



# Oosit Morfolojik Komponentlerinin Fertilizasyona Etkisi

## Impact of Oocyte Morphological Components on Fertilization

Zehra Sema ÖZKAN, Mustafa EKİNCİ, Hüseyin TİMURKAN, Ekrem SAPMAZ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Elazığ

### Özet

**Amaç:** Polar cisimcik (PB) büyüklüğü, zona pellusida (ZP) kalınlığı ve oosit sitoplazma (OS) çapının fertilizasyon üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak.

**Gereç ve Yöntem:** Bu ileriye yönelik randomize çalışmaya tubal faktör etiyojisi ile intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) uygulanan 224 matür oosit dahil edildi. ICSI esnasında mikroskop altında PB'nin yatay ve dikey çapları (mikrometre), ZP'nin saat 3-6-9-12 hizalarındaki kalınlıkları (mikrometre) ve oosit sitoplazmasının yatay ve dikey çapları (mm) ölçülüp aritmetik ortalamaları hesaplandı. ICSI'dan 24 saat sonra pronükleus oluşumuna göre fertilizasyon kontrolü yapıldı.

**Bulgular:** Çalışmadaki olguların ortalama yaş, vücut kitle indeksi, antral folikül sayısı, matür oosit sayısı ve stimülasyon süresi sırasıyla 31.5±4.2 yıl, 26.5±4.7 kg/m<sup>2</sup>, 12.9±4.5, 13±3.8 ve 8.1±0.9 gün idi. Ortalama PB çapı, ZP kalınlığı ve OS çapı sırasıyla 6.1±1.1 mcm, 6.4±0.5 mcm and 36.7±1.9 mm idi. ROC analizinde ZP kalınlığı için AUC= 0.47, LR+= 2.4 ve 7.275 mcm cut-off kabul edildiğinde fertilizasyon %93.7 spesifite ve %6 sensitivite ile öngürebilir. Regresyon analizinde sadece ZP kalınlığı (RR: 5.3, %95 GA: 1.85-15.19, p=0.002) fertilizasyon oranı üzerine etkili bulundu.

**Sonuç:** Oosit morfolojik komponentlerinden ZP kalınlığının fertilizasyon oranı üzerine etkisi olduğunu gözledik.

**Anahtar sözcükler:** Fertilizasyon; oosit morfolojisi; oosit sitoplazması; polar cisimcik; zona pellusida.

### Summary

**Background:** To investigate the impact of polar body size, zona pellucida thickness, and oocyte cytoplasm diameter on fertilization rate.

**Methods:** This prospective randomized study was conducted with a total of 244 mature oocyte picked up from tubal factor infertility. The size of polar body (two dimensions, micrometer), thickness of zona pellucida (four dimensions at direction of clock 3-6-9-12, micrometer) and diameter of oocyte cytoplasm (two dimensions, mm) were measured during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure. Twenty-four hours later, two pronucleus formation was controlled.

**Results:** The mean age, body mass index, antral follicle count, number of mature oocytes, and stimulation duration of cases were respectively 31.5±4.2 years, 26.5±4.7 kg/m<sup>2</sup>, 12.9±4.5, 13±3.8 and 8.1±0.9 days. The mean size of polar body, thickness of zona pellucida, and diameter of oocyte cytoplasm were respectively 6.1±1.1 mcm, 6.4±0.5 mcm and 36.7±1.9 mm. In ROC analysis, AUC for zona pellucida thickness was 0.47 LR+=2.4 and 7.275 mcm cut-off value predicts fertilization with 93.7% specificity and 6% sensitivity. In regression analysis, only zona pellucida thickness showed influence on fertilization rate (RR: 5.3, 95%CI: 1.85- 15.19, p=0.002).

**Conclusion:** We observed that thickness of zona pellucida has an impact on fertilization rate.

**Key words:** Fertilization; oocyte morphology; oocyte cytoplasm; polar body; zona pellucida.

**İletişim:** Dr. Zehra Sema Özkan.  
Fırat Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, 23119 Elazığ  
**Tel:** 0424 - 237 11 80

**Başvuru tarihi:** 16.07.2013  
**Kabul tarihi:** 21.08.2013  
**Online baskı:** 15.03.2014  
**e-posta:** zehrasema@yahoo.com



## Giriş

Günümüzde intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) başarısının işlem için seçilen oositin kalitesine bağlı olduğu geçerli olsa da,<sup>[1]</sup> oositin kalitesinin nasıl ve hangi yöntemle belirleneceği hala belli değildir. Oosit kalitesi polar cisimcik (PB), zona pellusida (ZP), perivitellin aralık ve oosit sitoplazma (OS) morfolojik özelliklerine göre belirlenebilir diyenler olduğu gibi buna karşı çıkanlar da bulunmaktadır.<sup>[2,3]</sup> Yapılan çalışmaların bazıları oosit morfolojisinin fertilizasyon üzerine etkisi olmadığını,<sup>[4,5]</sup> bazıları da morfolojik özelliklerin fertilizasyonu ve embriyoner gelişimi etkilediğini bildirmektedir.<sup>[6,7]</sup>

Morfolojik açıdan bakıldığında sitoplazmik granül, fragmanlı PB ve sitoplazmik vakuol varlığı oosit kalitesini bozmaktadır.<sup>[6,8]</sup> Fragmente PB'li oositlerin fertilizasyon oranlarının, normal görünümlü PB'li oositlerden daha düşük olduğu ve sitoplazmik yetersizliğe işaret ettiği düşünülmektedir.<sup>[9]</sup> Oosit boyutu ve component oranlarının, oosit kalitesi adına ipucu verebileceği ileri sürülmektedir.<sup>[4,10]</sup>

Bu çalışmada PB büyüklüğü, OS çapı ve ZP kalınlığının fertilizasyona etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

## Hastalar ve Yöntem

Bu ileriye yönelik çalışmaya hastanemiz Tüp Bebek Ünitesi'nde Ağustos 2012-Aralık 2012 tarihleri arasında tubal faktör, açıklanamayan infertilite ve azalmış over rezervi tanılılarıyla yapılan 22 kontrollü overyan hiperstimülasyon-ICSI siklusunda toplanan 244 matür oosit dahil edildi. Fertilizasyonu etkileyeceğini düşündüğümüz erkek faktörü, endometriozis, ileri anne yaşı ve anovulasyon endikasyonu ile toplanan matür oositler çalışma dışı tutuldu. Siklusların %64'ünde gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonisti, %36'sında ise GnRH antagonist ile hipofizer down-regülasyon yapıldı.

Stimülasyona hastanın over rezervine göre rekombinant FSH±human menopozal gonadotropin ile adetini ikinci ya da üçüncü günü agonist/antagonist protokole uygun başlandı. En az üç tane 17 mm ve üstü folikül varlığında final maturasyon için rekombinant human koryonik gonadotropin (hcG) injeksiyonu uygulandı. hcG uygulamasının 35/36. saatinde oosit pick-up (OPU) işlemi ile yumurtalar toplandı. Ardından ejakulat spermleri ile ICSI işlemi yapıldı. ICSI esnasında

mikroskop altında PB'nin yatay ve dikey çapları (mikrometre), ZP'nin saat 3-6-9-12 hizalarındaki kalınlıkları (mikrometre) ve oosit sitoplazmasının yatay ve dikey çapları (mm) ölçülüp aritmetik ortalamaları hesaplandı. ICSI'den 24 saat sonra pronukleus oluşumuna göre fertilizasyon kontrolü yapıldı.

Veriler "SPSS for Windows 15.0" paket programı (Inc., Chicago, USA) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı. Sürekli değişkenler datanın dağılım özelliğine göre Student's t-test veya Mann-Whitney U-test ile kategorik değişkenler ise ki-kare veya Fisher kesin testi ile değerlendirildi. Fertilizasyonu öngörece en sağlıklı cut-off değerleri ve bunların sensitivite, spesifite, LR+ değerlerini tespit etmek için 'receiver-operating characteristic' (ROC) eğrileri kullanıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Matür oositlerin %64'ü GnRH agonist ve %36'sı ise GnRH antagonist protokolü ile yapılan stimülasyon siklusunda toplandı. Uzun ve kısa protokolün ortalama stimülasyon süreleri benzer idi. Çalışmadaki olguların ortalama yaş, vücut kitle indeksi, antral folikül sayısı, matür oosit sayısı ve stimülasyon süresi sırasıyla 31.5±4.2 yıl, 26.5±4.7 kg/m<sup>2</sup>, 12.9±4.5, 13±3.8 ve 8.1±0.9 gün idi (Tablo 1). Ortalama PB büyüklüğü, ZP kalınlığı ve OS çapı sırasıyla 6.1±1.1 mcm, 6.4±0.5 mcm and 36.7±1.9 mm idi. ROC analizinde PB büyüklüğü için AUC= 0.55, LR+= 2 ve 6.975 mcm cut-off kabul edildiğinde fertilizasyon %93.7 spesifite ve %25

**Tablo 1.** Olguların demografik ve stimülasyon özellikleri

Parametre	Ort.±SS
Yaş (yıl)	31.5±4.2
Vücut kitle indeksi (kg/m <sup>2</sup> )	26.5±4.7
Bazal FSH (mIU/mL)	5.8±2
Bazal estradiol (pg/mL)	37.3±13
Antral folikül sayısı	12.9±4
hCG günü estradiol (pg/mL)	2333±587
Toplam gonadotropin dozu (IU)	2390±903
Stimülasyon süresi (gün)	8.1±0.9
GnRH agonist süresi (gün)	17±6
GnRH antagonist süresi (gün)	3.7±0.7
Matür oosit sayısı	13±3.8

Ort.: Ortalama; SS: Standart sapma.

sensitivite ile öngörülebildi. ZP kalınlığı için AUC= 0.47, LR+= 2.4 ve 7.275 mcm cut-off kabul edildiğinde fertilizasyon %93.7 spesifite ve %6 sensitivite ile öngörülebildi. OS çapı için AUC= 0.47 ve LR+= 1 idi. Regresyon analizinde sadece ZP kalınlığı (RR: 5.3, %95 GA: 1.85- 15.19, p=0.002) fertilizasyon üzerine etkili bulundu. Oositleri bağımsız olarak fertilize olup olmamalarına göre PB, ZP ve OS açısından karşılaştırdığımızda fertilize olan ile olmayan arasında istatistiki anlamlı bir fark gözlemedik.

## Tartışma

Çalışmamızda oosit morfolojik komponentlerinden ZP kalınlığının fertilizasyona etki ettiğini gözlemledik. ZP için bulduğumuz 7.275 mcm cut-off değerinin spesifitesi yüksek ama sensitivitesi düşük idi. Bu durumun çalışmamızdaki iki sınırlılık kalkınca düzeleceğini düşünüyoruz. Birincisi çalışılan oosit sayısının artırılması, ikincisi de sadece tubal faktör oositlerinin kullanılmasıdır.

Embriyoloğun, fertilizasyon ve embriyoner gelişim potansiyelini öngörmesine oosit morfolojisinin imkan verdiği düşünülmektedir. Anormal PB ve perivitellin aralık, sitoplazmik vakuol-granül varlığı gibi dismorfizmlerin IVF üzerine etkisini anlayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır.<sup>[9]</sup> Bu çalışmaların bir kısmı bu dismorfizmlerin fertilizasyon ve embriyoner gelişim üzerine olumsuz etkisi olduğunu bildirirken,<sup>[11-13]</sup> bir kısmı da etkisi olmadığını bildirmektedir.<sup>[14,15]</sup> Çalışmamızda 39 yaş üstü kadın bulunmamakta ve yapılan bir çalışmada 45 yaş ve üstü kadınlarda ZP kalınlaşmasının ister klasik IVF ister ICSI uygulansın, fertilizasyonu negatif etkilemediği bildirilmiştir.<sup>[16]</sup> ZP kırılabilirliğinin yaş, bazal FSH ve hCG günü LH düzeyinden etkilendiği ve ZP kırılabilirlik düzeyinin fertilizasyonu etkilemediği bildirilmiştir.<sup>[17]</sup> Bir başka araştırmacı da ZP kalınlığının hasta yaşından etkilendiğini ve yaşla lineer oranda azaldığını bildirmiştir.<sup>[18]</sup> Biz çalışma popülasyonumuzda yaş ve bazal FSH düzeyi ile ZP kalınlığı arasında bir korelasyon gözlemedik.

Camargos ve ark.<sup>[4]</sup> oosit morfometrik komponentlerinden PB büyüklüğü, ZP kalınlığı, perivitellin aralık ve oosit çapı ile yaptıkları analiz çalışmasında tek başına fertilizasyonu predikte ettirecek bir parametre olmadığını bildirmişlerdir. Perivitellin aralığı dar ve çapı geniş oositlerden gelişen zigotun kalitesinin daha iyi olduğunu ve bu sonucun çapı geniş oositin daha matür olmasından, perivitellin aralığının genişlemesinin ise sitoplazmik deformiteye işaret edeceğinden bahset-

mişlerdir. Ayrıca çalışmalarında dört embriyo transferi yaptıkları için hangi kalitedeki embriyonun gebelik oluşturduğunu tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda OS çapı ile fertilizasyon arasında bir ilişki gözlemedik ve şartlı iki embriyo transferi yapılan olgularımız da olduğu için implantasyon ve klinik gebelik oranlarına bakmadık.

Yapılan bir başka çalışmada fragmanlı PB'li oositlerin fertilizasyon oranlarının ve embriyonik gelişimlerinin, normal görünümlü PB'si olan oositlerden daha düşük olduğu bildirilmiştir.<sup>[9]</sup> Çalışmamızda PB büyüklüğü ile fertilizasyon arasında bir bağlantı gözlemedik. Oosit sitoplazmik granülaritesi hasta yaşı ve stimülasyon protokolünden etkilense de, fertilizasyona ve embriyonik gelişime etki etmediği ama refraktil cisim varlığında klivaj oranının düştüğü ve embriyonik gelişimin bozulduğu bildirilmiştir.<sup>[7]</sup> Overyan stimülasyon için kullanılan yüksek doz FSH'nin azalmış over rezervli kadınlarda iyatrojenik olarak oosit kalitesini bozduğu bunun da düşükle sonuçlanan gebelik akıbetine yol açtığı iddia edilmektedir.<sup>[19]</sup> Çalışmamızda yüksek doz gonadotropin kullanılan endometriyozis ve ileri anne yaşı olgularını oosit kalitesini etkileme olasılığından ötürü çalışmaya dahil etmedik. Bir başka çalışmada final oosit matürasyonu için hCG yerine GnRH agonisti kullanılmasının erken embriyonik dönemde klivaja geçişi hızlandırdığı ama embriyo kalitesine etki etmediği bildirilmiştir.<sup>[20]</sup> Biz de çalışmamızda GnRH agonist ve antagonist protokollerinde, hem rekombinant FSH hem de hMG ile stimüle edilip, hCG final matürasyonu ardından toplanan oositler kullanarak stimülasyon protokollerinde bir homojenite sağlamaya çalışmadık.

Polikistik over sendromlu kadınlardan elde edilen oositlerin *in vitro* matürasyona tabi tutulduğu bir çalışmada, LH/FSH oranının 1.5'in üzerinde olduğu olgularda gebelik oranı daha düşük bulunmuş ve durumun yüksek LH'ye bağlı folikülogenez ve endometrial reseptivitedeki bozulmadan ileri gelebileceği iddia edilmiştir.<sup>[21]</sup> Biz de polikistik over sendromlu anovulasyon olgularından elde edilen oositleri çalışmamıza dahil etmedik.

Çalışılan bir hayvan modelinde fetuin-B gen delesyonunun oositlerde ZP kalınlaşmasına yol açarak fertilizasyonu önlediği ve infertiliteye sebep olduğu bildirilmiştir.<sup>[22]</sup> Mikroskopik morfolojik kriterler dışında genetik belirteçler de fertilizasyon sürecine etki etmektedir. Sonuç olarak fertilizasyon dinamik bir olay olup predikte etmeye yardımcı olacak kesin bir

belirteç bulunmamaktadır. İlerleyen dönemlerde IVF uygulamasına gelebilecek kanuni kısıtlama hallerinde fertilizasyon potansiyeli yüksek oositi seçmeye ZP kalınlığı yardımcı olabilir.

### Çıkar Çatışması

Yazar(lar) çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

### Kaynaklar

1. Harris SE, Faddy M, Levett S, Sharma V, Gosden R. Analysis of donor heterogeneity as a factor affecting the clinical outcome of oocyte donation. *Hum Fertil (Camb)* 2002;5(4):193-8. [Crossref](#)
2. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11(3):595-7. [Crossref](#)
3. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72(2):240-4. [Crossref](#)
4. Camargos Md, Lobach VN, Pereira FA, Lemos CN, Reis FM, Camargos AF. Computer-assisted oocyte morphometry before ICSI: correlation of oocyte measurements with fertilization and embryo development. *Reprod Sci* 2012;19(3):306-11. [Crossref](#)
5. Halvaei I, Ali Khalili M, Razi MH, Nottola SA. The effect of immature oocytes quantity on the rates of oocytes maturity and morphology, fertilization, and embryo development in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(8):803-10. [Crossref](#)
6. Wilding M, Di Matteo L, D'Andretti S, Montanaro N, Capobianco C, Dale B. An oocyte score for use in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2007;24(8):350-8.
7. Fancsovits P, Tóthné ZG, Murber Á, Rigó J Jr, Urbancsek J. Importance of cytoplasmic granularity of human oocytes in in vitro fertilization treatments. *Acta Biol Hung* 2012;63(2):189-201. [Crossref](#)
8. La Sala GB, Nicoli A, Villani MT, Di Girolamo R, Capodanno F, Blickstein I. The effect of selecting oocytes for insemination and transferring all resultant embryos without selection on outcomes of assisted reproduction. *Fertil Steril* 2009;91(1):96-100. [Crossref](#)
9. Rose BI, Laky D. Polar body fragmentation in IVM oocytes is associated with impaired fertilization and embryo development. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(5):679-82.
10. Romão GS, Araújo MC, de Melo AS, de Albuquerque Salles Navarro PA, Ferriani RA, Dos Reis RM. Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. *Fertil Steril* 2010;93(2):621-5. [Crossref](#)
11. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15(2):427-30. [Crossref](#)
12. Fancsovits P, Tóthné ZG, Murber A, Takács FZ, Papp Z, Urbancsek J. Correlation between first polar body morphology and further embryo development. *Acta Biol Hung* 2006;57(3):331-8. [Crossref](#)
13. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008;90(5):1692-700. [Crossref](#)
14. Chamayou S, Ragolia C, Alecci C, Storaci G, Maglia E, Russo E, et al. Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos. *Reprod Biomed Online* 2006;13(5):661-7. [Crossref](#)
15. Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod* 2004;19(10):2334-9. [Crossref](#)
16. Check JH, Chase DS, Horwath D, Yuan W, Garberi-Levito MC, Press M. Oocytes from women of advanced reproductive age do not appear to have an increased risk of zona pellucida hardening. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2012;39(4):440-1.
17. Luo J, Xu YW, Zhang MF, Gao L, Fang C, Zhou CQ. Effects of M II stage oocytes zona pellucida birefringence on pregnancy outcome. *Asian Pac J Trop Med* 2013;6(7):578-82.
18. Valeri C, Pappalardo S, De Felici M, Manna C. Correlation of oocyte morphometry parameters with woman's age. *J Assist Reprod Genet* 2011;28(6):545-52. [Crossref](#)
19. Slovis BH, Check JH. Younger women with diminished oocyte reserve are not more prone to meiosis errors leading to spontaneous abortion than their age peers with normal oocyte reserve. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2013;40(1):29-32.
20. Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;168(2):167-72. [Crossref](#)
21. Wiser A, Shehata F, Holzer H, Hyman JH, Shalom-Paz E, Son WY, et al. Effect of high LH/FSH ratio on women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro maturation treatment. *J Reprod Med* 2013;58(5-6):219-23.
22. Dietzel E, Wessling J, Floehr J, Schäfer C, Ensslen S, De-neckel B, et al. Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. *Dev Cell* 2013;25(1):106-12.