ERKEN VEYA EKİLİBRASYON SONRASI SOYULARAK İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU YAPILAN OOSİTLERDE MONOPRONUKLEUS VE MULTİPRONUKLEUS ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Emrah Sansar
191503103

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 MONOPRONUKLEUS VE MULTİPRONUKLEUS ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Emrah Sansar
191503103
Orcid: 0000-0003-1978-4354

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Danışman: Unvanı: 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 eğitim süresince tez danışmanlığımı yapan ve bu süreçte bana desteklerini esirgemeyen değerli hocamız Prof.Dr. Mehmet Cıncık'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım süresince maddi ve manevi destek veren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Emrah Sansar

Ekim 2021

ÖZ

ERKEN VEYA EKİLİBRASYON SONRASI SOYULARAK İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU YAPILAN OOSİTLERDE MONOPRONUKLEUS VE MULTİPRONUKLEUS ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Emrah Sansar
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 çalışmada erken soyularak ve inkübasyon sonrası soyularak İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılan oositlerde MonoPronuleus(MPN) ve MultiPronukleus (MultiPN) oranlarının prospektif olarak araştırılmıştır. Araştırmamız Altunizade Acıbadem hastanesi Tüp bebek merkezi Embriyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Bu merkeze başvuran hastalar arasından belirlenen kriterlere uyan hastalardan alınan oositler ikiye bölünmüş ve ilk grup (Çalışma Grubu) hemen oosit pick-up(OPU-oosit toplama) işleminden sonra soyularak ICSI yapmıştır, Diğer grup (Kontrol Grubu) ise OPU işleminden sonra rutinde olduğu gibi ekilibrasyon için 2 saat bekletilerek soyulup ICSI yapılmıştır. Bu iki grup arasında fertilizasyon oranı, MPN, MultiPN, 3. ve 5.gün grade 1 embriyo kaliteleri ve blastosist aşamasına ulaşma oranları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen 85 hastadan 1107 oosit toplanmıştır. 2 gruba bölünen oositlerin 565 tanesi erken soyuldu, 542 tanesi ise rutinde olduğu gibi 2 saat sonra soyulmuştur. Erken soyulan oositleri 1.Grup altında, rutinde olduğu gibi soyulanlar ise 2.Grup altında toplanmıştır. Erken soyulan oositlerin 342 tanesi, rutinde olduğu gibi soyulanların ise 295 tanesi fertilize olmuştur. Fertilizasyon oranlarına sırasıyla baktığımızda; erken soyulan grubun %60,5 rutinde olduğu gibi soyulan grubun ise %54,4 olduğu görülmüştür. Gruplar arasında fertilizasyon (2PN) oranları açısından anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$); Grup 1 olgularında fertilizasyon oranı anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Diğer değişkenler sırasıyla MPN oranları 1.grubun %2,5; 2.grubun %2,6,

MultiPN oranları 1.grubun %0,4; 2.grubun %1,3. 3.gün GRADE 1 embriyo kalitesi oranları 1.grubun %54,7; 2.grubun %48,9, 5.gün GRADE 1 embriyo kalitesi oranları 1.grubun %34,9 2.grubun; %28,6, blastosiste ulaşma oranları 1.grubun %41,2; 2.grubun %33,6 olduğu saptanmıştır. MPN oranları, MultiPN oranları ve 3.gün GRADE 1 Embriyo kalitesi oranları arasında gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. 5.gün GRADE 1 embriyo kalitesi Grup 1 olgularında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Blastosist aşamasına ulaşan embriyo oranları Grup 1 olgularında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek oranda saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: İnsan; ICSI; Oosit; MPN; MultiPN; Erken denüdasyon.

ABSTRACT

COMPARISON OF MONOPRONUCLEUS AND MULTIPRONUCLEUS FORMATION RATES DERIVED FROM THE OOCYTES DENUDED AT EARLY OR POST-EQUILIBRATION FOR INTRACYTOPLASMIC SPERM INJEKTION

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

In this study, MonoPronuleus (MPN) and MultiPronucleus (MultiPN) ratios were investigated prospectively in oocytes that underwent intracytoplasmic sperm injection (ICSI) by early denuded and after incubation denuded. Our research was carried out in the Embryology Laboratory of the Altunizade Acıbadem Hospital IVF center. The oocytes taken from the patients, who applied to this center and met the determined criteria, were divided into two groups.The first group (Study Group) was denuded and applied ICSI immediately after the oocyte pick-up (OPU- oocyte pick up), while the other group (Control Group) was remained untouched for two hours for equilibration and applied ICSI, as a part of the routine, directly after the operation of OPU. Fertilization rate, MPN, MultiPN, 3rd and 5th day grade 1 embryo qualities and rates of reaching the blastocyst stage were compared between these two groups. A total of 1107 oocytes were collected from 85 patients included in this study. Of the oocytes divided into 2 groups, 565 were denuded early, and 542 were denuded after 2 hours as routinely. Early denuded oocytes were collected under Group 1, and those that were denuded as routinely were collected under Group 2. 342 of the early denuded oocytes and 295 of those that were denuded as routinely became fertilized. When we look at the fertilization rates respectively; It is seen that the early denuded group is 60.5%, while the as routinely denuded group is 54.4%. A significant difference was noticed between

the groups in terms of fertilization (2PN) rates ($p<0.05$); Fertilization rate was found to be significantly higher in Group 1 cases. Other detected variables are, respectively; MPN rate of the first group is 2.5%, while 2.6% for the second group; MultiPN rate of the first group is %0,4, while %1,3 for the second group; 3rd day GRADE 1 embryo quality rate is 54.7% in the first group, while it is 48.9% for the second group; 5th day GRADE 1 embryo quality rate of the first group is 34.9%, while it is %28,6 for the second group; the rate of reaching the blastocyst is 41.2% for the first group, while it is 33.6% for the second group. According to the results, there is no statistically significant difference between MPN rates, MultiPN rates and 3rd day Grade 1 Embryo quality rates of the groups. A statistically significant difference was found in the 5th day Grade 1 embryo quality in Group 1 cases ($p<0.05$). The rate of embryos reaching the blastocyst stage was found to be statistically significantly higher in Group 1 cases.

Keywords: Human; ICSI; Oocyte; MPN; MultiPN; Early denudation.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZ v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
TABLOLAR LİSTESİ xi
ŞEKİLLER LİSTESİ xii
KISALTMALAR xiii
ÖZGEÇMİŞ xiv
BÖLÜM 1. GİRİŞ 1
1.1. Problem 2
1.1.1.İnfertilite 2
1.2. Gamet Hücreleri 3
1.2.1. Sperm 3
1.2.2. Oosit 5
1.3. Oositlerin Toplanması (OPU) 8
1.4. Oositlerin Değerlendirilmesi 8
1.5. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) 9
1.6. Fertilizasyon Kontrolü 10
1.6.1. Pronukleus Değerlendirmesi 11
1.6.1.1. Mono Pronukleus (MPN) 12
1.6.1.2. Multi Pronukleus (MultiPN) 14
1.7. Blastosist Değerlendirmesi 15
1.8. Amaç 19
1.9. Önem 19
1.10. Varsayımlar 20
1.11. Sınırlıklar 20
1.12. Tanımlar 21
BÖLÜM 2. YÖNTEM 22
2.1. Araştırma Modeli 22
2.2. Evren ve Örneklem 22
2.3. Veriler ve Toplanması 23
2.4. Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 23
BÖLÜM 3. BULGULAR VE YORUMLAR 25
3.1. Bulgular 25

3.1.1. Fertilizasyon (2PN) Oranı 25
3.1.2. Monopronukleus(MPN) ve Multipronukleus(MultiPN) Oranları 26
3.1.3. 3. ve 5. Gün Grade 1 Embriyo Kalitelerinin Oranları 26
3.1.4. Blastosist Aşamasına Ulaşma Oranları 27
3.1.5. Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması 28
3.1.6. Yorumlar 29
BÖLÜM 4. SONUÇ 31
4.1. Özet 31
4.2. Yargı 31
4.3. Öneriler 32
KAYNAKÇA 33

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1.: ALPHA/ESHRE İstanbul Konsensus Blastosist Sınıflandırması..... 17

Tablo 3.1.2.: Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması..... 28

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. : Spermatogenez Aşamaları..... 4

Şekil 1.2. : Sperm Morfolojisi..... 5

Şekil 1.3. : Oogenez aşamaları..... 7

Şekil 1.4. : Graaf (olgun) Folikülü ve Oosit Histolojik Kesiti..... 7

Şekil 1.5. : Normal Fertilizasyon..... 10

Şekil 1.6. : Fertilizasyon Gerçekleşmemiş Oosit..... 11

Şekil 1.7. : MPN Zigot Örnekleri..... 13

Şekil 1.8. : MultiPN Zigot Örnekleri..... 14

Şekil 1.9. : Blastosist Aşamaları..... 18

Şekil 3.1. : Grupların Fertilizasyon (2PN) oranları dağılımı……..…24

Şekil 3.2. : Grupların 5.gün grade 1 embriyo oranlarının dağılımı……...……..25

Şekil 3.3. : Grupların Blastosist aşamasına ulaşan oosit oranları dağılımı…….26

KISALTMALAR

MPN	:Mono Pronucleus
MultiPN	:Multi Pronucleus
PN	:Pronucleus
ICSI	:Intra Cytoplasmic Sperm Injection-Mikroenjeksiyon
OPU	:Oosit Pick-Up - Oosit toplama işlemi.
ÜYTE	:Üremeye Yardımcı Tedavi
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
YÜT	:Yardımcı Üreme Teknikleri
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
WHO	:World Health Organization

ÖZGEÇMİŞ

Emrah Sansar

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.	2019	Marmara Üniversitesi, Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı
Lise	2014	Örfi Çetinkaya Anadolu Teknik Lisesi

İş/İstihdam

Yıl	*Görev*
2021- devam	Embriyolog/Biyolog. Bahçeci Umut Tüp Bebek Merkezi
2020 - 2021	Öğretmen. Şehit Er Tuncay Türken Ortaokulu
2018- 2019	Biyoloji Öğretmeni. Çapa Fen Lisesi

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Çiftlerin 1 yıl veya daha fazla sürede her hangi bir önleyici tedbir almadan cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması infertilite olarak tanımlanır (ZegersHochschild vd., 2009). Toplumda İnfertilite oranları farklılık göstersede dünyada yaklaşık olarak 80 milyon insanın infertiliteden etkilendiği düşünülmektedir (Seymen & Siyez, 2018). İnfertiliteye neden olan faktörlerde oranlar; erkekler %30-40, kadınlarda %40-50 ve açıklanamayan faktörlerde ise %20 olduğu belirtilmiştir (Boivin vd., 2007). Çiftlerde Fertiliteyi etkileyen nedenler arasında; erkek ve kadın yaşı, cinsel ilişkinin zamanı ve sıklığı, alkol ve sigara kullanımı, kadın ve erkekte geçirilmiş pelvik ameliyatlar, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, toksinler, ilaçlar, radyasyon, kimyasal ajanlar ve stres gibi faktörler fertiliteye etki eden unsurlardır (Özcan & Yücetürk, 2020). Böyle faktörler dışında çiftin ovulasyon zamanını bilmemesi ve bu bilince sahip olmaması cinsel birleşmenin doğurganlığın olduğu zamanda olmamasının da infertilite için önemli bir sebep olabileceği belirtilmiştir (Atasü & Şahmay, 2001; Çavuşoğlu, 2015).

İnfertil olan çiftler çocuk sahibi olabilmek için bazı tedavi yöntemlerine başvururlar. Günümüzde en bilinen ve tercih edilen In Vitro Fertilization (IVF) yöntemidir (Karpat & Erensoy, 2020). Yardımcı üreme tekniklerinde(YÜT), anne adayından alınan oositlerin laboratuvar ortamında sperm ile biraraya getirilmesi rutin olarak yapılan işlemlerdendir. ICSI sonrası yapılacak olan fertilizasyon kontrolünden sonra embriyoların gelişimine bakılarak en iyi olan embriyoların seçilmesi implantasyon için önem arz etmektedir, transfer sonrası hastanın kaliteli embriyoları varsa dondurma işlemi uygunabilmektedir. (Alpak, 2009).

Kumulus hücreleri, oosit olgunlaşmasının uyarılmasında önemli bir rol oynar, çünkü bu hücreler büyüme faktörleri sağlayabilir veya adezyon moleküllerini eksprese edebilir (Xue vd., 2013). Kumulus hücreleri ile gelişen oosit arasındaki etkileşim ve yakın temas, salgılanan faktörlerin varlığı ile karakterizedir. Oosit ve çevresindeki

kumulus hücreleri arasındaki etkileşim oosit tarafından kontrol edilir ve bu etkileşim sonuçta oosit kalitesini belirler. Kumulus hücreleri gelişen embriyonun korunmasında önemli bir rol oynar (Akt: Aktan vd., 2011). Bu nedenle, erken kumulus hücrelerinin soyulmasının embriyo fertilizasyonu ve gelişim potansiyeli ile ICSI sonuçları üzerinde etkilerinin olup olmadığı henüz tam belirlenemeyen önemli bir soru işareti olmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada erken soyularak ve rutinde olduğu gibi inkübasyon yoluyla ekilibrasyon sonrası soyularak İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu(ICSI) yapılan oositlerde MonoPronuleus(MPN) ve MultiPronukleus (Multi PN) oranlarının normal fertilizasyon ile prospektif olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamızda oosit toplama(OPU) işleminden hemen sonra ve inkübasyon sonrası soyularak ICSI yapılan oositlerde kumulus hücrelerinin MPN ve Multi PN oranlarına etkisinin bulunup bulunmadığı ve özellikle ekilibre etmeden erken soymanın MPN ve Multi PN oranlarına etkisinin olup olmadığı hipotezimiz açısından önem taşımaktadır.

1.1. Problem

1.1.1. İnfertilite

İnfertilite veya gebe kalamama, tüm dünyada bir sorun olmaya devam ediyor. Kısırlığın dünya çapında üreme çağındaki çiftlerin % 8 ile 12'sini etkilediği tahmin edilmektedir (Ombelet vd., 2008a, b) ve şu anda Dünyada ortalama olarak % 9 olduğu belirtilmiştir (Boivin vd., 2007). Bununla birlikte, dünyanın bazı bölgelerinde kısırlık oranları çok daha yüksektir ve bazı popülasyonlarda % 30'a kadar ulaşılabilmektedir (Nachtigall, 2006; Ombelet vd., 2008a, b). Doğurganlık oranları birçok faktörden etkilenir: yaş, akut veya kronik hastalıklar, çevresel toksinler, mesleki sebepler, genel yaşam tarzı sorunları, bulaşıcı hastalıklar, genetik koşullar ve gebe kalmaya çalışan erkek veya kadını etkileyebilecek spesifik üreme bozuklukları (National Public Health, 2017). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) gelişmiş ülkelerde 8500 infertil çift üzerinde yaptığı bir araştırmaya göre, infertiliteye neden olan faktörleri ve oranlarını şöyle sıralamıştır: kadın faktörü ,% 37; erkek faktörü,% 8; ve hem kadın hem de erkek faktörü

% 35 geriye kalan çiftlerin ise açıklanamayan infertiliteye sahip olduğu kabul edilmiştir (WHO, 2011).

1.2. Gamet Hücreleri

1.2.1. Sperm

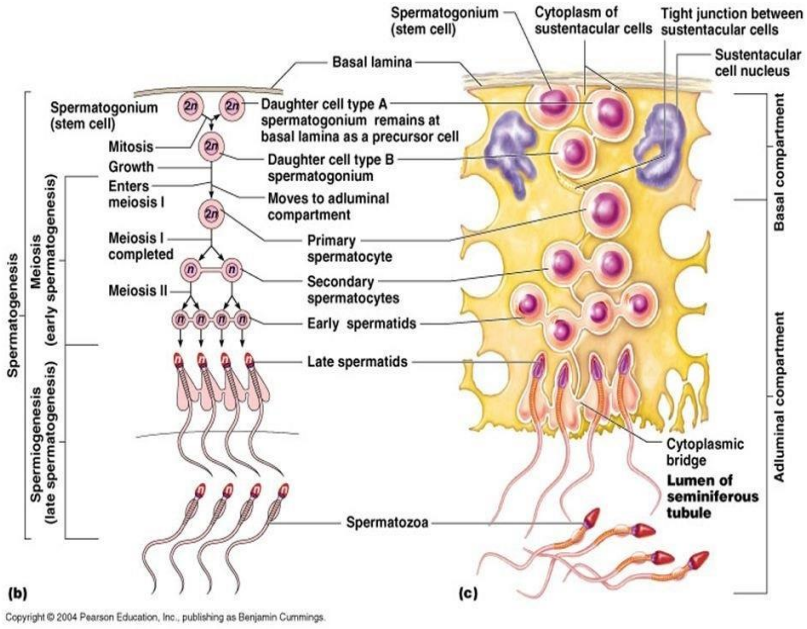
Sperm hücresini oluşturan erkek üreme sistemi; er bezleri (testis), yardımcı bezler, genital kanallar ve penisten oluşmaktadır. Testisin iki yönlü görevi hormon ve spermatozoon üretmektir. Spermatozoonların dışarıya iletilmesinde yardımcı bezler ve genital kanallarda üretilen salgılar görev almaktadır. Bu salgılar aynı zamanda spermlerin beslenmesini sağlar. Genital kanallarda ve yardımcı bezlerde üretilen salgılar ile birlikte spermatozoonlar semeni oluşturur, semenin dişi üreme sistemine iletilmesinde ise penis görev yapar. Testiste üretilen başlıca hormon testosteron olmakla birlikte, erkek fizyolojisi için hem testosteron hem de metaboliti dihidrotestosteron gereklidir.(Junqueira, Solakoğlu & Aytekin, 2009; "Spermatogenez", 2020; "Erkek üreme sistemi histolojisi", 2014).

Erkeklerde puberte (ergenlik) döneminde hormonların etkisiyle testislerde yer alan seminifer tübüllerde erkek üreme hücresi olan spermin üretimi başlamaktadır. Sperm hücresinin yapımı mitoz ve mayoz hücre bölünmelerini içeren spermatogenezle başlar ve bu bölünmeler sonucunda spermatozoidlere dönüşür; son olarak gerçekleşen bu aşamaya spermiyogenez denir.

Spermatogenez aşaması spermatozoon yapımının gerçekleştiği kısımdır. Bu aşama spermatogunyum hücreleri ile başlamaktadır. Spermatogonyumun çapı yaklaşık olarak 12 μm dir, bazal laminanın üst kısmında yer almaktadır. Ergenlik döneminde, spermatogonyum hücreleri sürekli mitoz bölünmeler geçirerek sayılarını arttırırlar ve böylece yeni hücreler oluşmaktadır. Mitoz bölünmeler sonucunda oluşan yeni hücreler iki gidişattan birini şeçebilirler: birinci yol A tipi spermatogonyumlar şeklinde isimlendirilen kök hücreler olarak segmantasyona devam edebilir, ikinci yol ise devam etmekte olan mitoz döngüleri süresince değişerek B tipi spermatogonyumları oluşturmaktadır. Daha sonra B tipi spermatogonyumlar değişerek primer spermatosit denilen öncül hücrelere farklılaşır. Primer spermatositler 4N DNA'ya ve 46 kromozoma

sahiptir. Primer spermatositler oluştuktan sonra bu hücreler mayoz I aşamasının profaz safhasına girmektedir. Bu hücrelerin profaz evresi yaklaşık olarak 22 gün sürer. Mayoz I bölünmesinden sonra kromozom sayısı 23 olan sekonder spermatosit denilen hücreler oluşmaktadır. Sekonder spermatositler daha sonra mayoz II bölünmesini geçirerek 23 kromozoma sahip iki hücrenin, yani spermatidlerin teşekkül etmesini sağlarlar.

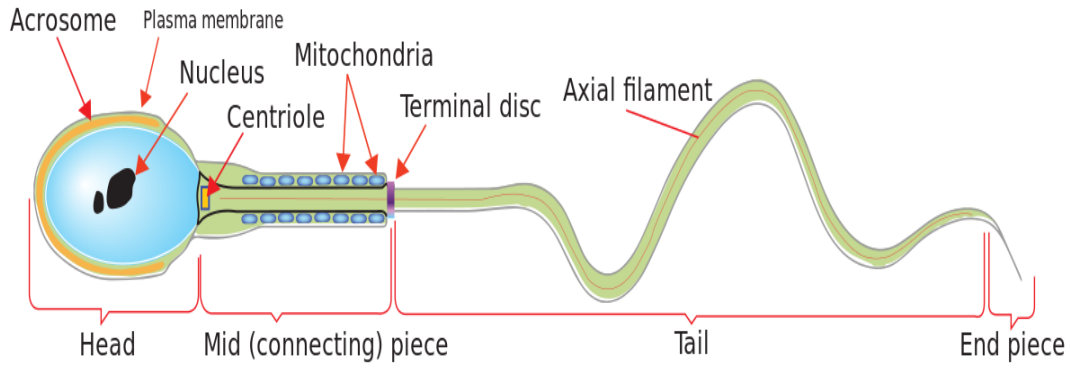
Spermatidler de spermiyogenez olarak adlandırılan bir aşamadan geçer. Burada nukleusta bulunan erkek DNA'sını yumurtaya iletmek için sperm denilen hücreye dönüşmektedir. Epididimiste olaylanan bu aşamada her hangi bir bölünme meydana gelmez. Akrozomun gelişmesi, nukleusun yoğunlaşması, sitoplazmanın azalması ve hareketi sağlayan kamçının oluşması spermiyogenezde gerçekleşir. Spermler hareket yeteneklerini ductus epididimiste; dişi genital kanalında ise dölleme kabiliyetini elde eder (Junqueira, Solakoğlu & Aytekin, 2009). Yukarıda anlatılmakta olan süreçler Şekil 1.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1.: Spermatogenez Aşamaları

Döllenme kabiliyetinde olan olgun sperm morfolojik olarak; baş, orta bölüm ve kuyruktan oluşur. Baş kısmında nükleus bulunur genetik bilgileri taşır, başın uç kısmında ise sindirim enzimleri barındıran ve oositin zarını eriterek spermin oosite

girmesini sağlayan akrozom bulunur. Spermin boyun (orta) kısmında ise ATP enerjisini kamçıdaki mikrotübüller tarafından kullanılarak hareketi sağlayan mitokondriler yer alır. Kuyruk kısmında ise kamçı bulunur. Hareketi sağlayan kamçı spermin döllenme için oosite doğru ilerlemesini sağlar, (şekil 1.2.) ("Spermatogenez", 2020; "Erkek üreme sistemi histolojisi", 2014).



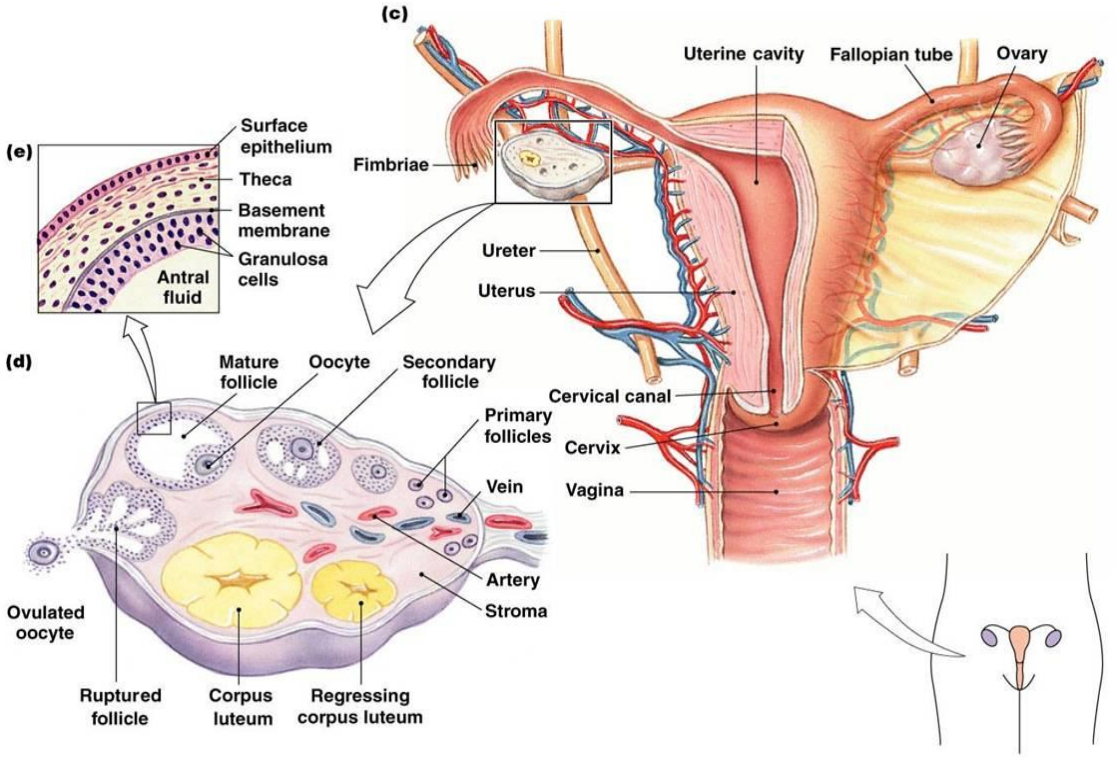
Şekil 1.2. : Sperm Morfolojisi

1.2.2. Oosit

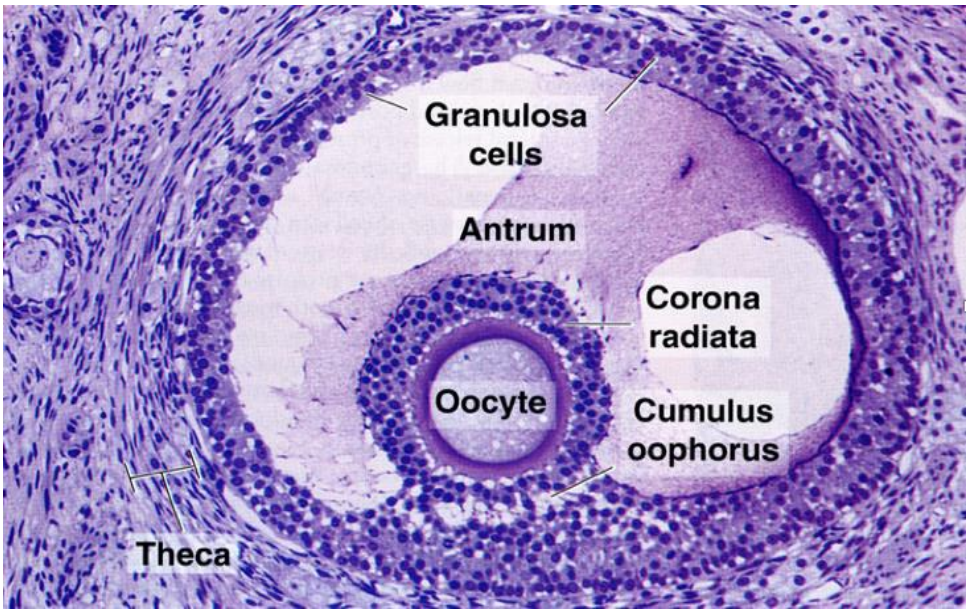
Oosit hücresinin üretiminin gerçekleştiği dişi üreme sistemi incelendiğinde; ovaryum, iki iletim kanalı, iki tuba uterina, vajina, uterus ve dış genital organlardan oluşmuştur. Bu yapıların işlevleri yumurta hücresinin üretimi ile embriyo ve fetüs safhalarından doğum aşamasına kadar fertilize olmuş yumurtayı taşımaktır. Embriyonik dönemin ortalama olarak birinci ayında, vitellüs vesikülünden gonadlara göç eden primordiyal germ hücreleri burada bölünerek oogonyumlara farklılaşır. Bu bölünmeler o kadar hızlı bir şekilde gerçekleşir ki, yaklaşık olarak yaşamın ikinci ayında altı yüz bin, beşinci ayda ise 7 milyondan daha fazla oogonyum oluşmaktadır. Oogonyumlar üçüncü ayda mayoz I'in profaz safhasına girer, fakat bölünme mayozun diploten safhasında durmaktadır. Burada oluşan hücrelere primer oosit denir, primer oositlerin etrafını saran hücreler ise folikül hücreleri olarak isimlendirilir. Hamileliğin 7.ayına gelindiğinde, oogonyumların büyük bir kısmı primer oosite dönüşmüştür. Fakat primer oositlerin büyük bir kısmı, atreziye uğramaktadır. Sonuç olarak baktığımızda ergenlik

döneminde overlerde ortalama 300 000 oosit bulunmaktadır. Adet döneminde ortalama olarak 28 günde bir yumurta serbest bırakılır ve doğurganlık dönemi bir kadında 30-40 sene sürdüğü düşünüldüğünde, sadece 450 oosit serbest bırakılabilir. Geriye kalan oositlerde atrezi uğrayarak yok olur (Jackson vd., 2019; Junqueira, Solakoğlu & Aytekin, 2009; "Spermatogenez", 2020; "Erkek üreme sistemi histolojisi", 2014)

Foliküllerin gelişmesi, hipotalamusun etkisiyle hipofizden salgılanan folikül Uyarıcı Hormon(FSH) tarafından uyarılır. Foliküler büyümenin birinci safhası oositlerin en hızlı büyüdüğü evredir; burada oositin çapı yaklaşık 120 μm ile en üst düzeyine ulaşır. Bu aşamadaki folikül tek tabakalı primer folikül olarak isimlendirilir. Folikül hücreleri sayılarını arttırarak, granuloza tabakasını meydana getirir. Buradaki hücreler çok katmanlı(mültilaminer) birincil folikül yada preantral folikül olarak adlandırılır. Oositlerin etrafında kalın, biçimsiz(amorf) bir örtü olan zona pellusida bulunur. Folikül hücreleri arasında folikül sıvısı(likör foliküli) toplanmaya başlar. Sıvı bulunan küçük boşluklar bir araya gelerek antrum olarak adlandırılan daha büyük bir boşluğu oluşturur. Bu folikül artık sekonder folikül veya antral folikül şeklinde isimlendirilir. Granuloza hücrelerinin antrumu oluşturacak şekilde yeniden düzenlenmesi esnasında bu katmanda bulunan bazı hücreler, folikül duvarının muayyen bir noktasında yoğunlaşarak küçük bir tepecik oluşturur. Antrumun içerisine doğru katlanmalar yapan bu yapı içerisinde oositi de bulundurur, bu yapıya kümülüs ooforus denir ve daha sonra folikülun bitişiğindeki stroma olarak adlandırılan kısımda bulunan fibroblast farklılaşarak teka folikülüne dönüşür, teka tabakasıda teka interna ve eksternayı oluşturur ve böylelikle her ay başı dönemi sırasinda Graaf folikül oluşur. Graaf folikül yaklaşık olarak 2.5 cm çapindadır. Yaklaşık olarak menstrüal döngünün 14 .günü ovulasyon ile bu çatlar ve içinden sekonder oosit atılır. Yukarıda anlatılan oogenez süreci şekil 1.3'te, olgun folikül ise şekil 1.4'te gösterilmiştir (Jackson vd., 2019; Junqueira, Solakoğlu & Aytekin, 2009; "Spermatogenez", 2020; "Erkek üreme sistemi histolojisi", 2014).



Şekil 1.3. : Oogenez aşamaları



Şekil 1.4. : Graaf (olgun) Folikülü ve Oosit Histolojik Kesiti

1.3. Oositlerin Toplanması (OPU)

Hastalardan oositin elde edilebilmesi için öncelikle uygun kontrollü ovaryen hiperstimulasyon (KOH) uygulaması yapılarak, hastanın birden fazla ve olabildiğince senkron maturasyon yapısına sahip oositlerin geliştirilmesi sağlanmaktadır. Bu protokollerle, hipotalamus-hipofiz-over aksının tedavi öncesi baskılanması ve daha sonra da overlerin uyarılarak foliküler gelişimin gerçekleşmesi sağlanır. Hastalara gonadotrophin releasing hormon (GnRH) agonisti yada GnRH antagonisti ile günlük rekombinant folikül uyarıcı hormon (FSH) (Gonal F, Serono vb.) uygulanmasıyla gerçekleştirilir (Lin vd., 2015).

Foliküler gelişimin ultrason altında takip edilirken, yaklaşık foliküler büyüklüğü 17-18 mm'ye ulaştığında human koryonik gonodotropin (HCG) (ovitrelle, Serono) uygulaması yapılarak 35-36 saat sonra ultrason eşliğinde transvajinal aspirasyon ile foliküller toplanmaktadır. Toplanan oositler laboratuvar ortamında incelenerek oosit sayısı ve matur olma durumlarına bakılır, daha sonra matur oositlere dölleme işlemi yapılır (Lin vd., 2015).

1.4. Oositlerin Değerlendirilmesi

Foliküllerin aspirasyonu sonrası tüp içerisine alınan folikül sıvısı, steromikroskop altında incelenir ve toplanan kümülüs-oosit-kompleskleri (KOK) bikarbonatlı kültür ortamına alınmaktadır. İlk olarak laboratuvarda oositin morfolojik değerlendirmesi ile KOK'ların incelenmesine başlanır. Olgun oositler (matur-M-II) için KOK, hyaluronik asitidin aktif salgılanmasından dolayı genişlemiş, musufiye ve yapışkan kabarık '' bulut benzeri '' bir görünüme sahiptir (Laufer vd., 1984). Küçük foliküllerden alınan ve genellikle profaz I (germinal vezikül aşaması-GV) ve M-I (metafaz I) aşamasındaki olgunlaşmamış oositleri (immatur) içeren KOK'ların; açılmamış koyu görünümlü, çok katmanlı, yapışkan, oositin zona pellusidasına doğru adhare olmuş kompakt kümülüs ve granuloza hücrelerini içermektedir. Bu şekilde

olgunlaşmamış KOK'ların in vitro maturasyon uygulaması yapılarak korona-kümülüs hücrelerinin genişlemesi ve oositin nüklear olgunlaşması da sağlanabilmektedir (Rienzi, Balaban, Ebner & Mandelbaum, 2012).

KOK'ların değerlendirilmesi için ikili puanlama sistemi kullanılmaktadır (0 veya 1). '' iyi '' bir KOK (Rienzi L ve balaban B ve 2012) olarak derecelendirilmesi, genişlemiş kümülüs ve yayılmış bir koronayı ifade etmektedir (''Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology'', 2011). KOK'ların değerlendirilmesinden sonra alınan oositlere; granuloza hücreleri arasındaki hyaluronik asit bağlarını parçalayan 80 IU/ml hyaluronidaz ile muamele edilmekte daha sonra denüdasyon pipeti ile oositi çevreyeleyen kümülüs hücrelerinin mekanik olarak ayrılması, oositin diğer hücrelerden arındırılması işlemi gerçekleştirilmektedir. Daha sonra tüm oositler ışık mikroskobu altında 400x büyütmede incelenerek kesin maturasyon değerlendirilmesi yapılmaktadır. Genel olarak 1.polar cisimciğin gözlemlendiği oositler M-II matur oositleri, polar cisimciğin olmadığı oositler M-I ve sitoplazmada germinal vezikülü taşıyan GV oositler ise immatür oositleri işaret etmektedir ve ancak matur M-II oositlere intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu(ICSI) işlemi uygulanabilmektedir. İmmatur oositlere ise IVM yöntemi uygulanabilmektedir.

1.5. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

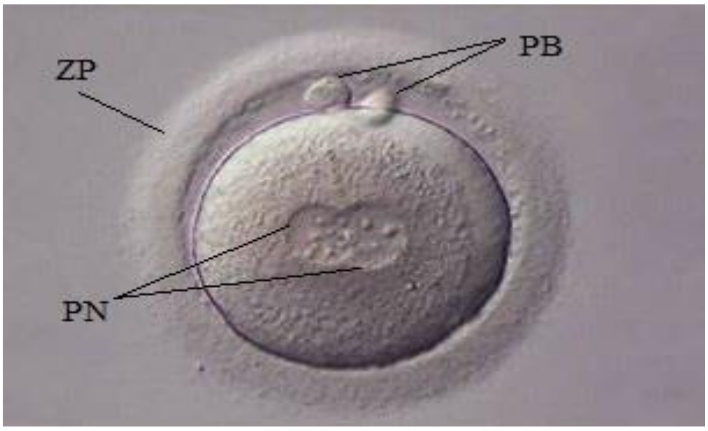
İntrasitoplazmik Sperm enjeksiyonu(ICSI) tekniği, oositin etrafındaki granüloza hücrelerinin temizlendikten sonra oositin içerisine yalnız bir sperm hücresinin enjeksiyonudur. ICSI işlemi ilk olarak Belçikada 1992 yılında Gian Piero Palermo ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır ve ICSI sonrası ilk gebelik yine aynı yılda elde edilmiştir. Erkeklerden kaynaklanan infertilitede ICSI uygulaması ile eski zamanlara oranla tedavide başarı düzeyini arttırmıştır (Palermo vd., 1992; Nagy vd., 1993a).

ÜYTE merkezlerinin en çok kullandığı yöntemlerden biri olan ICSI; rutin olarak büyük bir hasta yüzdesine uygulanmaktadır. ICSI işlemi uygulanırken, oosit holding pipet ile kutup cisminin konumuna göre ayarlanarak tutulur ve sonra içerisinde seçilmiş olan spermin bulunduğu mikropipet ile oositin içine girilir ve sperm hücresi bırakılır. Böylelikle normal şartlarda oositin içine giremeyen sperm hücresi zona pellusida (oosit zarı) engelini geçerek oositin içine girmiş olur. ICSI işleminden 1 gün

sonra, oositte iki pronukleus (çekirdek) gözlenmesi, oositin döllendiğine işaret eder. Bu iki pronukleustan birinin babadan, diğerinin ise anneden geldiği bilinmektedir (‘’ICSI’’, 2020).

1.6. Fertilizasyon Kontrolü

İntrasitoplazmik Sperm enjeksiyonundan 16-18 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapılmaktadır. Fertilizasyon değerlendirmesi yapılırken pronukleus (PN) sayısı ve morfolojisini tespit etmek için en az 200x büyütme altında, invert mikroskop veya zaman aralıklı mikroskopi cihazı (time lapse) kullanılarak yapılmalıdır (‘’Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology’’, 2011).



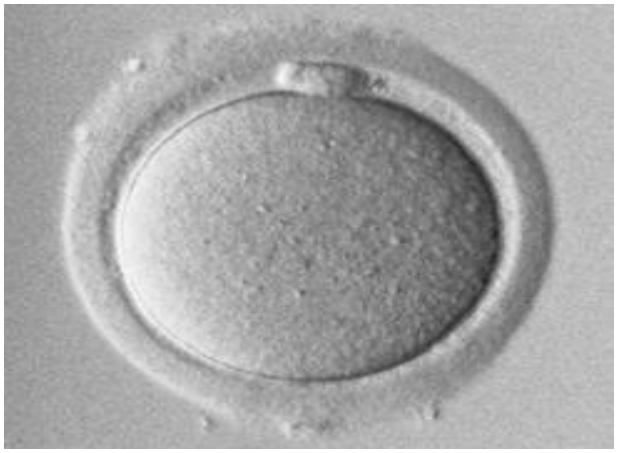
Şekil 1.5. : Normal Fertilizasyon: PB: polar body , PN: pronukleus , ZP: zona pellusida

Oosit sitoplazmasında dişi ve erkeğe ait iki pronukleusun (2PN) merkezi olarak hizalanması ile hem anneden hem de babadan gelen pronukleusların ve perivitellin boşlukta iki polar cisimciğin görülmesi normal fertilizasyonun gerçekleştiği anlamına gelir (Küpker, Diedrich & Edwards, 1998). (Şekil 1.5.)

ICSI sonrası fertilizasyon başarısızlığı gösteren oositlerin yaklaşık %30’unda temel neden oosit aktivasyonunun olmamasıdır ki bu oositlerin %80’inden fazlası sperm içermektedir. Bu başarısızlık hem sperm hem de oosit ile ilişkili olabilir ve oosit

aktivasyonu için gerekli biyokimyasal süreçlerin başlamasındaki yetersizliğe dayanır (Nasr-Esfahani, Ravazi & Tavalaee, 2008).

ICSI ile fertilizasyon sonrası 2PN içeren oositlerin yaklaşık % 90'nı klivaj evresine girer ve çok hücreli embriyolar haline gelir. Bazı zigotlarda tek veya ikiden fazla pronukleus(PN) görülmesi de anormal fertilizasyon olduğunu gösterir (Capalbo vd., 2017). Anormal fertilizasyonda; iki pronuklusun yerine, bir pronukleus görülmesi Mono pronukleus(MPN), üç, veya daha fazla pronukleus görülmesi ise multi pronukleus(MultiPN) olarak adlandırılır.



Şekil 1.6. : Fertilizasyon gerçekleşmemiş oosit

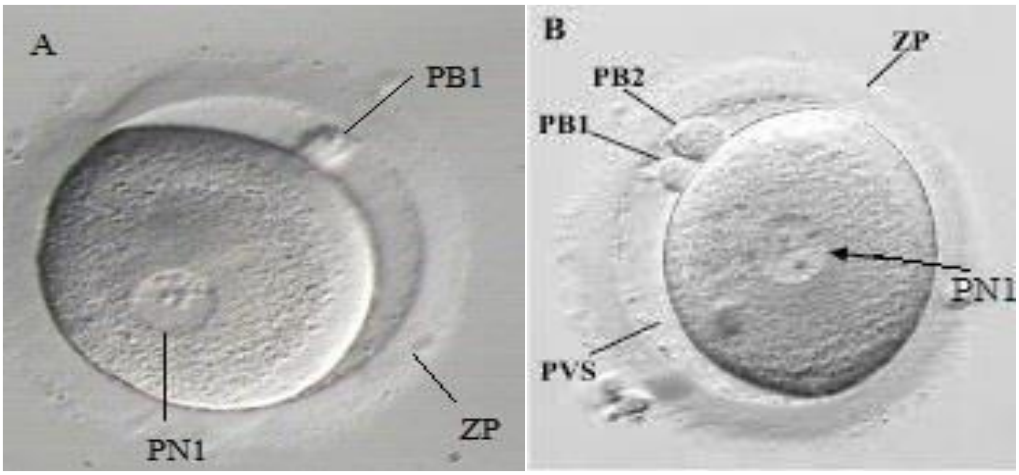
1.6.1. Pronukleus Değerlendirmesi

Pronukleusun ve Fertilizasyonun değerlendirilmesi; ikinci polar cisimciğin dışarı atılıp atılmadığı, pronukleusların sayısı, büyüklüğü, yerleşimi ve pronukleus (PN) ve polar cisimcik (PB) arasındaki hiza kontrol edilirek yapılır (Capalbo vd., 2017). Oosit sitoplazmasında iki farklı pronukleus ile normal döllenmiş zigotların pronüklear morfolojisine bakılarak, transfer edilecek embriyoların kalitesini ve canlılığını değerlendirmek için en çok atıf alan ve sık kullanılan skorlama şemasından biri Tesarik ve Greco tarafından yayınlanmıştır (Gardner & Simon, 2017; Tesarik & Greco, 1999). Pronukleus sınıflandırılması için Smith Z skorlama sistemini geliştirmiştir. ALPHA ve ESHRE tarafından pronukleer skorlama için basitleştirilmiş bir değerlendirme şeması da

önerilmiştir. Bu derecelendirme sistemine göre, Scott ve Smith tarafından tarif edildiği gibi Z1 ve Z2'ye eş değer simetrik zigotları temsil eden kategori 1, simetrik olmayan zigotları diğer tüm pronükleer görünüm düzenlemeleri ile temsil eden kategori 2, pronukleus içinde 0 veya 1 nükleolar prekürsör cisimcikler (NPC) ile anormal zigotları temsil eden kategori 3 olmak üzere üç kategori tanımlanmıştır (Gardner & Simon, 2017).

1.6.1.1. Mono Pronukleus (MPN)

ICSI'de görülen anomalilerden biri de fertilizasyon sonrası 1 pronukleus(MPN) içeren oositlerdir ve yaklaşık enjeksiyon yapılan oositlerin %2-5'i kadardır. (Şekil 1.7.). Tek pronukleustan elde edilen embriyolar için yüksek diploid oranlar gösterilmişse de, Y kromozomuna sahip blastomerlerin %50'si ve mononükleer zigotlar ile transfer sonrası gebelik, ikinci pronukleusun sonradan gözlendiği düşünülerek, gösterilmiştir (Staessen, Janssenswillen, Devroey & Van Steirteghem, 1993). MPN zigotların haploid olma riskinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir ve bu embriyoların transferinin implantasyon başarısızlığına yol açması beklenmektedir. Bu oositler mekanik veya kimyasal etmenler sonrasında partenogenik olarak aktive olabilmektedir. Bu sebeple MPN zigotlardan köken alan embriyoların normal kromozomal yapıya sahip olabileceği düşünüldüğünde, hastanın başka embriyosu bulunmadığı durumlarda transfer için kullanılabileceği duyurulmuştur (Capalbo vd., 2017; Kaufman, 1993).

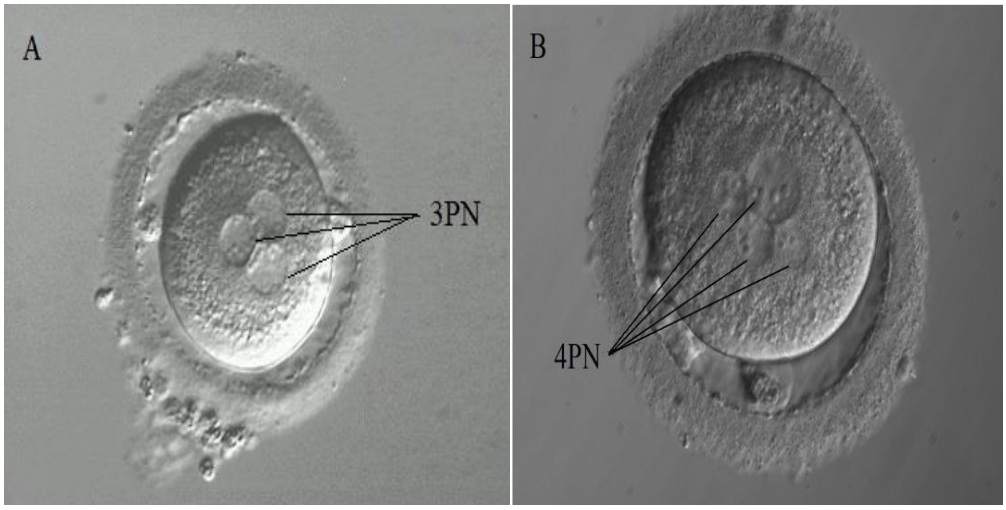


Şekil 1.7. : MPN Zigot Örnekleri : A: 1PN, 1PB , B: 1PN, 2PB ; pn: pronükleus, pb: polar body , pvs: perivitellin aralık , zp: zona pellusida

MPN oositlerin blastosiste oluşma hızı ve klinik gebelik oranları hala belirsizliğini korumaktadır. Son zamanlarda, MPN oosit ve embriyolarda kromozomal durumları ve genetik kompozisyonları analiz edilerek rapor edilmiştir. Örneğin, MPN embriyolarının kromozomal durumu floresan in situ hibridizasyon (FISH) kullanılarak analiz edildiğinde, IVF sonrası MPN olan oositlerin ve bölünme aşamasındaki embriyoların, blastosiste ulaştıklarında diploid kromozom oluşum oranı, ICSI'den anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür (Staessen & Van Steirteghem, 1997; Sultan vd., 1995; Yan vd., 2010). Daha önce yapılan çalışmalarda, blastosist aşamasına kadar kültürlenen MPN zigotlarından malformasyonsuz dokuz normal sağlıklı bebeğin doğumu bildirilmiştir (Itoi vd., 2015). Ayrıca Bradley ve ark. tarafından 20 oosite klasik IVF, 6 oositede ICSI yapılmıştır, bunlardan elde edilen MPN oositlerin blastosiste ulaşmalarıyla hastalara tranfer edilmiş bunun sonucunda; sağlıklı 6 bebeğin ve hala gebeliği devam eden 3 hastanın olduğu bildirilmiştir (Bradley vd., 2017). Bununla birlikte, anormal MPN embriyoları güvenli bir şekilde transfer etmek için yerleşik bir protokol yoktur, bu da anormal MPN embriyoların seçilmesini çok önemli hale getirir.

1.6.1.2. Multi Pronukleus (MultiPN)

İkiden fazla pronukleus görülmesi hem konvansiyonel IVF hem de ICSI sonrası gözlenen fertilizasyon anomalilerindendir. 2PN'den fazla pronukleus görülmesine Multi Pronukleus denir. Konvansiyonel IVF' te 3PN(üç pronukleus) görülmesi dispermik oosit penetrasyonuna bağlı anormal polispermi ile ilişkilidir. Bu da oosit maturasyonu ile ilişkilidir; immatür ve postmatür oositlerde kortikal reaksiyonun erken veya geç olması polispermik fertilizasyonla sonuçlanır. Bundan başka inseminasyonun erken veya geç yapılması, zona pellusidanın hasar görmüş olması veya fazla sayıda sperm ile inseminasyon olması, diploid bir sperm tarafından dölleme veya oosit ikinci polar cisimciğinin atılmaması, tek bir sperm pronukleusu ile birlikte iki dişi pronukleusun oluşması nedenlerdendir. Ayrıca bu durum mikroenjeksiyon sırasında muhtemelen iki spermin birden injeksiyonu veya oositin ikinci polar cisimciğini atamaması yada atılımındaki bozukluk, ICSI sırasında metafaz plağının hasarı, birinci mayotik iğciğin re-oryantasyonu, hCG günü yüksek östrodiol, testiküler sperm kullanımı, şiddetli oligoastenoteratozoospermik örnek kullanımından kaynaklanmaktadır. Bu 3PN' li zigotlardan kaynaklanan embriyoların poliploid kromozomal yapısını barındırdığı kabul edilir ve bu embriyoların transferinin yüksek abortus oranları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gardner & Simon, 2017; Capalbo vd., 2017).



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

3PN veya daha fazla Pronukleus içeren oositlerden gelişen embriyoların transferi yapılmamalı veya dondurularak saklanmamalıdır. İki pronukleusa sahip oositlerden elde edilen embriyo bulunmuyorsa bile, monopronukleus olan oositlerden ya da pronukleus göstermeyen oositlerden elde edilen embriyoların transfer edilmesi tavsiye edilmez (‘’Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology’’, 2011).

Klasik IVF ve ICSI’de 3PN zigotların oluşma nedenleri farklılık gösteririr. ICSI'de yalnızca oositlerin % 1'inde 3PN görülür ve ikinci polar cisimciğinin ekstrüzyonundaki başarısızlık nedeniyle diginiktir (Papale, Fiorentino, Montag & Tomasi, 2012). Multi pronukleusun genel olarak nedenleri; oositin polispermi durumuna karşı korumayı etkinleştirememesi nedeniyle iki spermatozoanın sitoplazmaya girmesinden kaynaklanır. İkinci kutup cisimciği normal olarak ekstrüde edilir ve sıklıkla bölünme meydana gelir. Bazı durumlarda, birden fazla PN'nin varlığı, başarısız sitokinez veya iki çekirdekli bir spermin penetrasyonundan kaynaklanıyor olabilir (Papale, Fiorentino, Montag & Tomasi, 2012). Triploid pronükleuslu (3PN) zigotlar bölünebilir ve hatta bazıları blastosist aşamasına kadar ulaşabilir, bu embriyolar transfer edildiğinde genellikle implantasyon başarısızlığına veya düşüğe neden olmaktadır (Feenan & Herbert, 2006).

1.7. Blastosist Değerlendirmesi

Blastosist değerlendirilmesi, 1999 yılında Gardner ve Schoolcraft tarafından yayınlandıktan sonra tüm laboratvarlarda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlandı (Gardner & Schoolcraf, 1999). Aşağıda görüldüğü gibi Gardner blastosist genişlemesini ve hatching durumu derecesine göre 1-6 arasında sınıflandırmıştır (Lane vd., 2000). Derecesi 3-6 arasında olan blastosistler İç hücre kitlesi (ICM) ve trofoektoderm açısından alfabetik harfler kullanılarak değerlendirilir. Blastosist değerlendirmesi, ICM ve trofoektodermin detaylı değerlendirilebilmesi için inverted mikroskopta yapılmalıdır. Ayrıca laboratuvar ve hastalar arasında standartı sağlamak için inseminasyon sonrası 115-177.saatlerde değerlendirilmelidir.

Gardner ve Schoolcraft blastosistleri; Blastosist genişlemesinin derecelendirilmesini, İç Hücre kitlesi(ICM) ve Trofektoderm (TE) değerlendirmesine göre 3 basamak altında sınıflandırmıştır. Bunlar sırasıyla;

Blastosist genişlemesinin derecelendirilmesini:

1. Erken blastosist(early blastocyst): blastosöl oluşmaya başlamıştır ve embriyonun yarısından az büyüklüktedir.

2. Blastosist: blastosöl embriyo volümünün yarısına ulaşmıştır veya daha fazla büyüklüktedir.

3. Tam gelişen blastosist: blastosöl embriyoyu tamamı ile doldurur.

4. Genişleyen blastosist: blastosöl büyüklüğü erken embriyo büyüklüğünden daha fazladır ve Zona incelmiştir.

5. Zonadan ayrılmakta olan blastosist: Trofektoderm zonadan çıkmaya başlamıştır.

6. Zonadan ayrılan blastosist: Blastosist zonanın tamamen dışına çıkmıştır.

İç Hücre kitlesi (ICM-Inner Cell Mass) değerlendirmesi: A: Sıkıca birleşmiş, bir çok hücre, B:Gevşek gruplandırılmış bir çok hücre, C:Az sayıda hücre

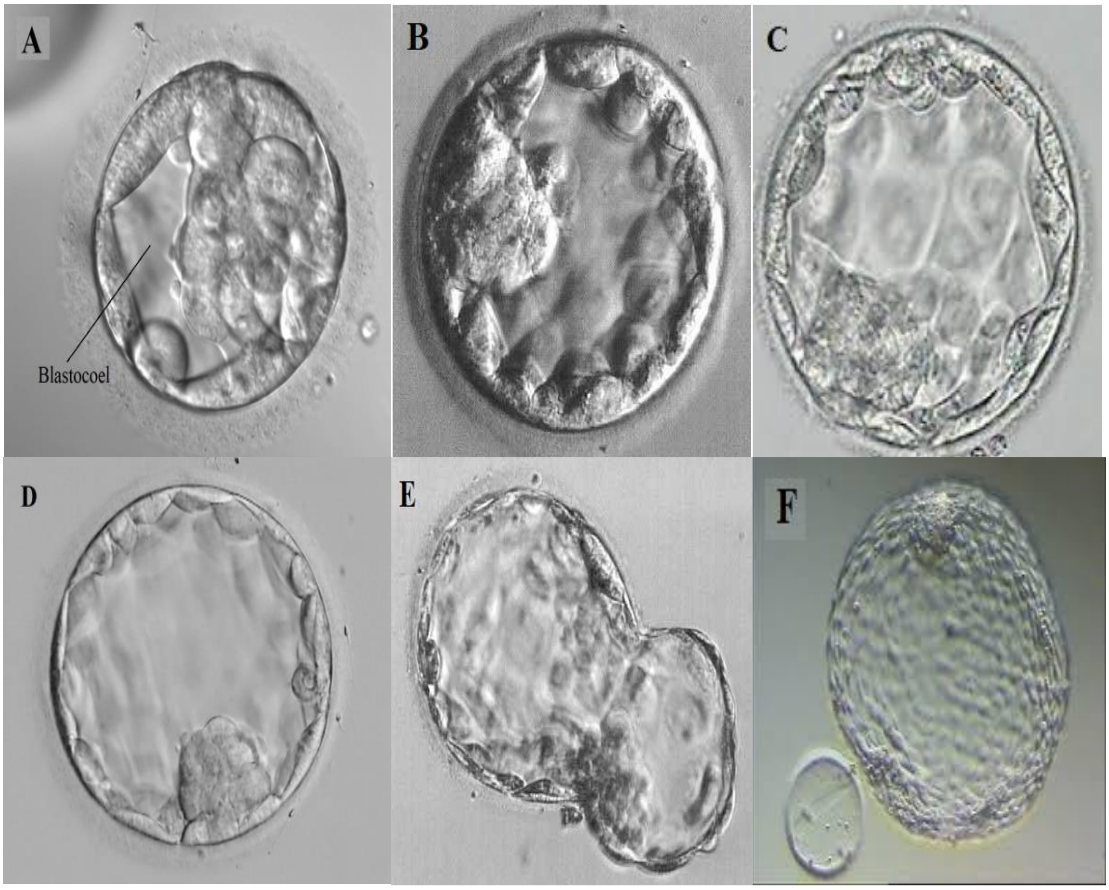
TE (Trofektoderm) değerlendirmesinde :A: Çok sayıda epitelyum formunda hücre, B: Az sayıda, gevşek epitelyum şekilde hücreler, C: Çok sayıda hücre mevcuttur, bu parametrelere göre değerlendirmişlerdir.

ALPHA/ESHRE konsensusunda Gardner ve Schoolcraft sınıflandırılmasını kullanmış fakat blastosist genişlemesi için 1-2 ve 5-6'yı birleştirerek dört gruba ayırmıştır. Ayrıca ICM ve trofoektoderm hücrelerini değerlendirirken, daha kolay istatistik yapılabilmesi için harf yerine sayı kullanılmıştır (Tablo 1.1.). Değerlendirme sırasında Blastosist büzüşürse doğru değerlendirilemeyeceği için bir iki saat sonra tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir.

DERECE	DEREC	ORAN	AÇIKLAMA
Gelişim evreleri	1		Erken blastokist
	2		blastokist
	3		Expanded blastokist
	4		Hatched/ hatching blastokist
Inner Cell Mass	1	iyi	Kompak ve birbirine sıkı bağlı bir çok hücre
	2	orta	Gevşek olarak biraraya gelmiş bir çok hücre
	3	zayıf	çok az sayıda hücre
Trofektoderm	1	iyi	sıkı epiteli oluşturan çok sayıda hücre
	2	orta	Gevşek epiteli oluşturan az sayıda hücre
	3	zayıf	Çok az sayıda hücre

Tablo 1.1.: ALPHA/ESHRE İstanbul Konsensus Blastosist Sınıflandırması

Blastosist değerlendirmesinde, hücre tiplerinin ayırt edilmesi önemlidir. Trofektoderm hücreleri, implantasyon sürecinde blastosistin uterusa implante olmasına ve sonrasında plasentanın oluşumunda yer alırken, ICM fetüsün gelişimi ile doğru orantılıdır. ALPHA/ESHRE konsensüs, ICM morfolojisinin implantasyon ve fetal gelişim için önemli bir kriter olduğunu belirtirken, Ahlström trofektoderm morfolojisinin canlı doğumları tahminde en önemli belirteç olduğunu göstermiştir (Ahlström vd., 2011; ‘’Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology’’, 2011)



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

Blastosistlerin kalitesi 5. Günde veya 6. Günde Gardner ve Schoolcraft derecelendirme sistemine göre değerlendirilir ve skor, blastosist genişlemesi, iç hücre kütlesi (ICM) gelişimi ve trofektoderm (TE) görünümüne göre yapılır (gardner 1999) Buna göre iyi kalitede embriyolar, genişleme derecesi ≥ 3 olanlar AA, AB, BA ve BB olarak derecelendirilirken, düşük kaliteli embriyolar AC, CA, BC, CB ve CC olarak derecelendirilmiştir ve blastosistin genişleme derecesi 3 veya üzeri skorlu embriyolardır. En kaliteli embriyolar , genişleme derecesi ≥ 4 olanlar AA, AB ve BA olarak derecelendirilen blastosistlerdir. Blastosistlerin 5. günde transfer edildiği veya sonraki transfer için vitrifiye edilebileceği belirtilmiştir. Morfolojik skoru zayıf embriyolar ($\leq$4CC) ve genişleme derecesi (1–2 derece) düşük olan blastosistler vitrifikasyon veya transfer için düşünülmemektedir (Wang vd., 2020).

1.8. Amaç

Çalışmamızda OPU işleminden hemen sonra ve inkübasyon sonrası soyularak ICSI yapılan oositlerde kumulus hücrelerinin Monopronukleus (MPN) ve MultiPronukleus (MultiPN) oranlarına etkisinin bulunup bulunmadığı ile ilgili araştırma yapılmıştır. Özellikle erken soymanın MPN ve MultiPN oranlarına etkisinin olup olmadığı hipotezimiz açısından önem taşımaktadır.

Araştırmamızda cevaplandırılmaya çalışılan sorular şunlardır:

- Kumulus hücrelerinin erken soyulması Monopronukleus ve MultiPronukleus'a neden olabilir mi?
- Kumulus hücrelerinin oositin gelişimi için nasıl bir önemi vardır ?
- Kumulus hücrelerinin Anormal fertilizasyonda rolü var mıdır?

1.9. Önem

Oosit ve çevresindeki kumulus hücreleri arasındaki etkileşim oosit tarafından kontrol edilir ve bu etkileşim sonuçta oosit kalitesini belirler. Kumulus hücreleri gelişen embriyonun korunmasında önemli bir rol oynar (Aktan ve Ark., 2011). Bunun gibi bir çok çalışma kumulus hücrelerinin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada Tüp bebek merkezlerine başvuran hastaların ve özellikle de açıklanamayan infertilite tanısı almış çiftlerin yardımcı üreme teknikleri ile infertilite tedavilerine olumlu katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Her geçen gün infertilite oranları yükselmektedir, Bu yüzden tüp bebek tedavilerinde canlı doğum oranları arttırmak için bir çok araştırma yapılmaktadır. Böyle çalışmalar infertilite tanısı almış ve çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin tedavilerinin daha başarılı olması için ekilibrasyon süreci ve bunun fertilizasyona etkisinin araştırılmasında yol gösterici olacaktır. ÜYTE merkezlerine başvuran hastalardan alınan oositlere ICSI işlemi uygulandıktan sonra fertilizasyon kontrolü için bakıldığında oluşan zigotta 2PN yerine MPN veya MultiPN görülmesi anormal ferlizasyon anlamına gelmektedir bu da istenmeyen durumlardan biridir, bizde çalışmamızda anormal

fertilizasyona kumulus hücrelerinin erken soyulmasının bir etkisinin olup olmadığını araştırdık.

1.10. Varsayımlar

Kumulus hücrelerinin erken soyulmasının oositlerin olgunlaşmasını olumsuz olarak etkilediği ve mevcut embriyo oranını anlamlı derecede düşürdüğü rapor edilmiştir (Wei vd., 2011). Xue, Dai ve Yang, inkübasyondan 4 saat sonra kumulus hücrelerinin soyulmasının, polipronükleer zigotların yüzdesini arttırdığını belirtmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, inkübasyondan 4 saat sonra kumulus hücrelerinin soyulmasının, tripronükleer zigotların yüzdesini arttırabileceğini rapor etmektedir (Dai vd., 2012; Xue vd., 2013, Yang vd., 2014). Bununla birlikte,literatürde, normal fertilizasyon oranı, embriyo gelişimi, klinik gebelik oranı ve implantasyon oranlarının kumulus hücrelerinin soyulmasının zamanlanmasından etkilenmediğine dair yayınlar da bulunmaktadır (Dai vd., 2012; Xue vd., 2013; Yang vd., 2014).

Klasik in-vitro fertilizasyon (IVF) yapılanlarda ise inkubasyondan 18 ile 22 saat sonra kumulus hücrelerinin soyulması karşılaştırılmış ve MultiPN Oranında artış (polipronükleer artış) tanımlamış çalışmalar da bulunmaktadır.(Wei vd., 2011; Zhang vd., 2013). Xiong ve Chen, ve arkadaşları ise klasik IVF yapılan hastalarda 6 saatlik inkübasyondan sonra ve 20 saatlik inkübasyondan sonra kumulus hücrelerinin soyulmasını karşılaştırmış ve polipronükleer döllenme oranında artış göstermişlerdir (Chen & Kattera, 2003; Xiong vd., 2011).

1.11. Sınırlıklar

Araştırmanın sınırlılıkları:

- 40 yaşın üzerindeki hastalar, yumurta sayısı 5’ ten aşağıda olan hastalar ve erkek faktörü olanlar kapsam dışı bırakılacaktır.
- Hastalardan rıza belgesi alınacaktır.
- Hastalara yardımcı üreme teknikleri ile olan tedavisi dışında ekstra bir maliyet çıkarılmayacaktır.
- belirli bir sayıda hasta çalışmaya dahil edilebilecektir.

1.12. Tanımlar

Denüdasyon: Oositlerin etrafında bulunan korona kumulus hücrelerinin temizlenmesi olayıdır.

ICSI (intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu) : Bir sperm hücresi şeçilerek yumurtanın sitoplazmasına enjekte edilmesine denir.

Fertilizasyon: Erkek üreme hücresi sperm ve dişi üreme hücresi olan oositin birleşmesi sonucunda 46 kromozoma sahip zigotun oluşmasına denir.

Oosit - pick up (OPU): Yumurta toplama işlemine denir.

Monopronukleus(MPN): ICSI yapılan oositlerde fertilizasyon kontrolü yapıldığında 1 çekirdeğin görünmesine denir.

Multipronukleus(MultiPN): ICSI yapılan oositlerde fertilizasyon kontrolü yapıldığında birden fazla çekirdeğin görünmesine denir.

Ekilibrasyon: Oositlerin soyulma işleminden sonra 2 saat bekletilmesine denir.

BÖLÜM 2. YÖNTEM

2.1. Araştırma Modeli

Bu prospektif olarak yapılan çalışmada; erken soyularak ve inkübasyon sonrası soyularak İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu(ICSI) yapılan oositlerde MonoPronuleus(MPN) ve MultiPronukleus (Multi PN) oranları karşılaştırılacaktır.

Araştırma yapılacak olan IVF merkezine başvuran hastalar arasında Evren ve Örneklemde belirtilen kriterlere uyan hastalardan alınan oositler rastgele ikiye bölünecek ve ilk grup hemen OPU işleminden sonra soyularak ICSI işlemi yapılacaktır, Diğer grup ise OPU işleminden sonra inkübasyon için 2 saat bekletilecek ve soyularak ICSI işlemi yapılacaktır. Bu hastaların embriyoları takip edilerek MPN ve Multi PN varlığı not edilecektir. Çalışmamızda OPU işleminden hemen sonra ve inkübasyon sonrası soyularak ICSI yapılan oositlerde kumulus hücrelerinin MPN ve Multi PN oranlarına etkisinin bulunup bulunmadığı ile ilgili araştırma yapılacaktır. Özellikle erken soymanın MPN ve Multi PN oranlarına etkisinin olup olmadığı hipotezimiz açısından önem taşımaktadır.

2.2. Evren ve Örneklem

Bu çalışmanın evreni Acıbadem Altunizade Hastanesi Tüp bebek merkezine başvuran hastalarından oluşmaktadır.

İnfertilite nedeniyle başvuran hastalarda şu kriterlere arananacak: hasta yaşının 40’tan küçük olması, 5’ten fazla oosite sahip olma, infertilite nedeni erkek faktörü olmayan hastalar çalışmamızın örneklemini oluşturacaktır.

2.3. Veriler ve Toplanması

Aynı hastadan alınan oositler rastgele ikiye bölünecektir. OPU işleminden hemen sonra soyularak ICSI işlemi yapılacak olan grup Çalışma grubunu, ekilibrasyon sonrası soyularak ICSI yapılanlar ise Kontrol grubunu oluşturacaktır. Kontrol grubu, ekilibrasyon solüsyonunda (G-IVF), inkübatör içinde %6 CO2, %5 O2, %90 nem ortamında 2 saat inkübe edilecektir. 2 saat süre ile inkübatörde inkübe edilen oositler dilüe edilmiş hyaluronidase ile denüdasyon pipetleri kullanılarak soyulacaktır ve maturasyon indeksleri not edilecektir. Ardından dış ortam solüsyonu (G-MOPS) içinde ICSI yapılacaktır ve inkubatör de normal kültür solüsyonu (Life Global-LG) içinde takip edilecektir.

Çalışma grubundaki oositler ise OPU dan hemen sonra bekletmeden soyulacaktır ve aynı ICSI prosedürü uygulanacaktır.

İmmatür çıkanlar çalışmaya dahil olmayacaktır. Takip edilen embriyoların, 16-18 saatleri aralığında fertilizasyon özellikleri kontrol edilecek, MPN ve MultiPN oranları kaydedilerek kültüre devam edilecek, 3 ve 5.günlerde Embriyolar morfolojik kriterlere göre skorlanacaktır. 5.güne kadar kültüre devam edilecek, gelişen embriyolar Gardner'e göre skorlanacaktır. OPU' dan hemen sonra soyulan ve 2 saatlik ekilibrasyon sonrası soyulan yumurtaların fertilizasyon oranları, MPN ve MultiPN oranları, blastosiste gidiş oranları ve embriyo kaliteleri karşılaştırılacaktır.

2.4. Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

Prospektif yapılan araştırmamızda çalışmaya dahil edilen hastaların embriyoloji laboratuvarında embriyo takip formlarına not edilen bilgiler kullanılarak yeni bir çizelge oluşturuldu. Hazırladığım çizelgede toplam hasta sayısı, toplam oosit sayısı, erken soyulan oosit sayısı, rutinde olduğu gibi soyulan oosit sayısı, fertilizasyon, MPN, MultiPN, 3. ve 5. Gün Embriyo kaliteleri ve blastosiste giden oosit sayısı not edildi.

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) Statistical Software (NCSS LLC,

Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi, ve Fisher's Exact test kullanıldı. Anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

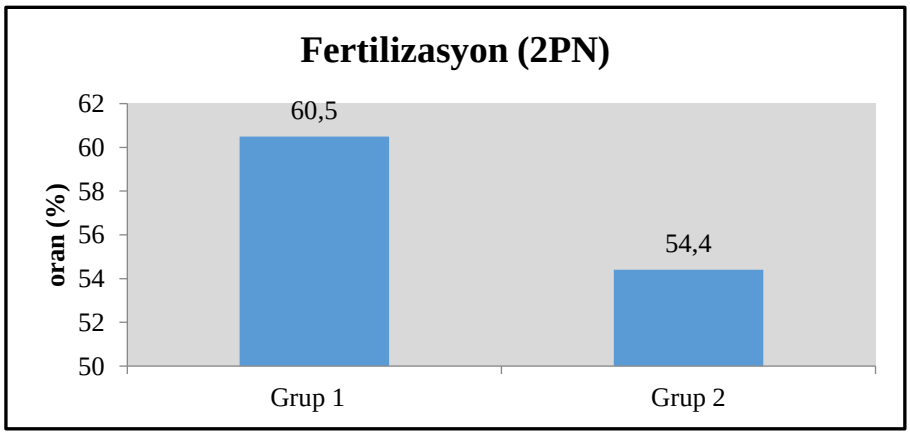
BÖLÜM 3. BULGULAR VE YORUMLAR

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

3.1. Bulgular

3.1.1. Fertilizasyon (2PN) Oranı

Bu çalışmaya dahil edilen 85 (N) hastadan 1107 oosit toplanmıştır. 2 gruba bölünen oositlerin 565 (n) tanesi erken soyuldu, 542 (n) tanesi ise rutinde olduğu gibi 2 saat ekilibrasyondan sonra soyulmuştur. Erken soyulan oositleri 1.Grup altında, rutinde olduğu gibi soyulanlar ise 2.Grup altında toplanmıştır. Erken soyulan oositlerin 342 tanesi, rutinde olduğu gibi soyulanların ise 295 tanesinin fertilize olduğu görülmüştür. Fertilizasyon oranlarına sırasıyla baktığımızda; erken soyulan grubun %60,5 rutinde olduğu gibi soyulan grubun ise %54,4 olduğu görülmüştür. Erken denüdasyon yapılanlarda fertilizasyon oranı daha yüksek bulunmuştur ($p<0,04$).



Şekil 3.1. : Grupların Fertilizasyon (2PN) oranları dağılımı

3.1.2. Monopronukleus(MPN) ve Multipronukleus(MultiPN) Oranları

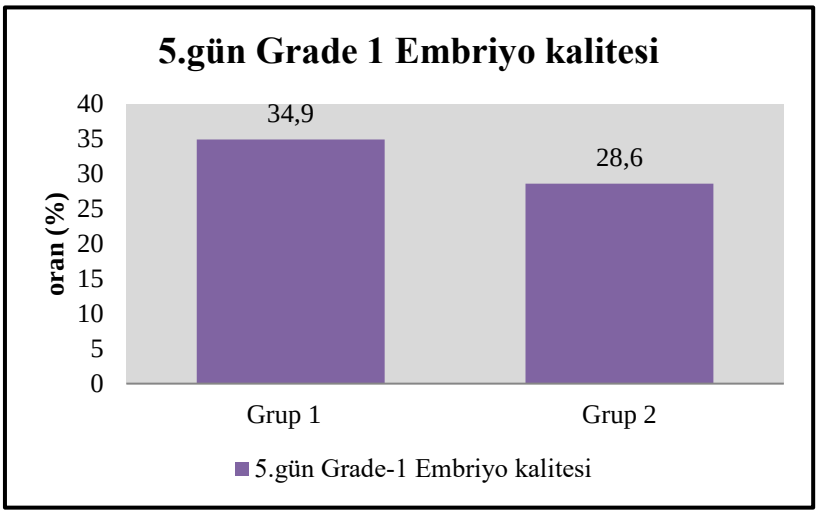
Erken soyulan oositlerde MPN oosit sayısı 14 (n) olduğu, rutinde olduğu gibi soyulanlarda ise 14 (n) olduğu görülmüştür. MPN oranları sırasıyla 1.grubun %2,5 2.grubun ise %2,6 olduğu saptanmıştır.

Erken soyulan oositlerde MultiPN oosit sayısı 2 (n) olduğu, rutinde olduğu gibi soyulanlarda ise 7 (n) olduğu görülmüştür. MultiPN oranları sırasıyla 1.grubun %0,4 2.grubun ise %1,3 olduğu saptanmıştır.

3.1.3. 3. ve 5. Gün Grade 1 Embriyo Kalitelerinin Oranları

3.gün embriyo kalitelerine baktığımızda 1.grupta 309 (n) tane, 2.grupta ise 265 (n) tane Grade 1 embriyo geliştiği görülmüştür. 3.gün embriyo kalite oranları sırasıyla: 1.grup %54,7; 2.grupta ise %48,9 olduğu bulunmuştur.

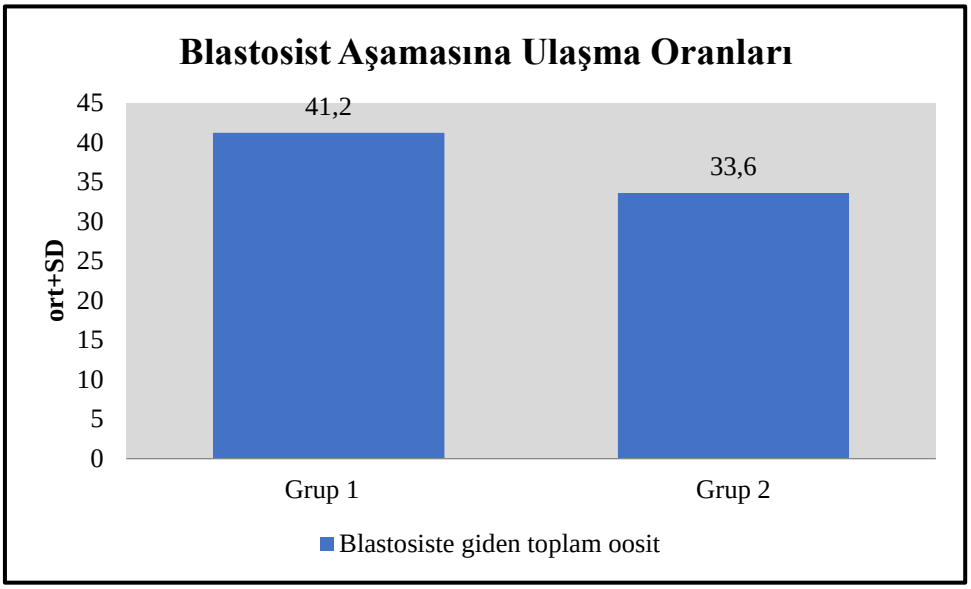
5.gün embriyo kalitelerinde ise 1.grupta 197 (n) tane, 2.grupta ise 155 (n) tane Grade 1 embriyo geliştiği görülmüştür. 5.gün embriyo kalite oranları sırasıyla: 1.grup %34,9; 2.grupta ise %28,6 olduğu saptanmıştır. Erken denüdasyon yapılanlarda 5.gün Grade 1 embriyo oranları daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,02$).



Şekil 3.2. : Grupların 5.gün Grade 1 Embriyo Oranlarının Dağılımı

3.1.4. Blastosist Aşamasına Ulaşma Oranları

Blastosist aşamasına ulaşan oositlerin sayısına baktığımızda erken soyulan oositlerin yer aldığı 1.grupta 233 (n) tanesi, rutinde olduğu gibi soyulan oositlerin yer aldığı 2.grupta ise 182 (n) tane oositin blastosiste ulaştığı görülmüştür. Blastosiste ulaşma oranlarına baktığımızda 1.grup %41,2; 2.grupta ise %33,6 olduğu saptanmıştır. Erken denüdasyon yapılanlarda blastosiste ulaşma oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0,008$)



Şekil 3.3.: Grupların Blastosist Aşamasına Ulaşan Oosit Oranları Dağılımı

3.1.5. Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması

	Grup 1 (n=565)		Grup 2 (n=542)		
	n	***%***	**n**	**%**	***[a]p***
Fertilizasyon (2PN)	342	*60,5*	295	*54,4*	***0,040****
MPN	14	*2,5*	14	*2,6*	***0,911***
Multi PN	2	*0,4*	7	*1,3*	***[b]0,101***
3.gün Grade 1 Embriyo Kalitesi	309	*54,7*	265	*48,9*	***0,054***
5.gün Grade 1 Embriyo Kalitesi	197	*34,9*	155	*28,6*	***0,025****
Blastosist Aşamasına Ulaşan Oositler	233	*41,2*	182	*33,6*	***0,008***

[a]Pearson Ki kare test *[b]Fisher's Exact test* **p<0,05* ***p<0,01*

Tablo 3.1.2.: Araştırma Parametrelerinin Gruplara Göre Karşılaştırılması

Gruplar arasında fertilizasyon (2PN) oranları açısından anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,05); Grup 1 olgularında fertilizasyon oranı anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

MPN oranları ise gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05). Multi PN oranı Grup 2 olgularda daha yüksek oranda saptanmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

3.gün Grade 1 Embriyo kalitesi gruplara göre anlamlı farklılık göstermezken (p>0,05); 5.gün Grade 1 embriyo kalitesi Grup 1 olgularında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek oranda saptanmıştır (p<0,05). Blastosist aşamasına ulaşan osit sayıları da yine Grup 1 olgularda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek oranda saptanmıştır (p<0,05).

3.1.6. Yorumlar

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere baktığımızda erken soyulan oositlerin, rutinde olduğu gibi soyulan oositlerle karşılaştırması yapıldığında, erken soyulan oositlerin fertilizasyon, 5.gün grade 1 embriyo kaliteleri ve blastosist aşamasına ulaşan embriyo oranlarının daha yüksek çıktığı saptanmıştır. Bunun için kumulus hücrelerinin erken soyulmasının fertilizasyon, 5.gün Grade 1 ve blastosiste ulaşma oranlarına etki ettiği söylenebilir. Erken soyulanlarda MPN, MultiPN ve 3.gün grade 1 embriyo kalitelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Kumulus hücrelerinin oositlerin maturasyanonunda etkili olduğu belirtilmiştir. Kumulus hücrelerinin erken soyulmasının yüksek embriyonik gelişme kapasitesine sahip olabileceği, geç soyulmanın ise kaliteli blastosist yüzdesini arttırdığı söylenmiştir (Mizuno vd., 2018). Oositin etrafında bulunan kumulus hücrelerinin arasında yakın bir etkileşim vardır. Biyo-yönlü iletişim hipotezine göre, oositler tarafından salgılanan faktörlerin kumulus hücrelerini aktive ettiğini ve kumulus hücreleri tarafından siklik nükleotidler, glikoz metabolitleri ve amino asitler gibi küçük moleküler besinleri sağlayarak oosit gelişimini ve olgunlaşmasını kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Gilchrist, Lane & Thompson, 2008; Coticchio vd., 2015). Yapılan bir çalışmada opu işleminden 4 saat sonra soyulan oositlerin, önceki soyulma zamanlarıyla karşılaştırıldığında klinik gebelik, canlı doğum ve kümülatif canlı doğum oranlarında artış olduğu belirtilmiştir (Carvalho vd., 2020). Başka bir çalışmada ise inkübasyon süresinin kısa olması embriyo gelişimi ve gebelik sonucu için faydalı olabilir ama 4 saatten fazla inkübasyon yapılmasından kaçınılması gerektiği belirtilmiştir (Wang, Xiao, Sun, Zhen & Yu, 2021). Ekilibrasyon maksadıyla inkübasyon süresi matur oosit sayısını artırmasa bile oositlerin sitoplazmik olgunlaşmasını ve fertilizasyon potansiyelini arttırdığını belirten raporlar mevcuttur (Patrat vd., 2012).

Periferik kumulus hücreleri, oositlerin nükleer veya sitoplazmik olgunlaşmasını desteklemek için bazı parakrin maddeler ve büyüme faktörleri salgılayabilir veya bazı adezyon molekülleri eksprese edebilir (Richani & Gilchrist, 2018; Gilchrist,Ritter & Armstrong, 2004). Örneğin, kümülüs hücreleri tarafından salgılanan ve beyinden türetilen nörotrofik faktörün, oositin çekirdek ve sitoplazmasının gelişimi için önemli olduğu belirtilmiştir (Zhao vd., 2019).

Bizde çalışmamızda erken soyulmanın MultiPN ve MPN oranlarına nasıl bir etki yapabileceği, erken soyulan kumulus hücrelerinin fertilizasyon, blastosiste gidiş ve embriyo kalitelerine nasıl bir etki yapabileceğini araştırdık. Anormal fertilize olmuş embriyolar anöploidi, yavaş gelişme, düşük riski, kromozom anomalileri vb. durumlardan dolayı genellikle transferi yapılması tercih edilmemektedir, anormal fertilizasyon görülen embriyoların implantasyon, gebelik oranları, canlı doğum ve düşük yapma oranlarının 2PN zigotlara oranla daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Chen vd., 2020).

Başka bir çalışmada ise anormal fertilizasyonun çeşitli nedenleri olduğu belirtilmiştir. MultiPN oluşumunun polispermik penetrasyondan veya polar body'nin atılmamasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Rosenbuch, 2010). Bununla birlikte nadir olarak 3PN'den fazla oosit bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada ise IVF ve ICSI takiben MultiPN zigot oluşumuna sahip bir hastada 2PN zigot gibi gelişim göstermiş ve embriyo transferi sonucunda doğum vakası bildirilmiştir (Vander Wasterlekan vd., 2003). MPN zigotların blastosiste ulaşma oranları klasik IVF sonrası ICSI sikluslarında 2PN embriyolarından önemli ölçüde düşük olmasına rağmen, klasik IVF'de MPN zigottan gelişen blastosistin gebelik oluşturabildiği bildirilmiştir, bu çalışmada klasik IVF'deki MPN'den gelişen blastosistlerin transfer edilebileceği ve ÜYTE'ye başvuran hastalar için gebelik şansını artırabileceği belirtilmiştir (Itoi, Asano, Shimizu, Honnma & Murata, 2015).

ICSI sonrası anormal fertilizasyon insidansının,ileri anne yaşı, yüksek gonadotropin dozları, uzun süreli stimülasyon protokolü veya over stimülasyonuyla ilgili olabileceği belirtilmiştir (Grigoryan, Levkov, Sciorio & Hambartsoumian, 2019). Yapılan benzer çalışmalar MPN ve MultiPN zigotların çeşitli nedenlerinin olabileceğini göstermektedir, Biz ise bunlardan farklı olarak, anormal fertilizasyonun erken soyulmayla bir ilişkisinin olup olmadığını araştırdık, bunların yanında erken ve rutinde olduğu gibi soyulan oositlerin grade 1 embriyo kaliteleri, blastosiste ulaşmaları vb. değişkenleri karşılaştırdık.

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 çalışmaya 85 hasta dahil edilmiş olup, hastalardan toplam 1107 oosit elde edilmiştir. Her hastadan alınan oositler rastgele ikiye bölünmüştür. Bunlardan 1.grubu yani çalışma grubunu yumurta toplama işleminden hemen sonra soyulan oositler, 2.grubu ise kontrol grubu veya rutinde olduğu gibi 2 saat sonra soyulan oositler oluşturmaktadır. 1.grupta toplam erken soyulan 565 oosit, 2.grupta ise 542 oosit yer almaktadır. Her hasta için oluşturulan embriyoloji laboratuvarı formlarına oositlerin; fertilizasyonu, MPN, MultiPN, 3.gün ve 5.gün Grade 1 embriyo kaliteleri, blastosiste giden oositler not edildi. Elde edilen 2 grubun verileri istatistiksel yöntemler kullanılarak karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonuçlarına göre fertilizasyon ve 5.gün Grade 1 embriyo kaliteleri ve blastosist aşamasına ulaşan oositler 1.grupta yüksek düzeyde anlamlı çıkmıştır. MPN, MultiPN, 3.gün grade 1 embriyo kaliteleri oranları açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

4.2. Yargı

Erken veya ekilibrasyon sonrası oosit denüdasyonunun zamanlaması MPN, MultiPN gibi anormal fertilizasyonlara bir etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bu çalışma erken denudasyonun anormal fertilizasyonları azaltmaya bir katkısının olup olmadığı konusunda bir fikir vermektedir.Ayrıca erken denudasyonun, fertilizasyon oranı,

blastosist aşamasına ulaşma ve embriyo kalitelerini nasıl etkilediği konusunda da ipuçları vermektedir.

Çalışmamızın sonucunda: erken veya rutinde soyduğumuz oositler karşılaştırıldı, erken soyulan grupta fertilizasyon, 5.gün grade 1 embriyo kaliteleri ve blastosist aşamasına ulaşmada istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlılık saptanmıştır, diğer değişkenlerde anlamlılık saptanmadı. Ancak araştırmaya 85 hasta dahil edildi. Dolayısıyla hasta sayısının arttırılması ve çok merkezli çalışmaların yapılmasına elde edilen sonucun güvenirliği açısından ihtiyaç vardır.

4.3. Öneriler

Bu çalışmada oositlerin OPU işleminden hemen sonra ve rutinde olduğu gibi 2 saat sonra soyulma işlemleri gerçekleştirildi. Oositlerde erken denüdasyon yapılması fertilizasyon, blastosiste ulaşma ve 5.gün grade 1 embriyo gibi önemli değişkenlerin oranlarının arttırıldığı saptanmıştır. Kumulus hücrelerinin soyulma zamanlaması değiştirilerek belki anormal fertilizasyonları en aza indirebileceğimiz çeşitli araştırmalar yapılarak hem gebelik hemde canlı doğum oranlarında nasıl bir fark yapabileceği daha geniş hasta popülasyonuyla veya elektif hasta gruplarıyla çalışmaya ihtiyaç göstermektedir

KAYNAKÇA

Ahlström, A., Westin, C., Reismer, E., Wikland, M., & Hardarson, T. (2011). Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(12), 3289–3296. https://doi.org/10.1093/humrep/der325

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

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

ALPHA Scientists In Reproductive Medicine, & ESHRE Special Interest Group Embryology (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reproductive biomedicine online*, 22(6), 632–646. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.02.001

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(6), 1270–1283. https://doi.org/10.1093/humrep/der037

Atasü, T., Şahmay, S. (2001). *Jinekoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.

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

Bradley, C. K., Traversa, M. V., Hobson, N., Gee, A. J., & McArthur, S. J. (2017). Clinical use of monopronucleated zygotes following blastocyst culture and preimplantation genetic screening, including verification of biparental chromosome inheritance. *Reproductive biomedicine online, 34(*6), 567–574. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.03.013

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

Chen, C., & Kattera, S. (2003). Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(10), 2118–2121. https://doi.org/10.1093/humrep/deg325

Chen, X., Shi, S., Mao, J., Zou, L., & Yu, K. (2020). Developmental Potential of Abnormally Fertilized Oocytes and the Associated Clinical Outcomes. *Frontiers in physiology*, *11*, 528424. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.528424

Coticchio, G., Dal Canto, M., Mignini Renzini, M., Guglielmo, M. C., Brambillasca, F., Turchi, D., Novara, P. V., & Fadini, R. (2015). Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human reproduction update*, *21*(4), 427–454. https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011

Çavuşoğlu, İ. (2015). *İnfertilite tedavileri sonrası gebe kalan kadınların yaşam kalitesi ve depresyon durumlarının incelenmesi.* (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Haliç Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Dai, S. J., Xu, C. L., Wang, J., Sun, Y. P., & Chian, R. C. (2012). Effect of culture medium volume and embryo density on early mouse embryonic development: tracking the development of the individual embryo. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *29*(7), 617–623. https://doi.org/10.1007/s10815-012-9744-8

Erkek Üreme Sistemi Histolojisi. (2021, 7 Nisan). Erişim Adresi http://istanbultip.istanbul.edu.tr/ogrenci/wpcontent/uploads

Feenan, K., & Herbert, M. (2006). Can 'abnormally' fertilized zygotes give rise to viable embryos? *Human fertility (Cambridge, England)*, 9(3), 157–169. https://doi.org/10.1080/14647270600636269

Gardner DK & Simon C. (2017). *Handbook of in Vitro Fertilization*. 4th ed. p.169-179.

Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., & Schoolcraft, W. B. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and sterility*, 73(6), 1155–1158. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)00518-5

Gardner, D.K. and Schoolcraft, W.B. (1999) In Vitro Culture of Human Blastocyst. In: Jansen, R. and Mortimer, D., Eds., Towards Reproductive Certainty*: Infertility and Genetics Beyond, Parthenon Press, Carnforth*, 377-388.

Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update, 14*(2), 159–177. https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040

Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., & Armstrong, D. T. (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal reproduction science, 82-83,* 431–446. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.017

Grigoryan, H., Levkov, L., Sciorio, R., & Hambartsoumian, E. (2019). Unexplained total abnormal fertilization of donor oocytes in ICSI with using spermatozoa from different patients. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology, 35*(sup1), 60–62. https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1632086

ICSI.(2020,25Aralık).Erişimadresi https://www.florence.com.tr/mikroenjeksiyon-icsi-intra-citoplasmic-sperm-injection.html

Itoi, F., Asano, Y., Shimizu, M., Honnma, H., & Murata, Y. (2015). Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes. *Journal of assisted reproduction and genetics, 32*(9), 1401–1407. https://doi.org/10.1007/s10815-015-0518-y

Jackson R.B., Urry L.A., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Cain M.L. and Reece J.B., (2013). *Campbell biyoloji 9. baskı,* (İ. Türkan, E. Gündüz, Çev.), Palme Yayıncılık.

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

Karpat, C , Erensoy, H . (2020). Tüp Bebek Tedavisi Gören İnfertil bireylerde stres ve stresle başa çıkma yaklaşımları Üzerine Pilot Bir Çalışma . *Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care , 14* (3) , 461-467 . DOI: 10.21763/tjfmpc.737420

Kaufman M.H. (1983). Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies. UK:Cambridge University Press.

Küpker, W., Diedrich, K., & Edwards, R. G. (1998). Principles of mammalian fertilization. *Human reproduction (Oxford, England), 13* Suppl 1, 20–32. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.20

Laufer, N., Tarlatzis, B. C., DeCherney, A. H., Masters, J. T., Haseltine, F. P., MacLusky, N., & Naftolin, F. (1984). Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, *42*(3), 366–372. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48074-x

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

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

Nachtigall R. D. (2016). International disparities in Access to infertility services. *Fertility and sterility, 85*(4), 871-875. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert. 2005.08.066

Nagy, Z. P., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1993). Intracytoplasmic single sperm injection of 1-day-old unfertilized human oocytes. *Human reproduction (Oxford, England), 8(*12), 2180–2184. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138000

Nasr-Esfahani, M. H., Razavi, S., & Tavalaee, M. (2008). Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. *Fertility and sterility*, *89*(4), 892–898. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.04.012

National Public Health Action Plan for the Detection, Prevention, and Management of Infertility. www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility/pdf/drh_nap_final_508 .pdf. Accessed June 12, 2017.

Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P. (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human reproduction update, 14*(6), 605–621. https://doi.org/10.1093/humupd/dmn042

Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P. (2008). Developing Countries and Infertility. *Spec Issue Human Reprod* 2008b;1–117.

Özcan, H, Yücetürk, S. (2020). *İnfertilite ve uyku* . Sağlık Akademisyenleri Dergisi , 7 (4) , 290-295.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet (London, England), 340*(8810), 17–18. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-f

Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., & Tomasi, G. (2012). The zygote. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27 Suppl 1, i22–i49. https://doi.org/10.1093/humrep/des205

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*, 403531. https://doi.org/10.1155/2012/403531

Richani, D., & Gilchrist, R. B. (2018). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human reproduction update*, *24*(1), 1–14. https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029

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

Rosenbusch B. E. (2010). A preliminary concept, deduced from cytogenetic analyses, for explaining different types of multipronuclear oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, *94*(6), 2479–2481. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.075

Seymenler, S, Siyez, D. (2018). *İnfertilite Psikolojik Danışmanlığı* . Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar, 10 (2) , 186-197. DOI: 10.18863/pgy.358095

Spermatogenez. (2020, 21 Aralık). Erişim Adresi http://www.kaanaydos.com.tr/seminifer-tubuller-sertoli-hucreleri-testislerin-gelismesi-ve-spermatogenez.html

Staessen, C., & Van Steirteghem, A. C. (1997). The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)*, *12*(2), 321–327. https://doi.org/10.1093/humrep/12.2.321

Staessen, C., Janssenswillen, C., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1993). Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)*, *8*(2), 221–223. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138026

Sultan, K. M., Munné, S., Palermo, G. D., Alikani, M., & Cohen, J. (1995). Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)*, *10*(1), 132–136. https://doi.org/10.1093/humrep/10.1.132

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

Van der Westerlaken, L., Helmerhorst, F., Verburg, H., & Naaktgeboren, N. (2003). Successful intracytoplasmic sperm injection after failed in vitro fertilization due to multipronuclear oocytes. *Fertility and sterility*, *80*(3), 639–640. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00752-0

Wang, W., Cai, J., Liu, L., Xu, Y., Liu, Z., Chen, J., Jiang, X., Sun, X., & Ren, J. (2020). Does the transfer of a poor quality embryo with a good quality embryo benefit poor prognosis patients?. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, *18*(1), 97. https://doi.org/10.1186/s12958-020-00656-2

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

WHO 2011, "Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010", (20.12.2020), http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/

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

Xue, Y., Tong, X., Jiang, L., Zhu, H., Yang, L., & Zhang, S. (2014). Effect of vitrification versus slow freezing of human day 3 embryos on β-hCG levels. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *31*(8), 1037–1043. https://doi.org/10.1007/s10815-014-0259-3

Yan, J., Li, Y., Shi, Y., Feng, H. L., Gao, S., & Chen, Z. J. (2010). Assessment of sex chromosomes of human embryos arising from monopronucleus zygotes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles of Chinese women. *Gynecologic and obstetric investigation*, *69*(1), 20–23. https://doi.org/10.1159/000245942

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K et al. (2009) The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology. *Fertil Steril*, 92:1520-1524.

Zhang, X. D., Liu, J. X., Liu, W. W., Gao, Y., Han, W., Xiong, S., Wu, L. H., & Huang, G. N. (2013). Time of insemination culture and outcomes of in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, *19*(6), 685–695. https://doi.org/10.1093/humupd/dmt036

Zhao, X., Du, F., Liu, X., Ruan, Q., Wu, Z., Lei, C., Deng, Y., Luo, C., Jiang, J., Shi, D., & Lu, F. (2019). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is expressed in buffalo (Bubalus bubalis) ovarian follicles and promotes oocyte maturation and early embryonicdevelopment.*Theriogenology*,*130*,79–88. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.020