

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



**KALSİYUM İYONOFORUN OOSİT AKTİVASYONU VE
EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALİT SERDAR SARI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. TÜLAY İREZ

İSTANBUL, 2025

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



KALSİYUM İYONOFORUN OOSİT AKTİVASYONU VE
EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALİT SERDAR SARI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. TÜLAY İREZ

Jüri Üyesi: Doç. Dr. IŞIL KASAPOĞLU

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi ELİF ŞAHİN

İSTANBUL, 2025

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

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı 21111102014 numaralı öğrencisi Halit Serdar SARI “**KALSİYUM İYONOFOR’UN OOSİT AKTİVASYONU VE EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**” adlı tez çalışması, Enstitümüz Yönetim Kurulunu 10.01.2025 tarih ve 2025/01 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından oy birliğiyle Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:30/01/2025

Prof. Dr TÜLAY İREZ
Tez Danışmanı

Doç. Dr. IŞIL KASAPOĞLU

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi ELİF ŞAHİN

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.

.... / / 20....

Adı-SOYADI

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasında başta eşim Gizem SARAÇ SARI olmak üzere, çalışmakta olduğum Pembemavi Hastanesi Tüp Bebek bölümüne ve bana olan tüm destekleri için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tülay İREZ'e teşekkürlerimi borç bilirim.

İSTANBUL, 2025

Halit Serdar SARI

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	İ
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ÜREME FİZYOLOJİSİ	3
2.1.1. Mitoz Bölünme	3
2.1.2. Mayoz Bölünme	3
2.2. İNFERTİLİTE	5
2.2.1. İnfertilite Prevalansını Etkileyen Faktörler	5
2.2.2. Çiftlerde İnfertilitenin Değerlendirilmesi.....	6
2.3. FERTİLİZASYON.....	9
2.3.1. Fertilizasyonun Evreleri.....	10
2.3.2. Klivaj	14
2.4. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ.....	15
2.4.1. IUI (Aşılama)	15
2.4.2. Klasik (Konvansiyonel) İn Vitro Fertilizasyon.....	16
2.4.3. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)	19
2.4.4. Oosit Aktivasyonu	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24

3.1. Hasta Seçimi	24
3.2. Tüp Bebek Merkezinde Uygulanan İşlemler	24
3.2.1. Sperm Örneği Alınması ve Yıkama İşlemi	25
3.2.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU).....	25
3.2.3. Denüasyon (Oositin Temizlenmesi)	26
3.2.4 ICSI (Mikroenjeksiyon)	26
3.2.5. Oosit Aktivasyonu (Ca ⁺⁺ Uygulanması)	27
3.2.6. Döllenen Oositlerin Değerlendirmesi.....	28
3.2.7. Oluşan Embriyoların Değerlendirmesi	28
3.2.8 Embriyo Transferi.....	28
3.2.9. Gebelik Değerlendirmesi.....	29
3.2.10 Verilerin Toplanması	29
3.2.11 İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	30
4. BULGULAR	30
4.1 Kontrol ve Deney (Ca⁺⁺ uygulanmış) Grupları Arasında Elde Edilen Verilerin Karşılaştırılması	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
6. KAYNAKLAR	40

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1: Elde edilen oosit sayılarının gruplara göre karşılaştırılması.	31
Tablo 4.2: Fertilize oosit sayılarının gruplara göre değerlendirilmesi.(% olarak geup içerisinde değerlendir yeni sütun ekle)	32
Tablo 4.3: Oluşan embriyo sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması.....	33
Tablo 4.4: Oluşan blastokist sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.	34
Tablo 4.5: Elde edilen klinik gebelik sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması.....	35
Tablo 4.6: İlk muayenede kese görülen hastaların gruplara göre karşılaştırılması. ...	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Döllenenin 6 ayrı adımının ayrıntılı şeması (Swain 2008).....	12
Şekil 2.2: Tüp bebek tedavi aşamaları (©ectorPot / Shutterstock.com).	16
Şekil 2.3: Gelişim açısından 3.gün embriyosu. (Faz kontrast mikroskobu 10x20) (Halit Serdar SARI)	18
Şekil 2.4: Gelişim açısından 5.gün embriyosu. (Faz kontrast mikroskobu 10x20) (Halit Serdar SARI)	19
Şekil 2.5: Mikroenjeksiyon (ICSI). (Faz kontrast mikroskobu 10x40) (Halit Serdar SARI)	21
Şekil 2.6: ICSI işleminden 20 saat sonra oluşan zigot. (Faz kontrast mikroskobu 10x40) (Halit Serdar SARI)	21
Şekil 2.7: Fertilizasyon sonrası Oosit Aktivasyonu. Fertilizasyonu takiben spermin aktivasyonunun şematik gösterimi: sperm ve oosit plazma zarının kaynaşmasından sonra PLC ζ spermden oosit sitoplazmasına yayılır. PIP2 taşıyan veziküller sitoplazmada bulunur ve PLC PIP2'yi DAG ve InsP3 ürünlerine hidrolize eder. InsP3, ER zarında bulunan reseptörüne bağlanır . Böylece Ca $^{2+}$ ER'deki hücre içi depolardan sitozol içine salınır. Tekrarlayan Ca $^{2+}$ salınımları kalsiyum konsantrasyonu artışını sağlar. Ca $^{2+}$ iyonları oosit aktivasyonu sağlayarak, perivitellin aralığa kortikal granül salınımını sağlayarak zona pellucidayı kimyasal olarak değiştirir ve polisperminin bloke edilmesini sağlarlar. Ca $^{2+}$ iyonları hücre döngüsü ilerlemesini sağlar—meiosis II'nin yeniden başlaması. Hücre döngüsünü durmuş halde tutan faktörlerin Ca $^{2+}$ -bağımlı inaktivasyonu, siklinB1 ve securin ve MPF'nin parçalanmasıyla gerçekleşir ve hücre döngüsünün inaktivasyonu sonunda ilerler. Ca $^{2+}$ iyonları mRNA'ların toplanmasında rol oynar ve bunların translasyonunu etkiler. Ca $^{2+}$ çekirdekte yayılabilir ve embriyonik gen aktivasyonunda rol oynar. Ca $^{2+}$ salınımları dışı pronükleus oluştuğunda ve PLC ζ pronükleusta yeniden yerleştiğinde sonlanır. (Hojnik vd., 2019)	23
Şekil 4.1: Elde edilen oosit sayılarının gruplara göre karşılaştırılması.	31
Şekil 4.2: Döllenen oosit sayılarının karşılaştırılması.	32
Şekil 4.3: Gelişen embriyo sayısının karşılaştırılması.	33
Şekil 4.4: Oluşan blastokist sayısının gruplara göre karşılaştırılması.	34

KISALTMALAR LİSTESİ

AOA: Yapay oosit aktivasyonu

Ca⁺⁺: Kalsiyum İyonofor

FSH: Folikül uyaran hormon

hCG: İnsan Koryonik Gonadotropini

ICSI: Mikroenjeksiyon, İntrastoplazmik Sperm İnjesiyonu

InsP3: İnozitol 1,4,5 trifosfat

IUI: Aşılama

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

OAT: Oligoastenoteratozoospermi

OPU: Yumurta toplama

PIP2: Fosfotidil inozitol 4,5 bifosfat

PLC ζ : Fosfolipaz C Zeta

PVP: Polyvinylpropylene

TFF: Total Fertilizasyon Başarısızlığı

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri

ÖZET

KALSIYUM İYONOFORUN OOSİT AKTİVASYONU VE EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Bu tez çalışmasının amacı, ICSI uygulaması sonrası fertilizasyon elde edilemeyen olgularda uygulanan A23187 kalsiyum iyonofor ile oosit aktive edildikten sonra embriyo gelişimi ve gebelik üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmaya 2023-2024 yılları arasında Pembemavi Tüp Bebek merkezinde tedaviye başlayan ve ICSI işlemi sonrası kalsiyum iyonofor'a maruz bırakılan 99 hasta ile kullanılmayan 74 hastaların dosyasından retrospektif olarak incelenen bulgular dahil edildi. Gruplarda toplam 1825 oositin döllenme ve gelişmeye başlayan embriyo kalitesi (döllenme sayısı/oranı, embriyo sayısı/oranı, 5.güne ulaşan embriyo sayısı/oranı) ve klinik gebelik oranı incelendi.

Kalsiyum iyonofor kullanılan kadınlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fertilizasyon oranı ($p<0,04$), gelişen embriyo oranı ($p<0,04$), blastokist oranı ($p<0,04$), gebelik oranı ($p=0,03$) ve klinik gebelik oranı ($p<0,018$) daha yüksek bulundu.

Sonuç: A23187 Ca⁺ ionophore uygulanması, blastokiste ilerleme oranı, embriyo kalitesini, klinik gebelik oranlarını arttırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: A23187 Ca⁺ ionophore, ICSI, IVF, fertilizasyon yetersizliği

Halit Serdar SARI, 2025

ABSTRACT

THE EFFECT OF CALCIUM IONOPHORE ON OOCYTE ACTIVATION AND EMBRYO DEVELOPMENT

This thesis aims to investigate the effects of A23187 calcium ionophore on embryo development and pregnancy after oocyte activation in cases where fertilization could not be achieved after ICSI application.

The retrospective findings from the files of 99 patients who applied to Pembemavi IVF Center between 2023-2024 and used calcium ionophore during insemination and 74 patients who did not use it were included in the study. In both groups, fertilization and embryo quality (fertilization number/rate, embryo number/rate, embryo number/rate reaching day 5) and clinical pregnancy rates of 1825 oocytes were examined.

When compared to the control group, fertilization rate ($p<0.04$), developing embryo rate ($p<0.04$), blastocyst rate ($p<0.04$), pregnancy rates ($p=0.03$), and clinical pregnancy rates ($p<0.018$) were found to be higher in women who used calcium ionophore.

Conclusion: A23187 Ca⁺ ionophore application increases blastocyst progression rates, embryo quality, and clinical pregnancy rates.

Keywords: A23187 Ca⁺ ionophore, ICSI, IVF, fertilization failure

Halit Serdar SARI, 2025

1. GİRİŞ

Anormal oosit aktivasyonu görülen hastalarda oosit aktivasyonu kalsiyum iyonofor ile sağlanması sonucu alınan başarılı sonuçlardaki embriyoların kalitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Total fertilizasyon başarısızlığı mikroenjeksiyon (ICSI) sonrası, sperm veya oosit kaynaklı birçok faktörden kaynaklanabilmektedir. Döllenmenin ICSI'den sonrası gerçekleşmemesi genellikle spermlerin oosit aktivasyonunu gerçekleştirememesindedir (Mahutte vd., 2003). Oosit aktivasyonunun gerçekleşmesi için, sperm kapasitasyonunu tamamlamış olması gerekmektedir. Daha sonra oluşması beklenen sperm hiperaktivasyonunun ve akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi için Ca^{++} iyonlarının salınımının yapılması gerekmektedir. Oosit aktivasyonunun olması için kalsiyum (Ca^{++}) salınımına bağlı olduğu düşünülmektedir (Bakı Acar vd., 2011). Yapay oosit aktivasyon yöntemleri kalsiyum salınımının olmadığı durumlarda oosit aktivasyonunun sağlanması için kullanılmaktadır. Kalsiyum (Ca^{++}) yüklemesi yapılarak oosit aktivasyonunu sağlanması için kullanılan kalsiyum iyonofor, yapay oosit aktivasyon (AOA) yöntemlerindedir (Montag vd., 2012). Murugesu ve arkadaşları kalsiyum iyonofor üzerine klinik gebelik ve canlı doğum oranı üzerine yaptıkları çalışmada, İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası kalsiyum iyonofor tedavisi ile AOA, döllenme, bölünme, blastülasyon ve implantasyon oranlarında ve genel gebelik ve canlı doğum oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme ile sonuçlanır. Kalsiyum iyonofor kullanımının güçlü bir etkisini gösteren bu sistematik incelemenin sonucu, özellikle ICSI'nin tek başına düşük döllenme oranları sağladığı çiftler için güven verici ve umut vadeden bir yöntem olduğunu göstermişlerdir (Murugesu vd., 2017).

Başka bir çalışmada Meryem Eftekhar ve arkadaşları teratospermi hastalarda oosit aktivasyonu için randomize klinik çalışma yapmışlardır. Yaptığım çalışmada ICSI sonrası 15 dakika boyunca 50 μ M kalsiyum iyonofor ile bırakılıp ardından en az 5 kez 4 farklı Global Collect HEPES solüsyonunda yıkayıp kültür ortamına alındıktan sonra 16-18 saat sonra fertilizasyon oranları takip edilmiş. Alınan sonuçlarda teratospermi olan hastalarda anlamlı bir fark bulunamamıştır (Eftekhar vd., 2013).

Bu alışma için toplanan hastaların döllenen oosit sayısı, gelişen embriyo sayısı, klivaj oranı, 5.gün embriyo kalitesi, kalsiyum iyonofor'a maruz bırakılan 99 hasta ile kalsiyum iyonofor'a maruz bırakılmayan 74 hasta sonuçları değerlendirildi ve sonuçta kalsiyum iyonofor kullanılan hastaların kullanılmayan hastalara göre daha iyi sonuç verip vermediği araştırıldı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. ÜREME FİZYOLOJİSİ

Üreme tüm canlılarda türlerin devamlılığını simgeleyen evrensel bir olgudur. İnsan yaşamı, erkek gamet hücresi spermatozoon ile kadın gamet hücresi oositin zigot adı verilen tek bir hücreyi oluşturmak üzere bir araya gelmesi yani fertilizasyon ile başlar. Üreme sisteminin iki anatomik bileşeni gonadlar ve üreme yollarıdır. Gonadlar (erkeklerde testisler, kadınlarda yumurtalıklar) endokrin bir işlev görür. Testosteron, testislerin ürettiği ana hormondur.

Ovulasyondan önce östrojen ve ovulasyondan sonra östrojen ile birlikte progesteron, overlerden salgılanan ana hormonlardır. Üreme sisteminin iki anatomik bileşeni gonadlar ve üreme yollarıdır.

2.1.1. Mitoz Bölünme

Mitoz, bir hücreden iki genetik olarak özdeş yavru hücrenin oluştuğu bir hücre bölünme sürecidir. İnsan somatik hücreleri 23 çift veya diploid sayıda kromozom içermektedir ve her bir çiftteki bir kromozom anneden gelirken diğeri babadan orjin almaktadır. Mitoz dört ana evreden oluşur: Profaz, Metafaz, Anafaz ve Telofaz. Süreç sonunda sitoplazma bölünmesi (sitokinez) gerçekleşir ve iki yeni hücre oluşur.

2.1.2. Mayoz Bölünme

Mayoz bölünme gonadlarda diploid ana hücrelerden haploid gametlerin oluşması için geçirilen bölünme tipidir. Bu nedenle redüksiyon bölünmesi olarak da isimlendirilir.

Mayoz bölünme iki evrede tamamlanır. Birinci evrede homolog kromozomlar birbirinden ayrılarak hücre diploid yapıdan haploide indirgenir. Mayoz II'de ise kardeş kromatidler birbirinden ayrılırlar.

2.1.2.1. Gametogenez

Oogenez

Ovaryumdaki oogonium adı verilen diploit hücrelerden yumurtanın meydana gelmesini sağlayan faaliyetler dizisine oogenez denir. Daha genel olarak ovaryumda yumurtanın oluşturulmasını sağlayan faaliyetler dizisine oogenez denir.

Oogenezin detayları değişik türlerde farklı olmakla birlikte genel esasları benzerdir. Oogenez spermatogenezden farklı olarak insanda doğumdan önce başlar. Kız çocuğu doğmadan evvel gelişiminin ilk birkaç ayında oogoniumlar mitozla bölünerek yedi milyon kadar yeni oogonium oluştururlar. Oluşan tüm oogoniumlar diploittir.

Oogoniumlar ovaryumu dıştan saran ve germinal epitel denilen epitelin meydana getirdiği küresel odacıklar içinde yer alırlar. Bu odacıklara primer folikül veya ovaryum folikülü denir.

Spermatogenez

Bu terim spermatogonyadan spermatozoa oluşumu sırasındaki proliferatif ve hücrel değişiklikleri kapsar ve 3 fazda incelenir;

1.Spermatositogenez: Tip A spermatogonya bir dizi bölünmeye uğrayarak sayıca çoğalır ve Tip B spermatogonyayı oluşturur. En son oluşan spermatogonyanın bölünmesiyle primer spermatositler meydana gelir.

2.Mayoz: Spermatositler iki olgunlaşma bölünmesine uğrayarak kromozom sayısını yarıya indirir ve spermatid kümelerini oluşturur.

3.Spermiyogenez: Spermatidler belirgin hücrel değişikliklere uğrayarak spermatozoaya dönüşürler.

2.2. İNFERTİLİTE

İnfertilite; korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen, bir yıl içerisinde gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır. İnfertilite, bir çift sorunu olup, popülasyonda %15 oranında görülür. Erkeğin infertilitedeki sorumluluğu; %30 olguda tek başına, %20 olguda da kadın faktörü ile birlikte olmak üzere, en az %50 oranındadır (Sigman vd., 1998).

İnfertilite psikolojik, ekonomik, demografik ve tıbbi durumlara önemli etkileri olan bir durumdur. İnfertilite, eşlerden birinde üremesine engel bir durum yokken 12 aylık korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen veya eşlerden birinde üremeye engel olan bir durum olmasından dolayı klinik olarak gebelik oluşmaması durumudur.

Dünyadaki infertilite oranı %8-12 arasında olup Türkiye'de %10-20 arasında değişmektedir. İnfertilite sorunları yaşamı tehdit eden bir hastalık olarak sınıflandırılmasa da hem bireyi hem de toplumu etkileyen basit bir jinekolojik rahatsızlık değil, biyolojik, sosyal, kültürel ve psikolojik boyutları olan bir sağlık sorunudur (Eftekhar vd., 2013).

İnfertilite iki grupta incelenir sekonder ve primer. Primer infertil cinsel hayatın hiçbir evresinde hamile kalamama; sekonder infertil ise önce gebe kalmış, ancak daha sonraki dönemde korunmasız gebe kalamama durumudur. (Upkong vd., 2006).

2.2.1. İnfertilite Prevalansını Etkileyen Faktörler

Gebeliklerin çoğu ilk 6 ayda oluşmakla birlikte infertilite prevalansını birçok faktör etkiler.

Kadın yaşı: Kadın yaşı arttıkça infertilite prevalansı artar. Çalışmalarda oranlar farklı olabilmekle birlikte 20-24 yaşlarında % 3 olarak görülen infertilite oranı, 35-39 yaş aralığında % 5.5 olarak saptanmıştır. Bunun nedenleri ise over rezervinin azalması, jinekolojik hastalıklar, enfeksiyon ve sistemik bazı hastalıkların oluşma riskinin ilerleyen yaşla birlikte artışıdır.

Etnik köken: Irk ve etnik kökenin infertiliteye etkisi gerçek bir nedenden çok sosyoekonomik durumlarla ilişkilidir.

Nulliparite: Kadın yaşından bağımsız olarak nulliparlar daha önce doğum yapmış kadınlara oranla infertilite sorunu ile daha çok karşılaşır. Nulliparlarda bu oran % 13 iken, doğum yapmış kalınlarda % 6 kadardır. 35-39 yaş aralığında ise nulliparda infertilite oranı %27,2, daha önce doğum yapmış kadınlarda ise % 7 kadardır.

Sağlık kuruluşlarına erişim: Üreme sağlığı merkezlerine erişim olanağı varsa infertilite prevalansı azalmaktadır. Bu durum gerekli taramaların zamanında yapılması, jinekolojik hastalıkların tedavisinin zamanında yapılması ile açıklanabilir.

2.2.2. Çiftlerde İnfertilitenin Değerlendirilmesi

2.2.2.1. Kadın İnfertilitesi

Kadınlarda infertilite nedenleri çok yönlüdür. Ovumun döllemesi ve gelişen embriyonun implantasyonu sürecinde pek çok faktör bu süreci bozmaktadır. Ovulasyon bozuklukları öncelikle ortaya çıkan faktörlerden biridir. Bu da endokrin faktörlerin eksik salgılanması veya senkronizasyonunda yetersizliktir (Kollman 2014).

Polikistik over sendromu (PCOS), çok sayıda folikül üretilmesi, insülin direnci ve obezite, akne ve kıllanma gibi belirtileri bulunur, çoğu zaman ovulasyon kusurları ile de seyreder (De Leo,2016).Diğer taraftan hipofiz veya hipotalamik hormonlar da yetersiz veya aşırı sekresyonu durumunda infertilite nedeni olabilir (Anderson 2003).Vücut kitle indeksinin de kadında infertilite nedeni olabileceği gösterilmiştir (Freizinger 2008).Menstrual siklus düzensizliği veya hiç adet görememe kadında ovulasyon kusurları oluşturarak infertilite nedeni olabilir (Karasu 2011).

Prematüre over yetmezliği olarak adlandırılan over korteksinde yetersiz yumurta bulunması, östrojen azlığı ile de karakterize bir durumdur (Magobe 2005). Genetik

veya kemoterapi ya da endokrin faktörler etkin olarak rol oynar, bu durum genellikle bir otoimmün yanıt veya ovaryumdan yumurtaların erken kaybı nedeniyle oluşmaktadır (Brydoy 2007, Leelabati B.2021).

Hiperprolaktinemi, hipofiz bezinden, östrojen üretimini azaltan ve kısırlığa neden olabilen aşırı prolaktin üretimi buna neden olabilir (Bjorvang 2021).

Tuba uterina hasarı veya tıkanıklığı da kadında infertiliteye neden olabilir (Fernandez, 2013). Ureaplazma, Klamidia, gibi cinsel yolla bulaşan hastalıklar da pelvik inflamatuvar hastalıklar oluşturarak infertiliteye neden olabilir (Judson FN 1985).

Endometriozis, genellikle uterusu implantasyona hazırlık amacı ile gelişen dokunun başka yerlere yerleşip büyümesiyle oluşur (Sarria-Santamera A, 2020). Bu ekstra doku büyümesi ve cerrahi olarak çıkarılması, fallop tüplerini tıkayıp yumurta ve sperm birleşmesini engelleyebilecek tıkanıklara neden olabilir.

Uterus'da iyi huylu polip veya adenomlar, miyomlar da infertilite nedeni olabilir (Gurunath 2011). Bazı durumlarda ise kadında infertilitenin nedeni anlaşılabilir.

Kadınlara Ait İnfertilite Nedenleri

En sık görülen kadın infertilitesi nedenleri esas olarak 6 ana başlık altında incelenebilir.

- ovulatuvar bozukluklar %25,
- endometriozis %15,
- pelvik adhezyonlar %12,
- tubal obstruksiyon %11,
- diğer tuba anomalileri %11
- hiperprolaktinemi %7 saptanmıştır

Kadının ilerleyen yaşı ile birlikte fertilité oranı azalmakla birlikte leiomyom, tubal hastalık ve endometriozis görünme olanları da artarak fertilité olasılığı azalmaktadır. Aynı zamanda yaşla birlikte ilişki sıklığında azalma görülmektedir (Female age-related fertility decline).

2.2.2.2. Erkekte İnfertilite

Günümüzde 7 çiftten neredeyse 1'inin infertil olduğu görülmektedir. Erkek infertilitesinin tüm olgular göz önüne alındığında yarısında görüldüğü anlaşılmaktadır (Leslie,2020). Erkekte infertilite düşük sayıda sperm üretimi, anormal sperm fonksiyonu veya spermın iletilmesini engelleyen tıkanıklıklar nedeniyle oluşabilir. Çeşitli hastalıklar, testiste travma, kronik sağlık sorunları, yaşam tarzı ve diğer faktörler erkek infertilitesine neden olabilir (Shamsi 2011). Genel olarak spermın yumurtayı döllemesinde ortaya çıkan problemler zigot ve embriyo oluşumunu engellemektedir. Dolayısı ile fertilizasyon kusurları en önemli etkidir. Fertilizasyon için spermın yumurtayı tanınması, kapasitasyon ve hiperaktivasyon motilitesi, akrozom reaksiyonu, zona pellusida ve oolemmayı delme ve oosit aktivasyonunu sağlama gibi rolleri vardır (Puga Molina 2018).

Erkeğe Ait İnfertilite Nedenleri

Erkek infertilitesi nedenleri esas olarak 4 ana başlık altında incelenebilir.

- Hipotalamik, hipofizer nedenler (sekonder hipo-gonadizm) - %5-15
- Testiküler hastalıklar (Y kromozomu mikroleksyonlarını da içeren primer testiküler defektler) -%70-80
- Posttestiküler defektler (Sperm transport bozukluklar) %2-5
- İdiyopatik - %10-20

2.2.2.3. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite mevcut tanısal metodların reproduktif defektleri belirlemede sınırlılığı veya sadece gebe kalma şansını kullanamama olarak

tanımlanabilir. Tam bir infertilite değerlendirme sonrası, tüm nedenler dışlanarak konulan bir tanıdır. Tanının konması oldukça karışıktır.

2.3. FERTİLİZASYON

Fertilizasyon, yapısal olarak iki hücrenin, sperm ve yumurta hücresi gibi iki farklı hücre tipi arasındaki hücre-hücre tanıma mekanizması, bağlanması ve sonunda birbiriyle birleşerek totipotent özellikte yeni bir hücre meydana getirdikleri bir dizi olaydır. İnsan oositi mayoz bölünmenin metafazında duraklamıştır ancak döllenme sonucu mayoz tamamlanır. Oosit çevresindeki glikoprotein kılıf zona pellucida üç farklı glikoprotein taşır. O ve N bağlantılı oligosakkaritler, üç glikoproteinin hepsinde bulunur (Miles, Linda. 2022). Zona pellucida, ozmotik bir bariyer değildir. ancak bir sperm bariyeri görevi görür. Zona pellucida, türlere özgü bir döllenme bariyeridir. Bu nedenle farklı türler arasında fertilizasyon gerçekleşmez. Sperm hücresi hareketli; baş, orta kısım ve kuyruk içeren bir hücredir.

1. **Kuyruk:** Ana bileşen olarak da bilinir. “9 + 2” mikrotübüllerden ve yardımcı yapılardan oluşan flagellar aparat kuyrukta bulunur.
2. **Orta parça:** Kuyruğun proksimal ucunda bulunan orta parça, kuyruk çırpma için gerekli ATP'yi sağlayan bir mitokondri kılıfı içerir.
3. **Baş:** Spermatik haploid çekirdek başta bulunur.

Spermin baş kısmında zarla çevrili bir vezikül olan akrozom, yer alır ve lizozom benzeri bir kese yapısı olan golgiden kaynaklanır. Akrozom çeşitli enzimler içerir, bunlardan çözünebilir hidrolazlar (serin proteaz akrosin, hiyaluronidaz) içerir ve düşük bir pH'a sahiptir. Akrozom reaksiyonu sırasında plazma zarı dış akrozomal zarla birleşerek akrozomun içeriğini serbest bırakır ve iç akrozomal zarı sperm başının işlevsel dış sınırı olarak ortaya çıkarır. Sperm plazma zarı da aynı şekilde oldukça uzmanlaşmıştır ve proteinler belirli alanlarda lokalizedir. Fertilin olarak da bilinen PH-30, spermin ekvatorial bölgesinde bulunan ve sperm-yumurta plazma zarı füzyonuna yardımcı olan bir proteindir (Eisenbach 2006).

Sperm çekirdeği, sentriyol, mitokondri ve sitoplazma bulunur ancak fertilizasyon sonrası embriyo gelişiminde mitokondri ve mitokondriyal DNA belirli bir aşamaya kadar sağlıklı kalır sonra yok edilir. Transkripsiyon ve parakrin faktörler için birkaç sperm proteini ve mRNA yumurtaya iletilir. Ayrıca gelen mikro RNA'lar: erken hücre bölünmesinde rol oynayan reseptörleri aşağı düzenleyebilir (Gould M 2012).

Döllenmeyen oosit 24 saat içinde dejenere olur. Fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için oositin matür olması gibi spermlerin de kadın genital sisteminden geçerken kazandığı bazı özellikler fertilizasyon kapasitesini kazanmasına yardımcı olur.

2.3.1. Fertilizasyonun Evreleri

Kapasitasyon: Ejakülasyondaki sperm bir yumurtayı dölemeye hazır değildir. Meninin seyreltilmesine yanıt olarak bir dizi değişiklik geçirirler ve bu değişikliklere kapasitasyon denir. 5-7 saat sürer.

Cinsel ilişki sırasında boşalan 300.000.000 insan sperminin yalnızca yaklaşık 200'ü yumurta kanalına ulaşır ve burada döllenir.

Spermatozoa olgunlaşır, rahim ve yumurta kanalından göçleri boyunca oositle kaynaşma yeteneğine sahip olurlar.

Spermatozoa kapasitasyondan sonra aşırı aktif hale gelir ve akrozom reaksiyonu geçirmelerine ve zona pellucidadan geçmelerine olanak tanır (Prefertilization events 2022).

Folikül hücrelerinden penetrasyon: Folikül hücreleri hyaluronik asit bazlı bir hücre dışı matrise gömülüdür. Spermatozoaları dağıtarak foliküler hücrelere nüfuz edebilirler.

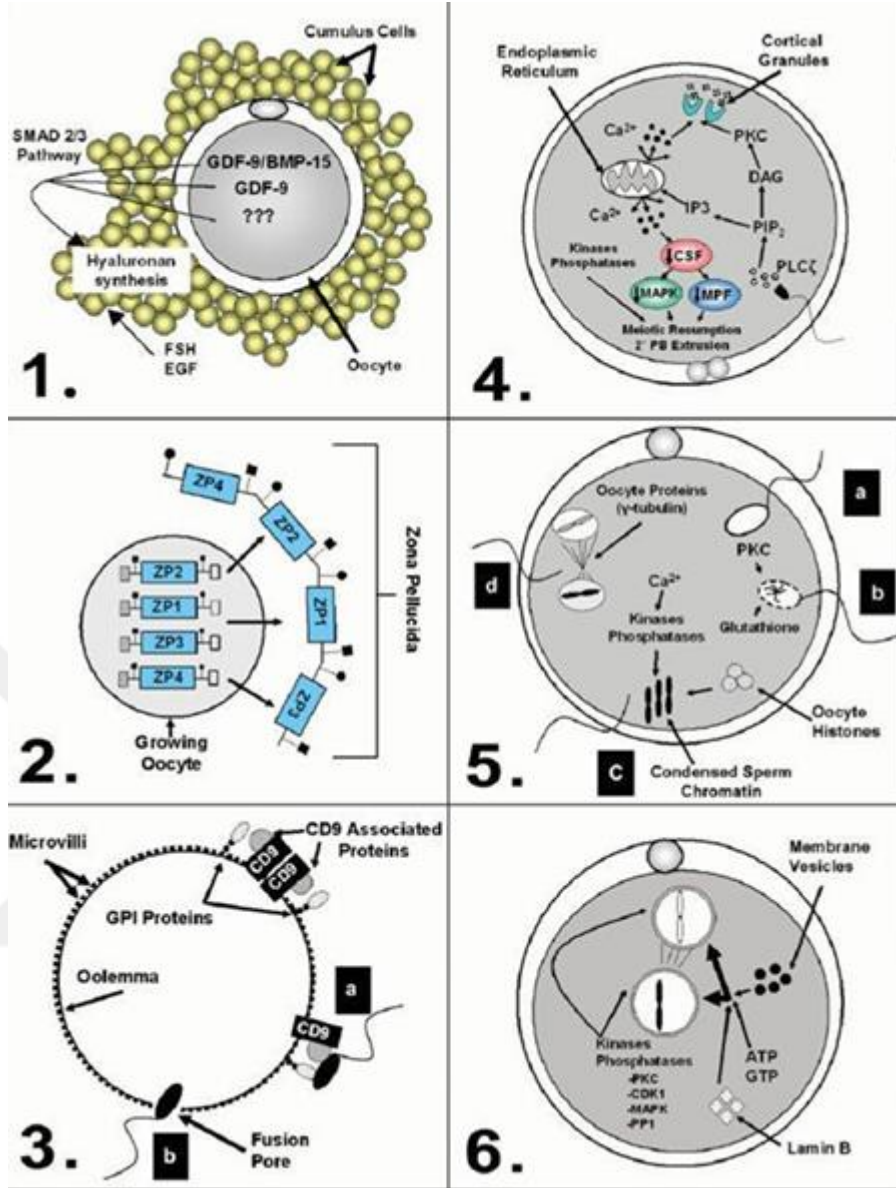
Spermatozoaların plazma zarında ve akrozomunda bulunan hyaluronidaz, akrozin ve diğer proteolitik enzimler foliküler hücreleri dağıtır. Hyaluronidaz enzimi hyaluronik asidi parçalar.

Akrozom reaksiyonu: Belirli bir ligand-reseptör etkileşimi yoluyla sperm başı zona pellucidaya bağlanır. Akrozom, bağlanma sürecinin bir sonucu olarak zona pellucida üzerinde veziküller oluşturur ve enzimleri serbest bırakır. Akrozomun dış plazma zarı, plazma zarıyla birkaç noktada birleşerek akrozomun içeriğini serbest bırakır. Buna akrozom reaksiyonu denir. Temas noktasında, akrozomal enzimler zona pellucidayı parçalar. Bir serin proteaz olan akrosin ve N-asetilglukozaminidaz iki temel bileşendir. Akrosin, zona pellucidada bir delik oluşturarak spermin yumurtaya ulaşmasını sağlar. Zona pellucida glikoprotein III'teki (ZPGP III) O-bağlı oligosakkaritler, spermin ayrılmasına izin veren N-asetilglukozaminidaz tarafından hidrolize edilir (Noritaka H.;2018).

Sperm üzerinde yeni bir yüzey (iç akrozomal membran) membran füzyonu sonucunda ortaya çıkar ve bunun ZPGP II için yeni bağlanma bölgeleri içermesi beklenir. Akrozom reaksiyonu geçirmemiş spermatozoalar zona pellucidaya nüfuz edemez ve döllenebilir.

Zona penetrasyonu: Zona pellucida, akrozom reaksiyona girmiş spermatozoalar tarafından penetre edilir. Zona pellucidanın enzimatik sindirimi ve spermatozoanın hiperaktif hareketliliğinin oluşturduğu itme kuvveti bu süreci kolaylaştırabilir.

Sperm oosit füzyonu: Spermatozoonun plazma membranı, zona penetrasyonundan sonra oositin plazma membranıyla buluşur. İki membranlı bir yapı, spermin oosit sitoplazmasına girişini garanti eder. Oositlerin kortikal granülleri sperm-oosit füzyonundan sonra hızla serbest kalır, zona pellucida ile reaksiyona girer ve onu diğer spermatozoalara karşı geçirgen hale getirir. Sperm yumurta ile bağ kurduğunda kuyruğun çırılması durur. Sperm nükleusu ve mitokondrileri yumurta sitoplazmasına çekilir (Barosso 2009).



Şekil 2. 1: Döllenmenin 6 ayrı adımının ayrıntılı şeması (Swain 2008)

(1) Oosit'ten GDF-9 ve BMP-15 gibi faktörlerin salgılanması ile kümülüs hücresi yayılmasını kolaylaştırmak için SMAD2/3 gibi sinyal yolları uyarılır ve bu da sperm kümülüs hücre bariyerini delme yeteneğini artırır.

(2) Büyüyen oositler, sperm hücrelerini tanıma, bağlanma ve penetrasyon için gerekli olan zona pellucidayı oluşturmak üzere zona pellucida glikoproteinlerini (ZP1-4) ve bununla ilişkili oligosakkaritleri düzgün bir şekilde sentezlemeli, işlemeli ve salgılamalıdır.

(3) Zona pellucida penetrasyonundan sonra, sperm önce (a) oolemaya bağlanmalıdır, bu süreç oolema mikrovilluslarına ve oositlerin CD9 ve GPI gibi oolema proteinlerini üretmesine bağlıdır. İkinci olarak (b) gamet zarları kaynaşarak sperm oosite girmesi için bir gözenek oluşturur.

(4) PLCz'nin sperm tarafından salınmasını takiben oosit aktivasyonu meydana gelir ve bu da PIP2'nin parçalanması ve IP3 ve DAG oluşumu gerçekleşir. IP3, kalsiyum depolarını (Ca²⁺) serbest bırakması için endoplazmik retikulumu uyarır. PKC ile birlikte Ca²⁺, kortikal granül reaksiyonuna ve polispermiye bloke olmasına neden olur. Bunlara ilave olarak, Ca²⁺, MAP kinaz ve MPF aktivitelerini azaltarak CSF aktivitesinin azalmasına neden olur. Bu kinazlar, diğer kinazlar ve fosfatazlarla birlikte, mayoz II'nin tamamlanması ve ikinci kutup cisminin atılması ile sonuçlanır.

(5) Aktivasyonla eş zamanlı olarak, oosit (a) spermi işler, (b) oosit kaynaklı PKC'nin etkileriyle sperm nükleer kılıfının parçalanmasına neden olur. Ek olarak, sperm nükleer bileşenleri yoğunlaştırılır ve disülfür bağları çıkarılır, bu süreç kısmen oosit tarafından sağlanan glutatyona bağlıdır. (c) Daha sonra, çeşitli protein kinazlar ve fosfatazların yardımıyla sperm kromatinini yeniden yoğunlaştırmak için oosit tarafından sağlanan histonlara ihtiyaç duyulur. (d) Son olarak, gama tubulin gibi oosit kaynaklı proteinler, PN oluşumu ve göçüne yardımcı olmak için mikrotübüller oluşturmak için gereklidir.

(6) Döllenmenin son adımı, PN'nin nükleer zarflarını yeniden oluşturmak için oositin membran vezikülü, ATP/GTP, lamin B ve protein kinaz ve fosfataz aktivitesi sağlamasını gerektirir.

GDF-9, büyüme farklılaşma faktörü-9; BMP-15, kemik morfogenetik protein-15; PLCz, fosfolipaz C zeta; PIP2, fosfatidilinositol bifosfat; IP3, inositol trifosfat; DAG, diasilgliserol; PKC, protein kinaz C; CSF, sitolik faktör; MPF, olgunlaşmayı teşvik eden faktör.

2.3.2. Klivaj

Klivaj, in vitro fertilizasyon tedavisinde döllenmiş bir yumurtanın bölünerek embriyo aşamalarını oluşturması sürecini ifade eder. “Klivaj” kelimesi, hücrelerin bölünmesini ve çoğalmasını ifade eder. Embriyo gelişiminin kritik bir aşamasıdır ve embriyonun sağlıklı bir şekilde gelişip gelişmeyeceğini değerlendirmek için yakından izlenir.

2.3.2.1. Klivaj Evrelerinin İzlenmesi

- IVF tedavisinde embriyologlar klivaj evresini mikroskop altında düzenli aralıklarla inceler.
- Embriyo kalitesi, hücre sayısı, simetri ve fragmentasyon gibi faktörlere göre değerlendirilir.
- Hücre Sayısı: Bölünmenin zamanlamasına uygun şekilde hücre sayısı artmalıdır.
- Simetri: Blastomerler mümkün olduğunca simetrik olmalıdır.
- Fragmentasyon: Hücreler arasında küçük parçacıkların (sitoplazmik artıklar) bulunması embriyo kalitesini etkileyebilir.

2.3.2.2. IVF’de Klivajın Önemi

- Klivaj evresi, sağlıklı embriyo gelişimi için temel aşamalardan biridir.
- Embriyo transferi için seçilecek en kaliteli embriyolar, genellikle klivaj evresindeki gelişimlerine göre seçilir.
- Bazı embriyolar, bu evrede düzgün bölünme gerçekleştiremeyebilir ve gelişimleri durabilir. Bu IVF başarısını etkileyen önemli bir faktördür.

2.3.2.3 Klivaj Anomalileri

Zigot ve blastomerin doğru ve iki kardeş hücre meydana getirecek şekilde ikiye ayrılmaları, sitokinezisde önemli sitoyapısal (cytoskeletal) etmenlerin etkinliğine ve doğru dizilimine bağlıdır. Normalden hafif sapmalar olasılıkla pek önemli değildir ancak önemli dengesizlikler bu temel mekanizmalarda sorunlar çıkacağı anlamına

gelir. Klivajın düzenliliği göz önüne alınırken, örneğin; normal, düzenli, blastomer eşitliği açısından "senkron" bir 5 hücreli embriyoda iki hücrenin diğerlerinden daha küçük olması beklenirken tıpa tıp aynı boyutlarda blastomerleri olan 3 hücreli bir "asenkron" embriyoya dikkat edilmesi gerekir.

2.4. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) kadın ve erkek infertilitesini tedavi etmek amacıyla kabul edilen ve spontan olarak hamile kalamayan çiftlerin, gebelik elde edebilmelerini sağlamak için tüm işlemleri kapsayan tekniklerdir (Abebe, 2020).

2.4.1. IUI (Aşılama)

Uterus içine hazırlanmış spermlerin enjeksiyonudur (IUI), kadın veya erkekte infertilitenin birinci basamak uygulamasıdır. IUI, uygulamasında spermler özel yöntemlerle ayrılır ve özellikle az volüm içinde enjekte edilir. İşlemin bir diğer adı da yapay tohumlama veya aşılama diye bilinir.

Bu işlemde gonadotropin stimülasyonu veya doğal siklus döngüsü kullanılır. Kullanılacak yöntem kadında infertilite nedenlerine bağlı olarak değişebilir (Ombelet,2015).

2.4.1.1. Aşılama Tarihçesi

Intravajinal inseminasyon ilk kez 18. yüzyılın sonlarında Hunter tarafından Londra'da hipospadias bir erkeğin eşine uygulandı ve bu uygulama gebelikle sonuçlandı. Bunu, serviksinde anatomik bozukluk olan bir kadında Sims tarafından 1867 yılında yapılan ve gebelikle sonuçlanan diğer uygulama izledi. İlk intrauterin inseminasyon (IUI) uygulaması bundan 4 yıl sonra tanımlandı. Ancak seminal plazmanın içerdiği prostaglandinler ve çeşitli bakterilerin kontaminasyonu, vb gibi nedenlerle sıkça görülen anaflaktik reaksiyon, uterin kontraksiyonlar ve pelvik enfeksiyonlar nedeniyle artifisyel inseminasyon giderek geçerliliğini kaybetti.

1930'lardan sonra sperm anormalliklerinin infertilite nedeni olabileceğine dair artan bulgular ile aşılama tekrar gündeme geldi.

2.4.2. Klasik (Konvansiyonel) İn Vitro Fertilizasyon

İn vitro fertilizasyon işlemi 1978'de Robert Edwards ve Patrick Streptoe tarafından geliştirilmiş ve ilk IVF bebeği doğmuştur (Karuppaswamy vd., 2009). İlk uygulamalarda oosit toplanması Laparoskopi yöntemi ile yapılmıştır. Günümüzde bu yöntem terkedilmiş, vaginal aspirasyon ile yumurta toplama işlemi gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2. 2: Tüp bebek tedavi aşamaları (©ectorPot / Shutterstock.com).

2.4.2.1. IVF Tarihçe

Hipokrat (MÖ:460-377) yazılarında uterusun ve tubal açıklığın gebe kalmadaki önemi ve ayrıca semenin üremedeki yeri vurgulanmaktadır.

17. ve 18. yüzyıl başlarında bilim adamları, semen içindeki spermin overlerde oluşan oositleri dölediklerini bilmelerine karşılık bunun fizyolojik mekanizmalarını tam olarak açıklayamamaktaydılar.

Tarihsel kronolojiye bakıldığı zaman, İngiltere'de kocasının spermi ile suni döllenme sonrası ilk doğumun gerçekleştiği 1790 yılından yaklaşık 200 yıl sonra, aynı ülkede, 1978 yılında ilk insan tüp bebeği dünyaya geliyordu.

Böylece, bilimin bir zamanlar hayal bile edilemeyecek bir konuyu gerçekleştirmesinin inanç ve sabır ile ne kadar uzun bir süreyi aldığı anlaşılıyordu.

IVF doğumu artık üreme endokrinolojisinin tarihe mal olmuş bir başarısı idi. Tüm bilim dünyası ayakta alkışladığı bu başarıya fazlası ile sahip çıktı. Ciddi boyutta infertilite sorunlu çiftler için yeni ve başarı dolu bir tedavi ufku açıldı.

2.4.2.2 IVF (İn Vitro Fertilizasyon) Önemli Ölçütleri

Klasik in vitro fertilizasyon sürecinde döllenme, spermlerin oositler ile birlikte inseminasyona bırakılması sonucunda gelişmektedir. Bu süreç sonunda, oosit sitoplazması içinde sperm başının saptanması, pronukleusların tespit edilmesi ve çift kutup cisimciğinin varlığı gerekir. Embriyonik gelişim ise yarıklanma ile başlar. Yaklaşık olarak 25-30. saatlerde iki blastomerli embriyonun görülmesi klivajların başladığının göstergesidir (Natural medicine web,2018).

Konvansiyonel İn Vitro Fertilizasyonun dört aşaması;

- Folikül gelişimi, (gonadotropinler kullanılır 13-15 günlük süreç)
- Yumurta toplama , (OPU)
- Oosit inseminasyonu, (IVF/ICSI)
- Embriyo gelişimi ve transferi

Folikül gelişiminin ardından, foliküller istenilen büyüklüğe ulaştığında oosit toplama (OPU) işleminden 34-36 saat önce hCG uygulanır. Ardından vajinal ultrason ile oositler toplanır (Edwards vd., 1980).

Erkekten semen örneği alındıktan sonra, hareketli spermlerin ayrılması amacı ile spermler yüzdürme ya da gradient yöntemi ayrıştırılır. Toplanan sperm ve oositlerin, bir kültür ortamına kaldırılır. Fertilizasyonun gerçekleşmesi için *in vivo* sperm aktivasyonu burada gerçekleşir. Döllenme gerçekleştiğinde oositin mayoz II duraksaması son bulur. 2N kromozomlu embriyo gelişimi ile fertilizasyon gerçekleşir (Brackett vd., 1982).

Gelişen embriyo sayısı ve kalitesine göre 5. veya 3. gün transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer olacak olan embriyo sayısı, hastanın tıbbi geçmişine bakılarak Sağlık Bakanlığı'nın direktifleri doğrultusunda karar verilir. İki ve daha çok başarısız denemesi olan veya 35 yaşından büyük hastalara iki embriyo verilebilir. Embriyo seçildikten sonra kateter yardımı ile serviksten rahim içerisine bırakılır. Embriyoların gelişmelerine devam ettirerek uterusu tutunmaları beklenir.



Şekil 2. 3: Gelişim açısından 3.gün embriyosu. (Faz kontrast mikroskobu 10x20) (Halit Serdar SARI)



Şekil 2. 4: Gelişim açısından 5.gün embriyosu. (Faz kontrast mikroskobu 10x20) (Halit Serdar SARI)

2.4.3. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI işleminde yine normal bir fertilizasyondaki temel adımlar izlenmelidir. Gamet füzyonunda olduğu gibi her iki hücre membranı (oolemma ve sperm plasmalemma) geçici olarak bozulmalıdır. Dolayısı ile ICSI sırasında oolemmenin penetre edilmesi (ooplasmanın ani şekilde serbest akış göstermesi olarak gözlemlenir) ve sperm plasmalemmasinin kalıcı olarak kırılması (hareketliliğin durması olarak gözlemlenir) son derece önemlidir.

Bu gereksinimlerden kaynaklı olarak ve mikromanipülatör kullanımının teknik zorluğundan dolayı ICSI işlemi meşakkatli ve potansiyel olarak yumurta hücrelerine zarar verebilecek bir işlemdir.

ICSI tekniği mikromanipülatör kullanılarak invert mikroskopta rutin olarak yapılmaktadır. Dolayısı ile ICSI sırasında gametlerin bulunacağı kültür solüsyonu atmosferik ortama maruz kalacağından HEPES veya MOPS tamponlu kültür solüsyonu kullanılması gerekmektedir.

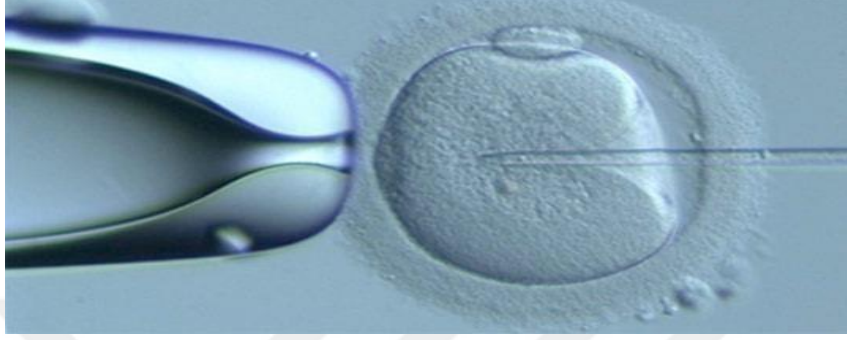
2.4.3.1 ICSI İşlemi Aşamaları

ICSI uygulaması, sırasıyla aşağıdaki işlemleri gerektirir.

1. Dekoronizasyon (Denudation): Hapesli ya da MOPS'lu mediumda oositlerin kümülüs ve korona hücrelerinden temizlenmesi, 4-5 kez yıkama ile enzimin uzaklaştırılması.
2. Az olan spermatozoidlerin konsantrasyonu, döküntülerden temizlenerek manipulasyonlarının kolaylaştırılması veya TESE gibi çok debrili örneklerde geniş damla içinde üzeri mineral yağlı kaplı olarak inkübatörde kenara yüzdürme (swim - out).
3. ICSI kabının hazırlanması: Yağ altı mikrodamların hazırlığı.
4. Mikromanipülatörün hazırlanması: Kontrol sisteminin dengelenmesi ve mikropipet ayarları (Set-up).
5. Spermilerin PVP ve oositlerin Hapesli/MOPS'lu mediumdan oluşan mikrodamlarına yerleştirilmesi. Swim-out'ta sperm toplanması.
6. Sperm immobilizasyonu ve aspirasyonu.
7. Holding pipete oosit (PB,6-12 hizası ya da son yıllarda 7-8, 10-11 arası) aspirasyonu.
8. Spermin, oosit ile aynı seviyeye getirilen enjeksiyon pipetinin en ucuna getirilmesi ve ooplazma ortasına kadar girilmesi, sitoplazma aspirasyonu, aspire edilen ooplazma ve spermin enjeksiyonu.
9. Mikroenjeksiyon sonrası kültür mediumu ile yıkama ve fertilizasyon kültürlenmesi.

Mikroenjeksiyon (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu, ICSI) nedeni açıklanamamış veya önemli derecede erkek faktörünün bulunduğu infertilite durumlarında direk ovum içerisine gradient veya yüzdürme yöntemi ile hazırlanmış sperm hücresinin intrasitoplazmik sperm enjeksiyonudur. Mikroenjeksiyonun gelişmesi, fertilitte sorunlarını tedavisini mümkün kılan bir yöntemdir (Ankara Üniversitesi, 2014).

Mikroenjeksiyon tekniği ile konvensiyonel in vitro fertilizasyon tekniği arasındaki fark, mikroenjeksiyon yönteminde sperm oosit içerisine kendi kendine girmemesidir. Klasik IVF yönteminde ise sperm, oosit içerisine kendi girmesidir. Bu fark dışında diğer aşamalar aynıdır.



şekil 2. 5: Mikroenjeksiyon (ICSI). (Faz kontrast mikroskobu 10x40) (Halit Serdar SARI)

ICSI işleminde, sperm kuyruk hasarı oluşturulur ve mikromanipülatör ile alınıp yumurtaya enjekte edilir (Ebner vd., 2015, Robert, 2010). Enjeksiyon sonrası CO₂ inkübatörüne yerleştirilen petripler ertesı gün 16-18. saatlerde kontrol edilir zigot oluşumu incelenir (Yıldırım, 2000). Döllenme işlemi genellikle 16-18 saat sonra değerlendirilir. Pronukleus değerlendirmesi ve 5. güne kadar embriyo kalitesi Eshre, ASRM, ve Alpha kurallarına göre yapılır (2011).

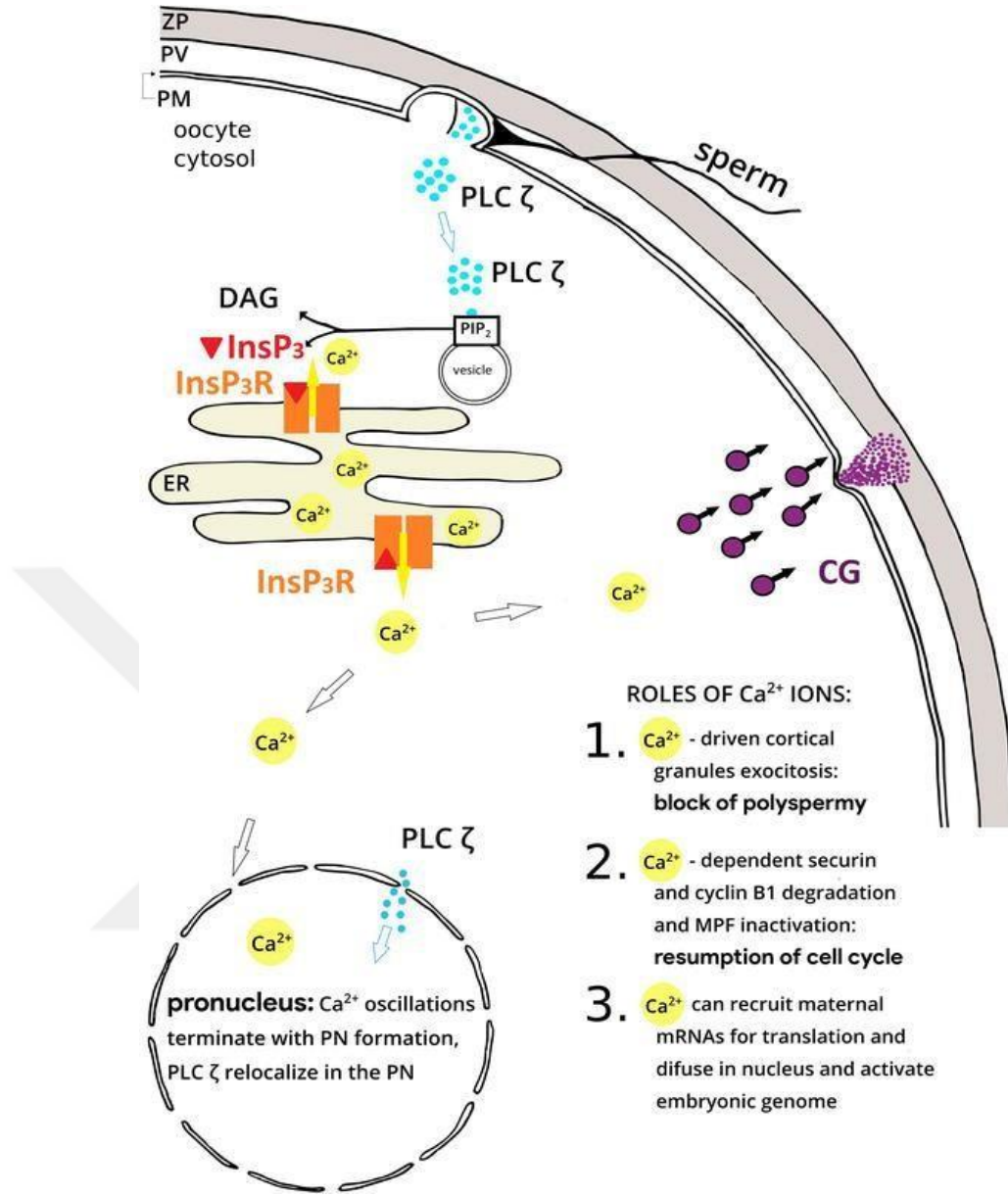


şekil 2. 6: ICSI işleminden 20 saat sonra oluşan zigot. (Faz kontrast mikroskobu 10x40) (Halit Serdar SARI)

2.4.4. Oosit Aktivasyonu

Fertilizasyonu takiben sonra hücre içi kalsiyum iyon (Ca^{++}) salınımı sonrası oosit aktivasyonu gerçekleşir. Bu süreçte polispermi önlenir, oosit mayozu tamamlanır ve dişi ve erkek pronukleuslar oluşur. Araştırma sonuçlarına göre, Ca^{++} iyon salınmasının testise özgü fosfolipaz C zeta (PLC ζ) izoenziminin önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (Hojnik 2019). Bu enzimin aktivasyonu sonucu hücre içi Ca^{++} sinyal yolağının aktive olması ve membran fosfolipidlerini uyaran fosfotidil inozitol 4, 5 bifosfat (PIP2) ile sitoplazmada Ca^{2+} salınışı ortaya çıkar. Yapılan çalışmalar anormal PLC ζ aktivasyonu ile oosit içi Ca^{2+} salınımı yetersiz olur ve dolayısıyla ICSI işlemi başarısız olur. Çalışmalar PLC ζ mutasyonlarının fertilizasyon yetersizliklerine neden olduğunu göstermiştir (Hojnik vd., 2019).

Fertilizasyon sorunları ile birlikte, daha önce yetersiz embriyo gelişimi olan olgularda kalsiyum iyonofor kullanımı uygun görülmektedir (Gardner vd., 2010).



Şekil 2. 7: Fertilizasyon sonrası Oosit Aktivasyonu. Fertilizasyonu takiben sperm aktivasyonunun şematik gösterimi: sperm ve oosit plazma zarının kaynaşmasından sonra PLCζ spermden oosit sitoplazmasına yayılır. PIP₂ taşıyan veziküller sitoplazmada bulunur ve PLC PIP₂'yi DAG ve InsP₃ ürünlerine hidrolize eder. InsP₃, ER zarında bulunan reseptörüne bağlanır. Böylece Ca²⁺ ER'deki hücre içi depolardan sitozol içine salınır. Tekrarlayan Ca²⁺ salınımları kalsiyum konsantrasyonu artışını sağlar. Ca²⁺ iyonları oosit aktivasyonu sağlayarak, perivitellin aralığa kortikal granül salınımını sağlayarak zona pellucidayı kimyasal olarak değiştirir ve polispermının bloke edilmesini sağlarlar. Ca²⁺ iyonları hücre döngüsü ilerlemesini sağlar—meiosis II'nin yeniden başlaması. Hücre döngüsünü durmuş halde tutan faktörlerin Ca²⁺-bağımlı inaktivasyonu, siklinB1 ve securin ve MPF'nin parçalanmasıyla gerçekleşir ve hücre döngüsünün inaktivasyonu sonunda ilerler. Ca²⁺ iyonları mRNA'ların toplanmasında rol oynar ve bunların translasyonunu etkiler. Ca²⁺ çekirdekte yayılabilir ve embriyonik gen aktivasyonunda rol oynar. Ca²⁺ salınımları dışı pronükleus oluştuğunda ve PLCζ pronükleusta yeniden yerleştiğinde sonlanır. (Hojnik vd., 2019)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmada Pembemavi IVF merkezinde 35-40 yaş arası birden çok tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan 173 hastanın iki grup altında incelenmesi planlanmıştır. Hastaların 99'unun oositlerine ICSI işlemi sonrası 15 dk. kalsiyum iyonofor uygulanmış, 74'ünün oositlerine ICSI sonrası kalsiyum iyanofor uygulanmamıştır.

3.2. Tüp Bebek Merkezinde Uygulanan İşlemler

Ovülasyon indüksiyonu, aslında anovülatuar sikluslar olan kadınlarda folikül gelişiminin çeşitli ajanlar yardımı ile uyarılması ve ovulasyonun sağlanması anlamına gelmektedir. Buna karşın günümüzde ovülasyonu olan kadınlarda da folikül gelişiminin yönlendirilmesi, ovülasyonun zamanlaması ya da gametlerin buluşma olasılığının arttırılabilmesi, bir yerine birkaç folikül gelişiminin sağlanması için de kullanılmaktadır. Bu amaca uygun olabilecek farklı ajanlar bulunmaktadır.

Klinikte ovulasyon indüksiyonu amacı ile Human Menopozal Gonotropin kullanılabilir.

Ovulasyon indüksiyonu için doz seçiminde dikkate alınması gereken önemli bir nokta vücut kitle indeksidir (VKI), obez olgularda ihtiyaç duyulan gonadotropin miktar artmaktadır. VKI normal sınırlarda bulunan bir olguda indüksiyona 75-150 IU ile başlanabilir indüksiyon başlangıcında ultrasonografik inceleme ile overlerde bir önceki siklustan kalan bir persiste folikül veya korpus luteum yapısı olup olmadığı kontrol edilmelidir. Böyle bir yapı sonraki takiplerde gelişen bir folikül ile karışarak yanılığa neden olabilir. Menstrüasyonun ikinci gününde gonadotropinlere başlanarak 5-7 gün süre ile aynı dozda devam edilir.

USG kontrolünü takiben 10 mm ve üzerinde folikül saptandığı takdirde aynı doza hCG verilecek güne kadar devam edilir. Yedi gün süreli indüksiyona rağmen 10 mm'nin üzerinde folikül gözlenmemesi halinde doz arttırılabilir.

Sonuç olarak, kliniğimize gelen ve tedavisine başlanan hastalarımıza fazla sayıda oosit elde edebilmek için Antagonist protokol başlandı. Stimülasyon sırasında 5- 6. günlerinde GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon), 3. günde FSH uygulandı. Olgunlaşan oositler insan koryonik gonadotropini (hCG) uygulanarak, enjeksiyondan ortalama 34-36 saat sonra yumurta toplama işlemi gerçekleştirildi. Tedaviye başlayan tüm hastalara eşit koşullarda aynı işlemler uygulandı.

3.2.1. Sperm Örneği Alınması ve Yıkama İşlemi

Semen analizinden sağlıklı sonuç alabilmek için cinsel perhiz süresinin en az 3, en fazla 5 gün olması gerekmektedir. Bu sürenin kısılması sayı ve volümü; uzaması ise hareketliliği olumsuz etkileyecektir. Örnek, mastürbasyon yoluyla ya da spermid içermeyen özel prezervatifler kullanılarak cinsel ilişki sonrasında toplanabilir. Ancak günümüzde mastürbasyon ile örnek alınması tercih edilmektedir.

Tedaviye başlanan hastaların OPU (yumurta toplama) işlemi günü mastürbasyon yöntemiyle alınan semen gradient ile temizlenir. Konik tüpün altına önce 0,5 ml %90'lık sonrasında 0,5 ml %50'lik gradient medyum ve en son olarak 1 ml semen örneği eklendi. Konik tüpler 12 dakika 1300 rpm de santrifüj edildi. Bir pipet ile semen ve gradient tabakaları üzerindeki süpernatant alınır ve 2 ml yıkama medyum (GENEA GEMS SPERM BUFFER) eklenip karıştırıldıktan sonra 6 dakika 1300 rpm de santrifüj edildi. Tekrar süpernatant alınarak 0.5 ml pellet bırakılarak, ICSI işlemi için %6.7 CO2 kalibrasyonlu inkübatöre alınır.

3.2.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU)

Hormonal tedavi ile stimüle edilen overlerde folliküller belli büyüklüğe ulaşınca, preovulatuvar aşamada derhal oosit toplanmasına başlanır.

IVF yaygınlaşmasından önce oositler laparoskopi ile elde ediliyordu. Daha sonra laparoskopi IVF döneminin ilk 10 yılında kullanılan bir yöntem olarak kalmıştır. Ultrasonun hızlı gelişmeleri ile ilk olarak overin görüntülenmesinde ve birkaç öncü çalışmada foliküler matürasyonun monitörizasyonu için kullanıldı. Kullanılan teknikler yıllar içinde birçok açıdan geliştirildi. Günümüzde kullanılan ekipmanlar daha sofistike oldu ve görüntü kalitesi oldukça arttı. Bu da tekniğin güvenilirliğinin artmasını ve kullanımının kolaylaşmasını sağladı.

Genel anestezi altında oosit toplama işlemi transvajinal ultrasonografi ile, tek ya da çift lümenli steril iğne yardımıyla yapılır. Foliküler sıvıdaki oositler, laminar airflow altında stereo mikroskop yardımı ile aranır. Otomatik aspirasyon pompası kullanılarak aspire edilen folikül sıvısı, stereo mikroskop altındaki sıcak yüzey üzerindeki petri kaplarına (NUNC 150370) dökülür. Pastör pipeti yardımı ile bulunan oositler korona kümülüs kompleksi HEPES içeren dishlere alınıp ardından bir gün önceden hazırlanan Global TOTAL LP MEDYUM solüsyonuna kaldırılır. Isı, osmolarite ve pH değişimleri gibi oosit kalitesi ve embriyo gelişimi üzerinde olumsuz etkileri en aza indirmek için, kısa süre içerisinde oositler kültür medyumuna alınır ve inkübatöre kaldırılır.

3.2.3. Denüdasyon (Oositin Temizlenmesi)

Opu işlemi yapıldıktan sonra oositler 4 saat inkübatörde bekletilir. Sonrasında %10'luk Global HEPES ile dilüe edilmiş hyalürodinaz enzimi bulunan centrewell dishlerde pipetleme yapılır. Oositler kümülüs hücrelerinden arındırmak amacıyla temizlenir. Ve kısa süre içerisinde Global HEPES içeren dishlerde pipet çapları azalarak oositler stereo mikroskop altında pipetleme işlemi yapılır. Ardından oosit matürasyon incelemesi yapılır.

3.2.4 ICSI (Mikroenjeksiyon)

Oosit damlası netleştirilir, oosit görüntüsü net iken Holding pipet damlaya inilir. İkisi aynı anda net olduğunda aspirasyonla oosit hafifçe yakalanıp mikrovidayla bir miktar

mikrodamla tabanına doğru yaklaştırılır. Enjeksiyon pipeti ile oosit damlasına inilip joystick yardımı ile ICSI mikropipeti ile oosite yaklaşp enjeksiyona uygun polar cisimcik pozisyonu vermede holding pipete destek verilir. Bu arada oositin çok sıkı tutulmamış olması ve gereğinden serbestleştirilerek ICSI pipetinin desteği ile uygun pozisyonun verilmesinden sonra gerekli sıklıkta tutulması önerilir. Gerekli pozisyonu sağlanan oosit Holding mikroenjektör ile aspire edilerek tam tutulur ve netleştirilir.

Hoffman inverted mikroskopun ısıtıcı tablası üzerinde 10x40 büyütme ile motil spermier toplanır. Bu işlemleri sırasında pipet içinde hızlı sperm hareketi gibi kontrol zorlukları varsa fazla PVP aspirasyonu ile kontrol sağlanmalıdır. Mikropipete doldurulan PVP küçük büyütmede pipetin eklemeni ne kadar geçmiş konumda olursa, mikroenjektörün her bir dönüşüne o kadar kontrollü yanıt vermektedir. ICSI pipeti ile ileri hareketli spermier toplanarak, sperm immobilizasyonu sağlayan PVP'de kuyruğu kırılarak spermier toplanır. Spermin kapasitasyon kazanması için yapılır. ICSI pipeti ile toplanan spermierin, oositlerin olduğu droplarda oosite enjekte edilir. Enjeksiyon işlemi sırasında oositi aktive edebilmek için, sitoplazma aspirasyonu yapılır. Mikroenjeksiyon işleminden sonra bir gün önceden hazırlanan kültür medyumuna (GLOBAL TOTAL LP MEDYUM) kaldırılarak inkübatöre alınır.

3.2.5. Oosit Aktivasyonu (Ca⁺⁺ Uygulanması)

IVF ve ICSI kısırlık için etkili tedavi yöntemleridir. Başarılı dölllenme, gametler arasında uygun etkileşime bağı olan oosit aktivasyonu gerektirir. Aktivasyon başarısızlığı ise, düşük dölllenme oranına sebep olur. Oosit aktivasyonu, Ca²⁺ + salınımı başta olmak üzere bir çok kimyasal olayı tetikler ve bu da dölllenmeye ve embriyo gelişimine yol açar. Hayvan modellerinde, Ca²⁺ + salınımının süresi, genliğı ve sıklığı normal oosit aktivasyonunu ve embriyo gelişimini etkiler. Bu sebeple, ICSI uygulaması sonrası fertilizasyon elde edilemeyen olgulara kalsiyum iyonofor uygulanarak oosit aktivasyonu sağlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla, Kalsiyum iyonofor (GM 508 Cult-Active) solüsyonu ve Global HEPES (+HSA eklenmiş) ile hazırlanan petriyeler bir gün önceden inkübe edilir. Mikroenjeksiyon sonrası oositler laminer flow kabini içerisinde kalsiyum iyonofor dishine alınıp GM 508 Cult-Active

droplarına alınarak 15 dakika 37 santigrad derece, %6,9 CO₂' li ortamda inkübatöre kaldırılır. Daha sonra işlemi tamamlanan oositler Global HEPES (+HSA eklenmiş) medyum ile bolca yıkanarak bir gün önceden hazırlanan Global Total Lp mediumuna alındıktan sonra inkübatöre alınır.

3.2.6. Döllenen Oositlerin Değerlendirmesi

Mikroenjeksiyon işlemi sonrası 16-18 saatleri içerisinde inverted mikroskopda oositler, spermden ve oositten gelen iki adet pronukleusun, 1. ve 2. kutup cisimciğinin görülmesi fertilizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

3.2.7. Oluşan Embriyoların Değerlendirmesi

Bölünme ve blastokist evrelerindeki embriyoların gebelik potansiyeli açısından derecelendirilmesi son derece önemlidir. Embriyonun içinde geliştiği kültür ortamının değerlendirecek güvenilir testler genellikle invaziv olduğundan yapılabilecek tek şey, biçimsel özellikleri kontrol etme ve segmentasyon bölünmeleri hızını dikkate almaktır. Biçimsel özellikler ve segmentasyon bölünmeleri hızı, 2. günde segmentasyon bölünmeleriyle gelinebilen evre ve blastokist evresindeki embriyo kriterleri kullanılır.

Fertilizasyon aşamasından transfer aşamasına kadar olan dönemdeki embriyodaki mitotoik açıdan değerlendirilirken dikkat edilmesi gereken blastomer morfolojisi, blastomer sayısı, embriyonun fragmentasyon seviyesidir. Normal gelişim hızına sahip bir embriyo ikinci günde 2-4 hücre, üçüncü günde 6-8 hücre ve dördüncü günde 10 ve üzeri hücre sayısına sahip ve hücrelerin birleşmeye başladığı embriyo olarak kabul edilir.

3.2.8 Embriyo Transferi

Embriyo transferi hazırlığı, embriyo transfer günü değil, OPU (oosit toplama) günü başlar. Transfer için embriyolog tarafından uygun olarak seçilen, en uygun embriyolar önceden belirlenmiştir. Seçilen ve transferi planlanan en uygun sayıdaki

en kaliteli embriyolar vücut ısısında olan tabla üstünde embriyo transferi kateterine yükler. Embriyo transferini yapacak olan jinekoloğa en kısa sürede iletir. Transfer sonrası ET kateteri hiçbir yere dokunmadan, embriyoloğa verilir ve embriyoloğun, kateter ve kılıfında embriyo retansiyonu olup olmadığını kontrol eder. Eğer retansiyon söz konusu ise, hızlıca yeni bir yükleme yapılır ve yeniden transfer yapılır.

3.2.9. Gebelik Değerlendirmesi

Embriyo transfer işlemi tarihinden 10 gün sonra kanda yapılan Beta- hCG testi sonucu 50 mIU/ml' nin üzerinde çıkan sonuçlar gebeliğin pozitif olduğunu gösterir.

3.2.10 Verilerin Toplanması

Çalışmada 2023-2024 yılları arasında Özel Pembemavi Hastanesi Tüp Bebek Kliniğinde tedavisine başlanan ve ICSI sonrasında kalsiyum iyonofor uygulanan 99 çift ile ICSI sonrası kalsiyum iyonofor uygulanmayan 74 çiftin dosyalarından elde edilen bilgiler toplandı. Bu hastalarda döllenmiş olan oosit sayısı, klivaj embriyo sayıları, 5. güne ulaşan embriyo sayısı ve klinik gebelik oranları retrospektif olarak incelendi.

Kalsiyum iyonofor uygulamasında; ICSI işlemi sonrası 15 dakika inkübatörde kalsiyum iyonofora maruz bırakılan oositler, daha sonra yıkanıp kültür ortamlarına alınır.

Kontrol ve deney grubu daha önceki denemelerinde fertilizasyon problemi yaşayan (TFF, fertilizasyon düşüklüğü veya klivaj azlığı gibi), iki ya da daha fazla denemesi olan, 35-40 yaş aralığındaki ve tek embriyo transferi olan hastalardan oluşmaktadır. Kalsiyum iyonofor uygulanan hastalar deney grubuna, kalsiyum iyonofor uygulanmayan hastalar ise kontrol grubuna dahil edildi.

3.2.11 İstatistiksel Analiz Sonuçları

İstatistiksel analiz için Graphpad prism programı kullanılarak, deney ve kontrol grubundaki verilerin normal dağılımından anlamlı düzeyde bir farklılık olup olmadığı incelenmiştir. Sonuç olarak elde edilen verilerin normal bir dağılım göstermediği anlaşılmıştır. Farklılıkların saptanması için non-parametrik testler kullanılmaktadır. Deney ve kontrol grubu karşılaştırmalarında veriler normal dağılım göstermediği için parametrik olmayan test yöntemlerinden Mann-Whitney testi uygulanmıştır.

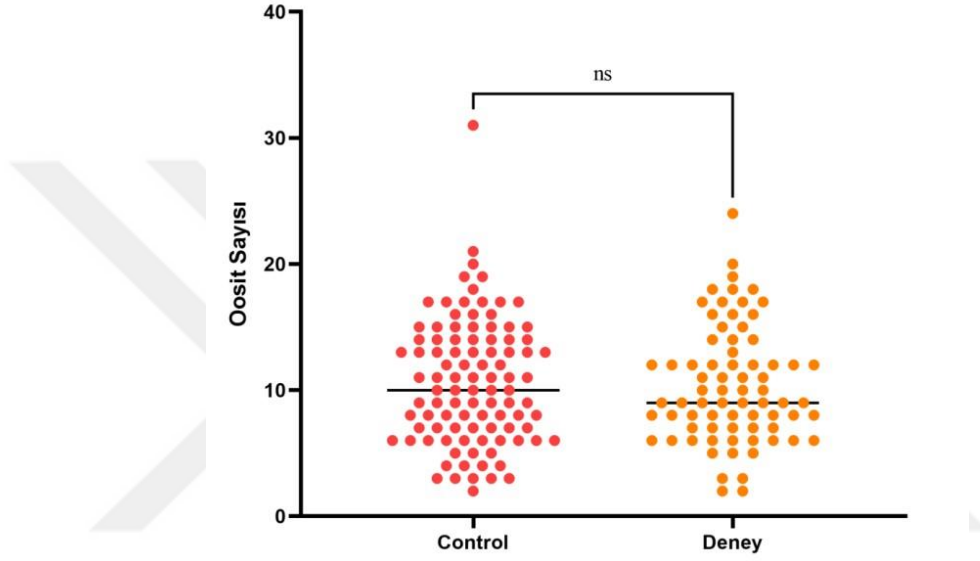
4. BULGULAR

Çalışmaya iki ya da daha fazla denemesi olan, 35-40 yaş aralığındaki ve tek embriyo transferi olan hastalara, fertilizasyon sırasında ICSI sonrasında kalsiyum iyonofor protokolü uygulanan 99 çiftten toplanan 1057 oosit elde edilirken, kalsiyum iyonofor uygulanmayan 74 çiftten 768 oosit elde edilerek, çalışmaya toplam 1825 oosit dahil edildi.

4.1 Kontrol ve Deney (Ca⁺⁺ uygulanmış) Grupları Arasında Elde Edilen Verilerin Karşılaştırılması

Tablo 4.1: Elde edilen oosit sayılarının gruplara göre karşılaştırılması.

Toplam oosit sayısı (1825)	Grup	N	Oosit Sayısı	Ortalama	Std. Sapma	P
	Deney	99	1057	10,68	4,98	0,23
	Kontrol	74	768	10,38	4,60	

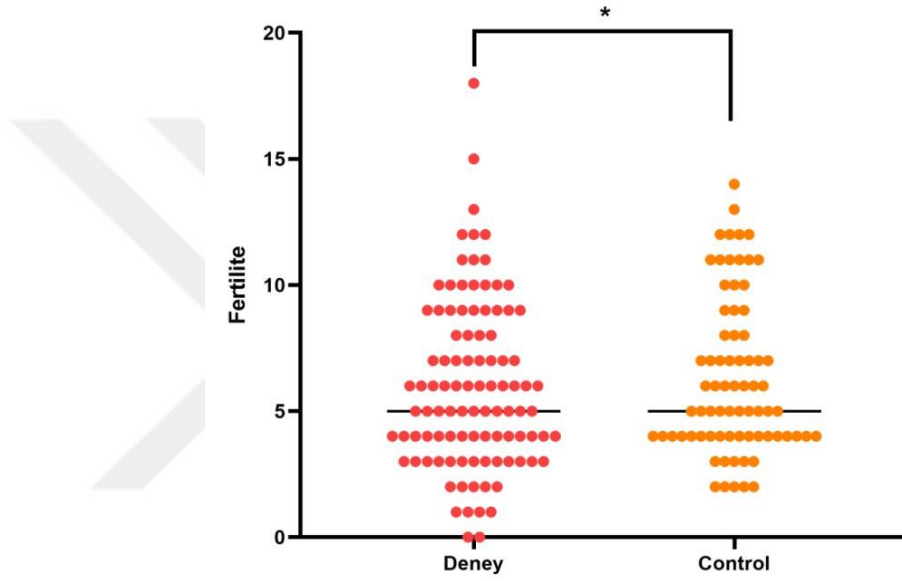


Şekil 4. 1: Elde edilen oosit sayılarının gruplara göre karşılaştırılması.

Toplanan oosit sayısının gruplar arasında farklılık göstermediği tespit edildi ($p>0,05$). Deney grubuna ait toplam oosit sayısı ortalaması ($10,68\pm 4,98$), kontrol grubuna ait toplam oosit sayısı ortalaması ($10,38\pm 4,60$) olduğu görülmektedir. Ortalama oosit sayıları arasında anlamlı düzeyde farklılık bulunmadığı deney ve kontrol grupları arasında yapılan incelemeler sonucunda görülmüştür ($p>0,05$). (Tablo 7.1.1).

Tablo 4.2: Fertilize oosit sayılarının gruplara göre değerlendirilmesi.

Toplam Fertilize Oosit Sayısı (1061)	Grup	N	Fertilize Oosit Sayısı	Ortalama	Grup içinde başarı %'si	Std. Sapma	P
	Deney	99	594	6	56,19	3,37	0,04
	Kontrol	74	421	5,68	54,82	3,10	



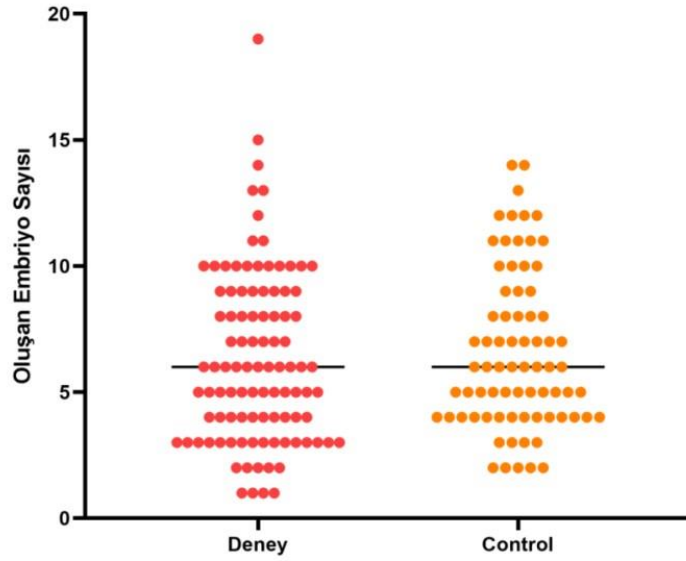
Şekil 4. 2: Döllenen oosit sayılarının karşılaştırılması.

Döllenen oosit sayılarının gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi ($p>0,05$).

Deney grubu döllenmiş oosit sayısı ortalaması ($6\pm 3,37$), kontrol grubu fertilize olan oosit sayısı ortalaması ($5,68\pm 3,10$) olduğu görülmektedir. Deney grubu döllenmiş oosit sayısı kontrol grubunda anlamlı düzeyde farklılık olduğu görülmüştür. (Tablo 7.1.2).

Tablo 4.3: Oluşan embriyo sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması.

Toplam Oluşan Embriyo Sayısı (1098)	Grup	N	Oluşan Embriyo Sayısı	Ortalama	Std. Sapma	P
	Deney	99	624	6,30	3,43	0,04
	Kontrol	74	457	6,18	3,20	



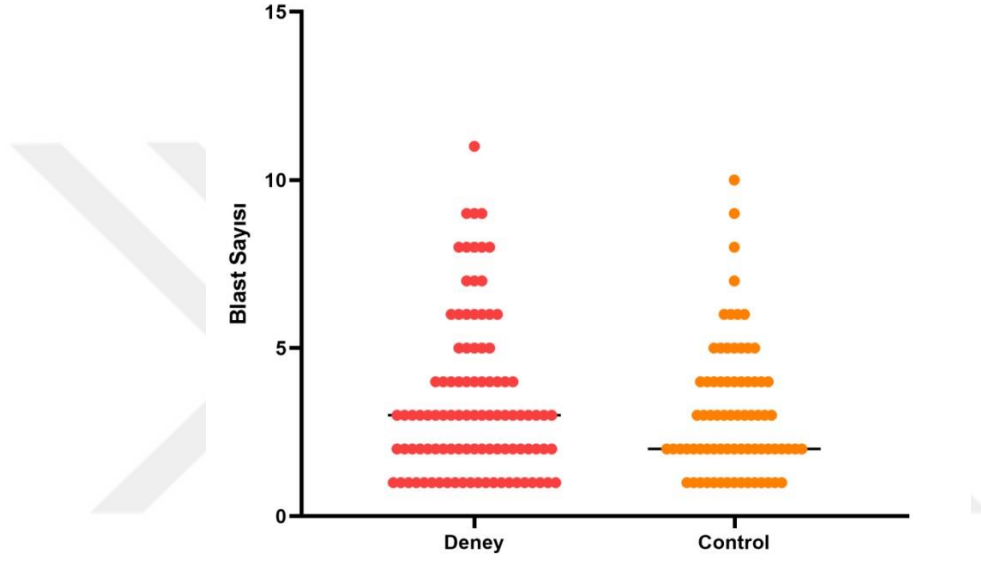
Şekil 4. 3: Gelişen embriyo sayısının karşılaştırılması.

Gruplara göre oluşan embriyo sayısının anlamlı farklılık gösterdiği görülmüştür. ($p>0,05$).

Deney grubu gelişen embriyo sayısı ortalaması ($6,30\pm 3,43$), kontrol grubu gelişen embriyo sayısı ortalaması ($6,18\pm 3,20$) olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ve deney grubu oluşan embriyo sayılarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık vardır. (Tablo 7.1.3).

Tablo 4.4: Oluşan blastokist sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Toplam Oluşan Blastokist Sayısı (531)	Grup	N	Blastokist Sayısı	Ortalama	Std. Sapma	P
	Deney	99	301	3,04	2,06	0,04
	Kontrol	74	203	2,74	1,96	



Şekil 4. 4: Oluşan blastokist sayısının gruplara göre karşılaştırılması.

Oluşan blastokist sayısının kontrol ve deney grupları arasında anlamlı farklılık gösterdiği görüldü ($p>0,05$).

Deney grubu oluşan blastokist sayısı ortalaması ($3,04\pm 2,06$), kontrol grubu oluşan blastokist sayısı ortalaması ($2,74\pm 1,96$) olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmektedir. (Tablo 7.1.4).

Tablo 4.5: Elde edilen klinik gebelik sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması.

Toplam Gebelik Sayısı (89)	Grup	N	Gebelik Sayısı	Ortalama	Std. Sapma	P
	Deney	99	58	58,58	0,049	0,033
	Kontrol	74	31	41,89	0,057	

Klinik gebelik sayısının deney ve kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p>0,05$).

Deney grubu klinik gebelik sayısı ortalaması ($58,58\pm 0,049$), kontrol grubu klinik gebelik sayısı ortalaması ($41,89\pm 0,057$) olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark olduğu görülmektedir. (Tablo 7.1.5).

Tablo 4.6: İlk muayenede kese görülen hastaların gruplara göre karşılaştırılması.

Toplam Kese Görülen Hasta Sayısı (88)	Grup	N	Kese Görülen Hasta Sayısı	Ortalama	Std. Sapma	P
	Deney	99	58	58,58	0,049	0,018
	Kontrol	74	30	40,54	0,057	

Transfer işlemi sonrası yapılan ilk muayenede görülen keselerin deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi ($p>0,05$). Deney grubu görülen kese ortalaması ($58,58\pm 0,049$), kontrol grubu ortalaması ise ($40,54\pm 0,057$) olduğu görülmektedir. Kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir. (Tablo 7.1.6)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasının amacı, embriyo gelişimi için yeterli oosit aktivasyonu sağlanamayan hastalarda kalsiyum iyonofor kullanılarak gerçekleştirilen oosit aktivasyonunun embriyo gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışmaya bu amaçla 35-40 yaş aralığında, fertilizasyon işleminde kalsiyum iyonofor işlemi yapılan 99 çift deney grubu ile fertilizasyon sırasında kalsiyum iyonofor işlemi yapılmayan 74 çift de kontrol grubu olarak seçilmiştir.

Çalışmanın amacı doğrultusunda, önceki denemelerinde TFF, fertilizasyon düşüklüğü, klivaj azlığı, blastokist arrest ve benzeri durumlar gösteren 99 hasta deney grubunun metafaz II evresindeki oositlerine ICSI sonrası kalsiyum iyonofor tedavisi uygulanmıştır.

Elde edilen veriler sonucunda fertilizasyon da sorun yaşayan hastaların deney ve kontrol grubu verileri incelendiğinde, ICSI sonrası kalsiyum iyonofor uygulanan deney grubunda fertilize olan oosit sayısı, embriyo sayısı, blastokist sayısı ile klinik gebelik oranı ve ilk muayenede kese görülen hasta sayılarında anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

IVF ve ICSI kısırlık için etkili olan tedaviler olduğu kesin olarak bilinmektedir. Fertilizasyon başarısızlığı genellikle ICSI sonrası oositlerin yaklaşık %30 civarında görülmektedir. Düşük fertilizasyon oranı ise ICSI sonrasında oosit fertilizasyonunun %25'den az gerçekleşmesi olarak bilinmektedir. ICSI gerçekleştikten sonra oluşan total fertilizasyon başarısızlığı %1,29 ile %3 aralığında görülen bir olaydır (Alberto vd., 2008).

“Spermin oositi aktive edememesi fertilizasyon problemlerine neden olan başlıca sebeplerden biri olarak görülmektedir. Oosit aktivasyonunun gerçekleşmesi spermoosit füzyonunun gerçekleşmesinden sonra oluşan çok önemli bir olaydır. Oosit aktivasyonunun in vivo olarak gerçekleşmesi ve embriyogenezin başlamasını sağlayan, döllenmiş oositlerdeki nükleer ve sitolojik gelişimlerin tam olabilmesi için

oosit içerisindeki hücre içi kalsiyum salınımının düzgün bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Yapay oosit aktivasyon yöntemlerine ise oosit aktivasyonunun doğal yollarla gerçekleşmediği durumlarda başvurulmaktadır.” (Ramadan vd., 2012).

Oosit aktivasyonu amacıyla kalsiyum iyonofor kullanımı ise ilk olarak 1990’larda başlamıştır (Veeck, 1999).

Vanden Meerschaut ve arkadaşlarının yaptığı prospektif çalışmada, ICSI işlemi sonrasında döllenme gerçekleştirilemeyen ve aktivasyon eksikliğinden şüphelenilen olgularda yapay oosit aktivasyonunun (AOA) etkili olduğu gösterilmiştir.

1995 yılında Hoshi ve arkadaşları ICSI sonrasında embriyo oluşum oranını arttırmak ve oosit aktive etmek amacıyla kalsiyum iyonofor kullanmış ve olumlu sonuçlar almışlardır (Yanagida, 2004).

1997 yılında Rybouchkin ve arkadaşlarının, yaptıkları çalışmada, oosit aktivasyon bozukluğu bulunan olgularda kalsiyum iyonofor uygulaması yaptıkları hastalarda oosit aktivasyonu saptamışlardır (Rybouchkin vd., 1997).

Fertilizasyon başarısızlığı bulunan vakalarda ICSI sonrası uygulanan kalsiyum iyonoforun fertilizasyonun başlamasında etkili olduğunu 2005 yılında Heindryckx ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarında rapor etmişlerdir (Heindryckx vd., 2005).

Kalsiyum iyonofor uygulaması sırasında yüksek dozda kalsiyum iyonoforun uzun süreli etkileşimi, kromozomlarda geri dönüşü mümkün olmayan hasarlara yol açabilmektedir. Ancak, düşük konsantrasyonlarda ve kısa süreli gerçekleştirilen kalsiyum iyonofor tedavisinin oositlerde sitotoksik etkiler oluşturmadığı bildirilmektedir. Yapılan insan ve fare oositlerine yönelik sitogenetik analizlerde, kalsiyum iyonofor ile aktivasyon sağlanan oositlerin %70-80 gibi yüksek bir oranında kromozom anomalisinin olmadığı ve bu oositlerin normal bir morfolojiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Yamano vd., 2000).

ICSI uygulaması sonucu olguların yaklaşık olarak %2-3 ünde fertilizasyon başarısızlıkları ile karşılaşılmaktadır (Yamano vd., 2000). Borges ve arkadaşları cerrahi olarak çıkardıkları spermiler ile yapılan ICSI uygulamasında, kalsiyum iyonofor ile oosit aktivasyonu gerçekleştirdiklerinde fertilizasyon oranının arttığını gösterdiler (Borges vd.2009).

Araştırmacılar uygulamanın zamanlamasının da başarıyı etkilediğini gösterdiler. NasrEsfahani ve arkadaşları teratozoospermik hastalarda Ca iyonoforu ICSI'den 48 ve 72. saatlerde denediler ve kaliteli embriyo oranlarında farklılık göremediler (Nasr-

Esfahani vd., 2007). Eftekhar ve arkadaşları tarafından 2013 de yapılan bir çalışmada, ICSI uygulamasından hemen sonra iyonofor kullanılmasının başarılı dölleme ve iyi kaliteli embriyo elde edildiği gösterildi (Eftekhar vd., 2013). Biz de çalışmamızda bu şekilde aktivasyon prosedürü uyguladık. Araştırmacıların çalışmalarında, dölleme ve bölünme oranı sırasıyla %72,5 ve %62,7 idi. Ancak iyi kaliteli embriyo oranının düşük olduğu görüldü. Çalışmamızda elde edilen blastokist sayısının iyonofor uygulanmış olgularda kontrole kıyasla yüksek bulduk, bu sonuç diğer araştırmacıların elde ettiklerinden daha yüksek olduğu anlaşıldı. ICSI'den sonra zamanın uygulama süresinin fazla geç olmasının negatif etki oluşturduğu çalışmaların sonuçlarından anlaşılmaktadır. Bu çalışmalar, oositin kalsiyum iyonofora maruz bırakılması için 24 saatlik bir ortalama süre olduğunu gösterdi.

Çalışmamızda yüksek embriyo gelişimi ile birlikte abortus oranlarını kontrole oranla yüksek bulduk, klinik gebeliğin ise daha başarılı olduğunu gösterdik.

Çalışmamızın sonuçları, iki grup arasında implantasyon, kimyasal ve klinik gebelik oranlarında önemli bir fark olduğunu gösterdi. Bu bulgular ICSI döngülerinde kalsiyum iyonofor kullanılarak yapılan yapay oosit aktivasyonunun implantasyon ve klinik gebelik oranlarını artırdığını desteklemektedir.

Çalışmadan elde edilen verilerin incelenmesi sonucunda, kalsiyum iyonofor işlemi yapılan ve kalsiyum iyonofor işlemi yapılmayan grupların döllemiş oosit sayıları,

fertilizasyon oranı, klivaj embriyo sayıları, blastokist embriyo sayılarının karşılaştırması yapılmıştır. Karşılaştırma sonucunda, kalsiyum iyonofor kullanılan deney grubunun döllenmiş oosit sayıları, fertilizasyon yüzdesi, klivaj embriyo sayıları, blastosist sayılarında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu sonucunda varılmıştır. Böylelikle, bu tez çalışmasının literatüre katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple, bütün bu verilerin incelenmesi sonucunda kalsiyum iyonoforun güvenilir olduğunun kanıtlanabilmesi amacıyla gelecekte konu ile ilgili daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

Anderson, SE., Dallal, GE., Must, A. (2003). "Relative weight and race influence average age at menarche: results from two nationally representative surveys of US girls studied 25 years apart". *Pediatrics*.

Ankara Üniversitesi Açık Ders, İn-vitro fertilizasyon (IVF) Ve Embriyo Transferi(ET) (2014). Ankara Üniversitesi. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/20140/mod_resource/content/1/infertilitte%20ders%206.pdf

Bakı Acar, D, & Bastan, A. (2011). Activation of bovine oocytes following ICSI and effect of activation on embryo according to developmental stages. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17(4), 631-6.

Balaban, M., Brison, D., & Van den, E. (2011). AbbeelAlpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.*

Barroso, G., Valdespin, C., Vega, E., Kershenovich, R.; Avila, R.; Avendaño, C.; Oehninger, S. (2009). "Developmental sperm contributions: fertilization and beyond". *Fertility and Sterility.* 92 (3), 835–848.

Björvang, Richelle, D., Damdimopoulou, Pauliina. (2 April 2020). "Persistent environmental endocrine-disrupting chemicals in ovarian follicular fluid and in vitro fertilization treatment outcome in women". *Uppsala Journal of Medical Sciences.* 125 (2): 85–94.

Borges, Jr E, de Almeida Ferreira Braga, DP, de Sousa Bonetti, TC, Iaconelli, Jr A, Franco, Jr JG. (2009). Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa. *Fertil Steril.* 92 131–136.

Brackett, BG, Bousquet, D, Boice, ML, Donawick, WJ, Evans, JF, Dressel, MA. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod.* 27, 147-58.

Bradley, J., Van Voorhis, M.D. (2007). In vitro fertilization, *The New England Journal Of Medicine.*

Brydøy, M, Fosså, SD, Dahl, O, Bjørø, T (2007). "Gonadal dysfunction and fertility problems in cancer survivors". *Acta Oncol.* 46 (4), 480–9.

Can, M., Doç. Dr. DURUKAN KÖSE, S., Uzm. KARAGÖZ, CAN N., (2017). Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi.

De Leo, V, Musacchio, MC, Cappelli, V, Massaro, MG, Morgante, G, Petraglia, F. (2016). "Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update". *Reproductive Biology and Endocrinology (Review).* 14 (1), 38.

Ebner, T., Oppelt, P., Woßber, M., Staples, P., Mayer, R.B., Sonnleitner, U., BulfonVogl, S., Gruber, I., Haid, A.E., Shebl, O. (2015). Treatment with Ca²⁺ Ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: a prospective multicenter study. *Human Reproduction.*

Eisenbach, M., & Giojalas, L. C. (2006). "Sperm guidance in mammals an unpaved road to the egg". *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 7 (4): 276–285.

Fernandez, H., Capmas, P., Lucot, J. P., Resch, B., Panel, P., Bouyer, J. (2013). "Fertility after ectopic pregnancy: The DEMETER randomized trial". *Human Reproduction.* 28 (5): 1247–1253.

Freizinger, M., Franko, DL., Dace, M., Okun, B., Domar, AD. (2008). "The prevalence of eating disorders in infertile women". *Fertil. Steril.* 93 (1): 72–8.

Gardner, D. K., Weissman, A., Howles, C. M., Shoham, Z. (2010). Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı, çeviri İrez. T., Kaleli. S., Arda. O. İstanbul. *Nobel Tıp Kitabevleri*.

Gould M. (2012). *Biology of Fertilization V3 : the Fertilization Response Of the Egg*. Oxford: Elsevier Science.

Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, RA., Bhattacharya, S. (2011). "Defining infertility a systematic review of prevalence studies". *Human Reproduction Update*. 17 (5): 575–588.

Heindryckx, B., Van der Elst, J., De Sutter, P., Dhont, M. (2005). Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod*. 20(8) 2237-41

Hirohashi, Noritaka, & Yanagimachi, Ryuzo (2018). "Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization". *Biology of Reproduction*. 99 (1): 127–133.

Hojnik, N., & Kovačić, B. (2019). Oocyte Activation Failure: Physiological and Clinical Aspects. *IntechOpen*.

İnvitro fertilizasyon ve embriyo transferi (IVF-ET).
<https://usaum.ankara.edu.tr/invitro-fertilizasyon-ve-embriyo-transferi-ivf-et/>

Karas,. T., Marczylo, T. H., MacCarrone, M., Konje, J. C. (2011). "The role of sex steroid hormones, cytokines and the endocannabinoid system in female fertility". *Human Reproduction Update*. 17 (3): 347–361.

Karuppaswamy, J., Smedley, M., Carter L., (2009). Intra-uterine insemination: pregnancy rate in relation to number, size of pre-ovulatory follicles and day of insemination. *J Indian Med Assoc*. 107(3), 141-3.

Kollmann, M, Martins, WP, Raine-Fenning, N. (2014). "Terms and thresholds for the ultrasound evaluation of the ovaries in women with hyperandrogenic anovulation". *Human Reproduction Update*. 20 (3): 463–4.

Leelabati, B. Tyc, Katarzyna, El Yakoubi, Warif, Morgan, Katie, Xing, Jinchuan, Schindler, Karen. (2021). "Meiosis interrupted: The genetics of female infertility via meiotic failure". *Reproduction*. 161 (2): R13 – R35.

Leslie, Stephen W., Siref, Larry E., Khan, Moien, AB. (2020), "Male Infertility", StatPearls, Treasure Island (FL). *StatPearls Publishing* retrieved.

Mahutte, NG, & Arici, A. (2003). Failed fertilization: is it predictable? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 15(3), 211-8.

Melese Shenkut Abebe, Mekbebe Afework, Yeshiwas Abaynew, (2020). *Primary and secondary infertility in Africa: systematic review with [meta-analiz]*

Meryem Eftekhari, Sima Janati, Mojgan Rahsepar, Abbas Aflatunyan (2013). *Effect of oocyte activation with calcium ionophore on ICSI outcomes in teratospermia*. *Reprod Med*. 11(11):875-82. [A randomized clinical Iran]

Miles, Linda. (2022) "LibGuides: BIO 140 - Human Biology I - Textbook: Chapter 45 - Fertilization". guides.hostos.cuny.edu. Retrieved.

Mogobe, D. K. (2005). "Denying and Preserving Self: Batswana Women's Experiences of Infertility." *African Journal of Reproductive Health* (9;2): 26-37.

Montag, M., Köster, M., van der Ven, K., Bohlen, U., van der Ven, H. (2012). The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle. *Reprod Biomed Online*. 24(5), 521-6.

Nasr-Esfahani, MH., Razavi, S., Javdan, Z., Tavalae, M. (2008). Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 90 2231–2237.

Nomikos, M., Yu, Y., Elgmati, K., Theodoridou, M., Campbell, K. (2012).

Vasilakopoulou V. Erkek İntertilitesinin Başarısız Oosit Aktivasyonunun Fosfolipaz İle Önlenmesi. *Erkek Üreme Sağlığı.* (S.36-37).

Ombelet, W., & Van Robays, J. (2015). "Artificial insemination history: hurdles and milestones". *Facts, Views & Vision in ObGyn.* 7 (2), 137–143.

Özgök, Y., Kilciler, M., Durmuş, M., Tahmaz, L., Soydan, H., & Erduran, D. (2001). Oligospermik hastalarda yardımcı üreme teknikleri öncesinde sperm fonksiyonlarının düzenlenmesi. *Türk Üroloji Dergisi.*

Prefertilization Events, (2022, 28 Kasım). www.med.umich.edu

Prof. Dr. Tülay İrez ,Elder, Dale,İn vitro fertilizasyon Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN,9789754209600

Prof.Dr. Tülay İrez, Prof.Dr.Semih Kaleli, Prof.Dr. Oktay Arda. (2010). Textbook of Assisted Reproductive Technologies D. Gardner et al, Turkish edition (Nobel Tıp Kitapevi,2010)

Puga Molina, LC., Luque, GM., Balestrini, PA., Marín-Briggiler, CI., Romarowski, A., Buffone, MG. (2018). "Molecular Basis of Human Sperm Capacitation". *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 6, 72.

R. Edwards, & P. Steptoe. (1980). A Matter of Life: The Story of a Medical Breakthrough (London: Hutchinson).

Ramadan, W M., Kashir, J., Jones, C., Coward, K., (2012). Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLCz): diagnostic and ther apeutic implications for a ssisted reproductive technology. *Cell Commun Signal.* 10, 12.

Robert G. (2010). Nobelförsamlingen The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, *Human In Vitro Fertilization*.

Rybouchkin, A.V., Van der Straeten, F., Quatacker, J., De Sutter, P., Dhont, M. (1997). Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril*. 68(6), 1144-7.

Sarria-Santamera, A., Orazumbekova, B., Terzic, M., Issanov, A., Chaowen, C., Asúnsolo-Del-Barco, A. (2020). "Systematic Review and Meta-Analysis of Incidence and Prevalence of Endometriosis". *Healthcare*. 9 (1), 29.

Shamsi, MB., Imam, SN., Dada, R. (2011). "Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility". *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 28 (11), 1073–1085.

Sigman, M., Howards, SS. (1998). Male infertility. Campbell's Urology Walsh PC., Retik AB., Vaughan ED., Wein AJ. (eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia. 2: 1287-1330.

Siristatidis, C., Bhattacharya, S. (2007). Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter?. *Human Reproduction*. 2084– 2087

Sughashini Murugesu, Srdjan Saso, Benjamin P Jones, Timothy BracewellMilnes, Thanos Athanasiou, Anastasia Mania, Paul Serhal, Jara Ben-Nagi. (2017). Does the use of calcium ionophore during artificial oocyte activation demonstrate an effect on pregnancy rate?.[meta-analiz]

Swain, J.E., & Pool T.B. (2008). ART failure: Oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human Reproduction Update*. 14(5):431-46.

Tejera, Alberto, et al. (2018). "Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient." *Fertility and sterility* 90(4) 1202-e1.

Upkong D., & Orji E. (2006).Mental health of infertile women in Nigeria. *Turk Psikiyatri Dergisi*. 17(4).

Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., De Gheselle, S., Dullaerts, V., Van Den Abbeel, E., Gerris, J. (2012). Assisted oocyte activation is not beneficial for allpatients with a suspected oocyte-related activation deficiency. *Hum Reprod*. 27(7) 1977-84.

Veeck, LL. (1999). An atlas of human gametes and conceptuses, An illustrated reference for assisted reproductive technology. *The Panthenon Publishing Group*. New York.

Yamano, S., Nakagawa, K., Naka saka, H., & Aono, T. (2000). Fertilization failure and oocyte activation. *J. Med*. 47 1-8.

Yanagida K. (2004). Complete fertilization failure in ICSI. *Hum Cell*. 17 187-194.

Yıldırım M. (2000). Klinik İnfertilite. *Eryılmaz Ofset*. (Yıl 2013, Cilt 5, Sayı 2, S. 162 – 178).