

**T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GLOBOZOOSPERMİ VAKALARINDA KALSİYUM
İYONOFOR UYGULAMASININ ETKİLERİ**

Biyolog İpek Pınar ÇALICIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2011

T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GLOBOZOOSPERMİ VAKALARINDA KALSİYUM
İYONOFOR UYGULAMASININ ETKİLERİ

Biyolog İpek Pınar ÇALICIOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2011

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezindeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Bio. İpek ÇALICIOĞLU



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. FERTİLİZASYON	4
4.1.1. Spermde Meydana Gelen Değişiklikler	5
4.1.1.1. Kapasitasyon	5
4.1.1.2. Hiperaktivasyon	6
4.1.1.3. Akrozom Reaksiyonu	6
4.1.2. Oositte Meydana Gelen Değişiklikler	7
4.1.2.1. Kortikal Reaksiyon	7
4.1.2.2. Zona Reaksiyonu	7
4.1.2.3. Oosit Aktivasyonu	8
4.2. PRONUKLEUSLARIN OLUŞUMU	9
4.2.1. Erkek Pronukleuslarının Oluşumu	9
4.2.2. Dişi Pronukleuslarının Oluşumu	9
4.3. FERTİLİZASYON ANOMALİLERİ	10
4.3.1. Total Fertilizasyon Defekti (TFF)	10
4.3.2. Polispermik Fertilizasyon	10
4.3.3. Monopronukleus Oluşumu	11
4.4. SPERME AİT ANORMALLİKLER	12
4.4.1. Globozoospermi	12
4.3.2. Teratozoospermi	12
5. MATERYAL VE YÖNTEM	13
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER	13
5.2. ÇALIŞMA GRUBU	14
5.2.1. Hasta Seçimi	14
5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER	14

5.3.1. Sperm Hazırlama.....	14
5.3.2. Oosit Toplama İşlemi.....	15
5.3.3. Yumurta Soyma İşlemi	15
5.3.4. Mikroenjeksiyon İşlemi	15
5.3.5. İyonomisin İşlemi.....	16
5.3.6. Fertilizasyon Değerlendirmesi.....	16
5.3.7. Klivaj Değerlendirmesi	16
5.3.8. Gebelik Değerlendirmesi	17
5.3.9. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	17
6. BULGULAR	18
7. TARTIŞMA.....	21
8. SONUÇ.....	24
9. TEŞEKKÜR	25
10. KAYNAKLAR.....	26

SİMGE VE KISALTMALAR

Ca	: Kalsiyum
DMSO	: Dimetil Sulfoxide
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
ICSI	: İnter Sitoplazmik Sperm Emjeksiyonu (Mikroenjeksiyon)
IVF	: İnter Vitro Fertilization (Tüp Bebek)
HCG	: İnsan Koryonik Gonadotropini
OPU	: Oosit Pick Up (Oosit Toplama)
PN	: Pronukleus
PVP	: Polivinil Piroolidon
SAOAF	: Sperm Kaynaklı Oosit Aktive Edici Faktör
SNDF	: Sperm Nukleusu Dekondanse Edici Faktör
TFF	: Total Fertilization Failure (Total Fertilizasyon Defekti)
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)
ZP	: Zona Pellusida

İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 01.04.2011 tarih 01.04.2011/19 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi No : TBG/0472009

1. ÖZET

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası total fertilizasyon başarısızlığı, sperm veya oosit kaynaklı pek çok faktörden kaynaklanabilir. En önemli sperm faktörleri immotil sperm ve globozoospermi diye adlandırılan yuvarlak başlı spermelerdir. Yuvarlak başlı spermeler akrozomal membran ve akrozinden yoksundur. Bu yüzden onlar oosite penetre olma ve oositi aktive etme kapasitesine sahip değildir.

Bu çalışmada önceki denemesinde düşük fertilizasyon oranı elde edilen, globozoospermik, en az 5 matür oosit elde edilen 37 çift incelenmiştir. İkinci denemelerinde tüm matür oositlere ICSI sonrası kalsiyum iyonofor tedavisi yapılmıştır. Akrozoma sahip olmayan globozoospermilerin ancak bu şekilde oosit aktivasyonunu sağlayabilmesi beklenir. ICSI'den 20 saat sonra yapılan fertilizasyon kontrolünde pronukleus değerlendirmesi yapılmıştır. Fertilize oositlerin mitotik bölünme evresi olan klivaj ve embriyo transferlerini takiben elde edilen gebelik oranları değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirmede, önceki denemelerinde düşük fertilizasyon oranına sahip olan veya total fertilizasyon başarısızlığı yaşayan hastalara, oosit aktivasyonu amacıyla yapılan Ca^{++} iyonofor uygulamasının fertilizasyon oranlarını anlamlı olarak artırdığı gözlenmiştir. Fertilizasyon oranının artmasına bağlı olarak klivaj oranları ve vaka başına gebelik oranlarında da anlamlı artış gözlenmiştir.

Ca^{++} iyonoforun globozoospermik vakaların fertilizasyonu, klivajı ve vaka başına gebelik oranları üzerinde etkili olduğu söylenebilse bile canlı doğum oranlarıyla ilgili fikir sahibi olabilmek için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

2. SUMMARY

Total fertilization failure after ICSI may be explained by different factors related to oocyte or semen characteristics. The most important semen factors are total immotile or round-headed spermatozoa called globozoospermia. Round-headed spermatozoa lack the acrosomal membrane and acrosin contents. Therefore they not only lack the capacity of penetrate oocytes but also are deficient in their oocyte-activating capacity.

In this study, 37 patients of globozoospermia with a previous low fertilization rate, whose wife is under the age of 38 and has at least 5 mature oocytes. On their second attempt, all the MII oocytes were treated with ICSI , followed by calcium ionophore oocyte activation. Therefore oocyte activation can be possible with akrosom free globozoospermia. The fertilization control has been made 20 hours after ICSI by pronukleus check.

It has been observed during the evaluation carried out that fertilization rate of the application of Ca^{++} ionophore applied with the purpose of oocyte activation to the patients who has lower fertilization rate or total fertilization in previous studies, has been increased expressively. Also it has been observed that cleavage rates and gestation rates per incidence depending on fertilization rates have been increased expressively.

Even thought it may be said that the fertilization of globozoospermia incidences of Ca^{++} ionophore is effective on gestation rates per incidence and cleavage, more extensive studies must be done in order to gain insight about live birth rates.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Total fertilizasyon başarısızlığı, elde edilen oositlerin tamamının fertilize olmadığına işaret eder. Klinisyen ve hasta açısından oldukça moral bozucu bir durumdur. Fertilizasyon başarısızlığı, ICSI sonrası yaklaşık %30 oositte gözlenen bir olaydır. Fertilize olmamış oositlerde mayozdan mitozu geçiş olamaz. Bu başarısızlığın pek çok sebebi vardır (1).

İn vitro fertilizasyonda (IVF), işleme hazırlanan oosit ve spermin in vivo ortamda geçirdiği tüm yapısal ve kimyasal değişimleri geçirmesi sağlanır. Bu aşamalardan herhangi birinde sorun olursa fertilizasyon başarısızlığı gözlenir. Bu sorun oosit veya sperm kaynaklı olabilir.

ICSI'de spermin oosit sitoplazmasına verilmesi dolayısıyla fertilizasyonun gerçekleşmemesi halinde farklı alternatiflerin düşünülmesinde yarar vardır. Yapılan çalışmalarda elde edilen oosit sayısının ICSI'de total dölleme başarısızlığına neden olabileceği belirtilmiştir. Bu da ovaryan yanıtı iyi olmayan hastalarda elde edilen oositlerin sitoplazmik matürasyonlarının yetersizliğine bağlanmıştır (2). Bazı araştırmacılar ise soruna sperm faktörünü inceleyerek yaklaşmışlardır. Klasik IVF'de oositi dölleyecek spermin seçimi doğal yollarla gerçekleşirken ICSI'de sperm seçimi uygulayıcı tarafından yapılmaktadır. Bu nedenle özellikle immotil spermle çalışıldığında seçilen sperm ölü olabilir (3). ICSI'de fertilizasyonun gerçekleşmemesinin bir diğer sebebi de globozoospermidir. Globozoospermilerin akrozomal membran ve akrozinleri yoktur. Bu sebeple oosit aktivasyonunu sağlayamazlar (4).

Oositin fertilize olabilmesi için, spermin kapasitasyonunu tamamlamış olması gerekir (5). Buna ardışık olarak sperm motilitesinde hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi için Ca^{++} iyonlarının salınımı gereklidir. Sperm akrozomal membranı ile oosit plazmasının füzyonu geri dönüşümü olmayan ekzositotik bir olaydır (6).

Bu bilgiler ışığında planlanan çalışmamızda, fertilizasyon problemi yaşayan globozoospermi hastalarında oosit aktivasyonunu sağlamak amacıyla Ca^{++} iyonofor kullanımının fertilizasyon, klivaj ve gebelik oranlarına etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. FERTİLİZASYON

Fertilizasyon, gametlerin (sperm ve oosit) yeni bir bireyi meydana getirmek üzere nükleus ve tüm sitoplazmik komponentlerinin katılımıyla gerçekleşen bir olaylar zinciridir. İnsanda in vivo fertilizasyon tuba uterinaların ampulla bölgesinde gerçekleşir. İn vivo ve klasik IVF'te fertilizasyonun gerçekleşebilmesi spermle oositlerin karşılaşması, iki hücrenin teması ve spermle oosit sitoplazması içerisine girmesi sonrasında oositin aktive olmasıyla devam eden bir süreçtir ve aktive olan oositin iki hücreli embriyoyu meydana getirmesiyle sonlanır (7,8).

Fertilizasyonun gerçekleşmesi için spermle oositlerle bir arada bulunmaları gerekli, ancak yeterli değildir. Oositin fertilize olabilmesi için 1. mayoz bölünmeyi tamamlayarak 1. kutup cisimciğini atması, yani olgun oosit özelliklerini kazanması gerekir. Buna ek olarak, spermle ancak kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu tamamlayarak hiperaktivasyon hareket yeteneğini kazandıklarında döleyebilme kapasitesine sahip olurlar (7,9).

Başarılı bir fertilizasyon için gerekli aşamalar şunlardır:

- 1) Spermle kapasitasyonu
- 2) Spermle oositin zona pellusida takabasına bağlanması
- 3) Akrozom reaksiyonu
- 4) Zona pellusidaya penetrasyon
- 5) Plazma membranlarının füzyonu
- 6) Oositin 2. polar cisimciğini atması ve mayozu tamamlaması
- 7) Oositin metabolik aktivasyonu
- 8) Sperm nükleusunun dekondansasyonu
- 9) Pronükleusların oluşması (10).

İn vivo fertilizasyon için, spermle vajinaya bırakıldıktan sonra oositle karşılaşacakları ampulla bölgesine doğru ilerlerler. Serviksten fallop tüplerine geçiş için spermle uterusdaki silli epitelyum hücrelerinin salgılarına ihtiyacı vardır. Spermle serviksten tuba uterinalara ulaşması ortalama 4-7 saatlik bir zaman alır. İstmus bölgesine

ulaştıklarında hareketleri yavaşlar ve dururlar. Daha sonra ovulasyonla birlikte, oosit çevresindeki hücrelerin salgıladığı kemoatraktif maddelerin etkisiyle yeniden motilite kazanan spermeler tuba uterinaların en distal bölgesi olan ampullaya ulaşırlar.

IVF’de ise kapasitasyon, kültür medyumunda uyarılır. Ancak kapasitasyonunu tamamlamış spermeler zona pellusidaya bağlanabilir. In vivo fertilizasyonda oosit sitoplazmasına çıplak sperm nükleusu girerken, ICSI’de tüm sperm hücresi oosit içine enjekte edilir (11).

4.1.1. Spermde Meydana Gelen Değişiklikler

4.1.1.1. Kapasitasyon

Kapasitasyon, spermelerde yapısal bir değişikliğe neden olmayan ve genellikle akrozom reaksiyonunun tamamlanması için gerekli bir olgunlaşma süreci olarak kabul edilir. Spermelerin vajinadan tuba uterinalara ulaşması sırasında geçen sürece yayılan kapasitasyon sırasında spermelerin plazma membranlarında bazı değişiklikler gözlenir. Akrozomal kep bölgesindeki plazma membranından seminal plazma proteinleri ve glikoprotein örtü uzaklaştırılır. Yine bu süreçte sperm plazma membranındaki intramembranöz partiküllerin yer değiştirdiği gözlenir, intrasellüler kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir (12).

Spermeler kapasitasyonun bir bölümünü dışı genital kanallarında, bir bölümünü ise oositle karşılaştığında, kumulus-korona hücreleri tarafından salgılanan glikoproteinlerin etkisiyle tamamlayabilirler. Yani spermelerin, kapasitasyon özelliklerini oositle karşılaşmadan önce kazanmış olmaları gerekir. Kapasite olan spermelerde yapısal bir değişiklik gözlenmese de metabolik değişiklikler olur ve intrasellüler iyonların yeniden organizasyonu gerçekleşir. Moleküler düzeyde ise adenilat siklaz / protein siklaz aktivitesi yeniden düzenlenir ve nükleus proteinlerinde değişimler olur (10).

İn vitro kapasitasyon sırasında seminal plazmadaki dekapasitasyon faktörü uzaklaştırılmaktadır. Spermeler yeniden seminal plazma içine alındıklarında kapasitasyon özelliklerini kaybederler. Bu da kapasitasyonun geri dönüşümlü bir olay olduğunu gösterir.

4.1.1.2. Hiperaktivasyon

Kapasitasyon yeteneğini tamamlayan spermlerin motilite kinetiği değişir ve hiperaktive olurlar. Hiperaktivasyon, spermlerin kuyruk hareketlerindeki açılanmanın ve ileriye doğru olan hızının artması olarak tanımlanır. Spermin hiperaktive olması kuyruk hareketlerinin güçlenmesi ve böylece oositi çevreleyen hücresel yapıları daha kolay aşması için önemlidir (13).

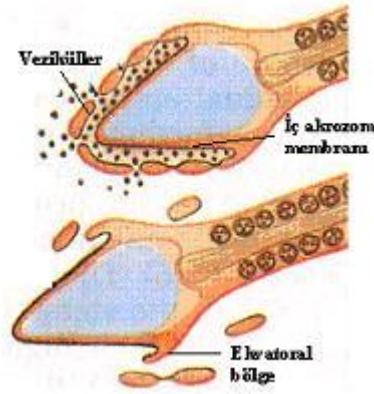
4.1.1.3. Akrozom Reaksiyonu

Akrozom reaksiyonu, sperm başında yer alan ve içi hidrolitik enzimlerle dolu olan yapının serbestleşmesi olayıdır. Akrozomal kep içeriğinin sperm başı etrafında dağılması spermde yapısal değişikliğe neden olur. Bu yüzden akrozom reaksiyonu kapasitasyonun tersine geri dönüşümü olmayan bir olaydır.

Akrozom reaksiyonu ancak spermin oositle karşılaştığı dönemde gerçekleşebilir. Bu reaksiyonu önceden tamamlayan spermler oositin kumulus-korona hücreleri arasında ilerleyemeyeceğinden, ilerlese bile zona pellusidaya penetre olamayacağından fertilizasyon başarısızlığı gözlenir (14).

Akrozom reaksiyonunun spermin oositle karşılaştığında geçirilmesi gereken bir değişim süreci olduğuna göre, zona pellusidanın bu olayın gerçekleşmesinde etkili olan yapılara sahip olması gerekir. Oosit yüzeyindeki transmembran proteinler olduğu düşünülen sperm reseptörlerinin bu dönemde rol oynadığı düşünülmektedir (9).

Akrozomal kep içeriği halinde zarla çevrili olan, endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi tarafından üretilen ve akrozom reaksiyonunda işlevi olan enzimler hyaluronidaz, asit proteinaz, ariminidaz, akrozin, esteraz, fosfataz, aril sülfataz, kollajenaz, fosfolipaz C, alfa- glukorinidaz ve nörominidazdır. Akrozom reaksiyonu tamamlandığında sperm başı yüzeyindeki hücre zarı ve dış akrozomal membran tamamen kaybolmuştur. Bu iki yapı sadece spermin ekvatoriyal segmentinde bozulmamış olarak kalır. İn vivo ve in vitro fertilizasyonda sperm-oosit birleşmesinin, spermin postekvatoriyal bölgesinde gerçekleştiği düşünülür. Çünkü burada hücre zarı intakt olarak kabul edilir. Akrozom reaksiyonu sonucu hidrolitik enzimlerin serbest kalmasıyla lokal olarak zona pellusida erir ve spermler perivitellin aralığa geçerler (15).



Şekil 1. Akrozom Reaksiyonu Sırasında Akrozom İç Membranına Bağlı Enzimlerin Açığa Çıkması (16)

4.1.2. Oositte Meydana Gelen Değişiklikler

4.1.2.1. Kortikal Reaksiyon

Gametlerin birleşmesi ve spermin oosit sitoplazmasına girmesinden hemen sonra oosit sitoplazmasının periferinde yerleşik olan kortikal granüller hücre yüzeyine salgılanarak polispermiye karşı blok oluştururlar. Bu olaya kortikal reaksiyon denir. Bu reaksiyon sırasında kortikal granüllerin oolemma'nın elektostatik yapısını değiştirerek salgılandıkları, salgılanmanın önce spermin oosite girdiği bölgeden başladığı ve dalgalar halinde tüm oosit yüzeyinde devam ettiği bilinmektedir. Kortikal reaksiyon sırasında her bir granül ayrı ayrı oolemma ile birleşerek içeriğini oosit yüzeyine boşaltır (11).

Kortikal granüllerin ekzositozunu başlatan mekanizma hücre içinde Ca^{++} artışına bağlı olarak gelişen bir olaydır. Nitekim oosit sitoplazması içine Ca^{++} enjeksiyonu, serbest Ca^{++} a bağlanan şelasyon ajanları ve oositin A 23187 veya amfoterin B ile muamele edilmesiyle kortikal reaksiyon başlatılabilmektedir (17).

4.1.2.2. Zona Reaksiyonu

Fertilize olan oositlerde zona pellusidaya bağlanmış spermilerin varlığı, zona pellusidanın diğer spermilerin oosite penetre olmasını engelleyici olduğu düşüncesine neden olmuştur. Fakat fertilize olan tavşan oositlerinin perivitellin aralıklarında da

spermlerin olabileceğinin gözlenmesi, polispermiye karşı blok oluşumunda zona pellusidanın tek başına değil, oolemma ile birlikte rol aldığını düşündürmüştür.

Zona reaksiyonu iki farklı yolla gerçekleşir :

- 1) Zona pellusidanın sperm bağlama yeteneği azalır, zona pellusida diğer spermlerin penetrasyonuna karşı direnç oluşturur.
- 2) Zona pellusidanın çözünürlüğe karşı direnci artar (18).

Zona reaksiyonu, zona pellusidadaki ZP2 ve ZP3 moleküllerinin modifikasyonu ile gerçekleşir. Bu gelişimde kortikal reaksiyon sırasında salgılanan proteazlar ZP2'nin proteolizisine neden olurlar. Zona reaksiyonu sırasında gerçekleşen olaylar in vitro fertilizasyon uygulamalarında daha da netleştirilmiştir. Zona reaksiyonunda ZP2 molekülünün yanı sıra ZP3 molekülü de değişime uğrar. ZP3 molekülündeki karbonhidrat içeriğinin sindirilmesine bağlı olarak sperm bağlama kapasitesinin kaybolduğu gösterilmiştir. Bu değişim de kortikal granüllerin içeriğinin özelliğinden kaynaklanmaktadır (18).

4.1.2.3. Oosit Aktivasyonu

Oosit aktivasyonunun spermin ooplazmaya girişini takiben sperm nükleusu dekonpanse edici faktörlerin (SNDFs) başlattığı düşünülmektedir. SNDFlerin girişinden sonra sperm başı şişer ve spermdeki perinükleer alandan oosit aktive edici faktörler (SAOAFs) salınır. Spermin oosite girişinden 4-5 saat sonra mayoz tamamlanır ve sperm başı dekonpanseasyonu gerçekleşir.

Oosit aktivasyonu ile hücre içi kalsiyum artışı 2 aşamada gerçekleşir :

- Hücre içi kalsiyum artışı ilk olarak(trigger) sperm-oosit membranlarının integrasyonu sonucu, oosit korteksinden başlar. ICSI sırasında ise bu doğal tetikleme yerine yalancı bir tetikleme ile aktivasyon sağlanır ve enjeksiyon ile kalsiyum akışı gerçekleşir. ICSI sırasında ilk kalsiyum artışı 20-30 dakika sonra başlar fakat bu yükselme tek başına oositi aktive etmeye yeterli değildir.
- 30 dakika sonra daha kısa süren, yüksek amplitüdü bir seri kalsiyum yükselmesi 3-4 saat boyunca devam eder (osilatör). Osilatör fonksiyonu, sperm kaynaklı oosit aktive edici faktörlere (SAOAFs) bağlıdır. Bu faktör ısıya duyarlıdır ve oositin hücre içi depolarındaki kalsiyum tekrarlayan salınımının frekansını kontrol eder.

Bu sinyalin tekrarlama özelliği oositin tam aktivasyonu için gereklidir. Osilasyon fonksiyonunun devamı için sperm demembranizasyonu gereklidir. Bu durum, osilatör fonksiyona sahip sitozolik sperm faktörünün serbestleşmesinin hızlanması açısından önemlidir (19).

4.2. PRONUKLEUSLARIN OLUŞUMU

4.2.1. Erkek Pronukleuslarının Oluşumu

Sperm çekirdek zarı, spermin oosit sitoplazmasına girmesinden sonra iç ve dış membranlarının birçok yerde birleşmesiyle veziküler bir yapı kazanır. Bu veziküllerin oosit sitoplazmasında dağılmasıyla vezikülleri çevreleyen membranlar yıkılır ve kondanse olmuş sperm kromatini ooplazmada serbest kalır.

Erkek pronukleuslarının oluşumu sperm nuklear zarının erimesiyle başlar, sperm kromatinin sitoplazmada dağılmasıyla devam eder ve pronuklear zar olarak nuklear zarın yeniden şekillenmesiyle tamamlanır.

Pronukleus zarının şekillenmesinde oosit sitoplazmasındaki endoplazmik retikulum görev yapar. Endoplazmik retikulumun dağınık halde bulunan kromatinin çevresinde yer yer birleşmeye başlamasıyla pronuklear membran şekillenir (11).

4.2.2. Dişi Pronukleuslarının Oluşumu

2. mayoz bölünmenin anafaz evresinde olan oosite ait kromozomlar sitoplazmada dağınık halde bulunurlar. Veziküller bir süre sonra kromozomların çevresinde toplanarak onları içlerine almaya başlarlar. Böylece veziküllerin birbirleriyle birleşmeleri sonucu dişi pronukleusu oluşur. Oluşan pronukleus zamanla genişleyerek yuvarlaklaşır ve içinde çekirdekçikler oluşmaya başlar.

Pronukleuslar zigot sitoplazmasının merkezine yerleştikten sonra birleşirler. Fakat pronuklear zarların erimesi sebebiyle mikroskopta gözlenemez ve bu döneme singami denir. Oosit sitoplazmasında merkezi yerleşim gösteren iki pronukleus ve perivitellin aralığındaki iki kutup cisimciği fertilizasyonun gerçekleştiğinin göstergesidir (11).



Resim 1: Merkezimizde Çekilen Bir Fertilize Oosit X 40 Büyütme

4.3. FERTİLİZASYON ANOMALİLERİ

4.3.1. Total Fertilizasyon Defekti (TFF)

Oositlerin hiçbirinin fertilize olmamasına total fertilizasyon defekti denir. Bunun birçok sebebi olabilir. Sorun oosit kaynaklı olabileceği gibi sperm kaynaklı da olabilir. Klasik IVF’de fertilizasyonun gerçekleşmemesi oositlerin immatür veya postmatür olmasından kaynaklanabilir. İmmatür oositlerde mayotik olgunluk yakalanamadığı için, postmatür oositlerde ise kortikal reaksiyon zamanlaması sebebiyle fertilizasyon gerçekleşmeyebilir (20). Spermilerin oosite ulaşmasında etkili olan baş anomalileri nedeniyle zona pellusidaya penetre olamadığı veya reseptör düzeyindeki bir problem sebebiyle fertilizasyonun gerçekleşmediği düşünülmelidir. Ayrıca inseminasyonun az sayıda ve yetersiz özelliklerdeki spermilerle yapılmış olması, sperm hazırlama tekniği veya mediumun içeriğine bağlı olarak kapasitasyonun gerçekleşmemesi veya inkübatör koşullarının yetersizliği söz konusu olabilir (21).

4.3.2. Polispermik Fertilizasyon

Polipronukleasyon en çok 3 pronukleus olarak gözlenir ve hem klasik IVF hemde ICSI sonrası gözlenen fertilizasyon anomalisidir. Daha az olmakla beraber oositlerin 4

veya 5 pronukleus içerdikleri de saptanabilir. 3 pronukleus klasik IVF’de dispermik fertilizasyon sonucu oluşur. İmmatür veya postmatür oositlerde kortikal reaksiyonun erken ya da geç olması polispermik fertilizasyona neden olmaktadır. ICSI’de 3 pronukleuslu zigotlar uygulama hatası sonucu 2 sperm verilmesinden veya oositin ikinci kutup cisimciğini atamamasından kaynaklanabilir. Üremeye yardımcı merkezlerde 2’den fazla pronukleus içeren zigotlardan gelişen embriyolar, iyi bir gelişim gösterebilir bile transfer edilmemelidir. Bu embriyoların transferi halinde genetik problemlerden dolayı abortusa neden olabileceği gibi aynı zamanda triploidik bebeklere de sebep olabilir (22).



Resim 2: Bir PN ve Üç PN

4.3.3. Monopronukleus Oluşumu (1PN)

Tek bir pronukleus varlığında yaklaşık 4 saat sonra ikinci bir değerlendirme yapılarak pronukleer durumun değişip değişmediği kontrol edilir. Bazılarında dişi pronukleus gelişmişken (ginogenetik), diğerlerinde ise erkek pronukleusu gelişebilir (androjenetik). Bu özellikteki oositler normal gelişimlerini tamamlayamazlar. 1 PN içeren oositlerin meydana gelişini açıklayan bir başka durum da erkek ve dişi pronukleuslarının birleşmesidir (singami). Bu durumda 1 PN diploiddir (18).

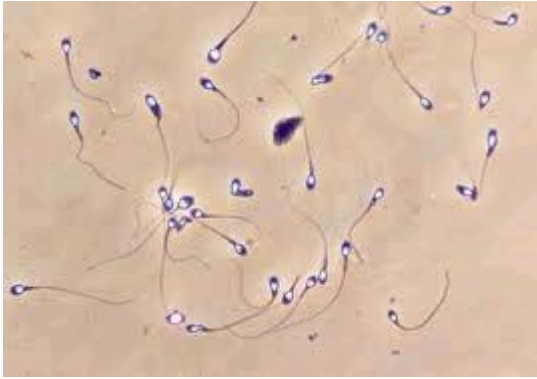
4.4. SPERME AİT ANORMALLİKLER

4.4.1. Globozoospermi

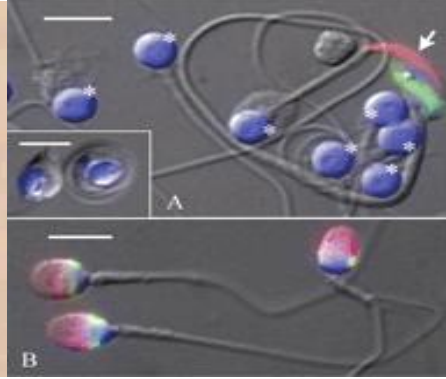
Globozoospermi, akrozomun komple yokluğunda nükleer yapı değişikliği ile , klasik yuvarlak başlı sperm görünümüne yol açar. Nadir rastlanan bu durumda sperm hareketli olmasına rağmen akrozomu ve postakrozomal kılıfı yoktur, ara parça ve mitokondrileri de normal değildir. Globozoospermide nükleer şekil bozuk ve mitokondri anormaldir. Bu nedenle globozoospermiden etkilenen erkekler infertildir ve IVF veya subzonal inseminasyondan fayda görmezler. Oositi aktive etme kapasiteleri yoktur (23).

4.4.2. Teratozoospermi

En sık görülen erkek infertilite sebebidir. Teratozoospermi ejakülatta referans değerinden daha düşük sayıda (%30) normal şekilli sperm bulunması olarak tanımlanır (24). Kruger'in kesin kriterlerine göre ise semende %16 'dan daha az normal sperm bulunmasıdır (25).



Resim 3: Teratozoospermi (26)



Resim 4: Globozoospermi (26)

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

Global	(Life Global LGGG 50)
Global For Fertilization	(Life Global LGGF 50)
All Grad % 100	(Life Global AGSS 100)
All Grad Wash	(Life Global GALW 100)
Paraffin Oil	(Life Global LGPO 100)
Protein Supplement	(Life Global LGPS 20)
PVP	(Life Global LPVP 2)
Hyase – 10X	(Vitrolife 10017)
HTF w/HEPES	(Life Global GMHH 100)
Sigma A23187	(Sigma Ca ionofor)
HCG	(Diagnostic Products Corp.)
DMSO	(Sigma D5879-100)

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

5.2.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmaya infertilite merkezimize çocuk sahibi olmak için başvurmuş hastalarından 38 yaş altı, herhangi bir kadın endikasyonu bulunmayan,indüksiyon sonucu en az 5 matur oosit (MII) elde edilen, globozoospermi tanısı konulan, geçmişinde düşük fertilizasyon başarısızlığı olan hastalar dahil edildi. Bu vakalar Ca^{++} iyonofor kullanılmayan ve Ca^{++} iyonoforla muamele edilen olmak üzere 2 grup altında değerlendirildi.

5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER

Çalışmaya alınan hasta grubumuza birden fazla oosit elde edebilmek amacı ile ovaryan stimülasyon uygulandı. Stimülasyon sırasında gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonist / antagonist ile rekombinant gonadotropinler kombine kullanıldı. Olgunlaşan oositler üriner insan koryonik gonadotropini (hCG) yapılarak, enjeksiyondan ortalama 36-40 saat sonra toplandı. Tedaviye alınan tüm hastalara eşit koşullarda aynı işlemler uygulandı.

5.3.1. Sperm Hazırlama

Tüm hastaların oosit toplama (OPU) günü mastürbasyon yoluyla toplanan semen örnekleri gradient yöntemiyle hazırlandı. Bu işlemde %90 ve %45'lik gradient medyumları (All Grad %100 Life Global) hazırlandı. Konik tüpün altına sırasıyla %90'lık üzerine %45'lik sperm grad medyumunu ve bunların üzerine de 1 ml semen örneği konuldu. Tüpler 1500 rpm de 12 dakika santrifüj edildi. Bir pipet yardımı ile gradient ve semen tabakaları geçilerek dipteki pellet alındı ve temiz bir tüpe aktarılıp 2 ml yıkama medyumunu (All Grad Wash Life Global) ile karıştırılıp 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar süpernatant alınarak sperm sayısına bağlı olarak 0.5-1 ml pellete kültür medyumunu eklenerek, %5 CO₂ ortamlı inkübatöre kaldırıldı.

5.3.2.Oosit Toplama İşlemi (OPU)

Oosit toplanması işlemi transvajinal ultrasonografi eşliğinde genel anestezi altında, çift lümenli steril iğne kullanılarak yapıldı. Foliküler sıvıda oosit aranması laminar air flow altındaki stereomikroskop yardımı ile gerçekleştirildi. Otomatik aspirasyon pompası içinde önceden ısıtılmış yerlerinde duran tüpler aspire edilen folikül sıvısı ile birlikte, laminar flow'un ısıtılmış yüzeyinde duran büyük petri kaplarına (Falcon 3803) döküldü. Oosit bulunduğunda, pastör pipeti ile oosit korona kümulus kompleksi alındı ve bir gün önceden etüve konulan üzeri yağ ile kapatılmış HTF w/HEPES solüsyonuna kaldırıldı. İşlem sırasında oosit kalitesini ve embriyo gelişimini etkileyebilecek olan ısı, osmolarite ve pH değişimlerini en aza indirmek için, oositler en kısa zamanda kültür medyumuna alınıp inkübatöre kaldırıldı.

5.3.3. Oosit Soyma İşlemi (Denudasyon)

Oositlere, OPU işlemini takiben 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1/3 oranında hyalüronidaz enzimi içeren HTF w/HEPES medyumunda 10 saniye süreyle pipetleme işlemi gerçekleştirildi. Kümulus hücrelerinden temizlenen oositler hyalüronidaz enziminden kurtarılmak amacıyla temiz damlalara alındı ve tekrar pipetlendi. Pipet çapı azaltılarak oositlerin etrafındaki tüm kümulus hücrelerinin temizlenmesi sağlandı. Pipetleme işlemi sonrası stereo mikroskop altında 100X büyültmede maturasyon değerlendirmesi yapıldı. I. polar cisimciği bulunan oositler metafaz II olarak değerlendirildi ve işlem yapılmak üzere tekrar inkübatöre kaldırıldı.

5.3.4. Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI)

Oositlerin denudasyon işleminden 45 dakika sonra Hoffman modülasyonu olan inverted mikroskobun ısıtıcı tablası üzerinde X400 büyütmede motil spermier seçildi. 12-15 mikrometre çapında mikropipetler ile hareket eden spermier toplanarak, sperm immobilizasyonunu sağlayan PVP'de ani bir hareketle sperm kuyruğunun kıvrılması ve sperm membranının zedelenmesi sağlandı. Bu işlem in vitro ortamda spermier kapasitasyon özelliğini kazanması için gerçekleştirilir. Mikroenjeksiyon pipeti ile alınan sperm, oositin

bulunduğu damlada oosite enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi sırasında oositi in vitro ortamda aktive edebilmek için, hafif bir sitoplazma aspirasyonu yapıldı. ICSI işlemi tamamlandıktan sonra bir gün önceden hazırlanan kültür mediumuna (LG for fertilization) konularak inkübatöre kaldırıldı.

5.3.5. İyonominin İşlemi

Ca⁺⁺ iyonofor (Sigma A23187) 1 mmol/L lik stok solüsyon olan dimetil sülfoksit (DMSO) de çözüdür. 10 µmol/L iyonofor içeren final solüsyonu ICSI den hemen önce IVF medyumunu (Global) ile dilue edilir.

ICSI sonrası inkübatöre kaldırılan oositler 30 dakika sonra iyonomininle muamele edilmek üzere laminar flow kabine alındı. 10 µmol/ L iyonofor A23187 (Sigma) içeren kültür medyumlarında 37° C , %5.5 CO₂ 'li ortamda 7 dakika muamele edildi. Daha sonra sperm enjeksiyonu yapılmış oositler iyonoforsuz taze kültür medyumuyla bolca yıkanarak inkübatöre kaldırıldı (27).

5.3.6. Fertilizasyon Değerlendirmesi

ICSI işlemini takiben 18. saatte inverted mikroskop altında Hoffman modülatörüyle ısıtıcı tablanın üzerinde incelenen oositlerde, biri oositten diğeri ise sperm hücrelerinden gelen iki adet pronukleusun, 1. ve 2. kutup cisimciğinin görölmesi fertilizasyon bulgusu olarak değerlendirildi.

5.3.7. Klivaj Değerlendirmesi

Laboratuvarımızda 2. günden 4. güne kadar olan klivaj dönemindeki embriyolar mitotik açıdan değerlendirilirken göz önüne alınan kriterler blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, embriyonun içediği fragmantasyon ve sitoplazma yapısıydı. Normal klivaj hızına sahip bir embriyo 24-25. saatte 2 hücre, 2. günde 3-4 hücre, 3. günde 6-8 hücre ve 4. günde birleşme işaretlerine bağlı olarak 10 ve üzerinde hücreye sahip olan embriyo olarak kabul edildi.

5.3.8. Gebelik Değerlendirmesi

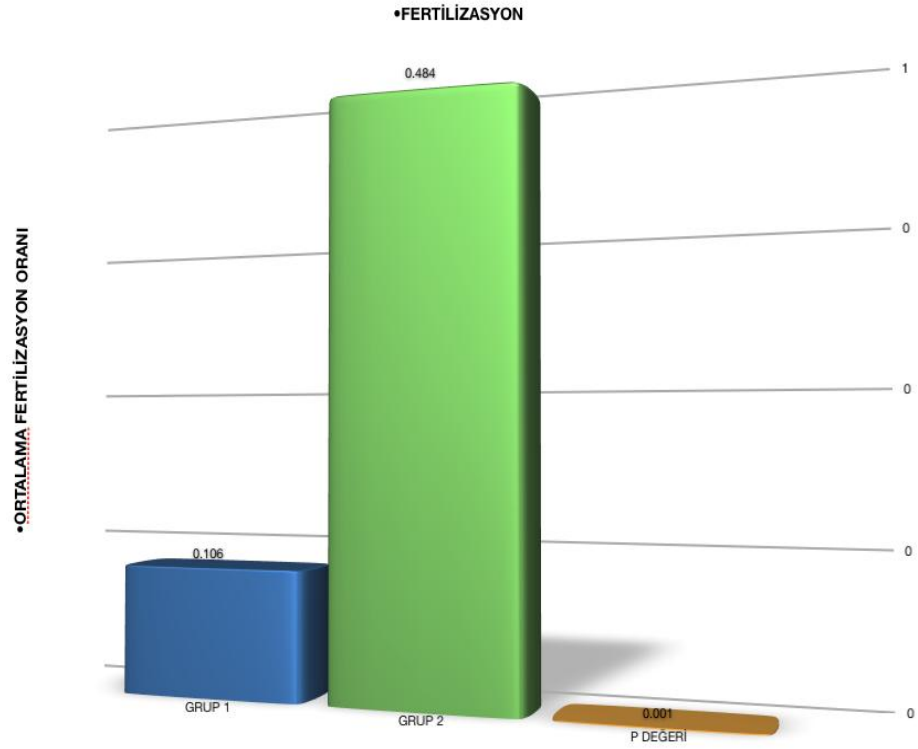
Oosit toplama tarihinden 15 gün sonra kanda yapılan β HCG testi sonucu 20mIU/mL'nin üzerinde çıkan değerler pozitif gebelik olarak değerlendirildi.

5.3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma grupları yaş ortalaması, ortalama MII oosit sayısı, fertilize olan oosit sayıları istatistiksel olarak "T Test" ile hesaplandı. Hastaların klivaj ve gebelik oranları "Chi-Square Test" ile hesaplandı. Anlamlılık sınırı $p < 0.005$ olarak alındı.

6. BULGULAR

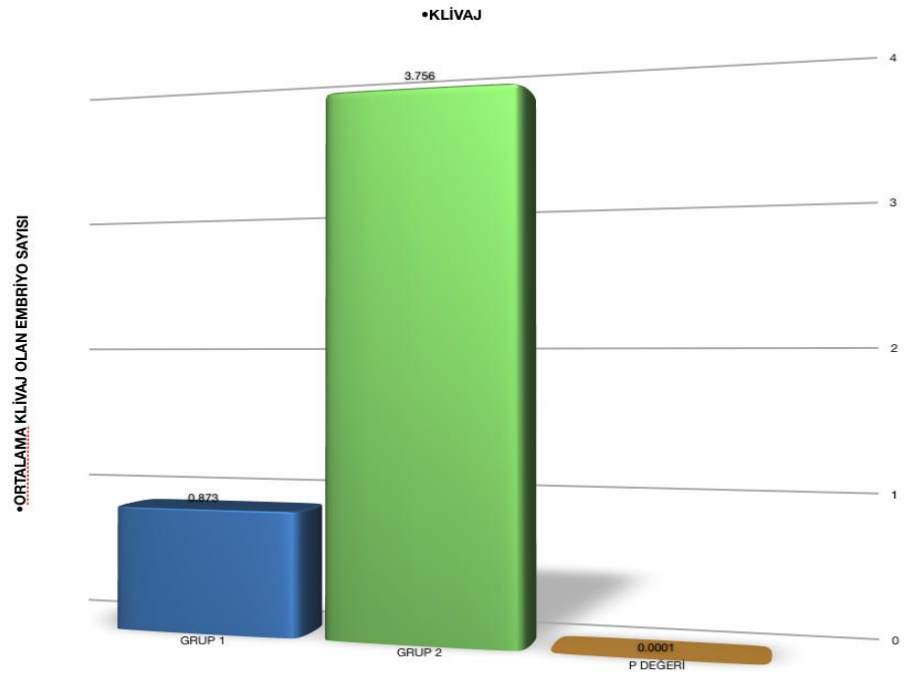
Çalışmamızda 37 çiftin dahil edildiği iyonominin tedavisinin fertilizasyon, klivaj ve gebelik sonuçları değerlendirildi. İyonominin, önceki denemelerinde total fertilizasyon başarısızlığı olan veya düşük fertilizasyon gösteren globozoospermi endikasyonlu hastalara faydası olup olmadığını tespit etmek amacıyla yapılan bu çalışmada, hastaların Ca^{++} iyonofor kullanılmayan ilk denemeleri ile Ca^{++} iyonoforla muamele edilen 2. denemelerindeki fertilizasyon, klivaj ve gebelik oranları karşılaştırıldı.



Şekil 2. Yapılan Çalışmada Grup 1 ve Grup 2 Arasındaki Fertilizasyon Oranları Farkı.
(Grup 1: ilk deneme, Grup 2: ikinci deneme)

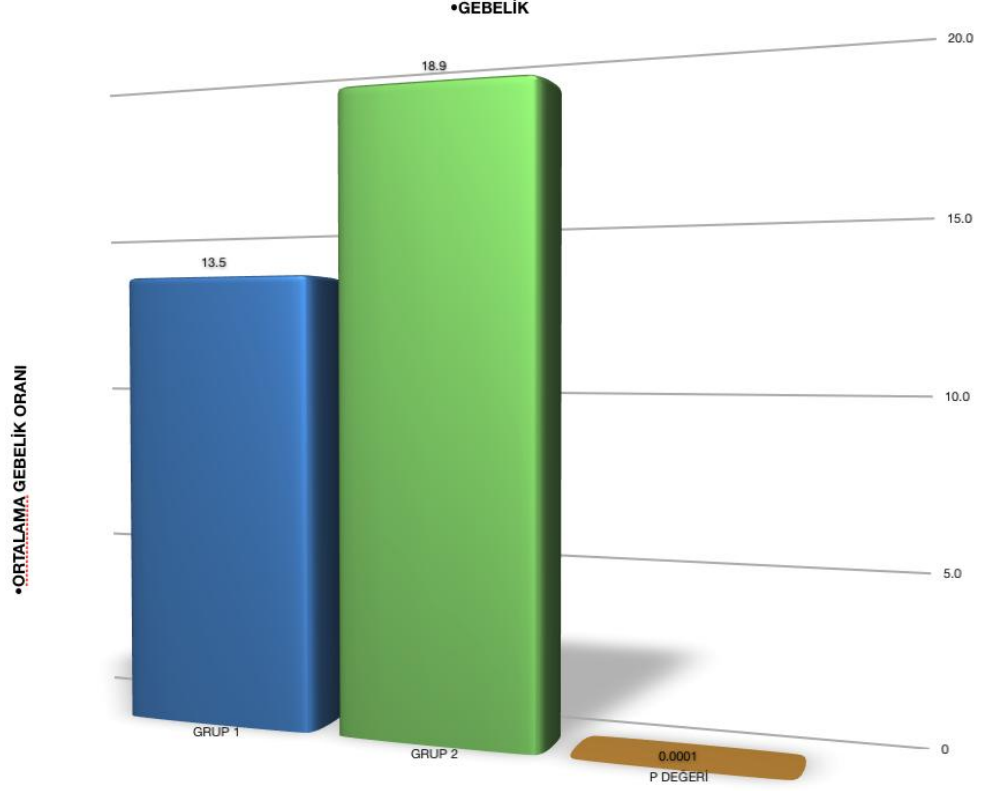
Çalışma grubunda 37 hasta bulunmaktadır. Bu hastaların yaş ortalamaları 30.018 ± 3.77 bulundu. Grup 1, bu hastaların Ca^{++} iyonofor kullanılmayan ilk denemelerine ait sonuçları içermekteydi, ortalama MII sayısı 8.189 ± 2.58 idi. Grup 2’de ise aynı hasta grubuna Ca^{++} iyonofor uygulaması yapıldı. 2. grubun ortalama MII sayısı 8.946 ± 1.99 idi.

Grup 1’de fertilize olan oosit sayısı ortalama 0.973 ± 1.00 olarak bulundu. Ca^{++} iyonofor uygulaması sonrası Grup 2’de fertilize olan oosit sayısı ortalama 4.216 ± 0.83 olarak bulundu. Grup 1 ve Grup 2’nin fertilizasyon oranları karşılaştırıldığında Grup 2’de anlamlı bir artış saptandı ($p < 0,0001$), (Şekil 2).



Şekil 3: Grup 1 ve Grup 2’nin Klivaj Oranları. (Grup 1: ilk deneme, Grup 2: ikinci deneme)

Yapılan değerlendirme sonucu klivaj oranlarının Grup 1’de 0.837 ± 3.75 iken Grup 2’de 3.756 ± 0.83 olarak bulundu. Klivaj oranlarının iyonofor kullanılan Grup 2’de, iyonofor kullanılmayan Grup 1’e oranla anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0,0001$), (Şekil 3).



Şekil 4: Grup 1 ve Grup 2’deki Vaka Başına Gebelik Oranları. (Grup 1: ilk deneme, Grup 2: ikinci deneme)

Grup 1 ve Grup 2 ‘nin gebelik oranları karşılaştırıldığında Grup 1 ‘in vaka başına gebelik oranı 13.5 ± 1.26 iken Grup 2 ‘nin 18.9 ± 1.06 olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$), (Şekil 4). Grup 1’de embriyo transferi iptal oranı %37,8 iken grup 2’de embriyo tansfer iptaline rastlandı. Embriyo transferi başına gebelik oranına bakıldığında ise grup 1’de % 21,7, grup 2’de ise %18,9 olarak bulundu ve anlamlı bir fark tespit edilmedi ($P = 0,363$).

7. TARTIŞMA

Fertilizasyon başarısızlığı, ICSI sonrası yaklaşık olarak %30 oositte gözlenen bir olaydır. Düşük fertilizasyon oranı; ICSI sonrası oositlerin %25 inden azının fertilizasyonu olarak tanımlanır (28). ICSI sonrası oluşan total fertilizasyon başarısızlığı ise %1.29 ile %3 arasında gözlenen bir olaydır (29).

Globozoospermi, teratosperminin nadir görünen bir çeşididir ve ilk olarak 1971 yılında tanımlanmıştır (21). Biyokimyasal olarak spermilerin akrozin ve kalisin eksikliğiyle karakterizedir (5). Globozoospermik vakalar akrozom eksikliği sebebiyle zona pellusidaya bağlanamaz ve oosit oolemmasıyla füzyonu gerçekleşmez (30).

Oosit aktivasyonu için, fertilizasyon sırasında hücre içine Ca^{++} salınımı gereklidir. Bu salınım, sperm-oosit füzyonundan sonra sperm kaynaklı oosit aktive edici faktörlerin serbest kalmasıyla sağlanır. Ca^{++} iyonofor, oosit aktivasyonu amacıyla ilk olarak 1990' larda kullanılmaya başlanmıştır (28).

Hoshi ve arkadaşları 1995 yılında fertilizasyon oranını arttırmak amacıyla ICSI sonrası oosit aktive edici olarak Ca^{++} iyonofor kullanmış ve ilk gebeliği rapor etmişlerdir (31).

Battaglia ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ilk denemesinde %7 fertilizasyon oranı elde etmiş globozoospermi hastasının fertilize olmamış oositlerine , ICSI den 20 saat sonra Ca^{++} iyonofor uygulamışlardır. Toplam oositlerin %79' unda fertilizasyon ve bölünme bildirmişlerdir. Aynı hastanın 2. denemesinde ICSI yapılan 28 oositin 8' ine Ca^{++} iyonofor uygulamış , kalan 20 oosite iyonofor uygulamamışlardır. İyonoforla muamele edilenlerin %75' i normal dölleme gösterirken, iyonofor kullanılmayanların sadece %10' u döllemiştir. Bu döllemeyen oositlere 20 saat sonra yapılan iyonofor uygulamasının sonucunda %73 fertilizasyon bildirmişlerdir. Fakat her iki denemede de gebelik elde edilmemiştir (32). Bu yaptığımız çalışmada da benzer şekilde Ca^{++} iyonoforun oosit aktivasyonunu sağlayarak fertilizasyon oranını arttırdığını gözlemledik.

Tejera ve arkadaşları globozoospermik bir hastanın eşinden toplanan 23 metafaz II oosite yapılan enjeksiyon sonrası, oositlerin 14 tanesine kimyasal bir işlem uygulamazken (Grup 1) , 9 adet oosite oosit aktive edici olarak Ca^{++} iyonofor uygulamışlardır (Grup 2). Grup 1' deki fertilizasyon oranı %35' ken, grup 2 deki fertilizasyonu %55 olarak

bildirmişlerdir. Grup 1' deki embriyo gelişimi yavaş ve zayıf kalitede devam ederken, Ca⁺⁺ iyonofor uygulanan grupta daha iyi bir bölünme oranı izlemişlerdir. Grup 2' deki 2 embriyonun transferi sonucu gebelik ve canlı doğum rapor etmişlerdir (28).

Birkaç nadir çalışmada normal fertilizasyon rapor edilmesine karşın globozoospermi, diğer teratozoospermilerle kıyaslandığında ICSI' de fertilizasyon oranlarını düşürür. Liu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da 7 globozoospermik hastanın 4 ünde ICSI sonrası total fertilizasyon başarısızlığı görülmüştür (21). Kalsiyum iyonofor ile oosit aktivasyonu artmış ve canlı doğumlar bildirilmiştir (32).

Bazı çalışmalar globozoospermisi olan erkeklerde kromatin kondensasyonu, yapısal ve numerik kromozom anormallikleri olmadığını ve yardımcı fertilizasyon teknikleri ile gebelikler elde edilebileceğini savunurken diğer çalışmalar; irregüler nükleer kondensasyon, düşük protamin 1 ve 2 seviyeleri, değişen P1 ve P2 oranları, yüksek seviyede nükleer histonlar ve artmış anöploidi oranları rapor etmiştir. Bu hastalarda ICSI ve oosit aktivasyonu fertilizasyonu gerçekleştirir ancak sağlıklı canlı bir gebelik sağlanabilir mi bilinmemektedir (33,34).

Spermlerde bulunan ve oositlerde putatif aktivasyonu sağlayan faktör ilk kez hamster sperm ekstraterlerinden 1997 yılında elde edilebilmiştir. Parrington ve arkadaşlarının bu çalışmasında osillin adı verilen oligometrik proteinin fare oositlerine enjeksiyonuyla Ca⁺⁺ un dalgalar halinde salgılanması (osilasyon) uyarılabilmektedir. Araştırmacılar bu proteinin karşıtı olan antikoru kullanarak bu molekülün hamster ve insan spermlerinin ekvatoriyal segmentine lokalize olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu da in vivo ve klasik IVF'de fertilizasyon sürecinde spermin oosite ekvatoriyal segment bölgesinden birleşmesinin nedenini daha iyi açıklayabilmektedir (35).

Lawrence ve arkadaşlarının deneysel çalışmasında fare oositlerinde spermin oosite bağlanmasının kesilmesine karşın Ca⁺⁺ dalgalanmalarının devam etmesi; sinyalizasyonun sperm bağlanmasıyla değil, fakat gametlerin membran füzyonundan sonra geliştiğini göstermiştir (36). Bu bulgular oosit aktivasyonunun reseptörlerce yönlendirilen bir olay olmadığını, spermin oosite aktardığı bir faktörün kalsiyum metabozilmasını etkilemesiyle gerçekleştiğini göstermektedir (37).

Fertilizasyon sürecinde oosit sitoplazması içinde kalsiyumun periyodik olarak artmasının klasik IVF ve in vivo fertilizasyonda benzer olması beklenir, ancak ICSI de fertilizasyon sürecinin birçok basamağı atlandığı için bu gelişmeler daha dikkat çekici

olarak değerlendirilmiştir. ICSI sonrası oositlerin nasıl aktive olduğu sorusuna ilk cevaplar Tesarik ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile gelmiştir (38).

Araştırmacılar ICSI de pipetin oosit sitoplazmasına sokulmasıyla oositin bir miktar mekanik yolla uyarıldığını ve uyarının aslında pipetin içinde sperm bulunmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmada oositin ICSI den sonraki 4-12 saat içinde aktive olduğu ve sürenin değişken olmasının oositler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu çalışmanın bir başka yorumu da; sperm tarafından oosite aktarılan SAOAF'nin Ca^{++} modülasyonunda etkin rol oynadığı ve aynı özelliklerin gerçekleşmesine karşın ICSI'den sonra fertilizasyonun klasik IVF ve in vivo fertilizasyondakinden bir miktar farklılık gösterdiğidir. Bu farklılıklar da aslında enjeksiyon prosedürünün kendisinden veya seçilen sperm özelliklerinden kaynaklanabilir. Ancak yapılan tüm araştırmaların sonucunda ulaşılan ortak görüş; oosit aktivasyonunda sperm tarafından oosite taşınan oositi aktive edici faktörün etkili olduğu yönündedir (19).

8. SONUÇ

- Bu çalışmada fertilizasyon problemi yaşayan globozoospermi hastalarında oosit aktivasyonunu sağlamak amacıyla Ca^{++} iyonofor kullanımının fertilizasyon, klivaj ve gebelik oranlarına etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.
- Bu amaçla önceki denemesinde düşük fertilizasyon oranı elde edilen, globozoospermik, en az 5 matür oosit elde edilen 37 çiftin ikinci denemelerinde tüm matür oositlere ICSI sonrası kalsiyum iyonofor tedavisi yapılmıştır.
- Çalışmanın sonucunda önceki denemelerinde düşük fertilizasyon oranına sahip olan veya total fertilizasyon başarısızlığı yaşayan hastalara, oosit aktivasyonu amacıyla yapılan Ca^{++} iyonofor uygulamasının fertilizasyon oranlarını anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir.
- Yapılan değerlendirme sonucu klivaj oranlarının iyonofor kullanılan Grup 2’de, iyonofor kullanılmayan Grup 1’e oranla anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir.
- Grup 1 ve Grup 2 ‘nin gebelik oranları karşılaştırıldığında; iyonofor kullanılan Grup 2’nin vaka başına gebelik oranı ile Grup 1’e göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu. Embriyo transferi başına gebelik oranına bakıldığında ise Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir gebelik oranı bulunamadı. Bunun yanı sıra Grup 1’de embriyo transferi iptal oranı yüksek iken Grup 2’de embriyo transfer iptaline rastlanmamıştır.
- Sonuç olarak fertilizasyon problemi yaşayan globozoospermi hastalarında Ca^{++} iyonofor kullanımının fertilizasyon, klivaj ve total gebelik oranlarını arttırdığı gözlenirken, embriyo transferi başına gebelik oranında anlamlı bir artış olmadığı bulunmuştur.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezim süresince beni her an destekleyen ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili tez danışmanım Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a,

İkinci tez danışmanım Prof. Dr. Tülay İREZ'e,

İş hayatımda ve Yüksek Lisans tezimde bana çok şey katan, bana inanan ve güvenen, bu tezin ortaya çıkmasında büyük emeği olan başta akıl hocam, sevgili ablam Pınar EROL HOROZAL olmak üzere çok sevgili iş arkadaşlarıma,

Bana zaman ayıran, tezimde yol gösteren, yardımlarını hiç eksik etmeyen değerli hocam Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e,

Tüm sabrıyla yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım İlknur KARAOSMANOĞLU'na

Eğitimim boyunca yardımlarını ve hoşgörülerini eksik etmeyen, birçok şeyi paylaştığım ve bundan sonra da her zaman yanımda olacaklarına inandığım sevgili dönem arkadaşlarım İpek YAŞA, Ebru KARAKAŞ, Tuğba VARLIK, Elif YILMAZ'a

Bu günlere ulaşmamı sağlayan, maddi manevi her türlü desteğiyle yanımda olan, bana hep güvenen ve beni hep seven biricik aileme,

EN İÇTEN TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

10 . KAYNAKLAR

1. Flaherty SP, Payne D, Matthews CD. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998, 13: 155-164.
2. Liu J, Nagy Z, Joris H. Et al. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod*, 1995, 10: 2630-2636.
3. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG. Et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1996, 11: 837-843.
4. Florke- Gerloff S, Topfer- Petersen E, Muller- Esterl W, Mansouri A, Schatz R, Schirren C, Schill W, Engel W. Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia*, 1984, 16(3): 187-202.
5. Yanagimachi R. Mammalian Fertilization In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J. New York, Raven Press, 1994: 135-185.
6. Yudin AL, Gottlieb W, Meizel S. Ultrastructural studies of early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Research*, 1988, 20: 11-24.
7. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Asisted Reproductive Techniques. Laboratory and Clinical Perspectives. Martin Dunitz, UK, 2011.
8. Trounson A, Gardner DK. Handbook of In Vitro Fertilization. CRC Pres, Florida, USA, 1993.
9. Avrech O, Fish B, Shalgi R. Acrosomal status of human spermatozoa after follicular fluid or calcium ionophore challenge in relation to semen parameters and fertilizing capacity in vitro. *Andrologia*, 1997, 29: 97-101.
10. Longo FJ. Fertilization. Chapman and Hall, 2nd ed., 1997.
11. Langman's Medical Embryology. Sadler TW, Lippincott Williams and Wilkins, 10th ed., Baltimore, First Week of Development: Ovulation to Implantation. 1988 : 35-37.
12. Tesarik J, Testart J. Treatment of sperm-injected human oocytes with Ca^{++} ionophore supports the development of Ca^{++} oscillations. *Biology of Reprod*, 1994, 51: 385-391.
13. Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril*, 1981, 35: 662-665.
14. Foltz KR. The sea urchin egg receptor for sperm. *Semin Dev Biol.*, 1994, 5: 243-253.

15. Wassarman PM. The biology and chemistry of fertilization. *Science*, 1987, 235-553.
16. <http://www.andrology.info/kapasitasyon-patofizyoloji.php>
17. K pker W, Diedrich K, Edwards RG. Principles of mammalian fertilization. *Current Theory and Practice of ICSI. Hum Reprod*, 1995, 13: 20-32.
18. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler, Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim. Bölüm1, Serono Yayınları 2000.
19. Bos- Mikich A, Swann K, Whittingham DG. Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate Mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1995, 41: 84-90.
20. Singh G. Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil*, 1992, 37: 99-102.
21. Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smitz J, Camus M, et al. Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod*, 1995, 10: 626-629.
22. Dandekar PV, Martin MC, Glass RH. Polypronuclear embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1990, 13: 266-274.
23. Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theco of mammalian spermatozoa and spermatids. *J Cell Biol*, 1987, 38: 677-687.
24. World Health Organization WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. 1999.
25. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1986, 46: 1118-1123
26. <http://anatomilab.com/default.asp?goster=androloji>
27. Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De Sutter P, Dhont M. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril*, 1997, 68: 1144-7.
28. Tejera A, Molla M, Muriel L, Remohi J, Pellicer A, De Pablo JL. Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril*, 2008, 90: 1202-1205.
29. Yanagida K. Complete fertilization failure in ICSI. *Hum Cell*, 2004, 17: 187-194.
30. Syms AJ, Johnson AR, Lipshultz LI, Smith RG. Studies on human spermatozoa with round-headed syndrome. *Fertil Steril*, 1984, 42: 431-5.

- 31.** Hoshi K, Yanagida K, Yazawa H. Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile spermatozoon. *Fertil Steril*, 1995, 52: 276-4.
- 32.** Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ. Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil Steril*, 1997, 68: 118-22.
- 33.** Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukçuoğlu Ş, Kahraman S, Biberoglu K. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod*, 1997,12: 1214-1217.
- 34.** Bourn H, Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm. *Fertil Steril*, 1995, 63(6): 1329-32.
- 35.** Parrington J, Swann K, Shevchenko VI. et al. Calcium oscillation in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*,1997, 379: 364-368.
- 36.** Lawrence Y, Whitaker M, Swann K. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{++} increase at fertilization in the mouse. *Devel*, 1997, 124: 233-241.
- 37.** Swann K, Lai FA. A novel signalling mechanism for generating Ca^{++} oscillations at fertilization in mammals. *Bio Assays*, 1997, 19: 371-378.
- 38.** Tesarik J, Sousa M, Testast J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1994, 9: 511-518.