

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZAL FOLİKÜL STİMÜLAN HORMON DÜZEYİNİN
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU SONUÇLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

Biyolog Nihal Yıldırım

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2006

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZAL FOLİKÜL STİMÜLAN HORMON DÜZEYİNİN
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU SONUÇLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

Biyolog Nihal Yıldırım

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meral Koyutürk**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. İNFERTİLİTE.....	4
4.2. OOGENEZ	6
4.3. FOLİKÜL STİMÜLAN HORMON (FSH) VE OOGENEZ.	6
4.4. OVER REZERVİ	10
4.5. ICSI VE DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER.....	11
4.5.1. Fertilizasyon.....	12
4.5.2. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi, Embriyo Transferi	12
4.5.3. Gebelik Oranları	12
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER	13
5.2. ÇALIŞMA GRUBU	14
5.3. ICSI	14
5.3.1. Hasta Hazırlanması.....	14
5.3.2. Oosit Toplama İşlemi	14
5.3.3. Oosit Temizleme İşlemi	15
5.3.4. Semen Analizi.....	15
5.3.5. Mikroenjeksiyon	16
5.3.6. Fertilizasyon ve Embriyo Gelişimi	17
5.3.7. Transfer İşlemi ve Gebelik	17
5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	18
6. BULGULAR	19
7. TARTIŞMA	25

8. SONUÇ.....	28
9. TEŞEKKÜR	29
10. KAYNAKLAR.....	30

SİMGE VE KISALTMALAR

EFOR	: Eksojen efort FSH ovaryan rezerv testi
E2	: Östradiol
FSH	: Folikül stimulan hormon
GNRH	: Gonodotropin salgılatıcı hormon
GV	: Germinal vezikül
HCG	: İnsan koryonik gonodotropin
HSA	: İnsan serum albumin
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	: İn vitro fertilizasyon
IUI	: İntra uterin inseminasyon
KOH	: Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu
LH	: Luteinizan hormon
MII	: Metafaz iki oosit
MI	: Metafaz bir oosit
OAT	: Oligo asteno teratospermi
OHSS	: Ovaryan hiperstimülasyon sendromu
OPU	: Oosit toplama işlemi
P	: Progesteron
PN	: Pronükleus
PVP	: Polivinil pirolidon
PZD	: Parsiyel zona diseksiyonu
SUZİ	: Subzonal sperm inseminasyonu
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri
WHO	: Dünya sağlık örgütü

T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurulu tarafından 20.1.2006 Tarih ve B.104. İSM. 4340014/290 numaralı Karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi Numarası: HE / 0182004

1. ÖZET

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) erkek kaynaklı infertilite tedavisi için yaygın olarak kullanılan yardımcı üreme tekniğidir. Yardımcı üreme tekniklerinde amaç, uygun tedavi protokolu ve yöntemleri kullanarak kaliteli gamet hücreleri ile embriyo ve gebelik elde edilmesidir. Yaşla birlikte overlerdeki germ hücre havuzu azalmaktadır. Bununla birlikte kadınlarda ilerleyen yaş ile paralel olarak azalan over rezervi, gonodotropin stimülasyonuna yanıtın azalmasına neden olmakta ve tedavide başarı şansını olumsuz olarak etkilemektedir. Yıllar içerisinde over progresif olarak folikül havuzunu kaybeder ve inhibin seviyesi düşer, buna karşılık adenohipofizden folikül stimulan hormon (FSH) salınımı artar. Bu nedenle günümüzde erken fazda ölçülen bazal FSH değerleri over rezervinin önemli bir belirteci olarak kabul edilmektedir. FSH değeri, oosit rezervinin yanı sıra kaliteli oosit ovulasyonu açısından önem taşır. Bazal FSH ölçümlerinin in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında gebelik sonuçları üzerine etki eden önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini bildiren pekçok çalışma mevcuttur.

Bu çalışmada, kadın hasta bazal FSH düzeyinin ICSI sonuçları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. ICSI tedavisine alınan 99 çift çalışma grubumuza dahil edildi. Hastalar bazal FSH <10 IU/ml ve FSH >10 IU/ml olan kadın ve normospermili erkek hastalar ile bazal FSH <10 IU/ml, FSH >10 IU/ml olan kadın ve oligospermili erkek hastaların oluşturduğu dört grup altında toplandı. Bazal FSH değeri <10 IU/ml olan normospermili ve oligospermili gruplarda, toplanan oosit sayısı ve metafaz II (MII) oosit sayısı, FSH değeri >10 IU/ml olan her iki gruba göre artmış olarak bulundu ve gruplar arası istatistiksel anlamlılık izlendi. Metafaz I (MI) ve germinal vesikül (GV) içeren oosit gelişimi, fertilizasyon oranları ve takiben elde edilen embriyoların 2. ve 3. gün iyi ve kötü kalite embriyo oranları arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı. Gebelik oranları bazal FSH < 10 IU/ml olan normospermili grupta 33.3, oligospermili grupta 40.0, FSH >10 IU/ml olan gruplarda ise sırasıyla 18.8 ve 26.7 olarak bulundu. Bazal FSH değerleri >10 IU/ml olan grupta gebelik oranları düşme göstermesine karşın istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi.

2. SUMMARY

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is an assisted reproductive technic widely used for the treatment of male originated infertility. The goal in assisted reproductive technics is to obtain quality oosite and embryo by using appropriate treatment protocols and methods. The pool of germ cells in the ovaries decreases by age. However the ovary reserves that decrease in parallel with increased age in women cause the decrease in the response to the stimulation applied by gonodotrophines and negatively affects the chances of success in treatment. In years, the ovary progressively looses the follicle pool and inhibin level decrease, conversely the follicle stimulating hormone (FSH) releasing increase from adenohypophysis. For this reason the FHS values measured in the early phase are accepted as an important indicator of the ovary reserves. FSH value also carries importance for the ovulation of quality oosits in addition to the oosit reserves. There are several reports that basic FSH value can be used as an important indicator having affected on the pregnancy results in the in vitro fertilization (IVF) applications.

This study aims to examine the effects of the basal FSH level in women on the ICSI results. 99 couples accepted for ICSI treatment were included in our study. The patients were grouped into four with basal FSH < 10 IU/ml, FSH >10 IU/ml women and normo spermic patients and basal FSH <10 IU/ml, FSH >10 IU/ml women and oligospermic patients. The oosit numbers in the groups with basal FSH value < 10 IU/ml normosperm and oligosperms and the metaphase II (MII) oosit counts were found to have increased relative to the two groups with FSH values >10 IU/ml and there was statistical significance between the groups. There was no statistical significance between metaphase I (MI) and germinal vesicle (GV) oosit development, fertilization rates and between the good and bad quality ratios of the following embryos in the 2nd and 3rd days. Pregnancy rates were 33.3 in the normosperm group and 40.0 with oligosperm groups with FSH < 10 IU/ml and 18.8 and 26.7 respectively in the FSH >10 IU/ml groups. Even though there was reduced pregnancy in the group with basal FSH values >10 IU/ml a statistical significance was not observed.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite korunmasız olarak cinsel ilişkiye girilmesine rağmen bir yılı aşan sürede çiftlerin çocuk sahibi olamama durumu olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda çiftlerin % 80-85'inin ilk yılın sonunda gebe kaldığı ve bu oranın 2. yılın sonunda % 90'ı aştığı görüldüğünden, genç çiftlerde incelemeler başlamadan önce bekleme süresi 2 yıla çıkarılabilir. Ancak kadınlarda 35 yaş sonrasında ve özellikle 37 yaşından sonra fertilitte çok belirgin bir şekilde azalmaya başladığından ileri yaştaki kadınlarda bekleme süresinin kısaltılmasında yarar vardır (1).

İnfertilite tedavisinin tayini için çiftler tedavi öncesi bir grup tanısal testlerden geçmektedir. Erkek infertilitesinin belirlenmesinde spermiogram önemli rol oynar. Kadınlarda tedavi şeklinin belirlenmesi ve elde edilecek başarı, gamet hücrelerinin elde edileceği overlerin kapasitelerinin tam olarak değerlendirilmesine bağlıdır (2). Over rezervinin değerlendirilmesinde bazal FSH, luteinizan hormon (LH), östradiol (E2), progesteron (P), inhibin düzeyleri, antral folikül sayısı gibi tetkikler bunlardan bir kaçıdır. Bunlardan en önemlisi erken dönemde siklusun 3. gününde bakılan bazal FSH değeridir. Bazal FSH seviyesi yaşa göre ovaryan cevabı aynı zamanda üreme potansiyelini gösteren güçlü bir parametredir. Serum FSH seviyesinin artışı, over rezervinin ve üreme potansiyelinin azaldığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Araştırmalar 3. gün bazal FSH artışının, ovulasyonda azalmaya ve siklus düzeninde bozukluklara yol açarak üreme potansiyelini etkilediğini göstermektedir (3,4).

Yüksek bazal FSH değerlerinin toplanan oosit sayılarında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (5). IVF tedavisine alınan kadınlarda yüksek FSH değerlerinin, siklus iptaline, folikül maturasyonu için kullanılan gonodotropinde doz artışına, düşük sayı ve kalitede oosit eldesine, ayrıca elde edilen embriyo sayı ve kalitesinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (6). Bazal FSH değerinin IVF sonuçları üzerine etkilerinin pekçok araştırmaya konu olmasına karşın veri tabanlarında FSH değerlerinin ICSI sonuçları üzerine etkisini gösteren çalışma mevcut değildir.

Çalışmamızda bazal FSH değerlerinin toplam oosit sayısı, MII, MI, GV oosit gelişimleri, fertilizasyon oranları, 2-3. gün embriyo gelişimleri ve gebelik sonuçları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite çiftlerin yaklaşık %10-20'sini etkileyen bir problem olup, istem dışı çocuk sahibi olamama veya korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen 1 yıllık süre sonunda gebe kalınmaması olarak tanımlanmaktadır (1). Çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin % 85'i bir yıl içinde başarılı olabilmektedir. İnfertilitenin % 40-45'i kadına, %40-45'i erkeğe bağlı olabileceği gibi %15-20 oranında her iki cinse bağlı sorunlar birarada bulunabilmektedir ya da konvansiyonel infertilite tetkikleri ile sorun ortaya konamamakta ve açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmaktadır (1). İnfertilite tedavisinde yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır. Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) vücut dışında oosit ve spermle ilgili işlemlerin yapılmasını içeren bir yöntemdir. Bu kapsamda yaygın olarak kullanılan iki teknik IVF ve ICSI uygulamalarıdır.

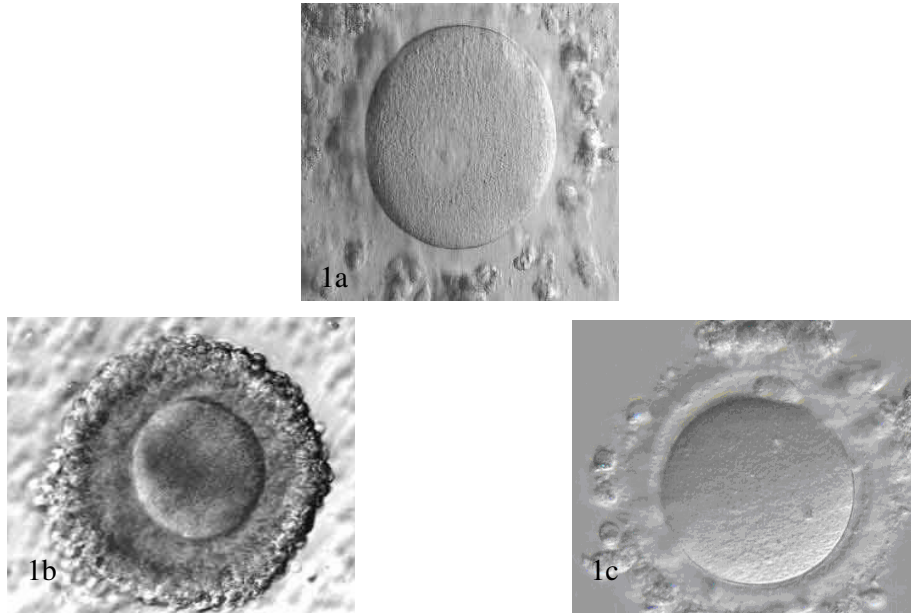
YÜT günümüzde infertil çiftlere yardımcı olma konusunda yeni ufuklar açmıştır. IVF uygulamaları ilk olarak tamir edilemeyen tubal hasarı olan çiftlere yardımcı olmak adına geliştirilmiş ise de günümüzde pek çok endikasyon için kullanılmaktadır. Ciddi tubal hasar, ileri erkek faktörü gibi başka yolla tedavi edilemeyecek mutlak endikasyonlar yanında diğer tedavilerin başarısız olduğu multifaktöriyel infertilite durumlarında da uygulanmaktadır (7).

Yardımcı üreme tekniklerinde mikromanüplasyonun kullanılması, şiddetli erkek infertilitesine çözüm olan ICSI ile önem kazanmıştır. Konvansiyel IVF 1984 yılından itibaren erkek subfertilitesinde de kullanılmaya başlanmışsa da (8) başarının sınırlı olması ve tekniğin şiddetli erkek infertilitesine çözüm olmayışı nedeniyle araştırmacılar mikromanüplasyon tekniklerine yönelmişlerdir. Bu amaçla kullanılan yöntemler öncelikle parsiyel zona disseksiyonu (Partial Zona Dissection, PZD) (9) ve subzonal sperm enjeksiyonudur. (Subzonal Sperm Injection, SUZİ) (10). PZD ve özellikle SUZİ ile şiddetli erkek infertilitesinde fertilizasyon oranı ancak %20 oranlarına çıkarılabilmektedir.

Fertilizasyon oranının düşük olması, her iki yöntem içinde yeterli sayıda progresif motil sperm bulunması gerekliliği ve ayrıca SUZİ'de polispermik fertilizasyonla sık karşılaşılması, yöntemlerin dezavantajı olarak değerlendirilmiştir (11).

ICSI ilk kez 1992'de Palermo ve arkadaşları tarafından (12) şiddetli erkek infertilitesine çözüm olarak gösterilmiş ve YÜT'de en önemli gelişme olarak kaydedilmiştir. ICSI'nun başarıyla uygulanabileceğini gösteren ilk çalışmalarda, daha önceki konvansiyonel IVF uygulamalarında fertilizasyonun gerçekleşmediği (Fertilization Failure, FF) ya da fertilizasyon oranının %5 veya daha altında olan olgular ile sperm parametrelerinin konvansiyonel IVF için uygun olmadığı olgular (total progressif motil sperm sayısının <500.000 den az olması) seçilmiştir.

Konvansiyel IVF'de sperm parametrelerinin yeterli olduğu durumlarda bile olguların %10-15'inde fertilizasyon gerçekleşmeyebilmektedir. ICSI uygulamalarında ise fertilizasyon başarısızlık oranı yaklaşık %3 olup genellikle yumurta sayısının az olduğu olgularda görülmektedir (13,14). Bugün artık ICSI endikasyonlarına bir yenisi daha eklenmiş ve oosit sayısının az olduğu olgularda da erkek faktörüne bakılmaksızın ICSI uygulanması prensip olarak kabul edilmiştir. ICSI'nin kullanıma girmesiyle birlikte; işlem öncesi kumulus-korona hücrelerinin temizlenmesi sonucu oositlerin morfolojik özellikleri ve matürasyonları daha ayrıntılı bir şekilde incelenebilmektedir (Resim1) (15).



Resim 1: (a) Germinal vesikül içeren bir GV oosit, (b) Metafaz I oosit ve (c) Metafaz II oosit izlenmekte.

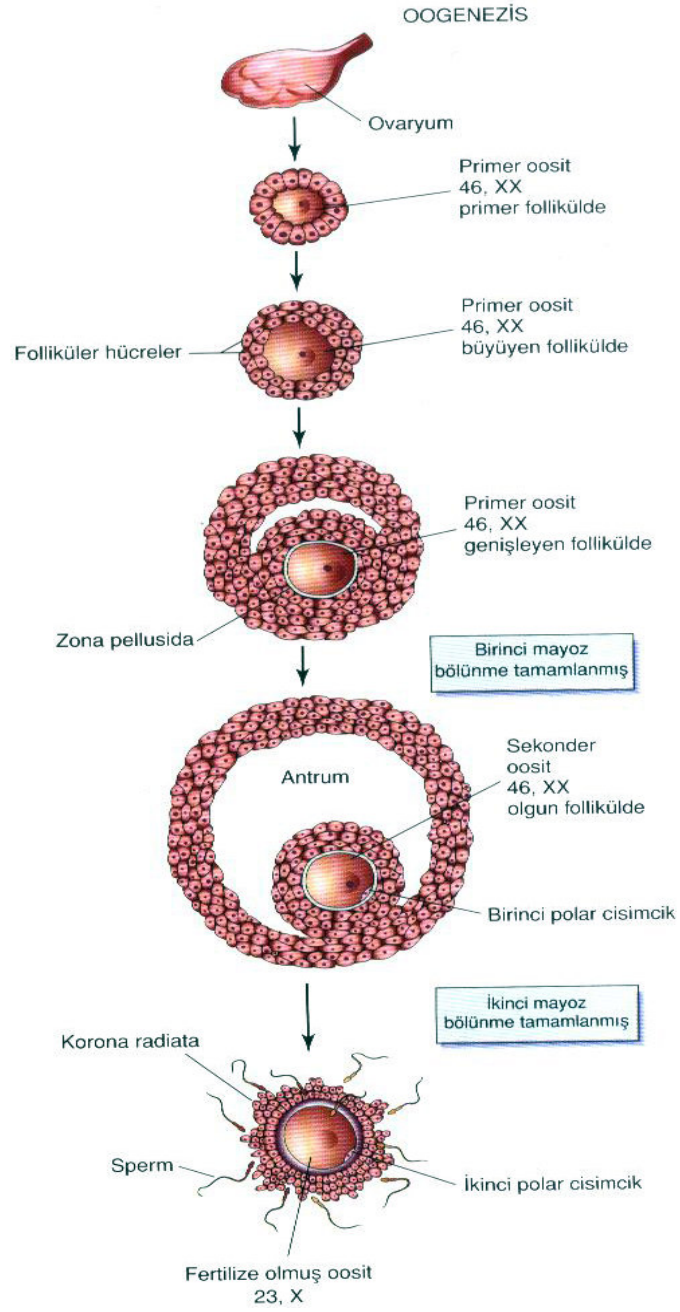
4.2. OOGENEZ

Oogenez, primordial germ hücrelerinin yolk salkdan gonadlara göçü ve oogoniumlara farklılaşması ile başlar. Oogoniumların çoğu mitozla bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı mayoz bölünmenin profaz aşamasında bekleyerek primer oositlere farklılaşır. Beşinci ayda oogoniumların sayısı maksimum düzeye yaklaşık 7 milyona kadar ulaşır. Bu sırada hücre ölümüne başlar, geriye kalan oositlerin tümü mayoz bölünmenin profaz aşamasındaki primer oositlerdir. Primer oositlerin herbiri yassı tek katlı epitel hücreleri ile çevrilidir. Oositler puberteye kadar birinci mayoz bölünmenin profaz safhasında beklerler. Pubertede her siklusta 4 ile 10 arasında folikül gelişmeye başlar ancak bunlardan sadece 1-2 tanesi gelişimini tamamlayarak ovulasyonla atılır. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasıyla bir sekonder oosit ve polar cisimcik oluşur. Takiben ikinci mayoz bölünme başlar ve metafaz aşamasında oosit ovule olur. İkinci mayoz bölünme ancak spermin oosit sitoplazmasına girmesi ve uyarması ile tamamlanır. İkinci mayoz bölünme sonucunda ikinci polar cisim ve kalıcı oosit oluşur. Kalıcı oosit kromozomları pronukleus adı verilen vesiküler bir çekirdek içerisinde yeniden yapılıncı (16,17).

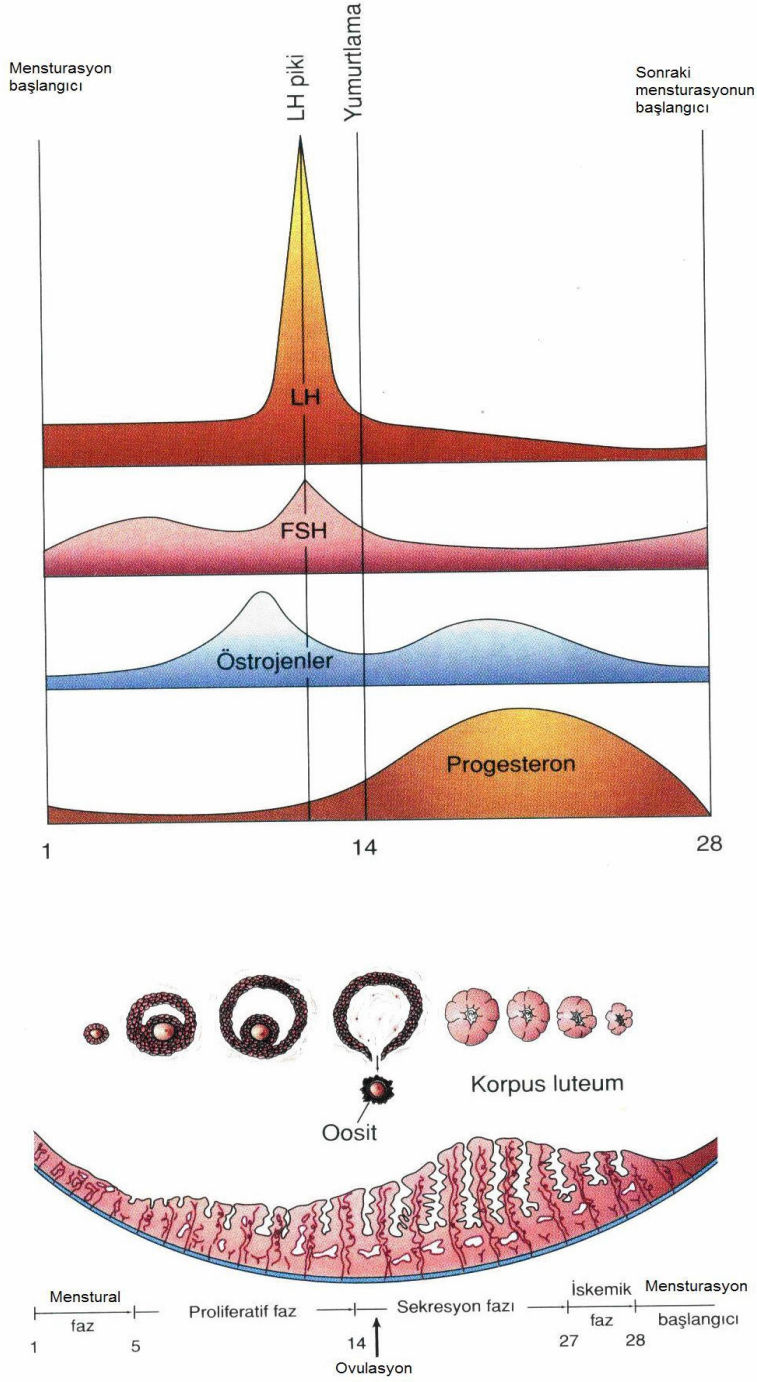
4.3. FOLİKÜL STİMÜLAN HORMON (FSH) VE OOGENEZ

Kadın doğurganlığının yaşla birlikte azalması, ileri yaşta kadın hastalarda oosit kalitesinin azalmasıncı bir sonucudur. 35 yaş üstü bayanlarda oosit kalitesinin azalması sonucu, gebelik eldesinde azalma, spontan abortus risklerinde artış olduğu bildirilmiştir. Ancak oosit kalitesinin azalması her kadın hastada aynı oranda olmamaktadır. Oosit kalitesindeki bu değişimler erken dönemde bakılabilecek klinik testler ile tanımlanabilmektedir (18,19). Bu testlerden biri erken dönemde bakılan (menstrual siklusun 2 veya 3. günlerinde) bazal FSH değeridir. Bazal FSH değeri oosit kalitesini gösteren önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Çalışmalarda over stimülasyon sürecinde yüksek bazal FSH konsantrasyonu değerlerinin folikül sayısında azalmaya ve gebelik potansiyelinde düşüslere neden olduğu bildirilmekte, ayrıca yüksek bazal FSH konsantrasyonu ile anöploidik gebelikler arasında bir ilişki olduğu ifade edilmektedir (20). FSH oosit matürasyonunu da sağladığı için oogenesisde kritik bir öneme sahiptir. Bir diğerc önemli etkisi ise granüloza hücrelerinde proliferasyonu ve androjen aromataz enzimi

sentezinin indüksiyonunda rol almasıdır (21). Erken hormonal kontrol, foliküler gelişimi ve oogenezi indükleyerek siklusun tam zamanında olmasına yardımcı olur. Hipotalamustan başlayan bu kontrol buradan GNRH salınımıyla ön hipofizden FSH ve LH hormon salınmasına sebep olur. Erken preantral dönemde granüloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonu gerçekleşir. Erken foliküler gelişim döneminin FSH'dan bağımsız olmasına karşın preovulatuvar antral dönem gelişimi için granüloza hücrelerindeki reseptörlere bağlanan FSH uyarısı gerekir. Teka hücrelerinde de korpus luteumun büyümesini stimüle eden LH hormonu için reseptör eksprese edilir. Teka hücreleri aynı zamanda granüloza hücrelerince östrojene çevrilen androjeni üretirler. Östrojen üretimi folikül gelişimine paralel olarak artar. Östrojen ön hipofize etki ederek FSH ve LH salınımını baskılar ve GNRH'nun hipofiz üzerine olan etkisini inhibe eder, endometriyum gelişimine ise destek olur. Dominant folikülden salınmaya başlanan inhibinde ön hipofize etki ederek, FSH salınımını baskılar. Sadece dominant folikül FSH'dan bağımsız olarak gelişimini sürdürebilir (17).



Şekil 1: Oogenez (16)



Şekil 2: Menstrual siklus boyunca FSH, LH ve östrojen hormonlarının kan düzeyleri (16).

4.4. OVER REZERVİ

İnfertilite tedavisinin belirlenmesi ve elde edilecek embriyo kalitesinde gamet hücrelerinin iyi değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bu amaçla erkeklerde yapılacak spermogram incelemesi, kadınlarda ise over rezervinin uygun şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Over rezervi kadınlarda fertilize olma yeteneğine sahip oosit gelişimini ifade eder ve fertilite potansiyeli ile direkt ilişkilidir. Değerlendirme sonuçları tedavi şeklini ve başarıyı doğrudan etkilemektedir .

Over rezervinin doğumdan itibaren yaşın ilerlemesi ile birlikte azalmaya başladığı bilinmektedir. Doğumda 1-2 milyon civarında olan primordial folikül sayısı menarşda 250 000'e düşmekte, repröduktif yaşamın sonunda ise geriye sadece birkaç yüz folikül kalmaktadır (2).

Over rezervi ve bu rezervi oluşturan foliküllerdeki kayıp hızında genetik olarak anneden kız çocuğuna aktarılan ailesel eğilimin katkısı olduğu düşünülmektedir (2). Over rezervini tayin etmek için bir çok parametre kullanılmaktadır. Bunlar bazal FSH düzeyi, E2 ölçümü, FSH /LH oranı, klomifan sitrat testi, inhibin B seviyesi, anti müllerian hormon seviyesi, GNRH agonist stimülasyon testi (GAST) ve eksojen FSH ovarian reserve testi (EFORT) gibi parametrelerden oluşmaktadır. Diğer non invaziv testler ise over volümünün tayini, antral folikül sayısının değerlendirilmesi ve over stromal kan akımının doppler ile ölçülmesidir. Ancak bu testlerden en sık kullanılanı siklusun 2. yada 3. günü bakılan bazal FSH değeridir (22-26). Kadın yaşının artması ile özellikle 35 yaşından itibaren oosit sayı ve kalitesinin giderek azaldığı bilinmektedir. İleri yaştaki kadınlarda yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen oositlerde çeşitli morfolojik değişiklikler gözlenmektedir. Bu oositlerde tipik olarak genişlemiş perivitellin aralık, debride ve ince zona pellusida izlenmektedir. Over rezervinin azalması ile beraber oosit kalitesinde bozulma izlenmektedir. Over rezervindeki kayıp daha genç yaşlarda da ortaya çıkabilmekte veya ileri yaştaki kadınların overlerinde beklenenin üzerine çıkabilmektedir. Genel olarak kadınların %10'unda overlerin erken yaşlanması sorunuyla karşılaşmaktadır (2)

Over rezervini olumsuz etkileyen faktörler: yüksek yaş, siklusun 2. veya 3. günü yüksek bazal FSH düzeyi, bazal östradiol seviyesinin yüksekliği, antral folikül sayısının azlığı ve inhibin düzeyinde düşüş olarak tanımlanabilir.

Menstrasyonun 2. veya 3. gününde değerlendirilen E₂'nin yüksek olması over rezervinin kısıtlı olması yönünde önem taşımakta, ancak FSH'dan daha iyi bir belirleyici

olarak kabul edilmemektedir. İlerleyen yaş ve azalan over rezervi ile paralel olarak inhibin B seviyesinde azalma olduğu ve bu azalmanın FSH değerlerindeki artışın öncüsü olduğu bildirilmiştir. Over rezervinin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan parametre bazal FSH değeridir. Overlerdeki folikül gelişimini uyarıcı FSH'nın kan düzeyi, over cevabı azaldıkça daha yüksek uyarıcı bulunmak için giderek artış gösterir. Bir süre sonra FSH'nın uyarıcısı yeterli olmamakta, overlerde folikül gelişimi azalmakta ve premenopoz dönemi başlamaktadır. Bu dönemin öncesinde folikül gelişimi bozulmakta, kısa foliküler faz ve düzensiz ovulasyonlara bağlı menstrasyon düzensizlikleri gözlenmektedir. Üçüncü gün FSH değeri 10 IU/ml ve üzerinde saptanan olgularda overlerin indüksiyona veya kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu (KOH) verdiği cevabın zayıf olduğu bilinmektedir (2).

4.5. ICSI VE DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER

ICSI tek bir sperm hücrenin oosit içerisine enjekte edilmesidir. Şiddetli erkek infertilite tedavisi için başvuru olan ICSI, 1992 yılından beri uygulanmakta olup geleneksel IVF için uygun olmayan hastalarda tercih edilmektedir (27).

Oositler ovarian foliküllerden transvajinal olarak toplanır. Toplanan matür MII oositler öncelikle kumulus ve korona tabakalarından hyalüridinaz enzimi ile uzaklaştırılır. Ejakülasyondan ya da epididimis veya testisten elde edilen bir sperm 6-7 mikrometre çaplı pipetler ile zonayı aşarak oosit sitoplazmasının ekvatorial bölgesine bırakılır. Enjeksiyon esnasında oosit aktivasyonu için oosit sitoplazması aspire edilir ve tekrar enjekte edilir (28). Farklı kriterlerdeki hastalar için ICSI uygulaması önerilmektedir. Özellikle sperm parametrelerinde şiddetli oligozoospermia ($<2-10 \times 10^6$ sperm/ml), şiddetli asthenozoospermia ($<5-10$ motil sperm), kötü sperm morfolojisi (<4 normal form) gibi anomali belirlenen, önceki IVF tedavilerinde başarısız sonuç alan ve cerrahi olarak sperm elde edilen hastalarda kullanılmaktadır. Son çalışmalar şiddetli erkek infertilitesinden bağımsız olarak düşük sayıda oosit toplanan hastalarda da kullanılabileceğini bildirmektedir (29).

4.5.1. Fertilizasyon

Fertilizasyon genellikle tuba uterinanın en geniş ve uzun parçası olan ampullada gerçekleşir. Fertilizasyon sperm ile oositin membranlarının temasıyla başlar, sperm çekirdeği ile oosit çekirdeğinin oosit sitoplazması içinde birleşmesi ile karakterizedir. ICSI uygulanan oositlerde 16-18 saat sonra 2 pronükleus, birinci ve ikinci kutup cisimciği görülmesi normal fertilizasyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir. 1PN ve 3PN görülmesi anormal fertilizasyon göstergesidir. Her iki çekirdekte meydana gelen olayların eş zamanlı olması döllenme ve ileri embriyo gelişimi açısından önem taşımaktadır.

4.5.2. Embriyo Kalitesinin Değerlendirmesi ve Embriyo Transferi

Embriyo kalitesi değerlendirilirken blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, embriyonun içerdiği fragmantasyon oranı ve sitoplazmik özellikler dikkate alınır. Gelişim potansiyeli iyi kalitede olan embriyolar anne uterusuna transfer edilir (30). Embriyo transferi fertilizasyondan yaklaşık 48 saat sonra yapılır. Çoğul gebelik riskini azaltmak içinde 2-3 embriyo transferi tercih edilmektedir (31).

4.5.3. Gebelik Oranları

Anne uterusuna transfer edilen embriyonun endometriyuma implante olması sonucunda gebelik gelişir. Embriyo gelişiminin 2. günü 4 –5, 3. günü 7 veya daha fazla blastomer sayısına sahip, %20'den daha az fragmantasyon içeren ve multinükleotid içermeyen embriyoların implantasyon potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmektedir (32).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER

G Sperm w HSA	(Vitrolife 10107)
Puresperm 100	(Nidacon ETH101-LE/02)
G Mops w HSA	(Vitrolife 10108)
G Fert w HSA	(Vitrolife 10107)
G Mops	(Vitrolife 10068)
G1 w HSA	(Vitrolife 10104)
G2 w HSA	(Vitrolife 10105)
Ovoil 100	(Vitrolife 10029)
ICSI	(Vitrolife 10111)
Hyase –10 X	(Vitrolife 10017)
Diff – Quick	(Allegiance Healthcare Corp.)

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma grubumuza infertilite merkezine çocuk sahibi olmak için başvurmuş ve ICSI uygulanan 99 hasta dahil edildi. Sonuçların sperm parametrelerinden etkilenmemesi ya da en az etkilenmesi amaçlanarak normo ve oligospermili erkek hastalar ve 40 yaşın altındaki bazal FSH değeri < 10 IU/ml ve >10 IU/ml olan kadın hastalar çalışma grubuna dahil edildi. Normospermili eşlere sahip FSH < 10 IU/ml olan 33, FSH > 10 IU/ml olan 18, oligospermili eşlere sahip FSH < 10 IU/ml olan 31 ve FSH > 10 IU/ml olan 17 kadın hasta değerlendirildi. Bazal FSH siklusun 2. yada 3.günü HCG'nin verildiği gün immüno lumetrik olarak ölçüldü.

5.3. ICSI

5.3.1. Hasta Hazırlanması

İnfertilite merkezine başvuran çiftlerde erkek partnere semen analizi yapıldı. Örneğin genel değerlendirilmesi WHO kriterlerine, morfolojik değerlendirmesi ise Kruger kesin kriterlerine göre yapıldı (33). ICSI işleminin yapılacağı gün semen sayı, motilite ve morfoloji yönünden tekrar değerlendirilerek uygun olan yıkama yöntemi belirlendi (34). Kadınlara ise over stimülasyonu uygulandı. Stimülasyon için gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH analogları, lucrin; abbot, Fransa) ve rekombinant gonodotropinler (FSH – Gonal F; Serono –Turkey, Puregon; Organon, Almanya) kombine olarak uygulandı.

Ovaryumların tedaviye verdiği cevap ultrason ve serum östradiol seviyeleri ölçümü ile takip edildi. Folikül çapı en az 18 mm çapına ulaştığında 5000 ya da 10000 IUI insan koryonik gonodotropini (HCG) (Pregnyl; Organon) enjeksiyonu yapıldı ve oosit toplama aşamasına geçildi (35).

5.3.2. Oosit Toplama İşlemi

HCG enjeksiyonundan 36 saat sonra oositler transvaginal olarak ultrasonografi ile toplandı. Aspire edilen folikül sıvısı steril aspirasyon tüpüne alınarak laboratuvarda steril bir kültür kabına döküldü, laminar air flow altındaki stereo mikroskop altında (SMZ 800 Nikon, SZ 61 Olympus) korona-kumulus kompleksi arandı. Oosit karşılama mediumu

(Gmops+HSA, Vitrolife, İsveç) içine alınan oositler Gfert+HSA (Vitrolife, İsveç) medyumuna ile yıkanarak bu medyum içinde 2-3 saat inkübe edilmek üzere 37 °C'deki %5 CO₂'lik inkübatöre (Heraeus 6000) kaldırıldı.

5.3.3. Oosit Temizleme İşlemi

Oosit matürasyonunun değerlendirilmesi ve mikroenjeksiyon işlemi için oosit etrafındaki korona-kumulus hücreleri temizlenerek uzaklaştırıldı. Temizleme işlemi, OPU (Oositlerin toplanması) dan minimum 2 saatlik inkübasyon süresi sonrası hyaluronidaz enzimi (Hyase 10, Vitrolife, İsveç) kullanılarak gerçekleştirildi. Enzim içine alınan oositler yaklaşık 15-20 sn cam pasteur pipetle alınıp verilerek etrafındaki kumulus-korona kitlesinden kısmen temizlendi. Oosit etrafında kalan kumulus hücreleri GMops+HSA (Vitrolife, İsveç) medyumunda 150-135 µm olmak üzere farklı çaplı pipetler (Mid atlantic diagnostik inc 800) (648-1151) kullanılarak mekanik olarak temizlendi. Pipetleme sonrası (G1+HSA, Vitrolife, İsveç) medyumunda yıkanan oositlerin invert mikroskopta (Nikon Eclipse, TE-300, Japonya) X40 büyütmede matürasyon değerlendirilmesi yapıldı. Sitoplazması homojen gözüken ve polar cisimciği bulunan oositler metafaz II, polar cisimciği gözükmeyen oositler metafaz I, germinal vesikül içeren oositler ise GV olarak değerlendirildi. ICSI işlemi sadece MII oositlere yapılırken MI ve GV oositlere ise yapılmadı.

5.3.4. Semen Analizi

Hastalardan üç ile beş günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon ile semen alındı. 37 °C'deki (N 400 nüve 5515) etüvde likefiye olan semenin hacmi tayin edildi. Sperm konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi için standart manuel teknikler uygulandı.

Motilite ve konsantrasyon ışık mikroskopunda X20 büyütmede WHO (World Health Organization) kriterlerine göre yapıldı. Makler sayma kamarasına (Makler chamber, Sefi Medikal Instr. İsrail) 10µl semen koyularak ve X20 büyütme altında 10 kare sayılarak motilitesi belirlendi.

Morfolojik skora için lam üzerine yayılarak hazırlanan semen preparatları Diff-Quick yöntemi ile boyandı. Morfoloji X100 büyütmede faz kontrast mikroskopta kruger kesin kriterlerine göre değerlendirildi.

ICSI işlemi öncesi semen örneği yıkandı. İşlem öncesinde semene ikili gradiyent yöntemi yapıldı. Bu amaçla Puresperm 100 (Nidacon, İsveç) ve G sperm+HSA (Vitrolife, İsveç) medyumunu ile %90'lık ve %45'lik olmak üzere iki farklı gradiyent hazırlandı. İki steril konik tüpe önceden oda ısısına getirilmiş %90 ve %45'lik gradiyentlerden 1'er cc yavaşça koyularak birbirine karışmayan iki tabaka oluşturuldu. Likefiye olmuş semen örneğinden 1'er cc bu tabakaların üzerine yavaşça bırakıldıktan sonra 1300 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. (Heraeus Labofuge 400, Almanya). İki tüpün süpernatantı 0,5 cc kadar çekildi ve kalan pellet bir tüpe toplandı. Üzerine 3 cc kadar Gsperm+HSA (Vitrolife, İsveç) eklenerek 2200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra tüpün dibinde 0,5 cc kalacak şekilde süpernatant alındı, pellet süspanse edildi. Yıkama sonrası konsantrasyon ve motilite değerleri tespit edilerek mikroenjeksiyon için kullanıldı.

5.3.5. Mikroenjeksiyon

Oositler toplandıktan 2-3 saat sonra mikroenjeksiyon işlemi yapıldı. Öncelikle mikroenjeksiyonun yapılacağı kültür tabağı hazırlandı. Bu tabağa (Falcon 1006, Fransa) oosit sayısına göre GMops+ HSA (Vitrolife, İsveç) medyumundan 5µl'lik oosit damlaları, hemen yanına 5µl'lik sperm hareketini yavaşlatan vizköz yapıdaki PVP (polivinilpirolidon) (ICSI –100, Vitrolife, İsveç) damlacığı yapıldı. Damlalar 3 cc ovoil (Vitrolife, İsveç) ile kapatıldı.

Mikroenjeksiyon işlemi Hoffman modülasyonu ve Narishige mikroenjeksiyon ünitesi içeren bir invert mikroskopta (Nikon Eclipse TE 300, Japonya) ısıtıcı tabla üzerinde X200 büyütme objektif altında gerçekleştirildi. İşlem enjeksiyon pipeti ile bir tutucu pipet kullanılarak gerçekleştirildi. Hareketli, morfolojik olarak normale yakın olan bir sperm seçildi. Enjeksiyon pipetinin uç kısmı sperm kuyruğunun üzerine getirildi.

Sperm kuyruğu, pipet ile kültür tabağının tabanı arasında sıkıştırılarak immobilize edildi. Sperm baş kısmı önde olacak şekilde enjeksiyon pipetine çekildi. Oosit polar cisimciği saat 6 yada 12 hizasında olacak şekilde 9 hizasında sabitlendi. Sperm, enjeksiyon pipeti yardımı ile oosit sitoplazmasına bırakılırken diğer yumurtalara da aynı işlem gerçekleştirildi. Enjekte edilen her oosit G1+HSA (Vitrolife, İsveç) kültür dışına (Falcon 3037) aktararak inkübatöre kaldırıldı.

5.3.6. Fertilizasyon ve Embriyo Gelişimi

Fertilizasyon değerlendirmesi mikroenjeksiyon işleminden 16-18 saat sonra invert mikroskopta büyük büyütmede ve hoffman modülasyonu varlığında yapıldı. Oosit sitoplazmasında 2PN ve 2 polar cisimciğin görülmesi normal fertilizasyon bulgusu olarak kabul edildi (36). Embriyo kalitesi blastomer sayısı ve morfolojik kriterleri dikkate alınarak belirlendi .

Grade 1 : Blastomerler eşit, fragmantasyon yok (A)

Grade 2.0 : Blastomerler eşit değil, fragmantasyon yok (A)

Grade 2.1 : %10'dan daha az fragmantasyon içeren embriyolar (B)

Grade 2.2 : %10 ile %20 arasında fragmantasyon içeren embriyolar (B)

Grade 3.1 : %20 ile % 50 arasında fragmantasyon içeren embriyolar (C)

Grade 3.2 : %50'den daha fazla oranda fragmantasyon içeren embriyolar (C)

İyi kaliteli embriyolar A (1.0, 2.0) ve B (2.1), kötü kaliteli embriyolar ise B(2.2), C (3.1, 3.2) olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda fertilizasyon yüzdesi, fertilize olan oosit sayısının enjeksiyon işlemi uygulanan oosit sayısına oranı alınarak hesaplanmıştır. Fertilize olan oositlerde enjeksiyondan sonraki 24-25. saatlerde birinci, 48. saatte 2. ve 72. saatte de 3.bölünmeleri değerlendirildi. Embriyolar blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, embriyonun içerdiği fragmantasyon ve sitoplazma yapısına göre değerlendirildi. Embriyolar 2 ve 3. gün iyi ve kötü kalite embriyo olarak değerlendirildi.

5.3.7. Transfer İşlemi ve Gebelik

İkinci veya üçüncü gün embriyo transferi yapıldı. Morfolojik olarak iyi kalitedeki embriyolardan 2 yada 3 tane transfer edildi. Transfer edilecek embriyolar hasta yaşı, infertilite süresi, sebebi, önceki tedavi sayısı, embriyo kalitesi, bölünme hızı, OHSS riski açısından hormonal durumu gibi kriterler göz önüne alınarak seçildi. Embriyolar Opu (oosit toplama işlemi) dan 48-72. saat sonra anne uterusuna yerleştirildi. Transferden yaklaşık yarım saat önce transfer edilecek embriyolar G2+HSA (Vitrolife, İsveç) medyumuna alındı. Seçilen embriyolar aynı medyum ile yıkanmış tuberkulin enjektörün ucuna takılı olan embriyo transfer kataterine (Swemed, İsveç) yüklendi ve anne adayının

uterusuna transfer edildi. Embriyo transferinden yaklaşık 12 gün sonra kanda bakılan >10 mIU/ml β HCG hormon değerinin 2 gün sonra tekrarında en az iki katına çıkmış olması kimyasal gebelik olarak değerlendirildi (37).

5.4. İSTATİSTİKSEL DEğERLENDİRME

Nicel değerler için parametrik one way Anova testi kullanıldı. Skoral değerlerin incelenmesinde, Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma sonucunda $p < 0.05$ anlamlılık gösteren veriler bonferroni düzenlemeli kıyaslama ile anlamlılık sınırı $P = 0.0083$ alınarak nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi.

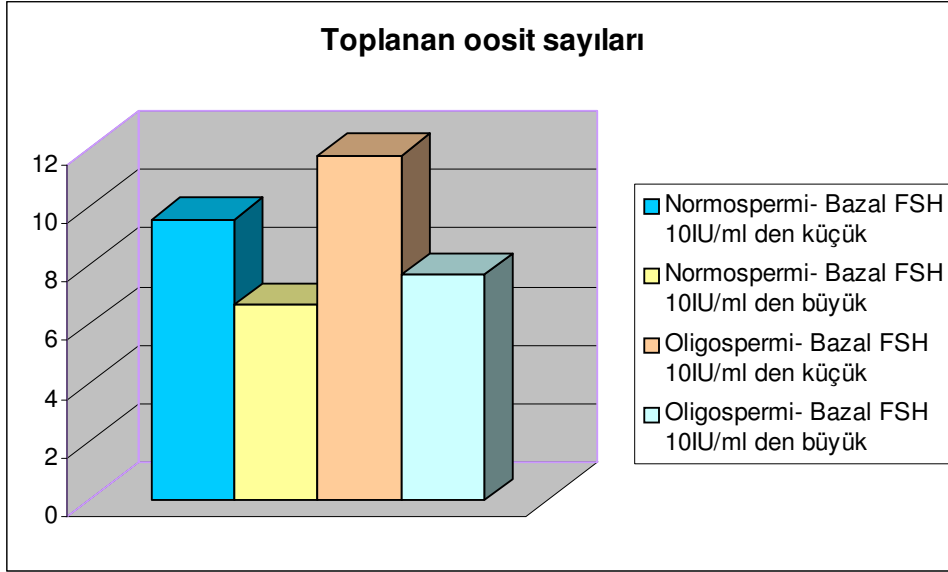
4. BULGULAR

Çalışmamızda bazal FSH düzeylerinin ICSI sonuçları üzerine etkisi 99 infertil çiftin dahil edildiği grupta incelendi. Sonuçların sperm parametrelerinden etkilenmemesi ya da en az etkilenmesi amaçlanarak normo ve oligospermili erkek hastalardan oluşan çiftler seçildi ve kadın hastalarda bazal FSH değerlerine göre 4 gruba ayrılarak incelendi. Gruplar 40 yaş altı kadınlarda FSH'sı <10 ve >10 olan ve normospermili erkek bireylerle, yine bazal FSH düzeyi <10 ve >10 olan kadınlar ve oligospermik erkek bireylerden oluşturuldu.

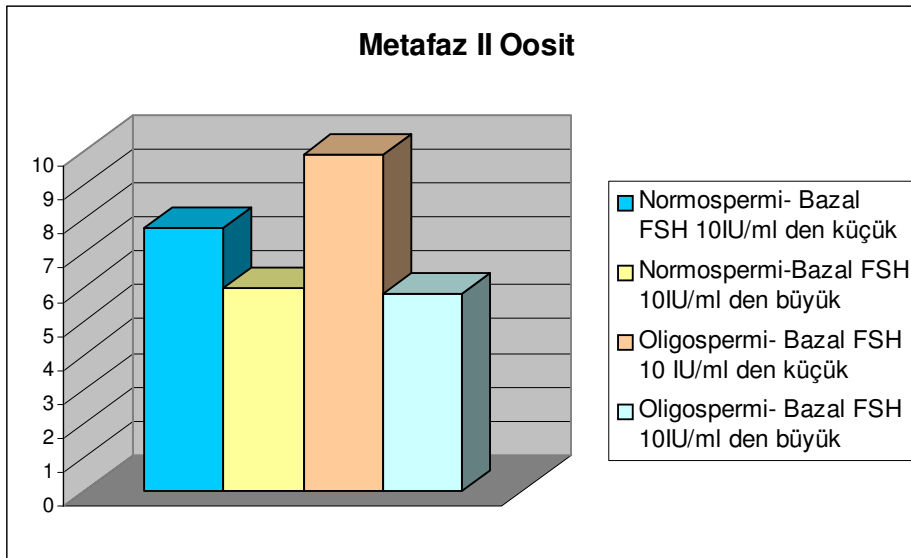
Normospermili bazal FSH<10 ve >10 olan gruplarda yaş ortalaması sırasıyla, 34.03±3.71 ve 35.00±0.8, oligospermili bazal FSH<10 ve >10 olan gruplarda ise sırasıyla 33.03±4.45 ve 34.05±5.59 idi ve gruplar arasında yaş ortalama değerleri yaklaşık olup istatistiksel farklılık göstermemekteydi (Tablo 1).

Gruplar arasında toplanan oosit sayıları ve metafaz II oosit sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi(Tablo1). Toplanan oosit sayıları, normospermili ve bazal FSH<10 olan grupta 9.60±5.08 olarak bulundu, FSH >10 olan grupta ise ortalama değer 6.68±5.00 olarak bulundu. Yüksek bazal FSH değerine sahip gruptaki azalma ikili grup karşılaştırması yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P=0.0283, anlamlılık sınırı= 0.0083). Oligospermik, bazal FSH <10 olan grupta toplanan oosit sayısı 11.76±7.45 iken FSH >10 olan grupta azalmış olarak 7.70±5.87 bulundu (Şekil 3). Ancak bu azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P=0.0469, anlamlılık sınırı= 0.0083). Sperm parametrelerine göre ayrılan normo ve oligospermik gruplar arasında da, toplanan oosit sayıları bakımından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (P=0. 5983 ve P=0. 3986), (Şekil 3). MII oosit gelişiminde gruplar arasında anlamlı farklılık izlendi (P=0.0288). MII oosit ortalaması, normospermili ve bazal FSH<10 olan grupta 7.75±4.27 olarak bulundu, FSH >10 olan grupta ise ortalama değer 5.94±4.13 olarak bulundu. Yüksek bazal FSH değerine sahip gruptaki metafaz II oosit sayısındaki azalma ikili grup karşılaştırması yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P=0.1468). Oligospermik, bazal FSH <10 olan grupta MII oosit sayısı 9.86±6.29 iken FSH >10 olan grupta azalma izlendi ve ortalama değer 5.82±5.06 bulundu (Şekil 4). MII oosit sayılarında izlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P=0. 0155, anlamlılık sınırı= 0.0083). Normo ve oligospermik gruplar kendi aralarında bazal FSH<10 ve >10 olan gruplar olarak

karşılaştırıldığında gelişen MII oosit sayıları bakımından anlamlı bir farklılık izlenmedi (P=0. 2490 ve 0.7028), (Şekil 4).



Şekil 3: Normo ve oligospermik gruplarda, bazal FSH değerleri <10 ve >10 olan infertil kadın bireylerden toplanan oosit sayılarına ait ortalamalar. Bazal FSH değerleri >10 gruplarda toplanan oosit sayılarında azalma izlenmekte.



Şekil 4: Normo ve oligospermik gruplarda, bazal FSH değerleri <10 ve >10 olan infertil kadın bireylerden elde edilen metafaz II oosit sayılarına ait ortalamalar.

Gruplar arası transfer edilen embriyo ortalama değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmasına karşın ikili grup karşılaştırmalarında bir fark olmadığı izlendi. Oligospermili ve bazal FSH >10 olan grupta transfer edilen embriyo median değeri 2 iken diğer tüm gruplarda transfer edilen embriyo median değeri 3 olarak bulundu. Gruplar arasında MI, GV oosit gelişimleri ve fertilizasyon yzdeleri arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi (Tablo 1).

2. ve 3. gvn embriyo gelişimleri blastomer sayısı, bnyklkleri ve sitoplazmik fragmentasyon oranlarına gvre değerlendirildi (Resim 2-5). Grade I, I-II ve II iyi kalite embriyo olarak, diğer embriyolar ise ktv kalite embriyo olarak skorlandı. Embriyo gelişimleri iyi ve ktv kalite olarak sınıflandığında bazal FSH <10 ve >10 olan gruplar arasında ki embriyo gelişimlerinde bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 1).

Gebelik oranları kıyaslandığında, normospermili ve bazal FSH<10 olan grupta 33.3, FSH >10 olan grupta ise 18.8 olarak bulundu. Oligospermili ve bazal FSH <10 olan grupta elde edilen gebelik oranı 40.0 iken, >10 olan grupta 26.7 olarak bulundu. Bazal FSH>10 olan grupta gebelik oranlarında azalma izlenmesine karşın gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmedi (P=0.493).

	Normospermi Bazal FSH< 10 IU/ml (n=33)	Normospermi Bazal FSH >10 IU/ml (n=19)	Oligospermi Bazal FSH< 10 IU/ml (n=30)	Oligospermi Bazal FSH>10 IU/ml (n=17)	P
Bazal FSH▪	7.08±1.41 (3.90-9.00)	12.78±1.87 (10.2-16.80)	7.55±1.47 (3.80-9.75)	14.05±1.87 (11.20-18.30)	
Yaş	34.03±3.71	35.00±0.8	33.03±4.45	34.05±5.59	P=0.49
>14mm oosit *	6.93±3.02 (7)	5.78±3.19 (6)	7.70±3.59 (7)	5.82±3.64 (4)	P=0.15
Toplanan oosit *	9.60±5.08 (10)	6.68±5.00 (6)	11.76±7.45 (10)	7.70±5.87 (7)	P=0.021
Metafaz II oosit *	7.75±4.27 (8)	5.94±4.13 (6)	9.86±6.29 (9)	5.82±5.06 (4)	P=0.028
Metafaz I oosit *	1.68±1.19 (1)	1.80±0.83(2)	1.40±0.69 (1)	1.30±0.48 (1)	P=0.640
GV *	1.76±1.36 (1)	1.50±0.54 (1.50)	2.00±1.69 (2)	1.00±0.00	P=0.151
Fertilizasyon (%)	64.63±23.71	58.52±35.68	50.81±30.46	54.35±34.56	P=0.32
2.gün iyi kalite embriyo *	3.97±2.95 (4)	4.12±3.18 (3.50)	4.62±4.06 (4)	2.80±2.00 (2)	P=0.344
2.gün kötü kalite embriyo *	1.80±1.22 (1)	1.33±0.51 (1)	1.18±0.40 (1)	1.00±0.00	P=0.417
3.gün iyi kalite embriyo *	5.75±1.83 (6)	5.83±3.43 (5)	8.66±4.21 (7)	2.00±1.41 (2)	P=0.062
3.gün kötü kalite embriyo *	1.50±0.70 (1.50)	1.16±0.40 (1)	1.00±0.00	-	P=0.198
Tansfer edilen embriyo *	2.72±0.71 (3)	2.37±1.02 (3)	2.36±0.76 (3)	1.80±0.77 (2)	P=0.040
Gebelik	33.3 (11/33)	18.8 (3/16)	40.0 (12/30)	26.7 (4/15)	P=0.493

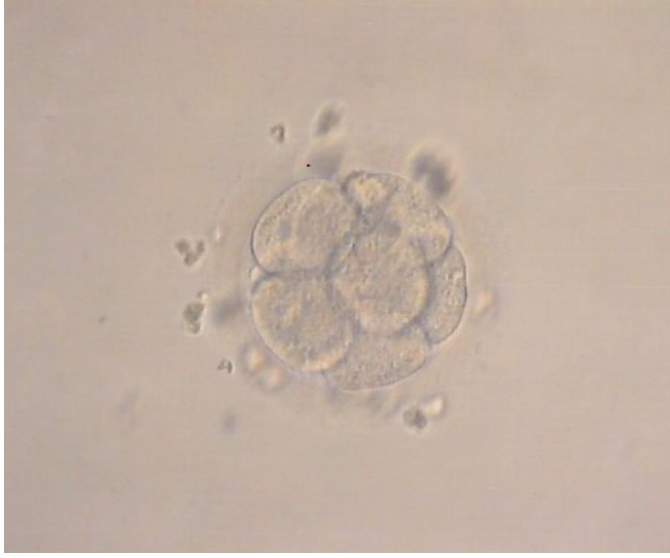
Tablo 1: ICSI uygulamasına alınan toplam 99 hasta, normospermili- bazal FSH < 10 IU/ml, normospermili - bazal FSH > 10 IU/ml olan ve oligospermili bazal FSH < 10 IU/ml oligospermili - bazal FSH > 10 IU/ml olarak 4 gruba ayrıldığında incelenen parametrelere ait (ortalama±SD) ve istatistiksel anlamlılıklar. ▪ Ortalama±SD ve minimum ve maksimum değerler *Ortalama±SD ve median değerler



Resim 2: FSH < 10 IU/ml olan bir vakaya ait ikinci gün 2 hücreli evreye geçmiş zigot, blastomer büyüklüğü ve sitoplazmik fragmentasyon açısından değerlendirilen iyi kaliteli bir embriyo. X200.



Resim 3: FSH > 10 IU/ml olan bir vaka, ikinci gün 2 hücreli ve kötü kaliteli bir embriyo. X200.



Resim 4: Üçüncü gün FSH < 10 IU/ml olan bir gruba ait iyi kalitede embriyo. X200.



Resim 5: Üçüncü gün FSH > 10 IU/ml olan bir vakaya ait kötü kaliteli embriyo. X200.

7. TARTIŞMA

Bazal FSH over rezervini gösteren menstural siklusun 2. ya da 3. günü bakılan ve overlerde folikül gelişimini uyaran bir hormondur. FSH'nın erken proliferatif dönemdeki seviyesi ile ovarian cevap arasında korelasyon izlenmektedir (38). FSH'nın yüksek olduğu ileri yaştaki olgularda konvansiyonel ovulasyon indüksiyonu ve YÜT uygulamalarında gebelik şansının düşük olduğu gösterilmiştir (6). Yüksek FSH değeri olan genç kadınlarda daha az folikül ve oosit gelişmesine ve yüksek siklus iptal oranlarına rağmen oosit eldesi ve embriyo transferi sonrası devam eden gebelik oranlarının normal düzeylerde olduğunu ifade eden yayınlar yanında, azalmış over rezervinin yukarıda anlatılan olumsuz etkilerden korunamadığını ifade eden yayınlarda mevcuttur (2). Overlerde folikül gelişimini uyaran FSH'nın kan düzeyi, over cevabı azaldıkça daha yüksek uyarıda bulunmak için giderek artış göstermektedir. Bir süre sonra FSH'nın uyarısında yeterli olmamakta ve overlerde folikül gelişimi azalmakta ve premenopoz dönemi başlamaktadır. Bu dönem öncesinde folikül gelişiminin bozulduğu kısa foliküler faz ve düzensiz ovulasyonlara bağlı menstural düzensizlikler gözlenmektedir. FSH değerleri yüksek olan olgularda oosit kalitesinin de morfolojik ve genetik olarak olumsuz etkilendiği düşünülmektedir (2). Farklı bazal FSH değerlerinin IVF başarısı üzerine etkisi olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur. Özellikle IVF tedavisine alınan bazal FSH değeri >14 IU/ml olan hastaların kötü prognoz gösterdiği, FSH değeri 10 ile 14 IU/ml olan genç kadınların ise sınırlı röprodaktif kapasite gösterdiği bildirilmiştir (39).

Bazal FSH değerinin IVF sonuçları üzerine etkisi bir çok araştırmada yer bulurken, FSH'nın ICSI sonuçları üzerine etkisini IVF vakaları ile birlikte inceleyen bir kaç çalışma mevcuttur (40). Çalışmamızda erkek kaynaklı faktörlerin etkisinden bağımsız bir değerlendirme için ICSI tedavisi gören normospermili ve oligospermili erkek bireylerle bazal FSH değeri > 10 ve bazal FSH değeri < 10 olan kadınlarda FSH'nın, toplanan oosit sayısı, M2, MI, GV oosit sayısı, fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları üzerine etkilerini inceledik. Araştırmalar Bazal FSH'nın sadece over rezervi üzerinde değil oosit ve embriyo kalitesi üzerinde de etkili olabileceğini göstermektedir (6).

Gruplar arası toplanan oosit sayıları ve MII oosit sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenirken, ikili gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Andrea ve arkadaşları (41) bazal FSH 10'nun altında ve üstünde over stimülasyonu uygulanan hastalarda elde edilen sonuçların yaşla korelasyonunu

araştırmış ve stimülasyon sonrası toplanan oosit sayısının 35 yaşa kadar FSH artışıyla azaldığını ancak ilerki yaşlarda bu azalmanın FSH düzeyi ile korelasyon göstermediğini bildirmişlerdir. Bazal FSH yüksekliğinin genç yaşta düşük over cevabının yanısıra, oosit kalitesinde düşmeye, gebelik oranında azalmaya ve düşük riskinde artışa neden olduğuda rapor edilmiştir (42). Çalışmamızda 25 ve 40 yaş arası bireyler değerlendirildi ve FSH artışıyla toplanan oosit sayılarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma izlendi. Bulgularımız, 25-40 yaş arası kadınlarda yüksek bazal FSH değerlerinin aynı yaş grubunda oosit gelişimini olumsuz etkilediğini desteklemektedir.

ICSI uygulamalarında fertilizasyon ve embriyo gelişimi, sperm ve oosit ilişkili faktörler ile mikroenjeksiyon teknik uygulamalarına bağlı faktörlerden etkilenmektedir. Oositin nükleer ve sitoplazmik matürasyonu fertilize olma yeteneğini de yansıtmaktadır. Pekçok oosit kaynaklı faktörün embriyonun klivaj aşamasını ve blastosist gelişimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Çalışmamızda bazal FSH değerinin yüksek olduğu normo ve oligospermik hasta gruplarında fertilizasyon oranı ile 2. ve 3. gün embriyo gelişiminin olumsuz etkilenmediği gösterildi. Abdalla ve Thum'da IVF/ICSI uygulanan hastalarda yaptıkları çalışmada, yüksek bazal FSH değerinin oosit ve embriyo kalitesinde bozulma ve fertilizasyon oranlarında azalma ile ilişkili bulunmadığını bildirmişlerdir (6). Chae ve arkadaşları ise erkek kaynaklı infertilite tanısı konmuş ICSI uygulanan ve FSH sınırı olarak 8.5 IU/ml değerinin alındığı hastalarda, yüksek bazal FSH ile oosit kalitesi ve gebelik oranının yüksek oranda azaldığını bildirmişlerdir (43). Bulgularımız MII oosit sayılarının bazal FSH artışı ile azaldığını göstermektedir. Ancak toplanan oosit sayılarındaki azalma göz önüne alındığında, MII oosit sayılarının paralel bir azalma gösterdiği izlenmekte, MI ve GV oosit sayılarında artış izlenmemektedir. Bu sonuçlar elde edilen MII oosit sayısındaki azalmanın toplanan oosit sayısındaki azalma ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda yüksek bazal FSH değerine sahip hastalarda gebelik oranlarının istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azaldığı görülmüştür. Gebelik oranlarındaki bu azalmanın, toplanan oosit sayılarındaki azalma sonucu elde edilen transferi yapılacak embriyo sayısının düşmesiyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (6). Ancak çalışmamızda gebelik oranlarının azaldığı yüksek bazal FSH'lı hastalardan toplanan oosit sayıları literatürde ileri sürüldüğü oranda düşmemiş ve hasta başına yaklaşık 2-3 embriyo transferi yapılmıştır. Ayrıca anöploidik gebelik ve düşük oranlarında yüksek FSH değerine sahip hastalarda arttığı rapor edilmiştir. Ancak 35 yaşın altındaki kadınlarda FSH artışı ile kromozomal anomalisi ve düşük oranlarının artışı arasında bir paralellik olmadığı bildirilmiştir (20).

Sonuç olarak ICSI uygulanan ve erkek faktörlü infertilite kaynaklarından bağımsız hastalarda, yüksek bazal FSH değerinin toplanan oosit sayısı ve buna bağlı olarak MII oosit sayılarında bir azalmaya sebep olduğu, ancak 2. ve 3. gün embriyo gelişimlerini olumsuz etkilemediği, fertilizasyon ve gebelik oranlarında da bir azalmaya neden olmadığı tespit edilmiştir.

8. SONUÇ

Çalışmamızda, ICSI uygulanan hastalarda basal FSH değerinin oosit ve embriyo gelişimi ile fertilizasyon ve gebelik sonuçları üzerine etkisi incelendi. Yüksek FSH değerlerine sahip normospermili bazal FSH >10 ve oligospermli bazal FSH >10 olan ve ICSI uygulanan kadınlarda toplanan oosit sayılarında ve MII oosit sayılarında azalma saptandı. FSH değerinin artışı ile fertilizasyon oranlarında bir azalma izlenmedi. Elde edilen embriyolar mikroskopik olarak blastomer sayısı, büyüklüğü ve sitoplazmik fragmantasyon oranları açısından değerlendirildiğinde 2. ve 3. gün gelişen embriyo kaliteleri ile bazal FSH değerleri arasında bir ilişki saptanmamıştır. Yüksek bazal FSH değerlerine sahip her iki grupta gebelik oranlarında belirgin bir düşme izlenmesine karşın istatistiksel bir anlamlılık elde edilmemiştir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular ışığında, yüksek FSH oranlarının toplanan oosit sayılarının azalması ile gösterdiği ilişki dışında, farklı sınır değerleri ve farklı yaş gruplarındaki etkileri ayrıca canlı doğum ve abortus oranları ile ilişkisinin yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi hazırlamam sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda özveri ve sabırla beni destekleyen ve yardımcı olan sevgili hocam Doç. Dr. Meral Koyutürk'e, ilgilerinden dolayı ve beni Histoloji ve Embriyoloji alanında Yüksek Lisans yapmam konusunda destekleyen İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü Doç. Dr. Nedret Altıok, sekreteri İlknur Karaosmanoğlu ve tüm program arkadaşlarım ile çalışanlarına,

Her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak her konuda bana yol gösteren ve yardımcı olan Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma hastanesinden Uzm. Dr. Kenan Sofuğlu'na, laboratuvar sorumlusu Dr. Naciye Arat, Dr. Emine Özçınar ve tüm çalışanlarına,

Beni destekleyen ve her koşulda beni bugünlere getiren canım annem Nadide Yıldırım, babam Hasan Yıldırım, abim Osman Yıldırım ve tüm Yıldırım ailesine

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİLE

10. KAYNAKLAR

1. Vicdan K, Işık AZ. İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. Ankara, Çağdaş Medikal Kitabevi, 1999.
2. Kahraman S, Karlıkaya G, Karagözoğlu H, Kumbak B, Laçın S, Güney A. Ovulasyon İndüksiyonu. Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri ve Genetik Merkezi, İstanbul, 2004.
3. Kligman I and Rosenwaks Z. Differentiating clinical profiles: predicting good responders, poor responders, and hyperresponders. *Fertil Steril*. 2001, 76: 1185–1190.
4. Ahmed Ebbiary NA, Lenton EA, Salt C, Ward AM and Cooke ID. The significance of elevated basal follicle stimulating hormone in regularly menstruating infertile women. *Hum Reprod*. 1994, 9: 245–252.
5. Cahill DJ, Prosser CJ, Wardle PG, Ford WC, and Hull MG. Relative influence of serum follicle stimulating hormone, age and other factors on ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994, 101: 999–1002.
6. Abdalla H, and Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2004, 19: 893-898.
7. Tıraş MB, Aybar F. In vitro fertilizasyon (IVF)-Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) indications, *J Surg Med Sci*. 2006, 2: 37-41.
8. Cohen J, Fehilly CB, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J, Rowland GF, Steptoe PC, and Webster J. Male infertility successfully treated by in vitro fertilization. *Lancet*. 1984, 1: 1239-1240.
9. Cohen J, Talansky BE, Malter H, Alikani M, Adler A, Reing A, Berkeley A, Graf M, Davis O, Liu H, Bedford JM and Rosenwaks Z. Microsurgical fertilization and teratozoospermia. *Hum Reprod*. 1991, 6: 118-123.
10. Fishel S, Timson J, Lisi F and Rinaldi L. Evaluation of 225 patients undergoing subzonal insemination for the procurement of fertilization. *Fertil Steril*. 1992, 57: 840-849.
11. Delilbaşı L. Gamet ve Embriyo Mikromanipülasyonları. Jinekoloji Obstetrik . 2006, 2: 58-64.
12. Palermo P, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992, 340: 17-18.

13. Flaherty SP, Payne D and Matthews CD. Fertilization failures after ICSI. In: Treatment of infertility: The new frontiers. Ed: Filicori, M. and Flamigni, C. Comms Media for Education: Princeton Junction. 1998, 269-282.
14. Willadsen SM, Lehn-Jensen H, Fehilly CB, Newcumb R. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology*. 1981, 15: 23-7.
15. www.advancedfertility.com
16. Moore L. Keith, Persaud TVN. Çeviri Editörleri: Yıldırım M, Okar İ, Dağçık H. 6. Baskıdan Çeviri, İnsan Embriyolojisi, Klinik Yönleri ile, İstanbul, 2002.
17. Carlson Bruce M. Human Embryology and Developmental Biology. Baltimore, Mosby Inc., 1999.
18. Faber BM, Mercan R, Hamacher P, Muasher SJ and Toner J. The impact of an egg donor's age and her prior fertility on recipient pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 1997, 68: 370-32.
19. Cohen MA, Lindheim SR and Sauer MV. Donor age is paramount to success in oocyte donation. *Hum Reprod*. 1999, 14: 2755-2758.
20. Nasser A, Mukherjee T, Grifo JA, Noyes N, Krey L and Copperman AB . Elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. *Fertil Steril*. 1999, 71: 715-718.
21. Simoni M, Nieschlag E. FSH in therapy: Physiological basis, new preparations and clinical use. *Reprod Med*. 1995, 4: 163-167.
22. Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve: Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2006, 21: 2729 -2735.
23. Scott RT and Hoffman GE. Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 1995, 63: 1-11.
24. VanRooij IAJ, Broekmans FJM, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH and Themmen APN. Serum anti-mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002, 17: 3065-3071.
25. Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir JS, Campbell S and Tan SL. Value of ovarian stromal blood flow velocity measurement after pituitary suppression in the prediction of ovarian responsiveness and outcome of in vitro fertilisation treatment. *Fertil Steril*. 1999, 71: 22-29.

26. Sharara FI and McClamrock HD. The effect of reproductive aging on ovarian volume measurements in infertile women. *Obstet Gynecol.* 1999, 94: 57–60.
27. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992, 340: 17–18.
28. Tesarik J, Sousa M. Key elements of a highly efficient intra cytoplasmic sperm technique and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil Steril.* 1995, 64: 770–776.
29. Thornton K. Advances in assisted reproductive technologies. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2000, 27: 517–527.
30. Staessen C, Camus M, Khan I, Smitz J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC. An 18-month survey of infertility treatment by in vitro fertilization, gamete and zygote intrafollopian transfer, and replacement of frozen thawed embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1989, 6: 22-29.
31. Staessen C, Camus M, Clasen K, De Vos A, and Steirteghem AV. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum Reprod.* 1999, 14: 2474-2479.
32. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche, M, Ryckaert G, Eestermans W. and Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999, 14: 2345–2349.
33. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction 1999. 4 th edition. Cambridge University Press, Cambridge.
34. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ , Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986, 46: 1118–1123.
35. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M, Van Steirteghem A. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1999, 14: 2313-2319.
36. Griffiths TA, Murdoch AP and Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod.* 2000, 15: 1592-1596.
37. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M and Van Steirteghem A. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1999, 14: 2313-2319.

38. Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S and Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1989, 51: 651-654.
39. Esposito MA, Coutifaris C and Barnhart KT. A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum Reprod*. 2002, 17: 118–123.
40. Abdalla H and Thum MY. Repeated testing of basal FSH levels has no predictive value for IVF outcome in women with elevated basal FSH. *Hum Reprod*. 2006, 21: 171-174.
41. Weghofer A, Margreiter M, Fauster Y, Schaetz T, Brandstetter A, Boehm D and Feichtinger W. Age-specific FSH levels as a tool for appropriate patient counselling in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2005, 20: 2448-2452.
42. Scott RT and Hofmann GE. Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 1995, 63: 1–11.
43. Chae HD, Kim CH, Kang BM, Chang YS. Clinical usefulness of basal FSH as a prognostic factor in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol Res*. 2000, 26: 55-60.