TAM ZAMANLI (TIME LAPSE) TAKİP EDİLEN IVF HASTALARININ ANORMAL PRONÜKLEUS (MPN, 3PN, 4PN) VE NORMAL PRONÜKLEUS (2PN) GÖZLEMLENEN EMBRİYOLARINDA BLASTOSİSTE ULAŞMA ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

KÜBRA NUR UZUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet CINCIK

İstanbul

T.C. Maltepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2018

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kübra Nur UZUN "Tam Zamanlı (Time-Lapse) Takip Edilen IVF Hastalarının Anormal Pronükleus (MPN, 3PN,4PN) ve Normal Pronükleus (2PN) Gözlemlenen Embriyolarında Blastosiste Ulaşma Oranlarının Karşılaştırılması" başlıklı tezi 15/08/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi **oy birliğiyle / oy çokluğuyla** olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı. Adı ve Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Mehmet CINCIK	.....
Üye	: Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ	.....
Üye	: Prof. Dr. Özgür DUNDAR	.....

Prof. Dr. Zeliha ÖZER
Enstitü Müdürü

maltepe üniversitesi	ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI	Doküman No	FR-178
		İlk Yayın Tarihi	01.03.2018
		Revizyon Tarihi	
		Revizyon No	00
		Sayfa	1/1

Revizyon Takip Tablosu

REVİZYON NO	TARİH	AÇIKLAMA
00	01.03.2018	İlk yayın.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

16/08/2018

Ben Kübra Nur Uzun, "Tam Zamanlı (Time Lapse) Takip Edilen IVF Hastalarının Anormal Pronükleus (MPN, 3PN, 4PN) ve Normal Pronükleus (2PN) Gözlemlenen Embriyolarında Blastosiste Ulaşma Oranlarının Karşılaştırılması" başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarından bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilmeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; çalışmanın Maltepe Üniversitesinde kullanılan "bilimsel intihal tespit programı" ile tarandığını ve öngörülen standartları karşıladığını beyan ederim.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Kübra Nur UZUN

Hazırlayan İlgili Birim	Kalite Koordinatörü Dr. Öğr. Üyesi Şafak GÜNDÜZ	Kurumsal Yetkili Prof. Dr. Belma AKŞİT

(Dokuman No: FR-178; Yayın Tarihi: 01.03.2018; Revizyon Tarihi: ; Revizyon No:00)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, gerek tezimin planlanması, yürütülmesi aşamasındaki bilgi paylaşımı ve desteğiyle gerekse hayat tecrübeleri ile bana yol gösteren ve vakit ayıran saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Mehmet CINCIK'a

Tezimin istatiksel olarak değerlendirilmesi ve yorumlanması aşamalarında bana destek olan, her daim başarabileceğimi söyleyerek beni motive eden çok sevgili Deniz TEZER'e

Tüm hayatım boyunca her koşulda benim yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili annem Hülya UZUN'a ve babam Vahap UZUN'a

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Kübra Nur UZUN

Ağustos 2018

ÖZ

TAM ZAMANLI (TIME LAPSE) TAKİP EDİLEN IVF HASTALARININ ANORMAL PRONUKLEUS (MPN, 3PN, 4PN) VE NORMAL PRONUKLEUS (2PN) GÖZLEMLENEN EMBRİYOLARINDA BLASTOSİSTE ULAŞMA ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Kübra Nur UZUN
Yüksek Lisans Tezi
Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet Cıncık
Maltepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT), infertil çiftlerde gebeliğin sağlanması amacıyla uygulanır. Belirli aşamalardan oluşan YÜT sonucunda eldeki en iyi kaliteye sahip 1 ve /veya 2 embriyonun transferi sonrası gebelik ve canlı bebek doğumu sağlanabilmektedir. Ancak bu tedavi sürecindeki yumurtalardan her zaman istenilen özelliklere sahip embriyolar elde edilememektedir. Bu anormalliklerden bir kısmı da döllenmeyi takiben oluşması gereken iki pronukleusun (2PN) yerine bir veya ikiden fazla sayıda pronukleus (MPN, 3PN, 4PN) içeren embriyoların meydana gelmesidir. Oluşan anormal pronukleuslu bu embriyolardan bazıları kromozomal anomaliler içermektedir ve genellikle blastosist aşamasına ulaşamamaktadır.

Yapılan bu çalışmada aynı hastaların anormal pronukleus sonrası gelişen embriyoları ile 2PN sonrası gelişen embriyolarının blastosist aşamasına ulaşma oranları karşılaştırılmıştır. Toplam140 hastanın MPN, 2PN,3PN ve 4PN sonrası oluşan embriyoları listelenmiş ve elde edilen veriler analiz edilmiştir. Hastalardan toplanan toplam 1820 oositten, 1280 tanesi (%70,3) döllenmiştir. Pronükleer evrede bunların %11,41'i MPN, %83,13'ü 2PN ve %5,47'si 3PN, 4PN (MultiPN) olarak bulunmuştur. Bu embriyoların blastosiste ulaşma oranları ise MPN' de %17,1 , 2PN' de %60,8 ve MultiPN'de %42,8 olarak saptanmıştır. Sayısal veriler değerlendirildiğinde 2PN sonrası gelişen embriyolar ile MPN ve MultiPN sonrası gelişen embriyoların blastosist gelişim oranı arasında anlamlı fark bulundu. MPN ve MultiPN sonrası gelişen embriyolar arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı.

Sonuçlar anormal pronukleuslu embriyoların büyük çoğunluğunun blastosiste ulaşmadan duraksadığını (arrest) göstermiştir. Blastosiste ulaşanlarda ise literatürde, kromozomal anomali riski yüksek bildirildiğinden genetik tarama (PGD) önerilmektedir. Bu sebeple normal fertilize embriyoların varlığında anormal pronukleuslu embriyoların transfer için tercih edilmemeleri faydalı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: 1. anormal fertilizasyon ; 2. blastosist ; 3. ICSI ; 4. infertilite ; 5. MPN ; 6. MultiPN ; 7. time-lapse

ABSTRACT

COMPARISON OF THE RATES OF REACHING BLASTOCYST OF IVF PATIENTS EMBRYOS WHICH ABNORMAL PRONUCLEUS (MPN,3PN,4PN) AND NORMAL PRONUCLEUS (2PN) OBSERVED BY TİME LAPSE MONITORING

Kübra Nur UZUN
Master Thesis
Clinical Embriology Department
Thesis Advisor: Prof. Dr. Mehmet CINCIK
Maltepe University Health Sciences Graduate School, 2018

Assisted reproductive techniques (ART) are used to provide gestation in infertile couples. At the end of a process consisting to certain phases, through the transfer of the best quality 1 and/ or 2 embryos, pregnancy and live birth can be attained. However in this treatment process, embryos in features on demand can not to be attained from the eggs all the time. One of these complications is formation of embryos involving one pronucleus (MPN) or more than two pronucleus (3PN, 4PN) instead of the needed two pronucleus (2PN) following insemination. Some of these formed embryos with abnormal pronucleus consist chromosomal abnormalities and commonly can not reach to the blastocyst phase.

In this study we compared the ratios of reaching to blastocyst phase of the embryos developing after abnormal pronucleus and embryos developing after 2PN of the same patients. Embryos developing after MPN, 2PN, 3PN and 4PN of total 140 patients are listed and the datum are analyzed. 1280 (% 70) of 1820 oocytes collected from the patients are fertilized. It's found that 11,41% of them are MPN, 83,13% of them are 2PN and 5,47% of them are 3PN and 4PN (MultiPN) at the pronuclear stage. The rates of reaching to blastocyst phase of these embryos are detected as 17,1% in MPN, 60,8% in 2PN and 42,8% in MultiPN. Considering the numeric datum a significant difference has been detected between the embryos developing after 2PN and the embryos developing after MPN and MultiPN in terms of their blastocyst development ratios. There is no significant difference between the embryos developing after MPN and MultiPN.

The results point that a great majority of the embryos with abnormal pronucleus arrested before reaching blastocyst. As for those embryos having reached to blastocyst, genetic screening (PGD) is recommended because the risk of chromosomal abnormality is reported to be high in the literature. For this reason it will be useful not to prefer embryos with abnormal pronucleus for transfer in case of normal fertilized embryos are avaliable.

Keywords: 1. abnormal fertilization ; 2. blastocyst ; 3. ICSI ; 4. infertility ; 5. MPN ; 6. MultiPN ; 7. time-lapse

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZ iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ vii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
KISALTMALAR x
ÖZGEÇMİŞ xi
1. GİRİŞ 1
Problem 2
1.1. İnfertilite 2
1.2. Gamet Hücreleri 3
1.2.1. Sperm 3
1.2.2. Oosit 5
1.3. Oositlerin Toplanması (OPU) 7
1.4. Oositlerin Değerlendirilmesi 7
1.5. ICSI 8
1.6. Tam Zamanlı Takip (Time-Lapse) 9
1.7. Fertilizasyon Kontrolü 10
1.7.1. Pronükleus Değerlendirmesi 12
1.7.1.1. Mono Pronükleus (MPN) 12
1.7.1.2. Multi Pronükleus (MultiPN) 14
1.8. Blastosist Değerlendirmesi 16
Amaç 18
Önem 18
Sınırlılıklar 19

2. YÖNTEM 20
Araştırma Modeli 20
Evren ve Araştırma Grubu 20
Veriler ve Toplanması 21
Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 21
3. BULGULAR VE YORUMLAR 22
Bulgular 22
Yorumlar 27
4. SONUÇ 31
Yargı 31
Öneriler 32
KAYNAKÇA 34

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. : Hasta Sayılarına Göre Fertilize Oosit Sayıları 22

Tablo 3.2. : Pronükleus Sayılarına Göre Blastosist Gelişme Oranları 23

Tablo 3.3. : Fertilize Oosit Sayılarına Göre Pronükleus ve Blastosist Gelişimi Karşılaştırma Tablosu 24

Tablo 3.4. : Pronükleus Sayıları ile Blastosist Gelişimi Arasında Farklılık Tablosu 25

Tablo 3.5. : Pronükleus Sayısının Blastosist Gelişimi ile Korelasyonu Tablosu 26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. : Spermatogenez Aşamaları 4

Şekil 1.2. : Sperm Morfolojisi 5

Şekil 1.3. : Oogenez Aşamaları 6

Şekil 1.4.: Oosit Histolojik Kesiti 7

Şekil 1.5. : Normal Fertilizasyon 10

Şekil 1.6. : Fertilizasyon Gerçekleşmemiş Oosit 11

Şekil 1.7. : MPN Zigot Örnekleri 13

Şekil 1.8. : MultiPN Zigot Örnekleri 15

Şekil 1.9. : Blastosist Aşamaları 17

Şekil 3.1. : Pronükleus Sayılarına Göre Blastosiste Ulaşma Düzeyleri.....23

KISALTMALAR

ART: Assisted Reproduction Techniques

ATP: Adenosine triphosphate

DNA: Deoxyribo nucleic acid

GV: Germinal Vesikül

hESC: Human Embryonic Stem Cell

ICM: Inner Cell Mess

ICSI: Intra Cytoplasmic Sperm Injection

IVF: In Vitro Fertilization

MPN: Mono Pronucleus

MultiPN: Multi Pronucleus

OPU: Oocyte Pick-Up

PB: Polar Body

PGD: Preimplantation Genetic Diagnosis

PN: Pronucleus

ÜYTE: Üremeye Yardımcı Tedavi

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

ZP: Zona Pellusida

ÖZGEÇMİŞ

Kübra Nur UZUN

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Eğitim

Derece	*Yıl*	*Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı*
Y.Ls.	2018	Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Ls.	2015	Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı
Lise	2011	Kadıköy Anadolu İmam Hatip Lisesi

İş/İstihdam

Yıl	*Görev*
2015 - 2017	Biyoloji Öğretmeni ; Mehmet Rauf Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi

Kişisel Bilgiler

Doğum yeri ve yılı : İstanbul 1993 Cinsiyet: Kadın
Yabancı diller : İngilizce (iyi) , Arapça (başlangıç)
e-posta : knuruzun1@gmail.com

1. GİRİŞ

Günümüzde evli çiftlerin yaklaşık %10-15'i çocuk sahibi olamamaktadır (1). Bu oran genetik ve çevresel faktörlerin etkileriyle her geçen gün daha da artmaktadır.

İnfertilitenin çok çeşitli sebepleri vardır. Bu çeşitlilik dolayısıyla, uygulanan yöntemler her hastada aynı sonucu göstermemektedir. Tedavi uygulanan hastalardan toplanan yumurta sayısı bir kaç tane olabildiği gibi çok sayıda da olabilmektedir. IVF'te toplanan oositlerin yaklaşık % 10'unun implante olabilecek embriyo haline gelme potansiyeli vardır (2). En önemli nokta eldeki sınırlı sayıdaki embriyolardan hangilerinin transfer için seçileceğidir. Günümüzde IVF merkezlerinde çalışan embriyologlar genellikle morfolojik olarak değerlendirmeyle embriyo seçimi yapmaktadırlar (3). Ancak YÜT laboratuvarlarında standart olarak kullanılan bir zigot ve embriyo sınıflandırma sistemi bulunmamaktadır (4).

Embriyonun kalite değerlendirmesi morfolojik parametreleri; blastomer şekli ve sayısı, fragmentasyon oranı, sitoplazmik düzensizlikler, klivaj oranı ve multinükleasyondur (5). Ancak bu değerlendirme embriyonun kromozomal dizilimi hakkında bilgi vermediğinden sadece morfolojiye bakarak embriyo kalitesi hakkında kesin bir kanıya varmak imkansızdır.

Morfolojik parametreler dışında, tüm süreç boyunca gelişimin olması gerektiği şekilde ilerlemediği durumlar (anormallikler) özellikle dikkat edilmesi gereken noktalardır. Bu anormalliklerden bir tanesi de fertilizasyon kontrolü esnasında oluşması gereken iki adet pronükleus yerine ikiden farklı sayıda pronükleus (1, 3, 4 PN) görülmesidir. Bu istenmedik tablonun ortaya çıkmasında farklı etkenler rol oynar. Anormal fertilize oositlerin her birisi, oluşma şekline göre ya farklı aşamalara kadar gelişirler ya da daha ilk günden arrest olurlar. Kümülatif skorlama yapılan YÜT laboratuvarlarında prezigotik evrenin değerlendirilmesinde, pronükleus sayıları ve morfoloji ayrı bir önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışmada, pronükleer evre ve üçüncü gün morfolojilerinin ayrı ayrı değerlendirilmeleri sonrası implantasyon oranları, bu iki aşamanın birlikte değerlendirilmesi sonrası oranlarla karşılaştırılmıştır. Pronükleer morfoloji değerlendirilmesi sonrası implantasyon oranı %15,1, üçüncü gün morfoloji değerlendirilmesi sonrası implantasyon oranı ise %12,1 olarak bulunmuştur. İkisinin

birlikte değerlendirilmesi sonrası ise %21,1 implantasyon oranı gözlenmiştir. Bulgulara dayanarak sadece pronükleus veya belirli bir gün morfolojik değerlendirmesiyle embriyo seçimi yerine ikisinin birlikte değerlendirilmesinin tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir (6).

Problem

1.1. İnfertilite

İnfertilite 35 yaş altı bayanlarda bir yıl, 35 yaş ve üstü bayanlarda 6 ay korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması durumu olarak tanımlanır (7). Bu durum çiftleri sosyal ve psikolojik açıdan olumsuz etkilemektedir.

Kısır (infertil) çiftlerin tedavisi amacıyla kurulan Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Merkezleri, gelişen tıp ve teknolojiyle beraber çocuk sahibi olamayan çiftlerin yüzünü güldürmeyi başarmıştır. ÜYTE merkezlerine başvuran çiftler belirli parametreler açısından değerlendirilir ve problemin kaynağı saptanmaya çalışılır. Tedavi amacıyla başvuran çiftler incelendiğinde, kadına bağlı infertilite oranı % 40, erkeğe bağlı infertilite oranı %40 ve her ikisinde de problem görülme oranı %20 bulunmuştur (8).

Kadına bağlı infertilitede bir çok faktör etkilidir. Bunlardan en önemlileri; ovulatuvar disfonksiyon, endometriyozis, fallop tüplerinde anormallik, geçirilmiş pelvik cerrahi, yumurta rezervinin azlığı, serviks problemleri ve ileri yaştır (9). Her bir faktörün tedavisinde aşamaları farklı yöntemler izlenmektedir. Anne yaşı, uygulanan tekniğin türü, infertilite sebebi gibi klinik parametrelerin birlikte değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (10).

1.2. Gamet Hücreleri

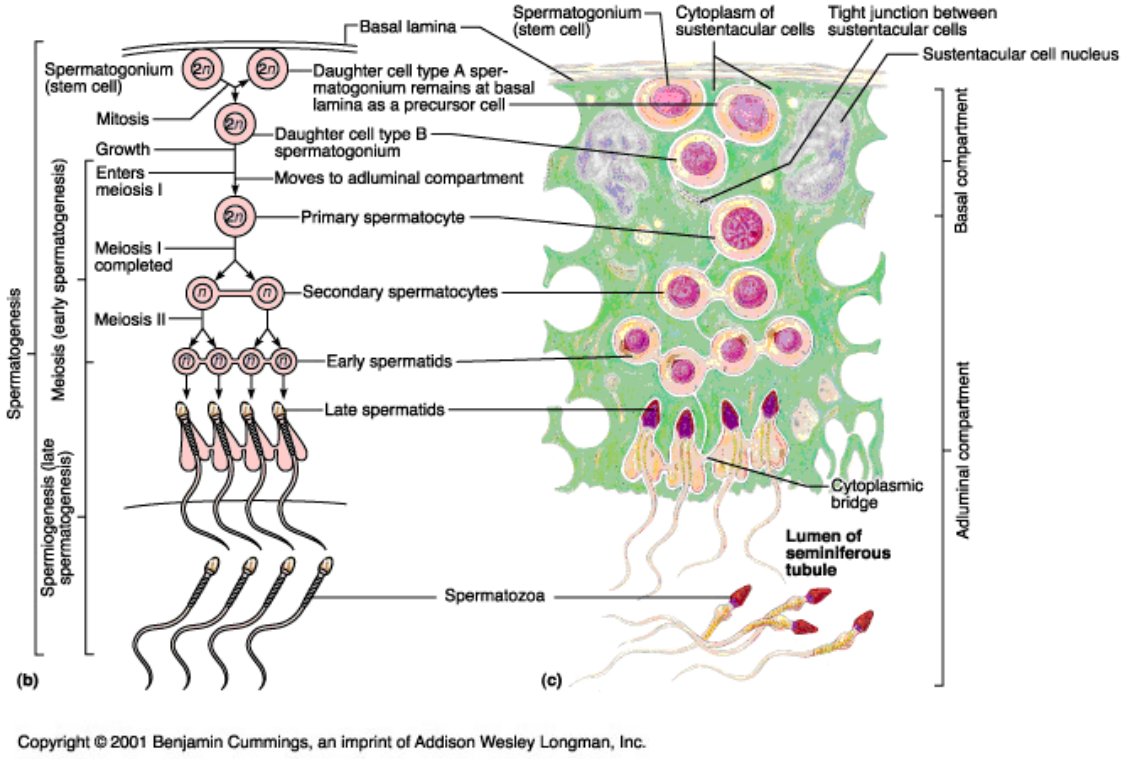
1.2.1. Sperm

Erkek üreme hücresi olan sperm, spermatogenez adı verilen bir dizi aşama sonucu oluşur. Bu süreç erkeklerde ergenlikte (puberte) hormonal uyarım ile başlar ve bir seri sperm oluşumu ortalama 74 gün sürer (11).

Spermatogenez seminifer tübüller içerisinde 3 aşamada gerçekleşir. Birinci aşama spermatositogenez olarak adlandırır. Bu aşamada spermatogonyum A hücreleri mitoz bölünme geçirir ve bir kısmı spermatogonyum B hücresine dönüşürken bir kısmı da spermatogonyum A olarak kalır. Spermatogonyum B hücrelerinin mitoz bölünmesiyle birincil (primer) spermatosit hücreleri meydana gelir ve ilk aşama biter (11,12,13).

İkinci aşama olan mayoz (spermatosit) fazında ise diploid kromozom ve 4 DNA içeren primer spermatosit hücreleri birinci mayoz bölünmeyi geçirir ve haploid kromozom içeren ancak diploid DNA'ya sahip olan ikincil (sekonder) spermatosit hücrelerini oluştururlar. Bunu takiben sekonder spermatosit hücrelerinin ikinci mayoz bölünmeyi geçirmesi sonucunda spermatid adı verilen hücreler gelişir. Spermatid hücreleri haploid kromozom ve DNA'ya sahiptir (11,12,13).

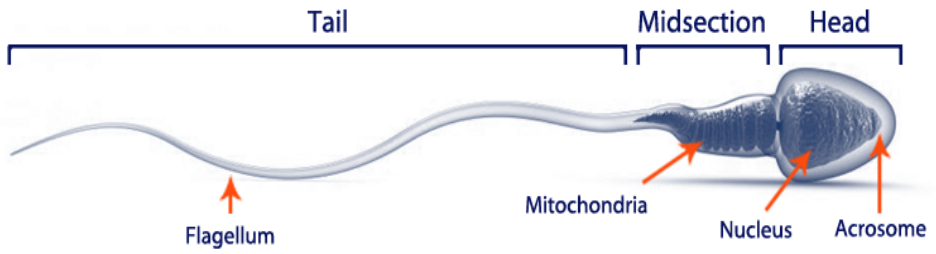
Son aşama spermiyogenezdir. Spermatidden olgun spermiyum oluşumuna kadar geçen süreç sertoli hücresi sitoplazmasında gerçekleşir. Erken spermatid hücreleri sırasıyla golgi, başlık, akrozom ve olgunlaşma fazlarını geçirir ve sonunda olgun spermiyumlar oluşur. Olgun spermiyumlar seminifer tübül lümenine atılırlar .Ancak bunların hareket ve dölleme yetenekleri yoktur. Hareket yeteneklerini ductus epididimiste; dölleme yeteneklerini (kapasitasyon) ise dişi genital kanalında kazanırlar (11,12,13). Yukarıda anlatılan süreç Şekil 1.1. de gösterilmiştir.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Şekil 1.1. : Spermatogenez Aşamaları

Olgun bir sperm hücresi morfolojik olarak incelendiğinde üç kısımdan meydana geldiği görülmektedir. Bunlar sırasıyla baş, orta bölüm ve kuyruktur. Baş kısmının içerisinde çekirdek vardır. Çekirdek genetik materyali taşır. Başın uç kısmında ise akrozom denilen yapı bulunmaktadır. Akrozom, içerisinde bulunan sindirim enzimleri sayesinde yumurta zarının eritilmesinde görev alır. Akrozom reaksiyonu sayesinde sperm yumurta içerisine girer. Spermin orta bölümünde (boyun) mitokondriler yer alır. Mitokondrilerin ürettiği ATP enerjisi kamçıdaki mikrotübüller tarafından kullanılarak hareket sağlanır. Kuyruk kamçı şeklindedir. Kamçı hareketleriyle spermin döllenme için yumurtaya doğru hızla hareketi sağlanır (Şekil 1.2.).

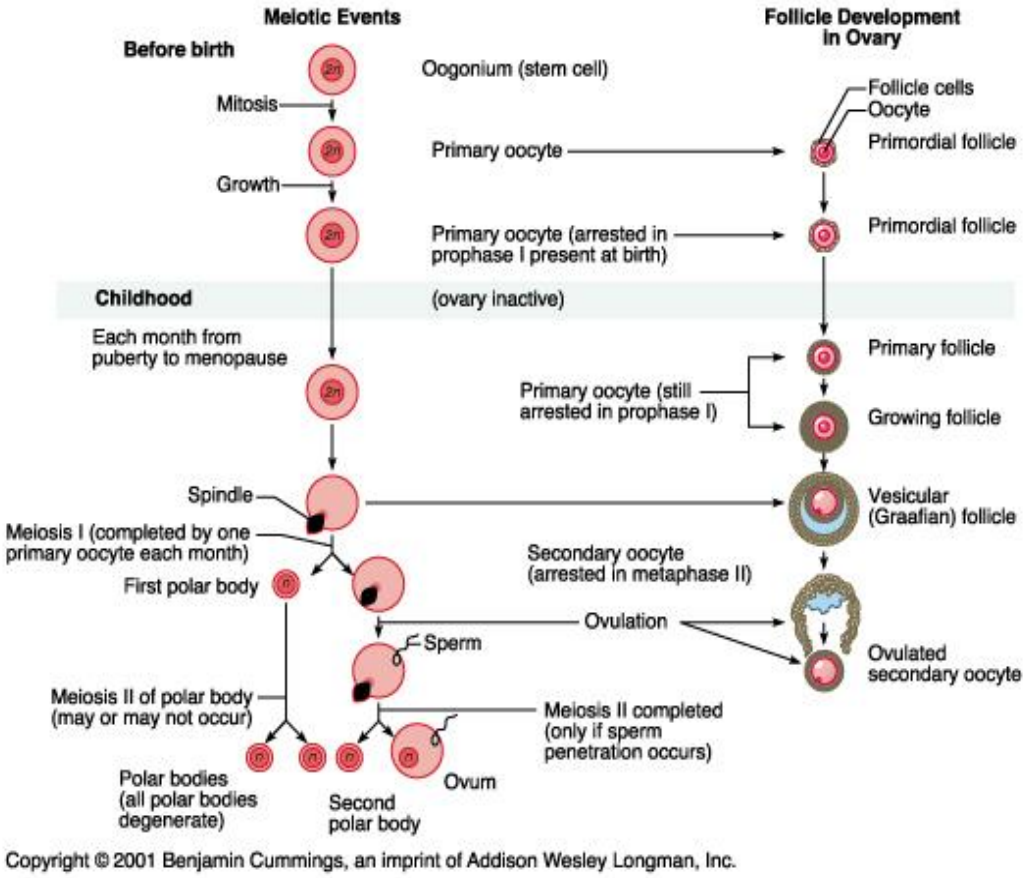


Şekil 1.2. Sperm Morfolojisi

1.2.2. Oosit

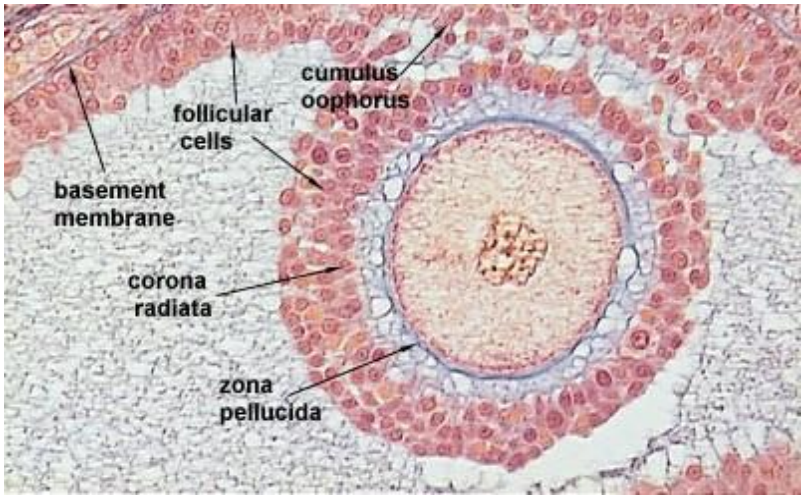
Dişi üreme hücresi olan yumurta (oosit) gelişimi, embriyonik dönemde primordiyal üreme hücrelerinin ovaryuma ulaşmasıyla başlar. Burada primordiyal üreme hücreleri oogonyumlara farklılaşırlar. Daha sonra, geçirilen ardışık mitozlarla birlikte primer oosite farklılaşma meydana gelir. Primer oositler birinci mayoz bölünmeyi geçirmeye başlar. Ancak bu primer oositler ergenlik dönemine kadar birinci mayoz bölünme profazının diploten evresinde beklerler. Kadınlarda, doğumdan sonra yeni oosit oluşumu meydana gelmediği için kadınlar belirli bir oosit rezerviyle dünyaya gelirler. Ergenliğe kadar bu oositlerin bir kısmı artreziye uğrar ve ergenlik döneminde her iki yumurtalıktaki toplam oosit sayısı 400.000 civarındadır (13, 14).

Ergenliğin başlamasıyla birlikte her menstrüasyon döngüsünde 5-15 tane primordiyal folikül olgunlaşmaya başlar. Ancak bunlardan genellikle sadece bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır. Primer oosit büyümeye başlar. Folikülün olgunlaşmasını takiben oosit birinci mayoz bölünmeyi tamamlar. Birbirine eş olmayan iki yavru hücre oluşur. Büyük olan sekonder oosit, küçük olan ise birinci kutup cismidir. Ovulasyonla birlikte sekonder oosit atılır. Sekonder oosit çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye girer ve metafaz aşamasında durur. Bu aşamada sekonder oosit ancak bir spermle döllenirse ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayabilir.Eğer döllenme gerçekleşmezse dejenere olur (14). Tüm bu süreç oogenez olarak adlandırılır ve Şekil 1.3. de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. : Oogenez aşamaları

Olgun bir oositin çapı yaklaşık 110-115 µm dir. Oosit, oolemma adı verilen plazma membranı ile sarılıdır. Oosit ve oolemmayı çevreleyen yaklaşık 15-20 µm genişliğinde, glikoprotein yapıda zona pellusida vardır. Oolemma ve zona pellusida arasında kalan kısma ise previtellin boşluk denir. Memeli oosit sitoplazmasına ise ooplazma denir. Ooplazma içinde genetik materyali taşıyan bir çekirdek vardır. Olgun oosit, zona pellusida ve previtellin boşluk dahil olmak üzere yaklaşık olarak toplam 150 µm çapındadır (15) (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. : Oosit histolojik kesiti

1.3. Oositlerin Toplanması (OPU)

Her hastaya, seçilen uygun tedavi yöntemine başlanmasıyla birlikte gonadotropik hormonlar kontrollü bir şekilde verilerek ovulasyon indüksiyonu yapılır ve hastalar belirli aralıklarla ultrason muayenesine çağrılır. Ultrason muayenesi sonucu yumurtalıktaki foliküllerin istenilen büyüklüğe geldiği görülünce hastaya uygun dozda çatlatma iğnesi (hCG) yapıldıktan 34-36 saat sonra yumurta toplama işlemi yapılır.

Yumurta toplanırken lokal ya da genel anestezi uygulanr. Ardından transvajinal ultrasonografi probunun ucundaki iğne ile overlere ulaşılır. Burada görülen her folikül içine girilir ve sıvı içerik aspire edilir. Alınan sıvı embriyoloji laboratuvarında mikroskop altında incelenir ve yumurta olup olmadığı kontrol edilir. Elde edilen yumurtalar kültür sıvısına konulur ve inkübatöre kaldırılır. Olgunlaşmış yumurtalar 2-4 saat inkübasyondan sonra döllenmek için hazırdır (16).

1.4. Oositlerin Değerlendirilmesi

Toplanan yumurtaların olgun (matür) olup olmadığını anlamak için üç kriter incelenir. Birincisi, ikinci mayoz aşamasında olup olmadığıdır. Bir yumurtanın ikinci

mayozda olduğunun en önemli göstergesi birinci kutup cisminin (polar body) varlığıdır. Eğer hiç kutup cismi görülmüyorsa yumurta birinci mayoz bölünme metafaz aşamasında olabilir. Böyle bir yumurta, matürasyon anomalisi yoksa 2-4 saat sonra ikinci mayoz aşamasına ulaşabilir. Ancak birinci mayoz profaz aşamasında olan bir yumurta olgun değildir ve germinal vesikül (GV) adını alır. GV, ICSI işleminde kullanılamaz (17).

İkinci kriter ise kümülüs hücrelerinin tiplemesidir. Toplanan oositler birkaç tabaka hücreden oluşan cumulus ooforus ile çevrilidir (15). Olgun bir yumurtanın etrafındaki kümülüs hücreleri arasındaki mesafe açılmıştır. Olgunlaşmamış bir yumurtada ise kümülüs hücreleri sıkı paketlenmiş şekildedir. Oositler ICSI işlemi öncesi bu kümülüs hücrelerinden temizlenir (17).

Son kriter ise oosit morfolojisinin değerlendirilmesidir. Değerlendirme yapılırken; santral granülasyon, refraktil cisim, vakuol, kutup cismi anormallikleri, previtellin aralık ve zona pellusidanın yapısına bakılır (17).

Yumurtanın morfolojisi ICSI işlemi için önemlidir. Anormal sitoplazma morfolojisi olan oositlerden normal döllenme ve erken embriyo gelişiminin elde edildiği rapor edilmiş. Ancak bu yumurtalardan elde edilen zigotların, normal morfolojili zigotlardan daha düşük oranda implantasyon potansiyeli gösterdiği belirtilmiştir (18). Yapılan başka bir çalışmada ise anormal oosit morfolojisi gösteren embriyolardan elde edilen klinik gebelik ve implantasyon oranları, normal oosit morfolojili embriyoların oranlarıyla benzer olarak kaydedilmiştir (19). Bu verilere bakıldığında, oosit morfolojisinin implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin henüz tam olarak açıklanamadığı görülmektedir.

1.5. ICSI

Klasik IVF'te yumurta ile spermler laboratuvar ortamında bir araya getirilir ve döllenmenin gerçekleşmesi beklenir. Ancak erkek infertilitesi, kadında düşük over rezervi gibi durumlarda IVF sonrası döllenmiş yumurta elde edilemeyebilir. Böyle vakalarda ICSI (mikroenjeksiyon) yöntemi tercih edilir. ICSI, yumurta hücresinin

seçilen tek bir sperm hücresi ile döllenmesi işlemidir. Günümüzde çoğu merkez ICSI'yi rutin olarak tüm hastalara uygulamaktadır. Bu yöntem uygulanırken, yumurta bir pipet (holdin pipette) ile kutup cisminin konumuna göre ayarlanarak tutulur. İçinde seçilmiş spermin bulunduğu mikropipet ile yumurta içine girilir ve sperm bırakılır. Böylece normal yollarla yumurta içine giremeyen sperm hücresi yumurta zarı engeline takılmadan yumurta içine girmiş olur.

ICSI yöntemi erkek kaynaklı infertilite olan çiftlerde mutlaka uygulanır. Bu hastalarda genellikle; düşük sperm sayısı, sperm hareket ve şekil bozuklukları, ejekülatta sperm olmaması, spermin yumurtaya penetrasyonu ile ilgili sorunlar görülmektedir. ICSI yapılan vakalarda, morfolojik değerlendirme ile seçilen spermlerin daha yüksek fertilizasyon oranına sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmaların çoğunda bu yöntemin etkinliği kanıtlanmıştır (20).

1.6. Tam Zamanlı Takip (Time- Lapse)

Tüp bebek tedavisinin uygulanmaya başlandığı ilk yıllarda embriyolar, gelişimlerinin takibi için günde bir kez belirli saatte standart inkübatörden çıkarılıp mikroskop altında tek tek incelenmekteydi. Bu uygulamada embriyolar günde sadece bir kere kontrol edildiği için bazı embriyolar hakkında yanlış izlenimler elde edilebiliyordu. Çünkü yumurtaların kaçıncı gün kaç hücreli ve nasıl olması gerektiği bilinmesine rağmen, her yumurta farklı zamanlarda farklı aşamalarda olabilmektedir.

Ayrıca embriyolar kontrol için inkübatörden çıkarıldığında oda koşullarında fazla bekletilmeden hemen geriye koyulmalıdır. Yoksa optimal koşullar dışındaki bir ortam dolayısıyla gelişmeleri sekteye uğrayacaktır. İşte bu yüzden embriyoların sürekli gözlem altında olabileceği ve günün istenilen anında değerlendirilebileceği bir yöntem ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Buna paralel olarak time-lapse teknolojisi geliştirilmiştir.

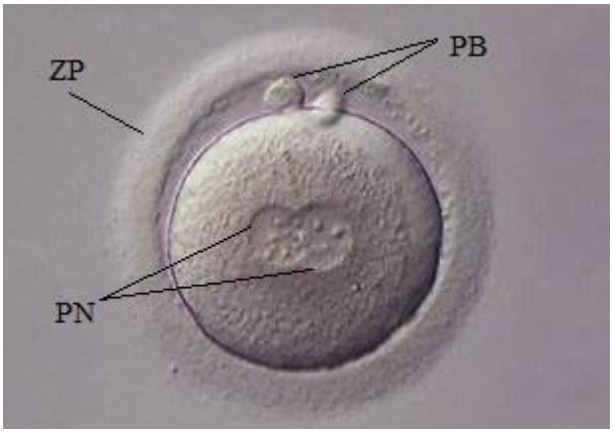
Time- lapse, içerisinde embriyolar için özel dişlerin bulunduğu ve bu dişlerdeki kameralar sayesinde belirli aralıklarla embriyoların fotoğraflarının çekildiği sistemdir. Bu çekilen fotoğraflar bir araya getirilerek videoya dönüştürülmekte ve embriyonun

hangi saatte hangi aşamada olduğu kesin olarak bilinebilmektedir (21). Dolayısıyla geriye dönük bilgi depolanması ve değerlendirilmesi mümkün olmaktadır.

Time- lapse ile birlikte embriyo gelişim sürecindeki, mekanizması ve zamanlaması bilinmeyen olaylar aydınlatılmıştır. Bunlardan bazıları sperm başı dekondensasyonu, polar body ve pronükleus oluşumudur (22). Yapılan bir çalışmada time- lapse ile takip edilen, ICSI den sonraki ilk hücre döngüsündeki insan oositlerinin ikinci polar body ve pronükleus oluşumlarının zaman bakımından farklılık gösterdiği kaydedilmiştir (23). Bu ve benzeri çalışmalar time-lapse teknolojisinin infertilite tedavisine kazandırdığı yeniliklerin kanıtıdır. IVF başarısını artıran kaliteli embriyo seçimi için kullanılan bu yeni bilgilerle gebelik oranlarının artması hedeflenmektedir.

1.7. Fertilizasyon Kontrolü

Yumurta ile sperm laboratuvar ortamında birleştirildikten sonra döllenmenin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilir. Kontrol ICSI işleminden sonraki 16-18. saatlerde yapılır. Normal bir fertilizasyonda yan yana merkezi konumlanmış iki tane pronükleus (PN) ve iki tane kutup cisminin (PB) varlığı gözlemlenir (24).(Şekil 1.5.)



Şekil 1.5. : Normal Fertilizasyon : PB: polar body **,** PN: pronükleus **,** ZP: zona pellusid

Zigotun oluşum mekanizması şu şekilde açıklanmıştır : spermin yumurtaya girmesi ile ikinci polar body oluşur ve ikinci mayoz bölünmenin devamını tetikler. Sonrasında oosit kromozomları bir membran ile kaplanarak dişi pronükleus oluşur. Aynı zamanda sperm çekirdeğinin dekondenzasyonuyla diploid embriyonun oluşmasını takiben erkek pronükleus meydana gelir. Dişi pronükleus ikinci kutup cisminin ve yumurta zarının altında yer alan erkek pronükleusun altında konumlanır. Ardından pronükleuslar mikrotübül ve mikrofilamentler yardımıyla yumurtanın merkezine doğru hareket ederler (25).

Eğer yumurtada döllenme gerçekleşmediyse hiç pronükleus görülmez (Şekil 1.6.). Başka bir olasılık da **anormal fertilizasyonun** gerçekleşmesidir. Böyle bir durumda normalde gözlemlenmesi gereken iki tane PN yerine, 1 ya da 3,4 tane PN görülür. Bizim çalışmamızda veriler time- lapse takip olanağı ile elde edilmiştir. Klasik inkübasyon ile takip edilenlerde; MultiPN, multinükleasyon, direkt üçe bölünme gibi anomaliler embriyonun sonradan kendini tamir edebilme yeteneği sebebiyle atlanabilir. Bu embriyolar değerlendirilirken dikkatli olunmalıdır.



Şekil 1.6. : Fertilizasyon gerçekleşmemiş oosit

1.7.1. Pronükleus Değerlendirmesi

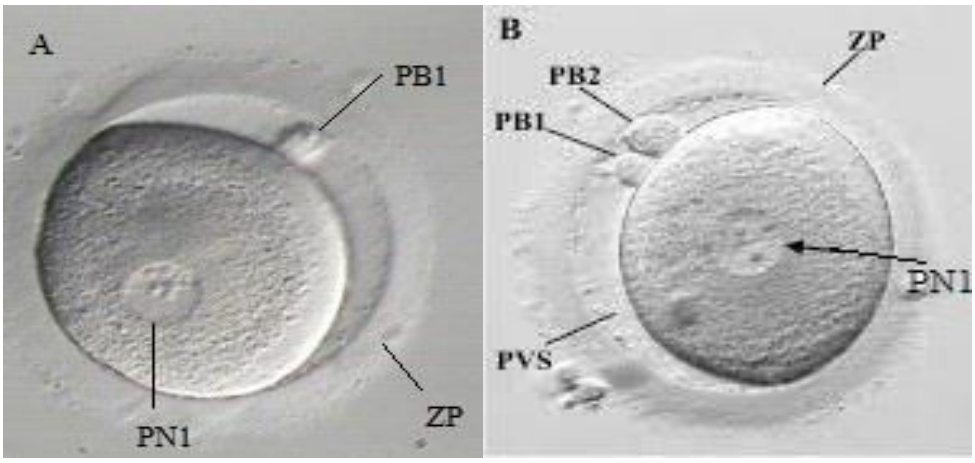
Pronükleus aşamasındaki embriyolar değerlendirilirken: pronükleusların sayısına ve büyüklüklerine, nükleolusların sayısı, büyüklükleri ve dağılımlarına ve son olarak da sitoplazmik boşluğa dikkat edilmelidir (26). Bunlara göre özel pronükleus evresi skorlama sistemleri geliştirilmiştir.

Pronükleer morfoloji değerlendirilmesinde iki sistem yaygın olarak kullanılır; Scott ve Smith 1998 (27) ve Tesarik ve ark. 2000 (28). Balaban ve ark. ideal pronükleer yapıda olan embriyoların üstün kaliteli blastosist oluşturduğunu ve ideal yapıda olmayanlara kıyasla yüksek implantasyon ve gebelik oranları olduğunu göstermişlerdir (29). Ancak başka bir çalışmada embriyo derecelendirmesinde pronükleer skorlamanın faydalı olmadığı rapor edilmiştir (30). Ortaya çıkan farklı sonuçlar doğrultusunda sadece pronükleer morfoloji değerlendirmesiyle değil de blastosist aşamasına kadar ki tüm sürecin kümülatif değerlendirilmesiyle kaliteli embriyoların seçiminin daha doğru olacağı düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda pronükleus sayısında anormallik görülen embriyolar incelenmiştir. Bu anormalliklerin ortaya çıkma mekanizmaları alt başlıklarda açıklanmıştır.

1.7.1.1. Mono Pronükleus (MPN)

Fertilizasyon sonrası embriyoda sadece bir tane pronükleus (MPN) görülmesinin sebepleri, bir çok araştırmacı tarafından incelenmiş ve aydınlatılmaya çalışılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre IVF ve ICSI işlemlerinden sonra embriyoların % 2,7-17'sinde MPN ve bir ya da iki PB görüldüğü kaydedilmiş ve genellikle MPN olan embriyoların iki PB'ye sahip olduğu belirtilmiştir (31) (Şekil 1.7.). Plachot ise IVF ya da ICSI de MPN görülme sıklığının %1 civarında olduğunu söylemiştir (32).



Şekil 1.7. : MPN Zigot Örnekleri : A: 1PN, 1PB , B: 1PN, 2PB ; pn: pronükleus, pb: polar body , pvs: perivitellin aralık , zp: zona pellusida

"Naggy ve ark.", pronükleus oluşumunun IVF oositlerinin %45,7'sinde asenkronize olduğunu göstermiştir (33). Ancak genellikle ikinci pronükleus, ilk pronükleustan otuz dakika sonra görülebilmektedir. Bu sebeple MPN embriyoların ilk döllenme kontrolünden 4 saat sonra ikinci pronükleus var mı diye tekrar kontrol edilmesi gerektiği belirtilmiştir(34).

IVF'in ilk yıllarında MPN görülen zigotların, spermatozon ile fertilizasyondan ziyade partenogenetik aktivasyondan kaynaklandığı düşünülmüştür (35). Yapılan bir çalışma sonrası MPN zigotların yaklaşık %45'inde sperm penetrasyonu bulguları görülmüştür. Görünür sperm başı ya da nükleus benzeri yapıları olmayan oositlerde, sperm kromatininin tam parçalanma ya da birleşmeye uğramış olabileceği sonucuna varmışlardır (36). Ayrıca preimplantasyon genetik taramanın (PGD) ortaya çıkışı ile bu MPN zigotların genetik yapısı içindeki Y kromozomu varlığının bulunması döllenmenin gerçekleştiğinin kanıtı olarak kaydedilmiştir (37). Y kromozomu içermelerine rağmen MPN'den gelişen embriyoların çoğunun anöploid olduğu bulunmuştur (38).

MPN varlığının, döllenme sürecindeki pronükleus oluşumu ya da füzyonundaki hatalar nedeniyle olabileceği kaydedilmiştir (39). Erkek ya da dişi kromatidlerinin

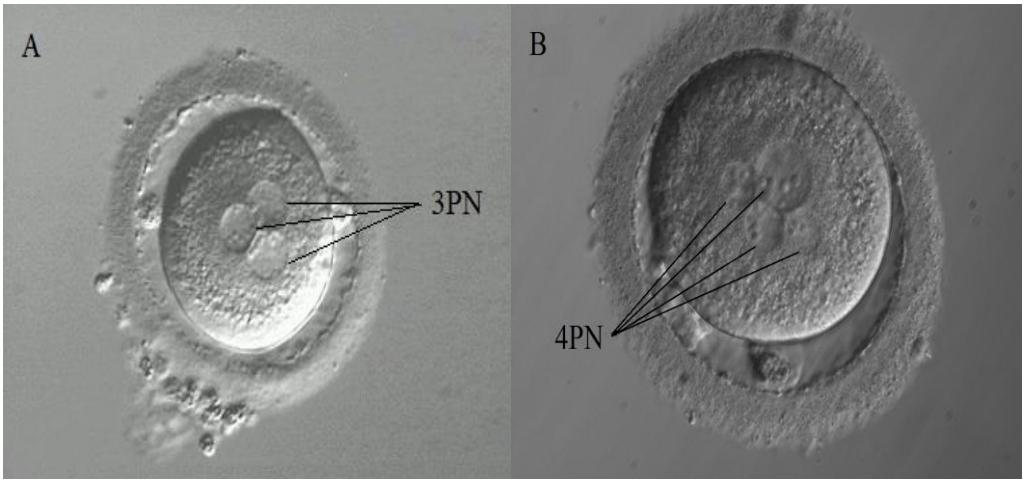
pronükleus oluşturmadaki başarısızlığı MPN görülmesine sebep olur. "Flaherty ve ark." pronükleus oluşumu başarısızlığını %20 sperm injeksiyonuna,%28 dekondense sperm başının engellemesine ve %52 oranında sperm başının kısmi ayrışmasına dayandırmıştır (40).

Aktif ama döllenememiş embriyolardan bazılarında dekondense sperm başı nedeniyle MPN ve 2PB görüldüğü belirtilmiştir (41). MPN ve 2PB görülen embriyolarda pronükleusun genellikle kadın kökenli olduğu bulunmuştur (22).

MPN embriyoların oluşması bir başka kaynakta da pronükleusların asenkronize ortaya çıkmasına, dişi ve erkek pronükleusun birleşmesine ve erkek veya dişi partenogeneze dayandırılmıştır (41). Pronükleusların asenkron görünümü MPN'den gelişen embriyolarda biparental diploidinin varlığını açıklayan ilk olasılık olarak değerlendirilmiş ve böyle embriyoların bazılarının transfer edilebilir olduğu belirtilmiştir (42). Erkek ve dişi pronükleuslarının tek bir zar örtüsü altında birleşmesi büyük bir pronükleus oluşturur bu da MPN görülmesini açıklar. Büyük bir pronükleus doğru kromozom bileşeni içerdiğini düşündürür.

1.7.1.2. Multi Pronükleus (MultiPN)

Fertilizasyon kontrolü aşamasında beklenen 2PN yerine ikiden fazla sayıda (3,4) pronükleus görülmesi MultiPN olarak adlandırılır (Şekil 1.8.) ICSI işlemi sonrası oositlerin sadece %1'inde 3PN oluştuğu kaydedilmiştir (24). Bu oran IVF'te %5'tir. "Feenan ve Herbert" ikiden fazla pronükleus varlığının genetik bozukluklarla ilişkili olduğunu düşünmüştür. 3PN embriyoların %61,8'inin triploid kromozom bileşenine sahip olduğu, %25,2'sinin mozaik dizilişe sahip olduğu ve sadece %12,6'sının diploid kromozom seti taşıdığı sonucuna varmışlardır (43).



Şekil 1.8. : MultiPN Zigot Örnekleri : A: 3PN , B: 4PN

İkiden fazla pronükleus oluşumunu: ikinci kutup cisminin ekstrüzyona tabi tutulamaması, ekstrüde olmuş kutup cismine tamamlanmamış kromatid ayrımının gerçekleşmesi ve oosit kromatidlerinin ikinci kutup cismi oluşumunda dağıtılması olaylarının tetiklediği düşünülmüştür (44). 3PN ve 2PB olan embriyoların büyük olasılıkla maternal kromatidlerin ikinci kutup cismine eksik dağılımından kaynaklandığı vurgulanmıştır (45).

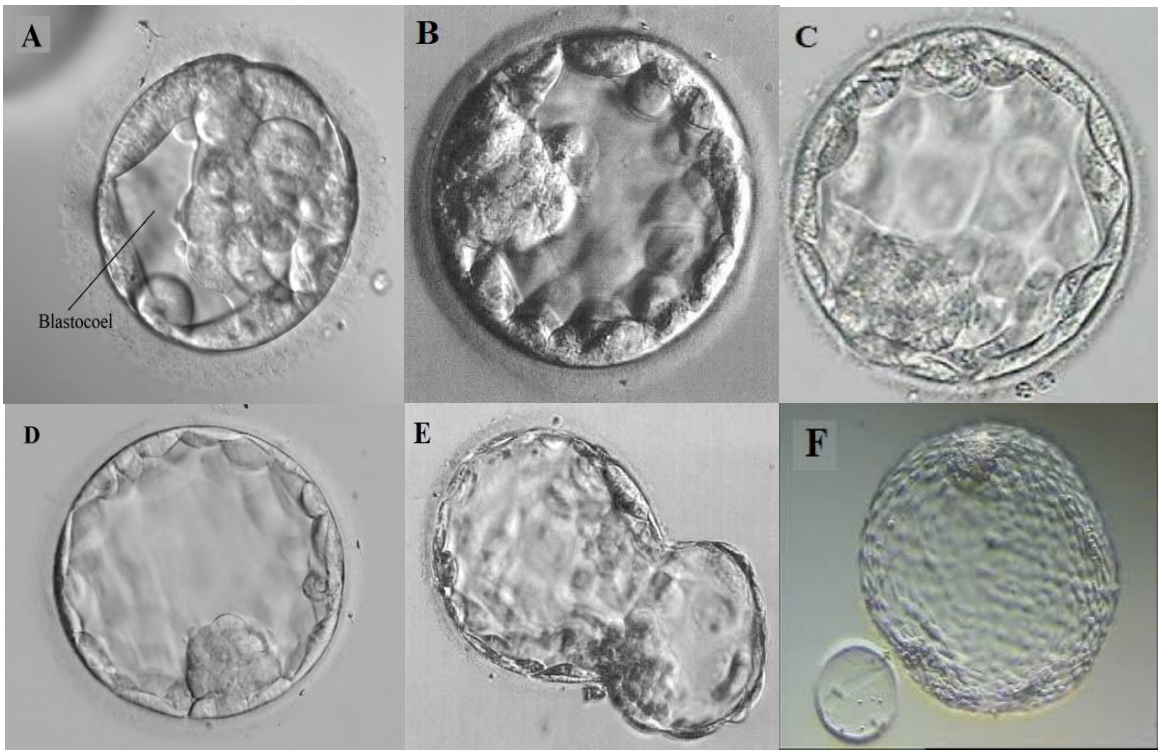
3PN görülmesinin temelde üç nedeni vardır. Birincisi ve en sık görüleni yumurtanın iki tane spermle döllenmesidir. İkincisi yumurtanın iki nükleuslu tek bir spermle döllenmesidir. Üçüncüsü ise iki nükleuslu bir oositin tek nükleuslu bir spermle döllenmesidir (46). Polisperminin, oositin gelişmemişliği ya da aşırı olgunluğu, sperm konsantrasyonu, kalıtsal kusurlar ya da oosit toplama sırasında zona pellusidada olan kırıklar dolayısıyla gerçekleşebileceği belirtilmiştir (47). Diandry en yaygın fertilizasyon anomalilerinden biridir ve genellikle 3PN ve 2PB olarak gözlemlenir. Bu durum sitoplazmaya iki spermin girmesinden dolayı oositin polispermiye karşı korumayı tetikleyememesi nedeniyle ortaya çıkar. Sık sık klivaj meydana gelir (24). Digyny ise iki nükleuslu bir oositin bir spermle döllenmesi durumuna denir. Genellikle IVF ve ICSI'de diginik zigotlar ikinci kutup cisminin oluşmaması yoluyla meydana gelirler.

3PN zigotlarda erken klivaj normal görülebilir ancak ileriki aşamalarda gelişme duraksayabilir ya da anöploidi gerçekleşebilir (25). IVF sonrası görülen 3PN zigotların değişken kromozomal bileşenle (triploidi; XXY, XXX, XYY, diploidi, mozaik) farklı embriyo aşamalarına gelişebildikleri gösterilmiştir (47).

1.8. Blastosist Değerlendirmesi

Döllenmeyi takiben oluşan normal embriyolar bölünerek ikinci, üçüncü ve dördüncü günlerde sırasıyla 4, 8 ve 16 hücreli evrelere ulaşacaklardır. Dördüncü gün 16 hücreli evreden sonra moruladan kompakta doğru ilerleme gözlenmelidir. Beşinci günde blastosöl varlığı görülmeli ya da yeterli sayıda hücreden oluşan düzenli bir tabakadan ve iyice belirginleşmiş, organize olmuş iç hücre kitlesinden meydana gelmelidir (48).

Blastosist aşamasının başladığının en önemli göstergesi blastosöl dediğimiz boşluğun şekillenmesidir. Hücrelerin kenara çekilmesiyle oluşan bu boşluk sıvıyla dolmaya başlar. Altı farklı blastosist aşaması vardır. İlki erken blastosisttir. Bu aşamada blastosöl embriyonun yarıdan daha azını doldurur fakat embriyo büyüklüğünde henüz bir artış olmamıştır. Blastosist aşamasına gelindiğinde blastosöl hacmi embriyonun yarısından fazlasını kaplar. Tam blastosist aşamasında ise blastosöl embriyonun tamamına yakınını kaplar, embriyo büyüklüğü artmıştır, iç hücre kitlesi ve trofoektoderm ayrımı vardır. Genişlemiş blastosistte blastosöl embriyo hacminden daha fazladır, genişleme artmıştır, zona pellusida incelmiştir. Hatching blastosist aşamasında zona pelusida çok incelmiştir ve trofoektoderm hücreleri zona pelusidadan ayrılmaya başlar. Son aşama olan hatched blastosistte zona pellusidadan tamamen ayrılmış serbest blastosist görülür (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. : Blastosist Aşamaları : A: Erken Blastosist , B: Blastosist , C: Tam Blastosist , D: Genişlemiş Blastosist , E: Hatching Blastosist , F: Hatched Blastosist

Gardner'in sistemine göre embriyo değerlendirmesi yapılırken üç farklı parametreye bakılır. Birincisi hücrelerin açılması ve ayrılma durumudur. Bu yukarıda açıklanan altı aşamadır. Embriyo skorlanırken bu altı durum için sırasıyla birden altıya kadar rakamlar kullanılır. İkinci kriter ise iç hücre kitlesinin (ICM) değerlendirilmesidir. A, B, C şeklinde sınıflandırma yapılır. A; sıkı paket halinde çok hücre içermeyi, B; gevşek ama bir çok hücre içermeyi ve C; çok az sayıda hücre içermeyi temsil eder. Üçüncü ve son değerlendirme kriteri de trofoektoderm hücrelerinin kalitesidir. Burada da A, B, C şeklinde değer verilir. A; birbirine sıkıca bağlı birçok hücreden oluşan epitel yapıyı, B; daha gevşek bağlı birkaç hücreden oluşan epitel yapıyı, C; çok az ve büyük hücrelerden oluşan epitel yapıyı temsil eder. Yapılan bu skorlama sonucu 3AA ve üzeri değer alan yumurtalar yüksek kaliteli kabul edilir ve transfer için önceliklidirler (49).

Sağlıklı gebeliklerin oluşması için yüksek kaliteli embriyo seçimi çok önemlidir. Bu sayede hem gebelik oranlarında artış hem de genetik olarak anormal olmayan yeni nesillerin gelişimi sağlanmış olacaktır. Ayrıca embriyo skorlama ile seçilen embriyoların implantasyon oranının, skorlama yapılmadan seçilenlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Amaç

Yapılan bu çalışmada, anormal fertilizasyonu takiben, MPN ve MultiPN sonrası gelişen embriyoların blastosist aşamasına ulaşma oranlarının, normal fertilizasyon sonrası gelişen embriyoların blastosist aşamasına ulaşma oranlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla cevaplandırılmaya çalışılan sorular şunlardır:

- Anormal pronükelus sonrası gelişen embriyoların blastosist aşamasına ulaşmaları mümkün müdür?
- Pronükleus sayıları ile blastosiste ulaşma arasında bir ilişki var mıdır?
- Anormal pronükleus sonrası gelişen blastositler ile normal fertilizasyon sonrası gelişen blastosistler arasında anlamlı bir fark var mıdır?
- Anormal fertilizasyon sonrası gelişen blastosistler transfer için uygun mudur?

Önem

Bilindiği gibi ÜYTE merkezlerine gelen hastalarda çocuk sahibi olma oranı geçtiğimiz yıllarda büyük artışlar gösterse de henüz istenilen yüksek seviyelere ulaşamamıştır. Biz araştırmacılar da bu seviyeye ulaşmak için sürekli yeni çalışmalar yapmaktayız. Tedavi sürecinde blastosiste ulaşana kadar ki aşamalarda karşılaşılan

biribirinden farklı durumların değerlendirilmesi, karşılaştırılması ve yorumlanması da bu çalışmalardandır.

Tedavi aşamasında karşılaşılan anormal fertilizasyon vakaları istenmedik durumlardan biridir. Çünkü normal koşullarla gebe kalamayan hastaların başvurduğu merkezler, eldeki sınırlı sayıdaki yumurtalarla gebelik sağlama çabasındadır. Bazı vakalarda toplanan yumurta sayısı bir, iki veya üç olabilmekte ve bunların da bir ya da birkaçında anormal fertilizasyon ile karşılaşılmaktadır.Böyle bir tablo çok umut vaad etmemekte ve yumurtaların akıbetinin ne olacağı bilinmemektedir. Tam tersi çok sayıda yumurta toplanıp da yumurtalarının çoğunun beşinci güne gelmeden arrest olduğu, blast olanların da kalitelerinin transfer için uygun görülmediği durumlarla karşılaşılabilmekte ve bu durumda blasta ulaşanlar arasında anormal fertilize embriyolar olabilmektedir. Embriyologlar bu kez de anormal fertilize embriyonun transfer edilip edilmemesi konusunda ikilemde kalmaktadır.

Yapılan bu çalışma ile anormal fertilize embriyolar hakkında elde edilen bilgilerle; anormal pronükleus sonrası gelişen embriyoların, transfer edilecek doğru embriyonun seçiminde nasıl değerlendirilebileceği konusu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Sınırlılıklar

Araştırmanın sınırlılıkları:

- Araştırma grubunun 140 hastadan oluşması.
- Sadece bir tüp bebek merkezi verilerinin araştırmaya dahil edilmesi.
- Anormal fertilizasyon görülen durumlarda blastosiste ulaşma oranının düşük olması dolayısıyla embriyo kalitelerine dair verilerin elde edilememesi.
- MPN ve MultiPN görülme insidansının çok az olması nedeniyle, prospektif çalışmak çok uzun yıllar alacağından retrospektif araştırma tecih edilmiştir.

2. YÖNTEM

Bu bölümde, araştırma modeli, evren ve araştırma grubu, veriler ve toplanması, verilerin çözümlenmesi ve yorumlanması bilgilerine yer verilmiştir.

Araştırma Modeli

ICSI tedavisi sürecinde anormal pronükleus sayısının gözlemlendiği embriyoların blastosist aşamasına ulaşma potansiyellerinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışma, nicel araştırma türünde yapılmıştır. Araştırma arşiv tarama (survey) modelidir.

Araştırmada anormal fertilizasyon görülen embriyolar ile normal fertilizasyon görülen embriyoların beş günlük süreç sonunda beklenilen blastosist aşamasına ulaşma oranları değerlendirilmiştir. Pronükleus sayısı ile blastosist gelişimi arasındaki ilişkiler ve bu ilişkilerin yönü değerlendirilmiştir.

Evren ve Araştırma Grubu

Genel evren: ÜYTE merkezlerine infertilite sebebiyle başvuran hastalar.

Çalışma evreni: Kadıköy Acıbadem Hastanesi Tüp Bebek Merkezine başvuran infertil hastalar.

Araştırma grubu: Kadıköy Acıbadem Hastanesi Tüp Bebek Merkezinde time-lapse takip edilmiş hastalardan MPN, 3PN ve 4PN gözlenenler.

Hastaların araştırma grubuna dahil edilme kriterleri;

- 25- 40 yaş aralığında olmak
- Time- lapse takip edilmek

- ICSI uygulaması yapılmış olmak
- Fertilizasyon sonrası hem MPN, 3PN ya da 4PN gözlenmesi hem de 2PN gözlemlenmesi

Veriler ve Toplanması

Bu araştırma retrospektif olarak tasarlanmıştır. Araştırmada Kadıköy Acıbadem Hastanesi Tüp Bebek Merkezinin 2013-2017 yılları arasındaki 5 yıllık verilerinden yararlanılmıştır. Etik kurul onayı ve tez önerisinin kabulünden sonra tarafımca, hastanede arşiv taraması yapılarak araştırma grubu kriterlerine uyan hastalar listelenmiştir. Belirtilen yıllar arasında toplam 140 hastada hem MPN, 3PN ya da 4PN ile birlikte 2PN varlığı görülmüştür. Elde sınırlı sayıda veri olması dolayısıyla ve sonuçların istatiksel olarak anlamlı olup olmadığının araştırılması için 140 hastanın hepsi çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca veri sayısının fazla olmasının sonuçların genellenebilmesi için önemli olduğu da dikkate alınmıştır.

Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

Arşiv taraması sonrası her hastaya ait, toplam kaç tane yumurta toplandığı, hangi işlemin uygulandığı, döllenme gelişip gelişmediği ve birinci günden beşinci güne kadar yumurtalarının hangi aşamada olduklarının kaydedildiği çizelge verileri not alınmıştır. Bu veriler doğrultusunda tarafımca bu tezin konusu olan bilgiler bir liste haline getirilmiştir. Oluşturulan listede her hasta bir satırda olmak üzere hastanın yaşı, toplam kaçar tane MPN, 2PN, 3PN ve 4PN embriyosu olduğu ve bu embriyolardan kaç tanesinin blastosist aşamasına ulaştığı (pronukleus sayılarına göre ayrı ayrı) belirtilmiştir.

Oluşturulan listedeki verilere göre bu araştırmanın bulguları SPSS 15 paket programı kullanılarak istatiksel olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR VE YORUMLAR

Bu bölümde, önce araştırmanın amaçlarını yansıtan belli başlıklar halinde, elde edilen bulgulara; sonra onların kümeler ve bütün halinde anlamlandırılmaya çalışıldığı yorumlara yer verilmiştir.

Bulgular

1. Fertilizasyon Oran

	HASTA SAYISI	Toplanan Oosit Sayısı	Fertilize Oosit Sayısı	Fertilizasyon oranı (%)
1 ve 5 Arası Oosit Toplanan	9	37	29	78.3
6 ve 10 Arası Oosit Toplanan	32	268	186	69.4
11 ve 15 Arası Oosit Toplanan	58	733	556	75.8
16 ve 20 Arası Oosit Toplanan	32	562	382	68.9
21 ve Üstü Oosit Toplanan	9	220	127	57.7
TOPLAM	140	1820	1280	70.3

Tablo 3.1. : Hasta Sayılarına Göre Fertilize Oosit Sayıları

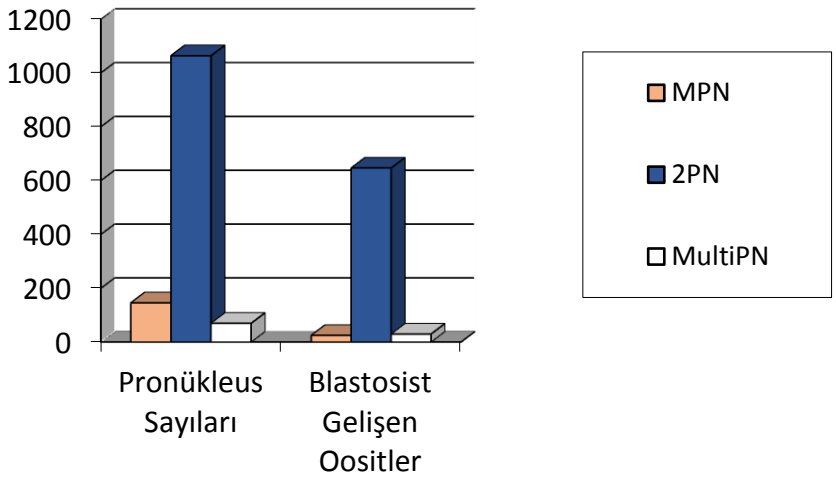
Araştırmaya alınan 140 (N) hastadan toplanan oosit sayısı 1820 tanedir. Bunların %70,3'ünde (n= 1280) fertilizasyon görülmüştür. Tablo 3.1'de hasta sayılarına göre fertilize oosit sayıları gösterilmiştir.

2. Blastosist Gelişme Oranı

	Pronükleus Sayıları	Blast Gelişen Embriyolar	Oranı (%)
MPN	146	25	17.1
2PN	1064	647	60.8
MultiPN	70	30	42.8
TOPLAM	1280	702	54.8

Tablo 3.2. Pronükleus Sayılarına Göre Blastosist Gelişme Oranları

Birinci günde görülen pronükleus sayılarına göre MPN, 2PN ve MultiPN olmak üzere üç grup oluşturulmuş ve her grubun blastosist gelişme oranları hesaplanmıştır. Toplam 1280 fertilize yumurtadan 702 tanesinin (%54,8) blastosist aşamasına ulaştığı görülmüştür. Anormal fertilizasyon (MPN, MultiPN) görülen zigot sayısı 216 ve anormal fertilizasyon oranı %16,9 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak MPN den gelişen embriyoların % 17,1' inde, 2PN sonrası gelişen embriyoların %60,8' inde ve MultiPN sonrası gelişen embriyoların % 42,8' inde blastosist gelişimi saptanmıştır (Tablo 3.2.).



Şekil 3.1. Pronükleus Sayılarına Göre Blastosiste Ulaşma Düzeyleri

Şekil 3.1 incelendiğinde, MPN'den gelişen embriyoların blastosiste ulaşma oranının MultiPN'e kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir.

3. Değişkenler Arası Normallik Değerlendirmesi

	Ortalama (Mean)	Standart Sapma	Normallik Test Değerleri		
			İstatistik değerleri	Anlamlık Düzeyi (Significant)	Anlamlılık (P)
Fertilize MPN	1.040	0.812	0.840	0.000	P< 0.5
Fertilize 2PN	7.600	3.501	0.977	0.016	P< 0.5
Fertilize MultiPN	0.500	0.782	0.661	0.000	P< 0.5
Blast Gelişen MPN	0.180	0420	0.461	0.000	P< 0.5
Blast Gelişen 2PN	4.620	2.552	0.966	0.001	P< 0.5
Blast Gelişen MultiPN	0.210	0.491	0.481	0.000	P< 0.5

Saphiro Wilk Test

Tablo 3.3. Fertilize Oosit Sayılarına Göre Pronükleus ve Blastosist Gelişimi Karşılaştırma Tablosu

Tablo 3.3.' te araştırmaya konu olan bağımsız değişkenler Shapiro Wilk testi ile α= 0.05 yanılma düzeyinde incelenmiş ve normal dağılım göstermedikleri gözlenmiştir. (Anlamlılık düzeyi P> 0.05 ile karşılaştırılmıştır.)

İstatistiki kararların doğru sonuçlar verebilmesi için araştırma verilerinin normal dağılım özelliği önem arz eder. Hastalardan farklı sayılarda oosit toplandığı için verilerde normal dağılım özelliği gözlenememiştir. Bu nedenle parametrik test varsayımları karşılanamamıştır.

4. Pronükleus Sayılarına Göre Blastosiste Ulaşma Oranları Arası Farklılık

	1. Gün Fertilize Oosit Sayıları	Blastosist Gelişen Oositler	Gruplar Arası Anlamlılık Test Değerleri			
			Oranı (%)	X^2	Anlamlılık Düzeyi (Significance)	Anlamlılık Düzeyi (P)
MPN	146	25	17.1	10.583	0.479	P> 0.05
2PN	1064	647	60.8	67.627	0.000	P< 0.05
MultiPN	70	30	42.8	5.934	0.878	P> 0.05
TOPLAM	1280	702	54.8			

Tablo 3.4. : Pronükleus Sayıları ile Blastosist Gelişimi Arasında Farklılık Tablosu

Tablo 3.4.'te pronükleus sayıları baz alınarak oluşturulan gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılığın varlığı KrusKal Wallis testi ile değerlendirilmiştir. İstatistik sonuçlarına göre '2PN' sonrası embriyolardan blast gelişim oranı %60.8 olarak saptanmıştır. Bu oran 'MPN' grubunda %17 ve 'MultiPN' grubunda %42.8 bulunmuştur. '2PN' grubunun saptanan oranı 'MPN' ve 'MultiPN' gruplarının

oranlarıyla karşılaştırıldığında α=0.05 yanılma düzeyinde istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

(X^2= 67.627, P<0.05)

5. Pronükleus Sayısının Blastosist Gelişimiyle İlişkisi

	Pronükleus Sayıları	Blastosist Gelişen Oositler	Gruplar Arası Anlamlılık Test Değerleri			
			Oranı (%)	Korelasyon Katsayısı (r)	Anlamlılık Düzeyi (Significance)	Anlamlılık Düzeyi (P)
MPN	146	25	17.1	0.009	0.458	P> 0.05
2PN	1064	647	60.8	0.683	0.000	P< 0.05
MultiPN	70	30	42.8	0.038	0.330	P> 0.05
TOPLAM	1280	702	54.8			

Spearman Rank Korelasyonu (r_s)

Tablo 3.5. : Pronükleus Sayısının Blastosist Gelişimi ile Korelasyonu Tablosu

Tablo 3.5.'te pronükleus sayılarına göre oluşturulan grupların blastosiste dönüşüm ilişkileri araştırılmıştır. Değişkenler arasında tam ilişki varlığı, korelasyon katsayısı (r)= 1 ve ilişkinin yokluğu, korelasyon katsayısı (r)= 0 şeklinde açıklanır.

Tabloda gösterildiği üzere MPN görülmesi ile blastosiste ulaşma sayıları arasında 0.009 gibi çok düşük bir korelasyon saptanmış ve istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (r_s = 0.458 , P> 0.05)

2PN görülmesi ile blastosiste ulaşma sayıları arasında 0.683 düzeyinde korelasyon varlığı saptanmıştır. Saptanan korelasyon katsayısı istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (r_s= 0.000 , P< 0.05)

MultiPN görülmesi ile blastosiste ulaşma sayıları arasında 0.038 düzeyinde korelasyon varlığı saptanmıştır. Çıkan korelasyon katsayısı istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (r_s= 0.330, P>0.05)

Yorumlar

Yapılan bu çalışma sonrası elde edilen verilerden MPN ve MultiPN sonrası gelişen embriyoların çoğunun blastosist aşamasına ulaşamadığı kaydedilmiştir. Blastosist aşamasına ulaşanların oranı MultiPN embriyolarda MPN embriyolara göre daha yüksek görüldü. İki pronükleusun görüldüğü embriyolardan blastosist gelişimi ise diğer iki grupla kıyaslandığında istatiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Bu verilere göre hareket edecek olursak anormal sayıda pronükleusa sahip bu embriyolar transfer için seçilmemelidir. Ancak bazı hastalardan az sayıda yumurta elde edilebilmekte ve bu bir, iki yumurtadan gelişen embriyolardan bazen hepsi anormal sayıda pronükleusa sahip olabilmektedir. Böyle bir durumda oluşan embriyolar hastaya transfer edilmeli mi yoksa edilmemeli mi?

Yapılan bir çalışmada 3PN gözlemlenen zigotların %31,4' ünde kromozomal anormallik saptanmıştır. Yine aynı çalışmada MultiPN olan embriyoların çoğunun genellikle triploid olduğu, poliploidi görülmesi durumunda da genellikle düşükle sonuçlandığı belirtilmiştir (50). Bizim çalışmamızda MultiPN embriyoların %42,8'inin blastosist aşamasına ulaştığı görülmüştür. Bu yüksek oran bize transfer edilebilir mi diye düşündürse de genetik tarama yapılmadan, anormallik var mı yok mu bilinemeyeceği için risk taşımaktadır.

Geniş pronükleer alan veya çapa sahip olan MPN' li zigotların gelişim potansiyelinin 2PN' li zigotlarla benzer bulunduğu bir çalışma vardır (51). Daha önce bahsedildiği üzere bu durum dişi ve erkek pronükleusun erken birleşmesi dolayısıyla gözlemleniyor

olabilir. MPN olan ve iki tane kutup cismi görülen embriyoların eğer normal fertilize başka bir embriyo yoksa transfer edilebileceği bildirilmiştir (52). Bir başka çalışma da ise MPN ve 2PB görülen bir embriyonun normal boyutta ise transfer için düşünülmemesi gerektiğine ve yüksek olasılıkla yeterli kromozom içeriğine sahip olmayacağına değinilmiştir (53). ICSI sonrası MPN'li hücrelerde kromozomal anomali riskinin IVF' ten açıkça daha yüksek olduğunu ve bu embriyoların transfer edilmemesi gerektiğini savunanlar da vardır (26).

Anormal pronükleusla ilgili yapılan bir araştırmada 0 PN ve MPN görülen embriyolar, 2PN görülen embriyolarla beşinci ve altıncı gün durumlarına göre karşılaştırılmış ve 2PN ile aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. 0 PN olanların blastosiste ulaşma oranı, MPN olanlardan daha yüksek bulunmuştur (54). Benzer başka bir araştırmanın sonucunda ise transfer için seçilen kaliteli 0 PN ve MPN den gelişen embriyoların hiçbirinden implantasyon gelişmemiştir. Bu duruma 'anormal pronükleus sayısı olan ve ilk beş gün normal gelişim gösteren embriyolarda, pronükleus anormalliği kromozom yetersizliğidir' şeklinde açıklama getirmişlerdir (38). Bizim çalışmamızda blastosiste ulaşmada en düşük oran MPN grubunda (%17) bulundu. Yukarıdaki bilgilere göre, 0 PN, MPN, 2PN, 3PN, 4PN görülen embriyolar karşılaştırıldığında genel olarak MPN sonrası gelişen embriyoların blastosiste ulaşma oranlarının en düşük olduğu sonucuna varabiliriz. Tüm bu çalışmalara bakıldığında MPN görülen embriyoların transferi konusunda ortak bir karara varılamadığı görülmektedir. Bu durum muhtemelen yapılan her çalışmada sınırlı sayıda örnek kullanılmasından kaynaklanmaktadır.

Anormal pronükleus görülmesinin bir nedeni de uygulanan yöntemler olabilir. Bu görüşü, gametlerin kısa inkübasyonu ve yumurtalarda kumulus hücrelerinin erken temizlenmesi durumlarında MultiPN görülme oranının arttığının tespit edilmesi desteklemektedir (55). IVF sonrası görülen MPN den gelişen embriyoların , ICSI sonrası MPN den gelişen embriyolardan daha yüksek oranda 3. , 5. ve 6. gün gelişimi gösterdiği belirlenmiştir (56). Anne yaşına bağlı olmaksızın infertilite tedavisi sonrası kromozom anomalileri görülmesi, normal yolla gebelikten %50 oranında daha yüksek bulunmuştur. Anöploidinin maternal yaşla arttığı. mozaiklik, kaotiklik, poliploidi gibi mayoz sonrası ortaya çıkan anormalliklerin ise tüm yaş gruplarında benzer oranda ortaya çıktığı görülmüştür (57). Kang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hiperstimüle edilmiş oosit sikluslarında MPN ve 3PN görülme oranının arttığı

saptanmıştır (58). Sadece bir merkeze ait verilerin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçların (yumurta ve sperm dışındaki etkenlerin de anormal pronükleus görülmesinde etkisi olabileceği göz ardı edilmediğinde) genellenebilir olup olmadığı tartışma konusudur.

Eldeki anormal pornükleuslu embriyolardan faydalanabilmek için değişik teknik ve yöntemler denenmektedir. Bunlardan bir tanesi 3PN görülen zigotlardan enükleasyon yoluyla fazla olan pronükleusun çıkarılması işlemidir. İşlem sonrası iki pronükleuslu, diploid bir embriyo elde edilir (58). Bu uygulamanın başlıca sınırlılığı hangi pronükleusun çıkarılacağının belirlenmesidir. Yanlış pronükleusun çıkarılması, embriyonun iki maternal ya da iki paternal kromozom seti taşımasına neden olabilir. Konuyla alakalı bir çalışmada, birinci gruptaki 3PN zigotların bir tane pronükleusu çıkarılmış, diğer 3PN zigot grubundakilere ise hiçbir işlem yapılmamıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, enükleasyon uygulanan grubun embriyo oluşturma potansiyelinin arttığı gözlemlenmiştir. Ancak ulaşılan oran 2PN lerle karşılaştırıldığında yine de düşük bulunmuştur (60). Enükleasyon uygulanan grubun bir kısmına karyotip analizi yapıldığında %44,4'ü diploid, %55,5'i anöploid olarak teşhis edilmiştir.

Anormal embriyolardan faydalanılabilecek diğer bir konu ise bu embriyolardan, insan embriyonik kök hücresi(hESC) elde etme çalışmalarıdır. hESC kendini yenileme ve üç germ tabakasına farklılaşma potansiyeline sahip bir hücrelerdir (61). Hücrelerin bu potansiyeli, ciddi dejeneratif hastalıklar için hücre naklinde yenilenebilir bir kaynak olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bir çalışmada anormal pronükleuslu (0 PN, MPN, 3PN) ve normal pronükleuslu (2PN) embriyolardan hESC elde edilmiş ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Karyotip analizi sonucu tüm hESC lerin normal kromozom içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak elde edilen hESC hücreleri arasında yapısal bir farklılık görülmediği, hepsinin ayrı bir kimlik ve karyotipik kararlılık sergilediği belirtilmiştir (62). Bu sonuç bizlere anormal fertilize embriyoların sağlıklı hESC üretiminde kaynak olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak daha önce de söylediğimiz gibi anormal pronükleus sonrası gelişen embriyolarda genellikle genetik bozukluklar görülmektedir. Yapılan bir araştırmada, hücrelerin kendini tamir edebilme mekanizması sayesinde mozaikizm görülen bir embriyonun, gelişme sürecinde mozaik hücrelerini trofoblasta doğru hareket ettirerek kendini düzeltebileceği hipotezi vurgulanmıştır (63). Başka bir kendini düzeltme mekanizması da apoptozdur.

Kromozomal olarak anormal embriyoların apoptoza uğruyor olabileceği bildirilmiştir (64).

Araştırmacılar, anormal fertilize embriyoların transfer için uygun olup olmadığı konusunda henüz fikir birliğine varamamıştır. Bu konuda yapılan çalışmalardan bazılarında gebelik görülmüş bazılarında ise gebelik gelişmemiştir. Ancak gebelik gelişen vaka sayısının çok fazla olmadığını belirtmek gerekir. "Staessen ve arkadaşları", anormal fertilize embriyoların transferi sonrası, sağlıklı iki çocuk doğumu ve bir biyokimyasal gebeliği raporlamışlardır (37). "Grass ve Trounson" yaptıkları çalışmada sağlıklı bir erkek çocuğun dünyaya geldiğini kaydetmişlerdir (65). Büyük başarılardan bir tanesi de IVF sonrası MPN den gelişen embriyoların transferlerinden dokuz sağlıklı bebeğin doğumu gerçekleşmesi ve ICSI sonrası MPN den gelişen embriyoların transferleri sonrasında da dört tanesinde implantasyon geliştiğinin gözlemlenmesidir (56). Gerçekleşen canlı bebek doğumları göz önünde bulundurulduğunda anormal fertilize embriyoların kesinlikle transfer edilmemesi gerektiğini söylemek imkansızdır. Ancak bu embriyolardan blastosist aşamasına ulaşanların hepsinin transfer için uygun olduğunu da söylemek doğru olmaz.

4. SONUÇ

"Bu bölümde, yapılan araştırma ile varılan noktanın açıklandığı *yargı* altbaşlığı ve bu konuyla alakalı başka hangi çalışmaların yapılabileceğine ilişkin *öneriler* altbaşlığı ele alınmıştır."

Yargı

Bu tez konusunda; toplam 140 hastanın, MPN ve MultiPN sonrası gelişen embriyolarının ve 2PN sonrası gelişen embriyolarının blastosist aşamasına ulaşma oranları ortaya konulmuştur.

MPN sonrası blastosist gelişim oranı %17,1 ve MultiPN sonrası blastosist gelişim oranı %42,8 bulunmuştur. Bu oranlar 2PN sonrası gelişen blastosistlerle (%60,8) karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır.

Pronükleus sayısı ve blastosist gelişimi ilişkisini incelediğimizde ise iki pronükleus görülmesinin blastosist aşamasına ulaşma ile ilişkisinin olduğu hesaplanmıştır. Hem MPN hem de MultiPN görülmesi ile blastosist aşamasına ulaşma arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Sonuçları değerlendirdiğimizde, fertilizasyon kontrolü sırasında 2PN görülmesi durumunun, MPN ve MultiPN görülmesi durumlarına kıyasla embriyoların blastosist aşamasına ulaşma şansını artırdığını söyleyebiliriz.

Yapılan diğer çalışmalarla birlikte değerlendirdiğimizde bulunan oranlar benzerlik göstermektedir. Anormal fertilize embriyolar arasından MPN olanların daha düşük oranda blastosist aşamasına ulaştığı görülmüştür.

Konuyla ilgili yapılan transfer çalışmalarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Hastanın normal fertilize embriyolarından blastosiste ulaşıp iyi skor alanlar varsa bu embriyoların transferine öncelik verilmesi genel prosedürdür. Her birey, her yumurta kendine özgüdür. Araştırma sonuçları genellenebilir olsa da istisnalar olacaktır. Önemli olan ve

yapılması gereken süreci bir bütün olarak değerlendirmektir. Bazı durumlarda iyi skor alanlar arasında anormal fertilizasyon sonrası gelişen embriyolar da olmaktadır. Bu embriyolar genetik olarak anormal olabileceği için transferde tercih edilmemelidir. Transfer edilse dahi genellikle implantasyonun gerçekleşmediği görülmüştür. İmplante olduğunu varsayarsak da genetik hastalığa sahip bireyler dünyaya gelebilir. Böyle bir risk almak ne kadar doğru olacaktır tartışılır. Fakat sadece anormal pronükleus kökenli olduğu için kaliteli bir blastosisti transfer etmemek belki de oluşabilecek bir gebeliği engellemek olacaktır. Çünkü anormal fertilizasyon sonrası morfolojik olarak normal blastosist oluşumunun, normal gelişim kapasitesine sahip embriyonun göstergesi olabileceği belirtilmiştir. Bazı durumlarda ise özellikle hastada genetik bir hastalık öyküsü varsa direkt olarak anormal fertilize embriyolar tercih dışında tutulmalıdır.

Görüldüğü üzere konuyla alakalı farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bizim düşüncemiz ise eğer blastosist aşamasına ulaşan başka bir embriyo yoksa PGD yapıldıktan sonra bir anormallik saptanmadığında bu embriyonun transfer edilebileceğidir.

Öneriler

Yapılan bu araştırmanın sonuçları anormal fertilizasyon konusuyla ilgili yeni bir kaynak niteliğindedir. Bu çalışma aynı hastaların anormal ve normal fertilize yumurtalarının incelenmesi dolayısıyla yapılan diğer araştırmalardan farklılık göstermektedir.

Biz oositlerin sadece birinci gün ve beşinci gündeki durumlarını değerlendirdik. Eğer daha geniş kapsamlı bilgi elde edilmek isteniyorsa, toplanan yumurtaların birinci günden itibaren her gün hangi aşamada olduğu dikkate alınarak beşinci güne kadarki tüm verileri listelenebilir. Böylece anormal fertilizasyon sonrası gelişen embriyoların: pronükleus sayılarına göre genellikle hangi aşamaya kadar gelişebildikleri, blastosiste ulaşana kadarki süreçte hücre sayılarında bir anormallik olup olmadığı vb. bilgiler elde edilebilir.

Bir başka araştırma konusu da blastosiste ulaşan MPN ve MultiPN kökenli embriyoların skorlanması ve 2PN kökenlilerle karşılaştırılması olabilir. Böylece anormal fertilize embriyoların kalitelerine dair veriler kaydedilmiş olacaktır.

Anormal fertilizasyon vakalarının çok sık görülmemesi, genellikle gelişimlerinin duraksaması ve beşinci güne ulaşamaması nedenleriyle geniş çaplı araştırma yapmak biraz zor olacaktır. Sadece bir laboratuvara ait verilerin değil de birkaç merkeze ait verilerin araştırmaya dahil edilmesi araştırma grubunu artıracağından elde edilen sonuçlar daha genellenebilir olacaktır.

KAYNAKÇA

1. Datta J., Palmer M.J., Tanton C., Gibson L.J., Jones K.G. et all.: Prevalence of infertility and help seeking among 15000 women and men. Hum Reprod. 2016, 31(9): 2108-2118.
2. Borini A., Lagalla C., Sciajno R., Distratis V., Bonu M.A., Cattoli M., et all.: Artificial reproductive technology achievements for optimizing embryo quality. Ann N Y Acad Sci. 2004, 1034: 252-261.
3. Giusti A., Corani G., Gambardella L., Magli C., Gianaroli L.: 3D Localization of pronuclei of human zygotes using texture features from multiple focal planes. MICCAI. 2010, 6362: 488-495.
4. James A.N., Hennessy S., Reggio B., Wiemer K., Larsen F., Cohen J.: The limited importence of pronuclear scoring of human zygotes. Hum Reprod. 2006, 21(6): 1599-1604.
5. Nicoli A., Capodanno F., Moscato L., Rondini I., Villani M.T. et all.: Analysis of pronuclear zygote configurations in 459 clinical pregnancies obtained with assisted reproductive technique procedures. Reprod Biol Endocrin. 2010, 8: 77.
6. Nagy Z.P., Dozortsev D., Diamond M., Rienzi L., Ubaldi F., et all.: Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. Fertil Steril.2003, 80(1): 67-74.
7. WHO. Current practices and controversies in assisted reproduction. Report of WHO meeting. Geneva: 2002.
8. Speroff L., Fritz M.A. Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite. Ed. Günalp S, Erk A. 7. Baskı. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi, 2007
9. Steinkeler J.A., Woodfield C.A., Lazarus E., Hillstorm M.M.: Female infertility: a systematic approach to radiologic imaging and diagnosis. RadioGraphics. 2009, 29(5): 1353-1370.
10. Wittemer C., Bettahar-Lebugle K., Ohl J., Rongieres C., Nisand I., Gerlinger P.: Zygote evaluation: an efficent tool for embryo selection. Hum Reprod. 2000, 15(12): 2591-2597.

11. www.kaanaydos.com.tr. "spermatogenez," *http://www.kaanaydos.com.tr/seminifer-tubuller-sertoli-hucreleri-testislerin-gelismesi-ve-spermatogenez.html*. [t.y.]. (01 Ağustos 2018).
12. www.istanbultip.istanbul.edu.tr. "erkek üreme sistemi histolojisi," *http://istanbultip.istanbul.edu.tr/ogrenci/wp-content/uploads/2014/04/079_ ErkekuremeSistemiwebversiyon1.pdf*. [t.y.]. (07 Ağustos 2018).
13. www.tipedu.cumhuriyet.edu.tr. "embriyoloji," *http://tipedu.cumhuriyet.edu.tr/Donem2/I.Komite(DokuKomitesi)/Histoembriyoloji/Eray/Embriyoloji.doc*. [t.y.]. (05 Ağustos 2018).
14. Laçin, Doç. Dr. Selman. "tüp bebek istanbul," www.tupbebek-istanbul.com. *https://www.tupbebek-istanbul.com/tupbebek-tedavisi-ve-oosit-nedir.php*. [t.y.]. (05 Ağustos 2018).
15. Zev Rosenwaks, Paul M. W. Human Fertility Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2014
16. www.tupbebek-genetik.com. "memorial şişli tüp bebek merkezi," *http://www.tupbebek-genetik.com/laboratuvar-yontemleri/embriyoloji-laboratuvari/*. [t.y.]. (31 Temmuz 2018).
17. Atayurt Z., Köksal G., Özdemir Ü.: Embriyoloji Laboratuvarı Değerlendirme Klavuzu. www.acetto.com.tr. *http://acetto.com.tr/ups/files/pdf /acetto .pdf*. [t.y.]. (07 Ağustos 2018).
18. Serhal P.F., Ranieri D.M., Kinis A., Marchant S., Davies M., Khadum I.M.: Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1997, 12(6): 1267-1270.
19. Balaban B., Urman B., Sertac A., Alatas C., Aksoy S., Mercan R.: Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998, 13(12): 3431-3433.
20. Johnson L.N.C., Sasson I.E., Sammel M.D., Dokras A.: Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2013, 100(3): 704-711.

21. Liu Y., Chapple V., Roberts P., Ali J., Matson P.: Time-lapse videography of human oocytes following intracytoplasmic sperm injection: Events up to the first cleavage division. Reprod Biol. 2014, 14(4): 249-256.
22. Payne D., Flaherty S.P., Barry M.F., Matthews C.D.: Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. Hum Reprod. 1997, 12(3): 532-541.
23. Montag M., Köster M., Nikolov A., Van der Ven H.: P-166 Time-lapse based evaluation of human oocytes from ICSI up to the pronuclear stage. Hum Reprod. 2010, 25(180).
24. Papale L., Fiorentino A., Montag M., Tomasi G.: The zygote. Hum Reprod. 2012, 27: 22-49.
25. Moore K.L., Persaud T.V.N., Torchia M.G.: The Developing Human : Clinically Oriented Embryology. 9th. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013
26. Greuner M., Montag M.: "Morphological Selection of Gametes and Embryos: 2PN/Zygote," 6. A practical guide to selecting gametes and embryos: 18. Ed. Markus Montag..
27. Scott L.A., Smith S.: The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Hum. Reprod. 1998, 13,4: 1003-1013.
28. Tesarik J., Junca A.M., Hazout A., Aubriot F.X., Nathan C., et all.: Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. Hum. Reprod. 2000, 15(16): 1396-1399
29. Balaban B., Urman B., Isklar A., Alatas C., Aksoy S., ve diğ.: The effects of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. Hum Reprod. 2001, 16: 2357-2361.
30. Berger D.S., Zapantis A., Merhi Z., Younger J., Polotsky A.J., Jindal S.K.: Embryo quality but not pronuclear score is associated with clinical pregnancy following IVF. Assisted Reproduction and Genetics. 2014, 31(3): 279-283.
31. Azevedo A.R., Pinho M.J., Silva J., Sa R., Thorsteinsdottir S., et all.: Molecular cytogenetics of human single pronucleated zygotes. Ann NY Acad Sci. 2014, 21(12).
32. Plachot M.: Fertilization. Hum Reprod. 2000, 15(4): 19-30.

33. Nagy Z.P., Janssenswillen C., Janssens R., De Vos A., Staessen C., Van de Velde H.: Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after İntracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejeculated spermatozoa. Hum Reprod. 1998, 13(6): 1606-1612.
34. Nagy Z.P., Liu J., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.: Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1994, 9(9): 1743-1748.
35. Kaufman M.H.: Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies. UK: Cambridge University Press, 1983
36. Balakier H., Squire J., Casper R.F.: Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization. Hum Reprod. 1993, 8(3): 402-408.
37. Staessen C., Janssenwillen C., Devroey P., Steirteghem A.C.: Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1993, 8(2): 221-22.
38. Noyes N., Fino M.E., Krey L., McCaffrey C., Adler A., Grifo J.: Embryo biopsy: the fate of abnormal pronuclear embryos. Reprod BioMed Online. 2008, 17(6): 782-788.
39. ESHRE: Atlas of Human Embryology. www.atlas.eshre.eu. *http://atlas.eshre.eu/es/14546650461602050*. [t.y.]. (31 Temmuz 2018).
40. Flaherty S.P., Dianna P., Swann N.J., Matthews C.D.: A etiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod.1995, 10(10): 2623-262.
41. Flaherty S.P., Payne D., Matthews C.D.: Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998, 13: 155-164.
42. Rosenbusch B.: The chromosomal constitution of embryos arising from monopronuclear oocytes in programmes of assisted reproduction. Reprod Med. 2014, 8.

43. Feenan K., Herbert M.: Can abnormally fertilized zygotes give rise to viable embryos?. Hum Fertil. 2006, 9(3): 157-169.
44. Rosenbusch B.E.: A preliminary concept, deduced from cytogenetic analyses, for explaining different types of multipronuclear oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2010, 94(6): 2479-2481.
45. Rosenbuch B., Schneider M.: Hypotriploid tripronuclear oocytes with two polar bodies obtained after ICSI: is regular chromatid segregation involved?. Hum Reprod. 2000, 15: 1876-1877.
46. Kang H.J., Rosenwaks Z.: Triploidy – the breakdown of monogamy between sperm and egg. Int J Dev Biol. 2008, 52: 449-45.
47. Chen Z., Yan J., Feng H.L.: Aneuploid analysis of tripronuclear zygotes derived from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in humans. Fertil Steril. 2005, 83(6): 1845-1848.
48. Scott L., Alvero R., Leondires M., Miller B.: The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod. 2000, 15(11): 2394-2403.
49. Gardner D.K., Lane M., et all.: Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril. 2000, 73: 1155-1158.
50. Rosenbusch B., Schneider M., Sterzik K.: The chromosomal constitution of multipronuclear zygotes resulting from in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1997, 12(10): 2257-2262.
51. Araki E., Itoi F., Honnma H., Asano Y., Oguri H., Nishikawa K.: Correlation between the pronucleus size and the potential for human single pronucleus zygotes to develop into blastocysts. J Assist Reprod Genet. 2018, 35(5): 817-823.
52. Mateo S., Vidal F., Parriego M., Rodriguez I., Montalvo V. et all.: Could monopronucleated icsi zygotes be considered for transfer? Analysis through time-lapse monitoring and pgs. J Assist Reprod Genet. 2017, 34(7): 905-911.
53. Mateo S., Parriego M., Boada M., Vidal F., Coroleu B., Veiga A.: In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from

monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2013, 99: 897-902.

54. Yin B.L., Hao H.Y., Zhang Y.N., Wei D., Zhang C.L.: Good quality blastocyst from non-/monopronuclear zygote may be used for transfer during IVF. Syst Biol Reproductive Medicine. 2016, 62(2): 139-145.
55. Zhou L., Wang J., Xiao L., Sun H., Wang Y. et all.: Differential effects of short co-incubation of gametes and early removal of cumulus cells in patients with different fertilizing capabilities. Reprod BioMed Online. 2016, 32: 591-596.
56. Itoi F., Asano Y., Shimizu M., Honnma H., Murata Y.: Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocyst derived from human single-pronucleate zygotes. Assist Reprod Genet. 2015, 32(9): 1401-1407.
57. Munne S.: Chromosomal abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. Reprod BioMed. 2005, 12(2): 234-253.
58. Kang H., Neri Q.V., Wang A., Rosenwaks Z., Palermo G.D.: Withdrawal of fsh during controlled ovarian superovulation impairs fertilization with icsi. Fertil Steril. 2006, 86(3): 320.
59. Suss-Toby E., Nir S.G., Amit M., Manor D., Itskoviz-Eldor J.: Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. Hum Reprod. 2004, 19(3): 670-675.
60. Jin H., Dai S., Song W., Yao G., Shi S., Sun Y.: Embryo developmental potential of microsurgically corrected human three-pronuclear zygotes. Syst Biol Reprod Med. 2015, 61(2): 96-102.
61. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A.: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol. 2000, 18: 399-404.
62. Huan Q., Gao X., Wang Y., Shen Y., Ma W., Chen Z.J.: Comparative evaluation of human emryonic stem cell lines derived from zygotes with normal and abnormal pronuclei. Dev Dyn. 2010, 239: 425-438.
63. James R.M., West J.D.: A chimaeric animal model for confined placental mosaicism. Hum Genet. 1994, 93(5): 603-604.
64. Hardy K.: Cell death in the mammalian blastocyst. Mol Hum Reprod. 1997, 3(10): 919-925.

65. Grass L., Trounson A.O.: Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization. Hum Reprod. 1999, 14(7): 1869-1871.

Sayı: EKK/2017/78 **22/09/2017**
Konu: Kübra Nur UZUN: YL tez çalışması

T.C. MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi: 11647525-302.08.01-57 sayılı 05.09.2017 tarihli yazınız.

İlgi yazınız ekinde sunulan Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Klinik Embriyoloji Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencilerinden Kübra Nur UZUN tarafından gönderilen "Tam Zamanlı (time-lapse) Takip Eden IVF Hastalarının Mono Pronucleus (MNP) ve Multi Pronucleus (3PN, 4PN) Gözlemlenen Embriyolarında Blastosiste Ulaşma Oranları ve Embriyo Kalitelerinin Kontrol Grubu İle Karşılaştırılması" konulu tez önerisi ve ölçekleri 22/09/2017 tarihinde incelenerek T.C. Maltepe Üniversitesi Etik Kurulu Yönergesinin 6. maddesinde yazılı; **"bilimsel disipline bağlılık, yaşama saygı, zarar vermeme, olası zarar ve riskler konusunda tüm ilgilileri bilgilendirme, insan ve topluma sorumluluk"** gibi ilkelere uygun olduğuna; yayına temel oluşturan araştırmanın tasarım, planlama ve yürütülme aşamalarında katkıda bulunanlara yer verilmesi, eksiksiz ve doğru kaynak gösterilmesi, gereken biçim ve doğrulukta atıflarda bulunulması kaydıyla yapılmasının etik olarak uygun olduğuna; toplantıya katılan üyelerin oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla arz/rica ederim.

Prof. Dr. Belma AKŞİT
Etik Kurulu Başkanı

Prof. Dr. Necla ÖZTÜRK
Üye

Prof. Dr. Nurgün OKTİK
Üye

Prof. Dr. Hacer KARANİSOĞLU
Üye

Prof. Dr. Nermin ÇELEN
Üye

Prof. Dr. Durmuş GÜNAY
Üye (Katılmadı)

Prof. Dr. Ahmet Zafer ÖZTEK
Üye