ERKEN VEYA EKİLİBRASYON SONRASI SOYULARAK İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU YAPILAN OOSİTLERDE FERTİLİZASYON, MULTİNÜKLEASYON, EMBRİYO KALİTESİ VE GEBELİK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Zehra Beyza Düzgün
19 15 03 101

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Danışman: Prof.Dr. Mehmet Cıncık

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ekim, 2021

ERKEN VEYA EKİLİBRASYON SONRASI SOYULARAK İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU YAPILAN OOSİTLERDE FERTİLİZASYON, MULTİNÜKLEASYON, EMBRİYO KALİTESİ VE GEBELİK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Zehra Beyza Düzgün
19 15 03 101
Orcid: 0000-0001-5641-3785

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Danışman: Prof.Dr. Mehmet Cıncık

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ekim, 2021



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" ile bildirilen 6689 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" ile bildirilen 6689 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince engin bilgilerinden faydalandığım, tez danışmanlığımı yapan ve bu süreçte bana desteklerini esirgemeyen değerli Prof. Dr. Mehmet Cıncık hocama sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte yolumuzun kesiştiği, desteklerini benden hiç esirgemeyen Acıbadem Altunizade Hastanesi Embriyoloji Laboratuvar Sorumlusu Embriyolog Şenay Kanaat ve ekibine teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destek olan, beni hiç yalnız bırakmayan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Zehra Beyza Düzgün

Ekim 2021

ÖZ

ERKEN VEYA EKİLİBRASYON SONRASI SOYULARAK İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU YAPILAN OOSİTLERDE FERTİLİZASYON, MULTİNÜKLEASYON, EMBRİYO KALİTESİ VE GEBELİK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Zehra Beyza Düzgün
Yüksek Lisans Tezi
Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Danışman: Prof.Dr. Mehmet Cıncık
Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2021

Bu tez çalışmasında; 2020-2021 yılları arasında Acıbadem Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran maternal yaşı <40 olan, oosit sayısı >5 olan, erkek faktörü bulunmayan, ICSI uygulaması yapılan 54 hastaya ait oositler kullanılmıştır. Toplamda 792 oosit araştırmamıza dahil edilmiştir. Bu oositlerden 416'sı (kontrol grubu) rutinde olduğu gibi oosit pick up'dan (OPU) 2 saat sonra soyulmuştur ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemi uygulanmıştır. Geriye kalan 376'sı (çalışma grubu) ise OPU sonrası hemen soyulmuştur ve ICSI işlemi uygulanmıştır. Bu iki grup arasında fertilizasyon, multinükleasyon, iyi kalite 3. ve 5. gün embriyo kaliteleri, blastokist ve gebelik oranları açısından farklılık olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışma grubunda fertilizasyonun %55,6 oranla, kontrol grubunda ise %48,3 oranla gerçekleştiği görülmüştür. Gruplar arasında fertilizasyonun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği belirlenmiştir (p=0,041). Çalışma grubu ve kontrol grubundaki multinükleasyon oranları %6,6 ve %4,3, iyi kalite 3. gün embriyo oranları %48,7 ve %43,0, iyi kalite 5. gün embriyo oranları %27,7 ve %23,8, blastokist oranları %34,0 ve %28,1, gebelik oranları %78,6 ve %71,4 olarak bulunmuştur. Erken soyulan oositler ile rutinde olduğu gibi soyulan oositler arasında multinükleasyon, 3. ve 5. gün iyi kalite embriyo oranları, blastokist ve gebelik oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Korona kümülüs hücrelerinin oosit olgunlaşmasındaki rolü bilinmektedir. Ancak bu hücrelere uzun süre maruziyet oosit yaşlanmasını indükleyebilir. Birçok araştırmacı oosit denüdasyonun ne zaman yapılması gerektiğine dair araştırma yapmış olmasına rağmen, bu konu hakkında bir fikir birliği oluşmamıştır. Çalışmamızda, bulduğumuz sonuçlar, optimum denüdasyon zamanının belirlenmesi için gelecekte yapılacak olan klinik çalışmalara fikir niteliğindedir.

Anahtar Sözcükler: İnsan; ICSI; Oosit; Multinükleasyon; Erken denüdasyon; Embriyo kalitesi; Fertilizasyon.

ABSTRACT

COMPARISON OF FERTILIZATION, MULTINUCLEATION, EMBRYO QUALITY AND PREGNANCY RATES DERIVED FROM THE OOCYTES DENUDED AT EARLY OR POST-EQUILIBRATION FOR INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION

Zehra Beyza Düzgün
Master Thesis
Department Interdisciplinary of Clinical Embryology
Clinical Embryology Programme
Thesis Advisor: Prof.Dr.Mehmet Cıncık
Maltepe University Graduate School, 2021

In this thesis; between the years 2020-2021, oocytes from 54 patients who applied to Acıbadem Hospital In Vitro Fertilization Center and underwent ICSI application were used. These patients were those with a maternal age of <40, an oocyte count of >5, and no male factor. A total of 792 oocytes were included in our study. 416 of these oocytes (control group) were denuded 2 hours after oocyte pick up (OPU) as part of the routine and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was applied. The remaining 376 (experimental group) were denuded immediately after OPU and ICSI was applied. It was investigated whether there were differences between these two groups in terms of fertilization, multinucleation, good quality 3rd and 5th day good embryo quality, blastocyst and pregnancy rates.

In the experimental group, fertilization rate was 55.6%. On the other hand, in the control group, fertilization rate was %48,3. It was determined that there was a statistically significant difference in fertilization between the groups (p=0.041). Multinucleation rates in the experimental group and control group were 6.6% and 4.3%, good quality 3rd day embryo rates were 48.7% and 43.0%, good quality 5th day embryo rates were 27.7% and 23.8%, blastocyst rates were 34.0% and 28.1%, pregnancy rates were 78.6% and 71.4%. There were no significant differences in multinucleation, good quality 3rd and 5th day embryo rates, blastocyst and pregnancy rates between experimental group and control group.

The role of corona cumulus cells in oocyte maturation is known. However, prolonged exposure to these cells can induce oocyte aging. Although many researchers have investigated when oocyte denudation should be performed, there is no consensus on this issue.The results we found in our study provide an idea for future clinical studies to determine the optimum denudation time.

Keywords: Human; ICSI; Oocyte; Micronucleation; Early denudation; Cumulus cell removal; Embryo quality; Fertilization.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZ v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
KISALTMALAR xi
ÖZGEÇMİŞ xii
BÖLÜM 1. GİRİŞ 1
1.1. Problem 1
1.2. Amaç 3
1.3. İnfertilite 4
1.4. Gamet Hücreleri 5
1.4.1. Sperm 5
1.4.2. Oosit 8
1.5. Oositlerin Toplanması (OPU) 11
1.6. Oositlerin Değerlendirilmesi 11
1.7. Klasik In Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplasmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) 13
1.8. Fertilizasyon Kontrolü 14
1.9. Pronükleus Değerlendirilmesi 16
1.10. Bölünme Evresi Morfolojik Skorlaması 18
1.10.1. Hücre Sayısı ve Boyutu 18
1.10.2. Fragmantasyon 18
1.10.3. Multinükleasyon 19
1.10.4. 3. Gün Embriyo Değerlendirilmesi 21
1.10.5. 5. Gün Embriyo Değerlendirmesi 21
1.10.6. Gebeliğin Değerlendirilmesi 24
1.11. Önem 24
1.12. Varsayımlar 24
1.13. Sınırlıklar 26
1.14. Tanımlar 26
BÖLÜM 2. YÖNTEM 28
2.1. Araştırma Modeli 28
2.2. Evren ve Örneklem 28
2.3. Veriler ve Toplanması 29
2.4. Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 30
BÖLÜM 3. BULGULAR VE YORUMLAR 31
3.1. Bulgular 31
3.1.1. Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması: 31
3.1.2. Fertilizasyon (2PN) Oranı: 32
3.1.3. Multinükleasyon Oranı: 32
3.1.4. 3. Gün Embriyo Kalitesinin Oranı: 33

3.1.5. 5. Gün Embriyo Kalitesinin Oranı: 33
3.1.6. Blastosiste Giden Embriyo Oranları: 33
3.1.7. Gebelik Oranları: 34
3.2. Yorumlar 34
BÖLÜM 4. SONUÇ 39
4.1. Özet 39
4.2. Yargı 39
4.3. Öneriler 40
KAYNAKÇA 41

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Tesarik ve Ark. Sınıflandırma Sistemi 17
Tablo 2: Scott ve Ark. Sınıflandırma Sistemi 17
Tablo 3: Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması 31
Tablo 4: Gruplarda Embriyo Transferi Yapılanların Gebelik Durumunun İncelenmesi34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Spermatogenez Aşamaları 6
Şekil 2: Sperm Morfolojisi 7
Şekil 3: Oogenez Aşamaları 9
Şekil 4: Olgun (Graaf) Folikül 10
Şekil 5: GV Oosit, M1 Oosit, M2 Oosit 13
Şekil 6: Normal Fertilizasyon: ZP: Zona Pellusida, PB: Kutup Cisimciği, PN:Pronükleus. 16
Şekil 7: (a) 2 Blastomerli, Her Biri Multinükleasyon İçeren Anormal Embriyo; (b) 2 Blastomerli, Her Biri Tek Çekirdek İçeren Normal Embriyo 19
Şekil 8: Blastokist (5. Gün Embriyosu) 22
Şekil 9: (A) Erken Blastokist; (B) Blastokist; (C) Tam Blastokist; (D) Genişleyen Blastokist; (E) Zonadan Ayrılmakta Olan Blastokist; (F) Zonadan Ayrılan Blastokist 23
Şekil 10: Grupların Fertilizasyon (2PN) Oranları Dağılımı 32

KISALTMALAR

PN : Pronükleus

ICSI : İntrasitoplasmik Sperm Enjeksiyonu

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

OPU : Oosit Pick-Up - Oosit toplama işlemi

OKK : Oosit-Korona-Kümülüs

ÜYTE : Üremeye Yardımcı Tedavi

IVF : In Vitro Fertilizasyon

YÜT : Yardımcı Üreme Teknikleri

GnRH : Gondotropin Salgılayıcı Hormon

FSH : Folikül Uyarıcı Hormon

LH : Luteinleştirici Hormon

KOH : Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon

USG : Ultrasonografi

HCG : Human Koryonik Gonodotropin

KOK : Kümülüs-Oosit-Kompleskleri

ZP : Zona Pellusida

GV : Germinal Vezikül

NPB : Nucleolar Precursor Body- Çekirdekcik Öncül Cisimleri

MNB : Multinükleuslu Blastomer-Çok Çekirdekli Blastomer

FISH : Floresan In Situ Hibridizasyon

PGS : Preimplantasyon Genetik Tarama

ICM : Inner Cell Mass-İç Hücre Kitlesi

ÖZGEÇMİŞ

Zehra Beyza DÜZGÜN

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Eğitim

Derece	*Yıl*	*Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı*
Y.Ls.	2021	Maltepe Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Ls.	2014	Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü
Lise	2009	Maltepe Coşkun Lisesi

İş/İstihdam

Yıl	*Görev*
2016	Laboratuvar Asistanı. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
2014	Lisans Araştırma Stajyeri, Yeditepe Üniversitesi
2013	Stajyer Biyolog, Özel Yunus Emre Hastanesi

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Bu bölümde, araştırmanın kimlik bilgilerinden olan problem, amaç, önem, varsayımlar, sınırlıklar ve tanımlara yer verilmiştir.

1.1. Problem

12 aylık düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiden sonra klinik olarak bir gebelik oluşmaması infertilite yani kısırlık olarak tanımlanır. 35 yaş üstü kadınlarda ise infertilite tanısı için bu süre 6 ay olarak belirlenmiştir (Agarval, Mulgund, Hamada ve Chyatte, 2015). Dünya çapında 186 milyondan fazla kişi infertiliteden muzdariptir. Bu kişiler çoğunlukla gelişmekte olan ülkelerde ikamet etmektedirler (Vander Borght ve Wyns, 2018).

Doğurganlığı negatif yönde etkileyen en önemli durumların; kadının yaşı, yaşam tarzı ve çevresel faktörler olduğu bilinmektedir (Sifakis, Androutsopoulos, Tsatsakis ve Spandidos, 2017).

İnfertil çift çalışmaları farklı faktörlere odaklanmaktadır. Bu faktörler genel olarak; yumurtlama faktörü (vakaların ~%20'sinde bulunur), utero-tubal peritoneal faktör (vakaların ~%30'unda bulunur), semen migrasyon faktörü (vakaların ~%10'u) ve erkek faktörüdür (vakaların ~%30'u). Tüm infertil çiftlerin yaklaşık %40'ı faktörlerin bir kombinasyonunu sergilemektedir (Brugo-Olmedo, Chillik ve Kopelman, 2001).

Son 30 yılda infertilite pratiğinde bazı değişiklikler meydana gelmiştir. Birincisi, yardımcı üreme teknolojilerinin tanıtılması temel üreme süreçlerini incelemek için bir fırsat sağlamıştır. İkincisi, 35 yaş üstü gebelik arayan kadınların oranındaki artış gibi toplumsal değişiklikler ortaya çıkmıştır. Üçüncüsü, moleküler biyoloji ve genetiğin gelişimi ile beraber şimdiye kadar "açıklanamayan infertil çiftler" olarak kabul edilen çiftlerin incelenmesi, teşhisi ve değerlendirilmesi mümkün hale gelmiştir.

Yardımcı üreme teknolojisi (YÜT) in vitro fertilizasyon (IVF), üremeye yardımcı olmak için yapılan tedavi veya prosedürü ifade eder. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

(ICSI), her yardımcı üreme ünitesinin vazgeçilmez bir prosedürü haline gelmiştir (Simopoulou ve ark., 2016).

Korona kümülüs hücreleri, yani granüloza hücreleri, oositin zona pellusidanın çevresinde bulunur ve ovulasyonda oosit ile birlikte atılır. Kümülüs ooforusun gerek oosit olgunlaşmasındaki gerekse döllenme sırasındaki önemi çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Aktan ve ark., 2011).

Oosit olgunlaşması, döllenmeyi ve erken embriyo gelişimini desteklemek için gerekli olan, hücrede yapısal ve biyokimyasal değişiklikleri içeren, karmaşık ve dinamik bir süreçtir. ICSI'den önce, oositleri çevreleyen korona kümülüs hücreleriyle inkübe etmek, in vitro sitoplazmik olgunlaşmanın tamamlanmasını artırabilir, ya da aksi şekilde uzun süreli kültür hücre dejenerasyonunu ve oosit yaşlanmasını indükleyebilir (Carvalho ve ark., 2020).

Rutin olarak tüp bebek ünitelerine başvuran hastalardan toplanan yumurtalar, ICSI öncesi ekilibrasyon amacı ile 2 saat kadar inkübatörde bekletilir ve korona kümülüs hücreleri ekilibrasyon sonrası temizlenir (Mizuno ve ark., 2018). ICSI'de seçilen ve hazırlanan tek bir sperm, korona ve kümülüs hücreleri temizlenmiş olan yumurtanın merkezine mikropipet yardımı ile enjekte edilir. ICSI'den sonra 17±1 saatlerinde fertilizasyon kontrolü yapılır. Daha sonra en iyi embriyonun seçilebilmesi için transfer zamanına kadar takip gerçekleştirilir (Alpak, 2009).

Yarıklanma evresine gelmiş embriyo; hücre sayısı, hücre boyutu, fragmantasyon ve multinükleasyon bakımından ayrı ayrı değerlendirilir. Normalden daha hızlı veya daha yavaş bölünen embriyoların implantasyon potansiyelinin daha az olduğu düşünülmektedir (Zhan, Ye, Clarke, Rosenwaks ve Zaninovic, 2016). İçinde Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) bulunmayan zarla çevrili olan sitoplazma parçacıkları fragmantasyonu oluşturur. Fragmantasyon oranı ≥10 ise embriyo 1. kalite olmaktan çıkar. Yapının blastomer ya da fragment olup olmadığından emin olmak için çekirdek kontrolü yapılır. Fragmentlerin çekirdeği olmaz (Stone, Greene, Vargyas, Ringler ve Marrs, 2015).

Multinükleasyon; bir blastomerde birden fazla nükleusun bulunması olarak tanımlanır. Multinükleasyon içeren embriyolara genellikle orta veya şiddetli

fragmantasyon eşlik eder. Multinükleasyonun kontrolü 2. günde yapılır. 3. veya 4. günde embriyo kendi kendini tamir edebilir. Embriyo multinükleasyonu birçok araştırmada embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olmuştur. Yapılan araştırmalara göre; multinükleasyon içeren embriyolarda implantasyon oranı düşer, kromozom anomali riski artar ve spontan düşük oranı artar (Setti, Figueira, Braga, Iaconelli ve Borges, 2018).

IVF işleminde, embriyo her aşamada dikkatlice incelenir, değerlendirilir ve skorlandırılır. Amaç, en iyi embriyoyu seçip transfer etmek ve gebeliğin oluşmasını sağlamaktır (Alpak, 2009).

1.2. Amaç

Çalışmanın asıl amacı; erken soyularak veya inkübasyon sonrası soyularak intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılan oositlerdeki fertilizasyon oranının, multinükleasyon oranının, iyi kalite 3. ve 5. gün embriyo oranlarının ve gebelik oranlarının prospektif olarak araştırılmasıdır.

40 yaşın altında, erkek faktörü olmayan ve yumurta sayısı 5'den yukarıda olan hastalar araştırmamıza dahil edilmiştir. Oosit-pick up (OPU) sonrası toplanan oosit-korona-kümülüs (OKK) kompleksleri rastgele ikiye bölünmüştür. Rutin olarak tüp bebek ünitelerine başvuran hastalardan toplanan yumurtalar, ICSI öncesi ekilibrasyon amacı ile 2 saat kadar inkübatörde bekletilir ve korona kümülüs hücreleri ekilibrasyon sonrası temizlenir. OKK komplekslerinin yarısına (kontrol grubu) rutin prosedür uygulanmış, kalan yarısı (çalışma grubu) ise OPU dan hemen sonra bekletilmeden soyulmuş ve ICSI prosedürleri uygulanmıştır. Kontrol grubu ile çalışma grubundaki embriyoların fertilizasyon oranları, multinükleasyon oranları, 3. gündeki ve 5. gündeki 1. kalite embriyo oranları, blastokiste giden embriyo oranları karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda, embriyo transferi sonrası 12.günde Beta-HCG takibi yapılarak gebelik oranları karşılaştırılmıştır.

Araştırmamızda şu soruların cevaplarına ışık tutmak hedeflenmiştir:

- Korona kümülüs hücrelerinin erken soyulması multinükleasyon oranını arttırır mı?
- Korona kümülüs hücrelerinin erken soyulmasının fertilizasyona bir etkisi var mı?
- Korona kümülüs hücrelerinin erken soyulması embriyo kalitesini etkiler mi?
- Korona kümülüs hücrelerinin erken soyulması gebelik oranını etkiler mi?

Bulduğumuz sonuçlar daha ilerdeki araştırmalar için fikir niteliğindedir.

1.3. İnfertilite

Dünya çapında üreme dönemindeki çiftlerin %8-%12 sinin infertiliteden etkilendiği düşünülmektedir. Erkeklerin infertilite vakalarınn %20-%30 undan tek başına sorumlu olduğu ancak vakaların %50 sinde de payı olduğu tespit edilmiştir (Vander Borght ve Wyns, 2018). Kadınların ise infertilite vakalarının %40-%50 sinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Çiftlerin yaklaşık %15 inde infertilite nedeni açıklanamamaktadır (Boivin, Bunting, Collins ve Nygren, 2007). Kısırlık tedavisi için kurulan Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Merkezleri, gelişen tıp ve teknoloji ile birlikte bebek sahibi olmayı imkanlı kılmaktadır.

İnfertilitenin çevresel, genetik, anatomik, ekonomik, sosyal birçok sebebi olabilir. Kadın inertilitesinin başlıca nedenleri: kadın yumurtlama bozuklukları, tubal hasar, uterus ve periton kaynaklı anatomik bozukluklar olduğu rapor edilmiştir (O'Flynn, 2014). Erkek infertilitesinin başlıca nedenleri ise: anorşi, kriptoorşidizm, konjenital vaz deferens agenezisi, genetik anomaliler, hipogonadotropik hipogonadizm, testiküler travma/torsiyon, ürogenital enfeksiyonlar, ürogenital sistem obstriksiyonu, sistematik hastalıklar, varikosel, ereksiyon/ejekülasyon bozuklukları, cerrahilere bağlı testiküler hasar, testis tümörleri ve hipogonadotropik hipogonadizmdir (Krausz, 2011).

ÜYTE Merkezlerine başvuran çiftlerden detaylı öykü alınır, gerekli olan bütün fizik muayeneler yapıldıktan sonra hekim tarafından tedavi yöntemi belirlenir ve yol haritası çizilir.

1.4. Gamet Hücreleri

1.4.1. Sperm

Erkek üreme hücresine sperm yani spermatozoon denir. Sperm, ergenlik dönemine gelen erkeklerde testislerde üretilmeye başlanır. Puberteye gelen erkeklerde GnRH (Gondotropin Salgılayıcı Hormon) kontrolü ile hipofizin ön lobu uyarılır, FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH (Luteinleştirici Hormon) salınımı başlar. FSH seminifer tübüllerinde sperm üretimini indükler. Yeteri kadar sperm üretildikten sonra sertoli hücrelerinden salgılanan inhibit hipofizin ön lobunu uyarır ve FSH salınımı durdurulur. LH hormonu leyding hücrelerini uyarır ve bu sayede leyding hücrelerinden testesteron hormonu salgılanır (O'Donnell, Stanton ve de Kretser, 2017).

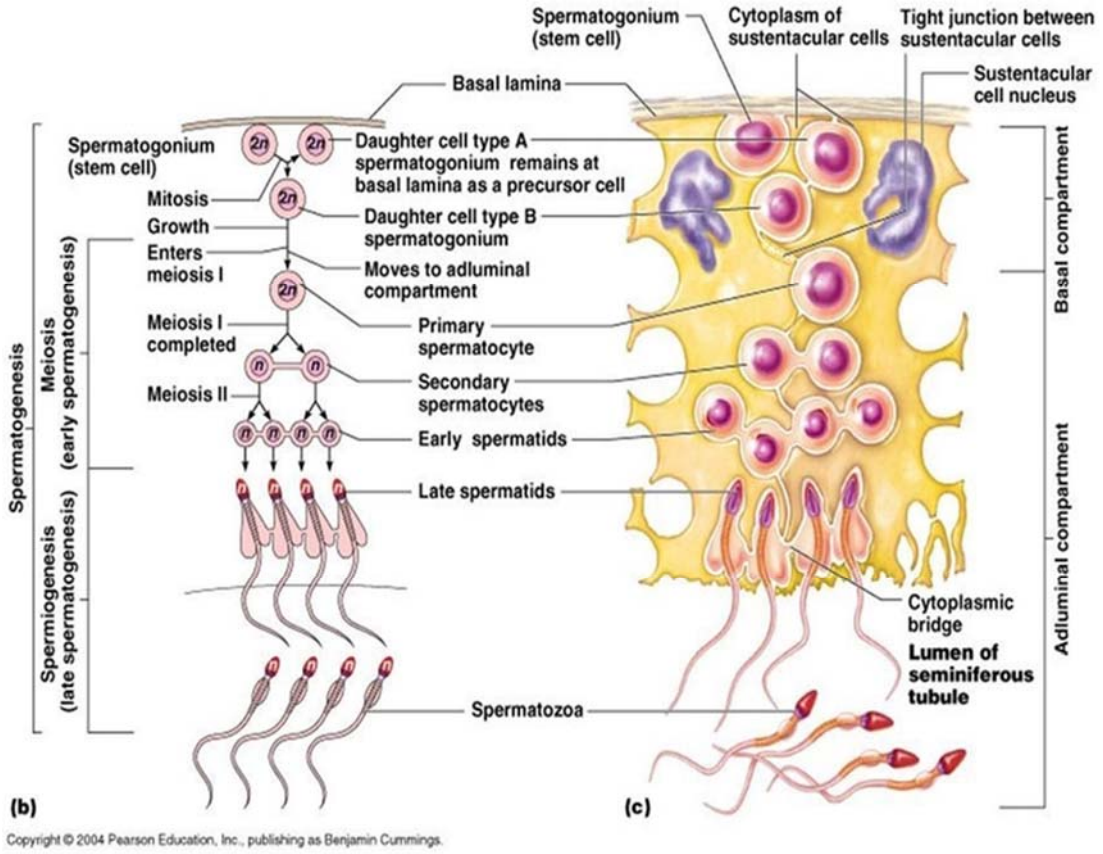
Puberte dönemine gelen erkeklerde başlayan ve yaşlanıncaya kadar devam eden, spermatogonial kök hücrelerden spermatozoaya oluşumunu sağlayan olaylar dizisine spermatogenezis denir. Bu olay testislerde gerçekleşir. Spermatogenezis ortalama 74 gün sürer ve 3 aşamada incelenir (Suede, Malik ve Sapra, 2021).

Birinci aşama spermatositogenez aşaması yani proliferasyon aşamasıdır. Bu fazda spermatogonialar mitotik bölünme ile çoğalırlar. Testesteron etkisi ile spermatogonialar DNA (Deoksiribo nükleik asit) larını ikiye katlayarak çoğalmaya başlarlar. Bu çoğalan hücrelerden bir kısmı spermatogonyum B tipine farklılaşırken bir kısmı ise spermatogonyum A hücreleri olarak kullanılır. B tipine farklılaşmış olan hücreler spermatogenez için kullanılacak olan hücrelerdir. Spermatogonyum A hücreleri ise kaynak hücreleridir, gerektiğinde mitotik aktivite ile yeniden çoğalabilecek olan hücrelerdir. B tipi spermatogonyumlar özelleşir, büyür ve primer spermatosite dönüşür. Primer spermatositler 2n DNA içeren 46 kromozomlu hücrelerdir (44+XX veya 44+XY) (Moore, Persaud ve Torchia, 2015).

İkinci aşama ise mayoz aşamasıdır. Primer spermatosit oluşumundan itibaren 1.mayoz başlar. 1. Mayozun başında hücre DNA'sı iki katına çıkararak 4n olur. Krossing over bu esnada meydana gelir. 1.Mayoz tamamlandığında 2 adet 2n DNA içeren daha küçük olan yavru hücreler meydana gelir, bunlar sekonder spermatosit olarak adlandırılır. Sekonder spermatositler 2.mayozu geçirir ve 4 adet 23 kromozom içeren n DNA'lı

spermatidler elde edilir. Bu spermatidlerin 2 tanesi 44+XX taşırken 2 tanesi 44+XY taşımaktadır (Moore ve ark., 2015).

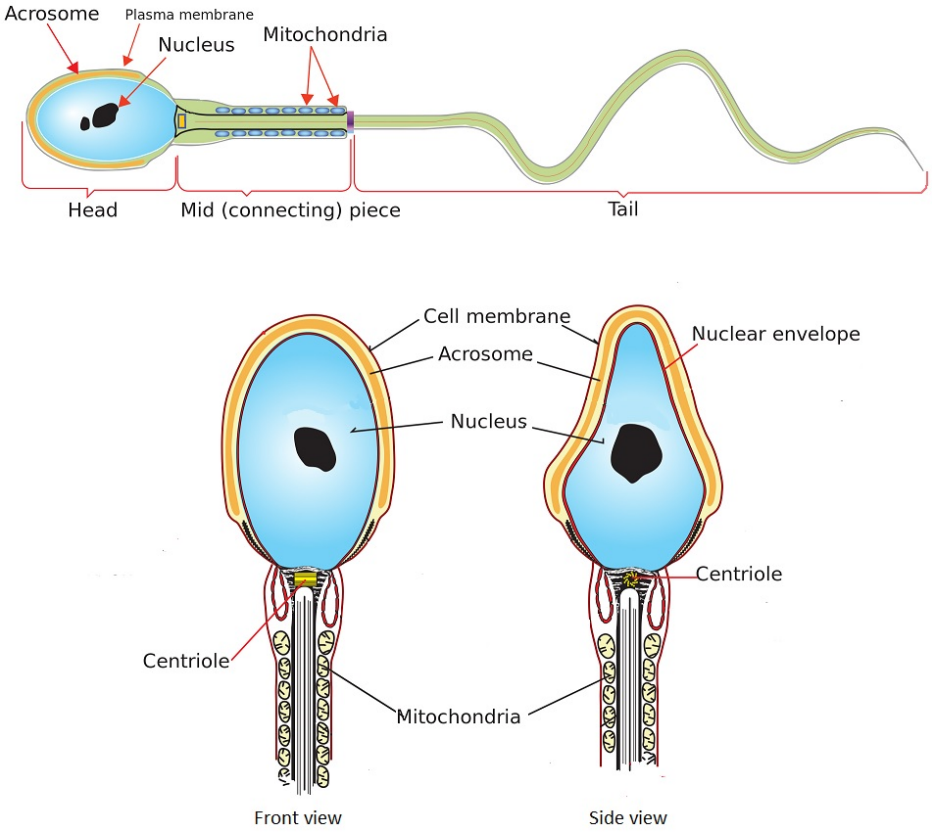
Üçüncü aşama yani son aşama ise olgun spermlerin oluştuğu spermiyogenez aşamasıdır. Yuvarlak hücre olan spermatidler sırası ile golgi evresi, kep/şapka evresi ve akrozomal evrelerini geçirerek seminifer tübül lümenine atılırlar. Seminifer tübül lümenine atılan olgun spermatidler hareket yeteneği kazanmak için epididimise göç ederler. Spermler vas deferenste depolanır ve ejakülasyon sırasında semenin içinde penisten dışarı atılırlar (Suphamungmee, Wanichanon, Vanichviriyakit ve Sobhon, 2018). Spermatogenez aşaması Şekil 1 ‘de gösterilmiştir.



Şekil 1: Spermatogenez Aşamaları

Olgun insan spermatoozonu 60 µm uzunluğundadır; baş, orta bölüm ve kuyruk bölümlerinden oluşur (Alberts ve ark., 2002).

Spermin baş kısmında çekirdek bulunur. Çekirdek hücrenin DNA'sını saklar, ayrıca baş kısmında akrozom denilen bir bölge vardır. Sperm yumurtaya ulaştığında akrozom da bulunan enzimler salınır, bu şekilde sperm yumurtanın hücre zarından geçer. Spermin baş kısmından başlayıp boyunda da devam eden sperm zarı bulunur. Spermin boyun kısmında bir çift sentriol bulunur. Sperm yumurta içine girmeyi başardığında bu sentrioller sayesinde anne ve babadan gelen kromozomların ilk bağlanması gerçekleşir. Yani embriyonun oluşmasında spermde ki sentriollerin rolü çok büyüktür. Spermin orta kısmı mitokondri ile doludur. Mitokondri hücrelerde enerji üretmekten sorumlu organeldir. Sperm hareket etmek için orta kısımda ki enerjiyi kullanır. Spermin kuyruk kısmı ise kasılarak hareketi sağlar. Spermin boyun kısmından başlayıp kuyruğa kadar uzanan aksonem bulunur. Spermin kuyruğunda ki aksonem 9+2 mikrotübül yapılıdır. Mikrotübüller ise mikroflamentlerden oluşur. Mikroflamentlerin kasılma özelliği vardır, kalsiyumun olduğu yerde mikroflamentler kasılır ve spermin dişi üreme sisteminde ki hareketi bu şekilde sağlanır. Dolayısı ile sperm kalsiyum olmadığı yerde hareket edemez (Alberts ve ark., 2002).



Şekil 2: Sperm Morfolojisi (Wikipedia, Erişim tarihi: 25.08.2021)

1.4.2. Oosit

Olgun dişi üreme hücresi oosit olarak adlandırılır. Oogenez dişi primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşme sürecidir. Primordiyal folikülden graaf foliküle kadar geçen olaylar dizisine folikülogenez denir. Oogenez ve folikülogenez eş zamanlı gerçekleşir ve her ikiside embriyonik dönemde başlar (Yıldırım, Okar ve Dalçık, 2002).

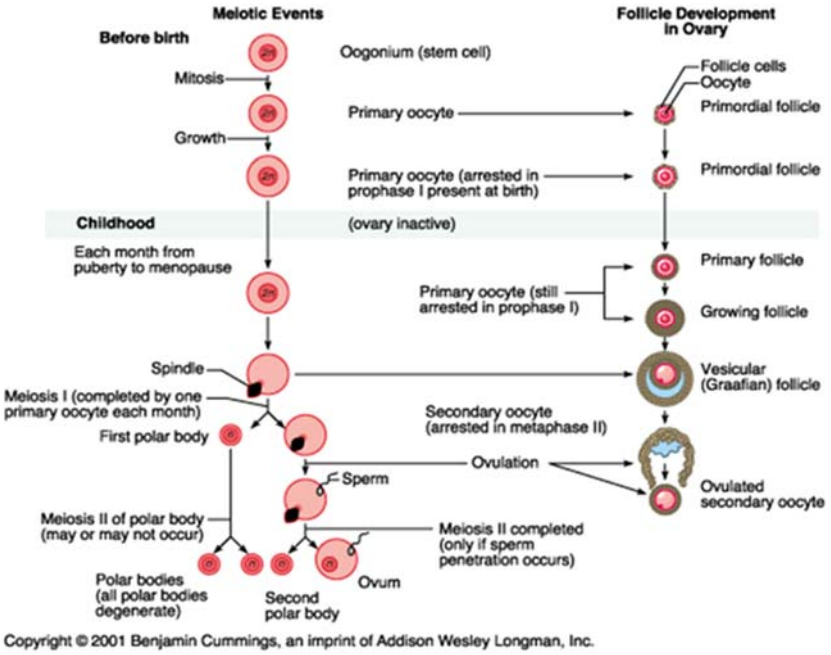
Kız çocuğu henüz embriyonik dönemde 3 aylık iken ovaryumları oluşmaya başlar. Vitellus kesesinden göç eden primordiyal germ hücreleri yumurta rezervi yapmak üzere ovaryumda kök hücre yığını oluşturur. Bu hücreler oogonyum olarak adlandırılır. Oogonyumların sayısı mitozla hızlı bir şekilde artmaya başlar. 3. Ayda bu hücrelerin sayısı yaklaşık 6-7 milyon kadardır. İlerde ki over rezervini bu mitotik aktivite belirler. Embriyonik dönemin 3.ayından sonra çoğalma biter, yaşlanma başlar. Oogonyumlar 3. ay itibari ile 1.mayoza girerler. Oogonyumlar büyüyerek primer oosite farklılaşırlar ve ergenlik dönemine kadar 1.mayozun profazın diploten evresinde beklerler. Primer oositlerin (46 kromozomlu) etrafı tek katlı yassı epitel hücreler ile çevrelenmiştir, bu yapı primordiyal folikül olarak adlandırılır. Yenidoğan bir kız çocuğu yaklaşık olarak 1 milyon rezerv hücreye sahiptir. Bu sayı puberte dönemine kadar yaklaşık olarak 300.000-400.000' e kadar düşer (Junqueira, Solakoğlu ve Aytekin, 2009).

Puberte dönemine gelen kız çocuğunda her ay hipofizden salgılanan FSH etkisi ile 5-15 adet primordiyal folikül olgunlaşmaya başlar. Primordiyal folikül hücreleri mitoz ile çoğalır ve tek katlı kübik hücre katmanı oluşur ve bu yapıya primer folikül adı verilir. Folikül hücreleri çoğalmayı sürdürür ve granüloza tabakası oluşur, bu yapıya preantral folikül adı verilir. Bu aşamada folikülün en dışında teka hücreleri de oluşur. Teka hücreleri androstenedion hormonu sentezlemeye başlar. Granüloza hücrelerinin salgıladığı aromataz enzimi sayesinde, androstenedion östrojene dönüşür ve folikül östrojen salgılamaya başlar. Antrumun içinde, primer oositi de çevreleyen ve hücre duvarına doğru granüloza hücrelerinin yoğunlaştığı yere kumulus ooforus adı verilir. Granüloza hücreleri arasındaki sıvı dolu kesecikler birleşerek daha büyük bir boşluk oluşturur, bu boşluğa antrum adı verilir. Antrumda folikül sıvısı bulunur. Bu aşamadaki folikül, antral folikül olarak adlandırılır. Folikül sıvısındaki artış ile beraber folikül büyür ve graaf folikülü olarak adlandırılır, ancak 1 veya 2 tanesi graaf folikül haline gelebilir (Junqueira ve ark., 2009).

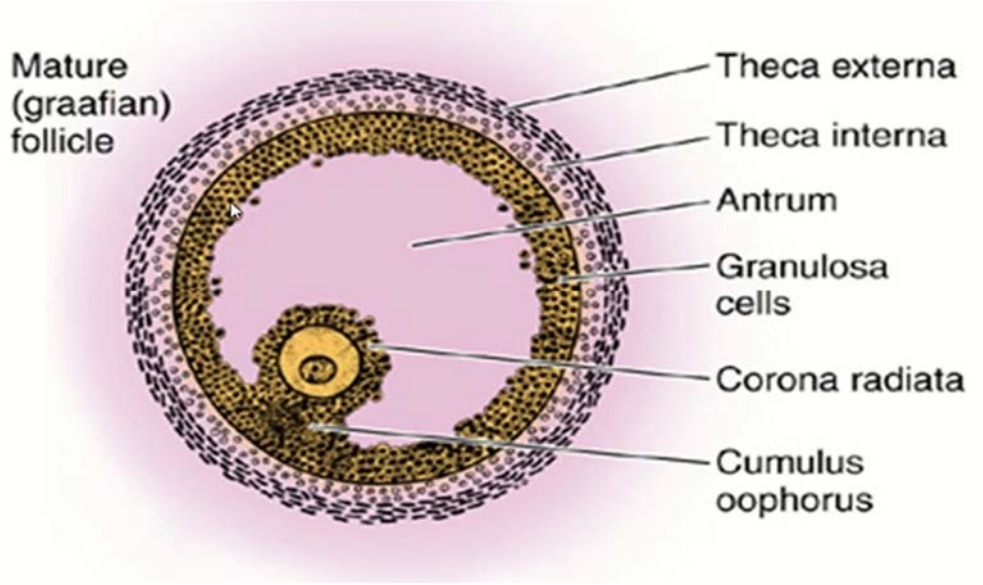
Primordiyal folikülün olgunlaşması ile beraber folikülün içindeki 1. mayozun profazın diploten aşamasında olan primer oosit 1. mayoz bölünmesini tamamlar. 1. mayoz sonunda birbirinden farklı 2 adet yavru hücre oluşur. Bunlardan büyük olan sekonder oosit olarak adlandırılırken, küçük olan ise birinci kutup cismi olarak adlandırılır. Sadece graaf folikülün içinde sekonder oosit bulunur. Sekonder oosit 2. mayoza girer ancak metafaz II aşamasında durur (Gilbert, 2000).

Adet ortasında yaklaşık 14. günde graaf folikül çatlar içindeki sekonder oosit tüplerin içine atılır. Geri kalan foliküller ise atreziye uğrar. Ovulasyondan sonra oositin hemen etrafında olan hücre topluluğuna korona radiata adı verilir. Korona radiata, korona ve kümülüs hücrelerinden oluşur. Korona kümülüs hücrelerinin gerek oositin olgunlaşmasında gerek döllenme sırasındaki önemi büyüktür (Robker, Hennebold ve Russell, 2018).

Tüplerin içine atılan sekonder oosit sperm ile karşılaşırsa ve sperm yumurtanın içine girmeyi başarırsa oositin 2. mayozu spermin sentriyolü kullanılarak tamamlanır. Bu olay menopoza kadar devam eder (Avidor-Reiss, Mazur, Fishman ve Sindhwani, 2019).



Şekil 3: Oogenez Aşamaları (Longman)



Şekil 4: Olgun (Graaf) Folikül (Jungueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th edition, 2010)

Kümülüs hücrelerinin sitoplazmik uzantıları vardır. Bu uzantılar ile zona pellusidayı geçer ve oositin plazmalemmasına ulaşır. Oositin olgunlaşması için gerekli olan maddeleri bu şekilde sağlar. Oosit ve oositi çevreleyen korona kümülüs hücreleri arasında etkileşim vardır. Bu hücreler siklik nükleotid, glukoz metabolitleri, amino asit gibi küçük moleküllerin sentezlenmesine olanak sağlayarak oosit olgunlaşması ile gelişiminde büyük rol oynarlar. Korona ve kümülüslerdeki gen ekspresyon seviyeleri, oosit gelişim potansiyelini yansıtmaktadır. Aynı zamanda, oositler enerji ihtiyaçlarını karşılamak üzere pirüvat ve laktat gibi enerji substratları sağlamak için korona kümülüs hücrelerinden faydalanırlar (Zhang, 2020). Bu hücrelerin embriyonik gelişimde de önemli rol oynadığı bilinmektedir (Mori, Amano ve Shimizu, 2000).

Çoğu memeli türünde, kümülüs hücreleri döllenme sırasında oositi çevreler. Kümülüs hücreleri hiperaktive olmuş spermleri oosite doğru yönlendirirken anormal spermlerin kümülüs matriksine girmesini engeller (Van Soom, Tanghe, De Pauw, Maes ve de Kruif, 2002).

Aynı zamanda, yapılan bazı araştırmalara göre, kümülüs hücrelerinin olgun oositlerin yaşlanmasını hızlandırdığı da bilinmektedir (Qiao ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2015).

1.5. Oositlerin Toplanması (OPU)

Hastalardan oosit toplanabilmesi için kontrollü ovarian hiperstimülasyon (KOH) tekniği kullanılarak bir siklusta çok sayıda folikül geliştirilmesi hedeflenir. KOH'un amacı en ideal sayıda kaliteli oositler elde etmektir. KOH uygulaması için birden fazla protokol seçeneği vardır ve hastanın özelliklerine göre hastaya uygun protokol belirlenir (Howie ve Kay, 2018).

Bu protokollerde hipotalamus-hipofiz-over aksı tedavi öncesi baskılanır, gonadotropinler ile overler uyarılır çok sayıda folikül geliştirilmesi amaçlanır. GnRH-agonist ve GnRH-antagonist kullanımı ile de erken LH artışının engellenmesi hedeflenir (Lin ve ark., 2015).

Östrojen düzeyi ve Ultrasonografi (USG) ile foliküllerin takibi yapılır. Eğer >17mm den büyük 2-3 adet folikül oluşmuş ise human koryonik gonodotropin (HCG) enjeksiyonu yapılır. HCG enjeksiyonundan yaklaşık 36 saat sonra yumurtanın çatlaması gerçekleşir. Bu yüzden 34-36 saat aralığında datransvaginal USG yardımı ile folikülün aspirasyonu yapılır (Lin ve ark., 2015).

1.6. Oositlerin Değerlendirilmesi

IVF de kaliteli embriyolar elde etmek için her aşamada değerlendirme yapmak çok önemlidir. Oositlerin toplanması ile başlayıp transfer edilecek embriyoya kadar her adımda dikkatlice değerlendirme yapılmalıdır, bu sayede gebelik oranları önemli ölçüde artmaktadır.

Foliküllerin aspirasyonu sonrası toplanan kümülüs-oosit-kompleksleri (KOK) inkübatörde bekletildikten sonra KOK un skorlaması yapılır. Olgunlaşmış yumurtalarda korona radiata ışınsal olarak yerleşmiştir. Kümülüs hücreleri yayılmıştır, korona hücreleri ise genişlenmiştir ve transparan görünümdedir. Olgunlaşmamış yumurtalarda ise KOK koyu görünümlüdür, hücreler üst üste binmiş ve kompakt şekildedirler. Granüloza hücreleri zona pellusidaya (ZP) doğru yapışmışlardır. Olgunlaşmış yumurtalarda olgunlaşmamış yumurtalara göre daha az hormon ihtiyacı olacağından hücre miktarı daha azdır. Olgunlaşmamış yumurtaların korona kümülüs hücrelerinin genişlemesi ve oositin

nüklear olgunlaşması için in vitro maturasyon işlemi gerçekleştirilebilir, bu sayede olgunlaşma sağlanabilir (Rienzi, Balaban, Ebner ve Mandelbaum, 2012).

KOK değerlendirilmesinden sonra, korona ve kümülüs hücrelerinin temizlenmesi gerçekleştirilir. Hyaluronidaz enzimi kullanılarak korona hücrelerinin arasındaki bağlar gevşetilir ve hücreler temizlenir. Hyaluronidaz enzimine maruziyet en az şekilde (yaklaşık 30-45 saniye) tutulmalıdır. Korona hücrelerinin temizlenmesinden sonra denüdasyon pipeti kullanılarak kümülüs hücrelerinin temizlenmesi gerçekleştirilir. Oosit hasarını önlemek için pipetleme sırasında çok dikkat edilmeli ve pipetlerin çapı uygun şekilde seçilmelidir (Karakoç ve ark., 2019).

Oositin hücrelerden arındırılması işleminden sonra ışık mikroskobu altında oositin maturasyonunun değerlendirilmesi yapılır. Çekirdeği ve çekirdekçikleri görünen, 46 kromozomlu olan oositler olgunlaşmamış Germinal Vezikül (GV) yumurta olarak adlandırılır, bu oositlere ICSI yapılmaz (Karakoç ve ark., 2019).

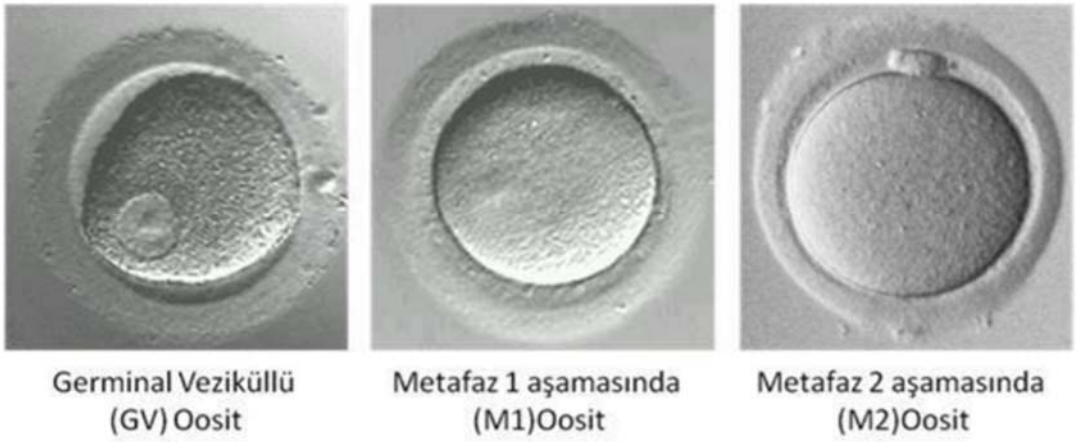
Hem çekirdeği görünmeyen hem polar cisimciği olmayan oositler ise M-I (Metafaz 1) olan intermediate oositler olarak adlandırılır. Bu oositler 46 kromozomludur, ama kromozomunu yarıya indirmek üzeredirler. 4-6 saat bekletildikten sonra, M-I'deki oositler polar cisimciğini atarlar ise ICSI işlemi yapılabilir. Döllenme olasılığı %30'dur (Karakoç ve ark., 2019).

Çekirdeği görünmeyen ve polar cisimciğini atmış olan oositler ise M-II (Metafaz II) de olan olgun oosit yani sekonder oosit olarak adlandırılır, 23 kromozomludurlar ve ICSI için uygun olan oositlerdir (Karakoç ve ark., 2019).

Oositlerin maturasyonunun değerlendirilmesi sonrasında oositlerin morfolojik olarak değerlendirilmesi yapılır. Oositin morfolojik olarak değerlendirilmesi sırasında ZP, perivitellin aralık, polar cisimcik, sitoplazma skorlaması yapılır. Oositin sitoplazması şeffaf, homojen yapıda olmalıdır, sitoplazmanın granüllü olması istenmeyen bir durumdur ve organellerde sorun olabileceği düşünülür. Sitoplazmada refraktil cisimcik ve vakuoller değerlendirilmesi de yapılır. Refraktil cisimcikler lipid ve granül içeren yapılardır, bu yapıların >5µm den büyük olması fertilizasyon oranını düşürür ve

blastokist gelişimini olumsuz etkilediği belirlenmiştir (Rienzi, Vajta ve Ubaldi, 2011; Veeck, 1991).

Vakuoller membrana bağlı sitoplazmik inklüzyonlardır, fertilizasyon ve blastokist oranını olumsuz etkilediği bilinmektedir. ZP'nin kalınlığının implantasyon için önemli olduğu rapor edilmiştir. Perivitellin aralık hem dar hem temiz olmalıdır, buradaki inklüzyon varlıkları anomali olarak ifade edilir. Polar cisimciğin normalden çok büyük olduğu durumlarda anöploidi olasılığı not edilmelidir. Aynı zamanda fragmante olmuş polar cisimcikler de embriyo gelişiminde olumsuz sonuçlara sebebiyet verir. Bunlarla beraber çapları çok büyük veya çok küçük oositler de değerlendirme sırasında dikkate alınır. Dev oositler anormal genetik içeriğe sahip olabilirler. Yapılan araştırmaya göre çapı normalden daha küçük olan oositlerde fertilizasyon oranının çapı normalden büyük olanlara göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Karakoç ve ark., 2019).



Şekil 5: GV Oosit, M1 Oosit, M2 Oosit (Prof.Dr. Mehmet CINCIK Arşivinden)

1.7. Klasik In Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplasmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

Tüp bebek tedavisi bilim insanları tarafından 1978'den beri çalışılan bir konudur. Zaman içinde gelişen tıp ile birlikte tüp bebek alanında birçok değişiklik ve iyileştirme olmuştur.

Günümüzde tüp bebek tedavilerinde 2 yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi klasik IVF'dir. Erkek faktörü olmayan yani kaliteli spermlerin olduğu

zamanlarda daha doğal bir yol olan klasik IVF tercih edilir. Klasik IVF'de korona kümülüs hücreleri temizlenmez ve yumurta başına en az 100.000 haraketli yıkanmış sperm boca edilir ve spermin kendiliğinden yumurtanın içine girmesi beklenir. Döllenme sonucu oluşan embriyo annenin rahmine yerleştirilir (DeCherney, 1986).

Ancak şiddetli oligospermi, astenospermi, oligoastenoteratospermi ve azospermi gibi durumlarda spermin yumurtayı döllemesi mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda en gelişmiş ve en etkili yol olan İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) tercih edilir. Azospermik erkeklerde MikroTESE, TESE, MESA gibi biopsi yöntemleriyle cerrahi yoldan sperm bulunmaya çalışılır ve izole edidiğ takdirde ICSI için kullanılabilir. Ayrıca kadın yumurtasının az olduğu durumlarda da klasik IVF tercih edilmez. Erkekten alınan semen örneğinin içinden yapılan değerlendirmeler sonucunda bir tane sperm seçilir. Spermin kuyruğu kırılır ve hareketsiz bırakılır. Kadından alınan ve hazırlanan oosit holding pipet ile kutup cisimciği 6-12 hizasına gelecek şekilde tutulur. Seçilmiş sperm mikropipet yardımı ile oosit içerisine girilerek bırakılır. Bu yönteme ICSI denir. ICSI'de birçok basamak atlanmış olur. Bu işlem yapılırken fazla miktarda sitoplazma aspire etmemeye, spermin başına ve boynuna zarar vermemeye dikkat edilmelidir (Palermo ve ark., 2000).

İki yöntem arasındaki fark ICSI'de bir tane sperm seçilerek yumurtanın içerisine enjekte edilmesi şeklinde gerçekleşirken, klasik IVF'de binlerce spermden sadece bir tanesinin yumurtayı kendiliğinden döllemesi beklenmektedir. ICSI'de döllenme oranı klasik IVF'e göre daha yüksektir. Günümüzde birçok merkez tarafından daha kesin sonuç verdiği için ICSI ağırlıklı olarak tercih edilen yöntemdir (Zheng ve ark., 2019).

1.8. Fertilizasyon Kontrolü

Fertilizasyon dişi gamet hücresi ve erkek gamet hücresinin bir araya gelmesi ile oluşan ve birbirini takip eden kompleks moleküler bir süreçtir (Marcello, Singaravelu ve Singson, 2013).

Fertilizasyon öncesi spermin yumurtayı dölleyebilmesi için spermin kapasite olması gereklidir. Spermin kapasitasyonu ile bir takım metabolik değişiklikler meydana gelir. Kapasitasyon ile sperm akrozom reaksiyonuna hazırlanır, intrasellüler iyonlarda ve

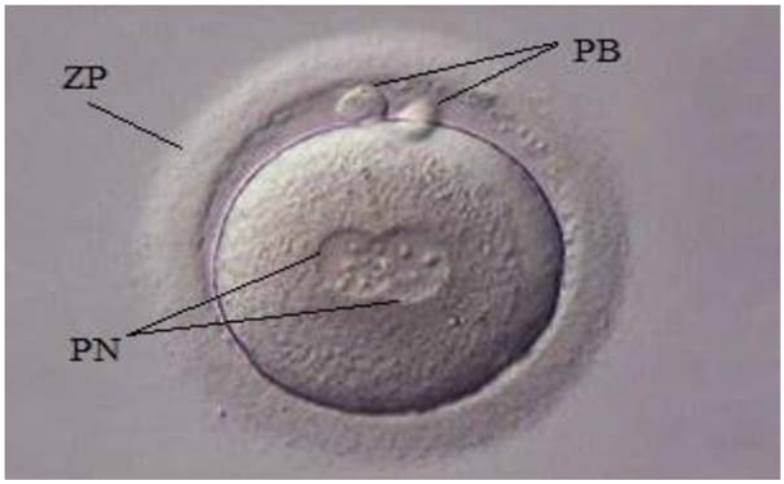
sperm zarında birtakım değişiklikler meydana gelir. Sperm zarında bol miktarda kolesterol mevcuttur. Bu kolesteroller uzaklaştırılmadan sperm zarındaki sinyal molekülleri açığa çıkamaz. Bu sinyal molekülleri yumurtayı bulmak ve yapışmak için gereklidir. Sperm kapasite olunca plazma zarında glikoproteinlerin asıl bileşeni olan kolesterol uzaklaştırılmış olur, sperm zarının geçirgenliği artar ve bu şekilde spermin zonaya bağlanabilme kapasitesi arttırılmış olur. Kapasitasyonunu tamamlamış olan sperm korona kümülüs hücrelerini geçmeye hazır hale gelir (Ikawa, Inoue, Benham ve Okabe, 2010; Kaji ve Kudo, 2004).

Sperm oositin korona ve kümülüs hücrelerini geçerken burada spermin dış akrozom zarı erir ve akrozom enzimleri salınır ve sperm zona pellusidaya bağlanır. Bu bağlanma sırasında sadece spermin iç akrozomal membranı vardır. Spermin başında bulunan sp56 enzimi zona pellusidada ki ZP3'e bağlanarak akrozom reaksiyonunu indükler ve sperm zonadan ve perivitellin aralıktan geçer (Anifandis, Messini, Dafopoulos, Sotiriou ve Messinis, 2014).

Sperm akrozomunun iç zarı ile oossit membranı arasında bir etkileşim başlar. Buradaki proteinler ve reseptörler sayesinde oolemmadakaki mikrovilluslar spermin başını sarar ve sperm oosit içerisine alınır. Spermin sitoplazması ve çekirdeği bu sayede oositin sitoplazmasına girmiş olur. Spermden gelen sentriyol sayesinde oosit 2. kutup cisimciğini atar ve 2. mayozunu tamamlamış olur. Oositin aktivasyonu gerçekleşir. Dişi kromozomları bir membran ile kaplanır ve dişi pronükleus (PN) oluşmuş olur. Sperm çekirdeğinin dekondensasyonuyla erkek pronükleus oluşur. Bu iki PN, yumurtanın merkezine doğru hareket ederek birbirlerine yaklaşırlar (Ikawa ve ark., 2010).

Doğal yolda, uzun bir şekilde meydana gelen bu olay, ICSI ile birçok adım atlatılarak kolaylaştırılır.

ICSI yapıldıktan sonra 16-18. saatlerde fertilizasyon kontrolü yapılır. Fertilizasyon kontrolü yapılırken, eğer döllenme gerçekleşmiş ise anneden gelen PN ve babadan gelen PN'nin ayrı ayrı yan yana konumlanmış şekilde olması beklenir. Aynı zamanda 2 adet kutup cisimciği (PB) de gözlemlenmelidir (Capalbo ve ark., 2017).



Şekil 6: Normal Fertilizasyon: ZP: Zona Pellusida, PB: Kutup Cisimciği, PN:Pronükleus.

1.9. Pronükleus Değerlendirilmesi

Döllenme kontrolü gibi pronükleusların (PN) değerlendirilmesi de 17±1 saatlerinde yapılır. Her bir pronükleusun içinde çekirdek öncül cisimcikleri (Nucleolar Precursor Body, NPB) bulunur. PN değerlendirilmesi ile bu çekirdek öncül cisimlerin dağılımı, büyüklükleri ve şekillerinin skorlanması yapılır. Yapılan araştırmalar çekirdek öncül cisimciklerinin kalitesinin embriyo kalitesi ve implantasyon üzerindeki önemini ortaya koymuştur (Scott, Alvero, Leondires ve Miller, 2000; Tesarik ve Greco, 1999).

Pronükleer morfoloji değerlendirmesi, kapsamlı bir şekilde zigotları puanlama yöntemi olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, bazı ülkelerde sadece zigotların dondurulmasına izin verilmektedir ve bu nedenle bu aşamada embriyoların seçilmesi gereklidir (Ludwig, Schöpper, Al-Hasani ve Diedrich, 2000; Zollner, Hartl, Dietl ve Steck, 2002).

Pronükleer morfolojiye artan ilgi nedeni ile birçok değerlendirme sistemleri ortaya çıkmıştır. Günümüzde bu skorlama sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanlar Scott ve Smith 1998 ve Tesarik ve ark. 2000 skorlama sistemleridir (Scott ve ark., 2000; Tesarik ve Greco, 1999).

Tesarik ve ark. sınıflandırma sisteminde, NPB'lerin sayısına ve dağılımına bağlı olarak altı farklı kategori mevcuttur (Tesarik ve Greco, 1999).

Tablo 1: Tesarik ve Ark. Sınıflandırma Sistemi

Pattern 0 (P0)	NPB lerin sayısı 3 ile 7 arasında ise PN içindeki NPB ler polarizedir. Eğer NPB lerin sayısı 7 veya 7'den büyük ise, NPB ler polarize olmazlar.
Pattern 1 (P1)	PN lerin içinde ki NPB ler arasında ki fark 3'den büyüktür.
Pattern 2 (P2)	En az bir PN'de polarizasyon olmadan az sayıda (<7) NPB ile karakterize edilir.
Pattern 3 (P3)	En az bir PN'de polarizasyon ve çok sayıda (> 7) NPB sunar.
Pattern 4 (P4)	En az bir PN'de çok az sayıda NPB vardır.
Pattern 5 (P5)	Bir polarize PN ve bir polarize olmayan PN vardır.

İkinci sınıflandırma, Scott ve diğerleri tarafından açıklanan Z-skorlama sistemidir. Bu sistemde zigot Z1, Z2, Z3, Z4 olarak 4 modele ayrılmıştır. Z1, Z2 ve Z3'te membranlar temas halindedir, ancak Z4'de durum böyle değildir (Scott ve ark., 2000).

Tablo 2: Scott ve Ark. Sınıflandırma Sistemi

Z1	Z1 zigotlarda, her iki PN de 3 ila 7 arasında NPB'ye sahiptir, PN'lerde ki NPB sayıları arasındaki fark birden fazla değildir. Her iki PN de polarizedir.

Z2	Z2 zigotları, Z1 zigotları ile aynı özelliklere sahiptir, ancak her iki PN de polarize değildir.
Z3	Z3 zigotlarındaki NPB sayılarında değişiklikler olabilir. Polarize olmayan bir PN ile birlikte bir polarize PN bulunur.
Z4	PN ler asimetrik ve/veya PN ler birbirlerinden ayrı.

Kısacası NPB lerin sayıları, boyutları, yerleşimleri çok önemlidir.

1.10. Bölünme Evresi Morfolojik Skorlaması

1.10.1. Hücre Sayısı ve Boyutu

Embriyo kalitesinin tespit edilmesinde gözlemlenen en önemli kriterlerden biri de hücre sayısıdır. Normalden daha hızlı veya daha yavaş bölünen embriyoların implantasyon potansiyellerinin daha az olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda bu embriyolarda, kromozomal anomali sıklığı daha fazla görülmüştür (Holte ve ark., 2007; Magli ve ark., 2007).

Blastomerlerin eşit büyüklükte olması embriyonun gelişim potansiyeli için önemlidir. Aynı zamanda, implantasyon oranlarını arttırmaktadır (Hesters ve ark., 2008).

1.10.2. Fragmantasyon

İçinde DNA bulunmayan, zarla çevrili sitoplazma parçacıkları fragment olarak tanımlanır. Bunlar gerçek blastomer değildirler. Fragmantasyon oranı %10 üzerine çıktığı zaman embriyo 1. kalite olmaktan çıkar. Fragmantasyon oranının artması gebelik potansiyelini azaltır ve bu oran ne kadar fazla ise o hücre apoptozise o kadar yakındır (Johansson, Hardarson ve Lundin, 2003).

1.10.3. Multinükleasyon

Çekirdek hücrenin komut merkezidir. Vücuttaki sağlıklı hücreler genellikle tek çekirdeklidir. Tek çekirdeklilik embriyo gelişimi için önemli bir durumdur. Döllenme işleminden sonra mitoz başlar. Mitoz ile beraber blastomer adı verilen embriyonik hücreler meydana gelir. Bu süreç normal bir şekilde ilerlerse her blastomer bir adet çekirdek içerir (Setti, Figueira, Braga, Iaconelli ve Borges, 2018).

Multinükleasyon, bir blastomer içerisinde birden fazla nükleusun bulunması olarak ifade edilir. Laboratuvarda 2. günde her blastomerin multinükleasyon açısından değerlendirilmesi gereklidir (Sun ve ark., 2018).



Şekil 7: (a) 2 Blastomerli, Her Biri Multinükleasyon İçeren Anormal Embriyo; (b) 2 Blastomerli, Her Biri Tek Çekirdek İçeren Normal Embriyo (Prof.Dr. Mehmet CINCIK Arşivinden)

Blastomer multinükleasyonu, erken insan embriyolarında gözlemlenen yaygın bir nüklear anomalidir. ICSI'de transfer edilecek embriyoyu belirlemek için kullanılan morfolojik kriterlerden biri de çok çekirdekli blastomerlerin (MNB) tespit edilmesidir. MNB tespiti ışık mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilir. Yapılan çalışmalarda, 2. ve 3. günlerdeki MNB oranı %11 ile %40 arasında değişiklik göstermiştir (Balakier, Sojecki, Motamedi ve Librach, 2016; Sun ve ark., 2018).

Bölünme evresindeki embriyolar analiz edildiğinde, multinükleasyonlu blastomerlerde bölünmenin bozulmuş olduğu, parçalanmanın arttığı ve implantasyon oranının düştüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, multinükleasyonu olmayan embriyolara

kıyasla multinükleasyonu olan embriyoların blastokist aşamasına ulaşma oranı düşmüştür. Embriyo gelişimi gibi, multinükleasyonlu embriyolarda embriyo transferinden sonraki gebelik oranı, mononükleer blastomerli embriyolara kıyasla düşmüştür. Bu nedenle bu embriyolar genellikle transfer edilmez (Ambroggio ve ark., 2011; Egashira ve ark., 2015).

Çok çekirdekli blastomerlerde meydana gelen DNA sentezindeki anomaliler 1987 gibi erken bir tarihte keşfedilmiştir (Tesarik, Kopecny, Plachot ve Mandelbaum, 1987). Aynı tarihlerde multinukleasyonun anöploidiyi ve kromozomlarda meydana gelen anomalileri arttırdığı başka araştırmalarla da desteklenmiştir (Laverge, De Sutter, Verschraegen-Spae, De Paepe ve Dhont, 1997).

Nüklear anomaliliğin klinik sonuçlar üzerindeki olumsuz etkisini araştırmak için floresan in situ hibridizasyon (FISH) kullanılarak çok sayıda preimplantasyon genetik tarama (PGS) çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalarda MNB içeren embriyoların %50 ile %100'ünde anöploidi ve mozaisizm tespit edilmiştir (Balakier ve ark., 2016).

Kligman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, MNB içeren embriyoların %74.5'inin ve MNB içermeyen embriyoların %32,3'ünün kromozomal olarak anormal olduğu bildirilmiştir (Sun ve ark., 2018). Benzer sonuçlar, MNB içeren embriyoların çoğunda genetik olarak anomali olduğu Yılmaz ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir (Yilmaz ve ark., 2014).

MNB içeren embriyolar başlangıçta implante olsa bile, devam eden gebeliğin düşük ile sonuçlanması beklenir (Pelinck ve ark., 1998).

FISH kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda ise, 3. gün anöploidi tespit edildikten sonra 5. gün hücrelerin kendi kendini onardığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, bazı anöploidi embriyolarının blastokist aşamasına gelişim sırasında kendi kendini düzeltme yeteneğine sahip olabileceğini göstermektedir. Bu embriyoların kendi kendini düzeltme yeteneği, bildirilen sağlıklı doğum vakaları için bir açıklama olabilir (Balakier ve ark., 2016; Stecher ve ark., 2014; Yilmaz ve ark., 2014).

Embriyolarda anormal çekirdekler gözlemlenmiş olmasına rağmen, bu tür anormal çekirdeklerin oluşma mekanizması bilinmemektedir. Bazı çalışmalara göre;

anormal çekirdeklenme mekanizmaları; bölünme başarısızlığı veya mitoz tamamlandıktan sonraki DNA'nın anormal paketlenmesidir (Egashira ve ark., 2015).

Jackson ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre, siklusta artan oosit sayısı ve yüksek E2 seviyesi ile orantılı olarak multinükleasyon oranının da arttığı bildirilmiştir. Döllenmiş embriyolarda multinükleasyonun, hızlandırılmış ovulasyon indüksiyonunun bir sonucu olduğu fikrine varmışlardır (De Vincentiis, De Martino, Buffone ve Brugo-Olmedo, 2013). Sun ve arkadaşları, HCG gününde düşük LH seviyesinin multinükleasyon ile korele olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda, kromozom polimorfizmi olan çiftlerin tüp bebek tedavisi sırasında MNB içeren embriyolarının sayısının, diğer çiftlere göre daha yüksek oranda olduğu bildirilmiştir (Sun ve ark., 2018).

Birçok araştırmacı multinükleasyonun nasıl ve neden olduğunu araştırmaktadır. Sitokinez olmadan karyokinez, çiftlerdeki kromozom polimorfizmi, kültür koşulları, suboptimal over stimülasyon rejimleri gibi halen araştırılan durumlar multinükleasyona sebep olan durumlardır (Ambroggio ve ark., 2011). Yapılan araştırmalara rağmen, multinükleasyonun mekanizması henüz tam olarak belirlenememiştir (Sun ve ark., 2018).

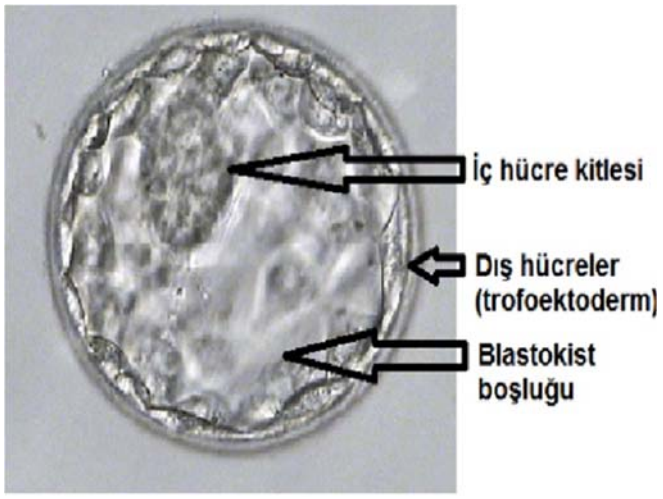
1.10.4. 3. Gün Embriyo Değerlendirilmesi

En iyi embriyoyu seçmek için yapılan değerlendirmelerden biri de 3. günde yapılan değerlendirmedir. Normal olarak sağlıklı büyüyen bir 3. gün embriyosu 6 ile 10 hücre içerir. Bu hücrelerin blastokiste ulaşma potansiyeli daha yüksektir (Dennis, Thomas, Williams ve Robins, 2006).

1.10.5. 5. Gün Embriyo Değerlendirmesi

Beşinci günki embiriyo blastokist olarak tanımlanır. Blastokist evresinde 2 tip hücre meydana gelir, bunlar trofoblast ve embriyoblasttır. Embriyoyu tamamen dış ortamdan ayıran epitel hücreler oluşur, bu hücrelere trofoblast adı verilir. Trofoblast blastokisti çevreleyen yapıdır ve içinde embriyoblast ve blastosöl (blastokist boşluğu) bulunur (Karakoç ve ark., 2019).

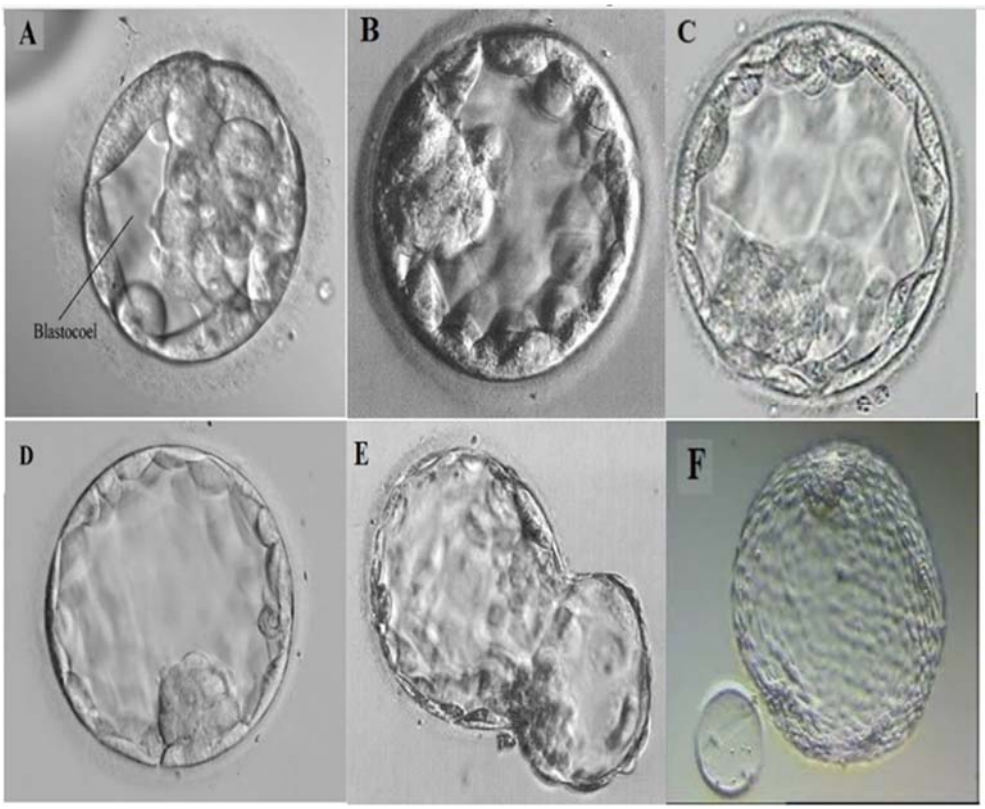
Embriyoblastların gelişmesi ile beraber iç hücre kitlesi (ICM) meydana gelir. ICM daha sonra bebeği oluşturacak olan kısımdır. Trofoblastların gelişmesi ile de trofektoderm hücreleri oluşur. Bu hücreler öncesinde implantasyonu sağlayacak ve sonrasında da plasentayı oluşturacak kısımdır. ICM, blastokistin bir kutbuna gider ve yerleşir (Zhao, Yu ve Zhang, 2018).



Şekil 8: Blastokist (5. Gün Embriyosu) (http://www.aliburan.com/iletisim/embriyo-nedir/, Erişim tarihi: 25.08.2021)

Kaliteli blastokisti seçmek için günümüzde en çok kullanılan yöntem Gardner ve Schoolcraftın yöntemidir. İlk olarak blastokistin genişlemesinin derecelendirilmesi yapılır. Derecelendirme şu şekilde yapılır:

1. Erken blastokist: Blastosöl embriyo hacminden daha az alan kaplar.
2. Blastokist: Blastosöl embriyo hacminden daha fazla alan kaplar.
3. Tam blastokist: Blastosöl embriyoyu tamaen doldurur.
4. Genişleyen blastokist: Blastosöl büyüklüğü embriyodan daha büyüktür ve zona incelmeye başlamıştır.
5. Zonadan ayrılmakta olan blastokist: Trofektoderm zonadan çıkmaya başlamış.
6. Zonadan ayrılan blastokist: Blastokist zonadan tamamen ayrılmış.



Şekil 9: (A) Erken Blastokist; (B) Blastokist; (C) Tam Blastokist; (D) Genişleyen Blastokist; (E) Zonadan Ayrılmakta Olan Blastokist; (F) Zonadan Ayrılan Blastokist (Prof.Dr. Mehmet CINCIK Arşivinden)

Gardner ve Schoolcraftın sisteminde blastokist genişlemesi 3-6 arasında ise iyi sayılmalıdır. Daha sonra trofektoderm ve ICM lerin skorlaması yapılır.

ICM için değerlendirme şu şekilde yapılır:

- A = Kompakt ve birbirine sıkıca bağlı olan hücreleri ifade eder.
- B = Gevşek olarak bir araya gelmiş olan bir çok hücreyi ifade eder.
- C = Çok az sayıda hücreyi ifade eder.

Trofektoderm için değerlendirme ise şu şekilde yapılır:

- A = Sıkı epiteli oluşturan çok sayıda hücreyi ifade eder.
- B = Gevşek epiteli oluşturan az sayıda hücreyi ifade eder.
- C = Çok az sayıda hücreyi ifade eder (Balaban, Yakin ve Urman, 2006).

1.10.6. Gebeliğin Değerlendirilmesi

En kaliteli embriyonun belirlenip, transfer edilmesinin ardından gebelik değerlendirilmesi yapılır. Gebelik değerlendirilmesi transfer işleminden 10-12 gün sonra gerçekleştirilir. Kadında gebeliğin olup olmadığı kanda Beta-HCG hormonuna bakılarak anlaşılır. Beta-HCG'nin istenilen değerin üzerinde olmasının ardından iki gün sonra tekrar Beta-HCG kontrolü yapılarak, hormonun artışı gözlemlenir (Kahyaoğlu, Demir, Ertürk Aksakal, Kaplanoğlu ve Mollamahmutoğlu, 2017).

1.11. Önem

Korona kümülüs hücrelerinin varlığı olgun oositlerin yaşlanmasına neden olsa da bu hücrelerin fertilizasyon ve embriyo gelişimi üzerindeki etkilerini saptamak için birçok araştırma yapılmıştır.

Gerek IVF işlemlerinde gerekse ICSI işlemlerinde, oositin soyulması için en uygun zamanın ne olması gerektiği hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Ancak bu konu hakkında kesin bir fikir birliği oluşmamıştır (Wei ve ark., 2011; Zhou ve ark., 2016).

Bu araştırmalar ışığında OPU dan hemen sonra kümülüsların temizlenerek ICSI yapılmasıyla, ekilibrasyon sonrasında kümülüsların temizlenerek ICSI yapılan olgularda blastomerlerde multinükleasyon oranlarının, fertilizasyon oranlarının, embriyo kalitelerinin, blastokiste gidiş oranlarının farklı olup olmadığını araştırdık. Aynı zamanda, embriyo transferi sonrası 12. günde Beta-HCG takibi yaparak gebelik oranlarını karşılaştırdık. Çalışmamızın, diğer araştırmalar ile birlikte, optimum denüdasyon zamanının belirlenmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

1.12. Varsayımlar

İncelenen makalelerde, erken soyularak ve 2-4 saatlik inkübasyon sonrası soyularak ICSI yapılan veya klasik IVF yapılarak 18-22 saat sonra soyulan oositler takip edilmiş; fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi, multinükleasyon oranı, gebelik oranı, implantasyon oranı, blastokist kalitesi, multi PN vb. gibi parametrelerin bazıları karşılaştırılmış ve korona kümülüs hücrelerinin erken soyulmasının sonuçları

değerlendirilmiştir (Mizuno ve ark., 2018; Wei ve ark., 2011; Zhou ve ark., 2016; Xue ve ark., 2013).

Makalelere konu olan birbirinden bağımsız araştırmalarda benzer uygulamalar gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, bazı araştırma sonuçlarının benzer nitelikte olduğu, bazılarınınsa farklı neticeler verdiği görülmüştür.

Klasik IVF de işlem sonrası 16-20 saat sonra hücrelerin temizlenmesi gerçekleştirilir (Xiong ve ark., 2011).

Klasik IVF ile yapılan, Duo Wei ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada erken soyulmuş embriyolarda embriyo kalitesi düşük bulunmuştur (Wei ve ark., 2011). Ancak, Yamei Xue ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada erken soyulmanın embriyo kalitesi üzerinde bir etkisi görülmemiştir, ama 3PN oranı erken soyulanlarda daha yüksek görülmüştür (Xue ve ark., 2013).

Satoshi Mizuno ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmaya göre, OPU dan hemen sonra kümülüsları temizlenen oositlerden elde edilen blastokist kalitesi, OPU dan 120 dakika sonra kümülüsları temizlenen oositlerden elde edilen blastokist kalitesine göre oldukça düşüktür. Ancak 2 grup arasında fertilizasyon ve blastokist oranı bakımından bir fark görülmemiştir (Mizuno ve ark., 2018).

Liang Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, kısa inkübasyon yapılan gametlerde kümülüs hücrelerinin erken temizlenmesi sonucunda oluşan embriyoların multi PN oranı, klasik IVF prosedürü uygulanmış olan embriyolara göre oldukça yüksektir (Zhou ve ark., 2016).

Korona kümülüs hücrelerinin temizlenmesi ne zaman yapılmalı sorusuna birçok araştırmacı farklı yanıt vermiştir. Korona kümülüs hücrelerinin oosit olgunlaşmasındaki rolü bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, bu hücrelerin ICSI zamanı için de önemli olduğu varsayımında bulunduk.

1.13. Sınırlıklar

Acıbadem Altunizade Hastanesi IVF merkezine başvuran 54 hastanın oositleri kullanılarak prospektif bir çalışma yapılmıştır. Hasta sayısının arttırılabilmesi için daha uzun süre gerekmesi, araştırmaya gebelik sonuçlarının da dahil edilmesi için de süre gerekmesi sınırlılık yaratmıştır.

Araştırmanın hasta karakteristikleri açısından sınırlılıkları:

- ✓ 40 yaşın üzerindeki hastaların, yumurta sayısı 5'den aşağıda olan hastaların ve erkek faktörü olanların araştırmaya dahil edilmemesi.
- ✓ Hastalardan rıza belgesi (hasta onam belgesi) alınması.
- ✓ Hastalara tedavi ücreti dışında ek bir maliyet çıkarılmaması.

1.14. Tanımlar

1) **ICSI (intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu):** Tek bir sperm hücresinin doğrudan bir yumurtanın sitoplazmasına enjekte edildiği bir in vitro fertilizasyon prosedürüdür.
2) **Multinükleasyon:** Bir blastomerde birden fazla çekirdeğin bulunduğu kromozal bir anomalidir.
3) **Oosit - pick up (OPU):** Tüp bebek tedavisinde yumurtalar belirli büyüklüğe geldikten sonra kalçadan yapılan bir "çatlatma iğnesi" ile çatlatılır ve 34-36 saat sonra yumurtalar toplanılır. Olgun yumurtaların toplanması işlemine "OPU (oosit-pick up, yumurta toplama)" adı verilir.
4) **Korona kümülüs hücreleri:** Kadın yumurtasının etrafını saran hücre topluluğudur. Yumurtanın beslenmesinde, olgunlaşmasında önemi büyüktür.
5) **Ovulasyon:** Kadın yumurtasının, yumurtalıktan tüplere atılma işlemine ovulasyon yani yumurtlama denir.
6) **Klasik IVF:** Spermin kalitesinin yüksek olduğu durumlarda, laboratuvar şartlarında hazırlanmış spermler yumurtalarıyla aynı kaba konarak döllenme işlemi gerçekleştirilir. Bu yönteme klasik IVF yöntemi denir.
7) **Polispermi:** Bir yumurta hücresine birden daha fazla sayıda spermin girebilmesi durumuna denir.

8) **Blastokist:** Döllenmiş embriyonun annenin rahim duvarına yapışmadan önceki son gelişim fazıdır.
9) **Denüdasyon:** Yumurtanın etrafında bulunan korona kumulus hücrelerinin temizlenmesi olayıdır.
10) **Fertilizasyon:** Bir yumurtanın sperm tarafından döllenmesi sürecine fertilizasyon denir.
11) **İmplantasyon:** Embriyonun uterusa gömülme işlemine implantasyon denir.

BÖLÜM 2. YÖNTEM

Bu bölümde, araştırma modeli, evren ve örneklem, veriler ve toplanması, verilerin çözümlenmesi ve yorumlanması ile süre ve maliyet bilgilerine yer verilmiştir.

2.1. Araştırma Modeli

Acıbadem Altunizade Hastanesi Tüp Bebek Merkezine başvuran ve ICSI işlemi gerçekleştirilen hastalar ile yapılan bu çalışma, prospektif bir araştırmadır.

Araştırmada erken soyulan oositler ile rutinde olduğu gibi 2-4 saat sonra soyulan oositlerin; fertilizasyon oranları, multinükleasyon oranları, iyi kalite 3. ve 5. gün embriyo oranları, blastokist oranları karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda, embriyo transferi sonrası 12. günde Beta-HCG takibi yapılarak gebelik oranları karşılaştırılmıştır. Erken denüdasyonun, fertilizasyon üzerindeki, embriyo kalitesi üzerindeki ve gebelik oranları üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

2.2. Evren ve Örneklem

Genel evren: ÜYTE merkezlerine infertilite sebebiyle başvuran hastalar.

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

Araştırma grubu: 40 yaş altı olan, yumurta sayısı 5'den fazla olan hastalar ve erkek faktörü bulunmayan 54 hasta.

Hastaların araştırma grubuna dahil edilme kriterleri:

- 40 yaşından genç olmak.
- Oosit sayısının 5'den fazla olması.
- Erkek faktörünün bulunmaması.

2.3. Veriler ve Toplanması

OPU sonrası toplanan oosit-korona-kümülüs (OKK) kompleksleri rastgele 2'ye bölünmüştür. OKK komplekslerinin yarısına (kontrol grubu) rutin prosedür uygulanmıştır. Kontrol grubu, ekilibrasyon solüsyonunda (G-IVF, Vitrolife - Swemed/Sweden), inkübatör ortamında içinde %6 CO2, %5 O2, %90 nem koşullarında 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. 2 saat süre ile inkübatörde inkübe edilen OKK kompleksleri dilüe edilmiş hyaluronidaz (Vitrolife - Swemed/Sweden) ile denüdasyon pipetleri kullanılarak soyulmuş ve maturasyon indeksleri not edilmiştir. Ardından dış ortam solüsyonu (G-MOPS, Vitrolife - Swemed/Sweden) içinde mikroenjeksiyon yapılmış ve inkubatörde normal bikarbonat tamponlu kültür solüsyonu (Life Global – LG - Australia) içinde takip edilmiştir.

Kalan yarısı (çalışma grubu) ise OPU dan hemen sonra bekletmeden soyulmuş ve aynı prosedür uygulanmıştır.

Çalışma grubu ve kontrol grubundaki oositlere:

- ICSI yapıldıktan sonraki 16-18. saatlerde fertilizasyon kontrolü yapılmıştır.
- 2. gün embriyo kontrolleri yapılmıştır. Multinükleasyon gösterip göstermedikleri kontrol edilerek not edilmiştir.
- 3. gün morfolojik kriterlere göre embriyo skorlaması yapılmıştır.
- 5. gün blastokiste gidiş oranlarına bakılmış ve embriyo skorlanması Gardner derecelendirilmesine göre yapılmıştır.

OPU'dan hemen sonra soyulan ve 2 saatlik ekilibrasyon sonrası soyulan yumurtaların fertilizasyon oranları, multinükleasyon oranları, blastokiste gidiş oranları ve embriyo kaliteleri karşılaştırılmıştır.

Aynı zamanda, erken soyulan ve rutinde olduğu gibi soyulan oositlerden elde edilen embriyoların transferi gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrası 12. günde, kanda Beta-HCG hormonuna bakılarak iki grup arasında gebelik oranları karşılaştırılmıştır.

2.4. Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

Acıbadem Altunizade Hastanesi Tüp Bebek Merkezine başvuran 54 hastanın, embriyo takip formlarına not edilen bilgiler kullanılarak yeni bir çizelge oluşturulmuştur. Tarafımca hazırlanan çizelgede toplam oosit sayısı; erken soyulan oosit sayısı ve rutinde olduğu gibi soyulan oosit sayısı olarak 2 ayrı sütuna ayrılmıştır. Erken soyulan oositlerden elde edilen toplam fertilizasyon (2PN) ve multinükleasyon sayısı, 3. ve 5. gün embriyo kaliteleri ve blastosiste giden oosit sayıları, erken soyulan oosit sütununun altına not edilmiştir. Rutinde olduğu gibi soyulan oositlerden elde edilen toplam fertilizasyon (2PN) ve multinükleasyon sayısı, 3. ve 5. gün embriyo kaliteleri ve blastosiste giden oosit sayıları, rutinde olduğu gibi soyulan oosit sütununun altına not edilmiştir. 3.gün embriyo kalitelerinde; 8//, 10//, 6//, 7//, Morula, Comp.Bs, 9//, T.Comp ve Kavite.Bs kalitesindeki embriyo sayıları not edilmiştir. 5. gün embriyo kalitelerinde; E.Blast, 3AA, 3AB, 3BB, 3BA, 4AA, 4AB, 4BB, 4BA, 5BB kalitesindeki embriyo sayıları not edilmiştir.

Kaç hastaya erken soyulan oositlerden elde edilen embriyolardan transfer edildiği, kaç hastaya rutinde olduğu gibi soyulan oositlerden elde edilen embriyolardan transfer edildiği not edilmiştir. Bu hastaların gebelikleri Beta-HCG sonuçları ile takip edilerek not edilmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) Statistical Software (NCSS LLC, Kaysville, Utah, USA) programı kullanılmıştır. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi, ve Fisher's Exact test kullanılmıştır. Anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 3. BULGULAR VE YORUMLAR

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

3.1. Bulgular

Çalışma, 54 hastadan toplanan 792 oosit üzerinde yapılmıştır. Oositlerin 376 (%47.47)'sı erken soyulan oosit, 416 (%52.53)'sı ise rutinde olduğu gibi soyulan oositlerdir. Gruplar arasında fertilizasyon, multinükleasyon, 3.gün embriyo kalitesi, 5. gün embriyo kalitesi, blastosiste giden toplam oosit sayısı ve gebelik oranları bakımından farklılığın değerlendirilmesine yönelik analiz sonuçları aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir.

Grup I olgular erken soyulan oositleri içerirken; Grup II rutinde yapılan uygulamaya göre soyulan oositleri kapsamaktadır.

3.1.1. Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması:

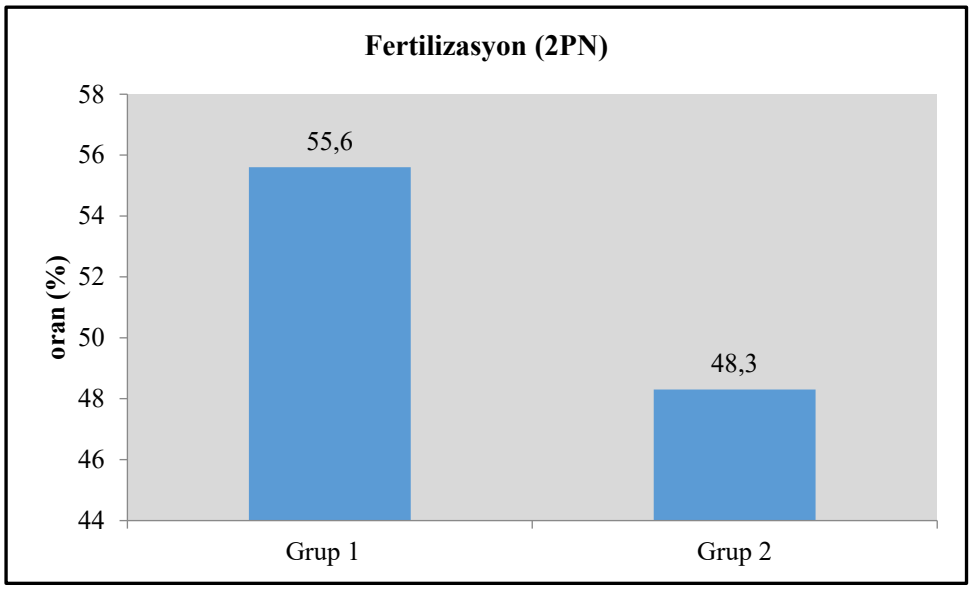
Tablo 3: Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması

	Grup 1 (n=376)		**Grup 2 (n=416)**		
	n	**%**	**n**	**%**	**[a]p**
Fertilizasyon (2PN)	209	*55,6*	201	*48,3*	***0,041****
Multinükleasyon	25	*6,6*	18	*4,3*	***0,150***
3.gün Grade-1 Embriyo Kalitesi	183	*48,7*	179	*43,0*	***0,112***
5.gün Grade-1 Embriyo Kalitesi	104	*27,7*	99	*23,8*	***0,214***
Blastosiste Giden Toplam Oosit	128	*34,0*	117	*28,1*	***0,072***

[a]Pearson Ki kare test **p<0,05*

Tablo 3 incelendiğinde, Grup 1 olgularda fertilizasyon oranı anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,041; p<0,05).

3.1.2. Fertilizasyon (2PN) Oranı:



Şekil 10: Grupların Fertilizasyon (2PN) Oranları Dağılımı

Şekil 10 incelendiğinde erken soyulan oosit grubunda fertilizasyonun 209 (%55.6) oranla, rutinde olduğu gibi soyulan oosit grubunda ise fertilizasyonun 201 (%48.3) oranla gerçekleştiği görülmüştür. Gruplar arasında fertilizasyonun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği belirlenmiştir (p=0.041). Buna göre erken soyulan oosit grubundaki fertilizasyon rutinde olduğu gibi soyulan oosit grubundaki fertilizasyona kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

3.1.3. Multinükleasyon Oranı:

Erken soyulan oositlerden (Grup I) gelişen multinükleasyonlu embriyo sayısının 25 (n) olduğu, rutinde olduğu gibi soyulan oositlerden (Grup II) gelişen multinükleasyonlu embriyo sayısının ise 18 (n) olduğu belirlenmiştir. Multinükleasyon oranları; Grup I için %6,6 iken, Grup II içinse %4,3 olarak saptanmıştır.

Tablo 3 incelendiğinde erken soyulan oosit ile rutinde olduğu gibi soyulan oosit gruplarında multinükleasyon bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0.150).

3.1.4. 3. Gün Embriyo Kalitesinin Oranı:

Erken soyulan oositlerden (Grup I) gelişen embriyoların 183 (n) tanesinin 3. gün Grade-1 embriyo kalitesine sahip olduğu, rutinde olduğu gibi soyulan oositlerden (Grup II) gelişen embriyoların ise 179 (n) tanesinin 3. gün Grade-1 embriyo kalitesine sahip olduğu belirlenmiştir. 3. gün embriyo kalitesi oranları; Grup I için %48,7 iken, Grup II içinse %43,0 olarak saptanmıştır.

Tablo 3 incelendiğinde erken soyulan oosit ile rutinde olduğu gibi soyulan oosit gruplarında 3. gün embriyo bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0.112).

3.1.5. 5. Gün Embriyo Kalitesinin Oranı:

Erken soyulan oositlerden (Grup I) gelişen embriyoların 104 (n) tanesinin 5. gün Grade-1 embriyo kalitesine sahip olduğu, rutinde olduğu gibi soyulan oositlerden (Grup II) gelişen embriyoların ise 99 (n) tanesinin 5. gün Grade-1 embriyo kalitesine sahip olduğu belirlenmiştir. 5. gün embriyo kalitesi oranları; Grup I için %27,7 iken, Grup II içinse %23,8 olarak saptanmıştır.

Tablo 3 incelendiğinde erken soyulan oosit ile rutinde olduğu gibi soyulan oosit gruplarında 5. gün embriyo bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0.214).

3.1.6. Blastosiste Giden Embriyo Oranları:

Erken soyulan oositlerde (Grup I) blastosiste giden oosit sayısının 128 (n) olduğu, rutinde olduğu gibi soyulan oositlerde (Grup II) ise blastosiste giden oosit sayısının 117 (n) olduğu belirlenmiştir. Blastosiste giden embriyo oranları; Grup I için %34,0 iken, Grup II içinse %28,1 olarak saptanmıştır.

Tablo 3 incelendiğinde erken soyulan oosit ile rutinde olduğu gibi soyulan oosit gruplarında blastosite giden toplam oosit sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p=0.072).

3.1.7. Gebelik Oranları:

Çalışmaya dahil edilen 54 hastadan 23 tanesinin bütün embriyoları dondurulduğu için karşılaştırılmaya dahil edilememiştir. 10 hastaya ise hem erken soyulanlardan hem rutinde olduğu gibi soyulanlardan elde edilen embriyolardan aynı anda transfer edilmiştir. Bu sebeple karşılaştırma 21 hasta arasında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4: Gruplarda Embriyo Transferi Yapılanların Gebelik Durumunun İncelenmesi

	Erken Soyulan Oositlerden Elde Edilen Embriyonun Transferi (N=14)		**Rutinde Ki Gibi Soyulan Oositlerden Elde Edilen Embriyonun Transferi (N=7)**		**[b]p**
	n	**%**	**n**	**%**	
Gebelik (+)	11	78,6	5	71,4	**1,000**
Gebelik (-)	3	21,4	2	28,6	

[b]*Fisher's Exact Test*

Erken soyulan oositlerden elde edilen embriyonun transferi sonucunda olguların %78,6'sı oranında gebelik saptanırken; rutindeki gibi soyulan oositlerden elde edilen embriyoların gebelik oranı %71,4'dür. Gruplara göre olguların gebelik görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

3.2. Yorumlar

Yapılan bu çalışmayla elde edilen verilere göre; erken soyulan oositlerin ve rutinde olduğu gibi soyulan oositlerin arasında fertilizasyon bakımından anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür. Multinükleasyon, iyi derece 3. ve 5. gün embriyo kaliteleri, blastokist ve gebelik oranlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu veriler, kümülüs hücrelerinin fertilizasyon üzerindeki, embriyo kaliteleri ve gebelik üzerindeki etkisi hakkında bilgi niteliğindedir.

Denüdasyon iki sebepten dolayı ICSI'den önce gerçekleştirilmelidir: Birincisi; kümülüs hücreleri enjeksiyon iğnesinin girişini etkiler ve KOK, tutma pipeti ile düzgün bir şekilde tutulamaz. İkincisi; oosit matüritesinin ICSI öncesi değerlendirilmesi gereklidir (Wnag, Xiao, Sun, Zhen ve Yu, 2021). Bu bilgiler ışığında, önemli bir soru ortaya çıkmaktadır: Optimum ICSI sonucunu elde etmek için oositlerin etrafındaki kümülüs hücreleri ne zaman temizlenmelidir?

Farelerin oositlerinin kullanıldığı bir araştırmada; kümülüs hücreleri ile uzun süre yapılan oosit kültürü sonucunda apoptotik değişikliklerin indüklendiği bildirilmiştir (Qiao ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2015). Bu sebeple, oosit toplandıktan sonra en kısa sürede oosit denüdasyonu tamamlanır ve bekletmeden ICSI gerçekleştirilir. Ancak oosit toplama işleminden sonra, ne kadar süre içinde denüdasyonun yapılması gerektiği hakkında tam bir fikir birliği oluşmamıştır. Makalelere konu olan, birbirinden bağımsız araştırmalarda benzer uygulamalar gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, bazı araştırma sonuçlarının benzer nitelikte olduğu, bazılarınınsa farklı neticeler verdiği görülmüştür (Mizuno ve ark., 2018; Patrat ve ark., 2012; Wei ve ark., 2011; Xiong ve ark., 2011; Xue ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2016).

Çalışmamızda, 2 saatlik inkübasyona maruz bırakılan oositlerin fertilize olma oranları, erken soyulan oositlere göre daha düşüktür. Nükleer olgunluk, birinci kutup cisimciğinin atılması ile ifade edilebilirken, sitoplazmik olgunluk süreci çok iyi bilinmemektedir. Sitoplazmik olgunluk sürecinin annenin mRNA sı ve proteinleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Patrat ve ark., 2012). Doğal döngülerde, nükleer olgunluk ve sitoplazmik olgunluk senkron şekilde ilerlerken, uyarılmış döngülerde bu işleyiş farklı olabilir. Bu nedenle, uyarılmış döngülerden elde edilen oositler, metafaz II aşamasına ulaşmasına rağmen sitoplazmik olarak olgunlaşmamış olabilir (Eppig, Schultz, O'Brien ve Chesnel, 1994; Sundström ve Nilsson, 1988). Korona kümülüs hücrelerinin sitoplazmik olgunlaşmadaki önemi bilinmektedir (Shu ve ark., 2007). Patrat C. ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmadaki fertilizasyon sonuçları, bizim çalışma sonuçlarımız ile çelişmektedir. Patrat C. ve arkadaşları, metafaz II olan olgun oositlerin, sitoplazmik olgunlaşmasının tamamlanması ve fertilizasyona hazır hale gelmesi için inkübasyon süresinin gerekli olduğu çıkarımında bulunmuşlardır (Patrat ve ark., 2012). Ancak bizim çalışmamızda, erken soyulan oositlerderin fertilizasyon oranları daha

yüksek bulunmuştur. Oosit toplama öncesi hastanın kullandığı GnRH'lar ile oositler belli olgunluğa gelir ve belli olgunluğa gelen oositlerin toplama işlemi gerçekleştirilir. Kullanılan GnRH'lar ile oositlerin hem nükleer hem sitoplazmik olgunluğu tamamlanmış olabilir ve fertilizasyona tam olarak hazır hale gelmiş olabilir. Korona kümülüs hücrelerinin yaşlanmayı ve apoptotik süreçleri indüklediği bilinmektedir. Belirli olgunluğa gelen oositlerin korona ve kümülüs hücrelerine maruz kalması, oosit yaşlanmasını başlatmış olabilir ve rutinde olduğu gibi soyulan oositlerde fertilizasyon anlamlı olarak düşmüş olabilir.

Multinükleasyon IVF'de sıklıkla gözlenen bir fenomendir. Yapılan çalışmalara göre multinükleasyonun; kısa stimülasyon, yüksek oosit sayısı ve yüksek FSH gibi faktörler ile pozitif ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Van Royen ve ark., 2003). Xiong S. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, klasik IVF'de 6 veya 20 saatlik süre ile inkübasyon uygulanmış ve 2 grup arasında multinükleasyon açısından bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (Xiong ve ark., 2011). Bizim çalışmamız da Xiong S. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı desteklemektedir. Kontrol grubu ile çalışma grubu arasında benzer multinükleasyon oranları görülmüştür. Bu da erken denüdasyon ile multinükleasyon arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. Düşük gelişme potansiyeli nedeni ile gebelik oranını etkileyen sebeplerden birinin multinükleasyon olduğu bilinmektedir. Çok çekirdekli blastomerlere sahip embriyolar transfer için uygun değildir ve başka embriyo olduğu sürece tercih edilmemelidir (Xiong ve ark., 2011).

Tüp bebekte en önemli süreçlerden biri de transfer için en iyi embriyonun seçimidir. Bu yöntemin invazif ve zaman alıcı olmaması gerekir. IVF sürecinde, 3. ve 5. gün embriyo kalitesi belirlenerek derecelendirilir. Embriyo derecelendirmenin amacı, en yüksek implantasyon potansiyeline sahip embriyoyu seçmektir (Weitzman ve ark., 2010).

Çalışmamızda, kümülüs hücreleri tarafından hızlandırılan oosit yaşlanması konusunda yapılan önceki fare çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, oosit alımından hemen sonra soyulan oositlerin daha yüksek embriyonik gelişim kapasitesine sahip olacağı varsayılmıştır (Miao ve ark., 2005; Qiao ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2015). Ancak çalışma grubu ile kontol grubu arasında iyi derece embriyo kalitesi bakımından bir fark gözlemlenmemiştir. Bizim çalışmamızın aksine, Satoshi Mizuno ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmada, OPU dan hemen sonra kümülüsleri temizlenen oositlerden

elde edilen blastokist kalitesi, OPU dan 120 dakika sonra kümülüsleri temizlenen oositlerden elde edilen blastokist kalitesine göre oldukça düşüktür (Mizuno ve ark., 2018). Ancak, Yamei Xue ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma bizim çalışmamızı desteklemektedir (Xue ve ark., 2013). Çalışmalardaki farklı sonuçların sebebi, alınan oositlerin yeri ve evrelerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Aynı zamanda, araştırmamız, embriyonik kalite bakımından, Wei D. ve arkadaşlarının raporu ile de örtüşmemektedir (Wei ve ark., 2011). Bu çelişkili sonuçların nedeni kullanılan farklı çalışma tasarımları olabilir. Wei D. ve arkadaşları, hastaların çalışma gruplarına atamasını kontrollü bir şekilde yaptıklarını açıklamışlardır. Döllenme başarısızlığı riski düşük olan hastaları kontrol grubuna, döllenme başarısızlığı riski yüksek olan hastaları deney grubuna aldıklarını beyan etmişlerdir. Wei D. ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırma incelenirken, mevcut olan düşüşün erken denüdasyon ile ilgili olup olmadığı sorgulanabilir. Çalışmamızda, rastgele atama ile gözlenen etkinin erken denüdasyon kaynaklı olup olmadığını tespit etmek daha olasıdır.

Xue Wang ve arkadaşların, OPU'dan denüdasyona kadar geçen sürenin ne olması gerektiği hakkında inceledikleri 11 yayından 6'sına göre, denüdasyon süresinin embriyo kalitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bu araştırma, bizim çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir (Wnag ve ark., 2021). İncelenen bir başka çalışmada ise, OPU- denüdasyon süresine göre gruplar oluşturulmuştur. Bu gruplar; 1-3 saat, 3-5 saat, 5-7 saat, 7-9 saat ve 9-11 saat şeklinde belirlenmiştir. 5 grubun ilk 4'ünde embriyo kalitesinin benzer sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Falcone ve ark., 2008). Yapılan tüm bu çalışmalar ve tarafımızca yapılan çalışmayla, erken denüdasyonun embriyo kalitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır.

Satoshi Mizuno ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, blastokist oranları bakımından bizim çalışmamız ile benzer sonuç vermiştir (Mizuno ve ark., 2018).

Ayrıca, çalışmamız, laboratuvar verilerini bildirirken, embriyo kalitesinin en önemli göstergelerinden biri olan gebelik sonuçlarını da içermektedir. İki grup arasında gebelik oranları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Gebelik oranlarını karşılaştırabildiğimiz hasta sayımız sınırlı olsa da daha kapsamlı olarak yapılmış olan birçok araştırmanın bizim çalışmamızı destekler nitelikte olduğu görülmüştür (Mizuno ve ark., 2018; Naji ve ark., 2018; Wei ve ark., 2011; Xue ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2016).

Sonuç olarak; kontrol grubu ile çalışma grubu arasında sadece fertilizasyon bakımından fark gözlemlenmiştir. Erken denüdasyon yapılmalı mı yapılmamalı mı sorusu gelecekte yapılacak olan çalışmalar ışığında net bir cevap bulabilecektir. Doğru bir cevaba ulaşabilmek için hasta sayısı arttırılmalı ve çok merkezli çalışmalar yapılmalıdır.

BÖLÜM 4. SONUÇ

Bu bölümde, araştırmanın kimliği, süreci ve elde edilen sonuçların özetlendiği bir *özet*, elde edilen bulguların yorumlandıktan sonra araştırma ile varılan nokta anlamında bir *yargı* ile araştırılan problemin çözümü için başka hangi çalışmaların yapılmasının gerekli görüldüğüne ve mevcut araştırmanın alandaki egemen kuram ve uygulamalara muhtemel katkısının neler olabileceğine ilişkin araştırmacının özgün değerlendirmelerini içeren bir *öneriler* altbölümleri yer almıştır.

4.1. Özet

Bu araştırmada, 54 hastadan elde edilen 792 oosit kullanılmıştır. Oositlerin 376 tanesi erken soyulmuş olup, 416 tanesi rutinde olduğu gibi soyulmuştur. Hem erken soyulan oositlere hem de rutinde olduğu gibi soyulan oositlere ICSI işlemi uygulanmıştır. Bu iki grup, fertilizasyon oranları (2 PN), multinükleasyon oranları, iyi kalite 3. ve 5. gün embriyo, blastokist ve gebelik oranları bakımından karşılaştırılmıştır.

İki grup arasında yapılan karşılaştırma sonucunda; erken soyulan oositlerde, fertilizasyon oranı anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Multinükleasyon, iyi kalite 3. ve 5. gün embriyo oranı, blastokist ve gebelik oranlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.2. Yargı

Çalışmamızda erken soyularak veya inkübasyon sonrası soyularak intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılan oositlerdeki multinükleasyon, fertilizasyon, blastokist, iyi kalite 3. ve 5. gün embriyo oranları ve gebelik oranları prospektif olarak araştırılmıştır. Erken soyulan oositlerde fertilizasyon oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak iki grup arasında multinükleasyon, blastokist, iyi kalite 3. ve 5. gün embriyo oranlarında ve gebelik oranlarında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Erken denüdasyonun; multinükleasyonu, embriyo kalitesini, blastokist sayısını ve gebelik oranını etkilemediği ancak fertilizasyonu etkilediği gözlemlenmiştir. Erken denüdasyonun ICSI döngüsünün sonucunu tehlikeye atmadığı düşüncesine

varırken, erken denüdasyon yapılmalı mı yapılmamalı mı, sorusunun net cevabı için ilerideki araştırmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatine varılmıştır.

4.3. Öneriler

Yapılan bu çalışma, erken denüdasyon konusu ile ilgili yeni bir kaynak niteliğindedir.

Çalışmamıza 54 hasta dahil edilmiştir. Daha kapsamlı bir araştırma için hasta sayısı arttırılabilir, farklı merkezler araştırmaya dahil edilebilir, canlı doğum oranları takip edilebilir ve çalışma genişletilebilir. Bulduğumuz sonuçlar gelecekte yapılacak olan araştırmalar için bilgi niteliğindedir.

KAYNAKÇA

Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *13*, 37. https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1

Aktan, T. M., Görkemli, H., Gezginç, K., Saylan, A., Duman, S., & Yılmaz, F. Y. (2011). Improvement in embryo quality and pregnancy rates by using autologous cumulus body during icsi cycles. *Journal of the Turkish German Gynecological Association,12*(3),162–167. https://doi.org/10.5152/jtgga.2011.38

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. *New York: Garland Science;* 2002. Sperm. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26914/

Alpak, O.(2009). Kümülüs hücreleri proliferasyon ve Apopitoz Endekslerinin İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu Sonuçlarıyla İlişkilendirilmesi.(Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Ambroggio, J., Gindoff, P. R., Dayal, M. B., Khaldi, R., Peak, D., Frankfurter, D., & Dubey, A. K. (2011). Multinucleation of a sibling blastomere on day 2 suggests unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertility and sterility*, *96*(4), 856–859. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.111

Anifandis, G., Messini, C., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., & Messinis, I. (2014). Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF). *International journal of molecular sciences*, *15*(7), 12972–12997. https://doi.org/10.3390/ijms150712972

Avidor-Reiss, T., Mazur, M., Fishman, E. L., & Sindhwani, P. (2019). The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction - The Known and the Unknown. *Frontiers in cell and developmental biology*, *7*, 188. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00188

Balaban, B., Yakin, K., & Urman, B. (2006). Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertility and sterility*, *85*(3), 559–563. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.11.013

Balakier, H., Sojecki, A., Motamedi, G., & Librach, C. (2016). Impact of multinucleated blastomeres on embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy. *Fertility and sterility*, *106*(3), 608–614.e2. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.04.041

Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction (Oxford, England)*, *22*(6), 1506–1512. https://doi.org/10.1093/humrep/dem046

Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2001). Definition and causes of infertility. *Reproductive biomedicine online*, 2(1), 41–53. https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)62187-6

Capalbo, A., Treff, N., Cimadomo, D., Tao, X., Ferrero, S., Vaiarelli, A., Colamaria, S., Maggiulli, R., Orlando, G., Scarica, C., Scott, R., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2017). Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles. *Fertility and sterility*, *108*(6), 1007–1015.e3. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.08.004

Carvalho, M., Leal, F., Mota, S., Aguiar, A., Sousa, S., Nunes, J., & Calhaz-Jorge, C. (2020). The effect of denudation and injection timing in the reproductive outcomes of ICSI cycles: new insights into the risk of in vitro oocyte ageing. *Human reproduction (Oxford, England)*, *35*(10), 2226–2236. https://doi.org/10.1093/humrep/deaa211

De Vincentiis, S., De Martino, E., Buffone, M. G., & Brugo-Olmedo, S. (2013). Use of metaphase I oocytes matured in vitro is associated with embryo multinucleation. *Fertility and sterility*, *99*(2), 414–421. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.028

DeCherney A. H. (1986). In vitro fertilization and embryo transfer: a brief overview. *The Yale journal of biology and medicine*, *59*(4), 409–414.

Dennis, S. J., Thomas, M. A., Williams, D. B., & Robins, J. C. (2006). Embryo morphology score on day 3 is predictive of implantation and live birth rates. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *23*(4), 171–175. https://doi.org/10.1007/s10815-006-9027-3

Egashira, A., Yamauchi, N., Tanaka, K., Mine, C., Otsubo, H., Murakami, M., Islam, M. R., Ohtsuka, M., Yoshioka, N., & Kuramoto, T. (2015). Developmental capacity and implantation potential of the embryos with multinucleated blastomeres. *The Journal of reproduction and development*, *61*(6), 595–600. https://doi.org/10.1262/jrd.2015-052

Eppig, J. J., Schultz, R. M., O'Brien, M., & Chesnel, F. (1994). Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Developmental biology*, *164*(1), 1–9. https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1175

Falcone, P., Gambera, L., Pisoni, M., Lofiego, V., De Leo, V., Mencaglia, L., & Piomboni, P. (2008). Correlation between oocyte preincubation time and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, *24*(6), 295–299. https://doi.org/10.1080/09513590802095613

Gilbert SF. Developmental Biology. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Oogenesis. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10008/

Hesters, L., Prisant, N., Fanchin, R., Méndez Lozano, D. H., Feyereisen, E., Frydman, R., Tachdjian, G., & Frydman, N. (2008). Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertility and sterility*, *89*(6), 1677–1684. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.04.047

Holte, J., Berglund, L., Milton, K., Garello, C., Gennarelli, G., Revelli, A., & Bergh, T. (2007). Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human reproduction (Oxford, England)*, *22*(2), 548–557. https://doi.org/10.1093/humrep/del403

Howie, R., & Kay, V. (2018). Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)*, *79*(4), 194–199. https://doi.org/10.12968/hmed.2018.79.4.194

Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., & Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of clinical investigation*, *120*(4), 984–994. https://doi.org/10.1172/JCI41585

Johansson, M., Hardarson, T., & Lundin, K. (2003). There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *20*(8), 309–313. https://doi.org/10.1023/a:1024805407058

Junqueira, L. C. U., Solakoğlu, S., & Aytekin, Y. (2009). *Temel histoloji: Text & atlas.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Kahyaoğlu, İ., Demir, B., Ertürk Aksakal, S., Kaplanoğlu, İ., & Mollamahmutoğlu, L. (2017). Value of Post-transfer Day-12 Beta Human Chorionic Gonadotropin Levels for Pregnancy Outcome Prediction of Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles. *Balkan medical journal*, *34*(5), 450–457. https://doi.org/10.4274/balkanmedj.2016.1769

Kaji, K., & Kudo, A. (2004). The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction (Cambridge, England)*, *127*(4), 423–429. https://doi.org/10.1530/rep.1.00163

Karakoç, L., Fındıklı, N., Ünsal, E., Enginsu, E., Balaban, B., Özkavukçu, S. ve Ergin, E. (2019). *Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar.* Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitapevi.

Krausz C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, *25*(2), 271–285. https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006

Laverge, H., De Sutter, P., Verschraegen-Spae, M.R., De Paepe, A. and Dhont, M. (1997) Triple colour fluorescent in-situ hybridization for chromosomes X, Y and 1 on spare human embryos. *Hum. Reprod., 12*, 809–814.

Lin, Y. J., Lan, K. C., Huang, F. J., Lin, P. Y., Chiang, H. J., & Kung, F. T. (2015). Reproducibility and clinical significance of pre-ovulatory serum progesterone level and progesterone/estradiol ratio on the day of human chorionic gonadotropin administration in infertile women undergoing repeated in vitro fertilization cycles. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E, 13, 41. https://doi.org/10.1186/s12958-015-0037-9

Ludwig, M., Schöpper, B., Al-Hasani, S., & Diedrich, K. (2000). Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Human reproduction (Oxford, England)*, *15*(2), 325–329. https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.325

Magli, M. C., Gianaroli, L., Ferraretti, A. P., Lappi, M., Ruberti, A., & Farfalli, V. (2007). Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertility and sterility*, *87*(3), 534–541. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1512

Marcello, M. R., Singaravelu, G., & Singson, A. (2013). Fertilization. *Advances in experimental medicine and biology*, *757*, 321–350. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_11

Miao, Y. L., Liu, X. Y., Qiao, T. W., Miao, D. Q., Luo, M. J., & Tan, J. H. (2005). Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biology of reproduction*, *73*(5), 1025–1031. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043703

Mizuno, S., Ishikawa, Y., Matsumoto, H., Sato, M., Ida, M., Fukuda, A., & Morimoto, Y. (2018). The timing of cumulus cell removal for intracytoplasmic sperm injection influences the capability of embryonic development. *Reproductive medicine and biology*, *18*(1), 111–117. https://doi.org/10.1002/rmb2.12257

Moore, K.L., Persaud, T.V.N. & Torchia, M.G. (2015). The developing human: clinically oriented embryology (10th ed.). *Philadelphia*: Saunders.

Mori, T., Amano, T., & Shimizu, H. (2000). Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biology of reproduction*, *62*(4), 913–919. https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.913

Naji, O., Moska, N., Dajani, Y., El-Shirif, A., El-Ashkar, H., Hosni, M. M., Khalil, M., Khalaf, Y., Bolton, V., & El-Toukhy, T. (2018). Early oocyte denudation does not compromise ICSI cycle outcome: a large retrospective cohort study. *Reproductive biomedicine online*, *37*(1), 18–24. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.03.014

O'Donnell, L., Stanton, P., & de Kretser, D. M. (2017). Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. In K. R. Feingold (Eds.) et. al., Endotext. MDText.com, Inc.

O'Flynn N. (2014). Assessment and treatment for people with fertility problems: NICE guideline. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners*, *64*(618), 50–51. https://doi.org/10.3399/bjgp14X676609

Palermo, G. D., Neri, Q. V., Hariprashad, J. J., Davis, O. K., Veeck, L. L., & Rosenwaks, Z. (2000). ICSI and its outcome. *Seminars in reproductive medicine*, *18*(2), 161–169. https://doi.org/10.1055/s-2000-12555

Patrat, C., Kaffel, A., Delaroche, L., Guibert, J., Jouannet, P., Epelboin, S., De Ziegler, D., Wolf, J. P., & Fauque, P. (2012). Optimal timing for oocyte denudation and intracytoplasmic sperm injection. *Obstetrics and gynecology international*, *2012*, 403531. https://doi.org/10.1155/2012/403531

Pelinck, M. J., De Vos, M., Dekens, M., Van der Elst, J., De Sutter, P., & Dhont, M. (1998). Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)*, *13*(4), 960–963. https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.960

Qiao, T. W., Liu, N., Miao, D. Q., Zhang, X., Han, D., Ge, L., & Tan, J. H. (2008). Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s). *Molecular reproduction and development*, *75*(3), 521–528. https://doi.org/10.1002/mrd.20779

Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. *Human reproduction (Oxford, England)*, *27 Suppl 1*, i2–i21. https://doi.org/10.1093/humrep/des200

Rienzi, L., Vajta, G., & Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human reproduction update*, *17*(1), 34–45. https://doi.org/10.1093/humupd/dmq029

Robker, RL, Hennebold, JD ve Russell, DL (2018). Yumurtlama ve Oosit Olgunlaşmasının Koordinasyonu: Doğru Zamanda İyi Bir Yumurta. *Endokrinoloji* , *159* (9), 3209-3218. https://doi.org/10.1210/en.2018-00485

Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., & Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human reproduction (Oxford, England)*, *15*(11), 2394–2403. https://doi.org/10.1093/humrep/15.11.2394

Setti, A. S., Figueira, R., Braga, D., Iaconelli, A., & Borges, E., Jr (2018). Blastomere nucleation: Predictive factors and influence of blastomere with no apparent nuclei on blastocyst development and implantation. *JBRA assisted reproduction*, *22*(2), 102–107. https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180028

Setti, A. S., Figueira, R., Braga, D., Iaconelli, A., & Borges, E., Jr (2018). Blastomere nucleation: Predictive factors and influence of blastomere with no apparent nuclei on blastocyst development and implantation. *JBRA assisted reproduction*, *22*(2), 102–107. https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180028

Shu, Y., Gebhardt, J., Watt, J., Lyon, J., Dasig, D., & Behr, B. (2007). Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and sterility*, *87*(5), 1022–1027. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.110

Sifakis, S., Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental toxicology and pharmacology*, *51*, 56–70. https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024

Simopoulou, M., Giannelou, P., Bakas, P., Gkoles, L., Kalampokas, T., Pantos, K., & Koutsilieris, M. (2016). Making ICSI Safer and More Effective: A Review of the Human Oocyte and ICSI Practice. *In vivo (Athens, Greece)*, *30*(4), 387–400.

Stecher, A., Vanderzwalmen, P., Zintz, M., Wirleitner, B., Schuff, M., Spitzer, D., & Zech, N. H. (2014). Transfer of blastocysts with deviant morphological and morphokinetic parameters at early stages of in-vitro development: a case series. *Reproductive biomedicine online*, *28*(4), 424–435. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.12.008

Stone, B. A., Greene, J., Vargyas, J. M., Ringler, G. E., & Marrs, R. P. (2005). Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development in vitro and pregnancy outcomes following embryo transfer. *American journal of obstetrics and gynecology*, *192*(6), 2014–2020. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.048

Suede, S. H., Malik, A., & Sapra, A. (2021). Histology, Spermatogenesis. *In StatPearls. StatPearls Publishing.*

Sun, L., Chen, Z. H., Yang, L., Yi, C. X., Liu, J., & Ou, C. Q. (2018). Chromosomal polymorphisms are independently associated with multinucleated embryo formation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *35*(1), 149–156. https://doi.org/10.1007/s10815-017-1037-9

Sundström, P., & Nilsson, B. O. (1988). Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycles is asynchronous. *Human reproduction (Oxford, England),* *3*(5), 613–619. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136756

Suphamungmee, W., Wanichanon, C., Vanichviriyakit, R., & Sobhon, P. (2008). Spermiogenesis and chromatin condensation in the common tree shrew**,** Tupaia glis. *Cell and tissue research*, 331(3), 687–699. https://doi.org/10.1007/s00441-007-0557-5

Tesarik, J., & Greco, E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human reproduction (Oxford, England)*, *14*(5), 1318–1323. https://doi.org/10.1093/humrep/14.5.1318

Tesarik, J., Kopecny, V., Plachot, M. and Mandelbaum, J. (1987) Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of human cleaving embryos obtained by in-vitro fertilization. *Hum. Reprod., 2,* 127–136

Van Royen, E., Mangelschots, K., Vercruyssen, M., De Neubourg, D., Valkenburg, M., Ryckaert, G., & Gerris, J. (2003). Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*, *18*(5), 1062–1069. https://doi.org/10.1093/humrep/deg201

Van Soom, A., Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D., & de Kruif, A. (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *37*(3), 144–151. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00345.x

Vander Borght, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, *62*, 2–10. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012

Veeck, L.L. (1991). *Atlas of the human oocyte and early conceptus.* Baltimore: Williams&Wilkins.

Wang, X., Xiao, Y., Sun, Z., Zhen, J., & Yu, Q. (2021). Effect of the time interval between oocyte retrieval and ICSI on embryo development and reproductive outcomes: a systematic review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *19*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s12958-021-00717-0

Wei, D., Zhang, C., Yin, B., Wang, P., Xie, J., Song, X., Liu, Q., Hu, L., Zhang, Y., & Hao, H. (2011). Early cumulus cell removal could reduce the available embryo rate in human IVF. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *28*(12), 1213–1216. https://doi.org/10.1007/s10815-011-9650-5

Weitzman, V. N., Schnee-Riesz, J., Benadiva, C., Nulsen, J., Siano, L., & Maier, D. (2010). Predictive value of embryo grading for embryos with known outcomes. *Fertility and sterility*, *93*(2), 658–662. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.032

Xiong, S., Han, W., Liu, J. X., Zhang, X. D., Liu, W. W., Liu, H., & Huang, G. N. (2011). Effects of cumulus cells removal after 6 h co-incubation of gametes on the outcomes of human IVF. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *28*(12), 1205–1211. https://doi.org/10.1007/s10815-011-9630-9

Xue, Y., Tong, X., Jiang, L., Zhu, H., Yang, L., & Zhang, S. (2013). Effect of cumulus cell removal 4 h post-insemination on fertilization and embryo quality: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *30*(8), 1049–1053. https://doi.org/10.1007/s10815-013-0049-3

Yıldırım, R., Okar, İ. ve Dalçık, H. (Ed.). (2002). *İnsan Embriyolojisi.* Nobel Tıp Kitapevleri.

Yilmaz, A., Zhang, L., Zhang, X. Y., Son, W. Y., Holzer, H., & Ao, A. (2014). Chromosomal complement and clinical relevance of multinucleated embryos in PGD and PGS cycles. *Reproductive biomedicine online*, *28*(3), 380–387. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.003

Zhan, Q., Ye, Z., Clarke, R., Rosenwaks, Z., & Zaninovic, N. (2016). Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome. *PloS one*, *11*(12), e0166398. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166398

Zhang, L. (2020). Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. *Systems biology in reproductive medicine*, *66*(3), 176–184. https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1725685

Zhao, Y. Y., Yu, Y., & Zhang, X. W. (2018). Overall Blastocyst Quality, Trophectoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer Cycles. *Chinese medical journal*, *131*(11), 1261–1267. https://doi.org/10.4103/0366-6999.232808

Zheng, D., Zeng, L., Yang, R., Lian, Y., Zhu, Y. M., Liang, X., Tang, L., Wang, H., Cao, Y., Hao, G., Liu, J., Zhao, J., Wang, R., Mol, B. W., Li, R., Huang, H. F., & Qiao, J. (2019). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional in vitro fertilisation (IVF) in couples with non-severe male infertility (NSMI-ICSI): protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ open*, *9*(9), e030366. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030366

Zhou, L., Wang, J., Xiao, L., Sun, H., Wang, Y., Geng, L., Hao, G., Zhang, C., Xu, L., & Qian, W. (2016). Differential effects of short co-incubation of gametes and early removal of cumulus cells in patients with different fertilizing capabilities. *Reproductive biomedicine online*, *32*(6), 591–596. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.02.010

Zhu, J., Zhang, J., Li, H., Wang, T. Y., Zhang, C. X., Luo, M. J., & Tan, J. H. (2015). Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas ligand in mice. *Scientific reports*, *5*, 8683. https://doi.org/10.1038/srep08683

Zollner, U., Zollner, K. P., Hartl, G., Dietl, J., & Steck, T. (2002). The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Human reproduction (Oxford, England)*, *17*(5), 1327–1333. https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1327