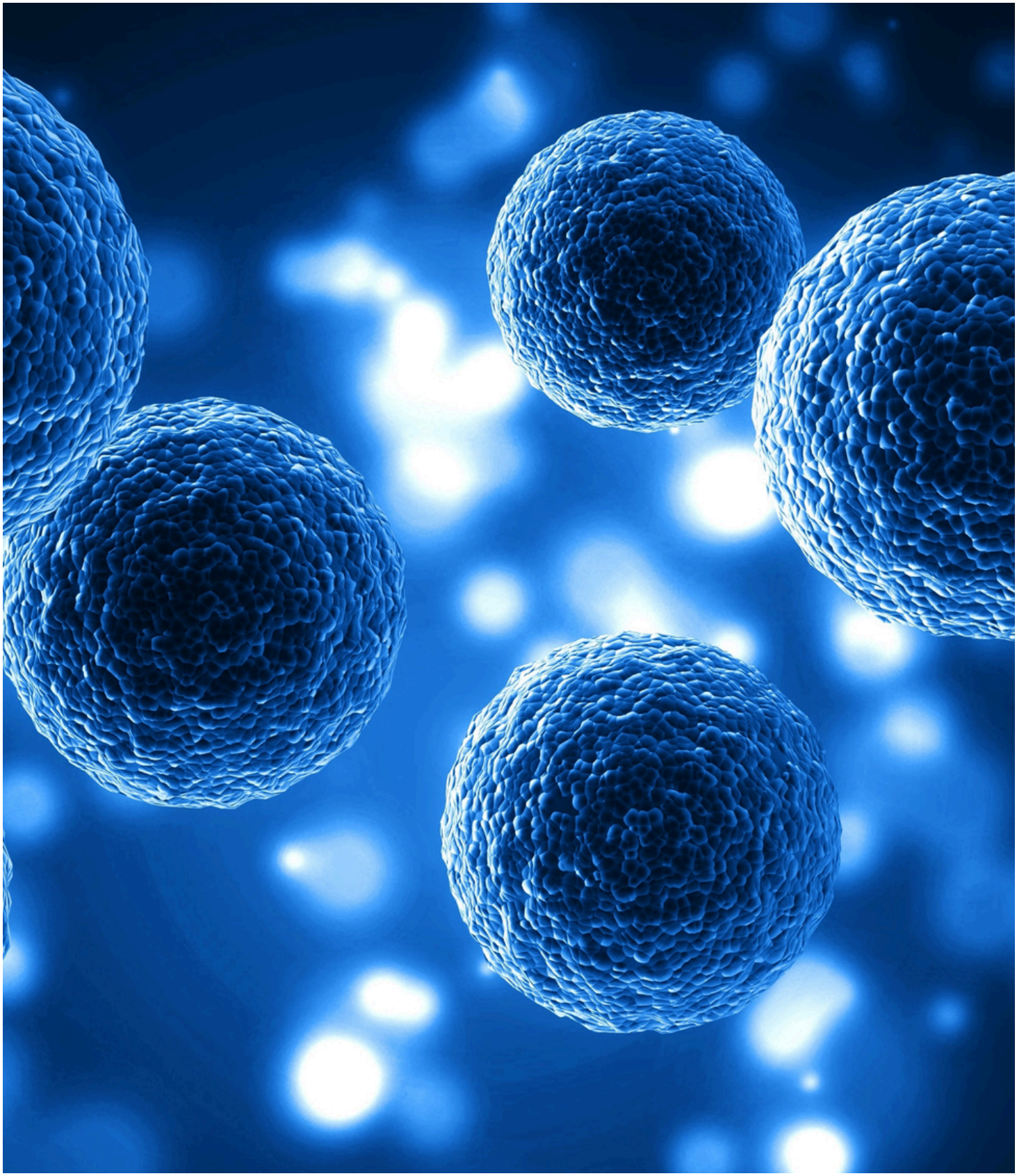
Ocak 2026
Sayı 6

HEMUD Dergisi

ISSN=2980-3594

Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Uzman Hekimleri Derneği'nin Yayınıdır



HEMUD Dergisi

Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Uzman Hekimleri Derneği'nin süreli yayınıdır.

HEMUD Adına İmtiyaz Sahibi
Uzm. Dr. Emine AKSOY

Editörler
Uzm. Dr. Sedanur YILMAZ DOĞAN
Uzm. Dr.Ayşe Firuze BIYIK

Yayın Kurulu
Uzm. Dr. Deniz Ekin ERBAŞ
Uzm. Dr. Betül SARI
Uzm. Dr. Tuğba YILMAZ
Arş. Gör. Dr. Gülten AYDIN
Arş. Gör. Dr. Ali KULABER
Arş. Gör. Dr. Beyhan KARLI YILDIRIM
Moleküler Biyolog Ayşe KENDİRCİ

Bilimsel Kurul
Prof. Dr. Tahsin Murat AKTAN
Prof. Dr. Sevim AYDIN
Prof. Dr. Selçuk DUMAN
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Prof. Dr. İmer OKAR
Prof. Dr. Bahar USLU
Prof. Dr. Ünal USLU
Prof. Dr. Gökçen KERİMOĞLU
Doç. Dr. Başak BÜYÜK
Doç. Dr. Can KÖSE
Doç. Dr. Deniz AKA SATAR
Dr. Öğr. Üyesi Gülsemin ÇİÇEK
Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin SAVRANLAR
Dr. Öğr. Üyesi Aysın Pınar TÜRKMEN
Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL
Uzm. Dr. Emine AKSOY
Uzm. Dr. Ayşe Firuze BIYIK
Uzm. Dr. Şadiye CANPOLAT
Uzm. Dr. Ayça IŞIK
Uzm. Dr. Fatma Nur KARAKUŞ
Uzm. Dr. Neslihan KOÇ
Uzm. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE
Uzm. Dr. Betül SARI

HEMUD ailesi olarak dergimizin yeni sayısı ile yeniden sizlerle buluşmanın mutluluğunu yaşıyoruz. Alanımızdaki hızlı gelişmeler doğrultusunda; güncel rehberleri, merkez tanıtımı ve yeni teknolojik yaklaşımları aynı sayıda bir araya getirdik. Amacımız, uygulamada karşılığı olan ve doğrudan pratiğe aktarılabilecek içerikleri sizlere sunmaktır.

Güncel dosya konumuzda, "İstanbul Konsensüs Güncellemesi: Oosit ve embriyonun statik ve dinamik morfolojik değerlendirmesine ilişkin revize edilmiş ESHRE/ALPHA konsensüsü" ele alınmaktadır. Bu güncellemenin, embriyoloji laboratuvarlarında değerlendirme ve raporlama süreçlerinde standardizasyona katkı sağlayacağına inanıyoruz. ÜYTE merkezi tanıtımı bölümümüzde İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Süleymaniye Tüp Bebek Ünitesi'ne yer veriyoruz. Yöntem bölümümüzde ise "Makine Öğrenimi ve Görüntü İşleme: Tıbbi Embriyoloji ve Histoloji Alanlarında Uygulamaları" başlığını sizlerle buluşturuyoruz. Görüntü analizlerinin daha objektif hale gelmesi ve karar destek yaklaşımlarının gelişmesi açısından bu alanın önümüzdeki dönemde önemli katkılar sunması beklenmektedir.

Bu sayının hazırlanmasında emeği geçen tüm yazarlarımıza, editör ekibimize ve katkı sunan herkese HEMUD ailesi olarak teşekkür ederiz.

HEMUD 5. Dönem Yönetim Kurulu

HEMUD Yönetim Kurulu
Uzm. Dr. Emine AKSOY
Dr. Öğr. Üyesi Aysın Pınar TÜRKMEN
Dr. Öğr. Üyesi Abdülkadir KUTLU
Uzm. Dr. Deniz Ekin ERBAŞ
Uzm. Dr. Betül SARI
Uzm. Dr. Berrin YANGIN
Uzm. Dr. Kenan DEMİR
Uzm. Dr. Emine UTLU ÖZEN
Uzm. Dr. Gökşen Derya REİS

İÇİNDEKİLER

SAYFA 1

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

SAYFA 11

ÜYTEM TANITIM: İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ

SAYFA 20

BİR YÖNTEM: MAKİNE ÖĞRENİMİ VE GÖRÜNTÜ İŞLEME: TIBBİ EMBRİYOLOJİ VE HİSTOLOJİ ALANLARINDA UYGULAMALARI

SAYFA 24

MAKALE ÖZETLERİ

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

OXFORD human reproduction

Human Reproduction, 2025, 00(0), 1–47
https://doi.org/10.1093/humrep/deaf021
ESHRE Pages

The Istanbul consensus update: a revised ESHRE/ALPHA consensus on oocyte and embryo static and dynamic morphological assessment†,‡

The Working Group on the update of the ESHRE/ALPHA Istanbul Consensus, Giovanni Coticchio [1,*], Aisling Ahlström [2], Gemma Arroyo[3], Basak Balaban[4], Alison Campbell [5,6], Maria José De Los Santos [7,8], Thomas Ebner [9], David K. Gardner [10,11], Borut Kovačič [12], Kersti Lundin[13], M. Cristina Magli [14], Saria Mcheik [15], Dean E. Morbeck [16,17], Laura Rienzi[18], Ioannis Sfontouris [19], Nathalie Vermeulen [15], and Mina Alikani [20,*]

Uzm. Dr. Deniz Ekin ERBAŞ
Etlik Şehir Hastanesi ÜYTEM

Özet

Araştırma Sorusu: Oosit, zigot ve embriyoların morfolojik değerlendirilmesi için güncel olarak önerilen kriterler nelerdir?

Özet Yanıt: Bu ESHRE/ALPHA Reprodüktif Tıp Bilimcileri konsensüs belgesi, oosit ve embriyo morfolojisinin değerlendirilmesi ve embriyoların transfer için sıralanmasına ilişkin çeşitli yeni öneriler sunmaktadır.

Bilinen Arka Plan: Daha önceki ALPHA /ESHRE konsensusu 2011 yılında yayımlanmıştı. Aradan geçen on yılı aşkın sürede, embriyo kültürü ve değerlendirmesine Zaman Atlamalı Teknoloji (time-lapse) entegrasyonunun ardından kapsamlı bir gözden geçirme ve güncelleme gerekli hale gelmişti.

Çalışma Tasarımı, Boyutu ve Süresi: Bu öneriler, ALPHA Reprodüktif Tıp Bilimcileri yönetim kurulu üyeleri ile ESHRE Embriyoloji özel ilgi grubunun üyelerinden oluşan bir çalışma grubu tarafından oluşturulmuştur.

Katılımcılar/Materyaller, Ortam, Yöntemler: Çalışma grubu, klinik embriyoloji konusunda geniş deneyime sahip 17 uluslararası uzmandan oluşmuştur. Yedi üye ALPHA'yı, sekiz üye ESHRE'yi temsil etmiş, ayrıca ESHRE merkez ofisinden iki metodolojik uzman eklenmiştir.

Sistematik bir literatür taraması ve mevcut kanıtların tartışılması temelinde 2011 İstanbul Konsensusu'nun önerileri yeniden değerlendirilmiş ve uygun olanlar güncellenmiştir. Taslak metin tamamlandıktan sonra değerlendirmeye sunulmuş, son versiyon çalışma grubu tarafından onaylanmıştır.

Ana Bulgular: Güncellenmiş konsensüs, preimplantasyon gelişimsel olayların zaman çizelgesi ve oosit, zigot ile embriyo değerlendirmesi için morfolojik kriterlere odaklanan 20 öneri sunmaktadır. Embriyo kültür süresine bağlı olarak, tutarlılık ve etkinlik sağlamak için değerlendirmelerin sıklığı ve zamanlamasına ilişkin öneriler geliştirilmiştir. Kısıtlılıklar ve Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar: Oosit ve embriyo morfolojisi ile ilgili bazı kriterler yeterince çalışılmamış olduğundan, bunların puanlamada kullanılmasına ilişkin veya yalnızca sıralamada kullanılmasına yönelik öneriler yapılmıştır. İlerideki güncellemelerde bu noktaların yeniden gözden geçirilmesi gerekebilir.

Anahtar kelimeler: embriyo / oosit / yarıklanma aşaması embriyo / morula / blastosist / morfoloji / morfokinetik / time-lapse

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

Giriş

İnsan embriyosunun gelişiminin değerlendirilmesi, IVF laboratuvarında zorlayıcı ancak temel bir görevdir. Embriyologlar, intrauterin transfer, kriyoprezervasyon veya preimplantasyon genetik test (PGT) için biyopsi amacıyla, yaşama en elverişli olabilecek embriyoları seçmek üzere değerlendirme yaparlar. IVF'in 1980'lerdeki dönemlerinde embriyolar "güzel, çok güzel veya çok çok güzel" olarak iyimser bir şekilde nitelendirilirken, embriyonun canlılık, implantasyon, canlı doğum ve kromozomal durum ile ilişkisini araştırmak amacıyla oldukça fazla sayıda erken embriyo morfolojik özelliği tanımlanmış ve incelenmiştir. Bununla birlikte, morfoloji değerlendirmesi büyük ölçüde öznel kalmaya devam etmekte ve gözlemciler arası ve laboratuvarlar arası değişkenliklere açık bir durum arz etmektedir (Arce ve ark., 2006; Baxter Bendus ve ark., 2006; Martínez-Granados ve ark., 2017; Storr ve ark., 2017).

Son on yılda embriyo değerlendirmesindeki en önemli ilerleme, zaman-atlamalı mikroskopi teknolojilerinin (time-lapse technologies, TLT) tanıtılması olmuştur. Bu gelişme, "morfokinetik" kavramının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Terimin de ima ettiği üzere, morfokinetik, morfolojinin (embriyoların şekil ve yapısı), kinetikle (gelişimlerinin dinamikleri) bütünleşmesini temsil eder ve in vitro embriyo gelişiminin anlaşılması ile değerlendirilmesi için kapsamlı bir çerçeve sunar. Bu teknolojiler, kültüre minimal müdahale veya bozulma ile embriyo gelişiminin sürekli gözlenmesine imkân sağlar (ESHRE Time-lapse Teknolojisi Çalışma Grubu ve ark., 2020). Embriyo değerlendirmesi üzerine yüzlerce makale yayımlanmıştır.

Bu çalışmaların çoğu retrospektif olup, hasta popülasyonu, sonuç ölçütleri, karıştırıcı faktörlerin kontrolü, laboratuvar prosedürleri ve embriyo kültür koşulları gibi bazı temel parametreler bakımından heterojendir. Dahası, hem morfokinetik hem de klasik morfolojik çalışmalar, maternal yaş, sigara kullanımı, ovaryan stimülasyon protokolleri ve fertilizasyon yöntemleri gibi faktörlerden etkilenebilir (Braga ve ark., 2015; Ubaldi ve ark., 2016; Grøndahl ve ark., 2017; Barrie ve ark., 2021a; Bam-ford ve ark., 2022). Bununla birlikte, TLT gözlemleri, gelişimsel olayların anlaşılmasına önemli katkılar sağlamış ve morfoloji değerlendirmeleri artık morfokinetikle desteklenir hale gelmiştir.

On yıldan fazla bir süre önce, Üreme Tıbbı Alanında Alpha Bilim İnsanları (ALPHA) ve ESHRE Embriyoloji Özel İlgi Grubu, oosit, zigot ve embriyoların değerlendirilmesine yönelik İstanbul Konsensusu'nu oluşturmak üzere iş birliği yapmıştır (ALPHA Scientists in Reproductive Medicine ve ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011). 2011 İstanbul Konsensusu, oosit, zigot ve embriyoların derecelendirilmesi için ortak ölçütler ve terminoloji belirlemiştir. Bu makalede, önceki yıllarda yayımlanmış verilerin dikkatli incelenmesi, derlenmesi, analizi ve yorumlanması yoluyla bu kriterler güncellenmiştir. En önemlisi, yeni öneriler, TLT'nin tanıtımından bu yana ortaya çıkan bazı embriyo morfokinetik özelliklerini de içermekte ve bunlar statik gözlem yaklaşımını tamamlamaktadır. Bu belgenin amacı, laboratuvarlar arasında standart terminolojiyi ve değerlendirme kriterlerini yeniden tesis etmeye yardımcı olmaktır.

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

Tablo 1. Embriyo gelişim aşaması değerlendirmelerine ilişkin referans zamanlamalarının oluşturulduğu zaman atlamalı (time-lapse) veriler.

Istanbul Consensus 2011			2024		
Type of observation	Timing (hpi)	Expected stage of development	Median time to reach developmental stage (rounded to nearest hour)	Assessment time for each developmental stage to give highest chance of observation (hpi). Rounded. After fertilisation check, all ±1 hour	Proportion expected to be at stage required for specific assessment. Rounded.
Fertilisation check	17±1	Pronuclear stage	N/A	16-17 (ICSI or IVF)	98% with visible pronuclei (Barrie *et al.*, 2021b)
Syngamy check	23±1	Expect 50% to be in syngamy (up to 20% may be at 2 cell stage)	tPNf (time to pronuclear fading) 23 (ICSI) 24 (IVF)	25 (ICSI) 26 (IVF)	53% 53%
Early cleavage check	26±1 (ICSI) 28±1 (IVF)	2 cell stage	t2 (time to 2 cell) 26 (ICSI) 27 (IVF)	31 (ICSI) 32 (IVF)	77% 79%
Day-2 embryo assessment	44±1	4 cell stage	t4 (time to 4 cell) 38 (ICSI) 39 (IVF)	43 (ICSI) 45 (IVF)	64% 67%
Day-3 embryo assessment	68±1	8 cell stage	t8 (time to 8 cell) 57 (ICSI) 58 (IVF)	63 (ICSI) 65 (IVF)	49% 51%
Day-4 embryo assessment	92±2	Morula	tM (time to morulae) 89 (ICSI) 91 (IVF)	93 (ICSI) 95 (IVF)	47% 44%
Day-5 embryo assessment	116±2	Blastocyst	tB (time to full blastocyst) 108 (ICSI) 107 (IVF)	108 (ICSI) 108 (IVF)	47% 52%
			tEB (time to expanded blastocyst) 113 (ICSI) 113 (IVF)	111 (ICSI) 112 (IVF)	34% 34%

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

Terminoloji

Embriyologlar, oosit ve embriyoların klinik olarak kullanılabilir olup olmadıklarına veya elenip elenmeyeceklerine dair kararları rutin olarak verirler. Oosit ve embriyolar IVF/ICSI tedavisinde, biyopsi/PGT'de, kriyoprezervasyonda, transferde ve donasyonda kullanılmaktadır.
Bu makalede sunulan güncellenmiş öneriler setinde, çalışma grubu "embriyo derecelendirme (grading)", "embriyo sıralama (ranking)" ve "embriyo seçimi (selection)" terimlerini kullanmıştır.

- **Embriyo derecelendirme (grading):** Belirli bir kriter seti kullanılarak embriyolara kalite puanı verilmesidir. Bu kriterlere blastomerlerin sayısı, boyutu ve şekli; fragmantasyon derecesi; iç hücre kitlesi (inner cell mass, ICM) ve trofoektoderm (TE) morfolojisi ile genişleme durumu gibi özellikler dâhildir.
- **Embriyo sıralama (ranking):** Klinik olarak kullanılabilir embriyoların, derecelendirme ve diğer değerlendirme ölçütlerine dayalı olarak, transfer için en uygun olandan en az uygun olana doğru önceliklendirilmesidir. Embriyolar, morfolojik ve mevcut olduğunda genetik faktörlerle belirlenen implantasyon ve gelişim potansiyellerine göre sıralanır. Bu, hangi embriyo(ların) ilk transfer edileceğinin önceliklendirilmesidir.
- **Embriyo seçimi (selection):** Transfer için seçilecek embriyoların belirlenmesi sürecidir. Bu seçim, sıralama ve diğer faktörler dikkate alınarak yapılır. Amaç, başarılı bir gebelik ve canlı doğumla sonuçlanma olasılığı en yüksek embriyoyu seçmektir.

Malzemeler ve yöntemler

Bu iyi uygulama önerileri dokümanı, ALPHA ve ESHRE'yi temsil eden uzman profesyonellerden oluşan bir çalışma grubunun bir yıl süresince gerçekleştirdiği çok sayıda çevrim içi toplantı ve iki günlük konsensus toplantısının sonucudur. Güncelleme süreci için başlangıç noktası olarak, yardımcı üreme teknikleri (ART) merkezlerinde İstanbul Konsensusu (2011) önerilerinin uygulanmasına ilişkin mevcut uygulamalara dair bilgi toplamak üzere bir anket hazırlanmıştır.

Anket üç bölümden oluşmakta olup, çoğunlukla çoktan seçmeli sorular içermektedir; uygulama yapılan ülke, kullanılan sınıflandırma sistemi, İstanbul Konsensusu (2011) önerilerinin benimsenme durumu ve TLT, yapay zekâ (AI) ve PGT gibi diğer teknolojilerin kullanımına ilişkin değerlendirmeleri sorgulamıştır. Katılımcıların anonimliği sağlanmış, kimlik belirleyici herhangi bir bilgi talep edilmemiştir. Bununla birlikte, aynı cihazdan ankete birden fazla kez katılım engellenmiştir.

Anket, ALPHA ve ESHRE üyelerine dağıtılmış ve her iki derneğin internet siteleri ile sosyal medya sayfalarında paylaşılmıştır. Merkezlerin kıdemli bir temsilcisinin anketi doldurması istenmiştir. Toplamda, 21 Kasım 2022 ile 2 Ocak 2023 tarihleri arasında 833 yanıt toplanmıştır.
Buna ek olarak, PubMed/MEDLINE'da Mayıs 2024'e kadar yayımlanmış oosit ve embriyo statik ve dinamik değerlendirmeleri ile ilgili literatür taranmıştır. Tüm başlıklar ve özetler gözden geçirilmiş, yalnızca uygun görülen makaleler seçilmiş ve metne dahil edilmiştir. Bu tarihten sonra yayımlanan makalelerden ilgili olanlar, el yazması için ayrıca manuel olarak eklenmiştir. Literatürden elde edilen referanslar, çalışma grubu üyelerinin belirlediği ek önemli kaynaklarla tamamlanmıştır. Makale kalitesi, GRADE Pro yazılımı (McMaster University, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Klinik uygulama için öneriler, çalışma grubunun uzman görüşleri temel alınarak, mevcut kanıtlar ve anket sonuçları dikkate alınarak formüle edilmiştir.

Konsensus toplantısında, anket sonuçları, bilimsel kanıtlar ve kişisel klinik deneyimler, belirli konular üzerinde uzmanlarca yapılan sunumlarda bir araya getirilmiştir. Konu sunumunun ardından, her bir öneri grup içinde tartışılmış ve fikir birliğine varılana kadar değerlendirilmiştir. İlgili en önemli makaleleri içeren güncel bir metin hazırlanmış ve konsensus noktaları eklenmiştir. Katılımcılar tarafından

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

onaylanmasının ardından, nihai taslak 17 Mayıs 2024 – 17 Haziran 2024 tarihleri arasında ALPHA ve ESHRE web sitelerinde paydaş değerlendirmesine açılmıştır. Toplamda 157 yorum alınmış ve uygun görüldüğünde dikkate alınmıştır.

Değerlendirme raporu www.eshre.eu/guidelines ve https://alphascientists.org adreslerinde mevcuttur. Son taslak, her iki derneğin yürütme kurulu üyeleri tarafından onaylanmıştır.

Oosit ve embriyo değerlendirme kriterlerine ilişkin güncel veriler

1.Embriyo gelişiminin zaman çizelgesi

Konsensus Noktaları

- Gözlemlerin zamanlamasının standardizasyonu, farklı laboratuvarlar, kültür koşulları, hastalar ve diğer değişkenler arasındaki sonuçların güvenilir biçimde karşılaştırılması için kritik önemdedir. Bu zamanlamalar inseminasyon zamanına göre ayarlanmalı ve uniform biçimde "inseminasyondan sonraki saat" (hours post-insemination-hpi) olarak raporlanmalıdır.
- Tüm biyolojik süreçlerde zamanlamada doğal bir değişkenlik vardır; önerilen gözlem zamanları, ilişkili gelişimsel evrelerin çoğu vakada gerçekleştiği zamanları yansıtır. Bununla birlikte, insan öznel değerlendirmesi de dahil olmak üzere çeşitli karıştırıcı ve etkileyici faktörlerin varlığı kabul edilmektedir.
- Kültür ortamları ve kültür sistemleri, embriyo morfokinetiği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir; bu nedenle karşılaştırmalı çalışmalarda bu etkinin mutlaka dikkate alınması gerekir.
- Her laboratuvar, ilgili zamanlamaları belirlemek için kendi veri setlerini geliştirmeye ve analiz etmeye teşvik edilmektedir. Başka laboratuvarlar tarafından üretilen veriler genellenebilir olmayabilir.

2.Oosit

Konsensus Noktaları

- Dev oositler (giant oocytes) klinik kullanım dışında bırakılmalıdır.
- Küçük/büyük oositler ve IVM (in vitro maturasyon) ile kurtarılan oositlerin kullanımı, daha düşük gelişim potansiyeline sahip göründüklerinden, prognostik amaçlarla ve izlenebilirlik için belgelenmelidir.
- Klinik kullanım için öncelik, büyük veya çoklu vakuolleri, SER-a (smooth endoplasmic reticulum aggregations), orantısız şekilleri ve çok büyük birinci polar cisimleri olmayan MII oositlerinden gelişen embriyolara verilmelidir.
- Atipik fenotipli oositlerden ve "rescue-IVM" ile elde edilen oositlerden doğan bebeklerin doğum öncesi takibi ve doğum sonrası izlemleri özel dikkat gerektirmektedir.

3.Zigot

Konsensus Noktaları

- Kanıtlar, insan fertilizasyonunda dikkate değer bir plastisite olduğunu ortaya koymakta ve bu da statik fertilizasyon değerlendirmesine ilişkin güncellenmiş önerilere temel oluşturmaktadır.
- **Gözlem zamanlaması:** Statik gözlemler için, PN (pronükleus) sayısının değerlendirilmesi hem klasik IVF (kIVF) hem de ICSI vakalarında 16–17 hpi'de yapılmalıdır. Bu, görece erken PNBD (pronüklear zarfın kaybolması) geçiren zigotların yanlışlıkla döllenmemiş oositler olarak sınıflandırılma olasılığını azaltacaktır. İstanbul Konsensusunda (2011) bahsedilen, statik gözlem yoluyla singami (PN'nin kaybolması) kontrolü önerilmemektedir; çünkü PNBD'nin zamanlaması kesin olarak belirlenemez.
- **Morfolojik özellikler:** Zigot büyüklüğü, PN büyüklüğü, PN konumu ve NPB (nükleoler prekürsör cisimcikleri) düzeni gibi çok sayıda zigotik özellik embriyo kalitesi ve klinik sonuçlarla ilişkili olabilir.

- Ancak bunların biyobelirteç olarak kullanımı en az iki faktör tarafından engellenmektedir: **(i)** yetersiz kanıt (ör. PN büyüklüğü) ve **(ii)** kısa zaman dilimlerinde görülen morfolojik değişkenlik (ör. NPB düzeni), ki bu da statik gözlemle doğru şekilde değerlendirilemez. PN yan yana bulunmaması çok nadirdir, fakat kötü blastosist gelişimi ile güçlü biçimde ilişkilidir. Sitoplazmik halonun yokluğu blastosist oluşumunu etkiler, fakat blastosist transferi sonrası implantasyon oranını etkilemez. Bu nedenle, halonun yokluğu embriyo sıralamasında kullanılabilir, ancak 3. gün embriyo transferlerinde embriyoları dışlamak için kullanılmamalıdır.
- **PN sayısı:** Statik gözlemde, döllenme kontrolünde pronükleuslar görülemeyebilir, ancak buna rağmen normal embriyo gelişimi meydana gelebilir. Bu durum, orijinal İstanbul Konsensusu (2011)'nde önerilen döllenme kontrolü aralığından daha erken bir zamanda önemli bir oranda 2PN zigotunun PNBD'ye uğradığını gösteren TLT verileri ile açıklanabilir. Bu gibi vakalarda, 2PN döllenmesini doğrulamak için ikinci polar cisim (PBII)'in varlığı ek bir puanlama kriteri olarak kullanılmalıdır. Bu zigotlar "**oPN**" olarak kategorize edilebilir; ancak kültüre edildiğinde normal laboratuvar ve klinik sonuçlar verebilirler. Bu nedenle, bu vakalarda "**döllenmemiş**" veya "**oPN**" terimleri kullanılmamalıdır. Bunun yerine, döllenmenin doğrulanması olmadan normal gelişim gösteren zigotlar için "**PN gözlenmedi**" ifadesi daha uygun bir alternatif olabilir.

4.Yarıklanma (Klivaj)

Konsensus Noktaları

- Klivaj evresi embriyo değerlendirmesi, İstanbul Konsensusu (2011)'de kararlaştırıldığı üzere, hücre sayısı, derece ve derecelendirme nedeni (örn. 4 hücre, derece 2, fragmantasyon) içermelidir.
- 1. günde 2 hücreli, 2. günde 4 hücreli ve 3. günde 8 hücreli embriyolar, <%10 fragmantasyon, mononükleasyon ve evreye özgü hücre boyutu gösteriyorsa, klivaj evresi transferi veya kriyoprezervasyon durumunda önceliklendirilmelidir.
- Klivaj evresi embriyolarda mekânsal düzensizlik, vakuoller, sitoplazmik granülarite ve zona anormallikleri gibi atipik özelliklerin implantasyon potansiyeli üzerine etkisini destekleyen güçlü bir kanıt yoktur. Bu nedenle bu embriyolar klinik kullanım için uygun kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu embriyoların canlılık açısından daha ileri seçim ve değerlendirme amacıyla uzatılmış kültürde tutulması göz önünde bulundurulmalıdır.
- Başarı oranlarını öngörmede erken klivajın değerlendirilmesinin önemi kesin olarak ortaya konmamıştır. Ancak, binükleasyon /multinükleasyon ve hücre boyutu gibi diğer özelliklere ilişkin bilgi sağlayabilir. TLT ile erken klivaj değerlendirmesi, doğrudan bölünme, ters bölünme ve düzensiz/kaotik bölünme gibi anormal erken klivajları tanımlamak için kullanılabilir.
- **Fragmantasyon:** Göreceli fragmantasyon derecesi şu şekilde tanımlanmıştır: yok veya minimal (<%10), hafif (<%25) veya şiddetli (>%25). Yüzdelik değerler hücre boyutu ile ilişkilidir; dolayısıyla 4 hücreli bir embriyoda %25 fragmantasyon, bir blastomer hacmine eşittir.
- **2. ve 3. günlerde blastomer sayısı:** Embriyo gelişiminde mevcut beklenti 2. günde 4 hücre, 3. günde 8 hücredir. Ancak bu, gözlem zamanının kesinliği ve kültür koşullarından etkilenebilir. Bu nedenle değerlendirme zamanının belgelenmesi önerilmektedir.
- **Hücre boyutu:** 2-, 4- ve 8-hücre evresindeki embriyolarda blastomerler eşit büyüklükte olmalıdır. Diğer hücre evrelerinde ise klivaj evresi tamamlanmadığından, evreye uygun

boyut farklılıkları beklenebilir.

- **Multinükleasyon:** Gerçek multinükleasyon (bir veya birkaç hücrede ≥3 nükleus) implantasyon potansiyelinde azalma ve kromozom anormalliğinde artış ile ilişkilidir. 2. günde, 4 hücre evresinde binükleasyon mutlaka olumsuz bir gösterge olmayabilir, fakat daha fazla kanıta ihtiyaç vardır. Laboratuvarlar her bir embriyoda binükleasyon, multinükleasyon ve mikronükleasyonu kaydetmeli, ideal olarak her embriyodaki her blastomerin nükleasyon durumunu ayırt etmelidir. Mevcutsa, multinükleasyon TLT kullanılarak değerlendirilmelidir.
- **Time-lapse teknolojisi (TLT):** Geniş veri setleri, belirli gelişimsel olayların zamanlamasını içerecek şekilde analiz edilmiş ve implantasyon ile canlı doğumu öngörmek için algoritmalar tasarlanmıştır. Ancak, TLT ile embriyo seçimini takiben daha iyi klinik sonuçlara dair yüksek kaliteli kanıtlar hâlen sınırlıdır (Armstrong ve ark., 2019; Kieslinger ve ark., 2023). TLT, hızlı bölünme, doğrudan bölünme ve ters bölünme gibi kinetik değişkenlerin değerlendirilmesine imkân verir. Bu veriler, embriyoların dışlanmasında kullanılmış ve doğrudan 3 hücreye bölünme gibi atipik bölünme paternlerinin embriyo gelişimini olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Bu olaylar çoğu durumda statik gözlemlerle kaçırılabilmektedir.
- **Kompaktlaşma:** Az sayıda çalışmaya dayanarak, 8 hücre öncesinde başlayan kompaktlaşmanın blastosist oluşumunu olumsuz etkilediği, 8 hücreden sonra başlayan kompaktlaşmanın ise olumlu bir gösterge olabileceği ve bu evrede ek bir seçim aracı olarak kullanılabileceği görülmektedir.

5.Morula

Konsensus Noktaları

- 4. gün embriyoları, tam kompaktlaşma veya erken boşluklanma (kavitasyon) göstermeleri durumunda, 4. gün transferi ya da vitrifikasyonu için önceliklendirilmelidir.
- Kısmi kompaktlaşma gösteren embriyolar blastosist oluşturabilir ve klinik kullanım için gözönünde bulundurulmalıdır. Bu embriyoların canlılık açısından daha ileri değerlendirme yapılabilmesi için kültürün uzatılması düşünülmelidir.

6.Blastokist (4-7.günler)

Konsensus Noktaları

- Sonuçta blastosist derecelendirmesinin amacı, kullanım sırasına göre sıralama yapmaktır.
- Blastosist puanlamasında Gardner derecelendirme sistemi kullanılmalıdır(**Tablo 4**). Bu sistem, önceki konsensus derecelendirmesinden, ICM/TE derecelerinde harflerin (A, B, C) kullanılması ve ek genişleme evrelerinin (ör. hatched blastosist) eklenmesi ile ayrılır.
- Yaşamla bağdaşmayan blastosistlere, dejeneratif özelliklere veya belirgin bir ICM'nin yokluğuna dayanarak, "C" yerine "D" derecesi verilmelidir.
- İmplantasyon potansiyeli ile açıkça ilişkili yaygın özellikler, blastosist oluşum günü (4–7. günler), genişleme evresi (3, 4, 5, 6) ve ICM (A, B, C) ile TE (A, B, C) dereceleridir.
- Grade C ICM ve/veya TE'ye sahip blastosistler ve 7. gün blastosistleri yaşayabilir ve klinik kullanım için uygun kabul edilebilir.
- İki ICM'ye sahip blastosistler, tek yumurta ikizliği potansiyelini gösterir; bu embriyolar, kapsamlı hasta danışmanlığı yapılmadan transfer edilmemelidir.

7.Embriyo kültürünün süresi ve değerlendirme sıklığı: güvenlik ve etkinlik kıyaslaması

Konsensus Noktaları

- Uzatılmış embriyo kültürü kabul edilmiş ve standart bir uygulamadır.
- Embriyo kültürünün süresi ve statik embriyo gözlemlerinin sıklığı, laboratuvardaki ekipman ve personelin yetkinliğine göre ayarlanmalı; embriyo gelişimini etkileyebilecek kültür koşullarındaki değişikliklerin en aza indirilmesi sağlanmalıdır.

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

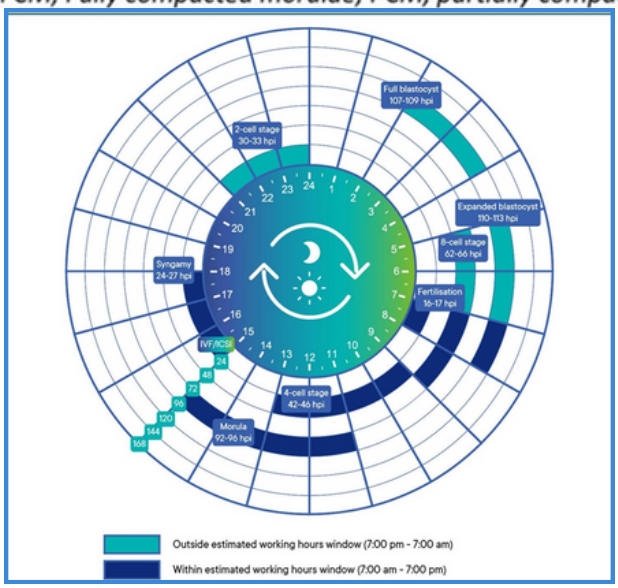
Tablo 2. 2. ve 3. gün embriyo transferi için sıralama şeması.

Özellik	En üst sıralama	Orta sıralama	Düşük sıralama
Hücrelerin sayısı	4 hücre 2. günde ya da 8 hücre 3. günde	>4 hücre 2.günde ya da >8 hücre 3. günde	<4 hücre 2.günde ya da <8 hücre 3.günde
Erken bölünme	Var	Yok	
Hücre boyutu	Hücre aşamasına özgü	Hücre aşamasına özgü değil	
Fragmantasyon	Yok ya da minimal (<10%)	10-25% fragmantasyon	>25% fragmantasyon
Multinükleasyon	Hiçbir hücre aşamasında multinükleasyon yok	4 hücreli aşamada multinükleasyon yok	4 hücreli aşamada multinükleasyon
Anormal Bölünme	–	–	Direkt bölünme DC2 (2-5 hücre)
Kompaksiyon	≥8 hücreli aşamadan sonra kompaksiyon	Kompaksiyon yok	8 hücreli aşamadan önce kompaksiyon
Öneri	• Tranfer için, anormal bölünmeye sahip 2./3. gün embriyolarına öncelik vermeyin (direkt bölünme DC1 (1-3 hücreli), düzensiz kaotik bölünme veya ters bölünme) • Anormal bölünmeye sahip embriyoların kültürünü blastosist aşamasına kadar ilerletin.		

Tablo 3. İnseminasyon sonrası benzer saatlere sahip morulaların seçimine ilişkin sıralama.

Özellik	Üst sıralama	Orta sıralama	Düşük sıralama
Erken Kavitasyon	Evet	Hayır	Hayır
Kompaksiyon	FCM	PCM	-Kompaksiyon yok -≥8 hücreli kompaktlaşan embriyo -Belirgin sitoplazmik kayıplı PCM
Morfoloji	Vakuol yok	Vakuol yok ya da küçük	Yoğun vakuolizasyon
Öneri	Atipik morfolojik özellikler olduğunda blastokist aşamasına kadar kültüre devam et (blastomerlerin self kavitasyonu, <50% kompakt embriyo, kompaksiyon olmaksızın ≤8 hücre, fazla fragmantasyon, yaygın vakuoller)		

FCM, Fully compacted morulae; PCM, partially compacted morulae.



Şekil 1. Zaman pencereleri çizelgesi: Bu şekil, belirli aşamalarda gelişen embriyonun, gözlemlenme şansını en üst düzeye çıkarmak amacıyla değerlendirme için önerilen zamanlamalara bir örnek sağlar. Bu örnekte, IVF/ICSI 15:00'te gerçekleştirilmiştir. hpi: inseminasyondan sonraki saatler

Tablo 4. Blastokistler için konsensüs puanlama sistemi.

	Derece	Tanım
Genişleme derecesi	1	Erken blastokist: blastosel, embriyo volümünün yarısından azdır.
	2	Blastokist: blastosel, embriyo volümünün yarısı kadardır ya da yarısından fazladır.
	3	Tam blastokist: blastosel, embriyoyu tamamen doldurur.
	4	Genişlemiş blastokist: blastosel artmıştır ve belirgin şekilde incelen zonası vardır.
	5	Hatch olmaya başlamış blastokist: trofoektoderm zonadan fıtıklaşmaya başlamıştır.
	6	Hatch olmuş blastokist: blastokist zonadan tamamen kurtulmuştur.
	Evre	**Tanım**
ICM	A	Belirgin, kolayca ayırt edilebilen, çok sayıda hücrenin bir arada sıkışmış ve sıkıca yapışık olduğu.
	B	Kolayca ayırt edilebilir, birkaç hücre gevşek bir şekilde bir araya toplanmıştır.
	C	Çok az hücre görülür.
	D	Görünür hücre yok veya dejenere hücreler mevcut.
TE	A	Kohezif epiteli oluşturan çok sayıda hücre.
	B	Gevşek bir epitel oluşturan makul sayıda hücre.
	C	Epitel oluşumu zayıf, az sayıda ve büyük hücreler.
	D	ICM'yi çevreleyen seyrek veya dejenere hücreler.

Sonuç

Bu konsensus makalesi, oosit, zigot, klivaj evresi embriyoları, morula ve blastosist gelişiminin değerlendirilmesine ilişkin ölçütler ve terminolojiye dair güncellenmiş öneriler sunmaktadır. Son on yıl boyunca biriken kanıtların kapsamlı incelenmesine dayanan bu çalışma, zaman-atlamalı görüntüleme (TLT) teknolojisinin uygulanmasıyla elde edilen kritik bilgileri de içermektedir. TLT sayesinde, gelişimsel kilometre taşlarının yeniden tanımlanması, döllenme yöntemlerinin erken embriyogenez üzerindeki etkilerinin daha geniş değerlendirilmesi ve zaman-atlamalı görüntüleme ile tespit edilen atipik morfolojilerin daha geniş bir yelpazede sunulması mümkün olmuştur.

Toplanan öneriler (**Tablo 5**), canlılık öngörüsünü daha iyi yapabilmek ve klinik kullanım için embriyoların sıralanması ile seçimini optimize etmek amacıyla standartlaştırılmış embriyo değerlendirme uygulamalarını teşvik etmeyi hedeflemektedir. Bununla birlikte, belirli morfolojik ve morfokinetik parametrelerin klinik değeri ile ilgili hâlen önemli bilgi boşlukları mevcuttur ve bunların ileri araştırmalarla incelenmesi gerekmektedir. Kuşkusuz, önümüzdeki on yıl, yardımcı üreme teknikleri (ART) laboratuvarına yapay zekânın daha güçlü entegrasyonuna tanıklık edecek ve bu, sürekli zorlayıcı olan canlı gamet ve embriyo seçimi sorununa yeni çözümler sunacaktır.

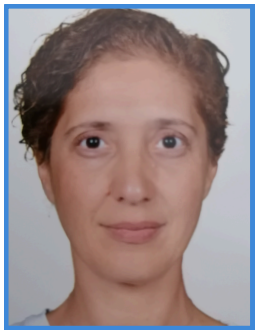
Son olarak, kurumlar ve coğrafi bölgeler arasında uzmanlık ve deneyimin birleştirilmesiyle oluşturulan bu tür uluslararası iş birlikleri, araştırma tutarlılığının, klinik uygulamanın ve en önemlisi, yardımcı üreme tedavisi arayan hastaların sonuçlarının iyileştirilmesine katkı sağlayacaktır.

İSTANBUL KONSENSÜS GÜNCELLEMESİ: OOSİT VE EMBRİYONUN STATİK VE DİNAMİK MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİNE İLİŞKİN REVİZE EDİLMİŞ ESHRE/ALPHA KONSENSÜSÜ

Tablo 5. Öneriler Listesi

DEĞERLENDİRME	ÖNERİLER
OOSİT DEĞERLENDİRMESİ	·Dev oositler klinik kullanım dışı bırakılmalıdır. ·Küçük/büyük oositlerin ve IVM ile kurtarılan oositlerin kullanımı prognoz ve izlenebilirlik için belgelenmelidir. ·Büyük veya çoklu vakuoller, SER-a ve çok büyük 1. polar cisim içermeyen MII oositlerden gelişen embriyolar klinik kullanım için önceliklendirilmelidir. ·Atipik fenotipli oositlerden ve kurtarma-IVM oositlerinden doğan bebeklerin takibi özel dikkat gerektirir.
ZİGOT DEĞERLENDİRMESİ	·PN sayısı hem IVF hem de ICSI vakalarında 16–17 hpi'de değerlendirilmelidir. ·2PN zigotlar klinik kullanım için önceliklendirilmelidir. ·2.1PN ve 1PN zigotlar uygun danışmanlıkla ve PGT-A teknolojisi mevcutsa klinik kullanım için düşünülebilir. ·3PN zigotların klinik kullanımı önerilmez; pre-klinik/pilot klinik çalışmalar teşvik edilmelidir. ·PN büyüklüğü, PN konumu, NPB düzeni ve sitoplazmik halo statik gözlemle güvenilir değildir, canlılık biyobelirteçleri olarak kullanılamaz.
1., 2. ve 3. GÜN EMBRİYO DEĞERLENDİRMESİ	·1. gün 2 hücreli, 2. gün 4 hücreli, 3. gün 8 hücreli embriyolar; <%10 fragmantasyon, mononükleasyon ve uygun hücre boyutu olan embriyolar önceliklendirilmelidir. ·Aşırı fragmantasyonu, multinükleasyonu, vakuolleri, granülaritesi, membran ve zona anormallikleri olan embriyolar klinik kullanım için uygundur; ancak uzatılmış kültürde değerlendirilmelidir.
4. GÜN EMBRİYO DEĞERLENDİRMESİ	·4. gün embriyoları tam kompaktlaşma veya erken boşluklanma gösteriyorsa transfer/vitrifikasyon için önceliklendirilmelidir. ·Kısmi kompaktlaşma gösteren embriyolar blastosist oluşturabilir; klinik kullanım için uygundur. Daha ileri değerlendirme için kültür uzatılabilir
5., 6. ve 7. GÜN EMBRİYO DEĞERLENDİRMESİ	·Blastosist puanlamasında Gardner sistemi kullanılmalıdır. ·Yaşamsal olmayan blastosistlere 'D' derecesi verilmelidir. ·İmplantasyonla ilişkili kriterler: blastosist oluşum günü (4–7), genişleme evresi (3–6), ICM (A–C), TE (A–C). ·Grade C ICM/TE ve 7. gün blastosistleri klinik kullanım için uygundur. ·İki ICM'ye sahip blastosistler, tek yumurta ikizliği riski nedeniyle, hasta danışmanlığı olmadan transfer edilmemelidir.
EMBRİYO KÜLTÜRÜ SÜRESİ VE DEĞERLENDİRME SIKLIĞI	·Uzatılmış embriyo kültürü kabul görmüş ve standart bir uygulamadır. ·Kültür süresi ve gözlem sıklığı, laboratuvar ekipmanı ve personelin yetkinliğine göre ayarlanmalı; kültür koşullarındaki değişiklikler en aza indirilmelidir.

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ



Uzm. Dr. Betül SARI
İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Süleymaniye Tüp Bebek Ünitesi

İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi İstanbul'un en eski hastanelerindendir. 1960 yılında İşçi Sigortaları Kurumu İstanbul Hastanesi ismiyle Samatya'da açılmıştır. Uzun yıllar Samatya Hastanesi olarak anılmış olup 2005 yılında Sağlık Bakanlığına devredilmiş ve bugünkü adını almıştır.

Kanuni Sultan Süleyman tarafından Mimar Sinan'a 1555 yılında yaptırılan Süleymaniye Külliyesi içinde yer alan Süleymaniye Doğum Evi en eski hastanelerden olup 1927 yılında özel dal hastanesi olarak Kadın Hastalıkları ve Doğum üzerine hizmet vermiştir. 1999 yılında Süleymaniye Doğumevi bünyesinde Tüp bebek ünitesi açılmıştır.

Semiha Şakir Doğum Evi

1990 yılında Hayırsever Semiha Şakir tarafından Zeytinburnu semtinde kendi adını taşıyan doğum evi yaptırılmıştır. Bu doğum evi 1994 yılında Süleymaniye Doğum ve Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesine dahil edilmiştir. Ancak Süleymaniye doğum evi tarihi bir bina olması nedeni ile yeniden düzenleme yapılmasına imkan sağlayamamıştır.

2009 yılında Eminönü –Süleymaniye Doğum evi tümüyle kaldırılarak Zeytinburnu semtinde bulunan Semiha Şakir Doğumevi binasında hizmet vermeye devam etmiştir.

2013 yılına kadar kadın doğum hastanesi olarak hizmet vermiş olup 2013 yılında Sağlık Bakanlığının onayı ile Süleymaniye Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne dönüştürülmüştür.

Süleymaniye Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Tüp bebek ünitemiz İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi bünyesinde Süleymaniye Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Ek Hizmet Binasında yer almaktadır. Tüp bebek ünitemiz uzun yıllar İstanbul Avrupa yakasında tek tüp bebek merkezi olarak hizmet vermiştir. Çocuk sahibi olmak isteyen hastalarımıza çıktıkları bu yolda deneyimli, bilgili ve güler yüzlü kadromuz ile yardımcı olmaktayız.

Hastalarımıza ilk başvurduklarında dikkatli bir değerlendirme ve ayrıntılı bilgilendirme yapılmaktadır. Sonrasında kişiye uygun tedavi planlanarak kısa sürede tedaviye başlanmaktadır. İnfertil çiftlere verilen hizmetler dışında onkoloji hastalarına da hizmet verilmektedir. Gelecekte anne baba olabilme şansı tanıyan yumurta ve sperm dondurma işlemleri de ünitemizde yapılmaktadır. Ünitemizde 3 kadın doğum uzmanı, 4 tıbbi histoloji ve embriyoloji uzmanı, 5 hemşire, 1 laborant ve 1 biyolog çalışmaktadır. Yılda yaklaşık olarak olarak 600 hastaya tüp bebek işlemi, 400 hastaya da aşılama işlemi yapılmaktadır.

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ

Tüp Bebek Merkezimizde Yapılan İşlemler

OPU (Oocyte Pıck–Up) Yumurta toplama işlemi
ICSI (İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu işlemi
IUI (Aşılama,intrauterin inseminasyon işlemi)
TESE, MESA İşlemleri
Spermiyogram
Embriyo Freezing- Embriyo Thawing
Oosit Freezing- Oosit Thawing
Sperm Freezing- Sperm Thawing
TESE Materyali Freezing - TESE Materyali Thawing
Embriyo Ko- Kültürü
Oosit Ko-Kültürü
Assisted Hatching (AH)
Klasik IVF İşlemi

Kliniğimizde Kullandığımız Cihazlar

Laminer flow hood cihazları
Bench-top
Stereoskopik Mikroskoplar
İnkübatör cihazları
Mikromaniplatörler
Santrifüj cihazı
Etüv
Buzdolabı
Mikrotese ameliyat mikroskobu
Sperm, oosit ,embriyo için ayrı ve yine ayrı olarak seroloji tankları.

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ

Hasta kabul ve bekleme salonu

İnfertilite Poliklinikleri

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ

Embriyoloji–Androloji Laboratuvar Sekreterlik

Embriyoloji-Androloji hasta bekleme alanları

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ

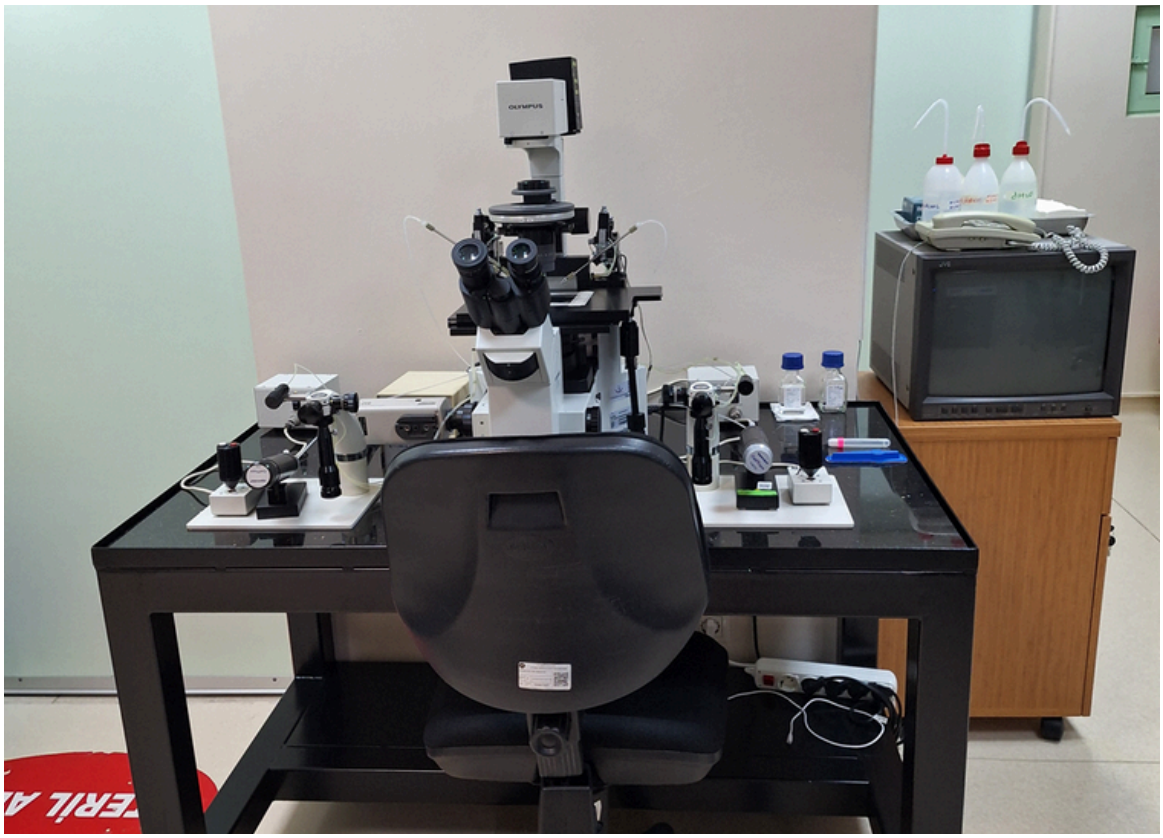
Androloji laboratuvarı kabul alanı

Androloji Laboratuvarı

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ

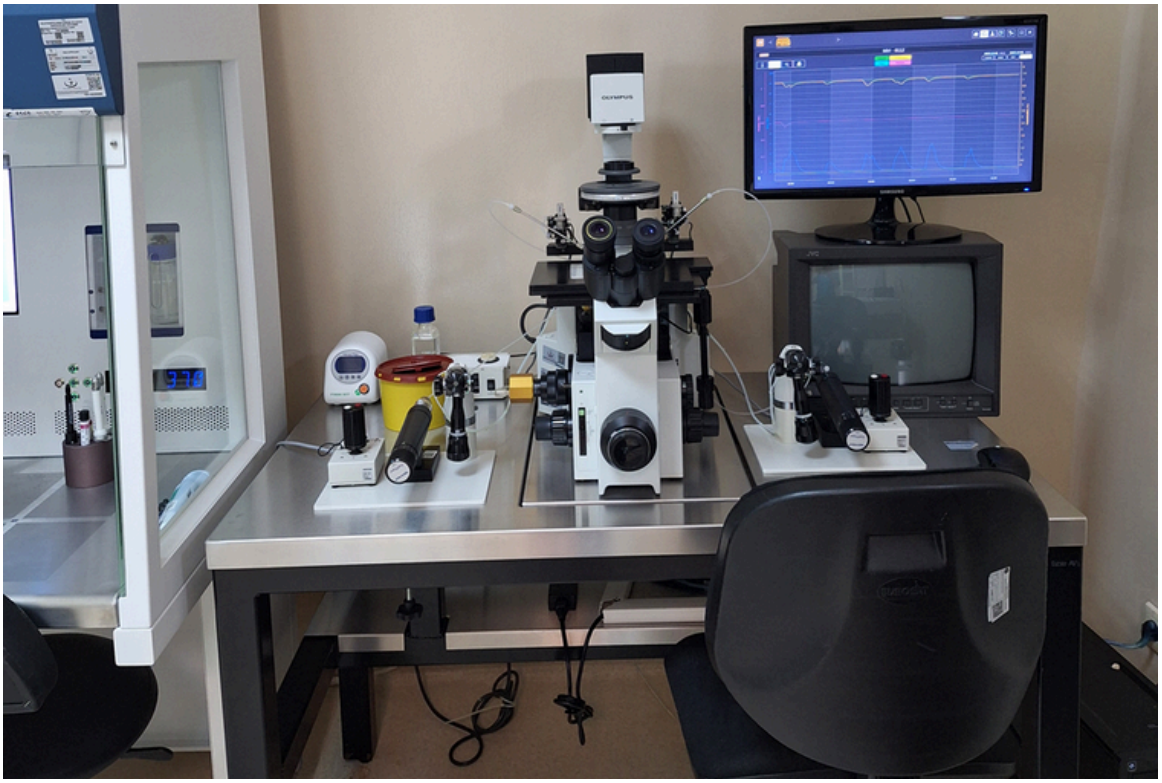
Embriyoloji Laboratuvarı

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ



Embriyoloji Laboratuvarı

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ



Embriyoloji Laboratuvarı

Dondurma Odası

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SÜLEYMANİYE TÜP BEBEK ÜNİTESİ

Ameliyathane

MAKİNE ÖĞRENİMİ VE GÖRÜNTÜ İŞLEME: TIBBİ EMBRİYOLOJİ VE HİSTOLOJİ ALANLARINDA UYGULAMALARI

Moleküler Biyolog Ayşe KENDİRCİ
Gaziantep Adli Tıp Grup Başkanlığı
Biyoloji İhtisas Dairesi

1. Giriş

Son yıllarda yapay zekâ teknolojilerinin gelişimiyle birlikte makine öğrenimi (Machine Learning, ML) ve görüntü işleme (Image Processing) alanları, biyomedikal bilimlerde giderek daha fazla önem kazanmıştır. Bu iki teknoloji, özellikle tıbbi embriyoloji ve histoloji gibi mikroskobik gözlem gerektiren disiplinlerde, hücresel ve dokusal yapıların analizini hızlandırmakta, nesnel hale getirmekte ve hata payını azaltmaktadır. Embriyoloji, organizmaların gelişim sürecini; histoloji ise dokuların mikroskobik yapısını inceler. Bu alanlarda hücre sayımı, morfolojik sınıflandırma, doku anormalliklerinin tespiti gibi analizler geleneksel olarak gözlemciye bağlıdır. Ancak makine öğrenimi destekli görüntü işleme sistemleri, bu süreci otomatikleştirerek tekrarlanabilir ve ölçülebilir hale getirmiştir.

2. Makine Öğrenimi Nedir?

Makine öğrenimi, bilgisayarların açıkça programlanmadan verilerden öğrenmesini sağlayan bir yapay zekâ yaklaşımıdır. Sistem, geçmiş verilerdeki desenleri (patterns) analiz eder, ardından yeni veriler üzerinde tahminlerde bulunur. ML algoritmaları üç temel grupta toplanabilir:

-Denetimli Öğrenme (Supervised Learning):
Girdi–çıktı ilişkisi bilinen örneklerden öğrenir. Örneğin, "normal embriyo" ve "anormal embriyo" olarak etiketlenmiş görüntülerle eğitilen bir model, yeni bir embriyonun durumunu tahmin edebilir.

-Denetimsiz Öğrenme (Unsupervised Learning):
Etiketlenmemiş verilerde gizli örüntüleri keşfeder. Örneğin, farklı hücre tiplerini morfolojik benzerliğe göre kümelere ayırabilir. Kullanılan yöntemler: K-means, PCA, Autoencoder tabanlı ağlar.

-Derin Öğrenme (Deep Learning):
Çok katmanlı sinir ağları (özellikle CNN) kullanarak görüntülerden otomatik özellik çıkarımı yapar. Histolojik analizlerde en etkili yaklaşım budur. Makine öğrenimi, yalnızca sonuç tahmini değil, aynı zamanda karar destek sistemi oluşturmak için de kullanılır. Böylece araştırmacılar, veriye dayalı, tekrarlanabilir değerlendirmeler yapabilirler.

3. Görüntü İşleme Nedir?

Görüntü işleme, dijital görseller üzerinde bilgi çıkarımı yapmayı sağlayan matematiksel ve algoritmik bir süreçtir. Bir görüntü, aslında her biri farklı ışık yoğunluğuna sahip piksellerden oluşur. Bu pikseller üzerinde yapılan işlemler, hücre yapısını ortaya çıkarabilir veya doku sınırlarını belirleyebilir.

Temel aşamalar:

1.Ön İşleme: Gürültü giderme (Gaussian/median filtre), kontrast artırma, renk standardizasyonu.

2.Bölütleme (Segmentation): Görüntüdeki anlamlı bölgelerin (örneğin hücre çekirdeği) ayrılması.

3.Özellik Çıkarımı: Şekil, renk, doku ve yoğunluk gibi ölçütlerin sayısallaştırılması.

4.Sınıflandırma: Çıkarılan özelliklerin makine öğrenimi algoritmalarıyla analiz edilerek "normal", "anormal" veya "kanserli" gibi kategorilere ayrılması. Bu süreç, mikroskopi, embriyo gelişim takip sistemleri ve histolojik kesitlerin dijitalleştirilmesinde kullanılmaktadır.

MAKİNE ÖĞRENİMİ VE GÖRÜNTÜ İŞLEME: TIBBİ EMBRİYOLOJİ VE HİSTOLOJİ ALANLARINDA UYGULAMALARI

4.Tıbbi Embriyoloji Alanında Kullanım

4.1.Embriyo Seçimi ve Kalite Değerlendirmesi

Yardımcı üreme tekniklerinde (IVF), embriyoların gelişim potansiyelinin doğru değerlendirilmesi başarı oranı için kritik öneme sahiptir. Geleneksel yöntemlerde embriyologlar, mikroskop altında morfolojik kriterlere (blastomer sayısı, fragmantasyon oranı, zona pellucida kalınlığı vb.) göre subjektif değerlendirme yapar. Makine öğrenimi tabanlı sistemler, time-lapse embriyo görüntülerini analiz ederek gelişim evrelerini otomatik tanımlar. CNN tabanlı ağlar, embriyonun simetri, hücre bölünme hızı ve blastosist oluşum zamanını değerlendirerek implantasyon potansiyelini tahmin edebilir. Bazı çalışmalarda, Convolutional Neural Network (CNN) mimarileri kullanılarak embriyolar "**yüksek canlılık potansiyeli**" veya "**düşük canlılık potansiyeli**" olarak %90'a varan doğruluk oranlarıyla sınıflandırılmıştır.

4.2.Zaman Serisi Analizi

Embriyonun gelişim süreci dinamik bir yapıya sahiptir. Recurrent Neural Network (RNN) ve LSTM (Long Short-Term Memory) modelleri, hücre bölünme zamanlamasını zamana bağlı olarak analiz eder. Böylece yapay zekâ yalnızca bir görüntüyü değil, embriyonun gelişim sürecini bir bütün olarak değerlendirebilir.

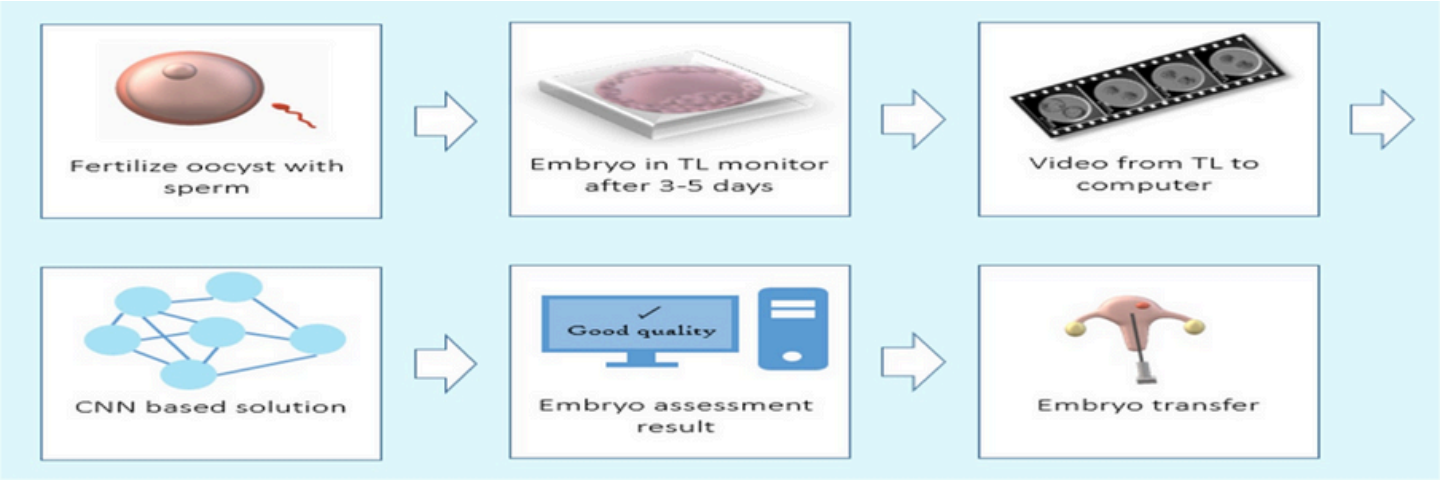
4.3. Genetik Anomali Tahmini

Yeni araştırmalarda, morfolojik verilerle genetik anomaliler arasında ilişki kuran modeller geliştirilmiştir. Örneğin, kromozomal anöploidi olasılığı, embriyo görüntülerinden dolaylı olarak tahmin edilebilmektedir. Bu yaklaşım, invaziv olmayan genetik tarama (non-invasive PGT) yöntemlerinin temelini oluşturmaktadır.

5. Histoloji Alanında Kullanım

5.1. Hücre ve Doku Sınıflandırması

Histoloji, organ ve dokuların mikroskobik yapısını inceler. Bu incelemelerde hücre tipinin belirlenmesi, patolojik değişimlerin saptanması ve doku bütünlüğünün değerlendirilmesi önemlidir. CNN tabanlı modeller, hematoksilen-eozin (H&E) boyalı görüntülerde epitel, kas, sinir veya bağ dokusu gibi farklı doku tiplerini otomatik olarak sınıflandırabilir. Örneğin, U-Net mimarisi, piksel düzeyinde segmentasyon yaparak nekroz, inflamasyon veya tümör bölgelerini ayırabilir. Bu, patoloji analizlerinde insan gözünün kaçırabileceği mikroskobik farklılıkların tespitine olanak tanır.



MAKİNE ÖĞRENİMİ VE GÖRÜNTÜ İŞLEME: TIBBİ EMBRİYOLOJİ VE HİSTOLOJİ ALANLARINDA UYGULAMALARI

5.2. Kanser Tanısı ve Derecelendirme

Makine öğrenimi, histolojik kesitlerde tümör dokusunu saptamak ve evrelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. ResNet veya EfficientNet gibi derin öğrenme ağları, meme, akciğer, karaciğer ve prostat kanseri örneklerinde yüksek doğruluk oranlarıyla tümör–sağlıklı doku ayrımı yapabilmektedir. Ayrıca yapay zekâ, histolojik derecelendirmeyi (grading) standardize ederek gözlemciden kaynaklanan farklılıkları azaltır. Böylece tanı süreci hem daha hızlı hem de daha tutarlı hale gelir.

5.3. Dijital Patoloji ve 3B Görüntü Analizi

Yüksek çözünürlüklü tarayıcılar ile elde edilen dijital histoloji görüntüleri, artık "dijital patoloji" olarak analiz edilmektedir. Makine öğrenimi algoritmaları, bu görüntülerde hücre çekirdeği yoğunluğu, doku düzeni ve morfolojik bozulmaları ölçerek otomatik raporlar oluşturabilir. Ayrıca 3 boyutlu mikroskopi teknikleriyle birleştiğinde, hücrelerin uzamsal dağılımı da incelenebilir; bu da embriyolojik gelişim aşamalarında hücre göçü ve doku farklılaşmasını anlamada önemli katkı sağlar.

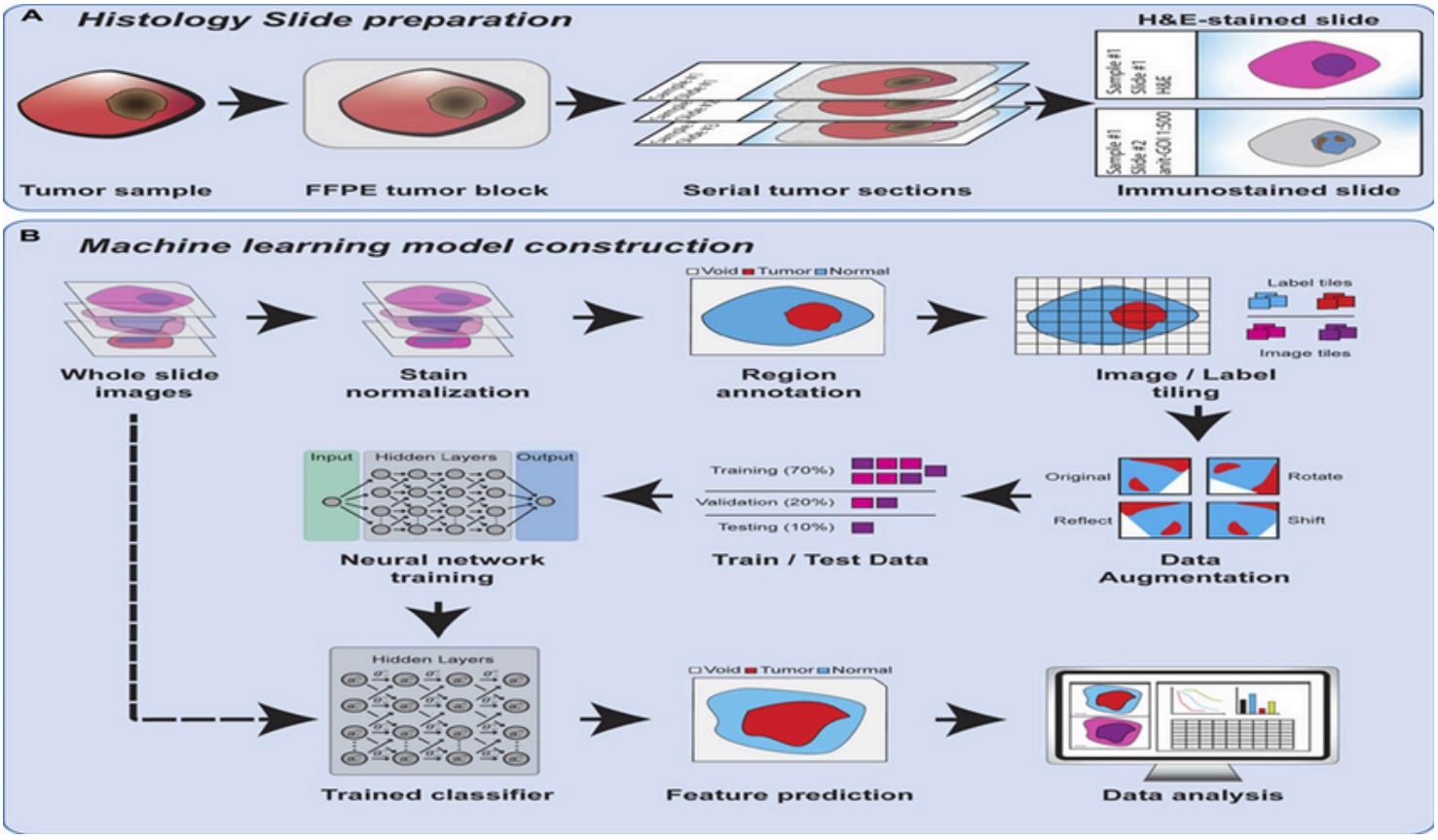
6. Avantajlar ve Sınırlılıklar

Avantajlar

- **Hız ve Otomasyon:** Binlerce hücre veya doku örneği saniyeler içinde analiz edilebilir.
- **Objektiflik:** İnsan yorumu yerine sayısal ve standart kriterlere dayalı sonuçlar elde edilir.
- **Erken Teşhis:** Mikroskobik düzeyde fark edilmeyen değişiklikler tespit edilebilir.
- **Veri Paylaşımı:** Dijitalleştirilmiş kesitler, farklı laboratuvarlar arasında kolayca paylaşılabilir.

Sınırlılıklar

- **Veri Eksikliği:** Etik nedenlerle tıbbi görüntü verilerinin paylaşımı kısıtlıdır.
- **Boyama ve Cihaz Farklılıkları:** Farklı laboratuvarlarda elde edilen görüntüler, modelin genellenebilirliğini zorlaştırabilir.
- **Etik ve Gizlilik:** Hasta verilerinin korunması (KVKK, GDPR) önemlidir.
- **Açıklanabilirlik:** Modelin hangi özelliklere dayanarak karar verdiği (XAI) klinik güvenilirlik açısından şeffaf olmalıdır.



MAKİNE ÖĞRENİMİ VE GÖRÜNTÜ İŞLEME: TIBBİ EMBRİYOLOJİ VE HİSTOLOJİ ALANLARINDA UYGULAMALARI

7. Gelecek Perspektifi

Yakın gelecekte, tıbbi embriyoloji ve histoloji alanlarında entegre yapay zekâ destekli analiz sistemleri yaygınlaşacaktır.

- Akıllı mikroskoplar, lam üzerindeki hücreleri gerçek zamanlı tanımlayıp sayabilecek.
- Embriyo takip sistemleri, canlı yayın sırasında gelişim potansiyelini tahmin edebilecek.

Dijital patoloji arşivleri, ulusal düzeyde veri paylaşımına olanak sağlayarak modellerin eğitimini hızlandıracak. Ayrıca açıklanabilir yapay zekâ (Explainable AI) yaklaşımları, algoritmik kararların görselleştirilmesini sağlayarak klinik güvenilirliği artıracaktır. Bu sayede yapay zekâ, yalnızca bir analiz aracı değil, uzmanların karar destekçisi konumuna gelecektir.

8. Sonuç

Makine öğrenimi ve görüntü işleme, tıbbi embriyoloji ve histoloji alanlarında analiz süreçlerini kökten değiştirmektedir. Hücre ve doku düzeyindeki verilerin otomatik olarak işlenmesi, hem araştırma hem de klinik uygulamalarda hız, doğruluk ve standardizasyon kazandırmaktadır. CNN, U-Net ve benzeri derin öğrenme mimarileri; embriyo seçimi, hücre sınıflandırması, tümör tespiti ve histolojik haritalama gibi görevlerde yüksek performans göstermektedir.

Ancak bu teknolojilerin güvenilir biçimde uygulanabilmesi için veri standardizasyonu, etik denetim ve açıklanabilirlik ilkeleri mutlaka gözetilmelidir. Gelecekte yapay zekâ destekli sistemler, yalnızca analiz sürecini değil; tanı, tedavi planlama ve araştırma süreçlerini de dönüştürecek; böylece biyomedikal bilimlerde insan–makine iş birliği yeni bir çağ başlatacaktır.

REFERANSLAR:

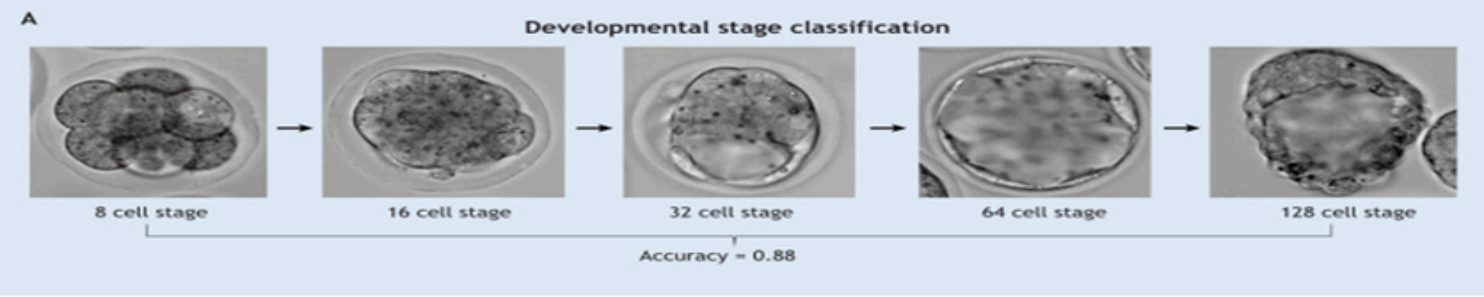
1.LeCun, Y., Bengio, Y., & Hinton, G. (2015). Deep learning. Nature, 521(7553), 436–444.

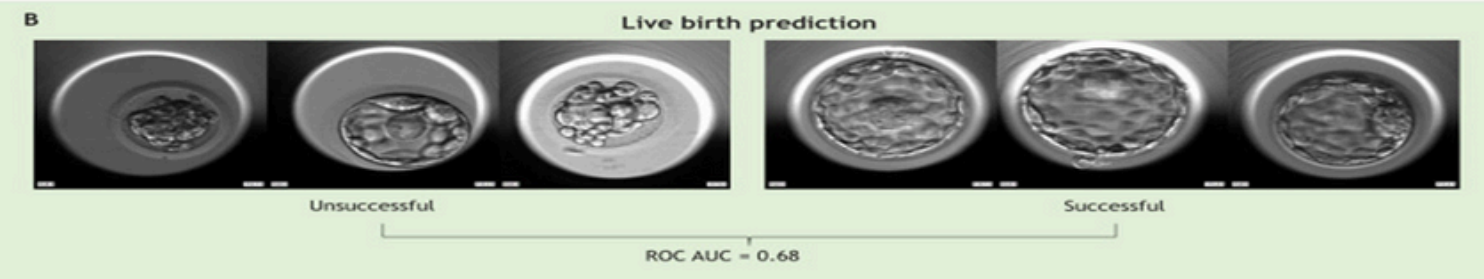
2.Ronneberger, O., Fischer, P., & Brox, T. (2015). U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI), 234–241.

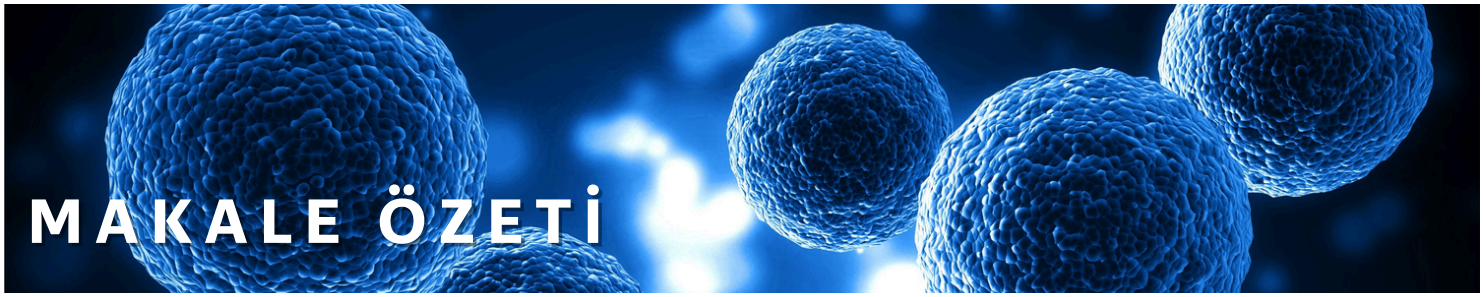
3.Litjens, G., Kooi, T., Bejnordi, B. E., et al. (2017). A survey on deep learning in medical image analysis. Medical Image Analysis, 42, 60–88.

4.Esteva, A., Robicquet, A., Ramsundar, B., et al. (2019). A guide to deep learning in healthcare. Nature Medicine, 25(1), 24–29.

5.Tran, D., Cooke, S., Illingworth, P. J., & Gardner, D. K. (2019). Deep learning as a tool for predicting embryo implantation potential. Reproductive Biomedicine Online, 38(1), 164–172.







MAKALE ÖZETİ

> Sci Rep. 2025 Jan 8;15(1):1301. doi: 10.1038/s41598-024-82630-1.

Intraovarian platelet-rich plasma injection significantly improves blastocyst yield and quality in IVF patients

Tzu-Ning Yu [1], Ming-Jer Chen [1 2 3], Tsung-Hsien Lee [1 4 5 6], Yi-Chun Chen [1], En-Hui Cheng [1], Chun-Chia Huang [1], Chung-I Chen [1], Chun-I Lee [1 5 6], Maw-Sheng Lee [1 4 5 6], Pin-Yao Lin [7]

Affiliations + expand

PMID: 39779754 PMCID: PMC11711656 DOI: 10.1038/s41598-024-82630-1

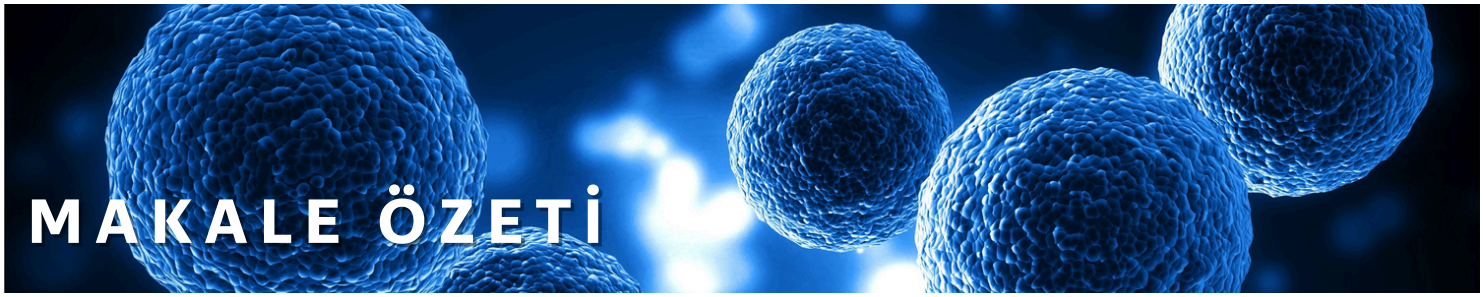
Hazırlayan:
Uzm. Dr. Tuğba YILMAZ
Afyonkarahisar Devlet Hastanesi

İNTRAOVARYAN TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (PRP) ENJEKSİYONU, IVF HASTALARINDA BLASTOKİST VERİMİNİ VE KALİTESİNİ ÖNEMLİ ÖLÇÜDE ARTIRIR

ÖZET

Bu çalışmada, daha önce kontrollü over hiper-stimülasyonu (KOH) sikluslarında embriyo kalitesi düşük olan IVF hastalarında over yanıtını ve embriyo kalitesini iyileştirmede intraovaryan trombositten zengin plazma (PRP) enjeksiyonunun etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmaya 74 hasta katılmıştır; bunlardan 30'u kontrol grubunda, 44'ü ise PRP grubunda yer almıştır. PRP, PRP grubuna foliküler fazda enjekte edilmiştir. Kontrol grubu iki KOH siklusu tamamlarken, PRP grubu PRP enjeksiyonundan önce ve sonra KOH sikluslarına girmiştir.İlk KOH siklusunda gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak ikinci KOH döngüsünde PRP grubunda önemli iyileşmeler görüldü: Döllenmiş oosit sayısı arttı (5,2 ± 3,6'ya kıyasla 3,3 ± 3,5, p = 0,011), toplam blastokist sayısı (1,7 ± 1,5'e kıyasla 0,5 ± 0,7, p < 0,0001) ve kaliteli blastokist sayısı (0,6 ± 0,8'e kıyasla 0 ± 0,2, P < 0,0001) arttı. Toplam blastokist oranı (%35 ± 31'e kıyasla %13 ± 24, p = 0,001) ve kaliteli blastokist oranı (%14 ± 22'ye kıyasla %1 ± 3, p < 0,0001) da PRP grubunda daha yüksekti. En belirgin faydalar PRP enjeksiyonundan bir-iki ay sonra KOH yapıldığında ortaya çıktı.

Anahtar Kelimeler: PRP (trombositten zengin plazma), KOH (kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu), IVF (tüp bebek), Embriyo kalitesi, Blastokist oluşumu



MAKALE ÖZETİ

GİRİŞ

Geç evliliklerin ve çocuk sahibi olma süreçlerinin artmasıyla birlikte infertilite oranı da yükselmektedir. Kadınlar yaşlandıkça over rezervleri azalmakta ve bu da daha az sayıda ve daha düşük kalitede oosite yol açmaktadır. Bu düşüş, over rezervinde azalma olan veya açıklanamayan şekilde düşük oosit ve embriyo kalitesi yaşayan genç kadınlarda daha belirginleşmektedir. Bu faktörler, yardımcı üreme teknolojileri (ART) ile bile düşük gebelik oranlarına yol açmaktadır. Canlı blastokist sayısı; özellikle "freeze-all (tamamını dondurma)" yaklaşımının, dondurulmuş embriyo transferlerinin ve aneuploidi için implantasyon öncesi genetik testlerin (PGT-A) giderek daha fazla benimsenmesiyle birlikte, ART'nin başarısında hayati bir rol oynamaktadır.

Blastokistlerin kalitesi, kaç embriyonun PGT-A ve kriyoprezervasyona tabi tutulabileceğini belirler ve gebelik oranlarını önemli ölçüde etkiler. 2016 yılında POSEIDON (Bireyselleştirilmiş Oosit Sayısını Kapsayan Hasta Odaklı Stratejiler) kılavuzunun yürürlüğe girmesinin ardından, çok sayıda araştırma çalışması, zayıf over yanıtı (POR) gösteren hastalar için ART sonuçlarını iyileştirmeye odaklanmıştır. Azalan over rezervi ve gonadotropinlere yetersiz yanıt, oosit sayısının azalmasına yol açar, bu da embriyo sayısını kısıtlar ve hem gebelik hem de kümülatif canlı doğum oranlarını düşürür. Bu nedenle, embriyo ve blastokist sayısının artırılması, ART başarısı için kritik öneme sahiptir. Oositlerde yaşa bağlı aneuploidin yanı sıra, metabolizma, mikrotübüller gibi yapısal proteinler, mitokondriyal fonksiyon ve transkripsiyon faktörleri gibi ooplazma anormallikleri de embriyo gelişimini etkiler.
Bugüne kadar, oosit ve embriyo kalitesini iyileştirmek için fiziksel aktivite, akupunktur ve testosteron, dedidroepiandrosteron (DHEA), koenzim Q10, D vitamini ve büyüme hormonu gibi ön tedavi yöntemleri de dahil olmak üzere çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak, bu çalışmaların sonuçları tutarsız olmuş ve kesin bir sonuca ulaşılamamıştır. Ayrıca, farklı protokollerin kullanılması, farklı tetikleyici ilaçların seçilmesi, embriyo kültür ortamının değiştirilmesi ve hatta otolog kök hücre nakli de farklı sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak, embriyo kalitesini iyileştirmek ve blastokist sayısını artırmak için yeterli kanıta sahip bir yöntem şu anda bulunmamaktadır.

Hastanın kanından elde edilen trombositten zengin plazma (PRP), 4-5 kat daha yüksek trombosit konsantrasyonuna sahiptir ve 800'den fazla protein, sitokin ve büyüme faktörü içerir. Bu faktörler hücre farklılaşmasını, çoğalmasını, göçünü ve anjiyogenezi uyararak doku rejenerasyonunu destekleyebilir. PRP, ortopedi, oftalmoloji, cerrahi, yara iyileşmesi ve cinsel işlev bozukluğu ve pelvik taban bozukluklarının tedavisi de dahil olmak üzere kadın doğum ve jinekolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha önceki araştırmalarımız, PRP'nin intrauterin infüzyon ve histeroskopik enjeksiyon yoluyla uygulanmasının endometriyal kalınlığı artırdığını ve gebelik sonuçlarını iyileştirdiğini göstermiştir.

Çeşitli çalışmalar, PRP'nin doğrudan POR'lu hastaların overlerine enjekte edilmesinin, toplanan oosit sayısını artırdığını, embriyo kalitesini iyileştirdiğini ve daha yüksek gebelik oranlarına yol açtığını göstermiştir. Ancak, bu çalışmalar PRP'nin blastokist sayısını artırıp artıramayacağını değerlendirmemiştir. Bu nedenle, bu çalışma, over içine PRP enjeksiyonunun blastokist oranını artırıp artıramayacağını araştırmayı amaçlamaktadır. Birincil çıktılar toplam ve iyi kalitede blastokist sayısı, ikincil çıktılar ise toplam ve iyi kalitede blastokist oranlarıdır.

Hasta Özellikleri

Bu araştırmaya 74 katılımcı katılmış olup, kontrol grubunda 30, PRP grubunda ise 44 hasta yer almıştır. Kontrol ve PRP gruplarındaki hastaların ortalama yaşları sırasıyla 39,8 ± 3,2 ve

40,2 ± 3,2 yıldı (p = 0,918). Gruplar arasında partner yaşı, vücut kitle indeksi (VKİ), anti-Müllerian hormon (AMH) seviyeleri, infertilite süresi, daha önceki toplam tüp bebek siklusları veya infertilite nedenleri açısından belirgin bir farklılık görülmemiştir (hepsi p > 0,05) (bkz. **Tablo 1**).

Gereç ve Yöntemler

Hasta Seçimi

Bu çalışma prospektif bir vaka-kontrol çalışmasıydı. Temmuz 2020 ile Ocak 2024 tarihleri arasında Tayvan, Taichung'daki Lee Kadın Hastanesi'nde PGT-A için kontrollü over hiperstimülasyonu (KOH) uygulanan bireyler çalışmaya dahil edilmek üzere değerlendirildi. Her katılımcı, iyi kalitede herhangi bir blastokist üretmeden en az iki KOH ve PGT-A döngüsü geçirmişti. Kapsamlı bir tartışma ve açıklamanın ardından, hastalar intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılıp yapılmayacağına karar vermek zorundaydı. Gardner derecelendirme sistemine göre, iyi kalitede bir blastokist, AA, AB, BA ve BB derecelerine sahip genişlemiş bir blastokist olarak tanımlanır. Dışlama kriterleri arasında endometriozis, 20 yaşın altında olmak, trombosit sayısı 150.000/μL'nin altında olan kan hastalıkları veya hemoglobin seviyesi 11 g/dL'nin altında olan anemi yer alıyordu. PGT-A'nın nedenleri arasında ileri anne yaşı, tekrarlayan düşükler ve embriyo implantasyonunda tekrarlayan başarısızlıklar yer almaktadır.

Etik Beyanlar

Chung Shan Tıp Üniversitesi Hastanesi Kurumsal İnceleme Kurulu (CS2-20,037) bu araştırmayı onaylamış ve tüm katılımcılar çalışmaya katılmak için yazılı onam vermiştir. Tüm yöntemler ilgili kılavuz ve düzenlemelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Otolog Trombositten Zengin Plazma (PRP) Hazırlığı ve İntraovaryan Enjeksiyon

PRP, antikoagülan içermeyen 60 mL tam kan ile iki Acti-PRP tüpüne (Aeon Biotherapeutics Corp., Taipei, Tayvan) açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Foliküler faz sırasında, PRP intravenöz anestezi altında her iki overe enjekte edilmiştir. Trans-vajinal ultrasonografi kılavuzluğunda, tek lümenli bir oosit aspirasyon iğnesi (18GA, Kitazato; Fuji, Japonya) kullanılarak her bir overin korteksine dört farklı noktadan 1 mL PRP enjekte edilmiştir.

Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyonu (KOH) Rejimi

Bu araştırmada, medroksiprogesteron asetat (Provera®; Pfizer, Milano, İtalya) kullanılarak progestinle hazırlanmış over stimülasyonu (PPOS) uygulandı. Follitropin alfa (Gonal-f®; Merck-Sereno, Darmstadt, Almanya) ve hMG (Menopur®; Ferring, Pymble, NSW, Avustralya), adet döngüsünün ikinci veya üçüncü gününden itibaren verilmeye başlandı ve öncü foliküller 17 mm boyutuna ulaşana kadar devam edildi. Son oosit olgunlaşması, rekombinant insan koryonik gonadotropini (hCG) (Ovidrel®; Merck-Sereno, Darmstadt, Almanya) ve triptorelin (Decapeptyl®; Ferring, Pymble, NSW, Avustralya) kullanılarak tetiklendi ve oosit toplama işlemi 34-36 saat sonra gerçekleşti.

Embriyo kültürü, biyopsi ve aneuploidi için implantasyon öncesi genetik test (PGT-A)

Oosit ve embriyoların bakımı için %5 oksijen, %5 karbondioksit ve %90 azot içeren, 37°C'ye ayarlanmış üç gazlı bir inkübatör kullanıldı. Döllenme, sperm kalitesine bağlı olarak geleneksel tohumlama veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile sağlandı. Embriyolar ilk olarak bölünme medyumunda (Quinn's Advantage™, SAGE Biopharma®; Cambridge, MA, ABD) büyütüldü ve döllenmeden yaklaşık 70-72 saat sonra blastokist medyumuna (Quinn's Advantage™, SAGE Biopharma®; Cambridge, MA, ABD) aktarıldı. Embriyoları değerlendirmek için Gardner derecelendirme sistemi kullanıldı ve yalnızca AA, AB, AC, BA, BB, BC, CA veya CB derecelerine sahip genişletilmiş blastokistler PGT-A için seçildi. PGT-A prosedürü, önceki çalışmaya oldukça benzemektedir. Biyopsi alınan blastokistler, Cryotech sistemi (Cryotech®; Tokyo, Japonya) kullanılarak vitrifiye edilmiştir. İki deneyimli teknisyen, blastokistleri mozaisizm seviyelerine bağlı olarak öploid, mozaik ve aneuploid blastokistler olmak üzere üç gruba ayırmak için BlueFuse Multi Yazılımını (Illumina,

San Diego, CA, ABD) kullanmıştır.

Dondurulmuş embriyo transferi (FET) için endometriyal hazırlık

Bu çalışmada, daha önce açıklandığı gibi hormon replasman tedavisi (HRT) kullanılmıştır. Hastalar, adet döngüsünün ikinci ila üçüncü gününden döngünün 11-13. gününe kadar oral estradiol valerat (Estrade®, Synmosa, Taipei, Tayvan) almaya başlamış ve endometriyal (EM) kalınlıkları transvajinal ultrasonografi ile kontrol edilmiştir.

EM üç katmanlı desene sahip olduğunda ve EM kalınlığı 7 mm'nin üzerinde olduğunda, günde üç kez 10 mg oral didrogesteron (Duphaston®, Abbott, Hong Kong, Çin) ve günde iki kez vajinal progesteron jeli (Crinone®, Merck-Serono, Darmstadt, Almanya) verildi. Embriyolar 5 gün sonra transfer edildi ve bu çalışmada yalnızca öploid ve mozaik embriyolar transfer için seçildi. İptal kriterleri, EM kalınlığının 7 mm'den az olması, intrauterin sıvı varlığı, progesteron uygulamasından önce progesteron seviyelerinin 1,5 ng/mL'yi aşması, herhangi bir hasta rahatsızlığı olması veya hastanın iptal talep etmesiydi.

Sonuçların Ölçümü

Olgunlaşma oranı, metafaz II (MII) oosit sayısının toplanan toplam oosit sayısına bölünmesiyle hesaplandı. Döllenme oranı, iki pronükleer (2PN) zigot sayısının, döllenen MII oosit sayısına bölünmesiyle hesaplandı. Toplam blastokist oranı, kalitelerine bakılmaksızın tüm blastokistlerin toplam sayısının 2PN zigot sayısına bölünmesiyle hesaplandı. İyi kalitede blastokist oranı, iyi kalitede blastokist sayısının 2PN zigot sayısına bölünmesiyle hesaplandı. İyi kalitede blastokistler genişlemiş ve AA, AB, BA veya BB (≥ 4BB) olarak derecelendirilmiş olarak karakterize edildi. PRP enjeksiyonundan önceki ve sonraki verileri dikkate alarak hem kontrol hem de PRP gruplarında KOH sonuçlarını inceledik. Ayrıca, PRP enjeksiyonundan bir, iki ve üç ay sonra başlatılan KOH döngülerinin sonuçlarını analiz ettik ve bunları enjeksiyon öncesi sonuçlarla karşılaştırarak PRP uygulama zamanlamasının sonuçları etkileyip etkilemediğini değerlendirdik. Ek olarak, intraovaryan PRP enjeksiyonunun etkilerinin devam edip etmediğini belirlemek için PRP enjeksiyonunu takiben iki ardışık KOH döngüsünün sonuçlarını inceledik.

Gebelik oranı, serum β-HCG düzeyleri 100 mIU/mL'nin üzerinde olan kadın sayısının embriyo transferi yapılan toplam kadın sayısına bölünmesiyle hesaplandı.İmplantasyon oranı, gebelik kesesi sayısının transfer edilen embriyo sayısına bölünmesiyle hesaplandı. Düşük, 24 haftaya ulaşmadan gebeliğin kaybı olarak tanımlanırken, canlı doğum, 24 haftadan sonra canlı bir bebeğin tam doğumu olarak tanımlandı.

Veri Analizi

Veri analizi, SPSS yazılım sürümü 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. < 0,05 p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma olarak sunulurken, kategorik değişkenler sıklık ve yüzde olarak ifade edildi. Verilerdeki varyasyonlar Mann-Whitney U testi, Wilcoxon İşaretli Sıra testi ve/veya ANOVA kullanılarak değerlendirildi. Kategorik değişkenler için ki-kare testi uygulandı.

İlk Kontrollü Ovaryan Hiperhiperstimülasyonu

Her iki grup da ilk KOH döngüsünü ve oosit toplama işlemini gerçekleştirdi. Bu aşamada, bazal FSH, LH ve E2 seviyeleri, stimülasyon günü sayısı, toplam gonadotropin dozu, toplanan ve döllenen oosit sayısı veya toplam ve kaliteli blastokist sayısı açısından kontrol ve PRP grupları arasında belirgin bir fark gözlenmedi (hepsi p > 0,05). Olgunlaşma ve döllenme oranları ile toplam ve kaliteli blastokist oranları gruplar arasında benzerdi (**Tablo 2**).

İkinci Kontrollü Ovaryan Hiperhiperstimülasyonu

Foliküler fazda intraovaryan PRP enjeksiyonu uygulandıktan sonra, PRP grubundaki hastalar aynı protokol kullanılarak ikinci bir KOH döngüsüne girdi. PRP enjeksiyonu ile ikinci oosit toplama arasındaki ortalama süre 41,1 ± 16,7 (aralığı: 11-82 gün) idi. Kontrol grubu PRP enjeksiyonu almadı ve doğrudan ikinci KOH döngüsüne geçti. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ikinci KOH döngüsünden sonra PRP grubunda be-

lirgin iyileşmeler kaydedildi. PRP grubunda, kontrol grubuna (3,3 ± 3,5) kıyasla belirgin şekilde daha fazla döllenmiş oosit sayısı (5,2 ± 3,6) vardı ve p değeri 0,011 idi. Ayrıca, PRP grubunda daha fazla toplam blastokist sayısı (1,7 ± 1,5'e karşı 0,5 ± 0,7, p < 0,0001) ve iyi kalitede blastokist (0,6 ± 0,8'e karşı 0 ± 0,2, p < 0,0001) görüldü. Toplam blastokist oranı (%35 ± 31 - %13 ± 24, p = 0,001) ve iyi kalitede blastokist oranı (%14 ± 22 - %1 ± 3, p < 0,0001) da PRP grubunda anlamlı şekilde artmıştı (**Tablo 3**).

Tablo 1. Hasta özellikleri. AMH, anti-Müllerian hormon; BKİ, vücut kitle indeksi; PRP, trombositten zengin plazma.

	Control group (n = 30)	PRP group (n = 44)	*P* value
Age (years)	39.8 ± 3.2 (30–42)	40.2 ± 3.2 (32–45)	0.918
Partner age (years)	41.4 ± 3.6 (33–49)	41.1 ± 5.1 (31–55)	0.695
BMI (kg/m^2)	23.0 ± 3.6 (18–33)	22.1 ± 3.9 (15–37)	0.328
AMH (ng/mL)	2.0 ± 1.8 (0.3–7.3)	1.9 ± 1.3 (0.1–5.4)	0.245
Infertility duration (years)	3.2 ± 2.9 (0.5–10.6)	2.6 ± 2.2 (0.5–8.0)	0.323
Previous IVF cycles (n)	5.7 ± 4.8 (2–18)	4.3 ± 3.5 (2–18)	0.239
Platelet count (10^3/μL)	291.9 ± 49.6 (210–396)	276.4 ± 60.1 (164–433)	0.228
Etiology of infertility (n)			
Male factor	0	2	
Female factor	10	14	
Mixed factor	20	28	

Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. Parantez içindeki değerler minimum ve maksimum değerleri temsil etmektedir. P değerleri Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 2. İlk kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunun sonuçları.

	Control group (n = 30)	PRP group (n = 44) (before PRP injection)	*P* value
Basal FSH (mIU/mL)	7.7 ± 3.7 (2.6–15.1)	7.4 ± 3.4 (1.1–20.8)	0.982
Basal LH (mIU/mL)	3.3 ± 1.9 (0.2–8.7)	3.1 ± 1.9 (0.2–8.2)	0.692
Basal E_2 (pg/mL)	53.9 ± 29.0 (20–151)	54.6 ± 24.8 (20–131)	0.593
Stimulation days (n)	13.5 ± 1.4 (12–16)	13.3 ± 1.0 (12–16)	0.697
Total gonadotropin dosage (IU)	2692 ± 595 (1800–4200)	2555 ± 449 (1275–3825)	0.880
Retrieved oocytes (n)	7.5 ± 5.0 (4–24)	9.0 ± 4.2 (4–20)	0.060
Matured oocytes (n)	5.3 ± 3.8 (0–20)	6.6 ± 3.7 (2–15)	0.060
Fertilized oocytes (n)	3.7 ± 2.5 (0–14)	4.8 ± 3.1 (0–12)	0.100
Total blastocysts (n)	0.4 ± 0.6 (0–2)	0.6 ± 0.8 (0–3)	0.386
Good quality blastocysts (n)	0 ± 0	0 ± 0	
Maturation rate (%)	73 ± 18 (0–100)	73 ± 22 (18–100)	0.596
Fertilization rate (%)	71 ± 25 (0–100)	72 ± 25 (0–100)	0.982
Total blastocyst rate (%)	12 ± 19 (0–67)	16 ± 24 (0–100)	0.560
Good quality blastocyst rate (%)	0 ± 0	0 ± 0	

Tablo 3. İkinci kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunun sonuçları.

	Control group (n = 30)	PRP group (n = 44) (after PRP injection)	*P* value
Days between PRP injection and OPU (n)		41.4 ± 16.7 (11–82)	
Basal FSH (mIU/mL)	7.4 ± 3.3 (1.9–14.3)	6.7 ± 3.0 (0.8–15.8)	0.538
Basal LH (mIU/mL)	2.8 ± 2.0 (0.6–7.4)	2.9 ± 1.7 (0.2–7.4)	0.956
Basal E_2 (pg/mL)	58.9 ± 22.6 (20–110)	56.0 ± 29.7 (20–145)	0.163
Stimulation days (n)	13.7 ± 2.0 (10–22)	13.5 ± 1.0 (11–16)	0.663
Total gonadotropin dosage (IU)	2636 ± 745 (750–4245)	2651 ± 422 (1500–3750)	0.640
Retrieved oocytes (n)	6.7 ± 5.6 (0–26)	9.5 ± 5.7 (0–27)	0.056
Matured oocytes (n)	4.9 ± 4.8 (0–21)	6.7 ± 4.2 (0–20)	0.053
Fertilized oocytes (n)	3.3 ± 3.5 (0–13)	5.2 ± 3.6 (0–14)	0.011
Total blastocysts (n)	0.5 ± 0.7 (1–2)	1.7 ± 1.5 (0–6)	< 0.0001
Good quality blastocysts (n)	0.0 ± 0.2 (0–1)	0.6 ± 0.8 (0–3)	< 0.0001
Maturation rate (%)	63 ± 31 (0–100)	69 ± 25 (0–100)	0.303
Fertilization rate (%)	67 ± 30 (0–100)	74 ± 27 (0–100)	0.109
Total blastocyst rate (%)	13 ± 24 (0–100)	35 ± 31 (0–100)	0.001
Good quality blastocyst rate (%)	1 ± 3 (0–17)	14 ± 22 (0–100)	< 0.0001

Veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak sunulmuştur. Parantez içindeki değeler minimum ve maksimum değerleri temsil etmektedir. P değerleri Wilcoxon işaretli sıra testi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4. Kontrol grubunda birinci ve ikinci kontrollü over hiperstimülasyonunun sonuçları.

N = 30	First COH	Second COH	*P* value
Basal FSH (mIU/mL)	7.7 ± 3.7 (2.6–15.1)	7.4 ± 3.3 (1.9–14.3)	0.644
Basal LH (mIU/mL)	3.3 ± 1.9 (0.2–8.7)	2.8 ± 2.0 (0.6–7.4)	0.077
Basal E_2 (pg/mL)	53.9 ± 29.0 (20–151)	58.9 ± 22.6 (20–110)	0.076
Stimulation days (n)	13.5 ± 1.4 (12–16)	13.7 ± 2.0 (10–22)	0.772
Total gonadotropin dosage (IU)	2692 ± 595 (1800–4200)	2636 ± 745 (750–4245)	0.871
Retrieved oocytes (n)	7.5 ± 5.0 (4–24)	6.7 ± 5.6 (0–26)	0.265
Matured oocytes (n)	5.3 ± 3.8 (0–20)	4.9 ± 4.8 (0–21)	0.507
Fertilized oocytes (n)	3.7 ± 2.5 (0–14)	3.3 ± 3.5 (0–13)	0.285
Total blastocysts (n)	0.4 ± 0.6 (0–2)	0.5 ± 0.7 (1–2)	0.870
Good quality blastocysts (n)	0 ± 0	0 ± 0.2 (0–1)	0.317
Maturation rate (%)	73 ± 18 (0–100)	63 ± 31 (0–100)	0.353
Fertilization rate (%)	71 ± 25 (0–100)	67 ± 30 (0–100)	0.121
Total blastocyst rate (%)	12 ± 19 (0–67)	13 ± 24 (0–100)	0.812
Good quality blastocyst rate (%)	0 ± 0	1 ± 3 (0–17)	0.317

Tablo 5. PRP grubunda birinci ve ikinci kontrollü over hiperstimülasyonunun sonuçları.

N = 44	Before PRP injection	After PRP injection	*P* value
Days between PRP injection and OPU (n)		41.4 ± 16.7 (11–82)	
Basal FSH (mIU/mL)	7.4 ± 3.4 (1.1–20.8)	6.7 ± 3.0 (0.8–15.8)	0.313
Basal LH (mIU/mL)	3.1 ± 1.9 (0.2–8.2)	2.9 ± 1.7 (0.2–7.4)	0.499
Basal E_2 (pg/mL)	54.6 ± 24.8 (20–131)	56.0 ± 29.7 (20–145)	0.767
Stimulation days (n)	13.3 ± 1.0 (12–16)	13.5 ± 1.0 (11–16)	0.216
Total gonadotropin dosage (IU)	2555 ± 449 (1275–3825)	2651 ± 422 (1500–3750)	0.427
Retrieved oocytes (n)	9 ± 4.2 (4–20)	9.5 ± 5.7 (0–27)	0.541
Matured oocytes (n)	6.6 ± 3.7 (2–15)	6.7 ± 4.2 (0–20)	0.378
Fertilized oocytes (n)	4.8 ± 3.1 (0–12)	5.2 ± 3.6 (0–14)	0.349
Total blastocysts (n)	0.6 ± 0.8 (0–3)	1.7 ± 1.5 (0–6)	<0.0001
Good quality blastocysts (n)	0 ± 0	0.6 ± 0.8 (0–3)	<0.0001
Maturation rate (%)	73 ± 22% (18–100)	69 ± 25% (0–100)	0.494
Fertilization rate (%)	72 ± 25% (0–100)	74 ± 27% (0–100)	0.451
Total blastocyst rate (%)	16 ± 24% (0–100)	35 ± 31% (0–100)	0.001
Good quality blastocyst rate (%)	0 ± 0%	14 ± 22% (0–100)	<0.0001

Veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak sunulmuştur. Parantez içindeki değeler minimum ve maksimum değerleri temsil etmektedir. P değerleri Wilcoxon işaretli sıra testi kullanılarak hesaplanmıştır.

Gruplar arası karşılaştırma

Kontrol grubu, birinci ve ikinci KOH döngülerinin sonuçlarında belirgin bir fark olmadığından tutarlı bir over yanıtı gösterdi (bkz. **Tablo 4**). Bununla birlikte, PRP grubunda, PRP enjeksiyonunu takip eden ikinci KOH döngüsü, toplam blastokist sayısı (p < 0,0001) ve iyi kalitede blastokist sayısı (p < 0,0001), toplam blastokist oranı (p = 0,001) ve iyi kalitede blastokist oranı (p < 0,0001) açısından birinci KOH döngüsüne göre önemli gelişmeler gösterdi (bkz. **Tablo 5**).

PRP enjeksiyonu ile sonraki KOH döngüsü arasındaki süre

PRP enjeksiyonu ile sonraki KOH döngüsü arasındaki süre, sonuçları önemli ölçüde etkiledi. PRP enjeksiyonundan bir ve iki ay sonra KOH sikluslarına giren hastalar, toplam blastokist ve iyi kalitede blastokist sayısında ve toplam ve iyi kalitede blastokist oranlarında kayda değer iyileşmeler gösterdi. Ancak, enjeksiyondan üç ay sonra KOH uygulanan hastalarda, sonuçlar enjeksiyon öncesi sonuçlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi (**Tablo 6**).

PRP grubunda 30 hasta, PRP enjeksiyonundan sonra ardışık iki KOH siklusu aldı. Enjeksiyondan sonraki ilk KOH siklusunda, PRP enjeksiyonundan oosit toplanmasına kadar genellikle 38,7 ± 17,5 gün süren süreçte, toplam blastokist ve iyi kalitede blastokist sayısında ve toplam ve iyi kalitede blastokist oranlarında kayda değer artışlar görüldü.

Bununla birlikte, enjeksiyondan sonraki ikinci KOH döngüsünde, yani PRP enjeksiyonundan oosit toplanmasına kadar geçen 78 ± 28,2 günde, enjeksiyon öncesi sonuçlara kıyasla gözlemlenebilir bir iyileşme eğilimi vardı, ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi (bkz. **Tablo 7**).

Birinci KOH döngüsü ile ikinci KOH döngüsündeki iyi kalitede blastosist sayısı arasındaki fark bp = 0,017'dir. Birinci KOH döngüsü ile ikinci KOH döngüsündeki toplam blastosist oranı arasındaki fark cp = 0,029'dur. Birinci KOH döngüsü ile ikinci KOH döngüsündeki iyi kalitede blastosist oranı arasındaki fark dp = 0,04'tür. Veriler ortalama ± SS olarak sunulmuştur. Parantez içindeki değerler minimum ve maksimum değerleri temsil etmektedir. P değerleri Friedman iki yönlü ANOVA kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 6. PRP enjeksiyonu ve kontrollü over hiperstimülasyonu arasındaki farklı zaman aralıklarının sonuçları.

	Before PRP injection	COH performed one month after PRP injection	*P* value	Before PRP injection	COH performed two months after PRP injection	*P* value	Before PRP injection	COH performed three months after PRP injection	*P* value
	N = 12			N = 28			N = 4		
Days between PRP injection and OPU (n)		23.3 ± 6.4 (11–31)			42.4 ± 8.1 (32–59)			74.5 ± 4.7 (70–82)	
Retrieved oocytes (n)	7.4 ± 3.5 (4–14)	5.9 ± 3.4 (0–12)	0.211	9.4 ± 4.4 (4–20)	9.1 ± 5.0 (2–18)	0.767	11.0 ± 3.4 (7–16)	12.3 ± 3.4 (9–18)	0.461
Matured oocytes (n)	5.6 ± 3.5 (2–13)	4.8 ± 3.2 (0–12)	0.474	6.8 ± 3.9 (2–15)	6.2 ± 3.7 (1–15)	0.411	8.3 ± 1.8 (6–11)	8.5 ± 1.1 (7–10)	0.713
Fertilized oocytes (n)	3.9 ± 3.1 (1–12)	3.5 ± 2.5 (0–9)	0.572	4.9 ± 3.1 (0–11)	4.9 ± 3.4 (0–13)	0.858	6.5 ± 1.7 (4–8)	7.0 ± 0.7 (6–8)	0.655
Total blastocysts (n)	0.3 ± 0.6 (0–2)	1.4 ± 1.3 (0–4)	0.028	0.8 ± 0.8 (0–3)	1.8 ± 1.7 (0–6)	0.007	1.0 ± 1.0 (0–2)	1.8 ± 1.3 (1–4)	0.257
Good quality blastocysts (n)	0 ± 0	0.4 ± 0.9 (0–3)	0.102	0 ± 0	0.6 ± 0.8 (0–2)	0.001	0 ± 0	0.8 ± 0.4 (0–1)	0.083
Maturation rate (%)	73 ± 22 (33–100	67 ± 34 (0–100)	0.594	72 ± 22 (18–100)	70 ± 21 (33–100)	0.709	79 ± 17 (50–92)	73 ± 17 (50–91)	0.285
Fertilization rate (%)	72 ± 27 (20–100)	61 ± 33 (0–100)	0.722	72 ± 24 (0–100)	78 ± 24 (0–100)	0.231	81 ± 21 (50–100)	83 ± 4 (78–88)	0.715
Total blastocyst rate (%)	5 ± 12 (0–33)	33 ± 28 (0–80)	0.012	21 ± 27 (0–100)	40 ± 33 (0–100)	0.021	19 ± 21 (0–50)	24 ± 15 (14–50)	0.715
Good quality blastocyst rate (%)	0 ± 0	21 ± 2 (0–80)	0.028	0 ± 0	16 ± 24 (0–100)	0.001	0 ± 0	11 ± 7 (0–17)	0.102

Tablo 7. PRP grubunda birinci ve ikinci kontrollü over hiperstimülasyonunun sonuçları.

N = 30	Before PRP injection	First COH after PRP injection	Second COH after PRP injection	*P* value
Days between PRP injection and OPU (n)		38.7 ± 17.5 (11–81)	78.0 ± 28.2 (31–167)	
Basal FSH (mIU/mL)	7.6 ± 3.7 (2.2–20.8)	6.4 ± 3.2 (0.8–15.8)	6.3 ± 3.9 (0.8–16.9)	0.381
Basal LH (mIU/mL)	3.2 ± 1.9 (0.9–6.7)	2.5 ± 1.5 (0.2–7.4)	2.3 ± 1.4 (0.2–5.9)	0.249
Basal E_2 (pg/mL)	51.5 ± 23.6 (20–118)	62.2 ± 31.4 (20–145)	60.3 ± 36.6 (20–177)	0.758
Stimulation days (n)	13.2 ± 0.8 (12–15)	13.3 ± 1.0 (11–15)	14.1 ± 2.6 (11–26)	0.070
Total gonadotropin dosage (IU)	2578 ± 268 (1800–3225)	2683 ± 288 (2175–3225)	2688 ± 611 (900–3900)	0.122
Retrieved oocytes (n)	8.5 ± 3.9 (4–16)	8.2 ± 5.4 (0–21)	8.8 ± 5.0 (0–21)	0.361
Matured oocytes (n)	6.6 ± 3.7 (2–15)	6.0 ± 4.1 (0–15)	6.7 ± 4.2 (0–16)	0.385
Fertilized oocytes (n)	4.7 ± 3.0 (1–12)	4.7 ± 3.6 (0–14)	5.0 ± 3.5 (0–15)	0.558
Total blastocysts (n)	0.6 ± 0.9 (0–3)[a]	1.5 ± 1.4 (0–6)[a]	1.2 ± 1.1 (0–4)	0.048
Good quality blastocysts (n)	0 ± 0[b]	0.5 ± 0.8 (0–3)[b]	0.3 ± 0.5 (0–2)	< 0.0001
Maturation rate (%)	75 ± 20 (33–100)	69 ± 27 (33–100)	72 ± 23 (20–100)	0.404
Fertilization rate (%)	74 ± 24 (17–100)	72 ± 30 (0–100)	73 ± 25 (0–100)	0.991
Total blastocyst rate (%)	13 ± 20 (0–67)[c]	34 ± 31 (0–100)[c]	21 ± 20 (0–67)	0.017
Good quality blastocyst rate (%)	0 ± 0[d]	12 ± 25 (0–100)[d]	5 ± 8 (0–25)	< 0.0001

Veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak sunulmuştur. Parantez içindeki değeler minimum ve maksimum değerleri temsil etmektedir. P değerleri Wilcoxon işaretli sıra testi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablonun en sağ tarafındaki p değeri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir. $p < 0,05$ olduğunda, farklı gruplar arasındaki ortalama değerler arasında anlamlı bir fark olduğu, yani en az bir grubun ortalamasının diğerlerinden farklı olduğu anlamına gelir. Daha sonra, gruplar arasındaki farkları değerlendirmek için gruplar içinde ikili karşılaştırmalar yapılır. $p < 0,05$ olduğunda, iki grup arasındaki ortalama değerler arasında anlamlı bir fark olduğu anlamına gelir ve farklı değerlerin sağ üst köşesinde küçük harflerle gösterilir.

PGT-A sonuçları ve gebelik sonuçları

Kontrol grubunda, iki hastanın her birinde ikinci KOH döngüsünden sonra PGT-A için birer blastokist mevcuttu. Bu blastokistlerden biri öploiddi ve transferden sonra gebeliğe yol açtı, ancak canlı doğum olmadan erken düşükle sonuçlandı. PRP grubunda ise, PRP enjeksiyonları uygulandıktan sonra, 22 hastada ilk KOH döngüsünden sonra PGT-A için blastokist mevcuttu. Toplam 34 blastokist test edildi ve öploidi oranı %17,6 (6/34) ve mozaik oranı %20,6

(7/34) olarak bulundu. PRP grubunda, dokuz hastaya hem öploid hem de mozaik embriyolar içeren embriyo transferleri uygulandı ve kişi başına ortalama 1,6 ± 0,7 embriyo transfer edildi. 7 kişi gebe kaldı ve gebelik oranı %29 oldu.

Tartışma

Bildiğimiz kadarıyla bu, en az iki IVF girişiminde kaliteli blastokist üretemeyen hastalarda over içi PRP enjeksiyonlarının kullanımını ve blastokistlerin hem niceliğini hem de kalitesini iyileştirme potansiyelini araştıran ilk çalışmadır. Bulgularımız, doğrudan overlere uygulanan PRP enjeksiyonlarının bu hastalarda over yanıtını ve embriyo kalitesini önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir. Bu, toplam blastokist sayısında, kaliteli blastokist sayısında, toplam blastokist oranında ve KOH sonrası kaliteli blastokist oranında bir artışı içerir.

KOH, PRP enjeksiyonundan bir ve iki ay sonra yapıldığında önemli iyileşmeler gözlenmiştir. Ardışık KOH siklusları da iyileşme gösterse de, PRP enjeksiyonundan sonraki ikinci siklus istatistiksel anlamlılığa ulaşmadan yalnızca bir iyileşme eğilimi göstermiştir.

PRP'nin over yanıtını ve embriyo kalitesini iyileştirmedeki etkinliğinin altında yatan mekanizmalar, muhtemelen PDGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin zengin konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu faktörler, anjiyogenezi teşvik eder ve ardından foliküler büyümenin tüm aşamalarında folikülogenezi artırır ve doğum sonrası oogenezise ulaşan oogonial kök hücrelerin (OSC'ler) yeni primordial foliküller oluşturmasını uyarır. Ancak, overlerde OSC'lerin varlığı hala tartışma konusudur ve fikir birliği yoktur.

2017'de Hosseini ve ark., PRP'nin izole insan primordial ve primer foliküllerinin büyümesini ve bunların preantral foliküllere dönüşümünü destekleyebileceğini göstermiştir. Pantos ve ark., 2018'de PRP'nin sekiz perimenopozal kadının bilateral overlerine transvajinal olarak enjekte edildiği deneysel bir çalışma açıklamıştır. 1-3 ay sonra, overler kendiliğinden folikül geliştirmiş ve tüm hastalardan başarılı bir oosit toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Pantos ve arkadaşları, menopozdaki üç kadının overlerine PRP enjekte ettiler ve üç kadının da enjeksiyondan bir ila iki ay sonra adet gördüğünü buldular.

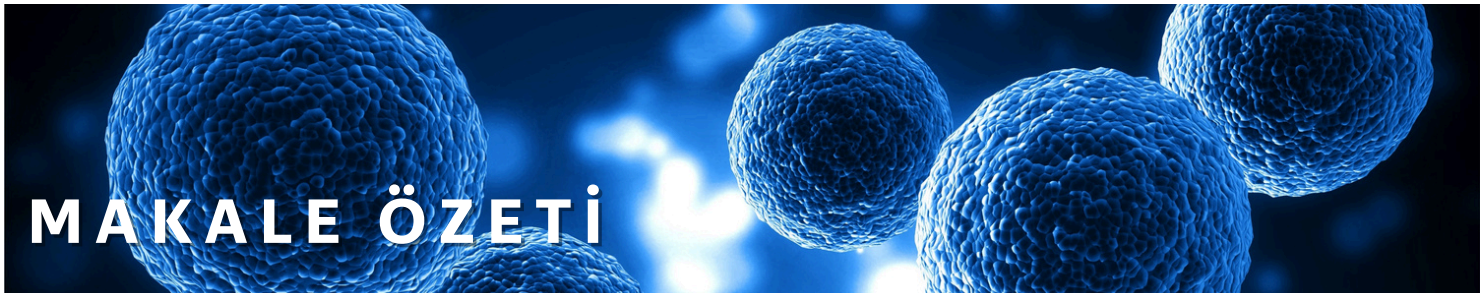
Altı ay içinde üç kadın da doğal yollarla gebe kaldı ve bu da over içine uygulanan PRP enjeksiyonunun folikül büyümesini destekleyebileceğini ve doğal yumurtlama fonksiyonunu geri kazandırabileceğini gösterdi. PRP'deki büyüme faktörlerinin over dokusu yenilenmesini desteklemede anahtar faktörler olduğuna inanılıyordu. 2018 yılında Sills ve arkadaşları, ortalama yaşı 42 ± 4 olan dört POR hastasına over içine PRP enjeksiyonu uyguladılar. 59-110 gün sonra IVF gerçekleştirildi ve her hasta dondurma için en az bir blastokist elde etti. Melo ve arkadaşları, PRP'nin doğrudan overlere enjekte edilmesinin preantral foliküllerin büyümesini destekleyebileceğini veya atrezilerini durdurabileceğini ve bunun IVF sırasında alınan oosit sayısında artışa ve daha fazla sayıda yüksek ve orta kaliteli embriyoya yol açabileceğini öne sürdüler ve bu da PRP'nin döllenme sonrası embriyo gelişimini destekleyebileceğini gösterdi. Rejeneratif etki, KOH döngüleri sırasında alınan oositlerin hormon profilinde, over rezervinde ve kalitesinde iyileşmelere yol açtı ve bu güncel çalışmanın bulgularıyla uyumluydu. Bu sonuçlar, over içine PRP enjeksiyonlarının over dokusunu gençleştirebileceği ve üreme sonuçlarını iyileştirebileceği hipotezini desteklemektedir. PRP'nin olumlu etkisi kısa süreli gibi görünmekte olup, toplam ve iyi kalitede blastokist sayılarında ve ilgili oranlarında enjeksiyondan sonraki iki ay içinde gözlemlenen önemli artışlar görülmektedir. Üçüncü ayda, rejeneratif etkiler, muhtemelen PRP'de bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin doğal bozunumu ve emilimi nedeniyle azalmış görünmektedir. Bu nedenle, PRP enjeksiyonu ve KOH'un zamanlaması, etkinliğini optimize etmek için çok önemlidir. Bu sonucun altında yatan nedenleri araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bulgularımızın aksine, bazı çalışmalarda PRP tedavisiyle daha az olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Örneğin, Barad ve arkadaşları, intraovaryan PRP enjeksiyonunun Poseidon grup 3 ve 4'teki POR hastalarında hormon profillerini veya IVF sonuçlarını iyileştirmediğini bulmuşlardır. Ek olarak, Herlihy ve arkadaşları ile Barrenetxea ve arkadaşları tarafından yürütülen iki randomize kontrollü çalışma (RCT), PRP'nin 38 yaşından küçük POR hastalarında veya POSEIDON grup 3 ve 4 altında sınıflandırılan hastalarda IVF sonuçlarını iyileştirmediğini göstermiştir. Bu tutarsızlıklar, hasta popülasyonlarındaki, PRP hazırlama yöntemlerindeki ve çalışma tasarımlarındaki farklılıklara bağlanabilir.

Çalışmamızın bazı sınırlamaları vardı. İlk olarak, randomize değildi; hastalar intraovaryan PRP enjeksiyonu yaptırıp yaptırmamayı kendileri seçmişti, bu da seçim yanlılığına yol açabilir. İkinci olarak, kontrol grubuna sahte bir prosedür uygulanmadı, bu nedenle gözlemlenen etkiler kısmen enjeksiyonun mekanik etkisine ve potansiyel olarak Hippo sinyal yolunu bozmasına bağlanabilir. Üçüncüsü, embriyo transferi ve gebelik sonuçları için örneklem büyüklüğünün küçük olması, bu bulguların güvenilirliğini sınırlamıştır. Ayrıca, over durumu ve fetal ve neonatal sonuçlar hakkında uzun vadeli veriler eksikti. Dahası, farklı çalışmalarda PRP hazırlamak için farklı yöntemler kullanıldığından, büyüme faktörlerinin bileşimi ve konsantrasyonu da farklılık gösterebilir. Çoğu çalışmada PRP'nin bileşenleri analiz edilmemiştir ve dozaj ve enjeksiyon bölgeleri farklı olduğundan, çalışmalar arasında sonuçların karşılaştırılması zorlaşmıştır.

Son olarak, bu araştırma, en az iki KOH ve PGT-A döngüsünü tamamlayıp kaliteli blastokist üretmemiş çeşitli katılımcı gruplarını kapsamıştır. Embriyo kalitesini etkileyen çok sayıda faktör olabilir ve gelecekteki araştırmalar, over içi PRP enjeksiyonlarından en çok fayda görecek grupları belirlemek için belirli bir gruba odaklanmalıdır.

Sonuç

Özetle, PRP'nin doğrudan overlere enjekte edilmesi, önceki IVF girişimlerinden tatmin edici sonuçlar alamayan hastalarda over yanıtını ve embriyo kalitesini artırmada umut verici sonuçlar göstermektedir. PRP enjeksiyonundan bir ve iki ay sonra KOH uygulanan hastalar, hem blastokist sayısı ve kalitesinde hem de ilgili oranlarda önemli iyileşmeler göstermiştir. Ancak, altta yatan mekanizmaları anlamak, enjeksiyonların optimum zamanlaması ve sıklığını belirlemek ve uzun vadeli güvenlik ve etkinliği değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



MAKALE ÖZETİ

OXFORD human reproduction

Human Reproduction, 2025, 00(00), 1–10
https://doi.org/10.1093/humrep/deaf206
Mini-review

Developments in reproductive biology and medicine

The contribution of single-cell omics technologies to improve knowledge on human early embryo development

Océane Girard[1,†], Eva Moinard[1,†], Laurent David[1,2,*], and Thomas Fréour[1,2,*]

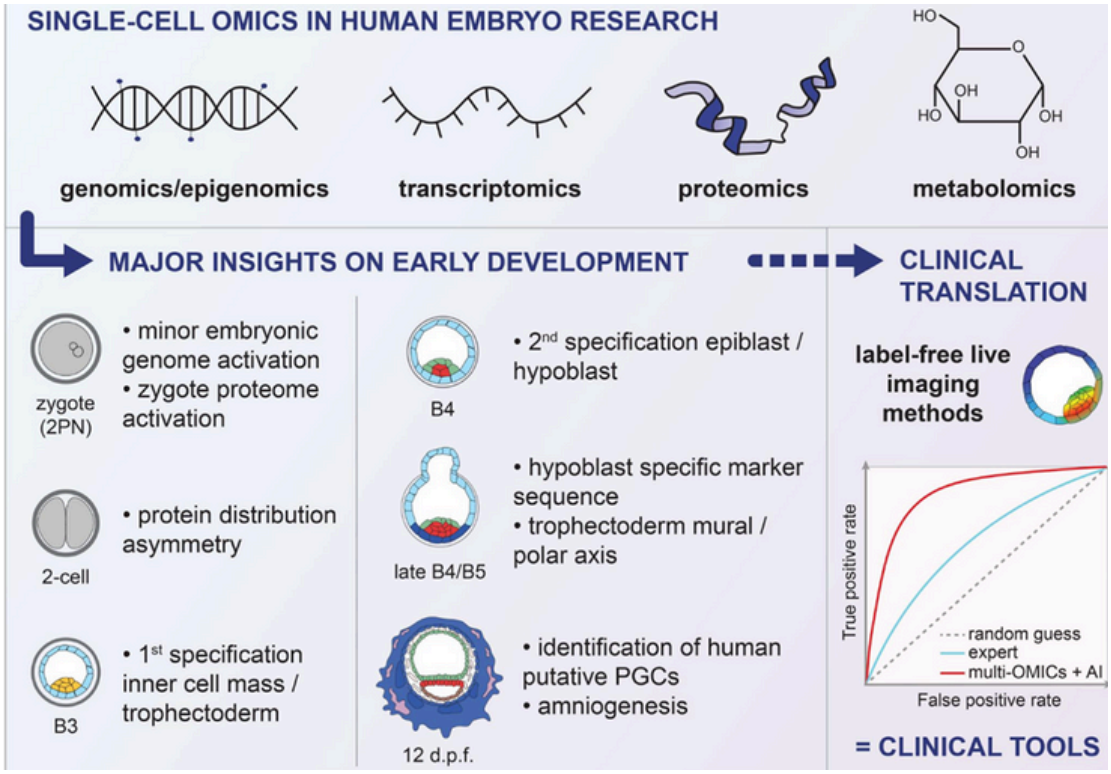
[1]CHU Nantes, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, Nantes Université, Nantes, France
[2]Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Nantes, Nantes, France

Hazırlayan:
Arş. Gör. Dr. Beyhan KARLI YILDIRIM
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi

TEK HÜCRELİ OMİK TEKNOLOJİLERİNİN, İNSAN ERKEN EMBRİYO GELİŞİMİNİN ANLAŞILMASINI GELİŞTİRMEYE KATKISI

ÖZET

Tıbbi yardımla üremeyi iyileştirmek için, döllenmeden gastrulasyona kadar insan erken embriyo gelişimini anlamak çok önemlidir. Teknik ve etik sınırlamalarla karşı karşıya kalan implantasyon öncesi aşamalarla ilgili araştırmalar, son zamanlarda ortaya çıkan tek hücreli omik teknolojilerle farklılaşmaya başladı. Transkriptomik, epigenomik ve proteomik benzeri yaklaşımlar, erken gelişim döneminde hücresel heterojenlik, soy belirleme ve uzamsal organizasyonun daha önce görülmemiş bir çözünürlükte incelenmesini mümkün kılıyor. Burada, tek hücreli omik yöntemlerin sağladığı önemli keşifleri, embriyonik gelişimin ilerleyişini yansıtacak şekilde kronolojik olarak sunuyoruz. Aynı zamanda, blastomer katkılarının tanımlanması, embriyonik genom aktivasyon mekanizmaları ve trofoektoderm, epiblast ve hipoblast hücre kaynaklarının kronolojik spesifikasyonu konularını ele alıyoruz. Ayrıca, tek hücre omiklerinin anöploidinin etkilerini nasıl açıklığa kavuşturduğunu, mural-polar trofektoderm maturasyonunu nasıl ortaya çıkardığını, X kromozomu düzenlemesini nasıl revize ettiğini ve primordial germ hücreleri ve amniyon gibi nadir implantasyon sonrası popülasyonların tanımlanmasını nasıl mümkün kıldığını da inceliyoruz.



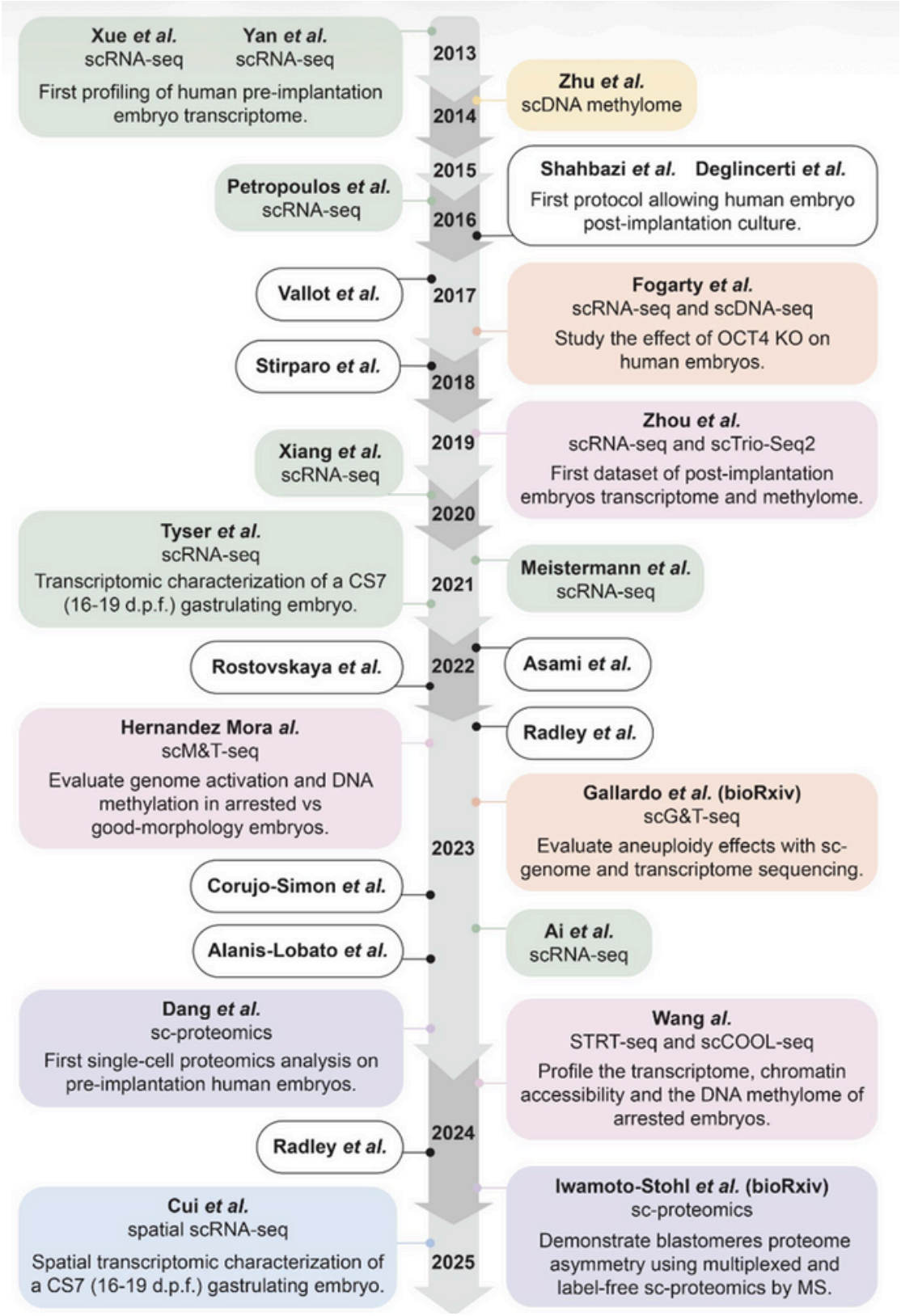
İnsan embriyo araştırmalarında tek hücreli omikler, erken gelişim hakkında önemli bilgiler sağlar ve yardımcı üreme tekniklerinde klinik araçların geliştirilmesi ve karar verme sürecinin iyileştirilmesi için umut vaat eder. 2PN: 2 pronükleus, B3: blastosist aşaması 3, B4: blastosist aşaması 4, d.p.f.: döllenme sonrası gün sayısı, AI: yapay zeka, PGC'ler: primordial germ hücreleri.

GİRİŞ

İnsanlarda erken dönem embriyo gelişiminin moleküler temellerini anlamak, üreme biyolojisi ve tıbbında hala en önemli zorluklardan biridir. IVF ve ilgili ART, erken dönem insan embriyolarına benzeri görülmemiş bir erişim sağlamış olsa da, implantasyon öncesi gelişimi yöneten genetik ve epigenetik programlara ilişkin mekanik bilgiler, tarihsel olarak teknik, yasal ve etik kısıtlamalarla sınırlı kalmıştır (Rugg-Gunn et al., 2023; Rossant, 2024). Erken embriyo, hücre kaderinin belirlendiği hızlı ve kritik morfolojik olaylara maruz kalır. İlk olarak, morula aşamasında kompaksiyon, plasentanın öncülleri olan dış trofektoderm (TE) hücrelerinin iç hücre kütlesinden (ICM) ayrılmasına yol açar.

İkinci olarak, blastokist aşamasındaki kavitasyon, ICM hücrelerini sırasıyla fetüs ve yolk sak'ın öncülleri olan pluripotent epiblast (EPI) ve hipoblast (HYPO) hücrelerine dönüştürür (Niakan ve Eggan, 2013; Shahbazi, 2020). Geleneksel toplu analizler, bilgilendirici olmalarına rağmen, genellikle insan embriyo-sunda bulunan hücresel heterojenliği gizler. Buna karşın, son on yılda ortaya çıkan tek hücreli omik teknolojiler, erken embriyogenezi incelemede benzeri görülmemiş bir çözümlemeyi mümkün kılmıştır. Bu yöntemler, tek tek embriyonik hücrelerin profillerini çıkararak, minimum miktarda biyolojik materyale rağmen, gelişim aşamaları boyunca hücresel çeşitliliği ve dinamik moleküler değişiklikleri yakalayarak hücre durumunun ve kaderinin hassas bir şekilde haritalanmasını sağlar (Haghverdi ve Ludwig, 2023).Tek hücreli RNA sekanslama (scRNA-seq), tek hücreli epigenomik, tek hücreli proteomik ve yeni ortaya çıkan tek hücreli multi-omik platformlardaki son gelişmeler, erken embriyolarda ki karmaşık süreçleri daha önce ulaşılamayan moleküler ayrıntı düzeyinde inceleyebilmeyi giderek mümkün hale getirmiştir (Vandereyken et al., 2023).

Bu derlemede, tek hücreli omik teknolojilerin erken insan embriyo gelişimi hakkındaki anlayışımızı nasıl geliştirdiğini inceleyeceğiz. Döllenmeden gastrulasyona kadar, tek hücreli omiklerle çözümlenmiş olan erken gelişim sorunlarını yeniden ele alacak ve bunların bilgimize katkılarını vurgulayacağız (**Şekil 1**). Moleküler biyoloji ile üreme tıbbı arasındaki boşluğu dolduran tek hücreli omikler, insan embriyo gelişimi ve infertilite konusundaki yaklaşımımızı farklı boyutlara taşımaya hazırdır.



Şekil 1. Erken insan embriyo gelişimini inceleyen seçilmiş önemli tek hücreli omik çalışmaların zaman çizelgesi. Önemli çalışmalar renklerle vurgulanmıştır: tek hücreli RNA sekanslama (scRNA-seq) için yeşil, tek hücreli DNA (scDNA) metilom için sarı, scDNA ve scRNA-seq kombinasyonu için turuncu, tek hücreli proteomik (sc proteomik) için mor ve uzamsal scRNA-seq için mavi.
Sc: tek hücreli, seq: sekanslama, KO: nakavt, scTrio- Seq2: tek hücreli üçlü omik sekanslama, CS7: Carnegie Aşama 7, d.p.f.: döllenme sonrası gün sayısı, scM&T-seq: tek hücreli metilasyon ve transkriptom sekanslama, scG&T-seq: tek hücreli genom ve transkriptom sekanslama, STRT-seq: tek hücreli etiketli ters transkripsiyon sekanslama, scCOOL-seq: tek hücreli kromatin genel omik ölçekli alan sekanslama, MS: kütle spektrometrisi.

TEK HÜCRELİ OMİK TEKNOLOJİLERİN TEKNİK ARKA PLANI

Tek hücreli omik teknolojiler, embriyogenez sırasında tek tek hücrelerin moleküler profilinin çıkarılmasını sağlar. Bu teknikler, materyal sayısının sınırlı ve hücre popülasyonlarının oldukça heterojen olduğu insan embriyo araştırmalarında oldukça değerlidir. Ancak, omik yaklaşımlar beraberinde teknik hususlar ve analitik zorluklar getirir.

TEK HÜCRELİ RNA SEKANSLAMA

scRNA-seq, tek hücre çözümlemesinde gen ifadesinin kantitatif profilini oluşturmayı sağlar. Her biri farklı avantajlara ve sınırlamalara sahip birkaç yaklaşım mevcuttur. Tek tek hücreleri barkodlu damlacıklar içinde kapsülleyen damlacık tabanlı yöntemler, yüksek verimlilik sunar ve binlerce hücrenin paralel olarak yakalanması için uygundur (Salomon et al., 2019). Ancak, bu yöntemler kısmi transkript yakalama nedeniyle sınırlı kapsama alanı sergiler. Buna karşılık, Smart-seq2 gibi tam uzunlukta protokoller tüm transkriptleri yakalar ve daha yüksek hassasiyet sağlar (Picelli et al., 2014; Byrne et al., 2019). Ancak, bunlar genellikle daha düşük verimlidir. İş akışı genellikle embriyoların tek hücrelere ayrılması, RNA'nın ters transkripsiyonu ve barkodlanması, cDNA amplifikasyonu ve sekanslamayı içerir. İleri analizler genellikle hücre kümelenmesi, diferansiyel gen ekspresyonu analizi ve gelişimsel seyirin çıkarımını içerir. Bu analizler, benzer transkripsiyon profillerine sahip hücre popülasyonlarının tanımlanmasını, kümeler arasında farklı şekilde eksprese edilen genlerin tespitini ve transkripsiyon dinamiklerine dayalı gelişimsel seyrin yeniden yapılandırılmasını sağlar.

Tek Hücre Epigenomikleri

Tek hücre düzeyinde epigenomik profilleme, kromatin erişilebilirliği, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının erken gelişimsel düzenlemeye nasıl katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (Wilkinson et al., 2023).

Kromatin erişilebilirliği, tek hücre transpozaz erişilebilir kromatin sekanslama (scATAC-seq) veya tek hücreli kromatin genel omik ölçekli alan sekanslaması (scCOOL-seq) gibi teknikler kullanılarak değerlendirilebilir (Buenrostro ve ark., 2013; Guo ve ark., 2017); DNA metilasyonu, tek hücre bisülfit sekanslama (scBS-seq) veya tek hücre indirgenmiş temsil bisülfit sekanslama (scRRBS) ile profillenebilir (Smallwood ve ark., 2014; Guo et al., 2015); ve histon modifikasyonları, tek hücre hedef altında kesme ve tagmentasyon (scCUT&Tag) veya tek hücre kromatin immünopresipitasyonu sekanslama (scChIP-seq) kullanılarak analiz edilebilir (Grosselin et al., 2019; Bartosovic et al., 2021). Bu yaklaşımlar teknik olarak daha zordur ve erken embriyonik hücrelerin düşük DNA içeriği göz önüne alındığında, kapsamlılık ve hassasiyet arasında denge sağlamak için dikkatli bir optimizasyon gerektirir (Vandereyken ve ark., 2023). Bu yaklaşımlar, implantasyon öncesi aşamalarda global ve soy spesifik DNA metilasyon dinamiklerini haritalandırarak, düzenleyici unsurları hedef genlerine bağlamış ve epigenetik alanların transkripsiyon sonuçlarını nasıl şekillendirdiğini ortaya çıkarmıştır (Li et al., 2018; Zhou et al., 2019).

Tek Hücreli Proteomikler

Tek hücreli proteomikler, proteinlerin doğrudan ölçülmesini mümkün kılarak, transkriptomiklerin veya epigenomiklerin tek başına sağlayabileceğinden daha fazla hücre fonksiyonu hakkında bilgi sağlarlar. Antikor bazlı yaklaşımlar, hedefe yönelik protein profilleme imkânı sunar, ancak antikor özgüllüğü ve erişilebilirliği ile sınırlıdırlar (Wingren, 2016). Buna karşılık, kütle spektrometresi (MS) etiket içermeyen yöntemler, amino asit dizilerini tanımlamak için doğrudan ve tarafsız bir yol sunar (Guo et al., 2025). MS tabanlı iş akışları genellikle tek hücre disosiyasyonu, veriye bağlı veya veriden bağımsız edinim modlu (DDA veya DIA) kütle spektrometresine bağlı nano-sıvı kromatografisine enjeksiyon ve ileri analizi içerir. Yağ-hava damlacık çipi (OAD-chip) gibi nanolitre damlacıklar kullanan numune hazırlama platformları, ön işlem ve enjeksiyon adımları için tek tek hücreleri kapsüller (Li et al., 2018b).

Buna karşılık, SCoPE2 gibi yöntemler izobarik etiketlemeyi (örneğin, protein miktarını belirlemek için aynı kütleye sahip ancak farklı parçalanma modellerine sahip kimyasal etiketler) kullanır ve peptid tanımlama ve miktarını artırmak için tek hücreleri bir taşıyıcı kanalla birleştirir, böylece hücre başına binlerce proteinin tanımlanmasını sağlar (Petelski et al., 2021).

Mikro numune işleme ve cihaz hassasiyetindeki son gelişmeler, protein kapsamının derinliğini genişletmeye devam etti. Tek hücre transkriptomik verilerle entegre edildiğinde, tek hücre proteomikleri mRNA ve protein seviyeleri arasındaki tutarsızlıkları gidermeye yardımcı olur ve fonksiyonel sinyal yollarını aydınlatır (Khan et al., 2024). Teknik engeller devam etmesine rağmen, devam eden yenilikler tek hücre proteomiklerini insan embriyogenezini incelemek için giderek daha güçlü bir araç haline getirmektedir.

MULTİ-OMİK TEKNOLOJİLER

RNA ve kromatin gibi çoklu düzenleme katmanlarını aynı anda yakalayan multi-omik yaklaşımların geliştirilmesi, embriyonik hücre durumlarının daha bütünleşmiş bir şekilde incelenmesini mümkün kılmıştır. Bu entegre yaklaşımlar, tek modlu çalışmaların sınırlamalarını aşarak hücresel kimlik ve düzenleme hakkında daha kapsamlı bir bakış açısı sunmaktadır (Fogarty et al., 2017; Li ve ark., 2018a; Zhou ve ark., 2019; Wang ve ark., 2022, 2024; Zhao ve ark., 2022; Gallardo ve ark., 2023; Hernandez Mora ve ark., 2023).

Teknik ve etik zorluklar

Güçlü yönlerine rağmen, tek hücreli omik teknolojiler insan embriyosu araştırmalarında çeşitli sınırlamalarla karşı karşıyadır. Erken embriyonik hücrelerin çok düşük RNA ve DNA içeriği, son derece hassas protokoller gerektirir ve atlama olayları, kapsama derinliği ve teknik gürültü gibi sorunlara yol açar (Qiu, 2020; Shangguan et al., 2020). Bu sınırlamalar, biyolojik olarak ilgili olmayan önyargılara yol açabilir ve veri yorumlamasını bozabilir. Ayrıca, birden fazla veri setinin entegrasyonu, deney koşulları, numune işleme veya sekanslama platformlarındaki farklılıklardan kaynaklanan teknik varyasyonlar olan parti etkileri ortaya çıkarır (Goh et al., 2017).

Bu sorunları çözmek için bir dizi düzeltme algoritması geliştirilmiştir. Ancak, farklı modaliteleri birleştirirken ve özellikle veri kümeleri ortak özelliklere veya ortak hücrelere sahip olmadığında bu yöntemlerin sorgulanması gerekir (Vandereyken et al., 2023). Ayrıca, gelişimsel asenkronizasyon ve insan embriyosunun heterojenliği gibi biyolojik değişkenlikler analizi karmaşıklaştırır. Hücre canlılığını korumak ve parti etkilerini en aza indirmek için numune hazırlığı optimize edilmelidir. Omik veriler kullanılarak, veri işlemeyi basitleştirmek, gereksiz özellikleri ortadan kaldırmak ve görselleştirmeye yardımcı olmak için boyut azaltma teknikleri kullanılır. Sonuç olarak, tek hücreli omikler kullanılarak insan embriyo araştırmalarında sağlam, tekrarlanabilir ve biyolojik olarak anlamlı içgörüler elde etmek için standartlar geliştirilmesi ve uygulama şeffaflığının artırılması gerekmektedir.

Son olarak, özellikle insan embriyo materyalinin kıtlığı ve hassasiyeti göz önüne alındığında, etik hususlar büyük önem taşımaktadır. Araştırmalarda insan embriyolarının kullanımını düzenleyen uluslararası kılavuzlar gelişmeye devam etmektedir (Venkatesh et al., 2024; Guidelines International Society for Stem Cell Research [Internet], 2025) ve omik verilerin klinik karar verme sürecine entegrasyonu, dikkat ve şeffaflık ile ele alınmalıdır.

Blastomerlerin Embriyonik Gelişime Bireysel Katkılarının Belirlenmesi

On yıllar boyunca, blastomerlerin 16 hücreli aşamaya kadar aynı karakteristikleri ve gelişimsel özellikleri paylaştığı genel olarak kabul ediliyordu (Veiga ve ark., 1987; Van de Velde ve ark., 2008). Bu hipotez, çoğunlukla fare çalışmalarıyla çürütülmüştür (Tsunoda ve McLaren, 1983; Piotrowska-Nitsche ve ark., 2005; Casser ve ark., 2017), ancak insan blastomerlerinin, örneğin gelişimsel potansiyelleri ve soy katkıları açısından ne kadar farklı oldukları, (Junyent ve ark., 2024), transkriptomik profiller ve epigenetik durumlar açısından ne ölçüde farklılık gösterdiği hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durum, Iwamoto-Stohl ve ark. (2024) tarafından yapılan bir ön baskı çalışmasında sorgulanmıştır.

Bu çalışmada, tek hücreli kütle spektrometrisi (scMS) kullanılarak tek tek blastomerlerde protein ekspresyonu ve gelişimsel akıbet incelenmiştir. Analizleri, fare embriyolarının 2 hücreli aşamasında alfa ve beta blastomerler arasında proteinlerin asimetrik dağılımını ortaya koymuştur. Özellikle, EPI hücrelerinin ağırlıklı olarak beta blastomerden kaynaklandığını öne sürdüler. Çalışmalarını 2 hücreli aşamadaki 13 insan embriyosuna genişleterek, alfa ve beta blastomerler arasında önemli ölçüde farklı bollukta olan 113 protein belirlediler, bu da erken moleküler asimetrileri düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, bu proteinler alfa blastomerlerde protein yıkımı ve beta blastomerlerde protein transportu için zenginleştirilmişti. Yazarlar, blastomerler arasındaki gelişim potansiyelindeki erken farklılaşmanın, farklı bollukta bulunan proteinlerin bir sonucu olabileceği hipotezini ortaya attılar.

EMBRİYONİK GENOM AKTİVASYONUNUN AYDINLATILMASI

İnsan embriyolarında, anneden alınan transkript ve proteinler ile gelişimden, 4 ila 8 hücreli aşamalar arasında (Braude ve ark., 1988) büyük bir embriyonik genom aktivasyonu (EGA) dalgası meydana gelir. Li ve ark. (2018), scCOOL-seq kullanarak sperm ve oositlerden blastokist aşaması embriyolarına kadar genom çapında DNA metilasyonu ve kromatin erişilebilirliğini profillemiştir. EGA'nın kromatin erişilebilirliğinin yeniden modellenmesi ile aynı zamana denk geldiğini göstermişlerdir. Daha sonra, yüksek çözünürlüklü scRNA-seq'den yararlanarak, Asami ve ark. (2022) transkripsiyon başlangıcının ve ilerlemesini araştırmıştır. Zigotların (yani 2 pronükleuslu 1 hücreli aşama embriyolar) küçük bir EGA aşamasından geçeceğini öne sürdüler ve metafaz II oositlere kıyasla zigotlarda 1322 genin yukarı regülasyonunu bildirdiler. Yazarlar daha sonra bu gen listesini hücre döngüsü ilerlemesi, kromozom onarımı veya transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilendirdiler. EGA'dan önceki embriyo gelişiminin bir diğer önemli yönü, protein ekspresyonu dinamikleridir. Dang ve ark. (2023), oositlerden blastosistlere kadar birçok gelişim aşamasındaki insan embriyoları üzerinde scMS analizi gerçekleştirdiler. .

Özellikle, 8 hücreli aşamadan sonra ortaya çıkan 1000'den fazla maternal translasyonlu protein ve 305 zigotik translasyonlu protein tespit ettiler. Bu bulgular, maternal proteom aktivasyonundan zigotik proteom aktivasyonuna geçişi vurgulamakta ve potansiyel açıdan EGA-'nın tetikleyicisi olarak hizmet etmektedir. Yazarlar ayrıca, gelişim boyunca transkriptom ve proteom arasında tutarlı bir şekilde düşük bir korelasyon katsayısı olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma, insan embriyolarının ilk tek hücreli proteomik analizini temsil etmektedir. Son olarak, Asami ve ark. (2022), tripronükleer (3PN) zigotlarda erken transkripsiyonlu genlerin aşağı regülasyonunun gelişimsel bozukluklarla bağlantılı olabileceğini varsaymıştır. Hernandez Mora ve ark. (2023) tek hücreli metilasyon ve transkriptom dizileme (scM&T-seq) kullanarak, duraklamış ve iyi morfolojili embriyolarda genom aktivasyonunu ve DNA metilasyonunu değerlendirdiler. Spontan bölünme aşamasında duraklama yaşayan erken embriyolarda sıklıkla anormal EGA ve DNA metilasyon dinamikleri gözlemlediler. Daha sonra, Wang ve ark. (2024) durmuş embriyolarda transkripsiyon aktivitesinde ve global DNA metilasyon seviyelerinde artış olduğunu bildirmiştir. Bu embriyolarda ayrıca, iğ anormallikleri ve mitotik aurora kinaz A (AURKA) ekspresyonunda azalma ile birlikte, hücre iskeleti organizasyonu ve mitozda rol oynayan genlerin aşağı regülasyonu görülmüştür. Bu bulgular, EGA'nın altında yatan mekanizmaların, zigotlarda ve erken blastomerlerdeki RNA ve protein içeriği ile birlikte aydınlatılmasının, in vitro erken embriyo duraksamasının nedenlerine ışık tutabileceğini göstermektedir. Daha da önemlisi, bu tür bilgiler, in vitro kültürlenen insan embriyolarının gelişim potansiyelini iyileştirmek için ipuçları sağlayabilir

ICM, EPI VE HYPO SPESİFİKASYONUNUN ÇÖZÜLMESİ

Birkaç scRNA-seq çalışması, insan gelişimi sırasında EPI ve HYPO soy hatlarını açıklayan modeller önermiştir. Petropoulos ve ark. (2016), TE, HYPO ve EPI soy hatlarının döllenmeden 5 gün sonra (d.p.f.) eşzamanlı olarak ayrıldığı bir "tek adımlı" model önermiştir. Buna karşılık, Stirparo ve ark. (2018) fare ve insan dışı primat embriyolarında gözlemlenene benzer bir "iki

aşamalı" model önermiştir (Boroviak ve ark., 2015; Chazaud ve Yamanaka, 2016; Nakamura ve ark., 2016). Bu son modele göre, morulanın dış ve iç hücreleri blastokist oluşumu sırasında ayrılır ve TE ile ICM'yi oluşturur. Daha sonra, EPI ve HYPO soy hatları ICM'den ortaya çıkar. Ancak, insan embriyolarındaki ICM hücrelerinin moleküler kimliği konusunda şüpheler devam etmiştir. Bu modellerden herhangi birini destekleyen kanıt bulunmadığından, grubumuz HYPO'nun EPI hücrelerinden farklılaşabileceğini öne süren üçüncü bir hipotez önermiştir (Meistermann ve ark., 2021). Başka bir yakın tarihli çalışmada, Radley ve ark. (2023), genler arasında gözlemlenen korelasyonların rastgele bir şans sonucu mu yoksa bağımlı bir ilişkiyi mi yansıttığını denetimsiz bir şekilde niceleştiren matematiksel bir çerçeve olan "entropi sıralaması" ile implantasyon öncesi scRNA-seq'i yeniden analiz ettiler. Sonuçları "iki aşamalı" modeli işaret etti. Bu yöntem, veri seti içinde oldukça yapılandırılmış ekspresyon modellerine sahip olan "yüksek bilgi içerikli genler"e dayanmaktadır. Bu tür genler, hücre kaderinin kimliğini daha iyi öngördüğü düşünülür ve gen ekspresyonundaki küçük zamansal değişikliklere duyarlıdır. Radley ve arkadaşları, HYPO ve EPI soyları arasında minimum bağlantı olduğunu göstermiştir. Ancak, her ikisi de ICM'ye karşılık gelen üçüncü bir hücre kümesine bağlıydı. Özellikle, insan blastokistlerinde immünofloresans (IF) yoluyla LAMA4'ü bir ICM markerı olarak doğruladılar. 5 d.p.f.'de, LAMA4, tanımlanmamış ICM hücrelerinin yüzeyinde tespit edildi. SOX17 veya OCT4 ekspresyonu ile belirtildiği gibi, tanımlanmış HYPO veya EPI hücrelerinde aşağı regüle edildi. Bu, insan embriyolarında EPI ve HYPO soylarının ortak bir kökene sahip olduğuna dair ilk doğrudan kanıtı sağlamıştır.

Transkripsiyon faktörü OCT4'ün insan gelişimindeki rolü, insan zigotlarında CRISPR-Cas9 genom düzenlemesi kullanılarak incelenmiştir (Fogarty et al., 2017). OCT4 kaybı, blastokist oluşumunda azalmaya yol açmıştır (mutantlarda %19, kontrollerde %47). Tek hücre analizleri, OCT4 mutant blastokistlerin önemli EPI belirteçlerinden (NANOG, KLF17, DPPA5) yoksun olduğunu ve ekstra embriyonik soy hatlarının bozulduğunu gösteren transkripsiyonel değişiklikleri ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma, OCT4'ün erken gelişimdeki temel rolünü ve tek hücre omiklerinin, soy ilerlemesini ve nihayetinde fetüsü oluşturan EPI hücreleri üzerindeki çevresel etkileri anlamak için çok önemli olan genetik bozulmaları değerlendirmek için gücünü göstermiştir.

HYPO Soy Hattının Karakterizasyonu

HYPO, tüm amniyotlarda bulunan ekstra-embriyonik bir soy hattıdır ve erken gelişimi destekleyen ve yolk kesesine katkıda bulunan viseral ve parietal endodermleri oluşturur. Visseral endoderm daha sonra, insan dışı primatlarda gösterildiği gibi (Stower ve Srinivas, 2018; Bergmann ve ark., 2022), gastrulasyon sırasında anterior-posterior paterninin oluşmasına yardımcı olur. Corujo-Simon ve ark. (2023) ve Radley ve ark. (2023), transkriptomik çıkarım ve insan blastokistlerinde IF'leri kullanarak HYPO spesifikasyonunu haritalandırmıştır. PDGFRA'nın başlangıçta EPI belirteçleri (NANOG, SOX2) ile birlikte eksprese edildiğini, ancak gelişim ilerledikçe HYPO ile sınırlı kaldığını bulmuşlardır, bu da EPI spesifikasyonunun HYPO oluşumundan önce geldiğini göstermektedir. Marker gidişatı PDGFRA>SOX17>FOXA2>GATA4, HYPO gelişimini izlemek için rafine bir imza sunmaktadır. Sonuç olarak, implantasyon öncesi HYPO markerlerinin başlangıcının kesin sırası, embriyoları moleküler olarak aşamalandırmak için büyük bir fırsattır. Bu bulgular, özellikle embriyo morfolojisi, moleküler profiller ve implantasyon potansiyeli arasındaki ilişkiyi aydınlatmada, gelişimsel ve üreme biyolojisi arasında köprü kurma fırsatı sunmaktadır. Morfolojik derecelendirmesi zayıf olan blastokistlerin, morfolojisi iyi olanlara kıyasla implantasyon oranlarının daha düşük olduğu bilinmektedir (Irani et al., 2017; Nazem et al., 2019).

Bu bulgudan yola çıkan Chousal et al. (2024), morfolojik kalitenin gen ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Morfolojisi zayıf ve implantasyon potansiyeli azalmış blastokistlerin, daha önce scRNA-seq çalışmalarında tanımlanan HYPO'ya özgü genlerin aşağı regülasyonu ile karakterize edilen bozulmuş HYPO gelişimi sergilediğini bulmuşlardır. Yazarlar, uygun HYPO gelişimi için gerekli sinyalleri ve faktörleri tanımlamanın, kültür

ortamının optimizasyonuna yol açabileceğini ve sonuçta HYPO spesifikasyonunu ve olgunlaşmasını ve dolayısıyla embriyo potansiyelini artırabileceğini öne sürmektedir.

İnsan TE Olgunlaşması, İmplantasyondan Önce Mural-Polar Aksı İzler

ART alanında onlarca yıllık ilerleme ve yeniliklere rağmen, canlı doğum oranı hala düşük ve IVF sonrası muhtemelen daha da iyileştirilebilir. İmplantasyon ve erken gebelik, TE'nin düzgün işlevi ve olgunlaşması, daha spesifik olarak da 7 d.p.f. civarında endometriuma yapışan ve daha sonra onu invaze eden polar taraf ile büyük ölçüde ilişkilidir. TE olgunlaşması konusunu ele almak için, grubumuz geç aşama blastokist TE'ye özgü bir transkriptomik imza belirlemeye çalıştı (Meistermann et al., 2021). Ağırlıklı gen ko-ekspresyon ağı analizi (WGCNA) kullanarak, implantasyon öncesi aşamalar arasında korelasyon gösteren gen modülleri belirledik (Langfelder ve Horvath, 2008). Analizimiz, erken ve orta TE aşamalarına kıyasla geç TE'de spesifik olarak yukarı regüle edilen belirgin bir gen modülü ortaya çıkardı. 6 d.p.f.'de insan blastosistlerinde yapılan IF doğrulaması, polar TE hücrelerinde nükleer reseptör alt ailesi 2 grup F üyesi 2'nin (NR2F2) varlığını doğruladı. Zaman aralıklı (time-lapse) embriyo izlemeyi kullanarak, yazarlar morfolojiyi moleküler belirteçlerin tespitiyle ilişkilendirdiler ve NR2F2 ekspresyonunun geç ekspanse (B4) aşamasıyla ilişkili olduğunu gösterdiler. Bu, NR2F2'nin implantasyon sürecinde potansiyel bir rolü olduğunu düşündürdü ve insan TE'sinde mural-polar eksenin ilk kanıtını sağladı. Bu çalışma, implantasyonu, özellikle implantasyon mekanizmalarını ve TE olgunlaşmasıyla ilişkili yeni belirteçlerin tespitini incelemek için yeni fırsatlar açtı.

Anöploidilerin embriyo gelişimi üzerindeki etkisinin araştırılması

Embriyo anöploidisi, mayoz ve/veya mitoz hatalarından kaynaklanan kromozomal kazançlar, kayıplar ve yapısal anormallikleri içerir (Shahbazi, 2020). Anöploidi için preimplantasyon genetik test (PGT-A), embriyo biyopsisi ve yeni nesil sekanslamayı içerir ve transfer için öploid embriyoların önceliklendirilmesini sağlayarak implantasyonu iyileştirir ve düşük oranlarını azaltır. Bununla birlikte, mozaik embriyoların gelişim potansiyeli ve segmental anöploidilerin kesin etkileri halen araştırılmaktadır. Tek hücre teknolojileri, son zamanlarda anöploid embriyoların gelişiminde rol oynayan bazı moleküler mekanizmalara ışık tutmuştur. Bir ön baskı makalesinde, Gallardo ve ark. (2023), tek hücre genom ve transkriptom sekanslama (G&T-seq) yöntemini kullanarak, implantasyon öncesi aşamalarda PGT-A ile anöploidi tanısı konmuş 112 embriyodan alınan 756 tek hücreyi analiz etmiştir. Tüm soylar ve aşamalarda anöploidi tespit edilmiş ve toplam hücrelerin %50'si anöploid bulunmuştur. İlginç bir şekilde, embriyoların %15'i tamamen öploid idi. Global transkriptomlar önemli ölçüde değişmemiş olsa da anöploid hücreler gelişim zamanlaması ve gen düzenleyici ağlarda (GRN'ler) düzensizlik gösterdi; buna TE hücrelerinde mTOR ve Hippo-YAP yolaklarının aşağı regülasyonu veya artan apoptoz da dahildi. Bu bulgular, anöploid hücrelerin zayıflamış kondisyon ve rekabet gücünü vurgulamakta ve mozaik embriyolardaki katkılarını sınırlayan hücresel rekabet fikrini desteklemektedir. PGT-A, tüm hücreleri etkileyen mayotik anöploidileri olan embriyoları tanımlayabilirken, sağlıklı gebelikler oluşturma potansiyelini koruyan mozaik blastokistlerin dışlanmasına da yol açabilir ve böylece transfer için kullanılabilir embriyo havuzunu gereksiz yere azaltabilir (Patrizio ve ark., 2019; Popovic ve ark., 2020).

X KROMOZOM DİNAMİKLERİNİ YENİDEN ELE ALMAK

Memeli dişilerde, X kromozom inaktivasyonu, somatik hücrelerde X'e bağlı gen ekspresyonunu dengeler (Patrat ve ark., 2020). Bu süreç, uzun kodlamayan RNA XIST'in bir X kromozomunda birikmesini içerir. Ancak, RNA-Floresan in situ hibridizasyon (RNA-FISH) çalışmaları, çoğu dişi blastokist hücresinde bi-alelik XIST ekspresyonu olduğunu göstermiştir (Vallot et al., 2017), bu da tam X inaktivasyonunun geciktiğini düşündürmektedir. Petropoulos et al. (2016), implantasyon öncesi embriyoların birini tamamen inaktive etmek yerine her iki X kromozomundan da ekspresyonu azalttığını öne sürmüştür. Vallot ve ark. tarafından yapılan yeniden analiz, XIST ve XACT'ın 4 ve 8 hücreli aşamalar arasında her iki alelden birlikte

eksprese edildiğini ve sessizleşmenin blastokist gelişiminde daha geç başladığını ortaya koymuştur. EPI ve HYPO hücrelerinde XACT'ın korunduğunu ve bazı TE hücrelerinde kaybolduğunu gözlemlemişlerdir, bu da scRNA-seq ve RNA-FISH verileriyle tutarlıdır. Zhou ve ark. (2019), tam uzunlukta cDNA sekanslama ve SNP analizine dayanarak, X inaktivasyonunun implantasyondan sonra rastgele meydana geldiğini ve anne veya baba X'ini etkilediğini göstermiştir.

Tek Hücre Transkriptomiklerinin, İmplantasyon Sonrası Nadir Hücre Tiplerini (İlkel Germ Hücreleri ve Amniyon) Tanımlamaya Katkısı

Gametlerin öncülleri olan ilkel germ hücreleri (PGC'ler), genetik ve epigenetik bilginin aktarılması için gereklidir, ancak insan embriyogenezi sırasında ortaya çıkışları hala tam olarak anlaşılamamıştır. İlk olarak Carnegie Aşama 5 (CS5) embriyolarında histoloji yoluyla önerilen (Hertig et al., 1956) olası PGC'ler, daha sonra 12 d.p.f. (CS5c) in vitro kültürlenmiş embriyolarda tanımlanmıştır (Chen et al., 2019; Popovic et al., 2019). EPI ve HYPO soylarıyla ortak belirteçlere sahip olmaları ve insan dışı modellere dayanmaları nedeniyle bunların tanımlanması zordur (Hancock et al., 2021).

Tek hücreli transkriptomik çalışmalar, PGC-'lerin nadirliği nedeniyle ek engellerle karşı karşıyadır. Tyser ve ark. (2021), RaceID algoritmasını uygulayarak, NANOS3, SOX17, DND1 ve DPPA5 eksprese eden ve türler arasında ortak belirteçler DND1 ve PDPN ile doğrulanmış olan ilkel çizgi içindeki bir CS7 PGC popülasyonunu tanımlamıştır. Cui ve ark. (2025), uzamsal transkriptomik ve IF kullanarak bu popülasyonu daha da doğrulamış ve PGC'leri CS7 embriyolarının bağlantı sapına lokalize etmiştir.

Amniyon, EPI'dan türetilen, amniyotik boşluğu oluşturan ve koruyucu ve sinyal verme işlevleri aracılığıyla embriyonik gelişimi destekleyen ekstraembriyonik bir membrandır (Shahbazi, 2020; Chuva de Sousa Lopes ve ark., 2022). TE ile transkriptomik benzerlikler paylaşmasına rağmen, Xiang ve ark. (2020) tarafından yapılan scRNA-seq, amniyonu 12 ila 14 d.p.f. arasında EPI'dan ortaya çıkan, pluripotensi genlerinin aşağı regülasyonu ile karakterize edilen ayrı bir soy olarak tanımlamıştır.

Perspektifler

İnsan embriyonik gelişimini daha iyi anlamak için önemli bir tamamlayıcı unsur, teknolojik yenilik gerektiren tek hücre düzeyinde embriyonik metabolik aktivitenin kesin olarak karakterize edilmesidir. Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) tarafından 10 ila 14 d.p.f. embriyolarından elde edilen scRNA-seq verilerinin yolak analizi, implantasyon sırasında EPI metabolizmasında "oksidatif fosforilasyon"dan "glikoliz"e bir geçiş olduğunu ortaya koymuştur (Ai et al., 2023). Bu nedenle, soy düzeyinde embriyo metabolizmasının daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılması büyük önem taşımaktadır. scMS ve uzamsal görüntüleme gibi teknikler bu tür bilgiler sağlayabilir, ancak teknik sınırlamalar vardır: kontaminantlar, düşük malzeme miktarı ve karmaşık numune hazırlama. Floresan yaşam süresi görüntüleme mikroskobu (FLIM) ve fazör tabanlı hiperspektral görüntüleme ve organel tanıma (METAPHOR) yoluyla metabolik değerlendirme gibi yeni ortaya çıkan non-invaziv yöntemler, insan ve fare embriyolarında hücre kaderi metabolizmasındaki farklılıkları araştırmak için umut verici sonuçlar göstermiştir (Venturas et al., 2022; Parra et al., 2024).

İkincisi, moleküler transkriptomik olayların nasıl düzenlendiğini anlamak için GRN'ler araştırılabilir. scRNA-seq verilerinden GRN'leri çıkarmak, bu tür verilerin doğasında bulunan gürültü ve seyrekliği nedeniyle zorluklar yaratmaktadır (Stock et al., 2025). Ancak, kromatin erişilebilirliği ve DNA fiziksel temas haritaları gibi çoklu omik veri kümelerinden elde edilen "ön bilgi"yi entegre etmek, GRN çıkarımını geliştirebilir. Bu tür bir yaklaşım, tahminleri iyileştirmek ve yanlış pozitifleri en aza indirmek için toplu kromatin erişilebilirlik verilerini kullanarak zaten önerilmiştir. Bu, insan embriyo scRNA seq veri kümelerinin küçük boyutu göz önüne alındığında özellikle önemlidir (Liu ve ark., 2019; Alanis-Lobato ve ark., 2024). Bu strateji, epigenetik scATAC-seq verilerini dahil ederek daha da geliştirilebilir ve daha yüksek çözünürlük ve daha fazla doğruluk sağlayabilir.

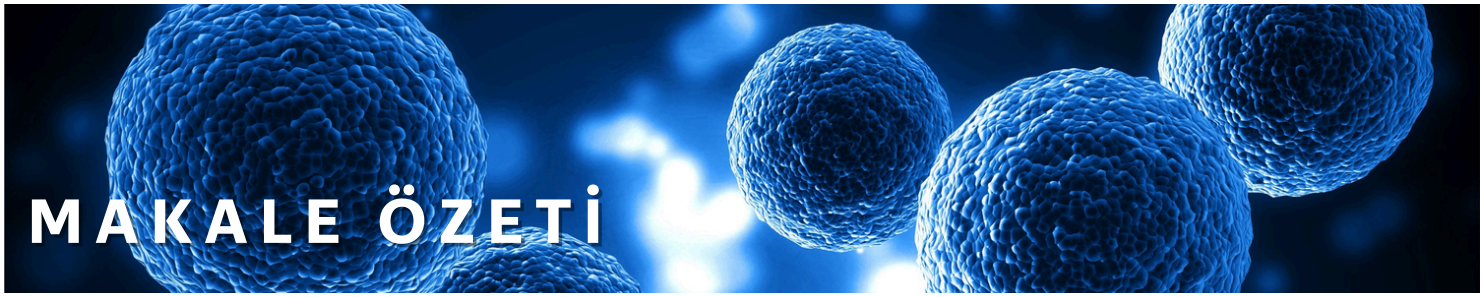
Üçüncüsü, insan embriyoları hakkında şu anda mevcut olan tek hücreli omik veri kümelerinin sayısı sınırlıdır ve bu verilerin işlenmesi ileri düzeyde biyoinformatik uzmanlığı gerektirir.

Biyologlar için faydalarını en üst düzeye çıkarmak amacıyla, birkaç araştırma grubu veri kümelerini çevrimiçi olarak taramak için kullanıcı dostu web arayüzleri oluşturmak için çaba sarf etmiştir (Petropoulos et al., 2016; Meistermann et al., 2021; Radley ve ark., 2023; Proks ve ark., 2025; Zhao ve ark., 2025). Daha ileri bir gelişme, epigenomik, transkriptomik, metabolomik ve proteomik verilerini birleştirerek her aşamadaki embriyonik gelişimin kapsamlı bir "haritasını" oluşturmak için çeşitli omik veri setlerinin entegrasyonu olacaktır (Vandereyken et al., 2023).

Sanal İnsan Gelişimi Konsorsiyumu (www.virtualhumandevelopment.org), insan embriyonik gelişiminin bilgisayar tabanlı bir simülatörünü geliştirmeyi hedeflemektedir. Bu projenin en önemli beklentisi, çalışma hipotezleri önermek ve test etmek için modeli bilgisayar ortamında bozabilme yeteneğidir. Şu anda, tek hücreli omiklerin klinik uygulaması sınırlıdır, çünkü henüz hiçbir moleküler test, bir embriyonun implantasyon potansiyelini tahmin etmede güvenilirliğini kanıtlamamıştır (Hernández-Vargas ve ark., 2020). Ayrıca, bu teknikler embriyolar için invazivdir ve genellikle birden fazla hücrenin biyopsisini gerektirir. Umut verici bir alternatif, kullanılmış kültür ortamlarının non-invaziv analizi ve özellikle implantasyon şansının artmasıyla ilişkili biyobelirteçleri tanımlamak için proteomik profillemedir. Bununla birlikte, düşük girdi, hızlı ve kantitatif testlerin geliştirilmesi ve klinik uygulaması, bu alanda önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir.

Sonuç

Tek hücreli omiklerin sağladığı fırsatlar ve ilerlemeler, temel ve klinik embriyoloji alanında benzeri görülmemiş bir dönüşüm sağlayacaktır. Translasyonel bir bakış açısıyla, insan embriyolarında tek hücreli omiklerden elde edilen bilgiler, üreme tıbbının etkinliği ve güvenliği açısından önemli sonuçlar doğuracaktır. Uygun ve uygun olmayan embriyoların moleküler özelliklerinin daha iyi anlaşılması, IVF'de embriyo kalitesinin değerlendirilmesini gerçekten iyileştirebilir ve morfolojik değerlendirmenin ötesine geçerek daha sağlam, moleküler bilgilere dayalı kararların alınmasını sağlayabilir. Bu bilgi, kültür koşullarının optimize edilmesine ve normal soy belirlemeyi bozan müdahalelerin en aza indirilmesine yardımcı olabilir ve sonuçta ART prosedürlerinin güvenliğini ve etkinliğini artırabilir.



> Reprod Biomed Online. 2023 Nov;47(5):103322. doi: 10.1016/j.rbmo.2023.103322. Epub 2023 Jul 28.

Why we need stem-cell derived gametes

Guido Pennings [1]

Affiliations + expand

PMID: 37677925 DOI: 10.1016/j.rbmo.2023.103322

Hazırlayan
Arş. Gör. Dr. Ali KULABER
KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD

NEDEN KÖK HÜCREDEN TÜRETİLEN GAMETLERE İHTİYACIMIZ VAR?

Özet

In-vitro gametogenez (IVG), neredeyse tamamen fonksiyonel gametleri olmayan insanlar için potansiyel bir çözüm olarak tartışılmaktadır. Ancak, IVG aynı zamanda standart tüp bebek (IVF) tedavisine bir alternatif olarak da görülebilir. Kadınların yumurtalık stimülasyonuna ve invaziv oosit toplama işlemlerine maruz bırakılması yerine, kök hücrelerden oosit üretimi ilk tedavi seçeneği olmalıdır. Bu yöntemin uygulanmasının birincil nedeni, bu kadınların genetik ebeveyn olmasını sağlamak değil, standart tüp bebek tedavisinin fiziksel ve psikolojik yükünü hafifletmektir.

Giriş

Bir süredir embriyonik veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden gamet elde edilmesinin kabul edilebilirliği konusunda bir tartışma sürmektedir. Bu tekniğin bazı gruplar için önemli etkileri bulunmaktadır çünkü onlara genetik olarak ilişkili çocuk sahibi olma imkânı sağlayacaktır.

Bu gruplar arasında menopoz sonrası kadınlar, azoospermik erkekler ve gonadotoksik tedavi sonrası kısır kalan kanser hastaları yer almaktadır. Ayrıca, bilinçsiz ebeveynlik (sahibinin bilgisi olmadan kaybolmuş deri hücrelerinin üremede kullanılması), çoklu ebeveynlik (iki kişiden fazla bireyden genetik materyal kullanılarak embriyo oluşturulması) ve solo üreme (aynı kişiden hem sperm hem de oosit türetilmesi) gibi farklı "aşırı" uygulamalar da tartışılmıştır (Goossens, 2021).

Tartışmanın odak noktası, gamet üretmenin başka bir yolu olmayan kişilerdir. İn-vitro gametogenez (IVG), her bireyin gamet üretmesine olanak sağlayarak kısırlığı sona erdirecektir (Smajdor ve Cutas, 2015). İlginç bir şekilde, bu ifade, donör gamet kullanımının kısırlığı çözmediğini ima etmektedir. Ancak, tartışma, fayda sağlayabilecek en önemli grup olan tüp bebek (IVF) tedavisi gören kadınları göz ardı etmiştir. IVG, oosit (yumurta hücresi) elde etmek için alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmelidir. Bu sonuç, IVG'nin geliştirilmesinin bir nedeni olarak sunulan tek bir çalışmada bile yer almamıştır.

Uygulama Alanı

IVG'nin (in-vitro gametogenez) geliştirilmesinin temel nedeni, gametleri olmayan veya artık gametleri bulunmayan insanlar için fonksiyonel gametler oluşturmaktır. Benim önerim, IVG'yi kısırlık tedavisi için oosit (yumurta hücresi) elde etmek amacıyla alternatif bir yöntem olarak kullanmaktır. Bu tekniğin klinik uygulamada kullanılabilmesi için gerekli adımları tamamladığında, yeterince güvenli ve etkili olduğunun gösterildiği varsayımından hareket ediyorum.

Maliyeti, güvenliği ve etkinliği göz önünde bulundurarak IVG'nin yalnızca kısıtlı ebeveynlerin genetik olarak ilişkili bir çocuğa sahip olmasının tek yolu olduğu durumlarda kabul edilebilir olacağı, ancak bir kadının tüp bebek tedavisinin yükünden kaçınmak istediği durumlarda kabul edilemeyeceği öne sürülebilir. Bu sonuç, kadınlar üzerindeki tüp bebek tedavisinin yüküne yeterince önem verilmediğini açıkça göstermektedir. Bu durum, şu anda mitokondriyal transferle ilgili tartışmayla kıyaslanabilir. Sınırlı kanıtlara dayanarak, İngiltere yetkilileri, mitokondriyal bozuklukları çocuklarına aktarma riski taşıyan hastalar için bu tekniğin klinik kullanım için yeterince güvenli olduğuna karar verdiler. Ancak, bu teknik kısırlık tedavisi için onaylanmadı, her iki uygulama için etkinlik (ya da yetersizlik) kanıtı gösterilmemiş olsa bile mitokondriyal transferin, tekrarlayan tüp bebek başarısızlıkları yaşayan kadınlar gibi belirli gruplar için işe yarayabileceğine dair en azından bazı belirtiler bulunmaktadır (Costa-Borges ve ark., 2023). Ayrıca, mitokondriyal bozuklukları olan hastalar için, kısırlık sorunu olan hastalardan daha yüksek riskler söz konusudur (Pennings, 2022). Her iki grup da esasen genetik olarak ilişkili bir çocuk istemektedir. Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM), 2012 yılında oosit vitrifikasyonunun artık tıbbi nedenlerle oosit dondurma için deneysel bir tedavi olmadığını, ancak sosyal nedenlerle bunu talep eden hastalar için hâlâ deneysel olduğunu kabul ettiğinde çok benzer bir argüman benimsenmiştir (ASRM Uygulama Komitesi, 2012).

Son Çare

Standart tüp bebek tedavisi gören kadınların tartışmada göz ardı edilmesinin altında yatan varsayım, IVG'nin (in vitro gametogenez) bir son çare olarak kabul edilmesidir. Ancak bu varsayım en azından sorgulanabilir. IVG'nin bir son çare çözümü olduğu fikri, her zaman standart tüp bebek protokolünden daha az güvenli ve daha pahalı olacağı varsayımına dayanıyor gibi görünmektedir.

Güvenlik ile ilgili varsayım, kök hücrelerin geniş çapta manipüle edilmesi ve bu hücrelerde genetik ve epigenetik değişikliklerin olma olasılığına dayanmaktadır. Yine de, bu doğru olsa bile, artan bir risk, bu uygulamanın kabul edilemez olduğu anlamına gelmez.

Klinik uygulamalarda, sonucun iyileştiğine dair kanıt olmaksızın halihazırda daha yüksek riskler içeren prosedürler kullanılmaktadır. Örneğin, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), çocuklarda olumsuz neonatal sonuçlara ve doğumsal anormalliklerin artmasına neden olmaktadır (Bosch ve ark., 2020). Bosch ve çalışma arkadaşları, ICSI'nin güçlü ve zayıf yönleri, fırsatları ve tehditleri (SWOT analizi) hakkında şu sonuca varmışlardır: "Bu prosedürün bazı dezavantajları vardır. Bazı durumlarda daha fazla teknik zorluk, daha yüksek maliyetler ve gereksiz invaziv bir tekniğin uygulanmasını içerir. Ayrıca güvenlik sorunlarıyla ilgili sorular göz ardı edilemez." Ancak, ICSI şu anda tüp bebek döngülerinin çoğunda, erkek kaynaklı olmayan kısırlık durumlarında bile kullanılmaktadır. Dolayısıyla, IVG'nin çocuk için biraz daha yüksek riskler taşıdığını varsaysak bile, bu riskler belirli bir aralık içinde kaldığı sürece ve başka faydalar sağlandığı gösterildiğinde kabul edilebilir olacaktır.

İkinci argüman, kök hücrelerin yeniden programlanmasının maliyetine ilişkindir. IVG'nin pahalı olma olasılığı vardır, ancak bu, hâlâ birçok farklı yol araştırıldığı için tahmin edilmesi zordur. Ancak toplam maliyet, birkaç tüp bebek döngüsünün toplam maliyetinden daha düşük olabilir. Şu anda, tüp bebek tedavisinin büyük bir kısmı, yumurtalık stimülasyonu için kullanılan ilaçlar ve yumurtaların toplanması için yapılan cerrahi (hastaneye yatış ve anestezi dahil) ile ilgilidir.

Düşük yumurta verimi veya düşük döllenme oranı nedeniyle birden fazla döngü gerektiğinde, bu maliyetler aşırı derecede yüksek olabilir. Oysa ki, yumurtalık stimülasyonu sonucunun aksine, IVG (tartışmada da belirtildiği gibi) neredeyse sınırsız sayıda oosit üretecektir. Ayrıca, tekniğin önümüzdeki yıllarda geliştirilmesi muhtemeldir, bu da maliyetin düşmesine yol açacaktır.

Yükün Azaltılması

IVG'nin (in vitro gametogenez) düzenli kısırlık tedavisindeki en önemli faydası, kadınlar için riskleri ve yükü azaltmaktır. Tüp bebek tedavisi, yüksek sayıda yumurta hücresi elde etmek amacıyla bir kadının yumurtalıklarının aşırı uyarılmasına dayanır. Yumurtalık uyarımı, kadınlar için önemli sağlık riskleri taşımaktadır. Geleneksel stimülasyon protokolleri, yüksek hasta rahatsızlığı, yüksek maliyetler ve hafif ile ağır yumurtalık hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gibi her türlü tıbbi komplikasyon ile ilişkilidir (Alper ve Fauser, 2017).

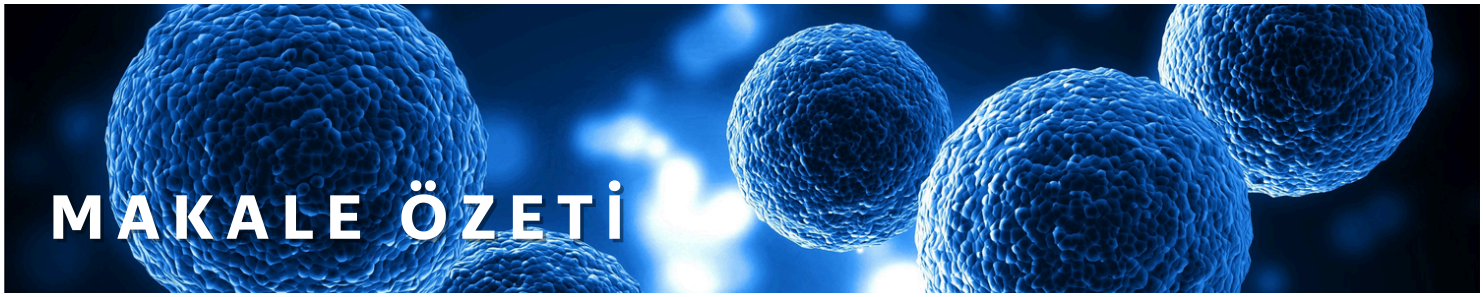
Tüp bebek tedavisinin fiziksel ve psikolojik yükü, hastaların kısırlık tedavisini bırakmalarının ana nedenlerinden biridir (Gameiro ve ark., 2012). Tıbbi etkilerin yanı sıra, OHSS'nin küçük komplikasyonları ekstra klinik ziyaretlere, günlerce veya haftalarca çalışamama durumuna ve genel yaşam kalitesinde bir kayba yol açabilir. Yumurtaların toplanması da tüp bebek döngüsünün çok zorlayıcı bir kısmı olarak deneyimlenmektedir.

Ayrıca, artan kanser risklerini araştıran çalışmalar şu anda kesin sonuçlar vermemekle birlikte, yumurtalık uyarımının kadınların uzun vadeli sağlığını olumsuz yönde etkileyebileceği ihtimali bulunmaktadır (Brinton, 2017). Bu dezavantajlar ve riskler önlenebilirse, bu tüp bebek tedavisinde büyük bir iyileşme sağlayacaktır.

IVG'nin oosit elde etmek için kullanılması, tüp bebek tedavisinin fiziksel ve duygusal yükünü büyük ölçüde azaltabilir. Feminist görüşlere sahip bireyler, kadınlar için söz konusu olan riskler nedeniyle tüp bebek tedavisinin normalleşmesine özellikle karşı çıkmışlardır (Petropanagos ve ark., 2015). IVG'nin bu potansiyel faydasının tartışmada bile geçmemesi, kadınlar üzerindeki yükün doğal bir durum olarak kabul edildiğini ve özel bir dikkati gerektirmediğini göstermektedir. Avrupa'da 2018 yılında 550.000'den fazla IVF/ICSI döngüsü gerçekleştirildiği göz önüne alındığında, tıbbi ve psikolojik komplikasyonların önlenmesi kamu sağlığı meselesi olarak değerlendirilmelidir.

Sonuç

IVG'nin (in vitro gametogenez) klinikte tanıtılması, şu anda tüp bebek tedavisine ihtiyaç duyan geniş bir kadın grubunda en büyük etkiyi yaratabilir. Yumurtalık stimülasyonu ve oosit toplama geçmişte kalacak ve çok daha kadın dostu bir tedavi sağlayacaktır. Sadece bu neden bile, IVG'nin geliştirilmesini değerli kılmaktadır.



Observational Study > Reprod Biol Endocrinol. 2023 Apr 24;21(1):39.
doi: 10.1186/s12958-023-01091-9.

Human papillomavirus infection in women undergoing in-vitro fertilization: effects on embryo development kinetics and live birth rate

Federica Zullo [1], Valentina Fiano [2], Anna Gillio-Tos [3], Sara Leoncini [1], Ginevra Nesi [1], Luigia Macrì [3], Mario Preti [1], Alessandro Rolfo [4], Chiara Benedetto [1], Alberto Revelli [5], Laura De Marco [3 2]

Affiliations + expand

PMID: 37095514 PMCID: PMC10123972 DOI: 10.1186/s12958-023-01091-9

Hazırlayan
Arş. Gör. Dr. Gülten AYDIN
KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD

TÜP BEBEK TEDAVİSİ GÖREN KADINLARDA İNSAN PAPİLLOMA VİRÜSÜ ENFEKSİYONU: EMBRİYO GELİŞİM KİNETİĞİ VE CANLI DOĞUM ORANI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Giriş:

İnsan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu, oldukça sık görülen, yaşam boyu cinsel olarak aktif erkek ve kadınların yarısını etkileyebilen cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. HPV enfeksiyonu için ana risk faktörleri; düşük sosyoekonomik durum, coğrafi konum, yaşam tarzı, yüksek cinsel partner sayısı ve yaştır. 25 yaşın altındaki ve 55 ila 64 yaş arasındaki kadınlarda HPV enfeksiyonu riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. HPV, insan epitel dokusu için spesifik tropizmi olan bir DNA virüsüdür. Enfekte hücrelerin neoplastik transformasyonunu indükleme yeteneklerine dayanarak düşük riskli (LR-HPV) veya yüksek riskli (HR-HPV) olarak sınıflandırılan yaklaşık 200 farklı HPV genotipi vardır. HPV enfeksiyonu sıklıkla geçici ve asemptomatik olmasına rağmen, HR HPV'ler kansere dönüşen genital lezyonların başlıca etkenidir. Rahim ağzı kanseri, sırayla, dünya çapında en sık görülen dördüncü kadın kanseridir (düşük sosyo-ekonomik indeks alanlarında ikinci); ayrıca HR-HPV enfeksiyonu vajina, vulva, anüs, penis, orofarenks ve ağız boşluğu kanserleri ile de ilişkilidir.

Son araştırmalar HPV'nin doğurganlığı ve muhtemelen tüp bebek tedavisinin (IVF) etkinliğini etkileyebileceğini öne sürüyor. Erkeklerde, HPV'nin semen üzerinde sperm motilitesinin azalması ve sperm DNA fragmantasyonunun artması gibi etki gösterir. HPV, spermatozoaları başın ekvator bölgesi boyunca bağlayabilir, muhtemelen viral DNA'yı oositlere iletebilir ve son olarak embriyonik gelişimi etkileyebilir. Fare modelinde, sperm HPV enfeksiyonunun blastosist oluşum hızını azalttığı, hathching sürecini engellediği ve embriyonun implante edilme şansını azalttığı gösterilmiştir. HPV'nin kadın doğurganlığı üzerindeki etkisi belirsizdir. HPV ile ilişkili servikal sitoloji anormalliklerinin infertil kadınlarda genel popülasyona göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca, HPV ile bilinen bir infertilite nedeni olan pelvik endometriozis arasında bir korelasyon gözlenmiştir.

Bazı çalışmalar, kadın HPV enfeksiyonunun in vitro fertilizasyonun (IVF) başarı oranını bile düşürebileceğini, düşük riskini artırabileceğini ve nihayetinde canlı doğum oranını azaltabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu bulgular diğer raporlarla doğrulanmamış ve hala tartışma konusu durumundadır. Bu çalışma gözlemsel prospektif bir kohort çalışması olarak tasarlandı ve hem IVF uygulanan kadınlarda HPV prevalansını hem de HPV enfeksiyonunun embriyo morfokinetik ve IVF sonucu üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçladı.

Materyal Ve Metot:

Çalışma popülasyonu:

S. Anna Hastanesi (Torino Üniversitesi) Üreme Fizyopatolojisi ve Tüp Bebek Ünitesi'nde IVF programının bekleme listesinde yer alan 30-43 yaşları arasında çift infertilitesi olan toplam 457 kadından HR-HPV testi için servikal sürüntü alındı. Bunlardan 326'sı çalışma döneminde (Ocak – Ekim 2021) ilk IVF tedavisini gördü ve IVF sonuç analizine dahil edildi. Servikal sürüntüde HPV pozitif çıkanlara HPV genotiplemesi ve servikal sitoloji (PAP testi) yapıldı. Ayrıca, servikal pozitiflik durumunda, HPV-DNA'nın varlığı endometriyal hücrelerde (IVF prosedürüne başlamadan önce sahte bir embriyo transferi sırasında toplanan) ve granüloza hücrelerinde (oosit alımı sırasında foliküler sıvıdan toplanan) da test edildi.

Çalışma, Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiş ve yerel Etik Komite tarafından yetkilendirilmiştir. Tüm hastalardan imzalı bilgilendirilmiş onam alındı. Servikal hücre örneklemesi, HR-HPV testi, PAP testi, endometrial hücre örneklemesi, servikal örnekleme, IVF prosedürüne başlamadan yaklaşık bir ay önce, belirli bir örnekleme seti (ThinPrep, Holo-gic) kullanılarak, hücreler servikal kanaldan ve serviksin iç ve dış kısmından nazikçe kazınarak gerçekleştirildi. Servikal örnekler 10 ml'lik bir taşıma ortamında (PreservCyt®, Hologic, ThinPrep) saklandı ve bir kimlik numarası ile etiketlendi. Daha sonra izole edilen servikal hücreler üreticinin talimatlarına göre Rapid Capture System® (RCS; Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak Hybrid Capture 2 assay Yüksek Risk HPV DNA testi (HC2, Qiagen, Hilden, Almanya) ile test edildi. HC2 testi servikal hücrelerde 14 HPV tipinin (HPV16, -18, -31, -33, -35, -18, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 ve - 68) kalitatif tespiti için sinyal amplifikasyonlu bir nükleik asit hibridizasyon testidir.

HC2 sonuçları, numunenin ışık emisyonu (göreceli ışık birimleri [RLU]) ile eş zamanlı olarak test edilen üç pozitif kontrolün (CO) ortalaması arasındaki oran olarak ifade edildi. Oran (RLU/CO) ≥ 1 olduğunda numuneler pozitif kabul edildi. HPV testinin pozitif çıkması durumunda, aynı örnekten sitolojik smear alındı ve olası herhangi bir servikal lezyonun morfolojik özelliklerini tespit etmek için Papanicolaou boyaması (Pap Test) ile boyandı. Sitoloji, Bethesda 2001 sistemi kullanılarak sınıflandırıldı: veriler, malignite (NILM), düşük dereceli (LSIL, ASC-US ve AGC) veya yüksek dereceli (ASC-H, HSIL, adenokarsinom in situ-AIS- ve kanser) intraepitelyal lezyonlar için negatif olarak sınıflandırıldı.

DNA ekstraksiyonu, HPV-DNA tespiti ve genotipleme:

DNA, servikal, endometriyal ve granüloza hücrelerinden QIAamp DNA Mini Kiti® (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak, üreticinin talimatına uygun olarak ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen DNA, NanoDrop® ND-1000 spektrofotometresinde ölçüldü ve DNA kalitesini kontrol etmek için, β-globin (152 baz çifti uzunluk (bp) temizlik geni, iCycleriQ™ Gerçek Zamanlı PCR Detection Sistemi (BioRad®, Hercules, CA, ABD) kullanılarak klinik örneklerden amplifiye edildi.

PCR reaksiyonu 2X SYBR Green Supermix (BioRad®), 0.3 µM β-globin primer [ileri (5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'); ters (5'CAACTTCATCCACGTTCACC3')] [32] ve 2 µl DNA örneği içeriyordu. Her örnek iki kopya halinde analiz edildi ve her çalışmaya DNA'sız bir kontrol dahil edildi. HPV varlığını test etmek için, 150 bp'lik bir L1 bölgesi, GP5 + / GP6 + konsensüs primerleri ile amplifiye edildi ve çok çeşitli HPV tiplerinin saptanması sağlandı. Konsensüs primerleri GP5+ (5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3') ve GP6+ (5'GAAAAATAAACTGTAAATCATATT3') kullanıldı. Her PCR çalışmasına bir pozitif (SIHA hücre hatları) ve bir negatif kontrol (DNA'sız) eklendi. PCR amplikon varlığı, etidyum bromür ile boyanmış %2'lik agaroz jel üzerinde kontrol edildi. GP5+/GP6 + PCR testi pozitif çıkan numuneler, INNO-LiPA® HPV Genotiplendirme Ekstra II Amplifikasyon testi (FUJIREBIO, Belçika) kullanılarak genotiplendirildi. Bu test, bir ön amplifikasyon adımından sonra ters hibridizasyon kullanarak aynı anda 32 farklı HPV genotipini tanımlayabilir. PCR reaksiyonları, SPF10 biyotinile konsensüs primerleri kullanılarak termodöngüleyicide (GeneAmp PCR System 9700) gerçekleştirildi.

Biyotinile edilmiş amplikonlar, membran şeritleri üzerine sabitlenmiş spesifik oligonükleotid probları ile denatüre edildi ve hibridize edildi. Ters hibridizasyondan sonra, mor bir çökelti veren bir çalkalayıcı üzerinde 20-25 ° C'de BCIP / NBT kromojeni ile inkübe edildi ve sonuçlar görsel olarak yorumlandı (INNO-LiPA® HPV Genotyping Extra II Ampmanual).

Tüp bebek prosedürü:

Gonadotropinlerle Kontrollü Over Stimülasyonu (COS) standart protokollere göre gerçekleştirildi. Foliküler büyüme, seri transvajinal ultrason (TV-US) ve 7. günden itibaren her iki günde bir dolaşımdaki estradiol (E2) ölçümü ile izlendi. En az iki folikül ortalama 18 mm çapa ulaştığında, uygun E2 seviyeleri ile, yumurtlamayı tetiklemek için 10.000 IU hCG'lik (Gonasi HP, IBSA, Pambio Noranco, İsviçre) tek bir subkutan enjeksiyon uygulandı. Transvajinal US eşliğinde oosit toplama (OPU) 35-37 saat sonra lokal anestezi altında (paraservikal blok) yapıldı. Foliküler sıvı aspire edildi ve stereomikroskop altında hemen izlendi. Kümülüs-oosit kompleksleri (COC'ler) tamponlu ortamda (Folikül Yıkama Tamponu – COOK Medikal, İrlanda) yıkandı ve uygun kültür ortamı (Döllenme Ortamı - COOK Medikal, İrlanda) kullanılarak kontrollü atmosferde (37 ° C,% 5 O2,% 6.5 CO2) inkübe edildi. OPU'nun aynı günü, Dünya Sağlık Örgütü yönergelerine (WHO laboratuvar kılavuzu, 2010) göre sperm konsantrasyonunu, hareketliliğini ve morfolojisini değerlendirmek için semen örnekleri incelendi. Daha sonra morfolojik olarak normal spermatozoaları seçmek için yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile hazırlık yapıldı. OPU'dan birkaç saat sonra oositler semen parametrelerine göre konvansiyonel IVF veya ICSI (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) ile döllendi. Normal döllenme, 16-18 saat sonra (Gün 1), iki pronükleusun (2PN) varlığı ve ikinci polar cismin ekstrüzyonu incelenerek değerlendirildi.

Embriyolar, gelişimin 3. gününe kadar mineral yağ ile kaplanmış önceden dengelenmiş bölünme medyumunda (Cleavage Medium - COOK Medical, İrlanda) kültürlendi; bu aşamada besiyeri değişikliği yapıldı ve yenisi (Blastosist Medium - COOK Medikal, İrlanda) blastosist evresine (5-6. gün) kadar tutuldu.

Embriyo morfolojik değerlendirmesi ilk olarak Entegre Morfoloji Bölünme Skoru (IMCS) kullanılarak 2. günde ve daha sonra The Istanbul Consensus Workshop'a göre 5. günde yapıldı. Embriyonik gelişimin kinetiği hakkında bilgi edinmek için, embriyolar entegre embriyo izleme sistemi ile Geri plus® time-lapse sistemi (Genea Biomed, Almanya) kullanılarak mikro kuyucuklarda (bir zigot/mikro kuyu) kültüre edildi. Geri plus ®, kültür koşullarını değiştirmeden düzenli zaman aralıklarında (her 5 dakikada bir) embriyo büyümesini sürekli olarak (24 saat/24) gözlemlemeyi sağlayan son nesil bir inkübatördür. Geri plus® ile elde edilen tüm videolar analiz edildi ve aşağıdaki morfokinetik parametreler dikkate alındı: pronükleer görünüm zamanı (tPNa), pronükleer kaybolma (tPNf), iki, üç, dört ve sekiz hücreye bölünmenin tamamlanması (sırasıyla t2, t3, t4 ve t8), blastülasyon başlangıcı (tSB), tam blastosist gelişiminin tamamlanması (tB), hatching sürecinin başlatılması (tHN). Uterusta embriyo transferi (ET), grubumuz tarafından

daha önce bildirildiği gibi, transvajinal US eşliğinde yumuşak kateter Sydney Guardia (COOK Medical, İrlanda) kullanılarak 5. günde gerçekleştirildi.

İstatistiksel analiz:

Güç hesaplaması için birincil kriter, IVF'ye aday olan infertil kadınlar arasında HPV enfeksiyonu prevalansıydı. Buna göre güç hesaplaması şu şekilde yapıldı: Mevcut epidemiyolojik veriler göz önüne alındığında, HPV enfeksiyonunun tüp bebek uygulanan kadınlar arasında genel popülasyona göre %10 daha sık olabileceği ve 450 deneğin 0,05 alfa hata ile %80'lik bir istatistiksel güce ulaşabileceği varsayıldı. IVF uygulanan kadınları servikal sürüntüde HPV enfeksiyonu varlığına veya yokluğuna göre alt bölümlere ayıran analizler yapıldı. Verilerin normal dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirildi. HPV pozitif ve negatif kadınlar arasındaki karşılaştırma Student t-testi (sürekli değişkenler) veya $\chi 2$ testi (kategorik değişkenler) kullanılarak yapıldı ve sonuçlar ortalama ve standart sapma veya yüzde olarak ifade edildi. Tüm istatistiksel testler eşleştirilmemiş ve iki taraflı veriler için yapıldı; p değeri < 0,05 anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

HPV enfeksiyonu prevalansı ve genotiplendirme

Çalışmaya alınan 457 kadından 41'i (% 8.9) servikal sürüntüde HPV pozitif sonuçlandı. Ortalama yaşları 36.5 ± 3.7 yıl idi ve HPV prevalansı genç kadınlarda daha yüksekti ve aynı yaş aralığındaki genel popülasyonda gözlenene benzer şekilde yaşla doğrusal olarak azaldı. İnfertilite nedenleri arasında, endometriozis HR-HPV pozitif kadınlarda negatif kadınlara göre anlamlı olarak daha sık görülen sebepti. (%31.6'ya karşı %10.1; p < 0.01). HPV pozitifliği durumunda, sitolojik lezyonların varlığını değerlendirmek için Pap testi yapıldı.

Hastaların % 80'i intraepitelyal lezyonlar veya malignite (NILM) için negatif, % 16.6 ve% 3.3'ünde LSIL veya HSIL vardı. Genotiplemeden sonra HPV16 en sık görülen genotip (%17.8) olurken, bunu HPV18 ve 59 (%8.21), 45 ve 66 (%6.85), 31, 33, 51 ve 52 (%4.11) izledi.

Kurumumuz Düşük Genital Sistem Enfeksiyonları Birimi uzmanlarının önerisine göre, HSIL hastalar geçici olarak tüp bebek programından çıkarılmış, LSIL hastalar ise programa kabul edilmiştir. İlginçtir ki, granüloza ve endometriyal hücreler, servikal sürüntüde HPV pozitif olan kadınların sırasıyla % 61'inde (25/41) ve % 48'inde (20/41) HPV için pozitif sonuç verdi. Endometriyal biyopsi, rahim ağzından herhangi bir kontaminasyonu önlemek için dış kısmı olan modifiye bir Vabra kateteri kullanılarak yapılmıştı.

Tüp bebek sonucu:

Çalışmanın yapıldığı dönemde ilk IVF'sini geçiren 326 hastanın bazal klinik özellikleri ve IVF sonuçları sırasıyla **Tablo 1 ve 2'**de özetlenmiştir. 27 HPV pozitif ve 299 HPV negatif kadın karşılaştırıldığında, ana bazal özellikler için anlamlı bir fark gözlenmedi: yaş, BMI, AMH, bazal (3. gün) FSH ve antral folikül sayısı (AFC) (**Tablo 1**).

Yumurtalıkların COS'a verdiği yanıt iki grupta da benzerdi ve bu da benzer oosit verimine yol açtı; hatta yumurta yeterliliği bile benzerdi ve benzer döllenme oranı, bölünme oranı ve embriyo bulunabilirliği vardı (**Tablo 2**). Embriyo morfolojik skoru HPV pozitif ve negatif kadınlarda benzerdi; Tüm hastalarda rahim içine transfer edilecek en az bir blastosist vardı ve hepsine tek bir embriyo transferi yapıldı.

Toplam 108 klinik (ultrason onaylı) gebelik gözlendi (Klinik Gebelik Oranı / başlatılan döngü:% 33.1); düşük oranı HPV pozitif kadın için istatistiksel olarak farklı değildi. (% 25'e karşı. % 15, p = 0.455). Son olarak, canlı doğum oranı/başlangıç döngüsü (LBR/SC) benzerdi. (HPV pozitif için %22.2, HPV negatif kadınlar için %28.1, p = 0.513) (**Tablo 2**).

Genel olarak, 845 embriyo Time-Lapse Sistemi kullanılarak analiz edildi; 446'sı blastokist evresine ulaşmış, bunların 202'si HPV pozitif, 244'ü negatif kadınlardan elde edilmiştir (Tablo 3). Erken gelişim aşamalarında, HPV pozitif gruptaki embriyolar, önemli ölçüde daha kısa pronükleus kaybolma süresi (tPNf) (23.40 ± 2.64'e karşı 24.95 ± 5.39 saat, p = 0.005) ve pronükleusların görünümü ile kaybolmaları (tPNf-tPNa) arasında önemli ölçüde daha kısa bir aralık (15.51 ± 2.83'e karşı 17.40 ± 5.90 saat, p = 0.014) ile daha hızlı bir kinetik gösterdi.

Takip eden günlerde, embriyo kinetiği, blastosist aşamasına (tB) kadar iki grup arasında benzerdi; blastosist aşamasının tamamlanması HPV pozitif kadınların embriyolarında, HR-HPV negatif deneklerin embriyolarına kıyasla önemli ölçüde daha yavaştı.(tB 122,76 ± 9,04 vs. 118,90 ± 10,20 dk, p = 0,049) **(Tablo 3**).

Tablo 1: İlk IVF döngüsüne giren 326 kadının (27 HPV pozitif ve 299 HPV negatif) klinik özellikleri

	HPV pozitif (n = 27)	HPV negatif (n = 299)	P
Yaş (yıl)	36,4 ± 3,7	36,5 ± 3,6	0,855
Vücut Kitle İndeksi (kg/ m^2)	21,8 ± 3,3	22,5 ± 3,8	0,156
AMH (ng/ml)	3,4 ± 4,2	3,2 ± 3,4	0,869
3. Gün FSH (IU/l)	8,5 ± 2,1	8,0 ± 4,3	0,394
Antral Folikül Sayımı (AFC)	12,7 ± 9,9	13,1 ± 7,3	0,830

Veriler ortalama ± SD veya yüzde olarak gösterilir

Tablo 2: HPV testi yapılmış 326 kadının (27 HPV pozitif ve 299 HPV negatif) IVF tedavisinin klinik sonuçları

Table 2 Clinical outcome of IVF treatment of 326 HPV-tested women (27 HPV-positive and 299 HPV-negative).

	HPV-positive (n = 27)	HPV-negative (n = 299)	p
Total exogenous FSH (IU)	2491 ± 878	2640 ± 998	0,409
Peak endometrial thickness (mm)	10.4 ± 2.0	10.2 ± 2.0	0,677
Peak E2 (pg/ml)	2200 ± 2198	1950 ± 1241	0,565
Retrieved oocytes (n)	8.5 ± 7.2	8.3 ± 5.8	0,890
Mature (MII) oocytes (%)	73.5 ± 29.4	82.2 ± 18.3	0,148
Fertilized (2PN) oocytes (%)	65.6 ± 28.3	71.3 ± 24.1	0,343
Cleaved embryos (%)	97.8 ± 10.4	96.4 ± 12.3	0,550
Transferred embryos (n)	33	449	
Implantation rate (%)	24.2	25.8	0,840
Pregnancy rate/started cycle (%)	33.3	35.8	0,799
Clinical Pregnancy Rate/started cycle (%)	29.6	33.4	0,687
Ongoing Pregnancy Rate/started cycle(%)	22.2	28.4	0,491
Miscarriage rate (%)	25	15	0,455
Live Birth Rate/started cycle (%)	22.2	28.1	0,513

Data are shown as mean ± SD or as percentage

Tablo 3: TLS GERI plus® ile kaydedilen embriyo morfokinetik parametreleri

	Embriyolar HPV pozitif kadınlar (n = 202)	Embriyolar HPV negatif kadınlar (n = 244)	Δ zamanı	P
tPNa (h)	7,97 ± 2,07	7,47 ± 1,89	0,50	0,150
tPNf (h)	23.40 ± 2.64	24,95 ± 5,39	- 1,55	**0,005**
t2 (saat)	27.00 ± 3.75	28.15 ± 4.87	– 1.15	0,051
t3 (saat)	36,99 ± 4,90	37,91 ± 10,16	- 0,92	0,389
t4 (saat)	39,03 ± 7,82	40.12 ± 9.42	– 1.09	0,369
t8 (h)	62.15 ± 13.08	62.19 ± 14.78	– 0,04	0,986
tSB (h)	102,32 ± 8,72	100,25 ± 9,58	2.07	0,205
tB (saat)	122,76 ± 9,04	118,90 ± 10,20	3.86	**0,049**
tHN (h)	115,55 ± 7,92	113,29 ± 11,41	2.26	0,429
tPNf – tPNa (h)	15,51 ± 2,83	17.40 ± 5.90	- 1,89	**0,014**
t2 – tPNf (h)	3,58 ± 2,97	3,52 ± 2,26	0,06	0,874
t3 – t2 (saat)	10.19 ± 3.98	9,72 ± 8,52	0,47	0,594
t4 – t3 (saat)	2,42 ± 4,72	3,08 ± 5,49	– 0,66	0,367
t4 – t2 (saat)	12,55 ± 6,65	12.30 ± 7.21	0,25	0,798
t8 – t4 (h)	23,34 ± 11,64	24.13 ± 13.27	– 0,79	0,690

HPV pozitif kadınlara ait 202 embriyo ve HPV negatif kadınlara ait 244 embriyo için zaman ve zaman aralıkları gösterilmiştir. ΔTime sütunu, her morfokinetik parametre için HR-HPV pozitif kadınlara ait embriyolar ile negatif kadınlara ait embriyolar arasındaki farkı göstermektedir. Değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

Granüloza hücrelerinde HPV enfeksiyonu olan veya olmayan hastaların IVF sonucu, olgun oosit oranı (sırasıyla 69.3 ± %34'e karşı 79.3 ± %21.8, p = 0.37), döllenmiş oositlerin oranı (sırasıyla %57.8 ± %33.6 ± 74.8 %17.8, p = 0.13) ve embriyo morfolojik skoru (7.2 ± 1.6'ya karşı 6.5 ± 1.9, p = 0.37) dahil olmak üzere tüm klinik parametreler için benzerdi. Ayrıca, granüloza pozitif veya negatif hücreleri olan hastalara ait embriyoların morfokinetik analizi, LBR / SC'nin yanı sıra önemli ölçüde farklı değildi (gösterilmedi). Farklı olarak, endometriyal hücrelerin HPV pozitifliği, HPV-negatif endometriyumlu kadın-larda (%42.8) gözlenenden çok daha düşük bir LBR/SC (%14.7) ile sonuçlandı, ancak fark, muhtemelen sınırlı sayıda gözlem nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı değildi.

SONUÇ:

Sonuç olarak, mevcut çalışma IVF adayı kadınlarda HPV enfeksiyonunun yaygınlığının aynı yaş aralığındaki genel kadın popülasyonuyla benzer olduğunu doğrulamaktadır, HPV'nin kadın genital organları boyunca hareket edebildiğini ve bir şekilde pelvik endometriozis oluşumunda rol oynayabileceğini göstermektedir veHPV'nin başlatılan döngü başına canlı doğum oranı da dahil olmak üzere ana IVF sonuçlarını önemli ölçüde etkilemeden, in vitro üretilen embriyoların gelişim kinetiğini hafifçe etkilediğini göstermektedir.