

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



ERKEN PRONUKLEUS OLUŞUMUNUN EMBRİYO
GELİŞİMİ VE BLASTOKİST ORANINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMAL EMRE GÜVEN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL, 2024

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ERKEN PRONUKLEUS OLUŞUMUNUN EMBRİYO
GELİŞİMİ VE BLASTOKİST ORANINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMAL EMRE GÜVEN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. TÜLAY İREZ

İSTANBUL, 2024

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ ONAY BELGESİ

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı **20111102010** numaralı öğrencisi Kemal Emre GÜVEN'in "ERKEN PRONUKLEUS OLUŞUMUNUN EMBRİYO GELİŞİMİ VE BLASTOKİST ORANINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması, Enstitümüz Yönetim Kurulunun 28.05.2024 tarih ve 2024/11 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından oy birliğiyle Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14.06.2024

Prof. Dr. Tülay İREZ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Emre SALABAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Elif ŞAHİN

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tezde;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

14/ 06 / 2024

Kemal Emre GÜVEN

ÖNSÖZ

Tezimin hem araştırması hem yazımında bana büyük destek sağlayan sayın danışmanım Prof. Dr. Tülay İREZ'e teşekkür ederim. Çalışmamı yaptığım kurum olan Özel Mecidiyeköy Çevre Hastanesi Tüp Bebek ekibine, başta Emb. Merve Öğüç, Op. Dr. Fatih Öğüç ve MsC. Derya Atıcı'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.



Kemal Emre GÜVEN

İSTANBUL, 2024

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vix
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Gametogenez.....	4
2.1.1. Oogenez süreci.....	4
2.1.2. Spermatogenez süreci.....	5
2.2. Folikülogenez	6
2.2.1. Primordiyal folikül gelişimi.....	6
2.2.2. Primer folikül gelişimi.....	7
2.2.3. Antral folikül gelişimi.....	7
2.2.4. Graff folikülü	7
2.3. Ovulasyon Süreci	8
2.2.5. Folikülogenez sürecinin hormonal kontrol mekanizması	9
2.2.5.1. Folikül Uyarıcı Hormon(FSH) ve Lüteinleştirici Hormon(LH)	9
2.2.5.2. Foliküler atrezi süreci	10
2.3. İN VİTRO FERTİLİZASYON (IVF).....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Çalışma için kullanılan malzemeler	16

3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler	16
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	17
3.1.3. Kullanılan cihazlar	17
3.2. İndüksiyon Protokolü	18
3.3. OPU (Oocyte pick up)- Oosit Toplama İşlemi	18
3.4. Hiyaz- Denudasyon işlemi	19
3.5. İntrasitoplazmatik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)	20
3.6. Fertilizasyon Değerlendirmesi	21
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	29
6. KAYNAKLAR.....	31

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Morfokinetik değişkenler ve beklenen olayların önerilen tanımları...	14
Tablo 3.1: Tez çalışması için tek seferlik kullanıma uygun sarf malzemelerin üretici firmaları ve katalog numaraları	16
Tablo 3. 2: Tez çalışması için kullanılan kimyasalların üretici firmaları ve katalog numaraları	17
Tablo 4.1: Nicel değişkenlerin normal dağılım analiz.....	23
Tablo 4.2: Demografik bilgilere ilişkin ortalamalar ve endikasyon gruplarının karşılaştırılması.....	24
Tablo 4.3: Araştırma gruplarında dölleme oranı ve karşılaştırılması.....	26
Tablo 4.4: Demografik bilgilere ilişkin ortalamalar ve erken PN görülme gruplarının karşılaştırılması.....	26
Tablo 4.5: Erken PN görülme durumunda bölünme oranı,3. Gün blastomer sayısı ve karşılaştırma.....	26
Tablo 4.6: Tüm olgularda Erken PN görülme durumunda blastokist oranı ve karşılaştırma.....	27
Tablo 4.7: Erken PN varlığına göre tüm gruplarda anova sonuçları.....	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Spermatogenezin şematik görüntüsü.....	5
Şekil 2.2: Folikülogenezin şematik görüntüsü. (Hsueh vd., 2023)'den değiştirilerek alındı	6
Şekil 2.3: Primordiyal folikülünden primer foliküle geçiş(Zhang vd., 2023).....	7
Şekil 1.4: Foliküler gelişim ve ovulasyon süreci (Zhang vd., 2023).....	8
Şekil 2.5: Folikülogenezin hormonal kontrolünün şematik görüntüsü (Zhang vd., 2023).....	9
Şekil 2.6: Hipotalamo-Hipofizyal-Gonadal aksın şeması. Hipotalamus, Hipofiz, Testis ve Overler (Saleh vd., 2023)'den alındı.....	10
Şekil 2.7: Foliküler atrezi süreci(Orisaka vd., 2021)'den değiştirilerek alındı.....	11
Şekil 2.8: Kasık IVF ve ICSI işleminin şematik görüntüsü.....	12
Şekil 2.9: Farklı insan oositlerindeki morfolojik anomaliler(Bartolacci vd., 2022).....	13
Şekil 3.1: OPU işleminde toplanan oositler.....	19
Şekil 3.2: OPU dişlerinin görseli.....	19
Şekil 3.3: Denudasyon işlemi için hazırlanan Hiyaz dişi.....	20
Şekil 3.4: Oosit matürasyonunu gösteren fotoğraflar (GV, M1, MII).....	20
Şekil 2.5: ICSI işleminin görsel fotoğrafı.....	21
Şekil 3.6: Pronukleusların görüntüsü. Döllenen oosit görüntüsü.....	22
Şekil 4.1: Araştırma gruplarında fertilizasyon oranı.....	25

KISALTMALAR LİSTESİ

BMP8B: Kemik Morfogenetik Prolteini 8B

DEK: Dinamik Embriyo Kùltürü

FSH: Folikùl Stimule edici Hormon

GV: Germinal Vezikùl

GnRH: Gonadotropin Stimule edici Hormon

HCG: Human Coryonik Gonadotropin

HSA: Human Serum Albumin

ICSI: İntrasitoplazmatik Sperm Enjeksiyonu

İVF: İn Vitro Fertilizasyon

İCM: İnnner Cell Mass

KOK: Kùmlùs Ooforus Kompleksi

LH: Luteinleřtici Hormon

M2: Metafaz 2

PVA: Perivitellin Aralık

OHSS: Ovariyan Hiperstimulyasyon Sendromu

PKO: Polikistik Over

PKOS: Polikistik Over Sendromu

PVP: Polivinilpirrolidon

OPU: Oocyte Pick Up

SER: Düz Yüzlü Endoplazmatik Retikulum

TE: Trofoektoderm

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ZP: Zona Pellusida



ÖZET

ERKEN PRONUKLEUS OLUŞUMUNUN EMBRİYO GELİŞİMİ VE BLASTOKİST ORANINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İn vitro fertilizasyon uygulamaları sonrasında yüksek implantasyon başarısı, gelişimsel yeterliliği en yüksek embriyoların transferi ile sağlanmaktadır. Bu kapsamda embriyo seçimi ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde ilerlemektedir. Sürekli embriyo izleme sistemleri embriyo dinamiğini yansıtmakta ve aşamaları arasında blastokist gelişimi ve IVF/ICSI sonuçlarını tahmin edecek kriterler oluşturulmak istenmektedir. Bu kapsamda biz de pronukleus oluşum zamanlamasını ele almak istedik. Bu çalışma, Özel Çevre Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'nde üç farklı endikasyona sahip 75 hastanın MII oositlerinin pronukleus zamanlama sonuçları temel alınarak prospektif olarak geliştirilmiştir. Kontrol grubunun yanı sıra yüksek ve düşük yanıtlı hastaların sonuçları değerlendirilerek 9-15 saat veya 16-22 saatte blastokist oluşum kapasiteleri değerlendirildi. Video kaynaklarından gözlemler yapıldı. İstatistiksel analiz SPSS 26 programı ve Kruskal Wallis, Fisher's Exact ve Mann-Whitney testleri kullanılarak değerlendirildi.

Çalışmamızda 9-15. saatlerde 2PN oluşumunun araştırma grubunun tamamında sperm konsantrasyonu, kadın yaşı, FSH, LH, PRL, AMH, HCG gün E2 değeri ve blastokist varlığı ile ilişkili olmadığı anlaşılmıştır. Kontrol vakaları ve yumurtalık rezervi yüksek, yumurtalık rezervi düşük olan hastalar değerlendirmeye alındı. Alındığında kadın yaşının ($<0,001$), sperm konsantrasyonunun ($p=0,049$), FSH, LH, PRL, AMH ve hCG gününün E2 ve Blastocyst oluşumuyla ilişkili olduğu anlaşıldı ($p<0,001$). Sonuçlarımız hasta endikasyonunun embriyo gelişimi ile ilişkili olduğunu gösterdi. Bu çalışmanın çok sayıda kontrollü randomize çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Erken PN gelişimi, IVF/ICSI, Time lapse, Blastokist oranı

Kemal Emre GÜVEN, 2024

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EARLY PRONUCLEUS FORMATION ON EMBRYO DEVELOPMENT AND BLASTOCYST RATIO

After in vitro fertilization applications, high implantation success is achieved by transferring embryos with the highest developmental competence. In this context, studies on embryo selection are progressing intensively. Continuous embryo monitoring systems reflect embryo dynamics, and it is desirable to establish criteria that will predict blastocyst development and IVF/ICSI results between stages. In this context, we wanted to address the timing of pronucleus formation. This study was developed prospectively based on the pronucleus timing results of MII oocytes of 75 patients with three different indications at Private Çevre Hospital IVF center. In addition to the control group, the results of high and low-response patients were evaluated, and blastocyst formation capacities were evaluated at 9-15 hours or 16-22 hours. Observations were made from video sources. Statistical analysis was evaluated using the SPSS 26 program and Kruskal Wallis, Fisher's Exact, and Mann-Whitney tests.

In our study, it was understood that the formation of 2PN at 9-15 hours was not related to sperm concentration, female age, FSH, LH, PRL, AMH, HCG day E2 value, and the presence of blastocyst in the entire research group. Control cases and patients with high ovarian reserve and low ovarian reserve oocytes were taken into consideration. When taken, it was understood that female age (<0.001), sperm concentration ($p=0.049$), FSH, LH, PRL, AMH, and hCG day were associated with E2 and Blastocyst formation ($p<0.001$). Our results showed that patient indication was associated with embryo development. This study should be supported by numerous controlled randomized studies.

Keywords: Early PN formation, IVF/ICSI, Time lapse monitoring, Blastocyst rate

Kemal Emre GÜVEN, 2024

1. GİRİŞ

İnfertilite dünyada 180 milyon insanı etkileyen önemli sosyal, klinik ve küresel bir sorundur ve bu olguları üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık olarak % 8 ile %14'ünü kapsamaktadır (Kumar, 2015). Bu olguların neredeyse %30-40'ı erkek faktör, %40-50 kadın faktör, geri kalanı ise açıklanamayan infertilite olarak tanımlanır. Tek kadın faktörü olan olgulara bakıldığında toplam olguların %40'ı ovulasyon ile ilgili fonksiyon bozuklukları, %40'ı tubal ve pelvik faktörler, geri kalanı ise açıklanamayan infertilite olgularıdır.

Yardımcı Üreme Tekniklerinin (YÜT) hızlı gelişimi ile günümüzde infertilite sorunu yaşayan çiftlerin çocuk sahibi olma şansları daha da artmıştır. Dünyada bu teknik yardımı ile ilk defa gebelik 1979 'da İngilterede elde edilmiştir. İlk zamanlarda tubal faktöre sahip hastalarda klasik İn Vitro Fertilizasyon (IVF) uygulanarak aynı kap içine yumurta ve sperm hücreleri koyularak laboratuvarında döllenmeleri sağlanırdı. Ancak bir süre sonra (1993'te) sperm sayısı az olan vakalarda seçilen spermlerin özel yöntemle oosite enjekte edilmesi (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu-ICSI) yaygın olarak kullanılmaya başlandı (Zev Rosenwaks, M.D., Nigel Pereira, 2017). IVF ve ICSI teknikleri ile günümüzde erken infertilitesi, endometriozis, ovaryan fonksiyon bozuklukları ve açıklanamayan infertilite gibi sorunlar yaşayan çiftler için çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ile bu teknikler kullanılarak elde edilen gebeliklerde transfer sonrası ne prenatal ne de postnatal dönemde, normal gebeliğe kıyasla artan belirgin bir konjenital anomaliye de rastlanmamıştır. YÜT en temel amaç bu yöntemler kullanılarak en başarılı bir şekilde gebelik ve canlı doğumlar elde edebilmektir. Ve bundan dolayı tek embriyo transfer ederek de çoğul gebeliği önlemek amaçlanmıştır. Tek embriyo transferi ile gebelik ve canlı doğum alabilmek için de implantasyon oranı en yüksek olan embriyoyu geliştirmek ve seçmekten ötürü birtakım parametrelere sahip teknikler ve cihazlar geliştirilmiştir. Dünyanın birçok yerinde hali hazırda da IVF ve ICSI işleminden sonra embriyoların gelişimi konvansiyonel inkübatörler kullanılarak klasik morfolojik değerlendirmeler yapılmaktadır. %6CO₂ ve %5O₂ içeren konvansiyonel inkübatörlerde embriyolar

geliştirilerek dölleme kontrolü, bölünme kontrolü gibi statik veriler ile takipleri sağlanmaktadır. Ancak bu kontroller ne kadar da hızlı olarak kısa zaman diliminde yapılsa da embriyo dış ortama çıktığı için gelişimlerine negatif etki gösterilmektedir. Artık son yıllarda dünya genelinde birçok klinikte Dinamik Embriyo Kültür (DEK) sistemi ile belirli zaman aralıklarında embriyolar kültürlendiği ortamlardan çıkarılmadan takip edilmektedirler. Konvansiyonel kültür sistemlerinden farklı olarak daha avantajlıdır, çünkü kısa süreliğine olsa bile embriyolar dış ortamın negatif etkisine maruz kalmayarak morfolojik olarak belirli zaman dilimlerinde değerlendirilebiliyor. DEK’te mikroskop, inkübatör ve gelişim verilerini kayıt eden cihazın hepsi bir arada toplanmıştır. Bu sistem kullanılarak embriyoların tüm gelişimsel süreçleri kaydedilmektedir. Embriyoların bu şekilde morfokinetik olarak değerlendirilmesi implantasyon oranı daha yüksek olan embriyoyu seçmekte yardımcı olmaktadır. DEK sistemi ile dölleme kontrolü yapıldığında da oositlerin kaçınıcı saatte döllendiğini belirleyebiliriz.

İnsan embriyosu, oositin bir sperm tarafından döllemesiyle başlamakta, bunu takiben ikinci kutup cismi atılmaktadır. Bu süreç kortikal granül salınımı ile zona pellusida’nın sertleşmesini sağlamaktadır. Erkek ve dişi pronukleuslar’ın ortaya çıkması ve göç edişi süreci iletir, sonra da pronukleus füzyonu gerçekleşir. (Scheffler K. Vd.,2021).

Wright ve arkadaşları ilk kez pronukleus ve nukleolar prekürsör cisimler ile ilgili bilgileri vermiştir(Wright G.,vd., 1990).Pronukleus skorlama işlemleri pek çok araştırmacı tarafından embriyo gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Scott L. A.vd.,1998). Skorlamalar sonucunda iyi embriyo gelişimi ve artan blastokist oranları ve implantasyon oranları bulunduğu, hatta genetiği normal embriyo ile ilişkisi ileri sürülmüştür (Rienzi L.vd.,2002, Gianoroli L. Vd., 2007). Ancak bazı araştırmacılar bu konuda çelişkili yayınlar yapmışlardır (Roos Kulmann M. I.vd., 2022).

Teorik olarak, pronukleus değerlendirilmesi oosit ve spermin iç kromozomal bütünlüğünü yansıtabilir, ancak morfokinetik veriler bize daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini göstermektedir. Bu çalışmada sürekli embriyo izleme

sistemleri ile gözlemlenen embriyolarda pronukleusların ortaya çıkış zamanının blastokist oluşumundaki etkisini incelemeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gametogenez

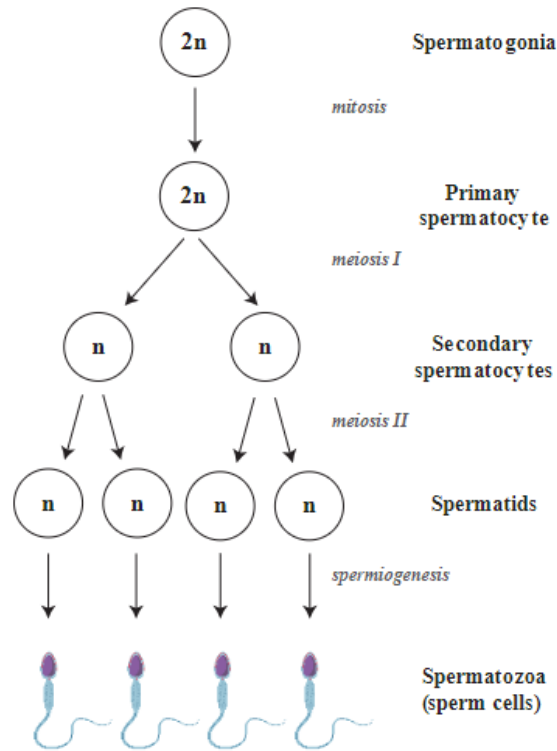
Mayoz bölünme ile haploid gametlerin oluşumunu kapsayan süreç Gametogenez olarak bilinir. Bu bölünme sonucunda, nükleusta eşleşmiş olan kromozomlar birbirinden ayrılır. Diploid bir hücredeki kromozom sayısının yarısına sahip olan haploid gamet hücreleri oluşur. Oositin oluşmasını kapsayan sürece oogeneze, spermin oluşumunu kapsayan sürece ise spermatogenez denir(Larose vd., 2020).

2.1.1. Oogeneze süreci

Oogeneze süreci Primordial Germ Hücrelerinden (PGC) oogoniumların gelişimi ile başlar ve bunlar fetal overlerde mayoz bölünmenin ilk aşamasına girip, primer oosite dönüşürler. (Gedikli vd., 2013; Virant-Klun, 2015). Oosit hücrelerinin olgunlaşma süreci pubertede de devam eder ve doğuma az bir süre kalana kadar primer oositlerin hepsi mayoz bölünmenin profaz 1 de beklerler. Bu oositler mayoz bölünmenin metafaz evresine geçmek yerine, diploten dönemi duraksarlar. Bu durum puberteye kadar bu şekilde devam eder. Primer oositlerin sayısı doğuma yakın 600, 800 bin aralığında olduğu bilinmektedir. Lakin puberteye kadar bunların çoğu atreziye uğrar, puberte döneminin başında 40 bine kadar oosit hücresi kalır. Her bir dişi birey doğurganlık dönemi boyunca 500 civarı oositi ovule eder ve dışarı atar. Metafaz evresi ovulasyondan önce sekonder oositi oluşturmak için başlar, sonuç olarak 23 kromozumlu 1. Sekonder oosit ve 1. Polar cisimcik oluşur ve sekonder oosit artık mayoz bölünmenin 2. aşamasına geçer. Fertilizasyon sonucunda polar cisim kaybolur. Bu süreçte DNA replikasyona uğramadığı için 23 kromozoma sahip olan 1.si ovum, diğeri 2. Polar cisim olan 2 hücre oluşur(Larose vd., 2020; Özgür Öktem, 2011; Virant-Klun, 2015).

2.1.2. Spermatogenez süreci

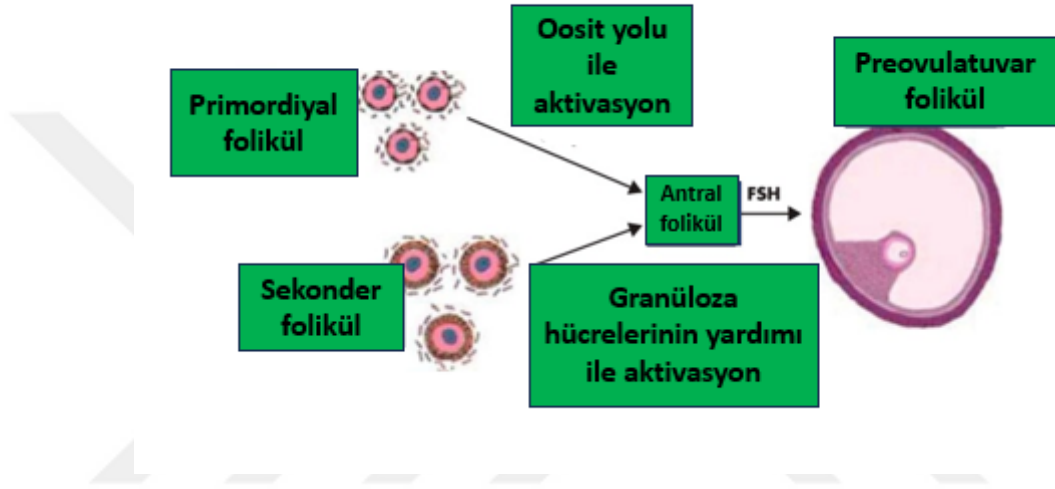
Spermatogenez süreci Primordiyal Germ Hücrelerinden (PGC) sperm hücresinin üretimini kapsayan süreç olarak adlandırılır. Bu süreç endokrin, parakrin mekanizmalar, mayoz bölünme, spermiyogenez, mitotik hücre bölünmesi gibi karmaşık süreçlere sahiptir. Endokrin mekanizmalarla uyarılma Folikül Stimülen Hormon, Lüteinleştirici Hormon ve testiste Leyding hücreleri tarafından sentezlenen testosteron hormonu işle yapılmaktadır. PGC'leri erkek embriyonun genital kabartılarına vararak dahil olur ve burada olgun olana kadar kalırlar. Seks kordonları da bu sürede seminifer tübülleri oluşturmak üzere oyuklanır, tübüllerin epiteli ise Sertoli hücrelerine faklılaşır. Spermatogonialar (spermatojenik germ hücreleri) spermatogenez düzenlemek için Kemik Morfogenetik Prtoteini 8B (BMP8B) faktörünü salgırlar ve BMP8B konsantrasyonu belli düzeyde olduğunda germ hücreleri faklılaşmaya başlar. Faklılaşan hücreler kendileri de BMP8B salgırlar, buda faklılaşmayı daha da indükler(Gedikli vd., 2013; Tenorio vd., 2016).



Şekil 2.1: Spermatogenezin şematik görüntüsü

2.2. Folikülogenez

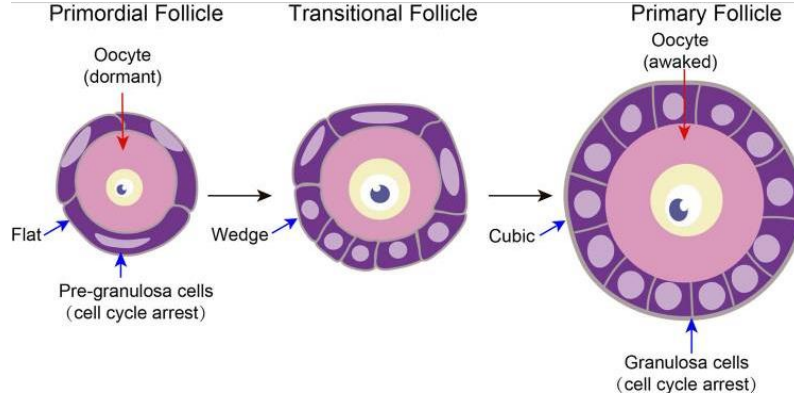
Folikülogenez süreci over foliküllerinin morfolojisini değiştirerek Primordiyal folikül, primer folikül , preantral ve antral folikül evresinden geçerek preovülatör foliküle dönüşmesini, bununla birlikte ovulasyon ve foliküler atrezinin de olduğu bir sürecini kapsamaktadır (Fan vd., 2019)(Gör & Kuyucu, 2009).



Şekil 2.2: Folikülogenezin şematik görüntüsü. (Hsueh vd., 2023)'den değiştirilerek alındı.

2.2.1. Primordiyal folikül gelişimi

Prenatal dönemin 16. Haftasında foliküllerin gelişimi başlar. Bu durum en geç postnatal dönemin 6. Ayına kadar devam eder ölçü olarak primordiyal foliküller en küçük çaplı foliküllerdir ve sayı olarak en çok olan foliküldür. Morfolojik yapı olarak folikülün merkezinde oosit olur ve oosit etraftan tek katlı yassı epitel hücreleri ile sarılmış şekilde olur(Growth, 2010)(Öktem ve Urman, 2011).



Şekil 2.3: Primordiyal folikülden primer foliküle geçiş(Zhang vd., 2023).

2.2.2. Primer folikül gelişimi

Büyümekte olan oositin etrafındaki yassı folikül hücreleri giderek kübikleşme eğilimi gösterir ve sonradan bu kübik hücrelerin sayısı da artar, sonuç olarak çok katlı bir şekil alır. Bu kübikleşen hücreler granuloza hücreleri, folikül ise primer folikül ismini alır. Bu folikülün etrafında olan granuloza hücreleri tarafından salgılanan glikoprotein yapıdaki zona pellusida belirgin olarak gözükmeye başlar. Zona tabakası oositin granuloza hücresi arasında yerleşir. Burada olan foliküler hücrelerdeki küçük molekülleri oosite transfer etmekte görevli olan parmak benzeri çıkıntılar zona pellusidayı delerek oositin membran tabakasında bulunan mikrovilluslarla temasa geçer(M.Ross, 2016).

2.2.3. Antral folikül gelişimi

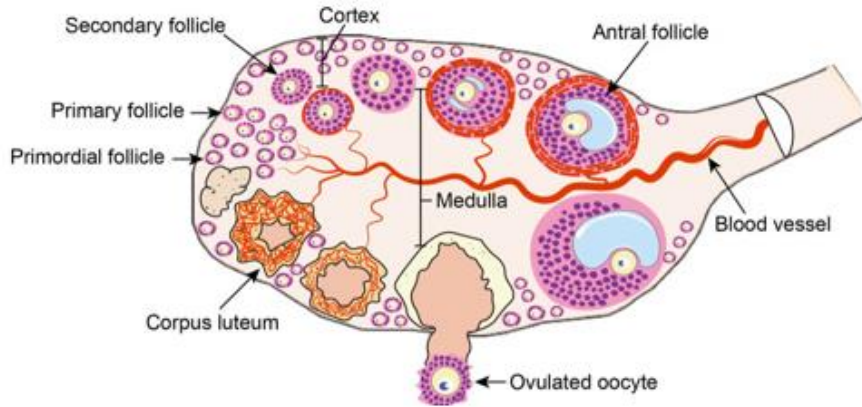
Gelişimini devam ettiren foliküllerde granuloza hücrelerinin arasında içerisi hiyalüronik asitten zengin olan sıvı dolu boşluklar gelişmeye başlar. Bu içerisi sıvı dolu boşluklar büyüyerek bir-birleriyle birleşir ve antral boşluğu oluştururlar, oluşan folikülde Antral folikül ismini alır. İçerisi sıvıyla dolan antral boşluklarda steroidlerle birçok büyüme faktörleri birikmektedir. Bu folikül büyüdüğü zaman onu etraftan saran Granuloza hücreleri kendisi yapısını değiştirmez ve kümülüs ooforus kompleksini oluşturur. Kümülüs ooforus kompleksinin belli bir kısmı da zona pellusida çevresinde kalarak korona radiatayı oluşturur(Sadler, 2013).

2.2.4. Graff folikülü

Puberte zamanı dişi gonad için folikül havuzu oluşur. Her menstrual siklus olduğunda bu havuzdan 15-20 adet folikül maturasyon yolculuğuna katılır. Buradaki Primordiyal foliküllerden bazıları dejenere olur, bazılarının içinde Antral sıvı birikir ve antrum boşluğu oluşur. Bu sıvının birikmesi ile de foliküller (Sadler, 2013).

2.3. Ovulasyon Süreci

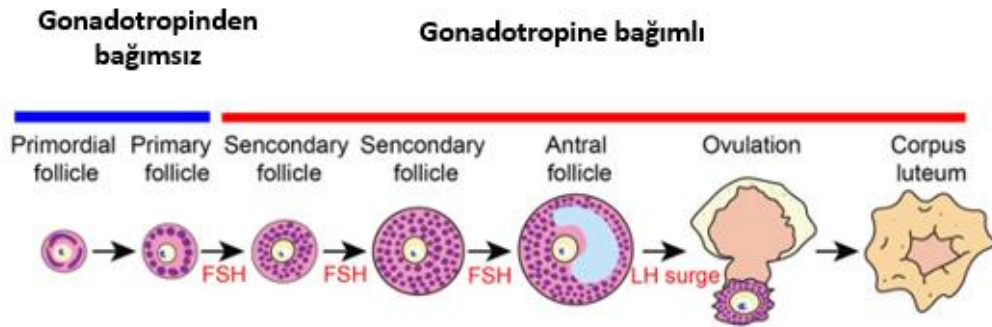
Gonadotropinlerin salgılanması zamanı salgılanmadaki ani olan artış ovulasyon sürecini indükler, LH pik seviyeye ulaştıktan 12-24 saat sonra oosit atılır. Her menstrüal siklusun 14. Gününde LH etkisiyle graff folikülündeki Antral sıvı artar ve ovaryumun üzerinde bir çıkıntı gibi belirir. Bu zaman overin yüzeyi gerilir, kollagenaz enziminin de etkisiyle folikülün duvarı rüptüre olur, Kümülüs-Oosit-kompleksi (KOK) periton boşluğuna doğru atılır ve fimbriyalar tarafından tutularak tuba uterinaya alınan oosit hücresi uterusu doğru gönderilir (Richards, 2018)(Strauss ve Williams, 2013).



Şekil 2.4: Foliküler gelişim ve ovulasyon süreci (Zhang vd., 2023)

2.2.5. Folikülogenez sürecinin hormonal kontrol mekanizması

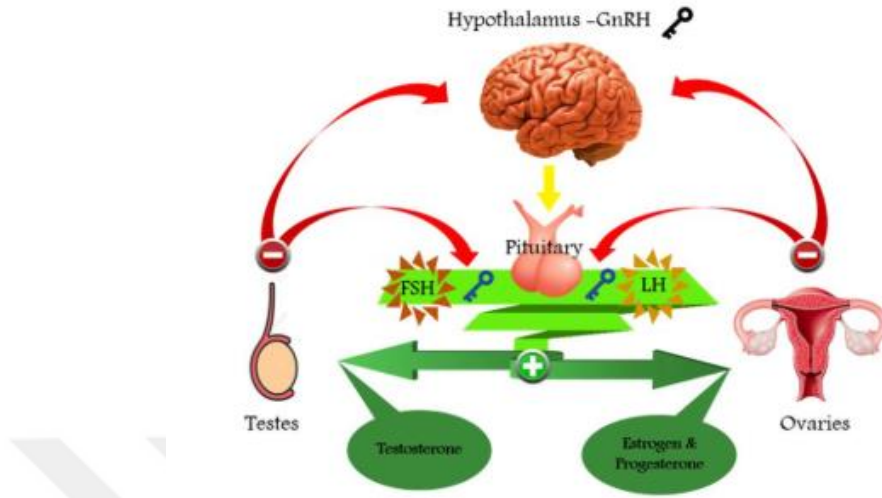
Hipofizden salgılanan Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) puberte başladığı gibi FSH ve LH salınımını indükler. Bu hormonlar da gametogeneze (oogenez ve spermatogenez) önemli rol sahiptir. Üreme organlarını işlevi, gelişimi, cinsel davranış ve b. sağlar. LH ovarumlarda folikülogenezi tetikler, östrojen salgılanmasını uyarır, ovulasyonu indükler ve korpus luteum oluşumuna katkı sağlar. FSH ise olgun folikül olan graff folikülünün gelişimi ve sayısını arttırmaya olanak sağlar(Özgür Öktem, 2011).



Şekil 2.5: Folikülogenezin hormonal kontrolünün şematik görüntüsü (Zhang vd., 2023).

2.2.5.1. Folikül Uyarıcı Hormon(FSH) ve Lüteinleştirici Hormon(LH)

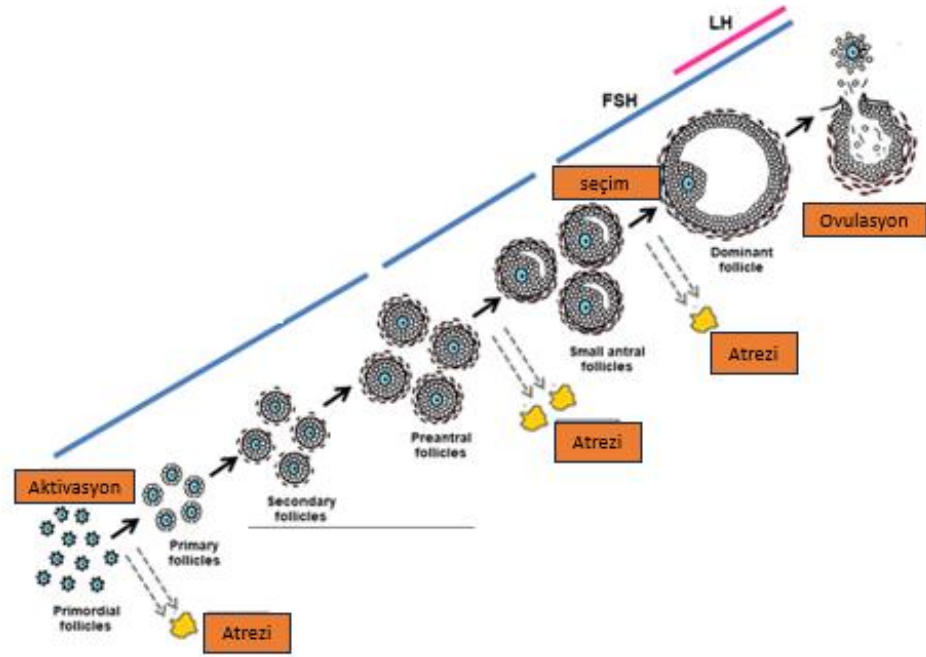
FSH glikoprotein yapıya sahip 2 peptit alt birimden oluşur. LH da glikoprotein yapıya sahip bir hormondur ve bu iki hormon da üreme fonksiyonlarında da çok önemli bir rol sahiptir. FSH ve LH, ikisi de Hipofiz bezi tarafından salınan hormonlardır. Bu hormonlar ön hipofiz bezi, hipotalamus, üreme organları ve oositlerdeki karmaşık bir etkileşimle folikül gelişimi ve ovulasyonda önemli rol oynarlar. Bu Gonadotropinlerin üretimlerinin veya etkisinin azalması, LH ve FSH eksikliğine neden olur. Sonuç olarak gametogenezi ve steroid üretimi azalır, buda dolayısıyla doğurganlığı etkilemiş olur(Growth, 2010; Hsueh vd., 2023; Öktem ve Urman, 2011) .



Şekil 2.6: Hipotalamo-Hipofizyal-Gonadal aksın şeması. Hipotalamus, Hipofiz, Testis ve Overler (Saleh vd., 2023)’den alındı.

2.2.5.2. Foliküler atrezi süreci

Folikülün primordiyalden olgun oosite dönüşmesi 90 günlük bir süreçtir. Menstrüal siklusun olduğu her ay birkaç primordiyal folikül gelişim sağlar ve bunlardan sadece biri olgunluğa ulaşır. Böylelikle in vivo olarak matürasyon sağlanmış olur. Yerde kalan diğer foliküller ise atreziye uğrayarak dejenere olur. Ancak bazen birden fazla folikülün matürasyonunu tamamlaması veya hiç oosit atılmaması gibi durumlarda görülmektedir. Foliküller bazen gelişim aşamasında da atreziye uğrayabilirler. Folikülün atreziye uğraması onun apoptoz sürecidir. Bu süreçte oosit otoliz olur, Granüloza hücreleri ayrılır, zona pelusida parçalanır(Mescher L, 2018).



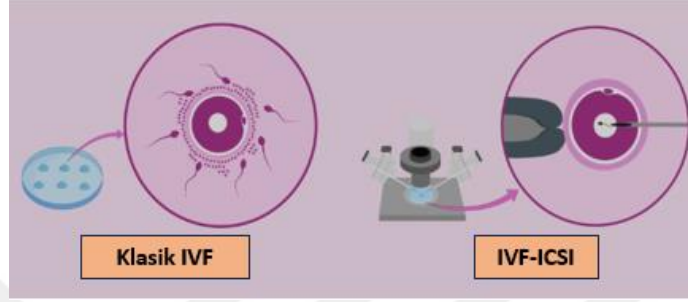
Şekil 2.7: Foliküler atrezi süreci(Orisaka vd., 2021)'den değiştirilerek alındı.

2.3. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

Sperm ve oositin vücut dışında döllenmesi işlemine İn Vitro Fertilizasyon işlemi denir ve bu işlem üreme sorunlarında alternatif bir yol olarak kullanılır. Anne adayından toplanan oositler belli işlemlerden geçirildikten sonra laboratuvar ortamında sperm hücresi ile döllenir ve belli bir süreç geçirdikten sonra anne adayına transfer edilerek gebelik oluşturması beklenilir. Bu işlemin yapılabilmesi için bir takım endikasyonlar- kadın ve erkek infertilitesi faktörleri, açıklanamayan infertilite vardır. Kadın infertilitesi faktörlerine şiddetli endometriyozis, düşük over rezervi, tubal faktörler ve tubal faktörler, şiddetli endometriyozis, ovulatuvar disfonksiyon, düşük over rezervi ve başkalarına ayrılır. Erkek infertilitesi faktörlerine ise spermlerin sayısı, sperm morfolojisi, motilitesi gibi faktörler dahildir. IVF işlemi implantasyondan önce genetik testler yapılmasına olanak sağlayan bir işlemdir. Yardımcı Üreme Teknolojisinde sperm hücresinin oosite intrastoplazmik olarak (ICSI) enjekte edilmesi ile önemli ölçüde ilerleme kaydetmiştir. Artık Tüp bebek tedavisi infertil çiftler için iyi bir tedavi seçeneği olmaya başlamıştır (Ümit Çabuş, Nazlı Çil, 2021).

2.3.1. İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu(ICSI)

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda cam mikropipet yardımı ile oosit sitoplazmasına tek bir sperm hücresinin enjekte edilmesini içeren, yardımla üremede yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir(Meij ve Wermer, 2019).



Şekil 2.8: Klasik IVF ve ICSI işleminin şematik görüntüsü.

2.4. Oosit Morfolojisi

Olgun bir oosit morfolojik olarak yuvarlak şekilli (zona tabakası olmadan 10-120 μm), homojen, parlak, açık renkli ve düzgün bir oolemmaya sahip olur. Glikoprotein yapıda olan zona pellusida tabakası 14-15 μm , tam bir zona pellusida tabakasına sahip, oosit ile temas halinde olan iç katmanı daha homojen yapıya sahiptir. Zona pellusidasının(ZP) kalınlığı oositin tüm etrafında aynı kalınlıktadır. Zona pellusida tabakası ile perivitellin aralık (PVA) dahil oositin ölçüsü ovule olmadan önce 140-150 μm 'ye kadar varmaktadır. Zona ile oosit arasındaki perivitellin aralık normal morfolojiye sahip oosit hücrelerinde döküntü içermeyen, düzgün yapıda, sadece 1. Polar body içeren kısmı hafif genişlemiş şekilde olur. Ancak diğer kısımları zona ile aynı uzaklıkta olan bir yapıya sahiptir. Bir oosit hücresinin döllenebilmesi ve normal embriyo gelişmesi için onun nukelus ve sitoplazmasının da olgun olması çok önemlidir (Krisher, 2004). Çünkü olgun sioplazması olmayan bir oosit hücresi döllandikten sonra normal gelişim göstermiyecektir (Shabankareh vd., 2015). Oositlerin sitoplazmasında olan granüller yapılarına göre- büyük, küçük, dağılımına göre- homojen dağılmış veya kümelenmiş şekilde, yerleşim yerine göre ise- merkezi konumlu veya oositin çevresinde,

perivitellin aralık mesafesine göre, sitoplazmik organellerin olmasına göre (Endoplazim Retikulum (ER), vakuol) göre birkaç sınıflandırmaya sahiptir.

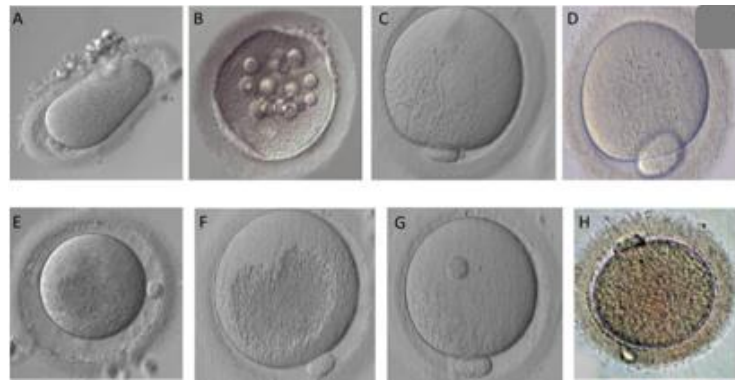
Oosit anomalileri ise ekstrasitoplazmik ve intrasitoplazmik olmakla iki yere ayrılır.

Ekstrasitoplazmik anomalilere PVA'nın geniş ölçüde olması, koyu renkli zona pellusida ve b. dahildir.

İntrasitoplazmik anomalilere ise- yoğun granüler sitoplazma, otofajik vakuoller, lipit damlacıkları, lipofuksin granülleri, sitoplazmatik atıklar ve b. dahildir(Otsuki, 2009; Otsuki vd., 2007).

2.4.1. Matür oosit

Ovulasyondan zamanı LH piki yaşanır ve bu da cAMP seviyelerinin düşmesine, dolayısıyla germinal vezikül(GV) membranının yırtılmasına sebep olur ve duraklamış olan mayoz bölünme süreci devam etmeye başlar. Primer foliküller bu zaman bölünmesini tamamlar, farklı büyüklüklere sahip 46 kromozomlu 2 hücreye bölünür. Oluşan hücrelerden biri sekonder oosit olup tüm sitoplazmayı alır, ikincisi ise sitoplazmadan mahrum olan I. Polar body'e (PB) dönüşür. Bu polar body PVA'da konumlanır. Artık sekonder oosit oluşmuş olur ve oosit II mayoz(MII) bölünmeye girer, mayozun II metafazı başlar. Matür oosit sperm hücresi ile birleşip döllenikten sonra II mayoz bölünmesini de tamamlamış olur(Ramos vd., 2018).



Şekil 2.9: Farklı insan oositlerindeki morfolojik anomaliler(Bartolacci vd., 2022).

A-anormal zona pellusida, sitoplazma, B-Vakuolizasyon, C-Düz yüzölü ER (SER), D-Büyük polar body, E- Geniş PVA, F- Sitoplazmik granülasyon, G- Refraktif body, H-Dejenere oosit.

2.5. Sürekli embriyo izleme sistemleri (Time Lapse) değerlendirilmesi

Time-lapse görüntüleme (TLI), embriyoları inkübatörden çıkararak kültür koşullarını bozmadan embriyo gelişiminin sürekli izlenmesine olanak tanımaktadır. TLI kullanılarak embriyo morfokinetiğinin incelenmesi, embriyo seçimi için embriyo morfolojisini ve gelişimsel olayların zamanlamasını sürekli canlı görüntü takibi yoluyla belgeleyebilen ve değerlendirebilen bazı yeni belirteçlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Hızlandırılmış görüntüleme, in vitro fertilizasyon sonuçlarının öngörücü modellerini oluşturmak için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Embriyonun in vitro gelişimi sırasındaki morfokinetiği, blastosist aşamasına ulaşma yeteneği, implantasyon ve gebelik oranlarını, canlı doğum sonucunu ve embriyo ploidisini tahmin edebilen farklı olayları gösteren parametreler kullanılarak bu sistemin geliştirilmesi düşünülmektedir.

Tablo 2.1: Morfokinetik değişkenler ve beklenen olayların önerilen tanımları(Carla Giménez,ve ark 2023)

Morfokinetik değişken	Tanım
t0	İn vitro fertilizasyon zamanı veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun orta zamanı
tPB2	2. kutup cismi tamamen ayrılmış
tPNa	Bireysel pronükleusların görünümü; tPN1a, tPN2a, tPN3a,
tPNf	Pronükleus solması zaman çerçevesi; tPN1f; tPN2f...
tZ	PN puanlama süresi (tPNf'den önceki son zaman dilimi)
tn	Bir embriyonun n sayıda blastomere ulaştığı ilk zaman dilimi (örn. t2, t3 ve t4)
tSC	Sıkıştırmanın ilk kanıtı
tM	Sıkıştırma işleminin tamamlanma zamanı (bazı blastomerlerin hariç tutulması durumunda gerçek zaman dilimini değerlendirmek zor olabilir)
tSB	Patlamanın başlatılması (blastocoel'in görülebildiği ilk kare)

tB	Tam blastosist (zona incelmeye başlamadan önceki son çerçeve)
tE veya tEB	Genişlemenin başlatılması: zona incelmesinin ilk çerçevesi (ayrıca TEyB olarak da adlandırılır “y” iç hücre kütlelerinin morfolojisine karşılık gelir; “z” trofektoderm hücrelerinin morfolojisine karşılık gelir)
tHN	Herniasyonu: genişleme aşamasının sonu ve kuluçka sürecinin başlatılması (tHNyz olarak da bilinir)
tHD veya tHB	Tamamen yumurtadan çıkmış blastosist (tHDyz olarak da bilinir)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma İçin Kullanılan Malzemeler

3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler

Tablo 3.1: Tez çalışması için tek seferlik kullanıma uygun sarf malzemelerin üretici firmaları ve katalog numaraları.

Çalışma için kullanılan sarf malzemeler	Kullanılan malzemenin markası	Kullanılan malzemenin katalog numarası	Malzemeyi üreten firma
OPU dişi	FALCON	353803	CORNING
35mm'lik diş	Thermo scientific	150255	Thermo Fisher Scientific
60mm'lik diş	Thermo scientific	150270	Thermo Fisher Scientific
Centerwell	FALCON	353037	Life Sciences
Cam Pastör Pipet	MARIENFELD	3233049	MARIENFELD
Plastik Pastör Pipet	FALCON	357575	Life Sciences
1ml serolojik pipet	FALCON	356521	Life Sciences
5ml serolojik pipet	FALCON	356543	Life Sciences
15ml'lik mavi konik tüp	FALCON	352095	Life Sciences
25cm ² kültür flaskı	FALCON	353014	Life Sciences
Holding pipeti	Vitrolife	15305	Vitrolife
ICSI pipeti	Vitrolife	15415	<u>Vitrolife</u>
Embriyoskop kültür kabı	Vitrolife	FT-S-ES-D	Vitrolife

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Tablo 3.2: Tez çalışması için kullanılan kimyasalların üretici firmaları ve katalog numaraları

Kullanılan kimyasalın ismi	Kullanılan kimyasalın katalog numarası	Kimyasalı üreten firma
Sperm Washing medium	9983	Irvine Scientific
Modified HTF medium	150255	Thermo Fisher Scientific
Single Step medium	150270	Thermo Fisher Scientific
Human Serum Albumin	353037	Life Sciences
Hiyaluronidase solüsyonu	10176	Vitrolife
PVP solüsyonu	10111	Vitrolife
Ovoil	10029	Vitrolife
Spermgrad	10099	Vitrolife
G-MOPS PLUS	10130	Vitrolife
G-IVF PLUS	10136	Vitrolife
G-TL	10145	Vitrolife

3.1.3. Kullanılan cihazlar

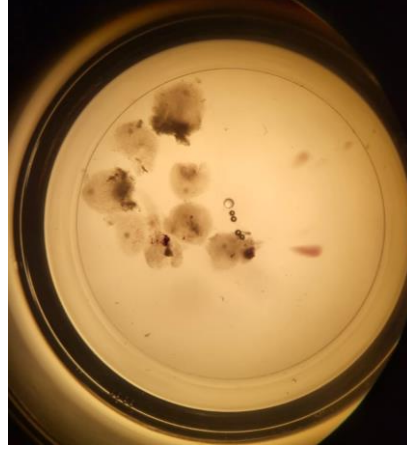
1. Laminar flow (Sınıf 2): IVF Workstation L126 DUAL
2. İnkübatör: SANYO
3. İnkübatör: ESCO Miri
4. Etüv: THERMO electron corporation
5. Buzdolabı: Arçelik
6. Işık mikroskopu: Olympus SZX7
7. Embryoscope: Vitrolife

3.2. İndüksiyon Protokolü

IVF’te kullanılan ovulasyon induksiyon protokollerinin esas amacı aynı anda birden fazla olgun ve iyi kaliteye sahip oosit hücresi elde ederek toplamaktır. İndüksiyon yapıldığında birçok dominant folikül seçilir ve matür oositler çok olduğunda da tekrarlayan başarısız denemelerin önüne geçilir. Transfer işlemi bittikten sonra da hastanın geriye kalan embriyoları dondurulur ve hastaya tekrar gebe kalma şansı kazandırılır.

3.3. OPU (Oocyte Pick Up)- Oosit Toplama İşlemi

Ovaryen stimülasyona tabi tutulan hastaların folikülleri 18-20 mm ölçüye ulaştığında çatlatma iğnesi (HCG- Human Caryonik Gonadotropin) yapılır ve iğneyi yaptıktan sonra 36. Saatde yumurta toplama işlemi gerçekleştirilir. Trasvajinel ultrason eşliğinde foliküller görüntülenerek toplanır. Bunun için de Ultrasonun probunu overlere doğru istikametlendirerek OPU iğnesi yardımı ile folikül sıvıları aspire edilir. Ultrason probunu vajen duvarından yumurtalığa doğru ilerleterek bir iğne yardımıyla her bir folikül içerisindeki sıvı aspire edildi. Aspire edilen folikül sıvısı küçük tüplere toplanarak embriyoloji laboratuvarına getirilir ve stereo mikroskop eşliğinde yumurtalar KOK’la birlikte alınarak bir gün önceden etüvde ısıtılmış HEPES tamponlu medium olan G-MOPS’a aktarılır. Folikül sıvısında temizlenen oositler bir gün önceden hazırlanarak gazlanması (O_2 5.0, CO_2 6.8, 37°C) için inkübatöre koyulan G- IVF PLUS’ta(gamet mediumu) 2 saata kadar dinlendirilir.



Şekil 3.1: OPU işleminde toplanan oositler



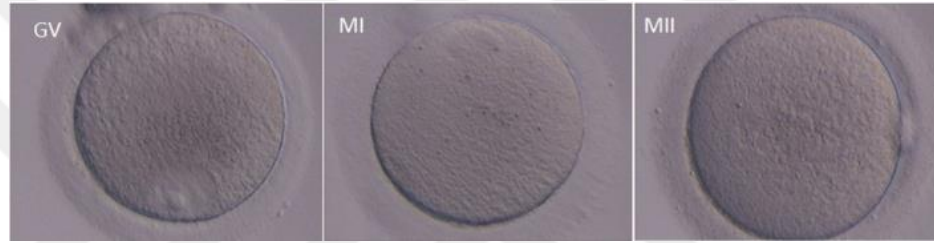
Şekil 3.2: OPU petrileri'nin görseli

3.4. Hiyaz- Denudasyon İşlemi

Oosit hücresinin matür olup olmadığını değerlendirebilmek için KOK'nin mekanik ve enzimatik olarak temizlenmesi gerekir. Etüvde 1-2 saat ısınan hiyaz ve hepesli tampon dropları olan kültür dişlerinde ilk olarak enzim etkisiyle kümülüs hücreleri oositten ayıklanır. İnce ayıklamaya geçerek ince cam pipet yardımı ile etrafında Granüloza hücreleri kalmış oosit bu hücrelerden mekanik olarak temizlenir. KOK'lardan temizlenmiş oositin matürasyonu değerlendirilebilir.



Şekil 3.3: Denudasyon işlemi için hazırlanan Hiyaz petrisi.



Şekil 3.4: Oosit matürasyonunu gösteren fotoğraflar (GV, M1, MII).

3.5. İntrasitoplazmatik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

OPU işlemi bittikten sonra hastanın eşinden alınan sperm örneği Oosit toplama işlemi sonrasında erkekten masturbasyonla alınan ejakülasyon örneği Gradient+ swim up yöntemi kullanılarak hazırlandı. ICSI işlemi için 1-2 ssat önceden hazırlanan ICSI dişi hazırlandı. ICSI dişinde sperm havuzu ve oosit için dropla yapıldı. Bu dropların arasına spermin hareketini yavaşlatmak ve akrozom reaksiyonunu aktifleştirmek için kullanılan polivinilpirolidon (PVP) çizgisi yapılarak üzeri yağ ile kapatıldı.

ICSI işlemini yapmak için spermier sperm havuzuna, oositler ise oositler için hazırlanan droplara koyuldu. Mikronejeksiyon için inverted mikroskop ayarlandı ve işleme başlandı. Morfolojik olarak iyi olan sperm hücreleri sperm havuzundan seçilerek PVP içerisine alındı ve ICSI pipetinin yardımı ile kuyruğu kırılarak hareketsizleştirildi. ICSI yapıldıktan sonra oositler gazlanması için bir gün önceden

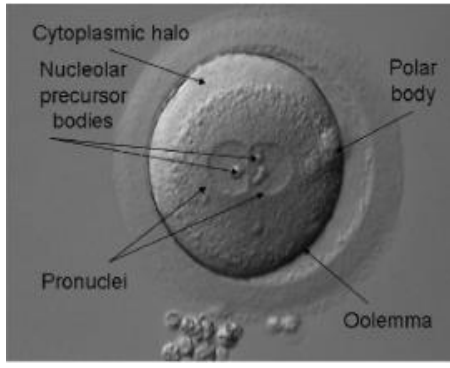
hazırlanarak inkübatörlerde tutulan kültür mediumu droplarına aktarıldı ve yine inkübatörde, O₂ 5.0, CO₂ 6.8, 37°C' de inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.5: ICSI işleminin görsel fotoğrafı.

3.6. Fertilizasyon Değerlendirmesi

Döllenme olduktan 16-22 saat sonra oluşan pronukleuslar (PN) oositler ve gelişecek embriyonun kalitesi ile ilgili bilgi verir ve hem erkek, hemde kadının kromozom kompozisyon durumunu yansıtabilmektedir. Dişi ve erkek PN'ler döllenmiş oositin yüzey kısmına yakın yerleşir ve sonradan orta konuma doğru hareket ederler. Biz çalışmamızda erken PN'leri gözlemlemek için ICSI'den 14-15saat sonra erken PN kontrolü yaptık ve 16-22. Saatlerde 2 pronukleus oluşumu gösteren embriyolar ile kıyasladık.



Şekil 3.6: Pronukleusların görüntüsü. Döllenen oosit görüntüsü.

Çalışmamızda fertilizasyon sonrası 9-15.ve 16-22 Saate kadar 2PN oluşturan zigotlarda (tZ-skoru aşaması) incelenmiştir.

4. BULGULAR

Tablo 4.1: Nicel değişkenlerin normal dağılım analizi.

	Shapiro-Wilk	p
Kadın yaşı	0,917	0,001
FSH	0,888	0,001
LH	0,886	0,001
PRL	0,872	0,001
AMH	0,838	0,001
E2 (HCG günü)	0,806	0,001
Blastomer sayısı	0,818	0,001
Sperm sayısı	0,712	0,001

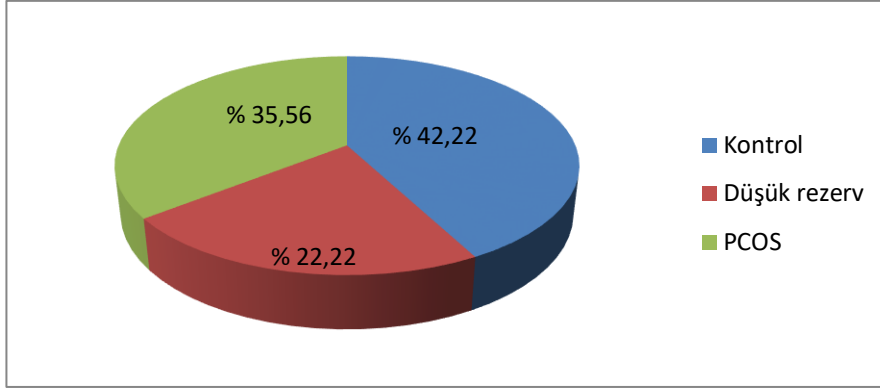
Nicel değişkenlerin normal dağılım kontrolü analizi Shapiro-Wilk Analizi ile yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Bu nedenle grup karşılaştırmaları non-parametrik yöntemlerle yapılacaktır.

Tablo 4.2: Demografik bilgilere ilişkin ortalamalar ve endikasyon gruplarının karşılaştırılması.

		Kadın yaşı	FSH	LH	PRL	AMH	E2 (HCG günü)	Blastomer sayısı	Sperm sayısı
Kontrol (n=27)	Ortalama	27,74	9,45 ^{PC}	8,41 ^{DR, PC}	15,98 ^{PC}	1,65 ^{DR}	2973,00 ^{DR}	5,65	31,78
	std. sapma	4,19	1,63	2,78	3,88	0,44	842,81	1,69	24,55
	Minimum	20	5,38	4	10,24	1,05	978	4	15
	Maximum	35	11	10,58	23,44	3,59	3698	9	75
Düşük Rezerv (n=16)	Ortalama	33	9,04 ^{PC}	4,36 ^{K, PC}	12,54 ^{PC}	0,87 ^{K, PC}	213,97	7,33 ^K	41,69 ^K
	Std. sapma	2,28	1,43	1,09	3,63	0,16	179,01	1,8	24,77
	Minimum	29	7,01	3,28	8,29	0,59	38,68	4	17
	Maximum	35	11,13	6,15	16,85	1,2	450	9	90
PCOS (n=32)	Ortalama	31,03	6,59	13,41 ^{K, DR}	7,31	4,61 ^{K, DR}	3283,84 ^{K, DR}	6,81 ^K	58,25 ^K
	Std. sapma	3,91	0,74	1,66	0,86	0,79	949,7	1,91	55,46
	Minimum	23	5,23	10,41	5,23	2,89	1023	2	15
	Maximum	36	7,89	15,87	8,29	5,89	4010	9	150
K-W		4,75	33,49	60,3	55,14	63,68	40,29	6,35	6,09
p		0,061	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,042	0,048

K-W: Kruskal-Wallis Test (K: Kontrol DR: Düşük Rezerv PC: PCOS)

Araştırma grupları Kruskal-Wallis Test ile karşılaştırılmıştır. Gruplarda yaş ortalamaları istatistiksel olarak farklı değildir. Bazal Hormon değerlerinin gruplarda farklı olduğu görülmüştür. FSH, PCOS grubunda diğer iki gruba göre daha düşüktür (p=0,001). LH ve AMH üç grupta da istatistiksel olarak farklıdır (p=0,001); LH ve AMH ortalaması PCOS grubunda daha yüksektir (p=0,001). PRL ortalaması PCOS, E2 ise düşük rezerv grubunda daha düşüktür (p=0,001). 3. gün Blastomer sayısı ve sperm sayısı kontrol grubunda diğer gruplara göre daha azdır



Şekil 4.1: Araştırma gruplarında fertilizasyon oranı.

Şekil 1’de, 45 fertilize olmuş oositin infertilite gruplarında dağılımı görülmektedir. Fertilize olmuş oositlerin %42,22’si kontrol, %35,56’si PCOS grubundadır.

Tablo 4.3: Araştırma gruplarında döllenme oranı ve karşılaştırılması.

		Kontrol (n=27)	Düşük Rezerv (n=16)	PCOS (n=32)	Ki Kare	p
2PN (+)	n	19	10	16	2,58	0,275
	%	70,40%	62,50%	50,00%		
2PN (-)	n	8	6	16		
	%	29,60%	37,50%	50,00%		
Erken PN (+)	n	1	4	7	1,1	0,576
	%	57,90%	40,00%	43,80%		
Erken PN (-)	n	8	6	9		
	%	42,10%	60,00%	56,30%		

Kontrol grubundaki 27 oositin %70,4’ü, düşük rezerv grubundaki 16 oositin %62,5’i fertilize olmuştur; gruplar arasında fertilizasyon oranları bakımından istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4.4: Demografik bilgilere ilişkin ortalamalar ve erken PN görülme gruplarının karşılaştırılması.

		Kadın yaşı	FSH	LH	PRL	AMH	E2 (HCG günü)	Sperm sayısı
Erken PN görülen (n=22)	Ortalama	29,86	8,63	9,27	12,59	2,53	2732,36	48,32
	Std. sapma	4,82	1,98	3,82	4,47	1,67	1379,14	46,68
	Minimum	20	5,98	3,28	5,23	0,82	38,68	15
	Maximum	36	11,13	15,27	23,44	5,32	4010	150
Erken PN görülmeyen (n=23)	Ortalama	29,78	8,19	9,46	11,32	2,64	2253,11	28,57
	Std. sapma	4,2	1,84	4,39	4,5	1,85	1503,74	21,42
	Minimum	20	5,23	3,28	6,61	0,59	38,68	15
	Maximum	36	11,13	14,55	23,44	5,89	3871	90
z*		0,27	0,51	0,34	0,92	0,26	1,06	0,96
p		0,784	0,609	0,733	0,357	0,794	0,291	0,337

*: Mann-Whitney Test

Erken PN oluşumunun hormonlar üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır.

Tablo 4.5: Erken PN görülme durumunda bölünme oranı, 3. Gün blastomer sayısı ve karşılaştırma.

		Erken PN		p**
		Görülen (n=22)	Görülmeyen (n=23)	
Blastomer	n	19	23	0,108
	%	86,40%	100,00%	
Arrest	n	3		
	%	13,60%		
Blastomer sayısı				
Ortalama±S.Sapma		6,58±1,92	6,35±1,89	z=0,32 ; p=0,749 *

** : Fisher's Exact Test

* : Mann-Whitney Test

Erken PN oluşumu saptanan 22 oositin %86,4'ünde bölünme ve blastomer gelişimi saptanmıştır. Gruplar arasında blastomer oluşma oranları ($p=0,108$) ve blastomer sayısı ($p=0,749$) bakımından istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4.6: Tüm olgularda Erken PN görülme durumunda blastokist oranı ve karşılaştırma.

		Erken PN		p**
		Görülen (n=19)	Görülen (n=23)	
Blastokist	n	8	9	0,546
	%	42,10%	39,10%	
Arrest	n	11	14	
	%	57,90%	60,90%	

** : Fisher's Exact Test

Gruplar arasında blastokist oluşma oranları bakımından istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ($p=0,546$). Anova sonuçları ise erken PN varlığının tüm gruplar sözkonusu olduğunda istatistiki anlamlılık taşımaktadır ($p<0,01$).

Tablo 4.7: Erken PN varlığına göre tüm gruplarda anova sonuçları

		Sum of Square s	Df	Mean Square	F	Sig.
HCGE2	Between Groups	98718	1	98718	0,046	0,83
Blast varlığı	Between Groups	2,569	1	2,569	17,729	<,001
	Within Groups	10,578	73	0,145		
	Total	13,147	74			

Elde ettiğimiz sonuçlara göre 2PN oluşumunun gruplarda farklı bulunduğu, erken PN gelişiminin sperm konsantrasyonu, kadın yaşı,FSH ,LH,PRL,AMH,HCG günü E2 değeri ile ve blastokist varlığı ile ilişkisi bulunmadığı anlaşılmıştır.Kontrol,yüksek over rezervi ve düşük over rezervi bulunan hastalar dikkate alındığında ,kadın yaşı ($<0,001$),sperm konsantrasyonu ($p=0,049$),FSH,LH,PRL,AMH,hCG günü E2 ve Blast oluşumunun gruplarda istatistiki olarak anlamlı olduğu ($p<0,001$) anlaşılmıştır.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde yeni dönemde dinamik ve morfokinetik embriyo seçimi yer almaktadır. Morfokinetik değerlendirme gün geçtikçe yaygınlaşmakta ve Morfokinetiği ve embriyo gelişiminin morfolojisini birleştiren YÜT merkezlerinde TLM uygulamasının sonucu olarak yapay zeka işlemlerine başlanması olası görülmektedir. Pronükleer oluşum, eşleşmenin ortaya çıkışı, erken bölünme olayları, hücre döngüsü aralıkları, hücre bölünmesinin eşzamanlılığı ve blastulasyonun başlatılması gibi belirli olayların kesin zamanlaması, bir embriyonun gelişim potansiyelinin göstergeleridir (Gimenez C.vd., 2023). Bütün bu kriterlerin izlenmesi bir embriyonun ilerleyişini öngörme açısından önem taşımakta sürekli olarak izleme yeteneği, embriyo transferi için en iyi embriyonun seçilmesine kesinlikle yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Erken dönem zigot gelişimi ile ilişkin olarak, embriyo yeterliliğini test eden çalışmalar ,ilk polar body atılımı, erkek ve dişi pronukleus senkronitesi, hızlı PN oluşumu ve erken pronukleus silinmesinin 3. Gün embriyo kalitesi ile ilişkisini gösterdi (Payne vd., 1997)(Lemmen vd., 2008).Üçüncü gün embriyo kalitesinin öngörülmesinde ayrıca ,fertilizasyon sonrası gelişen sitoplazmik halo,pronukleusların solması,ilk bölünme ve erkek PN görünümü ve solmasındaki zamanlama ileri sürülmüştür (Coticchio vd., 2023). Bu belirteçleri 5. gündeki embriyo kalitesi ve klinik sonucun belirleyicileri olarak değerlendiren daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır, ancak TLT, embriyoların bu tür kriterlere göre değerlendirilmesine olanak tanıyan mevcut tek teknolojidir. Polar vücut emisyonunun süresi (tPB2) ve PN morfolojisi canlı doğumu öngörmese de, tPNf canlı doğumla ilişkilendirildi, yani canlı doğumla sonuçlanan zigotların tPNfsi canlı doğum olmayan grubun tPNfsinden önemli ölçüde daha uzundu (Azzarello ve ark., 2012). Ayrıca, sitoplazma içindeki düzensiz PN hareketinin ve nükleer zarfların gecikmiş solmasının, embriyo gelişim potansiyelinin tehlikeye girdiğinin göstergesi olduğu rapor edilmiştir (Athayde Wirka vd., 2014). Bizim çalışmamızda, yukarıda belirtilen bulgulara ek olarak ve farklı bir bakış açısı sunulmuştur. Çalışmamızda PN lerin aynı düzlemde ve Z skoru aşamasında (tZ) değerlendirdik,bunu 9-15 saatlik zaman diliminde gelişim gösterenlerin blastokist

gelişimi ile ilişkili olduğunu gösterdik. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda bu bulgu gösterilmedi. Çalışmamızda 2PN oluşumu ve erken PN oluşumunun kontrol grubunda, diğer iki gruba oranla daha yüksek oranda olduğunu bulduk (%70.4, %62 zayıf yanıtılı, ve %50 Pkos ile %57.9, %40 zayıf yanıtılı ve %43 pkos). Oosit sayısının düşük olması bu sonuçların istatistiksel anlamlılık sınırına gelemediğini, bu kapsamda çalışmanın daha fazla oosit sayısı ile tekrarlanmasının önemi bulunduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamız bu açıdan sürekli embriyo izleme sistemlerinde embriyo değerlendirmesine önemli bir katkı yapacaktır. Ancak olgu sayısı açısından çalışmamız zayıf görülmektedir. Değerlendirmeleri bu nedenle çok sayıda olgu ile doğrulamak gerekmektedir. Çalışmamız sonuçları kadın endikasyonlarının embriyo gelişim parametrelerini değiştirdiğini gösterdi. Bazal hormon düzeylerinin embriyo morfolojik değerlendirmelerinde mutlaka göz önünde bulundurulmasının önemi ortaya çıkmıştır.

Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalar hangi parametrelerin öngörücü olduğu konusunda kesin bilgi sağlamamaktadır. Hamilelik veya gelişim için öngörücü olarak tanımlanan parametrelerin birçoğu, görüntü alımı arasında kısa aralıklar olan hızlandırılmış sistemler kullanılarak insan çalışmalarında değerlendirilmiştir ve bunların kayıtlar arasında daha uzun zaman aralıkları olan klinik sistemlere uygulanabilirliği şüphelidir. Bununla birlikte, yüksek gelişim potansiyeline sahip insan embriyolarının, erken hücre bölünmeleri için tek tip bir optimal zaman aralığı modeli sergilediği görülmektedir. Erken gelişimsel olayların zamanlamasına göre blastosiste dönüşme olasılığı en yüksek olan embriyonun tanımlanması, yüksek gelişim potansiyeline sahip embriyoların erken transfer için seçilmesine olanak tanıyarak uzun süreli in vitro kültürden kaçınılmasını sağlayabilir (Wong vd., 2010). Meseguer ve arkadaşları en yüksek gebelik potansiyeline sahip embriyoları belirlemek için yakın zamanda, statik değerlendirmeyi dinamik parametrelerin değerlendirilmesiyle birleştiren hiyerarşik bir tahmin modeli önerdiler (Meseguer vd., 2011). Ancak, bu yöntemin de başarıyı artırma konusundaki önemi halen tartışılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. Hum Reprod. 2012;27(9):2649-2657. doi:10.1093/humrep/des210

Athayde Wirka, K., Chen, A. A., Conaghan, J., Ivani, K., Gvakharia, M., Behr, B., Suraj, V., Tan, L., ve Shen, S. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: High prevalence and association with embryo development. Fertility and Sterility, 2014; 101(6). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.050>

Bartolacci, A., Intra, G., Coticchio, G., dell'Aquila, M., Patria, G., ve Borini, A. Does morphological assessment predict oocyte developmental competence? A systematic review and proposed score. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2022;39(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02370-3>

Coticchio, G., Cimadomo, D., Cermisoni, G. C., Rienzi, L., Papaleo, E., Ubaldi, F. M., Borini, A., ve De Santis, L. The first mitotic division: a perilous bridge connecting the zygote and the early embryo. Human Reproduction, 2023; 38(6), 1019–1027. <https://doi.org/10.1093/humrep/dead067>

Fan, X., Bialecka, M., Moustakas, I., Lam, E., Borggreven, N. V, Trouw, L., Louwe, L. A., Pilgram, G. S. K., Mei, H., Westerlaken, L. Van Der, ve Lopes, S. M. C. D. S. Single-cell reconstruction of follicular remodeling in the human adult ovary. Nature Communications, 2019; 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11036-9>

Gedikli, S., Özbek, E., ve Demirci, T. Fertilizasyonun Moleküler Temeli. 2013; 20(4), 294–301.

Gör, A., ve Kuyucu, Y. Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyici Faktörler. 2009; 227– 240.

Growth, O. Folikülogenezisin Moleküler Temelleri. 2010; 17(1), 59–63.

Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., ve Fauser, B. C. J. M. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. 2023; 36(1), 1–24. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>

Krisher, R. L. The effect of oocyte quality on development. 2004; 14–23.

Kumar, N. Trends of male factor infertility , an important cause of infertility : A review of literature. 2015; <https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>

Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Hammoud, S. S., Arbor, A., Arbor, A., Arbor, A., ve Arbor, A. Gametogenesis: A Journey from Inception to Conception. 2020; <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.006>.Gametogenesis

Lemmen, J. G., Agerholm, I., ve Ziebe, S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. Reproductive BioMedicine Online, 2008; 17(3), 385–391. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60222-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60222-2)

Ross, M. H. . ve Pawlina, W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology, Philadelphia: 2016; Wolters Kluwer. (7th baskı).s.238

Meij, A. Van Der, & Wermer, M. J. H. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional IVF. 2019; 1521–1523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00843-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00843-6)

Mescher L, A. Junquiera’s Basic Histology Text and Atlas. 2018.

Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., ve

Remoh, J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Human Reproduction, 2011; 26(10), 2658–2671. <https://doi.org/10.1093/humrep/der256>

Öktem, Ö., ve Urman, B. Reproductive Life Cycle: Folliculogenesis and menstruation. 2011

Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K., & Yoshida, Y. The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini- - review. November 2020, 2021; 169–175. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12371>

Otsuki, J. Intracytoplasmic Morphological Abnormalities in Human Oocytes. 2009; 26, 26–31.

Otsuki, J., Nagai, Y., ve Chiba, K. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. 20007; 263–270. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9130-0>

Öktem Ö. B. U. Over hayat döngüsünü anlamak. 2011; 71–82.

Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., ve Matthews, C. D. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. Human Reproduction, 1997; 12(3), 532–541. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.3.532>

Ramos, G., Ana, C., Monteiro, S., Maria, J., Souza-fabjan, G., Otávio, C., Vasconcelos, D. P., Altamiro, L., Nogueira, G., Maria, A., Ferreira, R., ve Varella, R. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte in vitro maturation in domestic animals. Animal Reproduction Science, October, 2018; <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.002>

Richards, J. S. The Ovarian Cycle. İçinde Ovarian Cycle (1. baskı, C. 107).

Elsevier Inc. 2018; <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.009>

Saleh, A. A., Hassanine, N. N. A. M., Taha, T. K., Rashad, A. M. A., ve Sharaby, M. A. Molecular regulation and genetic basis of gonadotropin-releasing hormone genes: A review. *Applied Veterinary Research*, 2023; 2(4), 2023017. <https://doi.org/10.31893/avr.2023017>

Shabankareh, H. K., Shahsavari, M. H., ve Moghaddam, G. In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. 2015; 13(10), 615–622.

Strauss, J. F., ve Williams, C. J. The Ovarian Life Cycle. İçinde Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Seventh Edition (Seventh Ed). Elsevier. 2013; <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2758-2.00009-3>

T.W. Sadler. Medical Embryology. Philadelphia: Wolters Kluwer. (7th baskı). 2013; s.275

Tenorio, F., Neto, L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., ve Goldstein, M. Spermatogenesis in Humans and Its affecting factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.2016; <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>

Çabuş, Ü. Çil, N. C. K. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanan infertil kadınlarda gebelik başarısını etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi. 2021; 748–759.

Virant-Klun, I. Postnatal oogenesis in humans: A review of recent findings. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2015; 8, 49–60. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S32650>

Wong, C. C., Loewke, K. E., Bossert, N. L., Behr, B., De Jonge, C. J., Baer, T. M., ve Pera, R. A. R. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature*

Biotechnology, 2010; 28(10). <https://doi.org/10.1038/nbt.1686>

Zev Rosenwaks, M.D., Nigel Pereira, M. D. The Pioneering of Intracytoplasmic Sperm Injection – Historical Perspectives. October, 2017; 1–29.

Zhang, T., He, M., Zhang, J., ve Xiao, Z. Mechanisms of primordial follicle activation and new pregnancy opportunity for premature ovarian failure patients. February, 2023; 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1113684>

