

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİSMORFİK VE NORMAL OOSİTLERDEN ELDE EDİLEN
EMBRİYOLARIN SAYISAL ANEUPLOİDİ ORANLARININ VE EMBRİYO
GELİŞİM SKORLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ YILDIRIM

DANIŞMAN
PROF. DR.TÜLAY İREZ

İSTANBUL-2015

**T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans
Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri
tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 23 /10 / 2015

**Prof.Dr.Tülay İrez
Biruni Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**Prof.Dr. Gül BAKTİR
İstanbul Üniversitesi**

**Prof.Dr.Emir Tan
Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

DENİZ YILDIRIM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini paylaşan, değerli danışmanım sayın **Prof. Dr.TÜLAY İREZ'e**, Yüksek lisans eğitimimde, işe başladığım günden beri bana yardımcı olan, derin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli klinik başkanımız **Prof. Dr. RECAİ PABUCCU 'ya**, Tezimin yazımı için desteklerini esirgemeyen sayın **Dr.EMRE PABUCCU'ya**, yüksek lisans tezimi yazarken bana destek olan değerli koordinatörümüz **SEMRA SERTYEL'e** teşekkürlerimi borç bilirim.

Yaşamım boyunca bana maddi-manevi destek olan aileme sonsuz kez teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ankara Centrum Klinik tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
RESİM LİSTESİ.....	vii
GRAFİK LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. OOSİT GELİŞİMİ VE MATURASYONU	2
2.2. OOSİT DISMORFİZMİ.....	4
2.2.1. Ekstrasitoplazmik Anomaliler	7
2.2.1.1. Kutup Cisimciği Özellikleri	7
2.2.1.2. Perivitellin Alan Özellikleri	11
2.2.1.3. Zona Pellucida (ZP) Özellikleri	14
2.2.2. İntrasellüler Anomaliler	19
2.2.2.1. Vakuoller-sER Kümelenmeleri-Refraktil Cisimcik	19
2.2.2.2. Metafaz İğciği	25
2.2.2.3. Sitoplazmik Matürasyon ve Sitoplazmanın Yapısal Özellikleri.....	26
2.2.2.4. Koyu, Granüler Oositler	27
2.2.2.5. Ovoid Oositlerde Embriyoner Gelişim.....	30
2.2.2.6. Dev Oositler.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
3.1. GEREÇ VE MALZEMELER	35
3.2. OOSİT TOPLAMA (OPU) İŞLEMİ.....	36
3.3. OPU ÖNCESİ HAZIRLIK İŞLEMLERİ	36
3.4. OOSİT TOPLAMA İŞLEMİ	36
3.5. KONVASİYONEL IVF	38

3.6. MIKROENJEKSİYON	39
3.6.1. ICSI işlemi için Kumulus ve Korona Hücrelerinin Temizlenmesi.....	39
3.6.2. Mikroenjeksiyon için Pipetlerin Hazırlanması	41
3.6.3. Mikroenjeksiyon işlemi (ICSI).....	43
3.7. FERTİLİZASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ (1.GÜN)	46
3.8. EMBRİYO SINIFLANDIRMASI (KLIVAJ DÖNEMİ)	47
3.9. BLASTOSİST DÖNEMİ EMBRİYO GELİŞİM DEĞERLENDİRİLMESİ	49
3.9.1. Blastosel Kavite Oluşumuna Göre Sınıflandırma	50
3.9.2. İç hücre kitlesi-Inner Cell Mass (ICM) Yapısına Göre Sınıflandırma.....	50
3.9.3. Trofektoderm Yapısına Göre Sınıflandırma	51
3.10. EMBRİYO BİYOPSİ İŞLEMİ	51
3.10.1. Polar body (PB)-kutup cismi biyopsisi.....	52
3.10.2. Embriyo Blastomer Biyopsisi.....	54
3.11. EMBRİYO TRANSFER İŞLEMİ	55
4. BULGULAR	57
4.1. ÇALIŞMA MODELİ	57
4.2. ÇALIŞMA SONUÇLARI	61
4.3. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRMELER	64
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ	67
7. KAYNAKLAR	68
8. ÖZET	73
9. SUMMARY.....	76
10. ÖZGEÇMİŞ	79
11. ETİK KURUL ONAYI.....	80

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: ICSI İşlemi Hazırlığı	42
Şekil 2: ICSI kabı hazırlığı	43
Şekil 3: Oositlerin morfolojik özelliklerinin sayısal dağılımı	61
Şekil 4: 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen emriyoların fertilizasyon ve klivaj oranları gösterilmiştir.	61
Şekil 5: 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen zigot ve emriyoların kromozomal anomali oranları gösterilmiştir.....	62



RESİM LİSTESİ

Resim 1: Profaz I Dönem Oosit.....	3
Resim 2: Metafaz I Dönemi Oosit.....	3
Resim 3. Metafaz II Dönem Oosit.....	4
Resim 4: Perivitellin aralıkta saat 12 (A) hizasında düzgün yüzeyli, (B)normal büyüklükte,fragmante yapıda ve (C) oval, büyük 1. kutup cisimcikleri.	8
Resim 5: A) Dar PVA'lı bir diğer oositte saat 6 hizasında fragmante (3 parçalı) 1. kutup cisimciği., B) PVA'nın dar olduğu ve fragmante, yassı kutup cisimciğinin saat 9 hizasında lokalize olduğu	9
Resim 6: Sınırları düzensiz, küçük ve oval, fragmante kutup cisimciği.	10
Resim 7: Sitoplazmanın granülasyon gösterdiği, PVA'nın nispeten dar olduğu MII oositte saat 11 hizasındaki yassı kutup cisimciği.....	10
Resim 8: Oolemmadan tamamen ayrılmış , geniş perivitalin aralıkta , bir kutup cisimciği.....	10
Resim 9: Birbirinden tamamen ayrı (A) ve(B),(C) birbirine yakın yerleşim gösteren kutup cisimcikleri	11
Resim 10: Perivitellin aralıkta yaygın olarak bulunan ince granüller halinde debris.....	12
Resim 11: PVA'nın geniş ve debrisin zona pellusidanın iç yüzünde yoğunlaşmış iri granüller.	13
Resim 12: Zona pellusidanın ince ve perivitellin aralığının geniş olduğu bir oositte PVA'nın bir bölgesine lokalize olmuş, granüloza hücreleri veya ekstrasellüler matriksten kaynaklanan granüller. ...	13
Resim 13: Kalın ve dış yüzeydeki düzensiz yapısıyla ZP ve dar PVA'nın gözlemlendiği bir MII oositler.....	14
Resim 14: Dış yüzeydeki düzensiz yapısıyla ZP ve geniş PVA'nın gözlemlendiği bir MII oosit.	14
Resim 15: PVA'nın dar olduğu bir MII oosit, zona pellusidanın oositi oolemmının hemen dışından itibaren kesintisiz olarak kuşattığı gözleniyor.....	15
Resim 16: Resmin sol üst bölümünde görülen kompakt embriyonun ZP'sı sağ altta görülen blastosistinkinden daha kalın.....	15
Resim 17: Transparan ve açık zenkli ZP.....	16
Resim 18: Kalın ve koyu renkli zona pellusidanın sitoplazmanın da koyu olduğu MII oosite eşlik ettiği gözleniyor.....	16
Resim 19: Genişlemiş perivitellin aralığı çevreleyen ince zona pellusida. ...	17

Resim 20: Zona pellusidası olmayan oositler.	17
Resim 21: MII oositin sol tarafında zona pellusidanın tabakalı bir yapılaşma sergilediği gözlenmekte. Bu tabakalanmaya PVA granülaritesi de eşlik etmektedir. Sağdaki resimde ise zona pellusidanın oositin her iki tarafında tabakalandığı görülmekte. Bu duruma iç zar varlığını göstermekte, icisi uygulamasında dejenerasyon veya düşük fertilizasyona sebep olduğu gibi başlıbaşına bir infertilite sebebi olarak ortaya konulmaktadır.	18
Resim 22: Zona pellusidanın sol tarafta tabakalı, sağ tarafta da giderek incelirken irregüler bir şekil aldığı gözlenmekte, biovüler bir zar özelliği gözlemekte.	18
Resim 23: Zona pellusida anomalisi: Aynı ZP içinde biri MII, diğeri GV evresinde iki oosit. MII oositte zona pellusidanın tabakalı ve sol-alt kısımda kalınlaştığı görülmekte. Her iki oosit de “biovüler oosit” olarak tanımlanır. İkinci resimde biovüler yapılardan birinin dejenere olduğunu görmekteyiz.	19
Resim 24: Sitoplazmanın merkezine yakın yerleşim gösteren, iri bir vakuol.	20
Resim 25: Büyüklükleri birbirinden farklı, çok sayıda vakuol içeren bir oosit.	21
Resim 26: Birbirinden farklı büyüklüklerde ve farklı bölgelerde yerleşim gösteren vakuoller.	21
Resim 27: Fertilize olan vakuoler oositlerde pronukleuslar ve büyüklük ve lokalizasyonu nedeniyle pronukleuslarla karıştırılabilecek vakuoller.	22
Resim 28: Fertilize olarak embriyoner gelişimini sürdüren oositlerdeki vakuoller blastomerlerde gözlenmekte.	23
Resim 29: Merkezi tek bir SER oluşumu görülmekte.	23
Resim 30: Ooplazmada farklı büyüklük ve şekillerdeki sER kümelenmeleri.	24
Resim 31: Sitoplazmasında refraktil cisimcik bulunan bir oosit.	25
Resim 32: Polarize ışık mikroskopuyla saptanan mayoz içiği.	26
Resim 33: A ve B MII evresindeki iki oositte sitoplazmanın merkezi granüler yapısı ve perivitalin aralığının genişliği dikkat çekerken B) MII oosit sitoplazmasında geniş ve yaygın granülasyon içeren oosit görülmekte.	28
Resim 34: Sitoplazmanın sağ periferik alanda homojen, merkezde ise hafif granülasyon gösteren MII oosit.	30
Resim 35: Sitoplazmanın çok yoğun granülasyon gösterdiği bir oosit.	30
Resim 36: Oval oosit morfolojisi.	31

Resim 37: Mikroenjeksiyon işleminin tamamlanmasının ardından ooplazmanın saat 3 hizasında sergilediği huni biçimindeki yapısal özellik.	33
Resim 38: Üstte MI dev oosit ve hemen altında yine MI ,ancak normal boyutlardaki bir başka oosit.	34
Resim 39: Resim Kültür kablalarının hazırlığı	41
Resim 40: ICSI işlemi	45
Resim 41: Fertilizasyon değerlendirmesi	46
Resim 42: Klivaj dönemi değerlendirmesi	48
Resim 43: Blastosist değerlendirmesi	51
Resim 44: Kutup cisimciği biyopsi işlemi	53
Resim 45: Embryo biyopsi işlemi	55
Resim 46: Grup I 'de bulunan toplam 1817 normal oositten gelişen embryo çalışmanın kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.	58
Resim 47: Grup II 'de bulunan toplam 387 sitoplazmik granülasyon ve reflaktile cisimcik içeren oositten gelişen embryo çalışmanın 1. Anomali grubu olarak değerlendirilmiştir.	58
Resim 48: Grup III 'de bulunan toplam 508 ekstra sitoplazmik (sitoplazma dışı, perivitalin içi) anomali gösteren oositlerden gelişen embryolar çalışmanın 2. Anomali grubu olarak değerlendirilmiştir.	59
Resim 49: Grup IV 'de bulunan toplam 193 sitoplazmik vakuolizasyon, düz endoplazmik retikulum aglitasyonu, düzensiz oolemma içeren oositlerden gelişen embryolar çalışmanın 3. Anomali grubu olarak değerlendirilmiştir.	60

GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1:** 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen zigotlardan alınan kutup cisimciklerde FISH analizi sonucu gözlenen kromozomal anomalilerin karşılaştırılması..... 63
- Grafik 2:** 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen embriyolardan 3.gün biyopsi ile alınan blastomerlerin FISH incelenesi sonucu kromozomal anomalilerin karşılaştırılması 63



SİMGE VE KISALTMALAR

PGD/PGT	Pre impantation genetic diagnosis -Pre İmplantasyon Genetik Tanı
ET	Embriyo Transferi
EB	Embriyo Biyopsisi
PBB	Polar body (kutup cisimcik) biyopsisi
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
HTF	Human Tubal Fluid
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
OPU	Oocyte pick up- Oosit aspirasyonu
HSA	Human Serum Albumin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
PN	Pronükleus
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FIX	Fiksasyon
ML	Mililitre
µL	Mikrolitre
PGT	Preimplantasyon Genetik Tanı
RB	Refraktil Cisimcik
PVA	Perivitelin Aralık –(PERİVİTELLİN Space-PVS)
PB	Kutup Cisimciği -(First Polar Body-1.PB)
MPF	Maturation Promoting Factor

1. GİRİŞ VE AMAÇ

In vitro fertilizasyon çalışmalarında oosit toplama işlemi sonrası elde edilen oositlerin yarısından fazlası morfolojik anomali göstermektedir ve bu anomaliler metafaz II oositlerin nükleus ve stoplazmik maturasyonlarında asenkroniteye sebep olmaktadır (1) . Bu durum işlem sonrası klinik sonuçlara yansımaktadır. Bu morfolojik varyasyonlar hasta metabolizmasından kaynaklanabileceği gibi (hasta yaşı, genetik problemler) , vücut dışı faktörlerdende kaynaklanabilir (stimülasyon programları, kültür ortamları ve beslenme dengesizlikleri).

Embriyo kalitesiyle oosit morfolojik özellikleri arasındaki ilişki birçok araştırmaya konu olmuş ve farklı sonuçlar alınmıştır. Bu farklılığın; değişik anomalilerin incelenmesi kadar infertil-fertil bireylerin oositleri arasındaki farklılıklardan da kaynaklanabileceği belirtilmektedir.(2,3)

Bu çalışmanın amacı, oosit morfolojik anormalliklerinin sınıflandırılıp hangilerinin genetik olarak embriyo gelişimini etkilediğini ortaya koyabilmek ve bu anormal oosit morfolojileri dominant olarak gösteren hasta grubunu preimplantasyon genetik tanı (PGT) endikasyon grubu olarak tanımlayabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oosit Gelişimi ve Maturasyonu

Ovaryum differensiyasyonu tamamlandığında dişi germinal hücreleri oogonia ismini alırlar. Bu hücreler mayoz başlangıcına dek mitotik bölünme sonrası çoğalma yaşarlar. Mitoz bölünmeler sonrası oogonia sayısında çok büyük bir artışla yarım milyon civarı germ hücreleri ile mayoz bölünme öncesi oosit rezervi tamamlanır. Oogoniumun son mitotik bölünümü sonrası hücre interfaza girer, Mayoz I in hazırlığı ile DNA replikasyonu başlar. İnsan overlerinde bu dönüşüm süreci gestasyonun 3. Yada 4. Ayında başlar; doğum süreciyle tüm germ hücreleri artık oositler ve mayotik süreç durdurulmuştur (1. Mayotik arrest)(4).

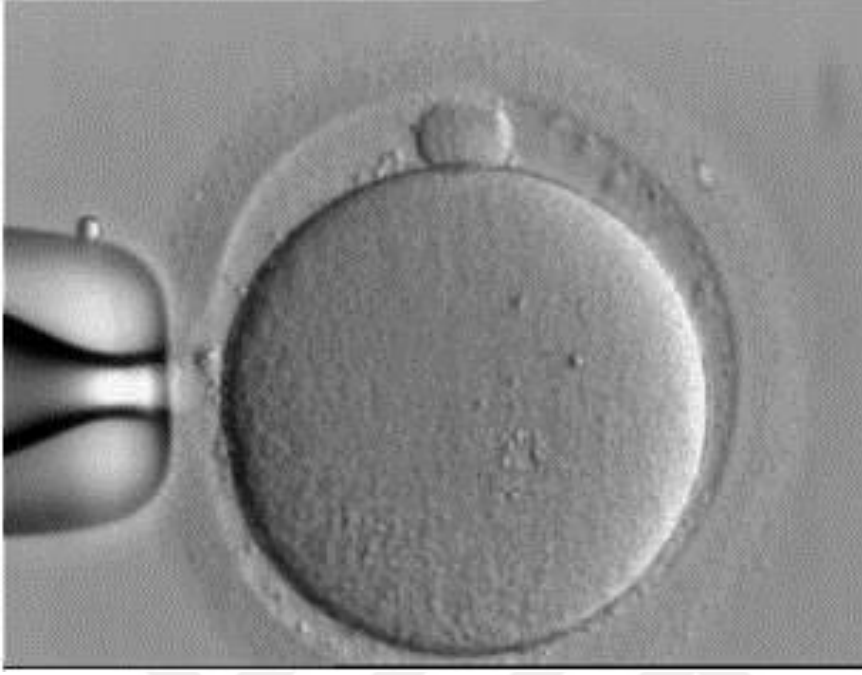
Oosit maturasyonu, oosit kalitesini belirleyen ve birbiriyle senkronize gelişim gösteren, nükleus ve sitoplazmik maturasyon olarak iki farklı süreç tarafından belirlenir. Nükleus maturasyonu oositin 1. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak metafaz II evresine girmesi ve 1. Kutup cisimciğinin (Polar Body, PB) atılması ile gerçekleşir (4). Bu evrede, siklin B ve p34^{cdc} etkin rol oynayan moleküllerdir ve bu moleküllerin aktivasyonu ile hücre G2 fazından M fazına geçer. Siklin B ve p34^{cdc} birlikte oosit maturasyonundan sorumlu faktörü (Maturation Promoting Factor, MPF) aktive ederek germinal vezikülün dağılmasını (Germinal Vesicle Breakdown, ,GVBD) ve metafaz I kromozomlarının kondensasyonunu sağlar. MPF miktarının azalması, oositin anafaz I evresine geçişini sağlarken ikinci yükselişi metafaz II fazına geçişine neden olur. Bu nedenle yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen oositler intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) öncesinde nükleer maturasyonun farklı evrelerinde gözlenebilirler (1) .



Resim 1: Profaz I Dönem Oosit



Resim 2: Metafaz I Dönemi Oosit



Resim 3. Metafaz II Dönem Oosit

Bununla birlikte oositlerin nükleus maturasyonlarını tamamlamaları fertilizasyon, oosit aktivasyonu ve erken embriyoner gelişim için yeterli özellikleri kazandığı anlamına gelmez, bu durum ancak oosit sitoplazmasının maturasyonunun tamamlanması sonrasında gerçekleşir (5).

2.2. Oosit Dismorfizmi

Oositlerin nükleer maturasyonlarının izlenmesi sırasında ışık mikroskobu düzeyinde bazı anormal morfolojik oluşumlarla karşılaşılabilir ve bu anomaliler "oosit dismorfizmi" olarak adlandırılır. Oosit dismorfizmi MII oositlerin büyük bir bölümünde gözlenir ve genel olarak kontrollü ovaryan stimülasyon programlarının tetiklediği mikroçevre etkisiyle olduğu kabul edilir (5).

Oosit dismorfizm fenotipinin mayotik matürasyonun farklı evrelerinde geliştiği ve bu gelişim evrelerine göre fertilizasyonunun

gerçekleşmemesiyle sonuçlanabileceği yada yüksek aneuploidi oranları veya gelişim anomalisi /yavaşlamalarına neden olabileceği gösterilmiştir (6).

Oosit morfolojisi değerlendirme gerek laboratuvar içinde, gerekse laboratuvarlar arasında, belirli standartları da olsa kişiden kişiye değişebilme olasılığının yüksek oluşu nedeni ile çok dikkatli uygulanması gereken bir işlemdir. Günümüzdeki yaygın kanı, IVF veya ICSI işlemi için kullanılan spermden çok, işlem uygulanan oositin morfolojisinin önem taşıyor olmasıdır.

Olgun bir oosit yuvarlak (yaklaşık 100µm büyüklüğünde), açık renkli parlak ve homojen granülasyon gösteren sitoplazmaya ve düzgün yüzeyli bir oolemmaya sahip olmalıdır. Zona pellusidası; yaklaşık 14-15 µm kalınlığında, kesintisiz, oosite bakan yüzü daha homojen ve tüm oosit yüzeyinde eşit kalınlıktadır. Perivitellin aralık ise döküntü içermeyen, düzgün ve I. Kutup cisimciğinin bulunduğu bölgede hafif genişlemiş diğer bölgelerde aynı genişlikte olmalıdır (5).

Değişik gruplar bugüne kadar yaptıkları çalışmalarda oosit morfolojisinin döllenme, embriyo gelişimi ve gebelik üzerine olası etkilerini araştırmışlardır. Bazı araştırmalar oosit morfolojisinin fertilizasyon ve klivaj oranları üzerine bir etkisi olmadığı sonucuna varırken, bazıları granüler oositler ve sitoplazmik anormallikler (düz endoplazmik retikulum, refraktil cisimcikler ve vakuoller) içeren oositler kullanıldığında implantasyon ve gebelik oranlarında azalmaya sebep olduğunu göstermiştir(6,7). Benzer bir çalışmada Xia ve arkadaşları birincil kutup cisimciği, perivitellin mesafe ve sitoplazmik anomalilerine bakarak bu özelliklere sahip dismorfik oositler ile ICSI sonrası oositlerin oluşturdukları embriyoların ileri gelişimi ile bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir (8). Işık mikroskobu altındaki görünüşleri nedeniyle adlandırılan yaklaşık 10 µm çapındaki refraktil cisimcikler ilk olarak Lucinda L. Veeck tarafından tanımlanmışlardır (5). Oluşum nedenleri ile oositin

maturasyonu veya oluşturacağı embriyonun ileri gelişimi üzerine etkisi tam olarak anlaşılmasına rağmen konvansiyonel IVF programlarında refraktil cisimcik içeren oositlerde fertilizasyonda kötü prognoz gözlenmiştir (5). Hem matür hem de immatür oositler refraktil cisimcik içerebilirler ve hastadan bir sonraki siklusunda da refraktil cisimcik içeren oosit elde edilme olasılığı yüksektir. Gelişim potansiyeli açısından uygun olmayan ve dismorfik bir oositten elde edilen embriyonun gelişimin ileriki aşamalarında hem vivo hem de in vitro ortamda gelişimini durdurma şansı yüksektir. Van Blerkom ve arkadaşlarının da yaptıkları bir araştırmalarında gösterdikleri gibi ciddi sitoplazmik organizasyon bozukluğu içeren M II safhasındaki oositler normal gruptakilere göre daha düşük bir hücre içi pH ve ATP içermektedir ve bununla beraber aynı grupta anöploidi ve kromozomal dağılım oranları da yüksek olarak bulunmuştur (9).

Yapılan son çalışmalar oosit morfolojisindeki anormalliklerin yüksek oranda çok fazla kaynaklı olduklarını göstermektedir. Bunlardan ilki uygulanan kontrollü ovaryen stimülasyon protokollerinin oosit üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerdir. Yaygın olan kanı, stimülasyon olmaksızın atreziye uğrayarak elimine edilebilecek anormal yapıya sahip oositlerin kullanılan stimülasyon protokolü ile matür hale gelebilme olasılıklarının tedavi üzerinde olumsuz etki oluşturabilecekleri yönündedir (10,11). Çalışmalar, normal bir stimülasyon programı sonrası elde edilmiş insan oositlerinin %30'undan daha fazlasının sayısal kromozom anomalileri içerdiklerini ortaya koymuştur (12, 13).

İkinci önemli etken, oositin maturasyon süresi boyunca içinde bulunduğu ve gelişimini tamamladığı ortam ve hormon parametreleridir. Hipoksik bir folikülden elde edilen oositler ile kötü embriyo gelişimi sergileyen oositler arasında bir bağlantı olduğunu Van Blerkom ve arkadaşları yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (14). Hormonlar arasında da östrojen ve progesteron değerleri sitoplazmik ve nükleer maturasyon için çok önemlidir.

Ayrıca foliküllerin uyarılmasında kullanılan gonadotropin preparatları da dikkat edilmesi gereken diğer bir hormonal parametreyi oluştururlar. Yapılan araştırmalar hipofiz desensitizasyonu sonrası kullanılan saf FSH preparatlarının elde edilen oositlerdeki morfolojik ve nükleer anomali oranını arttırdığını göstermiştir (15). Işık mikroskobu düzeyinde görülebilen ve embriyo kalitesini etkileyebilecek anomaliler aşağıda sırasıyla anlatılmaktadır.

2.2.1. Ekstrasitoplazmik Anomaliler

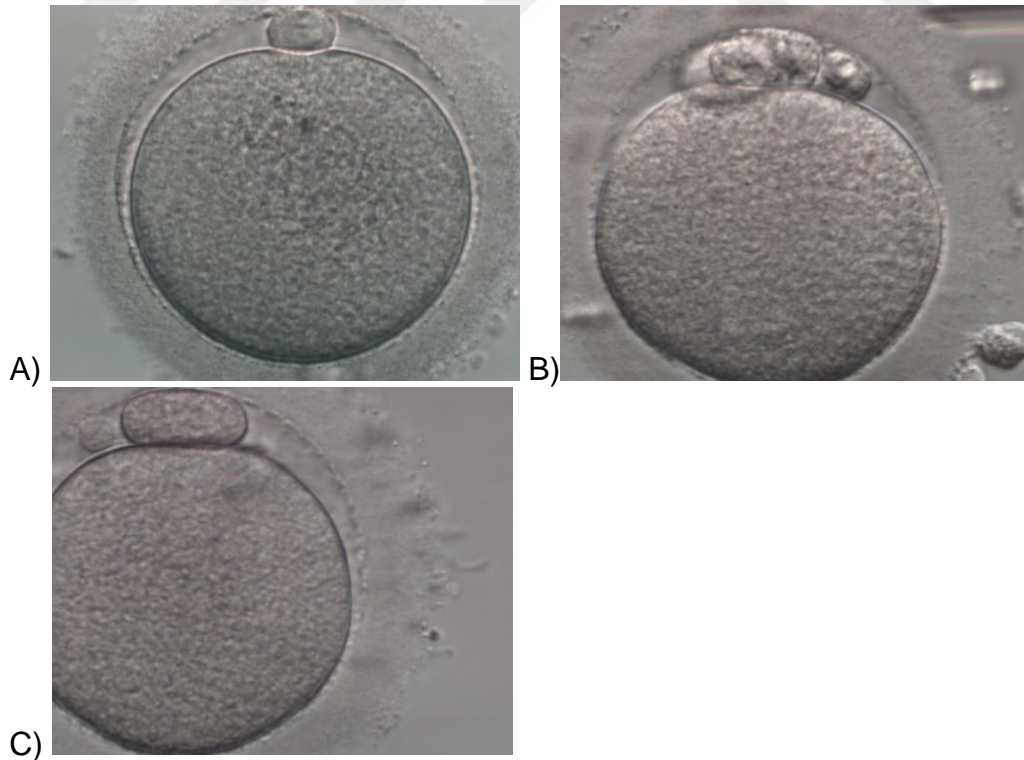
2.2.1.1. Kutup Cisimciği Özellikleri

IVF'de elde edilen oositlerin büyük bir bölümü (>%85) nukleus matürasyonunu tamamlamıştır ve bunun göstergesi de perivitellin aralıkta (PVA) 1. kutup cisimciğinin (1.PB) gözlenmesidir.

1. kutup cisimciği birçok memeli türünde kısa bir süre sonra dejenere olur, insanda yaşam süresi daha uzun (yaklaşık 20 saat) olmakla birlikte genellikle oositin yaşını belirlemede kullanılır (16). Bu özelliğinden dolayı inceleme zamanı da önem taşır. 1. kutup cisimciğinin fertilizasyon, embriyoner gelişim ve implantasyona olası etkilerini inceleyen çalışmalarda bu parametreler hakkında yeterli bilgi vermediği belirtilmiştir (17,18). Ancak incelemenin yumurta toplama işleminden (Oocyte Pick Up, OPU) 9 saat gibi uzun bir süre sonra yapılmış olması kutup cisimciğinin yapısal bozulmaya başladığı zaman olarak kabul edilir. Nitekim Verlinsky ve arkadaşlarının kutup cisimciği morfolojisi ve oosit anöploidisi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarında bu ilişki saptanamamakla birlikte, incelenen tüm oositlerin yaklaşık 1/3'ünde ikinci gözlem sırasında 1. kutup cisimciklerinin yapısal özelliklerinin değiştiği vurgulanmıştır (19). 1. kutup cisimciğinin yapısal özelliklerinin değişmesini ve belki de hızlanmasını oositlerin mekanik denüdasyonu sırasındaki stresin arttırabileceği de düşünülmelidir.

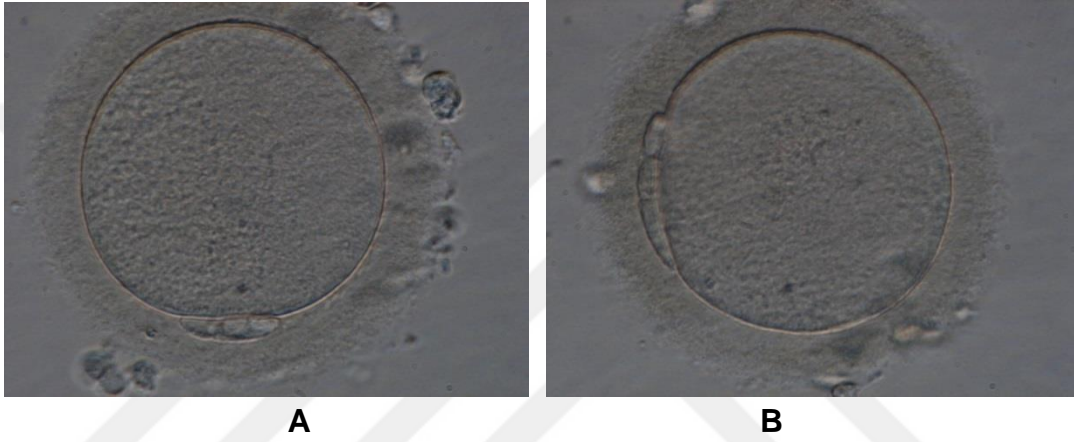
Olgun (metafaz II, MII) oositlerde 1. kutup cisimciği oolemma ile zona pellusida (ZP) arasındaki hafifçe genişlemiş perivitellin alanda yer alır. Dişilerde mayoz bölünmenin bir özelliği olarak oosit sitoplazmanın hemen hemen tamamını alırken 1.kutup cisimciği boyut olarak çok daha küçük, yuvarlak veya oval ve düzgün çepelidir (Resim 4 A ve B).

1. kutup cisimciğinin morfolojik özelliklerini inceleyen ilk çalışmada Xia ve arkadaşları 1. kutup cisimciklerinin intakt (tek parça) ve bulunduğu bölgede PVA'nın dar olması gerektiğini vurgulamışlardır (8). Ebner ve arkadaşları ise 1. kutup cisimciği morfolojisini dört başlıkta sınıflamışlardır (20). Bu klasifikasyon sisteminde 1.kutup cisimciğinin yuvarlak veya oval ve konturlarının düzgün (Resim 4) veya hafifçe düzensizlik gösterdiği (Resim 5) iki grupta fertilizasyon, embriyoner gelişim ve implantasyon oranlarının yüksek olduğu belirtilmiştir.



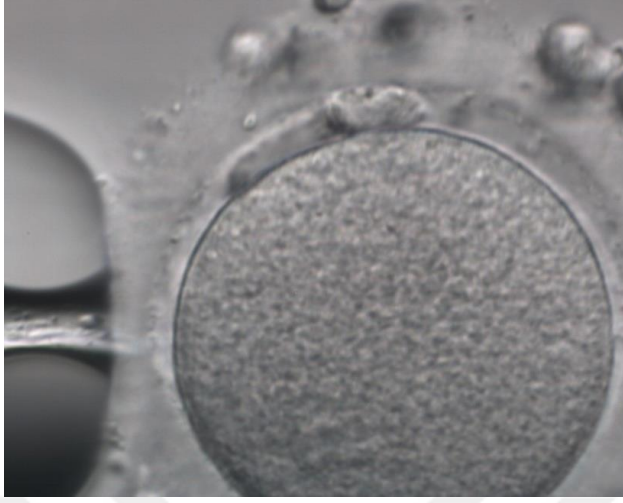
Resim 4: Perivitellin aralığında saat 12 (A) hizasında düzgün yüzeyli, (B)normal büyüklükte,fragmante yapıda ve (C) oval, büyük 1. kutup cisimcikleri.

1. kutup cisimcikleri 2 veya daha fazla parçalı olmaları halinde (Resim 4-B) “fragmante” olarak tanımlanırlar. Fragmantasyon gösteren kutup cisimciğine sahip oositlerde incelenen parametreler daha düşük oranda gerçekleşirken son grupta 1.kutup cisimciğinin çok iri olduğu (Resim 4-C) belirtilmiştir. 1. kutup cisimciğinin atipik olarak büyük olması 2. gündeki kötü embriyo kalitesiyle ilişkilendirilmiştir.



Resim 5: A) Dar PVA'lı bir diğer oositte saat 6 hizasında fragmante (3 parçalı) 1. kutup cisimciği., B) PVA'nın dar olduğu ve fragmante, yassı kutup cisimciğinin saat 9 hizasında lokalize olduğu

IVF uygulamalarında, fertilizasyon kontrolunda, özellikle pronukleusların görülemediği olgularda 2. kutup cisimciğinin varlığı kontrol edilir. Fragmante kutup cisimciği yanlışlıkla 2.kutup cisimciği olarak yorumlanabilir ki bu da yanlışlıklara neden olabilir. Bu nedenle mikroenjeksiyon sırasında 1. kutup cisimciğinin doğru ve net bir şekilde tanımlanması ilerleyen dönemlerdeki yanlış değerlendirmeleri de engeller.



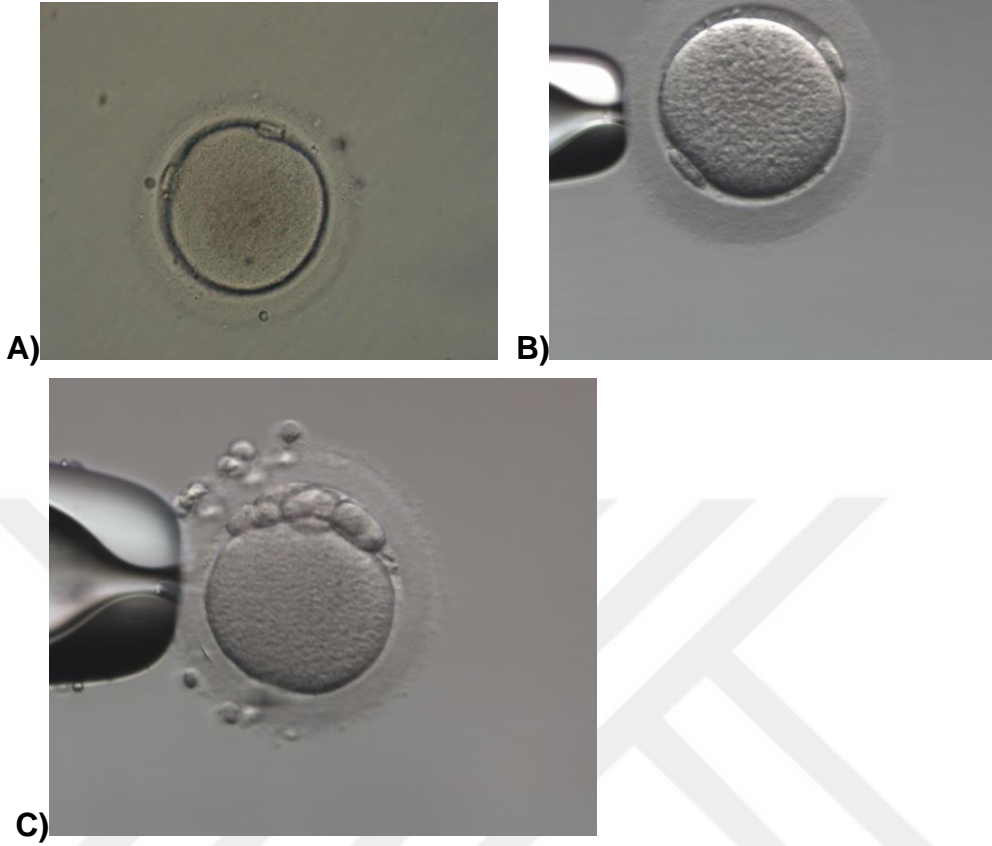
Resim 6: Sınırları düzensiz, küçük ve oval, fragmente kutup cisimciği.



Resim 7: Sitoplazmanın granülasyon gösterdiği, PVA'nın nispeten dar olduğu MII oositte saat 11 hizasındaki yassı kutup cisimciği.



Resim 8: Oolemmadan tamamen ayrılmış , geniş perivitalin aralıkta , bir kutup cisimciği.



Resim 9: Birbirinden tamamen ayrı (A) ve(B),(C) birbirine yakın yerleşim gösteren kutup cisimcikleri

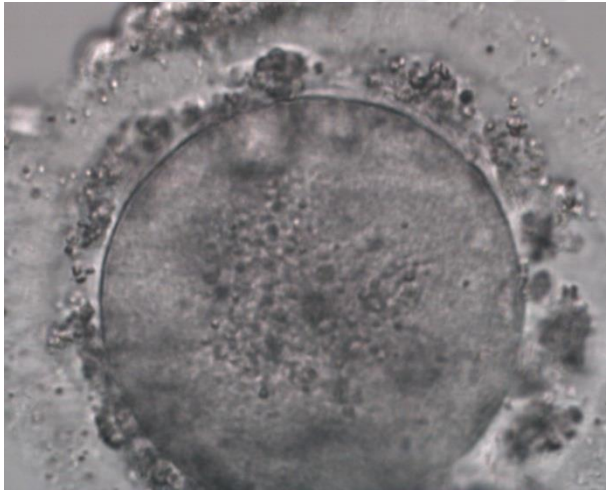
2.2.1.2. Perivitellin Alan Özellikleri

Ekstrasitoplazmik anomalilerden bir diğeri de perivitellin alanda görülen granülaritedir. Her ne kadar fertilizasyon, embriyoner gelişim ve gebelik oranlarını etkilemese de; Hassan Ali ve arkadaşları ovaryan stimülasyon sırasında gonadotropinlerin yüksek dozlarda kullanılmasının bu görünüme neden olabileceğini vurgulamışlardır (21). Ayrıca, perivitellin granülariteye neden olabilecek düzeydeki gonadotropinlerin folliküler mikroçevre özelliklerini değiştirerek oosit kalitesi ve oolemma özelliklerini etkileyebileceği de Palermo ve arkadaşlarının çalışmasında belirtilmiştir (22).

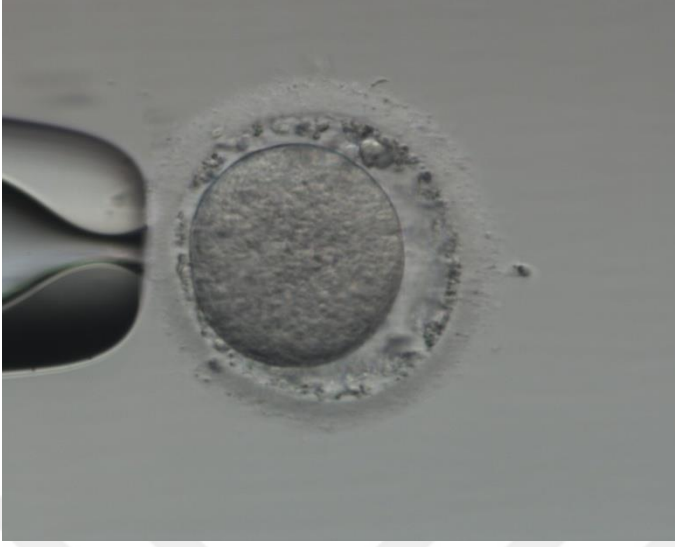
Perivitellin granülarite veya debriler dağınık ve ufak granüller halinde olabileceği gibi (Resim 10) zona pellusidaya komşu yüzeyde yoğun

olarak da gözlenebilir (Resim 11). Perivitellin alan granülaritesinin oluşumu tam olarak saptanamamıştır, ancak çok daha az olmakla birlikte PVA'da bir bölgeye lokalize olmuş, büyük debrislerin korona radiata hücrelerinden veya ekstrasellüler matriksten kaynaklanabileceği belirtilmektedir (23,24).(Resim 12).

Perivitellin aralık dar (Resim 13) veya geniş (Resim 14) olabilir. Geniş perivitellin aralığın embriyo kalitesini 1. kutup cisimciğinin normal boyutlarda olması halinde olumlu yönde etkileyebileceği belirtilmekle birlikte bu konuyu destekleyen daha fazla çalışmalara gereksinim olduğu da bildirilmiştir (3).



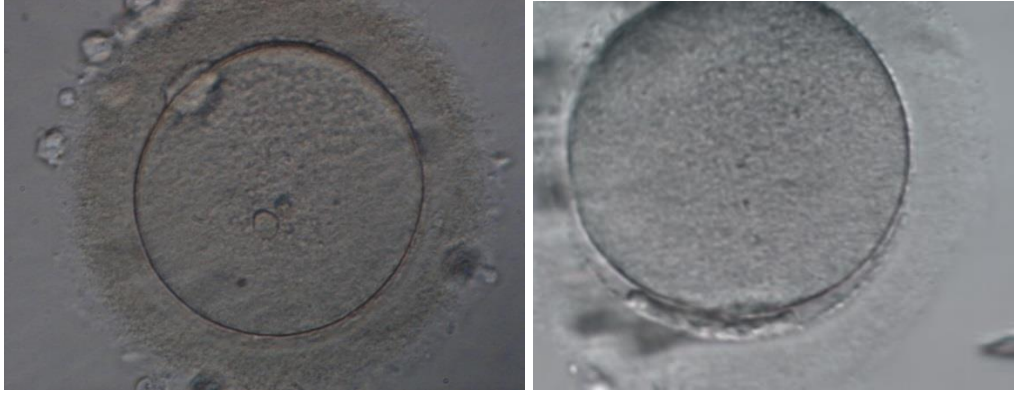
Resim 10: Perivitellin aralıkta yaygın olarak bulunan ince granüller halinde debris.



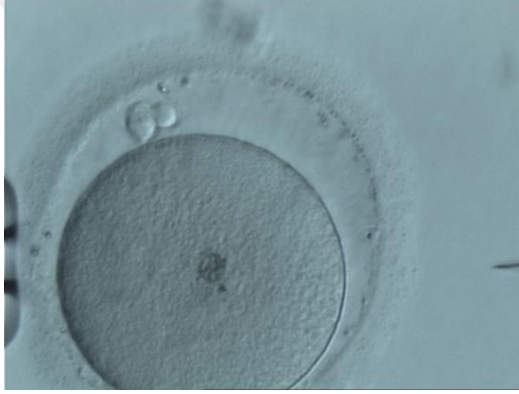
Resim 11: PVA'nın geniş ve debrisin zona pellusidanın iç yüzünde yoğunlaşmış iri granüller.



Resim 12: Zona pellusidanın ince ve perivitellin aralığın geniş olduğu bir oositte PVA'nın bir bölgesine lokalize olmuş, granüloza hücreleri veya ekstrasellüler matriksten kaynaklanan granüller.



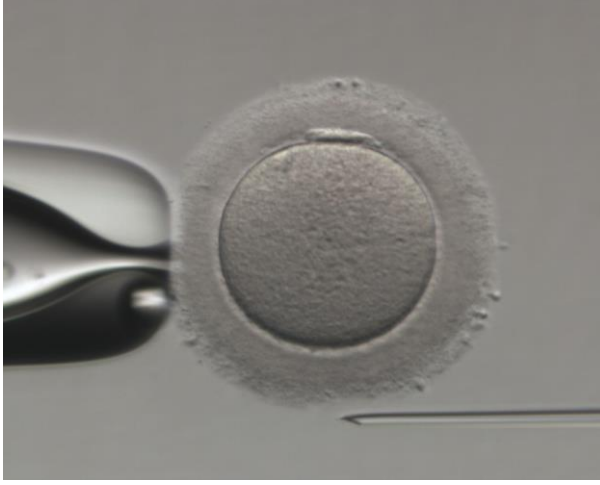
Resim 13: Kalın ve dış yüzeydeki düzensiz yapısıyla ZP ve dar PVA'nın gözlemlendiği bir MII oositler.



Resim 14: Dış yüzeydeki düzensiz yapısıyla ZP ve geniş PVA'nın gözlemlendiği bir MII oosit.

2.2.1.3 Zona Pellucida (ZP) Özellikleri

Zona pellucida oositlerin gelişme döneminden itibaren salgıladıkları ZP1, ZP2 ve ZP3 glikoproteinlerinden meydana gelen, insanda yaklaşık 15-18µm. kalınlığında, hücre içermeyen ve oositi oolemma ve PVA'nın dışında kesintisiz olarak kuşatan bir kılıftır (14,25)(Resim 15)



Resim 15: PVA'nın dar olduğu bir MII oosit, zona pellusidanın oositi oolemmanın hemen dışından itibaren kesintisiz olarak kuşattığı gözleniyor.

Elektron mikroskop çalışmaları zona pellusidanın düzgün ve kompakt ya da ağsı bir yapı sergileyebileceğini ve bu özelliklerin de oosit matürasyonuna eşlik edeceğini göstermiştir (26) .

Zona pellusidanın kalınlığı kadar yapısal özellikleri de farklılık gösterebilir. Genellikle oositlerde embriyolardakinden daha kalındır ve kompaktlaşmadan itibaren giderek incelir (Resim 16).

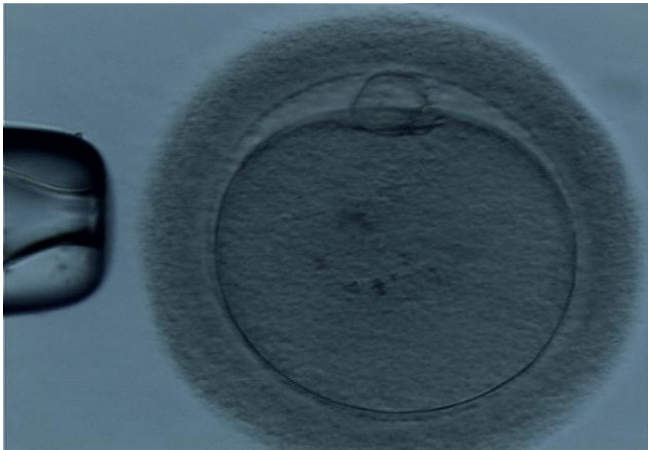


Resim 16: Resmin sol üst bölümünde görülen kompakt embriyonun ZP'sı sağ altta görülen blastosistinkinden daha kalın.

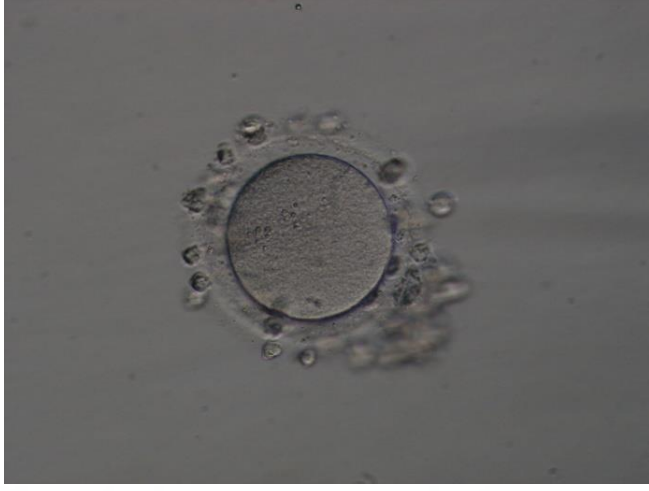
Zona pellusidanın saydam ve açık renkli olması beklenirken (Resim 17), kimi zaman da kalın ve koyu renkli olabilir (Resim 18). Zona pellusidanın kalın olması gibi ince olmasıyla da sık karşılaşılmaz (Resim 19). Çok daha az rastlanmakla birlikte zonasız oositler de görülebilir (Resim 20). Bu oositler de fertilize olabilir ve blastosist gelişimine kadar embriyoner gelişimlerini sürdürebilirler.



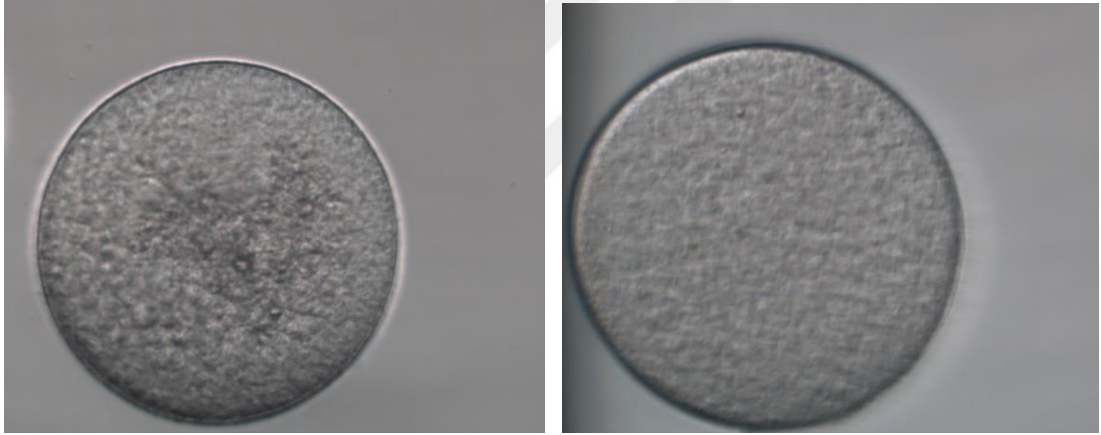
Resim 17: Transparan ve açık zenkli ZP.



Resim 18: Kalın ve koyu renkli zona pellusidanın sitoplazmanın da koyu olduğu MII oosite eşlik ettiği gözleniyor.



Resim 19: Genişlemiş perivitellin aralığı çevreleyen ince zona pellusida.



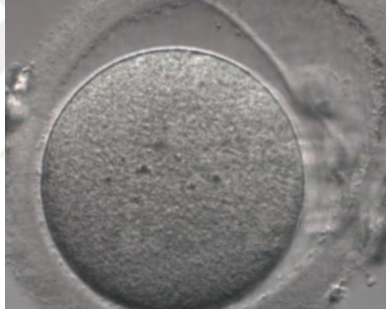
Resim 20: Zona pellusidası olmayan oositler.

Zona pellusidanın ince olmasının yetersiz embriyoner gelişime neden olabileceği düşüncesiyle 2005 yılında yapılan bir çalışmada zona pellusida tabakalarının polarize ışık mikroskobuyla ışığı kırma indisi arasındaki farklılıklar incelenmiş ve iç tabakanın ışığı kırma indisinin %30 kadar fazla olması durumunda gebelik oranının arttığı gözlenmiştir (27).

Zona pellusidanın oositin bir tarafında lokal bir kalınlaşma göstermesi (Resim21), tabakalı bir yapılanma sergilemesi ve kimi zaman da farklı katman ve şekillerde olmasıyla karşılaşılabılır (Resim 22).



Resim 21: MII oositin sol tarafında zona pellusidanın tabakalı bir yapılaşma sergilediği gözlenmektedir. Bu tabakalanmaya PVA granülaritesi de eşlik etmektedir. Sağdaki resimde ise zona pellusidanın oositin her iki tarafında tabakalandığı görülmektedir. Bu duruma iç zar varlığını göstermekte, icisi uygulamasında dejenerasyon veya düşük fertilizasyona sebep olduğu gibi başlıbaşına bir infertilite sebebi olarak ortaya konulmaktadır.



Resim 22: Zona pellusidanın sol tarafta tabakalı, sağ tarafta da giderek incelirken irregüler bir şekil aldığı gözlenmektedir, biovuler bir zar özelliği gözlemekte.

Lokal kalınlaşma ICSI sırasında oosit manipülasyonunu zorlaştırırken tabakalı zona pellusida mikroenjeksiyon sırasında sıkıntı yaratabilir. Bazen tek bir ZP içinde iki oosit de bulunabilir (Resim 23). Bu oositlerden birisi genellikle küçük, dejeneratif ve GV evresindeyken diğeri MII olabilir ve fertilize olması halinde bu oositten blastosist gelişimi de gözlemlenebilir.



Resim 23: Zona pellusida anomalisi: Aynı ZP içinde biri MII, diğeri GV evresinde iki oosit. MII oositte zona pellusidanın tabakalı ve sol-alt kısımda kalınlaştığı görülmekte. Her iki oosit de “biovüler oosit” olarak tanımlanır. İkinci resimde biovüler yapılardan birinin dejenere olduğunu görmekteyiz.

Zona pellusidada gözlenen bir diğeri yapısal değışiklik “zona splitting” olarak isimlendirilir ve OPU sırasında veya mekanik denüstasyonda artan stresten kaynaklanabileceğı veya zona proteinlerinin salgılanması sırasında geçici bir duraksamayı gösterebileceğı vurgulanmıştır (27).

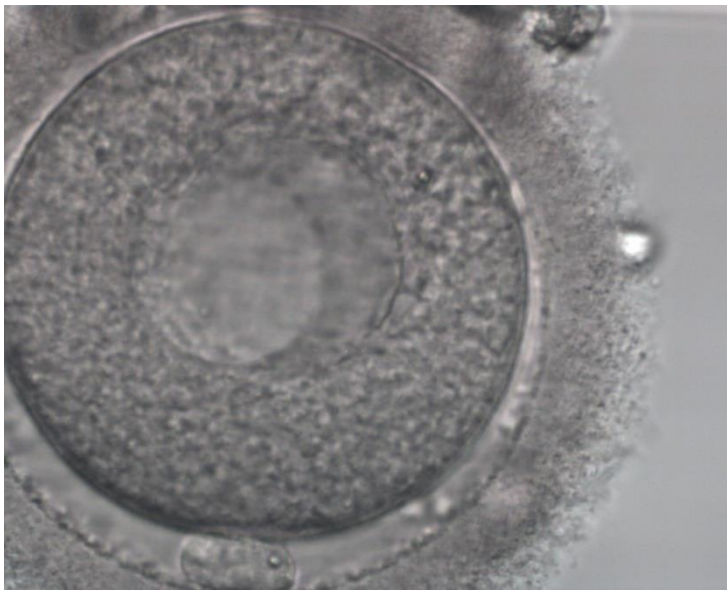
2.2.2. İntrasellüler Anomaliler

2.2.2.1. Vakuoller-sER Kümelenmeleri-Refraktil Cisimcik

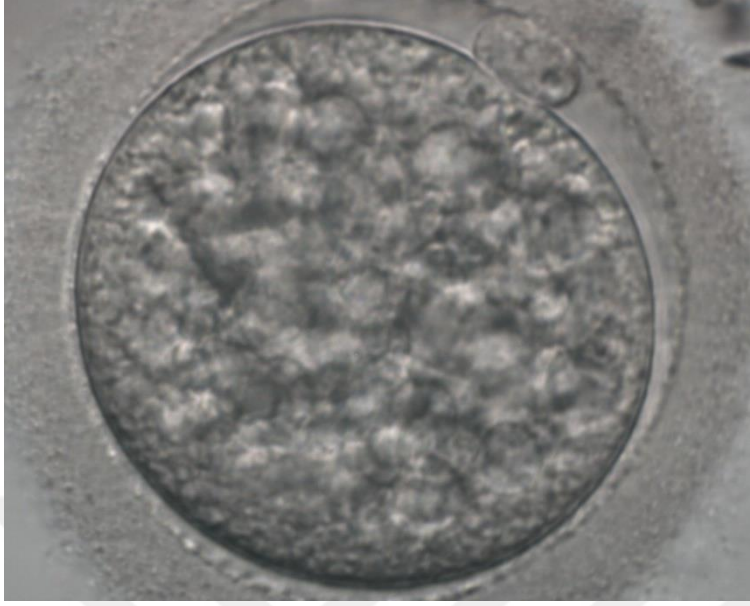
Işık mikroskopunda gözlenebilen oosit anomalilerinden birisi de sitoplazmik inklüzyonlardır. Düz yüzlü endoplazmik retikulum (smooth Endoplasmic Reticulum, düz endoplazmik retikulum, sER) kümelenmeleri ve vakuoller ekstrasitoplazmik anomalilerden farklı olarak embriyoner gelişimi bozan unsurlardır. Oositlerde gözlenen vakuoller 1990 yılında Van Blerkom ve arkadaşları tarafından membranla çevrili, içi perivitellin alan sıvısına benzer bir sıvıyla dolu sitoplazmik inklüzyonlar olarak tanımlanmıştır (14) . Aynı çalışma vakuollerin spontan olarak gelişebileceğini belirtirken El Shaife ve arkadaşları önceden var olan ve sER ile Golgi kompleksinden gelişen veziküllerin birleşmesiyle de şekillenebileceklerini vurgulamışlardır (14). Alikani ve arkadaşları (25) IVF olgularında vakuoller oositlerle karşılaşma

oranını %12,4 olarak belirtirken De Sutter ve grubu bu oranın %5,7 olduğunu ve çoklu (multiple) vakuolizasyonun %1 gibi küçük bir grupta gözlenebileceğini belirtmişlerdir (29,30,18). De Sutter ve arkadaşları vakuoller oositlerde fertilizasyon oranının %40 olarak gerçekleşmesi sonrasında vakuollerin fertilizasyon oranını düşüren bir anomali olarak yorumlamışlardır (18)

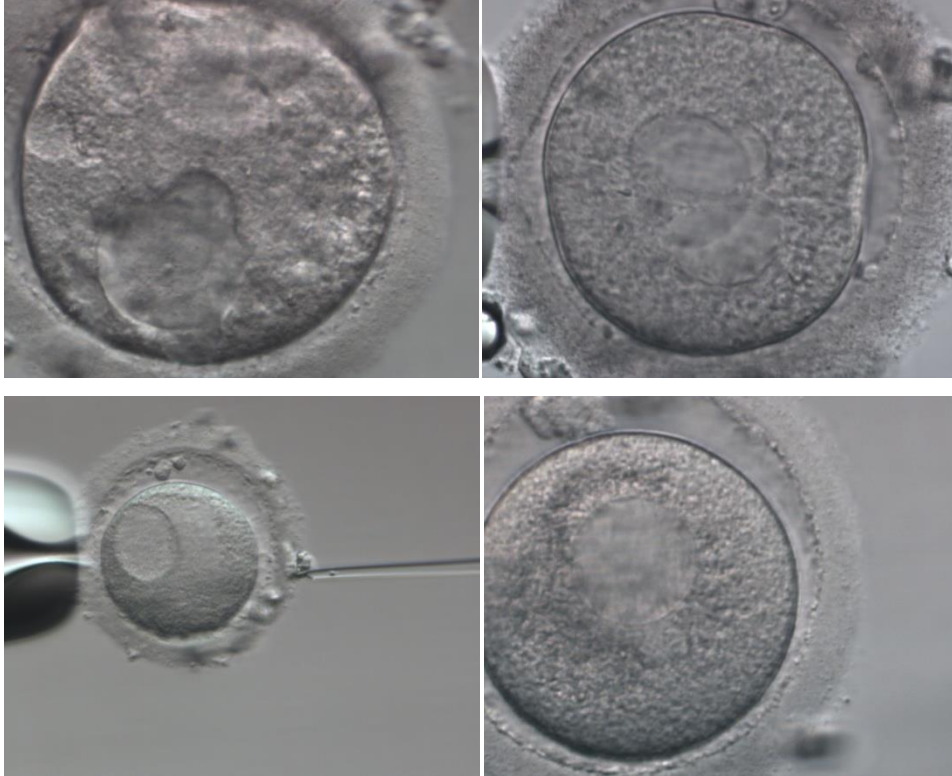
Vakuoller sitoplazma içinde tek tek (Resim 24) veya birkaçı bir arada bulunabileceği gibi (Resim 25) büyüklükleri de birbirinden farklı olabilir (Resim 26). Buradan da anlaşılacağı gibi fertilizasyon ve embriyoner gelişim vakuollerin büyüklüğü ve sayısı ile doğru orantılı olarak yetersizlik göstermektedir. Van Blerkom ve arkadaşlarının çalışmasında büyük vakuollerin metafaz içiğinin yerini değiştirerek fertilizasyonu engelleyebileceği belirtilirken genel olarak hücre iskeletinin mikrotübüler organizasyonunu bozarak bu tür etkileşime neden olduğu kabul edilir (14). Bu zararlı etkileşimler sonucunda fertilizasyon gerçekleşmeyebilir veya bölünme evresinde anomalilerle karşılaşılabilir (14). Ebner ve arkadaşları vakuol çapının önemini pronukleusların büyüklüğü ile ilişkilendirerek incelemiş ve vakuollerin 14µm.den büyük olduğu olgularda fertilizasyonun gerçekleşmediği vurgulanmıştır (31) .



Resim 24: Sitoplazmanın merkezine yakın yerleşim gösteren, iri bir vakuol.



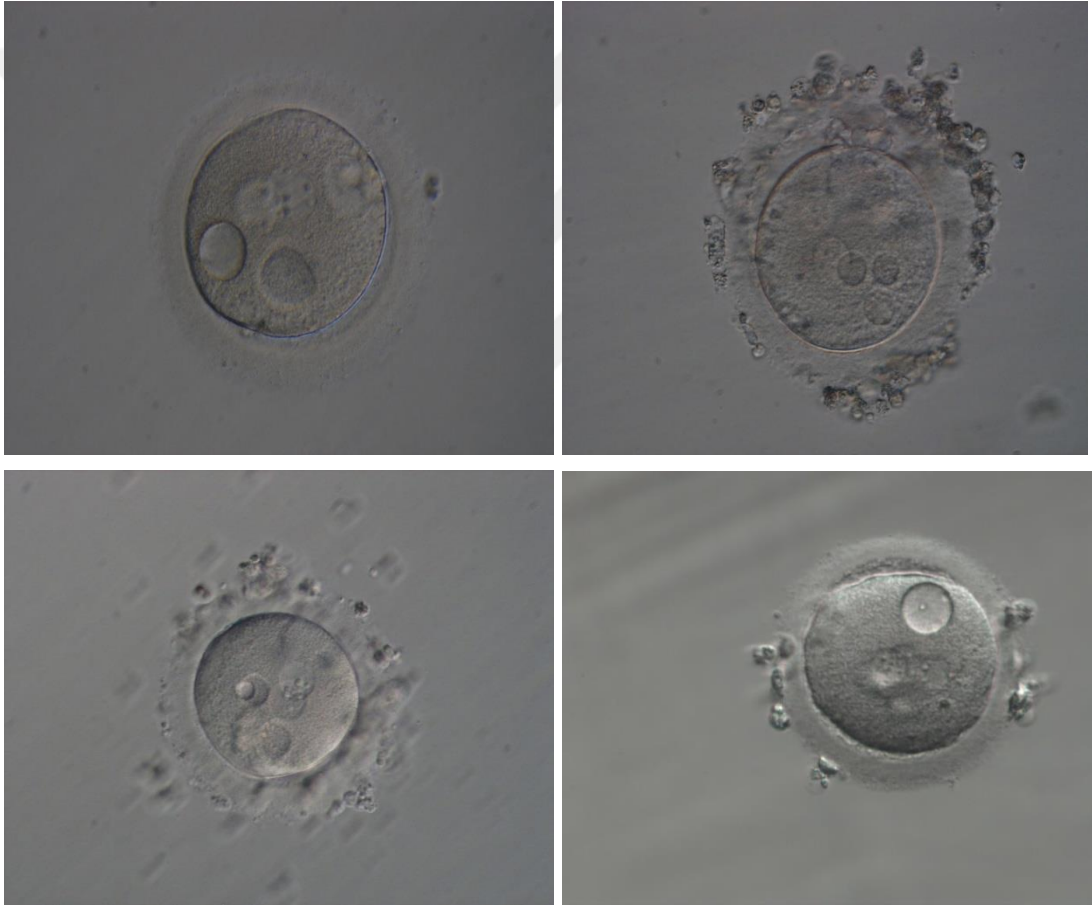
Resim 25: Büyüklükleri birbirinden farklı, çok sayıda vakuol içeren bir oosit.



Resim 26: Birbirinden farklı büyüklüklerde ve farklı bölgelerde yerleşim gösteren vakuoller.

Vakuoller oositin itibaren varlıklarını embriyoner gelişimde de sürdürdüklerinden özellikle fertilizasyon kontrolunda dikkatli olunması gerekir. Zigotlarda vakuoller pronukleuslarla aynı büyüklükte ve lokalizasyonda

olabilirler (Resim 27) ve yanlışlıkla pronukleus olarak algılanabilirler. Vakuollerin içlerinin boş olmasına karşın pronukleusların nukleolar öncülleri (Nucleolar Precursor Body, NPB) içermeleri ayırıcı tanıda dikkate alınmalıdır. Embriyoner gelişim sırasında blastomerlerde farklı büyüklükte vakuoller olabileceği gibi (Resim 28) blastosist gelişimi sırasında önceden saptanmamış olsa da bazı blastomerlerin vakuolizasyon göstermesi muhtemeldir.

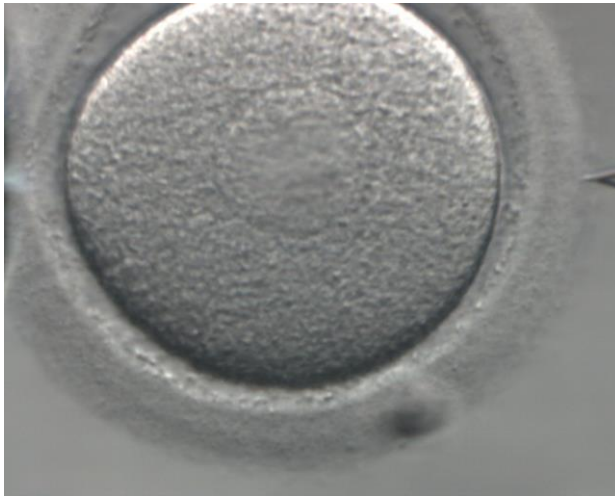


Resim 27: Fertilize olan vakuoler oositlerde pronukleuslar ve büyüklük ve lokalizasyonu nedeniyle pronukleuslarla karıştırılabilecek vakuoller.

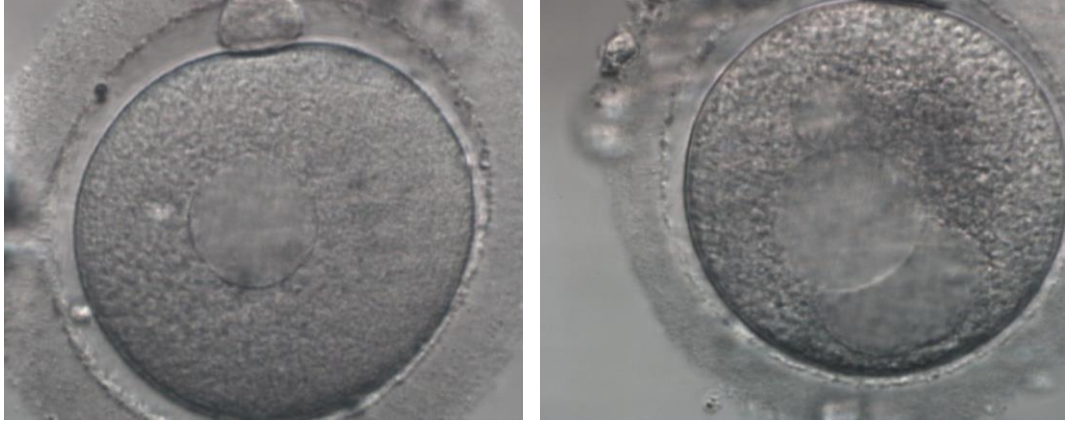


Resim 28: Fertilize olarak embriyoner gelişimini sürdüren oositlerdeki vakuoller blastomerlerde gözlenmekte.

Vakuollerin oluşum mekanizmalarının bilinmesine karşın sER'lerin gelişimi tam olarak netleştirilememiştir. Ovulasyon indüksiyonunda kısa protokolların kullanıldığı hastalarda bu anomalinin daha sık gözleendiği belirtilmektedir (10). Aışkın bir göz ooplazmada daha silik olan sER kümelenmeleriyle (Resim 29) membranla çevrili vakuolleri kolaylıkla ayırt edebilir.



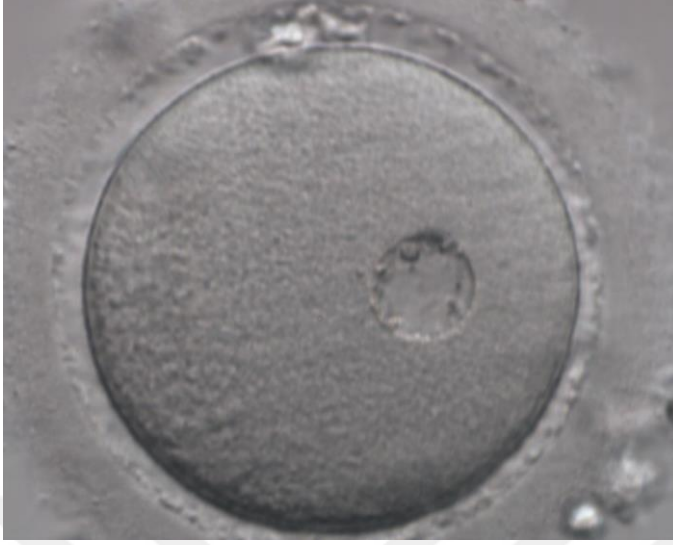
Resim 29: Merkezi tek bir SER oluşumu görülmekte.



Resim 30: Ooplazmada farklı büyüklük ve şekillerdeki sER kümelenmeleri.

sER kümelenmesi içeren oositlerin mikroenjeksiyonunda pipetin bu oluşumun çevresindeyken işlemin tamamlanması fertilizasyonu sağlayabileceği ve blastosist gelişim oranının da %18'lere kadar çıkabileceği belirtilmiştir(10). Yine aynı çalışma erken preembriyoner gelişimin çok farklı olmamasına rağmen sER kümelenmeleri içeren oositleri olan hastaların biyokimyasal gebelik oranlarının daha yüksek olduğuna dikkat çekmiştir. sER kümelenmeleri düzgün yüzeyli ve yuvarlak olabileceği gibi irregüler de olabilir (Resim 30).

Refraktil cisimcikler de bir sitoplazmik inklüzyon olup (Resim 31) klasik IVF'de fertilizasyon oranının düşük ve embriyo kalitesinin yetersizliğine neden olabileceği gösterilmiştir (25).



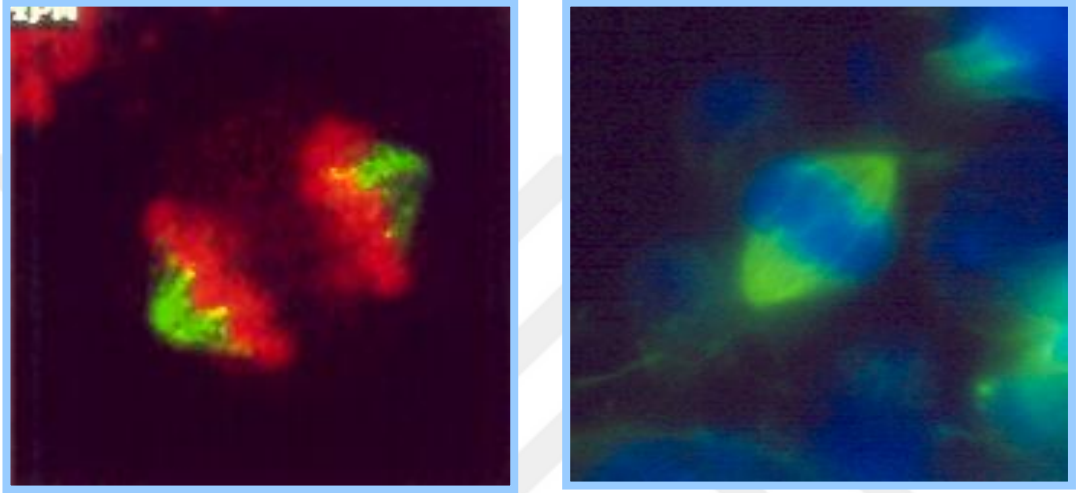
Resim 31: Sitoplazmasında refraktil cisimcik bulunan bir oosit.

Sitoplazmik anomalilerin oluşum dönemlerine bağlı olarak etkili olabileceğini savunan araştırmacılar dişi gametlerinin gelişiminin erken döneminde gözlenen anomalilerin fertilizasyon defekti ve anöploidi oluşumuna, daha geç dönemde gelişenlerin ise gelişim yetersizliğine neden olduğuna vurgu yaparak oosit dismorfizmini sınıflamış ve önemine dikkat çekmişlerdir (6). Bu hipoteze göre oogonyumların birleşmesi, koyu santral granülasyon ve mayoz içiğinin gelişmemesi erken dönemde gözlenen anomalilerdir ve anöploidi riskini arttırırlar. Buna karşın, daha geç dönemde gelişen sER ve vakuoller embriyoner gelişim defektlerine neden olabilmektedir.

2.2.2.2. Metafaz İğciği

Birinci kutup cisimciği gözlenmesine karşın bu oositlerin halen telofaz I veya profaz I evresinde olabileceği gösterildiğinde metafaz II içiğinin gözlenmesinin ve pozisyonunun önemi de vurgulanmıştır (33,34,35,36). Polarize ışık mikroskopunun kullanılmasıyla birlikte, mayoz içiğinin (Resim 33) pozisyonu embriyo kalitesiyle ilişkilendirilmiş ve içiğin görülmemesi halinde embriyo kalitesinin dramatik bir şekilde düştüğü belirtilirken Rienzi ve arkadaşları 1. kutup cisimciği ile içiğin açılanması

artıkça embriyo kalitesinin kötüleştiğini belirtmişlerdir(34,35,36,37,38). Ayrıca fertilizasyon oranının da açılanmanın azalmasıyla birlikte arttığı vurgulanmıştır. Bu konudaki çalışmaların sonuçları çelişkili olmakla birlikte: mayoz içiğinin gözlenmesinin blastosist gelişimiyle ilişkisi ilk kez 2001 yılında Wang ve arkadaşlarınca gösterilmiştir (33).



Resim 32: Polarize ışık mikroskobuyla saptanan mayoz içiği.

2.2.2.3. Sitoplazmik Matürasyon ve Sitoplazmanın Yapısal Özellikleri

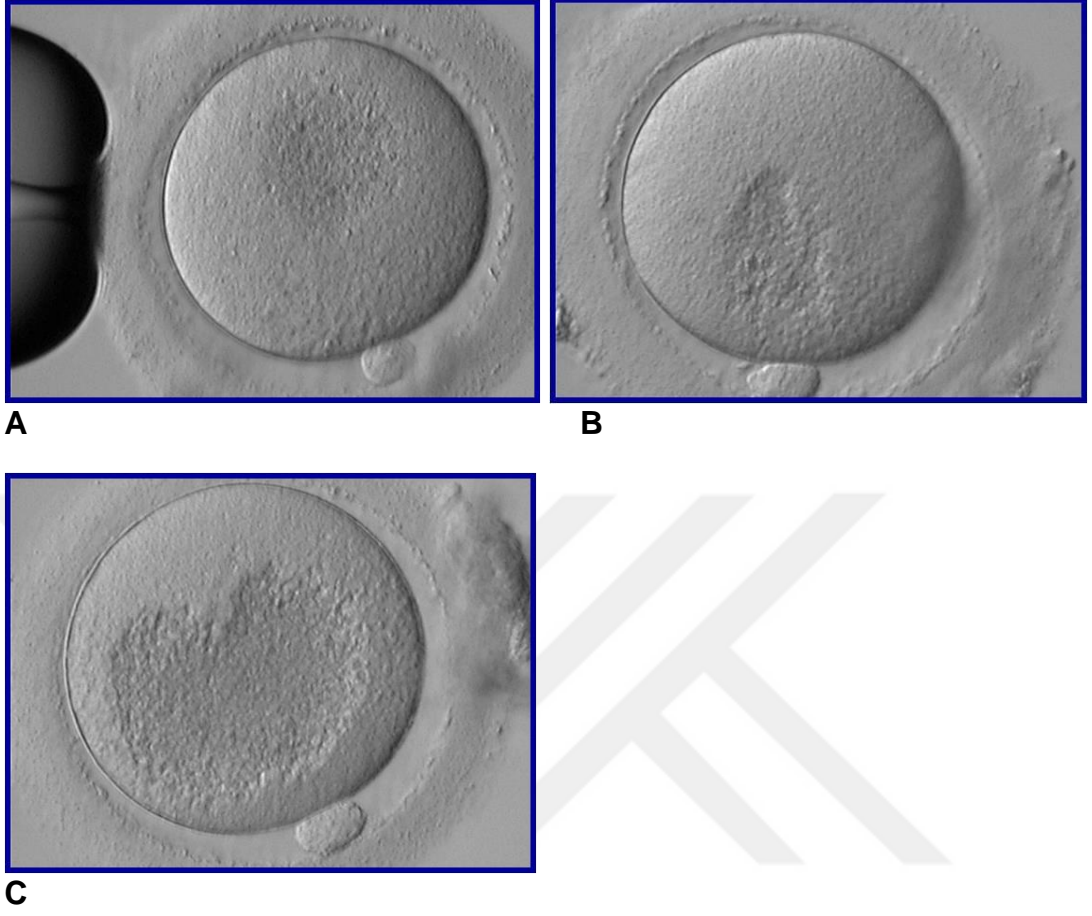
Ooplazma matürasyonu in vitro fertilizasyon uygulamalarında gelişimi etkileyen önemli bir parametre olmakla birlikte bu konudaki çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır. MII oositlerin sitoplazması renksiz ve homojen olmalı ve inklüzyon içermemelidir (Resim 33-A). Ancak kimi zaman hafif (Resim 33-B), kimi zaman da şiddetli ve yaygın granülasyon gözlenebilir (Resim 33-C). İnsan oositlerinin yarısından fazlasının en az bir morfolojik anomali göstermesine karşın bir bölümü ışık mikroskobu düzeyinde görülemez(39).

2.2.2.4. Koyu, Granüler Oositler

Olgun insan oositinin çapı yaklaşık olarak 110-115 µm olup, oolemma adı verilen plasma membranı ile çevrilmiştir. Oolemma'nın dışında zona pellusida olarak adlandırılan 15-20 µm genişliğinde ve fertilizasyon sonrası incelen glikoprotein yapıda bir kılıf bulunur. Oolemma ile zona pellusida arasında, içi sıvı dolu perivitellin alan yer alır. Oosit sitoplazması ooplazma olarak da adlandırılır ve ooplazmada yer alan temel organeller, mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi sistemidir. Mikroskop altında ooplazma homojen yapıda, açık renkli ve parlak görünümlü olup, oolemma tarafından düzgün bir yüzey oluşturacak şekilde kesintisiz olarak çevrelenir (18) (Resim 34) .

IVF olgularında oositlerin sitoplazmik özelliklerini irdeleyen çalışmaların bir bölümünde sitoplazmik organizasyonun göstergesi olduğu öngörüsüyle sitoplazmik granülasyon üzerindeki çalışmalarda yoğunlaşmıştır.

Sitoplazmik granülasyon homojen dağılım gösterebileceği gibi (Resim 35) merkezi yerleşimli de olabilir (Resim 33-A,B,C). Homojen granülasyon tüm sitoplazmada yaygın olarak veya yer yer kümelenmeler halinde gözlenirken merkezi granülasyonda ise çevredeki normal sitoplazma kolaylıkla ayrılabilir (Resim 33-A,B,C). Merkezi granülasyon geniş, koyu renkli ve süngerimsi granüler alan olarak dikkat çekicidir ve merkezi granülasyonun ağır ya da hafif derecede oluşunu lezyonun çapı belirler. Hafif granülasyondan farklı olarak, çok yoğun koyuluk genellikle oositte dejenerasyon veya matürasyon yetersizliği olarak yorumlanır (12,34,35,36,37).

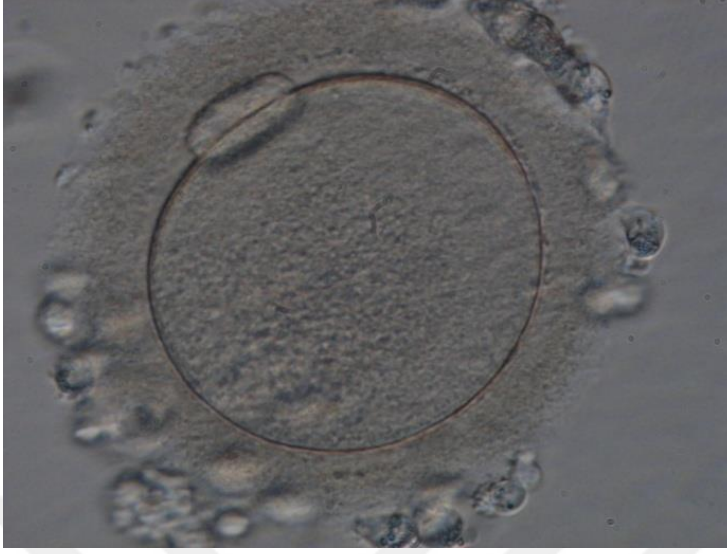


Resim 33: A ve B MII evresindeki iki oositte sitoplazmanın merkezi granüler yapısı ve perivitalin aralığının genişliği dikkat çekerken B) MII oosit sitoplazmasında geniş ve yaygın granülasyon içeren oosit görülmekte.

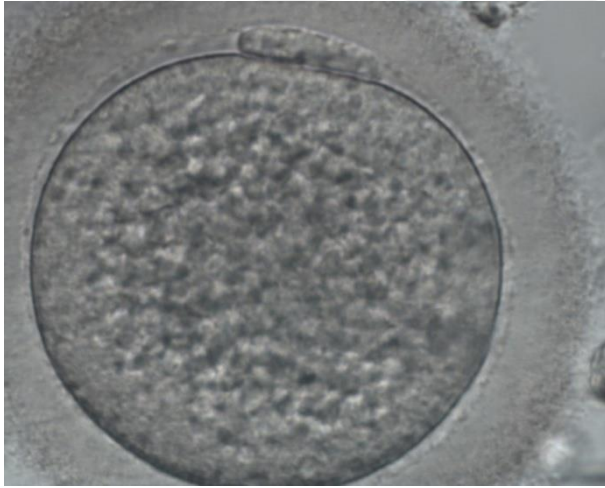
Sitoplazmik granülasyondaki artış embriyoner gelişim potansiyelinde gerileme ve azalma ile karakterize değildir (39,40,41,42,43,44). Fertilizasyon oranları da granüler ve nongranüler oositlerde benzerdir. Bununla birlikte granüler grupta triploid fertilizasyon oranı bir miktar yüksek olarak bulunmuştur (45,46). Benzer şekilde, granüler sitoplazmalı oositlerden gelişen ve blastomerleri granülasyon gösteren embriyolarda gebelik potansiyeli de azalmaz (18). Bazı ticari mediumlarla kültüre edilen oositlerde ve preembriyolarda yoğun granülasyon ve/veya yer yer sitoplazmik koyuluk görülebilir. Bu durum başlangıçta viabilitenin azalması ve negatif bir durum gibi gözükse de embriyo transferi sonrası klinik gebelik oranı üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı gözlenmiştir (2). Genellikle hafif ve orta

granülasyon izlenen oositlerden, hafif ve orta granüler yapılı blastomeri olan embriyolar (Resim 33:A,B) oluşurken, yoğun granüler oositlerden, yoğun granüler yapılı blastomeri olan embriyolar gelişir (Resim 33:C)(Resim 34).

Serhal ve arkadaşlarının çalışmasında morfolojik olarak anormal oositlerin fertilizasyon oranının, normal oositlerden farklı olmadığı gösterilmiş, ancak merkezi granüler oositlerden gelişen embriyoların transferiyle, implantasyon ve gebelik oranının düşük olarak gerçekleştiği bildirmiştir (47). Bu çalışmada 837 oosit değerlendirilmiş, 538'i normal oosit olarak tanımlanıp mikroenjeksiyon işlemi yapılmıştır. Mikroenjeksiyon yapılan diğer 299 oositin 142'sinde yoğun granülasyon, 112'sinde de sitoplazmik cisimcikler bulunmaktadır. Geri kalan 75 oosit işleme alınmamıştır. Normal oositlerle anormal sitoplazmalı oositlerin fertilizasyon oranları arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Her iki grupta da embriyolar normal gelişimlerine devam ederek benzer kalitede embriyolar gelişmiştir. Ancak, normal oositlerden gelişen embriyoların transferiyle %24 gebelik oranı, %10 implantasyon oranı elde edilirken anormal sitoplazmalı oositlerden gelişen embriyoların transferiyle bu oranlar sırasıyla %3 %1 olarak gerçekleşmiştir (48). Bu çalışmalardan farklı olarak Veeck'in 1991'de yaptığı bir çalışmada sitoplazmik anomalili ve koyu granüler sitoplazmalı oositlerde fertilizasyon oranının düştüğü belirtilmektedir (40). Bu çalışmada özellikle sitoplazmik cisimcikleri olan oositlerde IVF uygulamaları sonucu belirtilen parametrelerin (fertilizasyon ve gebelik oranları) düştüğü saptanmıştır. Serhal ve arkadaşları vakuollü ve sitoplazmasında sER kümeleri bulunan oositlerin mikroenjeksiyonu ile normal fertilizasyon elde etmişler fakat, gebelik elde edememişler (47).



Resim 34: Sitoplazmanın sağ periferik alanda homojen, merkezde ise hafif granülasyon gösteren MII oosit.



Resim 35: Sitoplazmanın çok yoğun granülasyon gösterdiği bir oosit.

Anormal oosit morfolojisi gametlerin maruz kaldığı ovaryan stimülasyon, hormonal değişiklikler ve oositin kromozomal içeriği ile ilgilidir. Ayrıca, Van Blerkom ve arkadaşları abnormal sitoplazmik yapılanmaları olan oositlerde anöploidi oranının yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (6).

2.2.2.5. Ovoid Oositlerde Embriyoner Gelişim

Fertilizasyonda zona pellusida (ZP) primer kontrolör rolünü üstlenir. Bu yapı farklı türe ait spermin geçişini ve oolemma ile kontakını

engeller. Ayrıca zona, polispermiye karşı etkin bir bariyerdir. Bir spermin penetrasyonu sonrası, yapısal değişikliğe uğrayarak diğer spermilerin girişini engeller. Transparan yapıda, oosit ve perivitellin aralığı çevreleyen aselüler bir kılıftır (49).

Sağlıklı, henüz fertilize olmamış bir oositte rengi açık, berraktır ve devamlılık oluşturur. Kalınlığında farklılıklar olabilir, hafif benekli olabileceği gibi koyu renkli, kompakt bir yapılanma da gösterebilir. ZP, embriyonun uterusu olan yolculuğu sırasında da koruyucudur. Fertilizasyondan yaklaşık 6 gün sonra hatching aşaması gerçekleşir, genişlemiş olan blastosist zonadan sıyrılıp implantasyon yeteneği kazanmış olur (45).



Resim 36: Oval oosit morfolojisi

ZP'daki şekil ve kompozisyon bozuklukları sonucu, oosit, prezigotlar ve preembriyolarda sıra dışı sitoplazmik kontürler görülebilir. Ovoid oosit ve embriyolar, ZP'da meydana gelen bu şekil bozukluklarına eşlik edebilirler. Ovoid oosit, sadece zonası ovoid, ooplazması normal (Resim 36), ya da hem zonası hem de ooplazması ovoid olarak iki grupta gözlenebilir. Her ne kadar biçimleri farklı olsa da; ovoid oositler ve diğer sıra dışı şekillerdeki oositler, monospermik fertilizasyon ve sonrasındaki bölünme aşamalarını devam ettirebilirler (1).

Ebner ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada ovoid oositlerin gelişimlerini ve gebelik oluşturma potansiyellerini incelemişlerdir¹². 525 ICSI siklusunun dahil edildiği çalışmanın, 94 siklusunda (%17.9) en az bir ovoid oosit görülmüştür. Bu grup içindeki ovoid oosit oranı %16.6 (137/827) iken, dahil edilen tüm hastalar arasındaki oran %3.9 (137/3524) olarak saptanmıştır (1).

Normal, yuvarlak yapıda ZP'sı olan embriyolarda blastomerler arası kontakt maksimumdur. Blastomerler arasında ne kadar çok bağlantı noktası olursa embriyodaki sıkı bağlantı birimlerinin sayısı da o kadar çok olacaktır. Diğer yandan, ovoid oositlerden gelişen embriyolarda tam tersi olur ve embriyodaki bağlantı noktaları azalır. Böyle durumlarda da optimal hücre birleşmeleri daha az oranda oluşur ya da hiç oluşmaz. Kısaca, ovoid zona (ovoid sitoplazma değil) atipik bölünme ve dolayısıyla gecikmiş birleşme ve geç blastosist oluşumuna neden olur (9). ZP şekli ve perivitellin boşluğun büyüklüğü embriyo gelişiminde önemli bir rol oynamasa da, bu yapılarıdaki anormallikler düşük gebelik oranlarına sebep olabilir (27).

Ovoid oositlerin oluşumu ile ilgili 2 mekanizma öngörülmüştür. Birinci mekanizmada, oosit toplama işlemi ya da denüstasyon sırasında oositin maruz kaldığı mekanik stresin, gametin bu şekli almasına sebep olduğu düşünülmektedir. Bu tür istenmeyen durumlardan hem ooplazma hem de zona etkilenmektedir. Ancak oositin eski şekline dönme eğilimi vardır ve kendini toparlar. Bir diğer mekanizma, ovoid yapının, oosit follikül içindeyken zona proteinlerinin oluşması esnasında protein salınımının geçici olarak kesilmesiyle meydana gelmesidir (27).

Sitoplazmik matürasyon ışık mikroskopunda gözlenemese de çoğu zaman mikroenjeksiyon sırasında işlemin özelliği sayesinde hissedilebilir. Ooplazmanın akıcı veya visköz oluşu mikroenjeksiyon sırasında sitoplazmik aspirasyonun pipet içine hızla veya yavaş girişiyle ayırt

edilebilir. Akıcı ooplazma enjeksiyon pipetine hemen dolar ve işlemten sonra oosit yapısı hızla geri döner. Mikroenjeksiyondan sonra ooplazmada huni benzeri bir görünümün oluşması sitoplazmanın visköz olduğunu gösterir ki bu da fertilizasyonu izleyen özelliklerin değişmesine neden olabilir (40) (Resim 37).



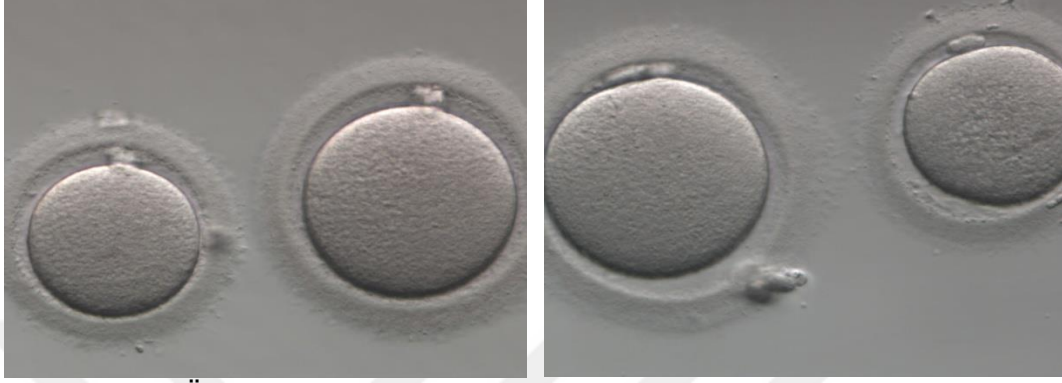
Resim 37: Mikroenjeksiyon işleminin tamamlanmasının ardından ooplazmanın saat 3 hizasında sergilediği huni biçimindeki yapısal özellik.

Palermo ve arkadaşları ise oolemmenin yapısal özelliğinden dolayı mikroenjeksiyon pipetine direnç hafif bir direnç göstermesi gerektiğini, bu direncin hissedilmediği oositlerin sitoplazmik matürasyonunun yetersiz olabildiğini ve çoğunlukla da oolemmadan sitoplazma akışının gerçekleştiğini gözlemişlerdir (22) . Oolemmenin direncinin arttığı olgularda ise ovaryan stimülasyon protokolları nedeniyle folliküler mikroçevrenin olumsuz etkisini sorumlu tutmuşlardır. Ebner ve arkadaşları ise bu özelliğın zona pellusidanın dış tabakasının üç boyutlu yapısındaki değişiklikten kaynaklandığını vurgulamaktadır (40).

2.2.2.6. Dev Oositler

IVF uygulamalarında çok seyrek (%0,26-%0,31) olmakla birlikte dev oositlerle de (giant oocyte) karşılaşılabilir. Yaklaşık 200µm. çapındaki dev oositler genellikle E2 düzeyi yüksek olan ve fazla sayıda oosit alınan

hastalarda görülmesi dolayısıyla bu anomalinin ovaryan stimülasyon protokollarından kaynaklandığı kabul edilir (41,42,43) (Resim 38).



Resim 38: Üste MI dev oosit ve hemen altında yine MI ,ancak normal boyutlardaki bir başka oosit.

Dev oositler mitotik bölünme sırasında sitokinezisin gerçekleşmemesinden veya iki oogonyumun birleşmesiyle de şekillenebilir. Her iki durumda da diploid genetik materyalin varlığı unutulmamalıdır ve bu özellikler immatür dev oositlerin binuklear özelliklerini de açıklayabilir (44).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç ve Malzemeler

G-MOPS

G-FERT

G-G1

G-G2

ICSIX100

G-PGD

HYASE

FALCON 2001

FALCON 2003

FALCON 3014

FALCON 3801

Falcon 3803

FALCON 7551

FALCON 35803

FALCON 35801

TOP-LINE FILTER TIPS(1-100µl)

TOP-LINE FILTER TIPS(5-10µl)

ICSI DISH(THERMO SCIENTIFIC)

QUINN'S ADVANTAGE MEDIUM WITH HEPES

3.2. Oosit Toplama (OPU) İşlemi

Oosit toplanması işlemi (OPU; oocyte pick-up) sırasında tüm oositlerin en kısa sürede elde edilmesi, elde edilen kumulus-korona-oosit kompleksinin maturasyon seviyesinin değerlendirilip inseminasyon için uygun bir ortam sağlanması çok önemlidir.

3.3. OPU Öncesi Hazırlık İşlemleri

Oosit karşılama mediumu (oda atmosferinde pH dengesinin sabit tutulmasını sağlayan sodyum bikarbonat, hepes veya MOPS tamponlu medium), oosit toplama işleminden bir gün önce 10 ml'lik tüplere (Falcon 2001) 3 ml olacak şekilde bölünür ve sadece ısınması için tamamen kapalı olarak etüve kaldırılır. Karşılama mediumunun üzerinin kaplanacağı mineral oil'de aynı şekilde bir gün öncesinden 50 ml'lik flaslara (Falcon 3014) bölünerek ağzı kapalı şekilde etüve alınır. Oositleri toplanacak olgu isimleri iki adet olmak üzere etiketlere yazılır.

Oosit toplama amacı ile kullanılacak olan petri kapları (Falcon 353803 ve Falcon 353801) laminar air flow'un ısıtılmış yüzeyine konur. Petri kabı sayısının 10 adetten fazla ve üstüste konulan petri kabı sayısının 2 adetten fazla olmaması gerekmektedir. Isınan petri kapları kullanıldıkça yerine yenisi konur. İki adet insülin enjektörü ambalajından çıkarılarak laminar air flow içine konur ve plastik korumaları çıkarılmaz. Her olgu için 2 adet steril pastör pipeti alınır ve uçları etil alkol alevi ile yuvarlaklaştırılır. Puar takıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelen pastör pipetleri sporlarına konur.

3.4. Oosit toplama İşlemi

Oosit toplanması işlemi transvajinal ultrasonografi eşliğinde genel anestezi altında yapılır. İşlem için tek yada çift lümenli steril iğneler

kullanılmaktadır. İşlem sırasında oosit kalitesini ve embriyo gelişimini etkileyebilecek olan ısı, osmolarite ve pH değişimlerini en aza indirmek için, oositler en kısa zamanda kültür mediumuna alınıp inkübatöre kaldırılmalıdır. Oosit toplama işleminde kullanılan aspirasyon pompası ısıtıcı bloğa sahip olmalı ve toplanan folikül sıvısı ve foliküllerin içerisindeki yıkama için kullanılan yıkama mediumu sürekli 37°C'de tutulmalıdır. Folikül aspirasyonuna başlamadan en az 15 dakika önce, etüvde bekletilen 3 ml' lik oosit karşılama mediumu alınır, kapağı açılır ve ısıtıcı yüzey üstünde bulunan oosit karşılama kabına (Falcon 3801) boşaltılır. Daha sonra inkübatörde bulunan mineral oil flaskı alınır. 1 adet 10 ml 'lik steril pipet (Falcon 7551) ile 3 ml aspire edilerek karşılama mediumunun üzeri örtülür. Petri kabın kapağı kapatılarak ilk oosit bulununcaya kadar kenara çekilir Foliküler sıvıda oosit aranması laminar air flow içindeki stereomikroskop yardımı ile gerçekleştirilir. Otomatik aspirasyon pompası içinde önceden ısıtılmış yerlerinde duran tüpler aspire edilen follikül sıvısı ile birlikte avuç içinde tutularak laminar flow'un ısıtılmış yüzeyinde duran büyük petri kaplarına(Falcon 3803) aspirasyon sırasına göre hafifçe çalkalanarak dökülür.

Daha sonra sıvının bulunduğu petri kabı eğimlendirerek çevrilir, kumulus ya da diğer hücrelerin olup olmadığı araştırılır. Oosit bulunduğunda, önce pastör pipeti ile küçük bir volüm karşılama mediumu alınır, daha sonra foliküler sıvının bulunduğu petri kabından mümkün olduğu kadar az sıvı ile oosit korona kümulus kompleksi alınır. Oosit karşılama kabının kapağı açılarak pipetin içindeki oositler, petri kabının alt kenarına (saat 6 hizası) gelecek şekilde yavaş bir hareketle boşaltılır. Oositlerin, oosit karşılama kabında çok uzun süre kalmaması gerekmektedir. Mümkün olan en kısa sürede, oositler karşılama mediumundan alınıp birincil kültür ortamına alınmalıdır. Foliküler sıvıda başka oosit olup olmadığı kontrol edilerek kanlı follikül sıvısı bulunan petri kapları atılır. Bu uygulamalar, oosit toplama işlemi

bitinceye kadar tekrar edilir. Oosit toplama işlemini yapan klinisyene, son gelen örnekte oosit olup olmadığı, toplanan toplam oosit sayısı bildirilmelidir.

Oosit toplama işlemi bittikten sonra insülin enjektörleri yardımı ile oosit karşılama mediumundaki tüm oositler, petri kabın eritrosit içermeyen bölgesine(saat 12 hizası) taşınır ve toplam oosit sayısı belirlenir. Daha sonra oosit kumulus diseksiyonu gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında sağ ve sol elde bulunan insülin enjektörleri ile kumulus-mass içerisinde bulunan oosit sıkıştırılarak kumulus kütlesi kenarına getirilir. Maksimum 2-3 hamle ile kumulus-mass kenarına getirilen oosit sol elde bulunan insülin enjektörü ile sıkıştırılır ve sağ elde bulunan insülin enjektörü ile diseksiyeye edilir. Kumulus-mass'in oosit içermeyen kısmı insülin enjektörünün ucu ile petri kabının daha önce oosit toplama işlemi sırasında oosit konulan kısmına (saat 6 hizası) taşınır. Oosit ise yine insülin enjektörünün ucu ile petri kabının hiç kullanılmamış kısmına (saat 3 hizası) bırakılır. Diseksiyon tamamlandığında inkübatörde bulunan ve birincil kültür mediumu içeren petriye alınarak altına dikkatlice hasta ismi yazılır.

3.5. Konvasiyonel IVF

Oositlerin sperm ile insemine edilmesinden önce olgunun dosyası yeniden gözden geçirilir. İnfertilite nedeni, infertilite süresi, önceki ART-YÜT denemeleri, daha önce değerlendirilen semen örneğine ait sperm parametreleri, erkek veya kadında sperm antikorlarının olup olmadığı değerlendirilir. İşlem günü alınan sperm parametreleri ve morfoloji indeksi incelenir. Daha önce IVF kararı alınmasına etken olan sperm parametreleri işlem günü değerlendirme ile uyumlu bulunmuş ise ve maturasyon değerlendirmesine göre en az on adet matür görünümlü oosit toplanmış ise IVF işlemi yapılır.

Androloji laboratuvarında uygun şartlarda ve çift kontrollü hazırlanmış ve ağzı parafilm ile kapatılmış olan sperm örneği alınır. Alınan sperm örneği laminar flow altında ve ısıtılmış bloklarda işleme kadar bekletilir. Spermin progressif motilitesine uygun volüm hesaplanır. Morfoloji kriterlerine göre 100.000-300.000 arası normal morfolojiye sahip progressif motil sperm ilave edilir. İnseminasyon öncesi gerekli malzeme laminar flow altında hazırlanır. İki adet pastör pipeti uçları ısıtılarak düzeltilir. İnseminasyon yapılacak droplet sayısı kadar steril mikropipet ucu hazırlanır. Mikropipetörde insemine edilecek sperm volümü ayarlanır.

İnseminasyon, OPU işleminden en erken 4, en geç 6 saat sonra gerçekleştirilir. İnseminasyon için Tip I veya Tip II kumulus kütlesi yapısına sahip olan oositler seçilir. Pastör pipeti ile her bir droplette ortalama 2 adet oosit yerleştirilir. Her droplette ayrı steril uç kullanılarak sperm mikropipetör yardımı ile oosit çevresine insemine edilir. Sperm inseminasyon işlemi bittikten sonra inverted mikroskopta sperm yoğunluğu kontrol edilir. İşlemler tamamlandıktan sonra inseminasyon yapılan dropletlerdeki oosit sayısı yazılarak belirlenir. İşlem yapılan kapları inkübatör kapağında olgunun soyadının yazılı olduğu bölüme yerleştirilir.

3.6. Mikroenjeksiyon

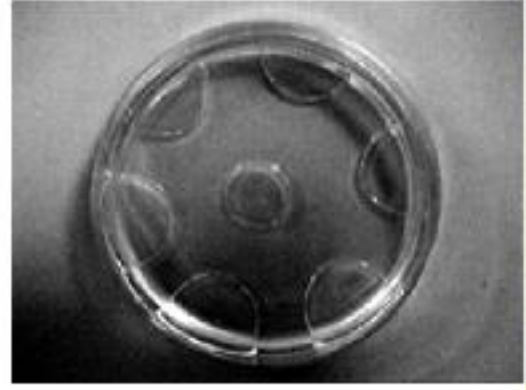
3.6.1. ICSI işlemi için Kumulus ve Korona Hücrelerinin Temizlenmesi

Oositlerin maturasyonuna karar verebilmek ve de ICSI işlemi gerçekleştirebilmek için oositlerin etrafındaki kumulus ve korona hücrelerinin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemin OPU'dan sonra minimum 2 saatlik inkübasyon süresi sonrası yapılması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılacak olan malzeme hazırlığı yapılır. Oosit çevresindeki kumulus-korona kütlesini uzaklaştırmak amacı ile önce 2-3 adet pastör pipetinin ucu ısı ile

yuvarlaklaştırılır. Ayrıca, pastör pipetin ince kısmı iki el ile birlikte alev içerisinde yaklaşık 10 saniye tutulur ve iki el aynı anda çekilir ve pastör pipetinin kalınlığının azaltılması sağlanır. İnce kısımlar birbirine sürtülerek ucunun düzgün bir şekilde kırılması sağlanır. Bu pipetler hyalüronidaz uygulaması sonrası kalan kümulus hücrelerinin temizlenmesinde kullanılır. İnkübatörden olgunun adı ve soyadı kontrol edilerek oositleri alınır. 8+3 petri kabında bulunan 7 no'lu droplet ucu yuvarlaklaştırılmış pastör pipeti ile boşaltılır, yerine hyalüronidaz konur ve pastör pipet atılır. Hyalüronidaz içeren 7 no'lu droplet cam kalemi ile alttan etrafı çizilerek belirlenir. Pastör pipetine çok az miktarda medium alınır ve hyalüronidaz dropletine götürülürerek maksimum 10 saniye olacak şekilde pipetleme gerçekleştirilir. Tüm oositler çok az hyalüronidaz ile birlikte 1 no'lu droplette taşınır ve burada 3 kez pipetlenir. Daha sonra tüm oositler 2 no'lu droplette taşınır ve aynı işlem tekrarlanır. Son olarak tüm oositler 3 no'lu droplette bırakılır. Eldeki pastör pipeti ile kullanılan hyalüronidaz dropleti boşaltılır ve pastör pipet atılır. Daha önce hazırlanmış olan denudasyon pipetlerinin en kalın olanı (yaklaşık 150µm) ile pipetleme işlemine başlanır ve pipet çapı azaltılarak oositin etrafındaki tüm kümulus hücrelerinin temizlenmesi sağlanır. Pipet çapı çok büyük olursa oositin etrafında bulunan kümulus hücreleri temizlenemez ve işlem süresi çok uzar. Pipet çapının çok ince olması durumunda ise oosit zarar görebilir. Bu işlem sırasında oositlere tek tek pipetleme işlemi yapılmalıdır. Pipetleme işlemi sonrası etrafında kümulus hücresi kalmamış olan oositler orta dropletlerden birisinin içerisine konur ve stereo mikroskop 110X büyültmede maturasyon değerlendirmesi yapılır. Metafaz II oositler (sitoplazması homojen görümlü ve I.kutup cisimciği bulunan oositler) 4 no'lu droplette, Metafaz I oositler (I.kutup cisimciği olmayan oositler) 5 no'lu droplette, Profaz I oositler (germinal vezikül GV içeren oositler) ise 6 no'lu droplette bırakılır ve sayıları droplet kenarlarına yazılır.



8 + 3 droplet hazırlığı



6 + 1 droplet hazırlığı

Resim 39: Resim Kültür kablarının hazırlığı

Oosit morfolojisi değerlendirme gerek laboratuvar içinde, gerekse laboratuvarlar arasında, belirli standartları da olsa kişiden kişiye değişebilme olasılığının yüksek oluşu nedeni ile çok dikkatli uygulanması gereken bir işlemdir. Günümüzdeki yaygın kanı, IVF veya ICSI işlemi için kullanılan spermden çok, işlem uygulanan oositin morfolojisinin önem taşıyor olmasıdır.

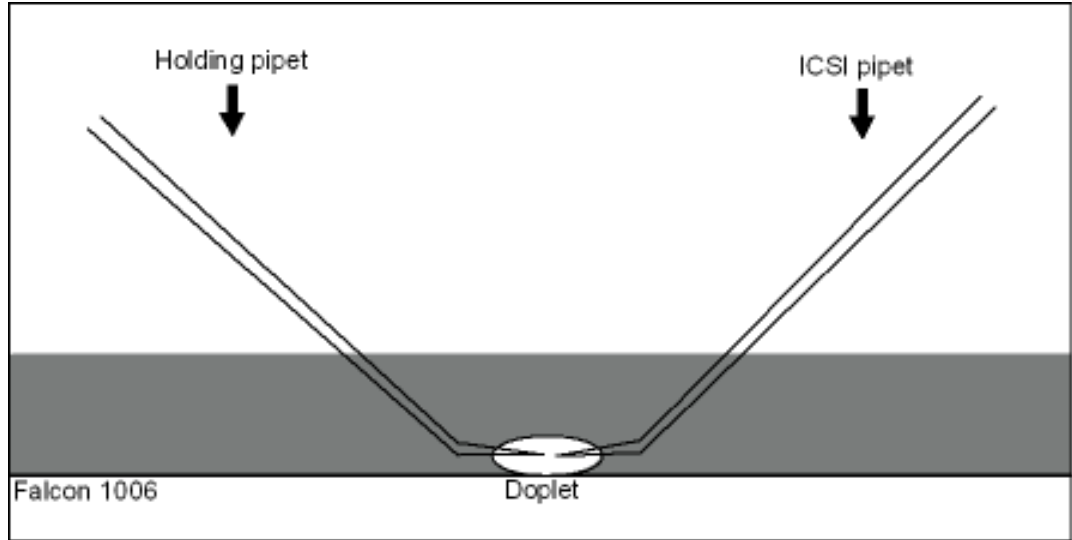
Olgun bir oosit yuvarlak, açık renkli parlak ve homojen granülasyon gösteren sitoplazmaya ve düzgün yüzeyli bir oolemmaya sahip olmalıdır. Zona pellusidası; kesintisiz, oosite bakan yüzü daha homojen ve tüm oosit yüzeyinde eşit kalınlıktadır. Perivitellin aralık ise döküntü içermeyen, düzgün ve I. Kutup cisimciğinin bulunduğu bölgede hafif genişlemiş diğer bölgelerde aynı genişlikte olmalıdır.

3.6.2. Mikroenjeksiyon için Pipetlerin Hazırlanması

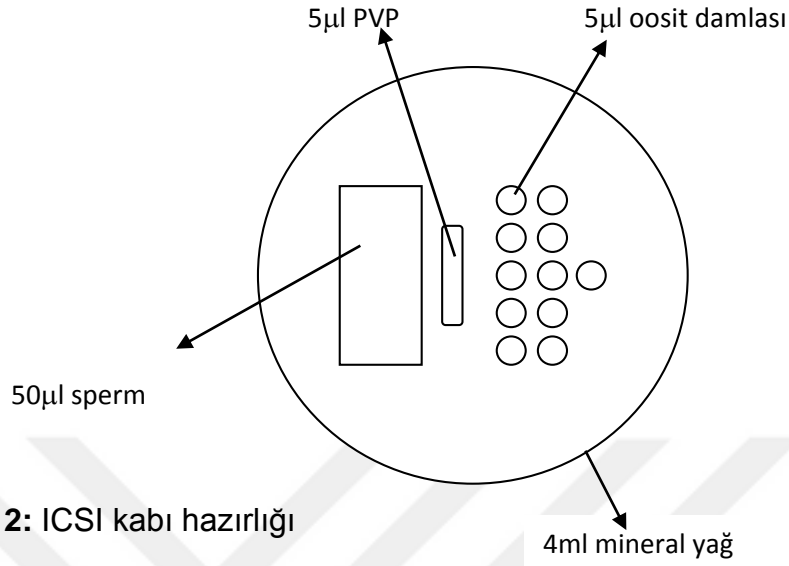
ICSI işleminde kullanılan mikropipetler 0.97 μ m dış çap ve 0.69 μ m iç çapa sahip borosilikat cam kapiller tüp (Drummond Scientific, Broomall, PA,U.S.) kullanılarak hazırlanır. Kapiller tüplerin çekilme işlemi mikro-puller (Model PC-10, Narishige CO Ltd.,Tokyo,Japan.) yardımı ile gerçekleştirilmektedir. ICSI pipetinin uç kısmının tıraşlama işlemi

mikrogrinder (Model EG-400, Narishige CO Ltd., Tokyo, Japan) ile yapılırken holding pipetin uç kısmının yuvarlaklaştırma işlemi mikroforge (Model MF-900, Narishige CO Ltd., Tokyo, Japan) ile yapılır. ICSI pipetinin dış çapı yaklaşık 7 mikrometre, iç çapı ise yaklaşık 5 mikrometre olmalıdır.

Holding pipetin dış çapı yaklaşık 60 mikrometre iç çapı ise yaklaşık 20 mikrometre olmalıdır. ICSI ve holding pipetlere yaklaşık 30 derecelik eğim verilmelidir ve bu amaçla mikroforge (Model MF-900, Narishige CO Ltd.,Tokyo, Japan) kullanılmaktadır. Hazırlanan mikropipetler steril MilliQ suyu (Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.) ve absolut etil alkol ile yıkandıktan sonra kuru hava sterilizatörü içinde 121°C'de 4 saat süre ile sterilize edilir. Steril pipetler işlem saatine kadar kapalı kutu içinde saklanır. ICSI işleminden hemen önce mikropipetler pipet tutuculara yerleştirilir. Mikropipet uçları zemine paralel olacak şekilde mikroskop altında ayarlanır.



Şekil 1: ICSI İşlemi Hazırlığı



Şekil 2: ICSI kabı hazırlığı

3.6.3. Mikroenjeksiyon işlemi (ICSI)

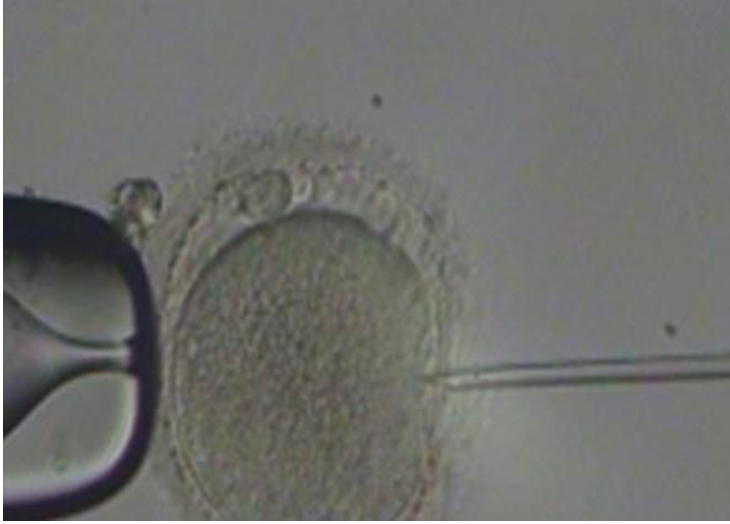
ICSI işlemi tek bir spermin oositin stoplazmasının içine enjekte edilmesi anlamına gelmektedir.

Mikroenjeksiyon Hoffman modülasyonu olan inverted mikroskobun ısıtıcı tablası üzerinde yapılır. X400 büyütme kullanılır. Mikroskop hava akımı ve kapıdan uzak, vibrasyonu önleyen masa üzerine konmalıdır. Olguların daha önceden incelenmiş dosyaları, işlem günü semen analizi sonucuna göre tekrar gözden geçirilir. İnfertilite nedeni, daha önce mikroenjeksiyon işlemi yapıp yapılmadığı, eğer yapıldıysa fertilizasyon oranı, elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi gözden geçirilir. Sperm parametreleri değerlendirilir. Motilitesi çok düşük örneklerde (<1%), 12-15 µm çapında bir mikropipet ile hareket eden spermiler tek tek toplanarak oluşturulan bir rezervuar droplet içine bırakılır. Totale yakın immotil spermileri olan olgularda aynı gün ardışık semen örneği alınması toplam motil sperm sayısının artışına katkıda bulunmaktadır.

OPU işleminden yaklaşık 2-4 saat sonra oositlerin denudasyonu gerekmektedir. Mikroenjeksiyon işleminde morfolojik olarak normal görünümlü ve eğer mevcutsa hareketli spermier seçilir. Bu yüzden mikroenjeksiyon işleminde hareketli kullanılacak olan spermier immobilize olması gerekmektedir. Bu işlem ya mekanik yolla ya da laser kullanılarak yapılmaktadır. Mekanik yolla yapılan sperm immobilizasyonunda, mikroenjeksiyon pipetinin uç kısmı ile sperm boynuna yakın kısımdan hafifçe immobilize edilir ve kuyruğa doğru pipet ucu ileri geri kaydırılarak sperm kendi etrafında döndürülür. Sonunda ani bir hareketle kuyruğun kıvrılması ve sperm membranının zedelenmesi sağlanır. Lazer ile yapılan sperm immobilizasyonunun en büyük avantajı, oosit için toksik olduğu bilinen PVP'nin kullanılmamasıdır. Immobilizasyon sırasında, 2 ms' ye ayarlanan lazer ile spermier kuyruğuna 1 veya 2 vuruş yapılır. Bu sırada lazerin spermier baş ya da boyun kısmına gelmesi engellenmelidir. Immobilize edilmiş spermier kuyruk kısmı önce ve düz olacak şekilde yakalanarak pipet içine aspire edilir. Eğer uç kıvrılmış ise pipet ile birkaç kere alıp vererek kuyruk düzeltilmeye çalışılır. Bu esnada enjektör kontrolü zayıf ise (sperm pipet içinde hızlı hareket ediyor ise veya yerinde sabit durmuyor ise) mikropipet daha fazla PVP ile doldurulmalıdır. Sperm mikropipet içinde iken yağ içinden çıkmaksızın ilk oosit dropletine gidilir. Droplet içindeki oosit, holder ile hafifçe aspire edilerek sabitleştirilir. Enjeksiyon pipeti ile oositte rotasyon yapılarak kutup cisimciği'nin yeri saat 12 hizasına gelecek şekilde tespit edilir ve oositin kutup segmentini içeren granüler görünümlü alan belirlenir. Bu alan germinal vesikülün parçalandığı alan olarak tahmin edilmekte ve sonuçta birinci kutup cisimciği'nin profüze olduğu yer olarak düşünölmektedir. Bu nedenle mikroenjeksiyon sırasında bu bölgeden aspirasyon yapmamaya dikkat etmek gerekmektedir. Oosit, bu alan saat 9 hizasına gelecek şekilde tesbit edilmelidir. İşlem esnasında oositin ekvatoryal düzlemi ile yakalama pipetinin iç ağız açıklığı aynı düzlemde olmalıdır. Oositin alt kutbu petri kabın tabanına değmelidir. Enjeksiyon pipeti oositin saat 3 hizasına getirilir ve oolemmannın dış çizgisi ile aynı düzlemde olması sağlanır. Sperm yavaşça pipetin uç kısmına getirilir ve zona pellusida delininceye kadar aspirasyon

yapılmaksızın ilerletilir. Oosit stoplazması içine ulaştırıldığında hafif bir aspirasyon yapılır.

Ooplazmanın pipet içine yavaşça dolması ve spermin geriye doğru hareketlenmesi oolemma membranının aşıldığını gösterir. Yavaşça aspire edilen stoplazma ve sperm geri verilir. Bu esnada pipet içindeki sıvının oosit içine verilmesinden kaçınılmalıdır. Pipet oosit içinden çıkarılırken hafifçe aspirasyon yapılarak oolemma açıklığı kapatılır ve sitoplazmik yapının sperm etrafını sıkıca sarması sağlanır. Bu işlem tüm oositlerde aynı sıra ile uygulanır. İşlem esnasında sperm ve oosit morfolojisi, mikroenjeksiyon ile ilgili tüm bilgiler sıra ile ICSI takip formuna kayıt edilir. Mikroenjeksiyon sonrası oositler sırayla dropletlerden alınır ve aynı kişiye ait petri kabında orta dropletlerde 3 kez pipetlenerek Hapes'li solüsyondan temizlenir. Yerleştirme işlemi bittikten sonra oositlere işlem sırasına göre verilen numaralar droplet yanına yazılır ve inkübatöre kaldırılır.



Resim 40: ICSI işlemi

3.7. Fertilizasyonun Değerlendirilmesi (1.Gün)

Fertilizasyon kontrolü IVF veya mikroenjeksiyon işleminden 12-18 saat sonra yapılmalıdır. İnsemine edilen oositlerin çevresindeki korona hücreleri sabah kontrolden önce yaklaşık 200µm kalınlığında çekilmiş pastör pipet ile stereo mikroskop altında temizlenir. Daha sonra oositler temiz 1.aşama kültür mediumu dropletlerine alınarak inverted mikroskop altında incelenir.

Fertilizasyon, kısaca tek bir sperm çekirdeğinin oositten gelen çekirdek ile aktive olmuş oosit sitoplazması içinde birleşmesi olarak özetlenebilir. Çekirdekler döllenmenin en basit ve kolayca gözlemlenebilen işaretleridir. Normal fertilizasyonda 2 pronükleus ve birinci ve ikinci kutup cisimciğı gözlenir. Her iki çekirdekte meydana gelen olayların eş zamanlı olması döllenme ve ileri embriyo gelişimi açısından önemlidir. Erken zigot oluşumunda çekirdekçik ve çekirdekçiğe bağlı oluşumlar büyük önem taşır. Eş zamanlı gelişim göstermeyen döllenme aktivitelerine sahip zigotlarla yapılan araştırmalarda bu zigotlarda yüksek oranda kromozomal anomali, anormal klivaj ve gelişim blokajı nedeni ile nadir blastosist oluşumu gözlenmiştir.



Resim 41: Fertilizasyon değerlendirmesi

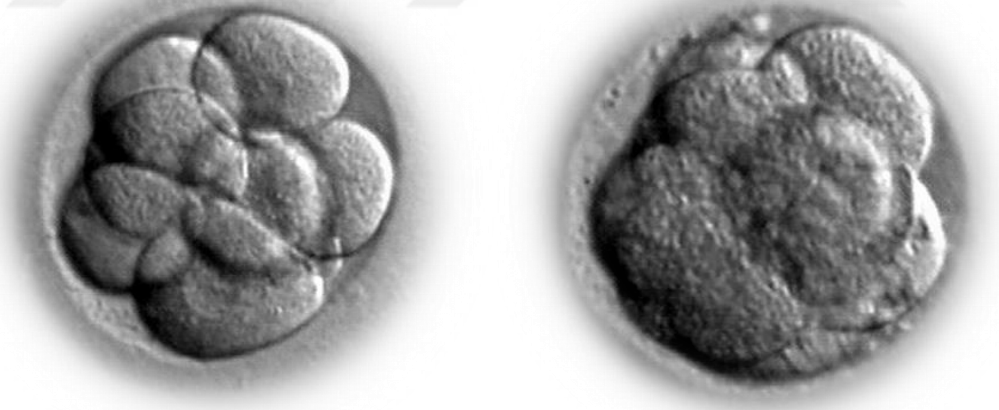
3.8. Embriyo Sınıflandırması (Klivaj Dönemi)

Zigot aşamasından 4-8 hücreli bir embriyo oluşumuna kadar geçen süre erken klivaj dönemi olarak tanımlanır. Bu dönem içerisinde zigot birbiri ile yapısal anlamda değişiklik göstermeyen iki-üç bölünme geçirir. Klivaj hızı embriyolar arasında değişiklik gösterebilir fakat bu bölünmeler sonrasında normal bir embriyo birbirine eş büyüklükte 6-8 hücreden oluşur. Yapılan araştırmalar bu parametrenin dışında, eşit olmayan blastomer veya fragman denilen yapısında çekirdek bulunmayan sitoplazmik parçacıklar içeren embriyoların ileri gelişim yönünden diğerlerine göre daha riskli olduklarını göstermiştir. Bu özelliklere sahip embriyolar ayrıca daha yüksek oranda kromozomal anomali içerirler ve çok çekirdekli blastomer oluşturma şansları yüksektir. Bu dönem ayrıca çekirdeklerin birleşmesi sonrası oluşan embriyoya ait genomun da devreye girdiği dönemdir. Normal olarak yapılanmamış bir genoma sahip embriyoların çoğu bu dönem sonrası ileri gelişim göstermezler. Bu dönem ayrıca hücreler arası bağların (tight junctions, adherens junctions ve gap junctions) kuvvetlenerek arttığı bir dönemdir. Bu bağların bir kısmı hücreleri birbirine sıkıca bağlayarak geçirgen olmayan bir tabaka oluştururken diğer bir kısmı seçici olarak bazı moleküllerin taşınmasını, böylece ileri embriyo gelişim döneminde hücreler arası sinyal mekanizmaları oluşturarak başkalaşmalarını sağlarlar. Birleşme (compaction) olarak ta adlandırılan bu dönemde artık hücrelerin sınırlarını belirlemek zordur.

2. günden 4. güne kadar olan klivaj dönemindeki embriyolar değerlendirilirken göz önüne alınan kriterler blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, embriyonun içerdiği fragmantasyon ve sitoplazma yapısıdır. Klivaj hızına göre embriyonun sahip olduğu blastomer sayısı şayet günün beklenen limitleri arasında ise normal gelişen bir embriyo, eğer bu sayı düşükse yavaş gelişen bir embriyo olarak değerlendirilir. Normal klivaj hızına sahip bir embriyo 24-25. saatte 2 hücre, 2.günde 3-4 hücre, 3.günde 6-8 hücre ve

4.günde ise birleşme işaretlerine bağlı olarak 10 ve üzerinde hücreye sahip olan embriyodur. Değerlendirilen embriyo eşit büyüklükte blastomer yapısına sahipse, % 0-5 arasında fragmentasyon içeriyorsa ve sitoplazmasında belirgin granüler yapı gözlenmiyorsa grade I, %10-%20 arasında fragmentasyon içeriyor, blastomerler hafifçe birbirinden farklı veya granülasyon gösteriyorsa grade II olarak sınıflandırılır. Daha yüksek oranda fragmentasyon veya granülasyon içeren embriyolar grade III-IV olarak tanımlanır. Bu gruba giren embriyoların ileri gelişim gösterme oranları son derece düşüktür ve ileri dönemlerde yüksek canlılık göstermezler.

Gelişim günlerine bağlı olarak embriyolarının değerlendirilmesinde kullanılan sınıflandırma sistemi ve her bir sınıfa ait tanımlama kriterleri aşağıdadır(50):



Resim 42: Klivaj dönemi değerlendirmesi

TANIM

- 1 Eşit blastomer morfolojisine sahip, fragmentasyon veya granülasyon işaretleri göstermeyen embriyo.
- 2 Eşit blastomer morfolojisine sahip, %5-10 oranında fragmentasyon içeren veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
- 3 Blastomerler birbirinden hafifçe farklı, %10 üzerinde fragmentasyona sahip veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
- 4 Blastomer sayısı net sayılamayan, %30 dan fazla fragmentasyona sahip, blastomerler birbirinden belirgin derecede farklı veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo.

3.9. Blastosist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi

1. günden sonra takip eden bölünmeler ile embriyonun hücre sayısı artar ve 16-32 hücreden oluşan sıkı bir kitle haline gelir. Bu aşamadaki bir embriyoya morula adı verilir. Normal bir morulada iç kısımda yerleşik olarak bulunan hücreler ile dış kısımdaki hücreler ileri gelişim aşamasında başkalaşımına devam ederek blastosist aşamasına geldiğinde sırasıyla iç hücre kütlelerini (inner cell mass) ve trofektoderm tabakasını oluştururlar. Trofektoderm tabakasını oluşturan hücreler arası bağlar sıkındır ve başkalaşım sırasında bu hücreler tarafından iç kısımda blastosel adı verilen sıvı oluşturulur. Blastosel içerdiği değişik iyon ve protein konsantrasyonu bakımından iç hücre kütlelerinin ileri gelişimi için son derece kritik bir önem taşır. Bu aşamada oluşan embriyonun yapısal değerlendirmesinde kullanılan üç temel kriter blastosel kavitenin yapısı , trofektoderm hücrelerinin yapısı ve dizilimi, ve iç hücre kütlelerini oluşturan hücrelerin sayısı ve yapısıdır. “

3.9.1. Blastosel Kavite Oluşumuna Göre Sınıflandırma

1. Erken-Early Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından azdır.

2. Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından fazladır.

3. Tam-Full Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün tümünü kaplamıştır.

4. genişlemiş-Expanded Blastosist: Blastosel kavitesi volümü artmış, çap büyümüş, zona iyice incelmıştır.

5. Çatlayan-Hatching Blastosist: Trofoektoderm hücrelerinin bir kısmı zona katmanı dışına çıkmaya başlamıştır.

6. Çatlamış-Hatched Blastosist: Embriyo tümüyle zona katmanı dışına çıkmıştır.

3.9.2. İç hücre kitlesi-Inner Cell Mass (ICM) Yapısına Göre Sınıflandırma

A) Sıkı, paket şeklinde çok sayıda hücre içermesi

B) Gevşek bir grup halinde çok sayıda hücre içermesi.

C) Çok az hücre içermesi

3.9.3. Trofektoderm Yapısına Göre Sınıflandırma

A) Birbirine sıkıca bağlı birçok hücreden oluşan epitelium.

B) Daha gevşek bağlı birkaç hücreden oluşan epithel yapı.



Resim 43: Blastosist değerlendirilmesi

3.10. Emriyo Biyopsi İşlemi

Embriyo biyopsi, embriyonun, genetikte incelenen kromozomlar açısından, normal olup olmadığını, teşhis etmek amacıyla uygulanan bir yöntemdir. Embriyo biyopsi işlemi ile embriyonun transferi yapılmadan önce test edilmesi çiftlerin herhangi bir genetik hastalık taşıyıp taşımadığı hakkında bilgi veren önemli bir yöntemdir. Embriyodan biyopsiyle alınan hücre, genetik bölümüne iletilir. Genetik inceleme sonucunda tanımlanan normal embriyoların transferi gerçekleştirilir.

Embriyoloji laboratuvarında, embriyo biyopsi işlemi embriyonun 3 farklı döneminde endikasyona bağlı olarak biyopsi uygulanır. 1- Zigot döneminde Polar body-kutupcismi biyopsisi, 2- 3. günde Blastomer biyopsisi (embriyo biyopsi), 3- Blastosist döneminde Trofoektoderm biyopsisi.

Bu çalışmada kutup cisimciği ve blastomer biyopsi sonuçları değerlendirmeye alınmıştır.

Embriyoloji laboratuvarında, embriyo biyopsisi için kullanılan medium Kalsiyum ve Magnezyum içermeyen, HEPES tampon içerikli bir mediumdur (Quin's Advantage Medium with hepes). Embriyo biyopsi mediumu biyopsi işlemi sırasında biyopsi işlemini ve pH derecesinin değişmeden kalmasını sağlamak için dizayn edilmiştir.

3.10.1. Polar body (PB)-kutup cismi biyopsisi

1. Birinci ve ikinci kutup cisimciği Biyopsileri aynı anda, ICSI işleminden 18-20 saat sonra hücre bölünmesi gerçekleşmeden önce, döllenmiş oositlere (zigot) uygulanır.
2. Kutup cisimciği Biyopsi işlemi yukarıda tanımlanmış olan pgt solüsyonunda (37°C de inkübe edilmiş) ile gerçekleştirilir. İşlem mikro manipulatör sistemi olan ısıtıcı tablalı invert mikroskop altında gerçekleştirilir. 10X-40X objektifler kullanılır.
3. Biyopsi petri kabına ve embriyo kültür petri kabına, embriyo numaraları, embriyononun bulunduğu damlanın yanına, cam kalemiyle yazılır.
4. Kutup cisimciği biyopsi pipeti önce zigotun bulunmadığı damla içinde 30 saniye bekletilerek kapiler hareketinin gerçekleşmesi sağlanır.
5. Kutup cisimcikleri saat 12 ile 1 arasında olacak pozisyonda, holding pipeti ile az miktarda aspire edilerek zigot sabitlenir.

6. Laser atışlarıyla (0.35mS Pulse çapında), zona pellusida da düz çizgi şeklinde kesik oluşturulur. Oluşturulan kesikten girilerek, kutup cisimciği biyopsi pipeti (13-15µm çaplı) ile birinci ve ikinci kutup cisimcikler, oolemmaya zarar vermeden, aspire edilir.
7. Pipetteki Birinci ve İkinci kutup cisimcikler zigotunda bulunduğu, zigottan da uzak olacak şekilde, aynı damlaya bırakılır veya manipulasyona bağlı olarak, zigotun bulunduğu damlanın yanındaki damlaya da aktarılabilir.
8. Kutup cisimciği biyopsisi işlemi tamamlandıktan sonra biyopsi uygulanan zigot klivaj kültür ortamına alınır ve inkübatöre kaldırılır.
9. Kutup cisimciklerinin bulunduğu petri kabı Genetik laboratuvarına doldurulmuş kutup cisimciği Biyopsi Formunun bir örneği ile teslim edilir.

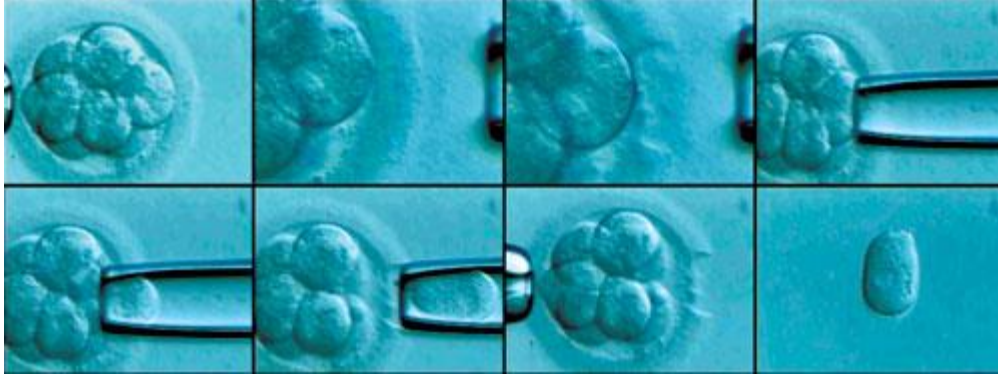


Resim 44: Kutup cisimciği biyopsi işlemi

3.10.2. Embriyo Blastomer Biyopsisi

Embriyo biyopsi işlemi, 7 hücreden fazla blastomere sahip embriyolara yapılabilmektedir.

1. Biyopsi işlemi analiz işlemi de göz önünde bulundurularak, embriyoların blastomer sayılarında bu işlem için elverişli ise, 3.gün, 4.gün veya 5. Gün (embriyo gelişim hızına göre 7 veya 8 hücrenin üzerindeki gelişim düzeyinde) yapılmalıdır.
2. Embriyo biyopsi işlemi Kalsiyum(Ca^{+2}) ve Magnezyum (Mg^{+2}) iyonlarını içermeyen, sukroz ve HEPES içeren, EB kültür ortamında ($37^{\circ}C$ de inkübe edilmiş) , silikon oil içeren, biyopsi pipeti bağlantılı mikroenjektör .kullanılır.
3. İşlem mikromanipulatör sistemi olan, ısıtıcı tablalı ($37^{\circ}C$) inverted mikroskop (OLYMPUS IX71) altında gerçekleştirilir (10X-40X objektifler kullanılır).
4. Biyopsi dishinde ve embriyo kültür dishine, embriyo numaraları, embriyonun bulunduğu damlanın yanına, cam kalemiyle yazılır.
5. Embriyo biyopsisine uygun embriyolara, lazer ile oluşturulan açıklıktan silikon oil içeren, biyopsi pipeti (30-35 μm) bağlantılı mikroenjektör ile bir blastomer aspire edilir.
6. Aspire edilen blastomer etrafı işaretlenmiş yan damlaya bırakılır.
7. Biyopsi uygulanan embriyolar, kültür ortamında yıkanır ve kültür ortamı içeren petri kabı içinde inkübatöre kaldırılır.
8. Aspire edilen blastomerlerin bulunduğu petri kabı Genetik laboratuvarına doldurulmuş EB Biyopsi Kayıt Formunun bir örneği ile teslim edilir.



Resim 45: Embrio biyopsi işlemi

3.11. Embriyo Transfer İşlemi

Embriyo Transfer işlemi , kateterin daha rahat yerleştirilebilmesi ve embriyoların rahim içersinde nereye konulduğunun tam olarak izlenebilmesi için dolu mesane ile ultrasonografi kontrolü altında yapılır. İşlem ağrısızdır ve anestezi gerektirmez. Jinekolojik masada vajene spekulum yerleştirildikten sonra vajen ve rahim ağzı steril serum veya özel sıvılar ile temizlenir. İnce bir kateter yardımı ile embriyolar endometriumun en uygun bölgesine bırakıldıktan sonra katater yavaş bir şekilde geri çekilir. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra embriyoların hepsinin verildiğinden emin olmak için embriyolog tarafından katater kontrol edilir. En iyi kalitedeki embriyolar transfer edildikten sonra eğer artan embryo varsa bunlar dondurularak saklanabilir.

Katater embriyo çekme işlemi stereo mikroskop altında gerçekleşir. Embriyoları getiren embriyolog embriyoların petri kabında saat 12 pozisyonunda olacak şekilde stereo mikroskop altına koyarak ve objektifin büyüklüğünü ve görüntüyü transfer edilecek embriyoların gözüne uygun şekilde ayarlar ve kontrol eder. Transfer enjektörü kataterin ucuna takılı olan ve ucundan yaklaşık 5 ul kadar içeri hava çekilmiş kataterin ucu embriyoların içinde bulunduğu damlacığın içine alınır ve katatere yaklaşık 5 ul kadar medium çeker. Kataterin ucunu mediumdan çıkarır ve yine 5 ul

mediumun geleceği seviyeye kadar hava çeker. Hava çektikten sonra kataterin uunu embriyoların bulunduğu damlacık içine çeker ve yaklaşık 10ul kadar medium çeker. Bu işlem esnasında embriyoları da katatere çeker ve embriyoların 10ul lik medium ortasında olmasına dikkat eder. Embriyoları katatere çektikten sonra kataterin ucunu çıkarır ve yaklaşık 5 ul lik mediumun geleceği seviyeye kadar hava çeker.

Son olarak tekrar kataterin ucunu solüsyon oratmına sokar ve 5 ul kadar medyum çeker. Kataterin ucunu steril petri kabın kapağında bulunan sıvı ile yıkar ve spanc ile kataterin ucundaki mineral yağı siler. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra embriyolog katateri alır ve iini, uç kısmı petri kabın kapağında bulunan mediumu içinde tutar, transfer enjektörü kataterden çıkarılır ve yerine içinde bir miktar medium olan insülin enjektörünü takar ve kataterin içindeki mediumu boşaltıp, kateterde embriyo kalıp kalmadığını stereo mikroskopu altında kontrol eder.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Modeli

Bu çalışmaya 279 preimplantasyon genetik tanı uygulanmış hasta dahil edilmiştir. Çalışma 2010 Mart ayı ile 2015 Mayıs ayı içinde sonuçlandırılmıştır, retrospektif bir çalışmadır. Taksim Alman Hastanesi ve Ankara Centrum Tüp Bebek merkezinde tedavi görmüş olgulardan hazırlanmıştır. Hastalar 38 yaş altı olgu gruplarından seçilmişlerdir. Hastalarda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (en az 2 an fazla 4 tekrarlayan başarısız denemeler) gözlenmiş ve preimplantasyon genetik tanı eşliğinde ıvf tedavisi planlanmıştır. Embriyo gelişiminin 1. Gününde kutup cisimcik biyopsisi (n=134) ve 3.gününde blastomer biyopsi (n=776) uygulamak üzere FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) tekniği ile blastomerlerin değerlendirmeleri yapılmıştır. Embriyolardan 3. Ve 4. Günde en fazla 1 blastomer alınmak suretiyle biyopsi uygulanmıştır, 2 raund çalışma yapılmış ve şu problemler tanınmıştır: 13,15,16,17,18,21,22,X,Y.Farklı oosit morfolojilerinden gelişen embriyoların biyopsi sonrası kromozomal kurulumlarının nasıl etkilendiği ortaya konulmuştur.

Oositler morfolojilerine göre 4 ayrı gruba ayrılmak suretiyle değerlendirilmişlerdir.

GRUP I: Normal oosit morfolojisinden gelişen toplam 1817 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir ve grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Grup I

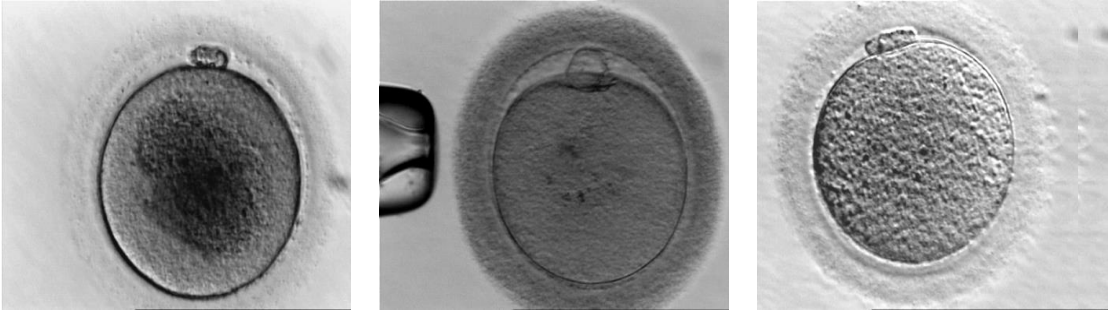


n=1817

Resim 46: Grup I 'de bulunan toplam 1817 normal oositten gelişen embryo çalışmanın kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

GRUP II: Homojen ve merkezi olarak granülasyon gösteren yada sitoplazmasında reflaktil cisimcik içeren oosit morfolojisinden gelişen toplam 387 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

Grup II



n=387

Resim 47: Grup II 'de bulunan toplam 387 sitoplazmik granülasyon ve reflaktil cisimcik içeren oositten gelişen embryo çalışmanın 1. Anomali grubu olarak değerlendirilmiştir.

GRUP III: Perivitaline ve zona anomalileri içeren sitoplazma dışı dismorfik sorunları olan oosit morfolojisinden gelişen toplam 508 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

Grup III

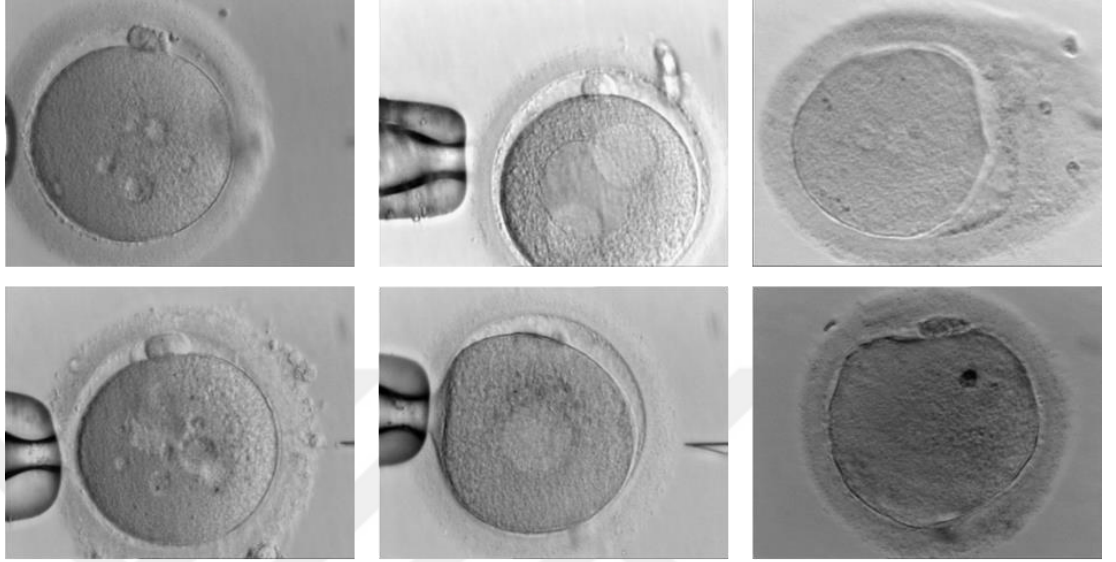


n=508

Resim 48: Grup III 'de bulunan toplam 508 ekstra sitoplazmik (sitoplazma dışı, perivitalin içi) anomali gösteren oositlerden gelişen embriyolar çalışmanın 2. Anomali grubu olarak değerlendirilmiştir.

GRUP IV: Bunların dışındaki anomalileri içeren oosit morfolojisinden gelişen (sitoplazmik vakuolizasyon, düz endoplazmik retikulum aglitasyonu, düzensiz oolemma gibi) toplam 193 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir. İstatiksel analizler Pierson coelation analysis kullanılarak yapılmıştır.

Grup IV



n=193

Resim 49: Grup IV 'de bulunan toplam 193 sitoplazmik vakuolizasyon, düz endoplazmik retikulum aglutasyonu, düzensiz oolemma içeren oositlerden gelişen embryolar çalışmanın 3. Anomali grubu olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada incelenen oosit anomalilerinin gruplandırılması ve yüzdeleri			
2905 M II Oositler	n	%	
Normal Morfoloji	1817	62.5%	} Grup I
Merkezi Granülasyon	204	7.0%	
Yaygın Granülasyon	98	3.4%	} Grup II
Koyu sitoplazma	85	2.9%	
Geniş Perivitalin Aralık	273	9.4%	} Grup III
Dar Perivitalin Aralık	235	8.1%	
Oval Yapı	22	0.8%	} Grup IV (%6.6)
İç duble zar	28	1.0%	
vakuolizasyon	27	0.9%	
Oolemma Anomalileri	63	2.1%	
SER	53	1.8%	

Şekil 3: Oositlerin morfolojik özelliklerinin sayısal dağılımı

4.2. Çalışma Sonuçları

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Fertilizasyon Oranı (%)	69,7	67,9	69,8	49,2 (*)
2.Gün embriyo duraksama oranı (%)	6,3	6,4	5,5	9,3
2.Gün 3-4 hücreli embriyo oranı (%)	63,3	67,0	58,7	57,0
3.Gün >6 hücreli embriyo oranı (%)	62,3	65,6	59,5	51,5
4.Gün >10 hücreli embriyo oranı (%)	45,2	45,9	43,9	34,2 (*)

(*):p<0,05

Şekil 4: 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen embriyoların fertilizasyon ve klivaj oranları gösterilmiştir.

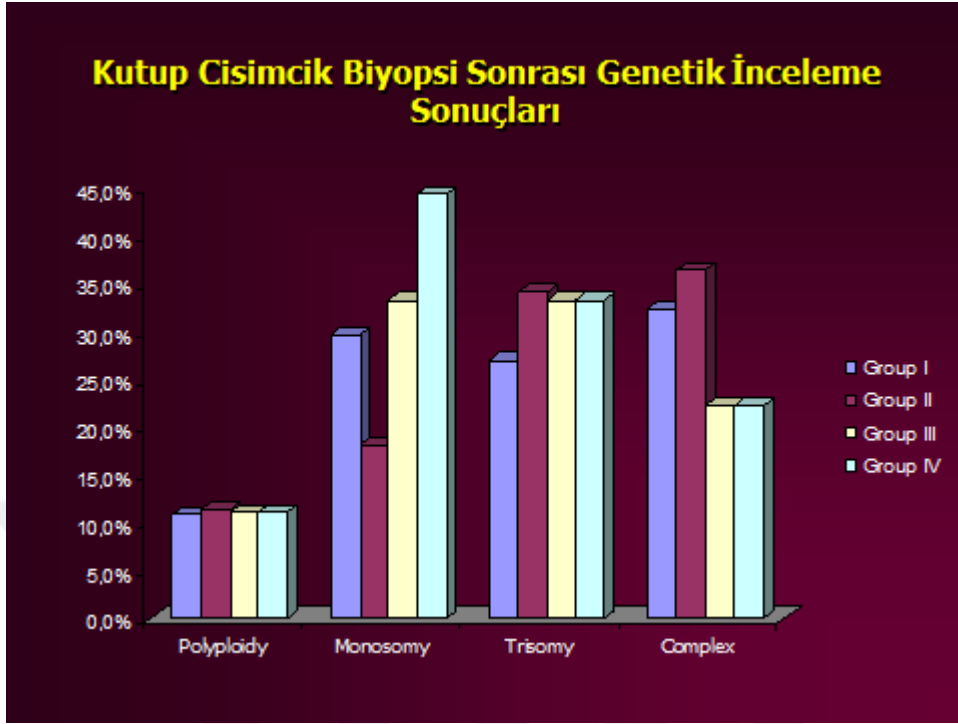
4.gruptaki oositlerden (vakuolizasyon, smooth-regüler endoplazmik retikulum ve irregüler iç zar gözlenen oositler) elde edilen embriyolarda döllenme oranı (%49,2) ve 3. Gün (mikroenjeksiyon işleminden 72 saat sonra) 10 hücre üzeri blastomer (34,2) kaydı anlamlı olarak ($p<0,05$) düşük gözükmetedir. Anlamlı olmamakla beraber 3. Günde 6 hücre üzeri embriyo oranı gene diğer gruplara göre düşüklük göstermektedir (%51,5) ve bu durum biyopsi yapılabilen embriyo oranını düşürmüştür.

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Kutup cisimcik biyopsi sayısı (n)	79	26	20	19
Anomali oranı (%)	45,6	39,1	52,3	47,4
Embriyo blastomer biyopsi sayısı (n)	504	102	142	28
Anomali oranı (%)	41,3	43,1	50,9	71,4(*)

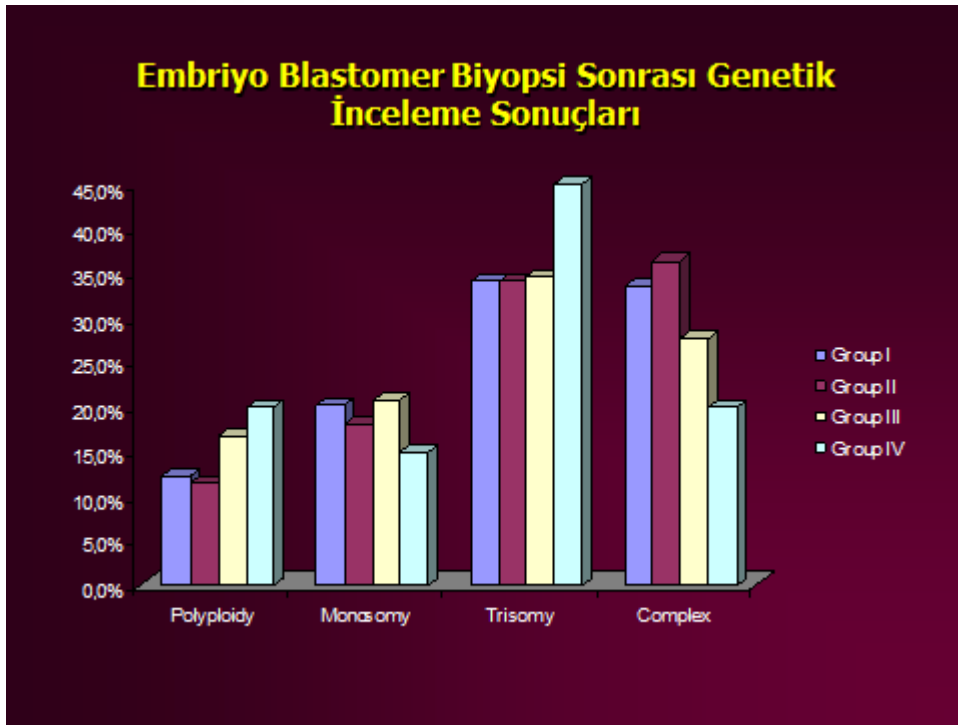
(*): $p<0,01$

Şekil 5: 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen zigot ve embriyoların kromozomal anomali oranları gösterilmiştir.

Döllenme sonrası yapılan kutup cisimcik biyopsisi sonrası anormal embriyo oranı gruplar arası farklılık göstermemekle birlikte 3. Gün yapılan embriyo biyopsi sonrası 4.gruptaki oositlerden (vakuolizasyon , smooth (düz,regüler) endoplazmik retikulum ve irregüler iç zar gözlenen oositler) elde edilen embriyolarda istatistiksel olarak anlamlı olarak ($p<0,01$) anomali artışı gözlenmiştir.



Grafik 1: 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen zigotlardan alınan kutup cisimciklerde FISH analizi sonucu gözlenen kromozomal anomalilerin karşılaştırılması



Grafik 2: 4 Ayrı grup oosit morfoloji gösteren oositlerden gelişen embriyolardan 3.gün biyopsi ile alınan blastomerlerin FISH incelenesi sonucu kromozomal anomalilerin karşılaştırılması

4.3. İstatiksel Değerlendirmeler

İstatiksel değerlendirmeler n ve yüzde değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Data analizleri pierson correlation analysis kullanılarak değerlendirilmiştir. Böylelikle söz konusu 4 grup birbirinden bağımsız olarak istatilerl parametrik olarak karşılaştırılmıştır.



5. TARTIŞMA

Son yıllarda yardımcı üreme tekniklerinde yapılan tüm çalışmalar embriyo gelişiminde laboratuvar şartları ve klinik uygulamalar optimize edildiği şartlarda gamet morfolojisinin ve kalitesinin embriyo gelişimi üzerine etkisinin çok fazla yer aldığı yönündedir (1,3,6,7 ,8).

Oosit morfolojisi fertilizasyon oranlarını, embriyo kalitesini ve gebelik oranlarını ciddi olarak etkilemektedir (18) .

Yapılan son çalışmalar oosit morfolojisindeki anormalliklerin yüksek oranda multi-faktöryel olduklarını göstermektedir. Bunlardan ilki uygulanan kontrollü ovaryen stimülasyon protokollerinin oosit üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerdir. Yaygın olan kanı, stimülasyon olmaksızın atreziye uğrayarak elimine edilebilecek anormal yapıya sahip oositlerin kullanılan stimülasyon protokolü ile matür hale gelebilme olasılıklarının tedavi üzerinde olumsuz etki oluşturabilecekleri yönündedir (10). Çalışmalar, normal bir stimülasyon programı sonrası elde edilmiş insan oositlerinin %30'undan daha fazlasının sayısal kromozom anomalileri içerdiklerini ortaya koymuştur (12,13).

İkinci önemli etken, oositin maturasyon süresi boyunca içinde bulunduğu ve gelişimini tamamladığı ortam ve hormon parametreleridir. Hipoksik bir folikülden elde edilen oositler ile kötü embriyo gelişimi sergileyen oositler arasında bir bağlantı olduğunu Van Blerkom ve arkadaşları yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (14).

Bu çalışmada oosit morfolojisindeki anomalilerinin sebep olduğu kromozomal aneuploidy oranları üzerine sonuçlara yer verilmiştir. Öncelikle oositler morfolojilerine göre 4 ana gruba ayrılmışlardır.1. grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir ve normal morfolojili oositler ve bu

oositlerden gelişen embriyolardan oluşmaktadır.2. grupta stoplazmik granülasyon gösteren ve reflaktil cisimcik içeren oositler ve onlardan gelişen oositlerden gelişen embriyolar değerlendirilmiştir.3. grupta sitoplazma dışı morfolojik anomalilerden gelişen oositler ve embriyolar değerlendirilmiştir.4. Grupta ise sitoplazmik vakuolizasyon ve düz endoplazmik retikulum aglütinasyonu gözlenmiş oosit ve onlardan gelişen embriyolar değerlendirilmiştir.

Grup 4'te bulunan vakuolizasyon ve smooth-düz endoplazmik retikulum aglütinasyonu gözlenen grupta embriyo biyopsi sonrası kromozomal değerlendirmelerine bakıldığında gruplar arası anomali oranlarında 4. Grupta anlamlı aneuploidi oranına rastlanmıştır. (GrupI,GrupII,GRUPIII ve Grup IV) (%41,3,%43,1,%50,5 ve %71,4*) (*p<0,01).

Sitoplazmik vakuollerin sıvı dolu ölü alanlar olduğunu düşünürsek özellikle vakuol sayısı ve büyüklüğüne göre oositin içerdiği filament, organel ve kromozomal materyalleri dışında bırakmakla birlikte sitoplazmik devinim sırasında metamorfik değişim ve bölünme döngülerine negatif olarak yansıdığı ve mitotik devinimlerde hasara yol açtığı ortaya konmuştur (31). Özellikle bu bölünme problemleri kutup cisimcik kromozomal değerlendirmesi değil de blastomer biyopsi değerlendirmesi sonrası gözlenen yüksek anomali oranlarını açıklamaktadır.

6. SONUÇ

Bu çalışma özellikle sitoplazmik vakuolizasyon ve endoplazmik retikulum aglütinasyonu gösteren oositlerden elde edilen embriyolarda yüksek oranda kromozomal aneuploidi gözleendiğini ve bu özellikteki gamet eldesinin yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında bir preimplantasyon genetik tanı endikasyonu oluşturduğunu göstermektedir. Bu hasta grubunda uygulanacak 3. Gün blastomer biyopsi veya bu çalışmada yer almamakla birlikte 5. Gün trofektoderm biyopsi uygulamaları sonrası preimplantasyon genetik tanı değerlendirilmesi ışığında daha yüksek oranlarda devam eden ve sağlıklı gebelikler elde edilmesi mümkündür.

Anormal gamet morfolojisi olarak nitelendirilebilecek bu endikasyon, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı veya açıklanamayan infertilite olgularının aydınlatılmasında ve gebelikle sonuçlandırılmasında PGT ile gerçek anlamda bir tanı ve tedavi imkanı ortaya koymaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. T. Ebner, O. Shebl, M. Moser, M. Sommergruber and G. Tews. Developmental fate of ovoid oocytes. Hum Reprod 2007 pp.1-5
2. Ebner T. (2006). Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? RBM Online, 12(4): 507-512.
3. Ten J. (2007). Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. RBM Online, 14(1): 40-48.
4. Moore and Persaud Human Embryology, 2002, 6th ed. Sayfa 17-47 W.B. Saunders company.
5. Veeck LL. The morphological assessment of human oocytes and early concept. In: Keel BA, Webster BW. eds. Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. Boca Raton CRC Pres, 1990:353
6. Van Blerkom J and Henry G. (1992). Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature oocytes after ovarian stimulation. Hum Reprod, 7:379-390.
7. Balaban B, Urman B, Sertaç A. Et al. (1998). Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 13: 3431-3433.
8. Xia P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocytes grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod, 12:1750-1755.
9. Van Blerkom J. : Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence: MITOCHONDRION 2011 Vol:11(797-813).
10. Otsuki J, Okada A, Morimoto K. et al. (2004). The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in metaphase II oocytes. Hum Reprod, 11: 172-176.
11. Mikkelsen AL, Lindenberg S. (2001). Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on infertility potential and embryo quality. Hum Reprod, 16: 1714-1718.
12. Kahraman S, Yakın K, Dönmez E. et al. (2000). Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 15: 2390-2393.

13. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S. et al. (2001). Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome of subsequent patients cycles. *Hum Reprod*, 16: 2118-2123.
14. Van Blerkom J. (1990). Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Elec Micros Tech*, 16:324-346.
15. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D. et al. (1998). Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13: 3425-3430.
16. Ortiz ME, Lucero P, Croxatto HB. (1983). Postovulatory aging of human ova: II spontaneous division of the first polar body. *Gam Res*, 7:269-276.
17. Ciotti Pm, Notorangelo L, Morselli-labate AM. Et al. (2004). First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality on pregnancy rate. *Hum Reprod*, 19: 2334-2339.
18. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C. et al. (1996). Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 11: 595-597.
19. Verlinsky Y, lerner S, Illkevitch N. et al. (2003). Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *RBM Online*, 7:336-341.
20. Ebner T, Yaman C, Moser M. et al. (2000). Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15: 427-430.
21. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D. et al. (1998). Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13: 3425-3430.
22. Palermo G, Alikani M, Bertoli M. et al. (1996). Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 11: 172-176.
23. Sathananthan H. (1997). Ultrastructure of human egg. *Hum Cell*, 10:21-39.
24. Dandekar P, Aggeler J, talbot P. (1992). Structure distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Hum Reprod*, 7:391-398.

25. Veeck LL. (1998). *An Atlas of Human gametes and Conceptuses*. Parthenon Publishing, New York-London, pp: 57-68.
26. Familiari G, Nottala SA, petrillo S. et al. (1987). The application of electron microscopy in the evaluation of in vitro unfertilized human oocytes. In: Spera G, de Kretser DM, eds. *Morphological Basis of Human Reproductive Function*. Plenum Press, New York-London, pp: 99.
27. Shen Y, Stalf T, Mehnert C. et al. (2005). High magnitude of light retardation by the zona pellusida is associated with conception cycles. *Hum Reprod*, 20: 1596-1606.
28. El Shaife M, Souse M, Windth M. et al. (2000). Ultrastructure of human oocytes: a transmission electron microscopic view. In: El Shaife Sousa M, Windth ML, Kruger TF. eds. *An Atlas of the Ultrastructure of Human Oocytes. A Guide for Assisted Reproduction*. Parthenon Publishing, New York-London, pp:151-171.
29. Alikani M, Paler MG, Adler A. et al. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote*, 3:283-288.
30. Nayudu PL, Lopata A, Jones GM. et al. (1989). An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics. *Hum Reprod*, 4:558-567.
31. Ebner T, Moser M, Sommergruber M. et al. (2005). Occurence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril*, 83:1635-1640.
32. De Santis L, Cino I, Rabelotti E. et al. (2005). Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *RBM Online*, 11: 36-42.
33. Wang WH, meng L, hackett RJ. et al. (2001). Developmental ability of human oocytes with or without briefrigent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod*, 16:1464-1468.
34. Moon JH, Hyun CS, Lee SW. et al. (2003). Visualisation of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod*, 18: 817-820.
35. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F. et al. (2003). Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte development potential after ICSI. *Hum Reprod*, 18:1289-1293.

36. Cooke S, Tyler JP, Driscoll GL. (2003). Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod*,18:2397-2405.
37. Cohen Y, malcov M, Schwartz T. et al. (2004). Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod*, 19:649-654.
38. Ebner T, Moser M, Sommergruber M. et al. (2003a). Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development. *Hum Reprod Update*, 9:251-262.
39. Ebner T, Moser M, Sommergruber M. et al. (2003b). Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod*, 18: 1294-1298.
40. Ebner T, Moser M, yaman C. et al. (2002b). Prospective hatching of embryos developed from oocytes exhibiting difficult oolemma penetration during ICSI. *Hum Reprod*, 17.1317-1320.
41. Balaiker H, Bouman D, Sojecki A. et al. (2002). Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod*, 17:2394-2401.
42. Rosenbuch b, Schneider M, Glaser B. et al. (2002). Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod*, 17:2388-2393.
43. Ropsenbuch B, Schneider M. (1998). Maturation of a binuclear oocyte from the germinal vesicle stage to metaphase II: formation of two polar bodies and two haploid chromosomal setes. *Hum Reprod*, 13: 1653-1655.
44. Veeck LL, 1999. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. Parthenon Publishing Group
45. Veeck LL. The morphological assesment of human oocytes and early concept. In: Keel BA, Webster BW. eds. *Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Boca Raton CRC Pres, 1990:353
46. Veeck LL. Pregnancy rate and out come associated with laboratory evaluation of spermatozoa, oocytes and preembryos. In: Mashiach S, Ben Rafael Z, Laufer N, Schenker JG, eds *Advances in Assisted Reproductive Technologies. Proceedings of the Sixth World Congress on In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Jerusalem 1990:74
47. Serhal P, Rainer D, Kinis A et al. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. . *Hum Reprod* 1997, 12, 1267-1270

48. Veeck LL, 1991, Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus. Williams and Wilkins, Baltimore
49. Sathanathan AH, Trounson AO, Wood C. Atlas of Fine Structure of Human Sperm Penetration, Eggs, and Embryos Cultured In Vitro. New York: Praeger, 1986:44,46,82 (vacuoles);70(zona pellucida);16(multi-nucleated blastomeres)
50. O’RahillyR, Müller F. Developmental Stages in Human Embryos, Publication 637. Washington, DC: Carnegie Institution of Washington, 1987:17



8. ÖZET

Amaç

İyi kalitede ve kromozomal olarak hayatla bağdaşan embriyo elde edilebilmesinin en önemli etkenlerinden biri oosit kalitesidir. Bu nedenle embriyo skorlamasının ilk aşamasını oositlerin morfolojik anomali sınıflandırmaları oluşturur. Bu çalışmada morfolojilerine göre sınıflandırılan oositler ve bu oositlerden elde edilen embriyolara yapılan polar cisimcik ve blastomer biyopsi sonrası kromozomal anomali sonuçlarına göre oosit morfolojik anomalilerinin önemi ve preimplantasyon genetik tanı açısından endikasyon oluşturabilme olasılıkları tartışılmıştır.

Materyal ve Method

Alman Hastanesi ve Ankara Centrum Tüp Bebek merkezlerinde 2010 mart ayı ve 2015 mayıs ayı arasında tedavi görmek için başvurmuş 279 pgt uygulanmış hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar 38 yaş altı olgu gruplarından seçilmişlerdir. Hastalarda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (en az 2 an fazla 4 tekrarlayan başarısız denemeler) gözlenmiş ve preimplantasyon genetik tanı eşliğinde ivf tedavisi planlanmıştır. Embriyo gelişiminin 1. Gününde polar cisimcik biyopsisi (n=134) ve 3.gününde blastomer biyopsi (n=776) uygulamak üzere FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) tekniği ile blastomerlerin değerlendirmeleri yapılmıştır. Embriyolardan 3. Ve 4. Günde en fazla 1 blastomer alınmak suretiyle biyopsi uygulanmıştır, 2 raund çalışma yapılmış ve şu problemler taranmıştır: 13,15,16,17,18,21,22,X,Y. Farklı oosit morfolojilerinden gelişen embriyoların biyopsi sonrası kromozomal kurulumlarının nasıl etkilendiği ortaya konulmuştur.

Oositler morfolojilerine göre 4 ayrı gruba ayrılmak suretiyle değerlendirilmişlerdir.

GRUP I: Normal oosit morfolojisinden gelişen toplam 1817 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir ve grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

GRUP II: Homojen ve merkezi olarak granülasyon gösteren yada sitoplazmasında reflaktil cisimcik içeren oosit oosit morfolojisinden gelişen toplam 387 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

GRUP III: Perivitaline ve zona anomalileri içeren sitoplazma dışı dismorfik sorunları olan oosit morfolojisinden gelişen toplam 508 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

GRUP IV: Bunların dışındaki anomalileri içeren oosit morfolojisinden gelişen (sitoplazmik vakuolizasyon, smooth endoplazmik retikulum-düz endoplazmik retikulum aglitasyonu, düzensiz oelasma gibi) toplam 193 embriyonun preimplantasyon genetik tanımlama sonrası elde edilen sonuçlara yer verilmiştir. İstatiksel analizler Pierson coelation analysis kullanılarak yapılmıştır.

Bulgular

Grup 4'te bulunan vakuolizasyon ve düz endoplazmik retikulum aglitasyonu gözlenen grupta embriyo biyopsi sonrası kromozomal değerlendirmelerine bakıldığında gruplar arası anomali oranlarında 4. Grupta anlamlı aneuploidy oranına rastlanmıştır. (GrupI,GrupII,GRUPIII ve Grup IV) (%41,3,%43,1,%50,5 ve %71,4*) (*p<0,01).

Tartışma

Sitoplazmik vakuollerin sıvı dolu ölü alanlar olduğunu düşünürsek özellikle vakuol sayısı ve büyüklüğüne göre oositin içerdiği filament, organel ve kromozomal materyalleri dışında bırakmakla birlikte sitoplazmik devinim sırasında metamorfik değişim ve bölünme döngülerine negatif olarak yansıdığı ve mitotik devinimlerde hasara yol açtığı ortaya konmuştur. Özellikle bu bölünme problemleri kutup cisimcik kromozomal değerlendirmesi değil de blastomer biyopsi değerlendirmesi sonrası gözlenen yüksek anomali oranlarını açıklamaktadır.

Bu çalışma özellikle sitoplazmik vakuolizasyon ve endoplazmik retikulum aglutinasyonu gösteren oositlerden elde edilen embriyolarda yüksek oranda kromozomal aneuploidi gözlendiğini ve bu özellikteki gamet eldesinin yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında bir preimplantasyon genetik tanı endikasyonu oluşturduğunu göstermektedir.

9. SUMMARY

Aim

Oocyte quality is one of the most important criteria to get a good quality and chromosomally normal embryos because of this reason the first part of the oocyte scoring is composed of grouping oocyte according to their morphology. In this study, not only the importance of oocyte morphology abnormalities after polar body and blastomer biopsies of embryos but also the possibility of indication generation for preimplantation genetic diagnosis have been discussed.

Material and Methods

279 patients, who have applied Istanbul Alman Hospital and Ankara Centrum IVF for ivf procedure, are the subjects of this study. Each patient was undergone pdg and they were under 38. Repetitive implantation failure is common for all subjects (minimum 2 maximum 4 repetitive failures). Their ivf treatment was planned with simultaneous preimplantation genetic diagnosis. Blastomer evaluation was done with FISH (fluorescent in situ hybridization) after day 1 polar body (n=134) and day 3 blastomer (n=776) biopsies. Biopsy was done by taking maximum one blastomer from day 3 and 4 embryos. The second turn of this biopsy procedure was done for probe examination and these were used: 13. 15. 16. 17. 18. 21. 22. X. and Y chromosome probes. The effect of different oocyte morphologies on chromosomal features of resultant embryos. Oocytes were divided into four groups. Group I: This group is defined as the control group and it includes 1817 embryos which are resultant of oocytes that had normal morphologies. Each embryo was undergone the preimplantation genetic diagnosis and their results were examined. Group II: It includes 387 embryos which are resultant of homogen and

central granulation observed oocytes and cytoplasmic refractile body contained oocytes. Each embryo was undergone the preimplantation genetic diagnosis and their results were examined. Group III: It includes 508 embryos which are resultant of oocytes that had perivitelline and zona abnormalities and dysmorphic morphological problems on the outside of their cytoplasm. Each embryo was undergone the preimplantation genetic diagnosis and their results were examined. Group IV: It includes 193 embryos which had other abnormalities besides above ones (cytoplasmic vacuolization, smooth endoplasmic reticulum agglutination, irregular oolemm, etc.). Each embryo was undergone the preimplantation genetic diagnosis and their results were examined. Statistical analysis was done by using Pearson Correlation analysis.

Results

After the chromosomal examination of embryo biopsies was done, group IV, which contains cytoplasmic vacuolization and smooth endoplasmic reticulum agglutination, have a higher aneuploidy rate among all experimental groups (Group I: 41.3%; Group II: 43.1%; Group III: 50.5%; Group IV: 71.4% and $p < 0.01$).

Discussion

Cytoplasmic vacuoles can be considered as dead parts that are full of liquid and they do not intake filaments, organelles, and chromosomal materials that are included by oocytes. Especially number of cytoplasmic vacuoles have a negative impact on metamorphic alterations during cytokinesis and cell division cycles also it harms mitotic cell cycles. These cell division disruptions explain higher abnormality rates of blastomer biopsy examination but not chromosomal evaluation of polar body.

This study shows that embryos which are developed from oocytes have cytoplasmic vacuoles and endoplasmic reticulum agglutination have chromosomal aneuploidy in higher rates. Additionally, it demonstrates gametes have these abnormalities result in a pre- implementation genetic diagnosis in assisted reproduction techniques.

Key words: Oocyte dysmorphism, PDG.



10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	DENİZ	Soyadı	YILDIRIM
Doğ.Yeri	ÜSKÜDAR	Doğ.Tarihi	11.05.1988
Uyruğu	TC	TC Kim.No	16814451594
Email	denis_yildirim@hotmail.com.tr	Tel	05321647688

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu kurumun adı	Mez.Yılı
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Kemal Atatürk Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sırala)

Görevi	Kurum	Yılı
Biyolog	ANKARA CENTRUM TÜP BEBEK MERKEZİ	2015-Halen Çalışmakta
Biyolog	BAKÜ NİGAR CLINICA	2014-2015
Biyolog	TAKSİM ALMAN HASTANESİ	2013-2014

Yabancı dilleri	Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

11. ETİK KURUL ONAYI



YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Tarih; 06.05.2015

Sayın , **Deniz Yıldırım**

İstanbul yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik kurulunun 06.05.2015 tarihinde yaptığı toplantı sonucunda

'DİSMORFİK VE NORMAL OOSİTLERDEN ELDE EDİLEN EMBRİYOLARIN SAYISAL ANEUPLOİDİ ORANLARININ VE EMBRİYO GELİŞİM SKORLARININ KARŞILAŞTIRILMASI " isimli çalışmanız etik kurulumuzca uygun bulunmuştur.(karar no: 2015/1)

Prof.Dr.Tülay İrez

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurul Başkanı