

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

**İNSAN SERUM ALBÜMİN KONSANTRASYONLARININ
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU
SONUÇLARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Tıbbi Biyolog Dilek CENGİZ ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2012

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

**İNSAN SERUM ALBUMİN KONSANTRASYONLARININ
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU
SONUÇLARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Tıbbi Biyolog Dilek CENGİZ ÇELİK

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Vildan KARPUZ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2012

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Dilek CENGİZ ÇELİK

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. İNFERTİLİTE.....	5
4.2. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ.....	6
4.2.1. Klasik İn Vitro fertilizasyon (IVF).....	6
4.2.2. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI).....	7
4.3. ICSI/IVF SONRASI DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER.....	8
4.3.1. Fertilizasyon ve Pronükleer Değerlendirme.....	9
4.3.2. Bölünme Evresi Değerlendirmesi ve Embriyo Kalitesi.....	11
4.3.2.1. Erken Bölünme.....	12
4.3.2.2. Embriyo Bölünme Hızı.....	12
4.3.2.3. Embriyo Kalitesi.....	13
4.3.3. Blastosist Evresi Değerlendirme ve Embriyo Kalitesi.....	15
4.3.4. Embriyo Transferi.....	16
4.3.5. İmplantasyon.....	16
4.4. EMBRİYO KÜLTÜR MEDİUMLARI.....	16
4.4.1. Temel İnorganik İyonlar (K, PO ₄ , Mg ve Ca).....	18
4.4.2. Karbonhidratlar (Enerji Kaynakları).....	18
4.4.3. Amino Asitler.....	18
4.4.4. Vitaminler.....	19
4.4.5. Nükleik Asit Öncüleri.....	19
4.4.6. Ağır Metal İyonlarının Şalesyon Ajanları.....	19
4.4.7. Antioksidanlar.....	20
4.4.8. Antibiyotikler.....	20
4.4.9. Protein ve Makromoleküller.....	20
4.4.10. Hormon ve Büyüme Faktörleri.....	21
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER.....	22

5.2. ÇALIŞMA GRUBU.....	23
5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER.....	23
5.3.1. Hastaların Hazırlanması.....	23
5.3.2. Oosit Toplama İşlemi.....	24
5.3.3. Semen Örneğinin Hazırlanması.....	25
5.3.4. Oosit Temizleme İşlemi.....	26
5.3.5. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI).....	26
5.3.6. Fertilizasyon Kontrolü ve Embriyo Gelişimi.....	27
5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	28
6. BULGULAR.....	29
7. TARTIŞMA.....	37
8. SONUÇ.....	40
9. TEŞEKKÜR.....	41
10. KAYNAKLAR.....	42

SİMGE VE KISALTMALAR

AHA	: Yardımla Yuvalama (Assisted Hatching)
BSA	: Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamino Tetra Asetik Asit
FSH	: Follikül Uyarıcı Hormon (Follicle-Stimulating Hormone)
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (Gonadotropin-Releasing Hormone)
GV	: Germinal Vezikül
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin (Human Chorionic Gonadotrophin)
HETM	: Hyaluronan ile Zenginleştirilmiş Transfer Mediumu (Hyaluronan-Enriched Transfer Medium)
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetersizlik Virusü (Human Immunodeficiency Virus)
HMG	: İnsan Menopozal Gonadotropin (Human Menopozal Gonadotropin)
HSA	: İnsan Serum Albumin (Human Serum Albumin)
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IU	: International Units
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
LH	: Lutein Uyarıcı Hormon (Luteinizing Hormon)
M I	: Metafaz 1 Oosit
M II	: Metafaz 2 Oosit
MESA	: Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu
NPB	: Çekirdekçik Öncül Cisimciği (Nukleolar Precursor Body)
OPU	: Oosit Toplama İşlemi (Oosit Pick-Up)
PB	: Kutup Cisimciği (Polar Body)
PGD	: Preimplantasyon Genetik Tanı
PN	: Pronükleus
PVP	: Polivinilpirolidon
PZD	: Parsiyel Zona Disseksiyonu
rec-HSA	: Rekombinant Serum Albumin

- SOATS** : Şiddetli Oligoastenoterato Spermi
SOD : Süperoksid Dismutaz
SPSS : Statistical Package for Social Science
SSS : Sentetik Serum Vekili (Sentetik Serum Substitute)
SUZİ : Subzonal İnseminasyon
TESA : Testiküler Sperm Aspirasyonu
TESE : Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
ÜYTM : Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi
WHO : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
YÜT : Yardımla Üreme Teknikleri
β-hCG : Beta-İnsan Koryonik Gonadotropin (β-Human Chorionic Gonadotrophin)

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 29.04.2011 tarih ve 2011/ 032 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi no: HE/0522010

1. ÖZET

İnfertilite bir çiftin korunmasız 1 yıl cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememesidir. Bu çiftler tedavi amacı ile yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) yönlendirilebilir. Bu yöntemlerden biri olan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrasında oositler uygun kültür mediumu içinde ve inkübatör ortamında kültüre edilir. Amaç in vitro ortamda implantasyon potansiyeli yüksek olduğu düşünülen iyi kalitede embriyoların gelişimini destekleyerek anne adayının uterusuna transfer etmektir. Bu süreçte kullanılan kültür ortamlarına “medium” denmektedir. Primer protein kaynağı, mediumlara %5-20 arasında değişen oranlarda eklenmektedir.

Bu çalışmada, insan serum albumin (HSA) konsantrasyonlarının (%5 ve %10) ICSI sonrasında fertilizasyon, embriyo gelişimi ve embriyo kalitesi ile ilişkisi olup olmadığı incelendi. Bu amaçla, 1. gruptaki 50 olgudan toplanan metafaz II (MII) oositler, ICSI uygulandıktan sonra, transfer gününe kadar %5 HSA eklenmiş mediumda kültüre edildi. 2. gruptaki 50 olgudan toplanan MII oositler, ICSI uygulandıktan sonra, transfer gününe kadar %10 HSA eklenmiş mediumda kültüre edildi. Çalışma gruplarının yaşları, infertilite süreleri, toplanan oosit sayıları, MII oosit sayıları benzer bulundu. Gruplar arasında fertilizasyon ve klivaj oranları açısından anlamlı fark belirlenmedi. Transfer gününde oluşan embriyolar kalitelerine göre 4 alt gruba ayrıldı (Grade 1, Grade 2, Grade 3, Grade 4). Bu çalışma gruplarının embriyo kaliteleri arasında anlamlı fark belirlenmedi. 1. ve 2. çalışma grupları, transfer gününe göre 2. ya da 3. gün oluşan embriyo kalitelerine göre yine 4 alt gruba (Grade 1, Grade 2, Grade 3, Grade 4) ayrıldığında, 2. çalışma grubunun 3. günde yapılan embriyo transfer olgularında “Grade 3 embriyo” gelişimi daha fazla bulundu.

Bu verilere dayanarak, hasta sayısının daha fazla olduğu, ayrıca embriyo transferi ve gebelik sonuçlarının da değerlendirilebildiği yeni çalışmaların yapılması, bundan sonraki araştırmalarda izlenecek yol olmalı kanaatindeyiz.

2. SUMMARY

Infertility is defined as a couple can not obtain pregnancy although unprotected sexual intercourse for 1 year. These couples can be directed assisted reproduction techniques (ART) for treated. Oocytes are cultured in suitable culture medium and ambient of incubator after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) which is one of the ART. The aim is to support development of good quality embryos through highest implantation potential in vitro environment and transfer to candidate mother's uterus. Using culture environments called "mediums" in the process. Primer protein source is added at rates ranging from 5-20% into the medium.

In this study, we investigated the effect of Human Serum Albumin (HSA) concentrations (5-10%) on the fertilization rates, embryo development rates and embryo quality after ICSI. For this purpose, picked-up metaphase II oocytes from 50 cases in grup 1 cultured in medium included %5 HSA after ICSI to embryo transfer day. Picked-up metaphase II oocytes from 50 cases in grup 2 cultured in medium included %10 HSA after ICSI to embryo transfer day. Ages, times of infertility, picked-up oocytes numbers, M II oocytes numbers of study grups were found similarly. Fertilization and cleavages rates were not statistically different. Each groups were classified in 4 subgroup (Grade 1, Grade 2, Grade 3, Grade 4) according to embryo quality in transfer day. In these study groups were found no statistically different according to embryo quality. The study groups were classified 4 subgroups (Grade 1, Grade 2, Grade 3, Grade 4) embryo quality in 2. or 3. day according to transfer day again. Grade 3 embryos development was found more in 3. day embryo transfer of study group 2.

According to the given data, we believe that the followed way must have higher number of cases, further more embryo transfer and pregnancy results must evaluated in the next researches.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite genel anlamda sağlıklı popülasyona göre daha az gebe kalabilme kabiliyeti olarak tanımlanırken, özgül anlamda bir çiftin korunmasız 1 yıl cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememesidir. İnfertilite için gerçekleştirilecek ilk tanısal testler; ovülasyonun takibini, tubaların açıklığının kontrolünü, uterus kavitesinin değerlendirilmesini ve semen analizini içermelidir (1). Test sonuçlarının değerlendirilmesiyle çift yardımıyla üreme teknikleri (YÜT)' ne yönlendirilebilir. Klasik in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) bu amaçla kullanılan yöntemlerdir (2). Her iki yöntem için de kadın hastanın overleri indüklenerek fazla sayıda oosit toplanması amaçlanmaktadır (3). İki yöntem arasındaki tek farklı aşama fertilizasyon aşamasında olup; klasik IVF' te sperm hücrelerinin arasına bırakılan oositin kendiliğinden döllenmesi beklenirken; ICSI her bir oosit içine bir sperm hücresinin enjeksiyon yapılmasıdır. Oosit/oositlerin döllenip zigot oluşturması durumunda, embriyo gelişimi takip edilerek, implantasyon potansiyeli en fazla olduğu düşünülen embriyo/embriyoların morfolojik yapılarına göre en iyi kalitedekilerin seçilip transfer edilmesi ile tedavi sonuçlanmaktadır (4, 5).

IVF laboratuvarında in vitro kullanım amaçlı geliştirilmiş semen hazırlama, oosit aspirasyonu-temizliği-kültürü, inseminasyon, mikromanipülasyon işlemleri (ICSI, assisted hatching, defragmentasyon, embriyo biyopsisi), embriyo kültürü, embriyo transferi, embriyo dondurma ve çözme işlemlerinin çeşitli basamaklarında kullanılan çeşitli solüsyonlar ve kültür ortamları mevcuttur; bunlara “medium” denmektedir (2,6). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, fare ve tavşan embriyolarının kullanıldığı deneylerin sonuçları anahtar niteliğinde olup insan gamet ve embriyo kültürü için mediumların geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır (7). Türlerle ait farklılıklardan dolayı, sonuçlar her zaman uyumlu ve biri diğeri için yol gösterici olmayabilir. Örneğin fare blastosistleri, bir hücreli öncülerine göre daha az protein içermeleri açısından farklılık göstermektedir (8). Temel olarak, insan embriyoları için kullanılacak mediumların fare, tavşan ve hamster embriyo kültürleri için kullanılan mediumlardan daha zengin olması gerektiği kabul edilebilir (6).

İnsan embriyo gelişiminde metabolik aktivitelerini destekleyebilecek mediumların kullanılmasının gerekli olduğu temel bir faktör olarak gözlenmiş ve medium içeriklerinin kadın genital kanal salgılarının kompozisyonunda olması gerektiği vurgulanmıştır. İn vivo

embriyoların tuba uterina ve uterus sıvısı içinde gelişimini sürdürmesi, embriyoların ileri gelişimi için benzer özellikler taşıyan mediumların kullanılması gerektiğini göstermiştir. Böylece tuba uterina ve uterus sıvıları içinde bulunan ve preimplante embriyoner gelişimi destekleyen maddelerin ayırımı yapılarak konsantrasyonları belirlenmiş ve yeni üretilen mediumlar bu özelliklerde geliştirilmiştir. %99' u sudan oluşan mediumlara eklenmesi gereken maddeler; temel inorganik iyonlar, karbonhidratlar, amino asitler, vitaminler, nükleik asit öncülleri, ağır metal iyonlarının şalesyon ajanları, antioksidanlar, protein ve makromoleküller, hormonlar ve büyüme faktörleridir (9).

Mediumlara primer protein kaynağı olarak, %5-20 arasında değişen oranlarda olmak üzere, ısıtılarak inaktive edilmiş anne (10) veya fetal kordon serumu (11) eklenebilmektedir; fakat öncelikle hepatit ve human immunodeficiency virus (HIV) yönünden araştırılmalıdır. Tuba uterinada en çok bulunan makromolekül olan albuminden dolayı insan serum albumin (HSA) (12, 13) veya bovine serum albumin (BSA) (13) en çok tercih edilen ürünler olmakla birlikte plazmanat (14), plazmatein ve sentetik serum vekilleri (SSS) (15, 16) gibi globulinden zenginleştirilmiş albumin solüsyonları da kullanılmaktadır.

Embriyo kültür mediumlarında bulunan proteinin, embriyoların gelişimi için sadece nitrojen kaynağı yaratmakla kalmayıp; aynı zamanda kültür ortamında kullanılan su, cam veya plastik malzemelerle geçebilen ve embriyo gelişimini olumsuz etkileyen toksik metal iyonları için de bağlayıcı görev yaparak toksik etkilerini nötralize ettiği de gösterilmiştir (17). Ayrıca kültür ortamında bulunan proteinler embriyonun kültür kaplarına ve cam pipetlere yapışmasını önleyerek manipülasyonlarını kolaylaştırır (2, 6).

Bu çalışmada insan serum albumin (HSA) konsantrasyonlarının (%5 ve %10) intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrasında fertilizasyon, embriyo gelişimi ve embriyo kalitesi ile ilişkisi olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite korunmasız ve düzenli olarak cinsel ilişkiye girilmesine rağmen bir yılı aşan sürede çiftlerin çocuk sahibi olamamasıdır. Yapılan çalışmalarda çiftlerin %80-85' inin ilk yılın sonunda gebe kaldığı ve bu oranın 2. yılın sonunda %90' ı aştığı görüldüğünden, genç çiftlerde incelemeler başlamadan önce bekleme süresi 2 yıla çıkarılabilir. Ancak kadınlarda 35 yaş sonrasında ve özellikle 37 yaşından sonra fertilitte çok belirgin bir şekilde azalmaya başladığından ileri yaştaki kadınlarda bekleme süresinin uzatılmamasında yarar vardır (2). Yaşı genç olmasına rağmen over rezervi azalmış kadın veya şiddetli oligoastenoteratospermi (SOATS) ve ejakulatta sperm hücresi olmayan azospermik erkek faktörlerinde de tedavi için beklememek gerekir.

İnfertilite, toplumun yaklaşık %10-15' inde gözlenmesine karşılık bu oranın giderek arttığı tahmin edilmektedir.

İki tip infertilite vardır; primer infertilite çiftin daha önce çocuk sahibi olmaması, sekonder infertilite ise çiftin daha önce çocuk sahibi olması şeklinde tanımlanabilir.

İnfertilitenin bağlı olduğu sorunlar kadına (%40-45) veya erkeğe (%40-45) bağlı olabileceği gibi her iki cinse (%15-20) bağlı sorunlar birarada bulunabilmekte; ya da bir sorun tespit edilememekte ve açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmaktadır (2). Çocuk sahibi olamamanın nedeni ne olursa olsun, bunun yalnızca eşlerden birine değil, her ikisine ait bir sorun olduğunu düşünmek gerekmektedir.

İnfertilite için gerçekleştirilecek ilk tanısal testler; ovülasyonun takibini, tubaların açıklığının kontrolünü, uterus kavitesinin değerlendirilmesini ve semen analizini içermelidir (1). Test sonuçlarının değerlendirilmesiyle çift yardımıyla üreme teknikleri (YÜT)'ne yönlendirilebilir. Klasik IVF ve ICSI günümüzde bu amaçla kullanılan yöntemlerdir (2).

Her iki yöntemde de anneden, overleri uyaran çeşitli hormon ilaçları uygulanarak geliştirilen oositlerin toplanması ve babadan alınan sperm hücreleri ile in vitro ortamda dölleni, gelişen embriyoların belli bir süre laboratuvar ortamında kültüre edildikten

sonra anne adayının uterusuna yerleştirilmesi söz konusudur. İki işlem arasındaki tek fark sperm hücresinin oositi dölleme şeklidir.

4.2. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

4.2.1. Klasik İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

Klasik IVF, kumulus-oosit kompleksi ile sperm hücrelerinin in vitro ortamda, oosit başına 100 bin sperm hücresi olacak şekilde aynı kültür tabağına bırakılması ile gerçekleştirilir. Spermin zona pellusida engelini aşarak dölleme işleminin dışarıdan müdahale edilmeden oluşması beklenir ve gelişen embriyolar anne adayının uterusuna yerleştirilir.

Steptoe ve Edwards'ın uzun süren çalışmaları sonucunda 1978' de bilateral tubal blok bulunan bir hastanın doğal siklusunda laparoskopik elde edilen oositin in vitro döllenenek uterusu yerleştirilmesi ile ilk IVF bebeği olan Louise Brown dünyaya gelmiştir (2).

Günümüzde tubal blok dışında açıklanamayan infertilite, erkek subfertilitesi, endometriyozis, immünolojik infertilite ve servikal faktörlere bağlı infertilite gibi durumlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır (2). IVF uygulamasında ilk dikkat edilen parametreler sperm sayısı ve motilitesinin uygunluğudur.

Sperm morfolojisinin %4' ün altında olduğu vakalarda IVF yöntemi ile fertilizasyonun düştüğü belirtilmiştir (18).

Erkek subfertilitesinde kullanılsa da başarının sınırlı olması ve bu tekniğin şiddetli erkek infertilitesine çözüm olamaması nedeniyle araştırmacılar mikromanüplasyon tekniklerine yönelmişlerdir.

Bunlar:

1. Zona Drilling ve Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD): Zonada bir açıklık meydana getirildikten sonra klasik IVF' deki gibi sperm hücrelerinin yıkama sonrası kültür tabağına bırakılarak fertilizasyonun beklenmesidir (19).
2. Subzonal İnseminasyon (SUZI): Hareketli sperm hücrelerinin zona pellusidayı aşmasına gerek kalmaksızın doğrudan perivitellin aralığa bırakılmasıdır (20).

3. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI): Tek bir sperm hücrenin mekanik yolla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesidir (21).

4.2.2. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI işlemi manipülatör adı verilen, inverted mikroskoba monte edilmiş joy-stick sistemi ile yapılmaktadır.

Tek bir sperm hücrenin mikroenjeksiyon pipeti içine alınarak, tutucu pipetle sabitlenmiş yumurtanın sitoplazmasının ekvatoryal bölgesine bırakılması esasına dayanır. Böylece sperm hücresi zona pellusida ve oolemma engelini aşmak zorunda kalmaz (20).

1992' de Palermo ve arkadaşları tarafından ICSI ile ilk doğumların elde edilmesi şiddetli erkek infertilitesine çözüm olarak gösterilmiş ve IVF için uygun olamayan tüm çiftlerde rutin tedavi seçeneği olarak önerilerek YÜT' nde en önemli gelişme olarak kaydedilmiştir (21, 22).

Günümüzde ejakulattan sperm hücresi elde edilemeyen azospermik erkeklerden epididimal aspirasyon (Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu, MESA), testiküler sperm aspirasyonu (Testiküler Sperm Aspirasyonu, TESA) ve testiküler parça alınması (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu, TESE) ile azospermik hastalar için ICSI yönteminin değeri bir kez daha vurgulanmıştır (23, 24).

Özellikle sperm parametrelerinde şiddetli oligozoospermi (<2 milyon sperm/ml), şiddetli astenoospermi (<%5 motil sperm) ve Kruger kriterleri' ne göre kötü sperm morfolojisi (<%4 normal form) gibi anomali belirlenen, cerrahi olarak sperm elde edilen ve önceki klasik IVF tedavilerinde başarısız sonuç alan hastalarda kullanılmaktadır (24, 25).

ICSI' de fertilizasyon başarısızlık oranı yaklaşık %3 olup genellikle yumurta sayısının az olduğu olgularda görülmektedir (26). Bunun da etkisiyle ICSI endikasyonlarına bir yenisi daha eklenmiş ve oosit sayısının az olduğu olgularda da erkek faktörüne bakılmaksızın ICSI uygulanması prensip olarak kabul edilmiştir (27).

Çok sayıda oosit elde edebilmek için hastanın özgeçmişini de değerlendirilerek en uygun ovulasyon indüksiyon protokolü uygulanır. İlaç tedavisi süresince bazı günlerde yapılan ultrasonografi ile folikül boyutları oosit matürasyonu için yeterli seviyeye ulaştığında ve kandaki östrodiol miktarı istenilen düzeye geldiğinde hastaya yapılan insan koryonik gonadotropin (Human Chorionic Gonadotrophin, hCG) enjeksiyonu ile lutein

uyarıcı hormon (Luteizing Hormone, LH)' nun pik değere ulaşmasıyla birlikte ovulasyon tetiklenir (2). hCG enjeksiyon uygulamasından 36 saat sonra vajinal yolla ultrasonografi eşliğinde oositler toplanır. Toplanan oositleri, etraflarındaki kümülüs ve granüloza hücrelerinden ayırmak için hiyaluridaz enzimi kullanılır. Oositleri soyma işlemi denilen bu uygulamadan sonra kutup cisimciği (Polar Body, PB) görülen olgun, metafaz II (MII) evresindeki oositler tespit edilir. Aynı gün erkekten alınan ejakulatın yıkanmasıyla elde edilmiş hareketli ve kaliteli sperm hücreleri ICSI işleminde kullanılır (20).

ICSI işleminin yapılabilmesi için işlem öncesi kümülüs-korona hücrelerinin temizlenmesi gerekmektedir. Böylece oositlerin morfolojik özellikleri ve matürasyonlarının daha ayrıntılı bir şekilde incelenebilmesinin yanında oosite bağlı infertilite sorunları da daha net görülebilmektedir.

YÜT' ndeki amaç tedavideki çiftin gebe kalmasını sağlamaktır. Hastanın gebe kalma olasılığını arttırmak için çok sayıda embriyonun transfer edilmesi de istenmeyen çoğul gebeliklere yol açmaktadır (28).

Bunun için de implante olma potansiyeli yüksek olan kaliteli embriyo seçimi önem kazanmaktadır. Bu süreçte elde edilen oosit ve sperm hücresinin yapısal özelliklerinin değerlendirilmesinin ardından yapılan klasik IVF veya ICSI işlemi sonrasında fertilizasyonun oluşması, in vitro kültür ortamında embriyonik gelişim aşamalarının zamanına uygun olarak ilerleyerek yaşama potansiyeli yüksek olduğu görülen ve morfolojik değerlendirme ile kalitesinin iyi olduğu tespit edilen embriyoların transfer edilmek üzere seçilmesi gerekmektedir.

4.3. ICSI / IVF SONRASI DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER

İnseminasyondan 16-18 saat sonra biri dişiye, diğeri erkeğe ait olan iki pronükleusun (PN) görülmesiyle belirlenen fertilizasyon kontrol edilir. İki pronükleusu görülen oosit "zigot" olarak isimlendirilmektedir. IVF veya ICSI uygulamasından yaklaşık 24 saat sonra zigot ilk bölünmesini gerçekleştirir ve iki blastomerli bir embriyo haline gelir.

İn vitro ortamda uygun sıcaklık, nem ve gaz oranlarına sahip inkübatörlerde saklanarak bölünmeleri takip edilir. Embriyolar 48 saatte ikinci kez bölünüp 4 blastomerli hale gelir. Üçüncü gün 8 blastomer sayısına sahip olan embriyolar, 4. gün blastomerlerin sayılamadığı kompakt bir görünüm alır ve 5. günde de blastosist evresine ulaşır (29).

4.3.1. Fertilizasyon ve Pronükleer Değerlendirme

Fertilizasyon; sperm hücresinin oosite temasıyla başlayan ve zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz evresinde, maternal ve paternal kromozomların kaynaşmasıyla sonlanan bir olaylar dizisidir (30).

Bir oositin fertilize olabilmesi için ovulasyonla birlikte 1. mayoz bölünmeyi tamamlayarak 1. kutup cisimciğini atması, sperm hücresinin ise kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu tamamlaması gerekir (30).

Fertilizasyonun evreleri:

- Sperm hücresinin akrozom enzimlerinden olan hiyaluridaz etkisiyle ve kuyruk hareketi yardımıyla granüloza hücrelerinden meydana gelen korona radiatayı geçtiği düşünülmektedir.
- Akrozomdan salınan enzimlerden olan akrozin, zona pellusidada sperm hücresinin geçeceği bir yol açar (25). Sperm hücresi zona pellusidaya dokunduktan sonra hızla penetre olur ve başı oosit yüzeyi ile temas ettiğinde, zona pellusidanın içeriği değişir (31). Zona reaksiyonu denilen bu olaydan sonra zona pellusida, diğer spermelere karşı geçirgenliğini kaybeder. Böylece polispermi önlenmiş olur.
- Sperm hücresinin oosit hücre membranına temasıyla birlikte, iki plazma membranı hemen kaynaşır. Sperm hücresinin baş ve kuyruk bölümü, plazma membranı dışarıda kalacak şekilde, oosit sitoplazmasına girer.
- Sperm hücresinin oosit sitoplazmasına girmesiyle ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde bekleyen oosit, bu bölünmeyi tamamlar ve olgun oosit ile perivitellin aralığa atılacak olan ikinci kutup cisimciği oluşur. Bundan sonra oositin nükleusuna dışı pronükleusu denir. Oosit sitoplazmasındaki sperm hücresinin nükleusu ise genişleyerek erkek pronükleusu oluşturur.
- Her iki pronükleus kendi deoksiribonükleik asit (DNA)' lerini replike ettikten sonra maternal ve paternal kromozomlar kaynaşır ve diploid kromozom sayısı oluşur, crossing over ile genetik çeşitlilik meydana gelir (32). Embriyonun primer cinsiyeti belirlenir ve mitotik hücre bölünmesi için düzenlenir (33, 34).

İn vivo ortamda genellikle tuba uterinanın en geniş ve uzun parçası olan ampullada gerçekleşen fertilizasyon, klasik IVF veya ICSI işlemi takip eden 16-20. saatler arasında gerçekleşir ve bunun göstergesi olarak her iki cinsiyete ait pronükleuslar belirgin hale

gelir. Her ikisi de haploid sayıda kromozom taşıyan pronükleusların birbiri içine geçip kaynaşması olayına “singami” adı verilir. Oluşan yeni nükleus diploid sayıda kromozom taşımaktadır. Fertilize oosite “zigot” adı verilir. Zigot, tek hücreli embriyodur (35).

Ooplazmadaki nükleuslar fertilizasyonunun en basit ve kolayca gözlemlenebilen işaretleridir. Normal fertilizasyonda erkek ve dişi olmak üzere 2 adet PN ve 2 adet PB gözlenir.

Pronükleer evrede değerlendirme yapılırken PN pozisyon ve boyutu, nükleolar prekürsör cisimciklerin (NPB) sayıları, şekli ve dağılımı, PN’lerin PB’ler ile yaptıkları açığı ve sitoplazmik halo varlığı dikkate alınır (6, 36).

Yapılan çalışmalar, pronükleer evre embriyosunun normal olarak değerlendirilebilmesi için her iki pronükleusun sitoplazmada merkezi pozisyonda, birbirine yakın pozisyonda ve eşit büyüklükte olması gerektiğini göstermektedir (37). PN morfolojisindeki belirli bazı düzensizliklerin, embriyonun kromozomal yapısı ve anöploidi oranları ile ilgili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (38, 39). Yüksek oranda kromozomal anomali, anormal klivaj ve gelişim duraksamaları nedeni ile embriyoların ileri gelişim sürecini tamamlayamadığı ve blastosist oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (40, 41).

Pronükleer evre değerlendirilmesinde kullanılan farklı skorlama sistemleri mevcuttur (37, 42). Sık kullanılan skorlama sistemlerinden biri olan Tesarik ve Greco’nun, 1999’da önerdiği skorlama sistemine göre ;

Pattern 0 (P0): Pronükleusların her ikisindeki NPB sayısı farkı üçten fazla değildir. NPB sayısı 7’den az olunca NPB’ler polarize, 7’den fazlaysa NPB’ler dağınık şekilde bulunmaktadır. Pronükleuslardaki NPB sayısı üçten az değildir.

Pattern 1 (P1): Her iki pronükleustaki NPB sayıları arasında fazla (>3) fark vardır.

Pattern 2 (P2): En az bir pronükleusta az sayıda (<7) ve dağınık durumda NPB vardır.

Pattern 3 (P3): En az bir pronükleusta fazla sayıda (>7) ve polarize olmuş NPB vardır.

Pattern 4 (P4): En az bir pronükleusta çok az sayıda (<3) NPB vardır.

Pattern 5 (P5): Bir pronükleusta polarize, diğerinde ise dağınık durumda NPB vardır (37).

Scott ve arkadaşlarının yaptığı skorlama sistemine göre de ;

Z1 zigotlarda bulunan NPB’lerin sayısı eşittir ve pronükleer junction bölgelerinde dizilmiş olarak bulunurlar. NPB’lerin sayısı 3 ve 6 arasındadır .

Z2 zigotlarda da yine sayısı 3-6 arasında olan NPB’ler iki nükleusta eşit olarak dağılmışlardır.

Z3 zigotlarda pronükleuslar Z1 ve Z2 gibi eşit büyüklüktedir. NPB bir nukleusta pronükleer bağlantı bölgesinde yerleşim gösterirken, diğerinde nukleusa dağılmış olarak bulunur.

Z4 zigotlarda pronükleuslar ayırık bir şekilde yerleşim gösterirler ya da biri büyük, diğeri küçük bir boyuttadır (40).

NPB' ler, PN' ler içerisinde çok sayıda, küçük ve dağınık olarak bulunan yapılar olup interfazda kaynaşıp büyüyerek yan yana dizilirler (38). PN' deki NPB' lerin aynı sayı ve aynı hizada olmaları implantasyon oranını arttırmaktadır (40, 41).

Pronükleusları eksenlerinden kesen bir çizgi çizildiğinde; bu çizginin 2. PB ile yapmış olduğu β açısının büyümesiyle embriyo kalitesinin azaldığı gösterilmiştir (42).

Pronükleer evrede sitoplazmik halonun varlığı, sitoplazmanın oositin merkezi bölgesinde daha yoğun, periferik bölgesinde ise daha az yoğun olması ile karakterizedir (27). Sitoplazmik halo varlığının embriyo gelişim ve implantasyon potansiyelini arttırdığını belirten çalışmalar vardır (43).

4.3.2. Bölünme Evresi Değerlendirmesi ve Embriyo Kalitesi

İn vivo olarak fertilize olan oosit tuba uterinada bölünmeye devam ederek uterusu doğru ilerler, uterus boşluğunda morula evresine ulaşmış olur.

Zigot, kalın ve jöle kıvamındaki zona pellusida içindedir ve bölünmeler zona pellusida içinde yarıklanma bölünmesi (klivaj) şeklinde gerçekleşir. Yarıklanma bölünmesi sonrasında embriyo hacim olarak büyümez ve bu nedenle her yeni bölünme sonucu meydana gelen hücrelerin hacmi küçülerek “blastomer” adını alır.

Transfer için yüksek implantasyon potansiyeline sahip embriyoları seçebilmek için, pronükleer evre ile birlikte bölünme evresi de değerlendirilmelidir. Bölünme evresinde erken bölünmenin varlığı, bölünme hızı, blastomer boyutu, fragmentasyon oranı, blastomerlerin nükleer durumu, sitoplazmik görüntü, perivitellin alan ve zona pellusida özellikleri değerlendirilmektedir (2, 20).

Bu süreçte en kritik faktör, embriyoları karşılaştırmak için en uygun zaman noktalarını belirlemektir. Enjeksiyondan yaklaşık 24-25 saat sonra embriyo ilk mitoz bölünmesini gerçekleştirir. İzleyen bölünmeler 18 saatlik süreçlerde tamamlanır. Böylece ilk 3 bölünme 60 saatte tamamlanmış olur. Bölünmeyle sayıları artan blastomerler

yuvarlak hücrelerdir ve ilk dönemlerde hücre biyolojisi, morfolojisi ve gelişim potansiyeli açısından benzer özelliklere sahiptir. Blastomerlerin tümü embriyoyu oluşturacak herhangi bir dokuya ait hücreye farklanabilir, yani totipotenttir (9).

4.3.2.1. Erken Bölünme

Zigotun ICSI'den yaklaşık 24-25 saat sonra zigot ilk mitoz bölünmesini tamamlayarak 2 blastomerli embriyo halini alması "erken bölünen embriyo" (early cleaved embryo) olarak adlandırılır. İki hücreli embriyo, 2 eliptik hücre ve blastomerlerin bölünme eksenlerinden geçen 2. PB ile karakterizedir.

Erken bölünen embriyoların kalitelerinin daha iyi olduğunu (44), daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (45).

4.3.2.2. Embriyo Bölünme Hızı

Bölünmenin zamanında gerçekleşmesi ve sürekli olması embriyonun canlılığını gösteren önemli bir özelliktir. İn vitro ortamda takip edilen embriyoların fertilizasyondan sonra 2. günde (42-44. saat) 4-5 blastomerli, 3. günde (66-68. saat) en az 7 blastomerli embriyo olması beklenir (46). Bu dönemde, iki ve ikinin katları sayısında blastomer içeren embriyolar senkronize embriyolardır ve tüm hücrelerin bölündüğünü gösterir. Tek sayıda blastomer içeren embriyolar ise asenkronize embriyolardır ve blastomerlerden birinin bölünmediğini gösterir (9). Bu aşamaya kadar geçen süreye "erken klivaj dönemi" denir.

Normal olmayan genoma sahip embriyoların çoğu bu aşamadan sonra ileri gelişim gösteremezler (47).

Embriyo bölünmelerinin gününde olması gerekenden yavaş veya hızlı olması ileri gelişim oranlarıyla beraber implantasyon oranlarında da düşüşe sebep olmaktadır (48). Embriyoların gelişimlerinin ve diğer embriyolarla arasındaki farklılıkların belirlenmesi için kritik zaman noktalarında gözlenmesi gerekmektedir. Rastgele zamanlarda yapılan kontroller yanlış yönlendirici olabilmektedir (49). İkinci gün sabah 4 hücre olan embriyo ile öğleden sonra 4 hücre olan embriyonun gelişimi aynı kabul edilmemelidir (49). Mc Kiernan ve Bavister' in en doğru zamanın belirlenmesi için yaptıkları çalışmada; aynı

zaman diliminde 8 hücre olan embriyolar ile olmayan embriyolar karşılaştırılmıştır. 8 hücre aşamasına gelen embriyoların blastosist oluşturma ve transfer sonrası canlılık ihtimalinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (50).

Transfer için embriyo seçerken farklı evredeki (pronükleer, bölünme ve blastosist evresi) embriyoların kritik zaman noktalarındaki morfolojileri değerlendirilmektedir.

Mikroskop altında embriyonun morfolojik özelliklerine bakarak canlılığın belirlenmesi en çok kullanılan seçim kriteridir. Bu parametreler embriyonun farklı evrelerinde değerlendirilir.

4.3.2.3. Embriyo Kalitesi

YÜT' nde başarılı sonuçların alınması pek çok faktöre bağlıdır. Embriyo kalitesi, önemli bir faktördür çünkü iyi kalitedeki embriyoların gelişim potansiyeli daha yüksek olacağından implantasyon ve gebelik şansları da daha yüksek olacaktır (51).

Embriyo kalitesi değerlendirilirken, blastomerlerin biçim ve büyüklüğü, fragmentasyon oranı ve sitoplazmik özellikleri dikkate alınır. Embriyolar bütün bu özelliklerin birlikte değerlendirildiği çeşitli embriyo kriterlerine göre sınıflandırılırlar.

Eşit olmayan hücresel bölünmelerde farklı büyüklükte blastomerler oluşmaktadır. Bu embriyoların transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (51).

Apopitozisten kaynaklandığı düşünülen fragmentasyon, embriyo kalitesi belirlenirken değerlendirilmelidir (52). Fragmentasyon oranı nükleusu olmayan fragmentların sayısı ve miktarının embriyo hacmine oranı ile belirlenir. Alikani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ayrıntılı bir embriyo sınıflaması yapılmış ve fragmentasyon oranı ile gebelik oranları arasında ters orantı olduğu ortaya konmuş; fakat küçük fragmentasyon oranlarında implantasyonun etkilenmediği gösterilmiştir (53). Fragmentasyon oranı yüksek olan embriyoların implantasyon ve klinik gebelik oranları düşük çıkmaktadır (54, 55).

Bunun yanı sıra, yapılan başka çalışmalarda fragmente embriyolarda sıklıkla çeşitli kromozomal anomaliler olduğu da bildirilmektedir (56, 57).

Yaygın olarak embriyo kalitesi fragmentasyon oranları açısından şu şekilde gruplanmaktadır:

1. İyi kalitede (Grade 1) embriyolar eşit sayı ve büyüklükte blastomerlere sahiptir ve fragmantasyon içermez.
2. Orta kalitede (Grade 2) embriyolar embriyo kütlelerinin %30' undan daha az oranda fragman içerirler.
3. Zayıf kalitede (Grade 3) embriyolarda embriyo kütlelerinin %30' undan fazlasında fragmantasyon mevcuttur (52).

Veek LL, embriyo kalitesini sınıflandırırken blastomer büyüklükleri ve fragmantasyon oranlarını beraber dikkate almıştır:

- Grade 1: Eşit büyüklükte blastomerlerin varlığı ve fragmantasyonun olmadığı grup.
- Grade 2: Eşit büyüklükte blastomerlerin varlığı ve %10 oranında minör sitoplazmik fragmantasyon.
- Grade 3: Eşit olmayan blastomerlerin varlığı ve değişken oranda fragmantasyon.
- Grade 4: Eşit büyüklükte veya eşit olmayan blastomerlerin varlığı ve %10' dan fazla sitoplazmik fragmantasyon.
- Grade 5: Çeşitli büyüklükte birkaç blastomer ve %50' den fazla fragmantasyon (57).

Embriyo blastomerlerinin sitoplazması açık renkli, şeffaf ya da hafif granülasyona sahipse, normal olarak değerlendirilir.

Hardarson ve arkadaşlarının 2001 yılında yayınladıkları çalışmalarında ise daha da ayrıntılı bir embriyo kalite sınıflandırması kullanılarak blastomer büyüklüğü, fragmantasyon oranları ve sitoplazmik görünüm dikkate alınmıştır (58). Bu çalışmaya göre;

- Grade I embriyolarda fragmantasyon yoktur, eşit büyüklükte blastomerler vardır ve embriyo sitoplazması homojen görünümündedir.
- Grade II embriyolar üç alt grupta değerlendirilmektedir:
 - Grade IIA embriyolarda %20' den az oranda fragmantasyon bulunmaktadır.
 - Grade IIB embriyoların blastomerleri eşit büyüklükte değildir.
 - Grade IIC embriyo sitoplazmalarının görünümü homojen değildir.

*Grade II A, B, C sınıfı embriyolarda çeşitli varyasyonlarda kullanılabilir (Örn: Grade II AB, Grade II BC vb.).

- Grade III embriyolarda %20-50 oranında fragmantasyon vardır.
- Grade IV embriyoların fragmantasyon oranları %50' den fazladır.

Perivitellin alandaki genişlik, darlık ve inklüzyonlar not edilmelidir. Ayrıca zona pellusida yapısı ve kalınlığı da değerlendirilmelidir (6). Zona pellusidanın 13-15 µm daha kalın olduğu durumlarda mekanik, kimyasal veya lazer yöntemiyle “Assisted Hatching (Yardımla Yuvalama, AHA)” yapılarak embriyonun zona pellusidası traşlanabilir.

Transfer edilecek embriyonun seçiminde kullanılan diğer bir morfolojik parametre ise blastomerlerde gözlenen multinükleasyondur. Blastomer multinükleasyonu, bir blastomerin içinde fragmente olmuş çok sayıda nükleusun bulunması ile karakterizedir. Multinükleasyon gözlenen embriyolarda implantasyon oranının düşük olduğu saptanmıştır (59).

4.3.3. Blastosist Evresi Değerlendirmesi ve Embriyo Kalitesi

Gelişen kültür sistemleri ile embriyolar in vitro ortamda 5. veya 6. güne kadar kültüre edilebilir.

4. gün embriyo 12-16 blastomerden oluşur ve blastomerler arası bağlantıların artmasıyla hücre sınırlarını belirlemek zorlaşır, kompaktlaşarak “morula” adını alır (60).

5. veya 6. gün morula uterusu ulaştığında uterus boşluğundaki sıvı iç hücre kitlesinin hücrelerarası boşluğuna geçiş yapmaya başlar. Bu boşlukların genişleyip birleşmesiyle “blastosol” denilen tek bir boşluk oluşur ve “blastosist” adını alır (61).

Blastosistin bir kutbuna yerleşmiş iç hücre kitlesi “embriyoblast”, dış hücre kitlesi “trofoblast” adını alır. Bu aşamada oluşan embriyonun yapısal değerlendirmesinde kullanılan üç temel kriter; blastosel kavitesinin genişliği, trofoblast hücrelerinin yapısı ve dizilimi, embriyoblast hücrelerinin sayısı ve yapısıdır (40, 61).

İyi kalitede bir blastosistin, geniş bir blastosele (en az embriyo hacminin yarısı kadar), belirgin bir embriyoblast kitlesine ve birbirine düzgün bağlanmış yassı epitelyum tabakası oluşturan trofoektoderm hücrelerine sahip olması gerekmektedir (61). Gardner ve arkadaşları kaliteli bir blastosistin implantasyon ve gebelik oranlarını olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir (62).

4.3.4. Embriyo Transferi

IVF ve ya ICSI sonrası embriyoların transferinde, implantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyoların seçilebilmesi için embriyo kalitesinin yanında gamet morfolojisi, pronükleer evre ve erken bölünme evresinin de birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Böylece gebelik oranları arttırılabilir ve daha az sayıda embriyo transfer edilmesine bağlı olarak çoğul gebelik oranları azaltılabilmektedir (63).

Uygun embriyo seçildikten sonra 2., 3., 4. ya da 5. gün anne adayının uterusuna ince ve yumuşak bir katater ile yerleştirilir (9).

Transfer işleminden 12 gün sonra kanda β -hCG değeri ölçülerek gebelik kontrol edilir.

4.3.5. İmplantasyon

İmplantasyon, embriyonun blastosist aşamasında gerçekleşir. Fertilizasyondan yaklaşık 5-6 gün sonra, zona pellusida yırtılarak blastosist iç hücre kitlesine komşu trofoblastların sekretuar fazdaki endometriyum epiteline penetre olmasına olanak sağlar (28).

Yaklaşık 8 gün sonra blastosist endometriyum içine kısmen gömülür. Trofoblastlar içte tek nükleuslu sitotrofoblastlar ve dışta çok nükleuslu sinsityotrofoblastlar olmak üzere iki tabakaya ayrılır ve bu aşamada endometriyum içerisine tamamen yerleşir (2).

4.4. EMBRİYO KÜLTÜR MEDİUMLARI

İnfertilite hastalarının Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi (ÜYTM)' ne başvurması ile başlayan süreçte sperm hazırlanması, oosit toplanması-soyulması-inkübasyonu, inseminasyon, mikromanipülasyon işlemleri (ICSI, AHA, defragmentasyon, embriyo biyopsisi), embriyo kültürü, embriyo transferi, embriyo dondurma ve çözme işlemlerinin çeşitli basamaklarında kullanılan çeşitli solüsyonlar ve kültür ortamları mevcuttur; bunlara "medium" denmektedir (2, 6).

İnsan embriyo gelişiminde metabolik aktivitelerini destekleyebilecek mediumların kullanılmasının gerekli olduğu temel bir faktör olarak gözlenmiş ve medium içeriklerinin

kadın genital kanal salgılarına benzer kompozisyonda olması gerektiği vurgulanmıştır. İn vivo embriyoların tuba uterina ve uterus sıvısı içinde gelişimini sürdürmesi, embriyoların ileri gelişimi için benzer özellikler taşıyan mediumların kullanılması gerektiğini göstermiştir. Böylece tuba uterina ve uterus sıvıları içinde bulunan ve preimplante embriyoner gelişimi destekleyen maddelerin ayırımı yapılarak konsantrasyonları belirlenmiş ve yeni üretilen mediumlar bu özelliklerde geliştirilmiştir. %99' u sudan oluşan mediumlara eklenmesi gereken maddeler; temel inorganik iyonlar, karbonhidratlar, amino asitler, vitaminler, nükleik asit öncülleri, ağır metal iyonlarının şalesyon ajanları, antioksidanlar, antibiyotikler, protein ve makromoleküller, hormonlar ve büyüme faktörleridir (6, 9).

Tarihsel gelişim içinde her merkez kendi kültür mediumunu hazırlarken daha sonra bu konuda ortak görüşler oluşmuş ve içerikleri basit bazı farklılıklar dışında benzer aminoasit, mineral, glukoz, vb. içeriklere sahip kullanıma hazır mediumlar üretilip piyasaya sunulmuştur.

YÜT' nde kullanılan mediumlar:

- Tamponlu Basit Tuz Solüsyonları (Simple Balanced Salt Solutions)

Pirüvat, laktat ve glukoz gibi enerji substratları içeren bikarbonat tamponlu solüsyonlardır (64). Bazıları modifiye Earle's (65), modifiye Whittingham's T6 (66) ve KSOM (67) 'dur. Bu grup mediumların türevlerinden geliştirilenler ise HTF ve P1 mediumlarıdır. Bu mediumlar YÜT' nde serum veya serum albumini eklenerek kullanılmıştır.

- Kompleks Mediumlar

Birinci grup mediumlardan farklı olarak amino asit, nükleik asit öncülleri ve vitamin içerirler ve somatik hücre kültürü için geliştirilmişlerdir. Bazıları Ham's F10, Menezo's B2 ve B3' dur (63). Bu mediumlara da %5-20 oranında serum eklenilerek kullanılmıştır.

- Ardışık Mediumlar

Zigot evresinden blastosist evresine kadar embriyoların özellikleri ve gereksinimleri düşünülerek bölünme ve blastosist evrelerinde farklı kombinasyonlarda mediumlar kullanılmasını savunurlar. Bunlar; G1 ve G2 (69), Universal IVF medium ve M3 (70), blastosist mediumu ile birlikte P1 de sayılabilir.

4.4.1. Temel İnorganik İyonlar (K, PO₄, Mg ve Ca)

İn vitro embriyo kültüründe kullanılacak mediumların iyon kompozisyonu ve medium içinde bulunması gereken değerleri; fare embriyolarının çeşitli konsantrasyonlardaki iyonların varlığında in vitro blastosist geliştirme potansiyelleriyle araştırılmıştır (6). Wales fare embriyoları ile yaptığı çalışmada potasyumun (K) 0,4-4,8 mM, magnezyumun (Mg) 0-9,6mM ve kalsiyumun (Ca) 0-7,2 mM konsantrasyonlarında olması durumunda blastosist gelişimi gözlemlenmiştir (71). İyonlar embriyo gelişiminde tek başına etkili olmaktan ziyade medium kompozisyonunda bulunan diğer maddelerle ve birbirleriyle etkileştiği kabul edilir (6).

Mediumlarda bulunan iyonların temel işlevi ozmotik basıncı düzenlemektir.

4.4.2. Karbonhidratlar (Enerji Kaynakları)

Karbonhidratlar, fallop tüpleri ile uterus sıvılarında farklı miktarda olmakla birlikte siklus evrelerine göre de farklılık gösterir (72). Pirüvat, laktat ve glukoz enerji kaynağı olarak mediumlara eklenmektedir. İn vitro ortamda insan embriyolarının gelişimin ilk döneminde pirüvata gereksinimi varken gelişimin ilerleyen döneminde glukoz tüketimi artmaktadır (73). Glukoz enerji kaynağı olmasının yanı sıra hücre içinde gerçekleşen biyosentetik aktivasyonda da rol oynar. Laktat ise, fare embriyolarının iki hücreli döneminden itibaren kullanılır (74).

4.4.3. Amino Asitler

Pre- ve peri-implantasyon dönemi embriyolarının gelişiminde fizyolojik rolleri olduğundan embriyo tarafından metabolize edilirler (6). Fallop tüpleri ve uterus salgısında Eagle'ın non-esansiyel amino asitlerden alanin, aspartat, glutamat, glisin, serin ve esansiyel amino asit olarak da taurin yüksek oranda bulunmaktadır (75). Amino asitler kültür ortamında embriyoların blastokist aşamasına geçişinde önemli rol oynayarak fare embriyolarında bölünme hızı, blastosist formasyonu ve hatchingi uyarmaktadır (76). Eagle'ın non-esansiyel amino asitleri ve glutamin erken dönemde embriyo gelişimine

sadece enerji substratı olarak değil, aynı zamanda intrasellüler ozmolit olarak da katkıda bulunur ve internal PH' yı regüle ederler (77).

Esansiyel ve non-esansiyel amino asitler farklı gelişim dönemlerindeki embriyoların gelişimini desteklediğinden dolayı, ardışık mediumların kompozisyonu da bu özelliğe dayandırılarak hazırlanmıştır (67).

Amino asitlerin gelişim sürecinde bulunması gerektiği tartışılmazdır; fakat embriyolar tarafından metabolize edildiklerinde ve 37 °C' de parçalandıklarında salgıladıkları amonyumun toksik etkisinden dolayı embriyoların içinde buldukları medium 24 saatlik kültür dönemlerinden sonra değiştirilmelidir (78).

4.4.4. Vitaminler

İnsan ve fare zigotları kültür ortamında blastosist oluşturmak için vitamene gerek duymazlar, hatta fare zigotları Ham's F10 veya MEM mediumlarında kültüre edildiklerinde suda eriyen vitaminlerin blastosist oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür (79). Fakat MEM mediumunda vitaminlerle birlikte amino asitlerin fare zigotlarının gelişimini engellemediği gösterilmiştir (80).

4.4.5. Nükleik Asit Öncüleri

Nükleik asit öncülerinin bulunmadığı mediumlarda embriyoların gelişmeye devam edebilmesi, nükleik asit sentezi için bir yol olduğunu gösterir. Bu yüzden olası olumlu ve olumsuz etkilerin araştırılarak, sonuçlar doğrultusunda mediumlara eklenmeleri kararlaştırılmıştır (6).

4.4.6. Ağır Metal İyonlarının Şalesyon Ajanları

İnsan embriyolarında yapılan çalışmalarda HTF' ye glukoz ve fosfat yokluğunda Etilen Diamino Tetra Asetik Asit (EDTA) eklenmesi sonucunda in vitro blastosist gelişiminin hızlandığı gösterilmiştir. EDTA' nın yararları sadece bölünme evresindeki embriyolarla sınırlı olduğu için blastosist mediumuna eklenmez (81).

Diğer bir şalesyon ajanı olan transferrin de fare zigotlarını iki hücre bloğundan kurtararak blastosiste geçişi destekler (82).

4.4.7. Antioksidanlar

İn vitro ortamda oksijen (O₂) oranının yüksek olması (%20), ışığa maruz kalma ve transizyonel metallere dolaylı olarak oluşabilecek oksidatif stres oluşumu embriyoların gelişimi olumsuz etkilemektedir (83). Superoksid Dismutaz (SOD) ve glutationun antioksidan olarak mediyumlara eklenmesiyle embriyoların gelişiminin uyarıldığı ve blastosiste gelişim oranının arttığı saptanmıştır (84, 85).

Ayrıca G1 ve P1 gibi mediyumlarda bulunan taurinin antioksidan olarak işlev görebileceği de düşünülmektedir.

4.4.8. Antibiyotikler

Penisilin, streptomisin ve gentamisin embriyoları bakteriyel kontaminasyondan koruma amacıyla kültür mediyumlarına eklenmektedir. 1996’ da Magli MC ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mediyumlara antibiyotik eklenmesinin embriyoların gelişimi bozduğu gösterilmiştir (86). Bu çalışma sonrasında kültür ortamında antibiyotik bulunması konusunda tereddütler oluşmaya başlamıştır.

4.4.9. Protein ve Makromoleküller

Mediyumlara primer protein kaynağı olarak %5-20 arasında değişen oranlarda olmak üzere ısıtılarak inaktive edilmiş anne veya fetal kordon serumu eklenebilmektedir; fakat öncelikle hepatit ve HIV yönünden araştırılmalıdır (10, 11). Tuba uterinada en çok bulunan makromolekül olan albuminden dolayı HSA (12, 13) veya BSA (9) en çok tercih edilen ürünler olmakla birlikte plazmanat (14), plazmatein ve SSS (15, 16) gibi globulinden zenginleştirilmiş albumin solüsyonları da kullanılmaktadır.

Embriyo kültür mediyumlarında bulunan proteinin, embriyoların gelişimi için sadece nitrojen kaynağı yaratmakla kalmayıp; aynı zamanda kültür ortamında kullanılan su, cam veya plastik malzemelerle geçebilen ve embriyo gelişimini olumsuz etkileyen toksik metal

iyonları için de bağlayıcı görev yaparak toksik etkilerini nötralize ettiği de gösterilmiştir (17). Ayrıca kültür ortamında bulunan proteinler embriyonun kültür kaplarına ve cam pipetlere yapışmasını önleyerek manipülasyonlarını kolaylaştırır (2, 6, 17).

Serum albumini yeterince saflaştırılsa da; yağ asitleri ve diğer birçok küçük molekülleri de içerebilir ve serumdaki küçük moleküller embriyotrofik etkileriyle embriyoner gelişimi uyarırlar (87, 88). Yeni üretilen mediumlarla birlikte kullanıma sunulan recombinant insan serum albumini (rec-HSA), kan türevlerinin kullanılmasından kaynaklanan sorunları giderdiği gibi, üretim serileri arasındaki farklılıkları da minimize etmektedir (6).

Serum yerine kullanılacak alternatif makromolekül arayışları da devam etmektedir. Dişi genital sistem salgılarının en büyük komponenti glikozaminoglikan ve proteoglikanlardır; bu moleküller glikoproteinlere benzer olarak sodyum (Na) gibi kationlara afinite gösterirler, bunlardan biri olan hiyaluronat da albumin yerine kullanılmaktadır (89). İnsan endometriyumu ve embriyosu hiyaluronat reseptörlerine sahiptir ve implantasyon sırasında embriyonun endometriyuma tutunmasında işlev gördüğü düşünülmektedir (90).

4.4.10. Hormon ve Büyüme Faktörleri

Preimplante embriyolar üzerine hormonların etkisini araştıran çalışma sayısı çok azdır. İn vivo embriyolara genital kanal hücreleri tarafından iletiildiği kabul edilmektedir (91).

İnsan genital kanal sıvılarında büyüme faktörlerinin bulunduğu yönündeki bulgulardan sonra bu faktörlerin embriyoner gelişimde, özellikle hücre sayısını arttırarak işlev görebileceği üzerinde durulmakta; lakin mediumda bulunması gereken konsantrasyonun ayarlanabilmesi için daha fazla çalışmaya gerek olduğu düşünülmektedir (6).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
1. Pure Sperm 100	<i>Nidacon</i>	PS100-100
2. Pure Sperm Buffer	<i>Nidacon</i>	PSB-100
3. G-MOPS	<i>Vitrolife</i>	10129
4. G-IVF	<i>Vitrolife</i>	10135
5. G-1. v5	<i>Vitrolife</i>	10127
6. G-2 .v5	<i>Vitrolife</i>	10131
7. HSA-Solution	<i>Vitrolife</i>	10064
8. OVOIL	<i>Vitrolife</i>	10029
9. G-RINSE	<i>Vitrolife</i>	10069
10. HYASE-10X	<i>Vitrolife</i>	10017
11. ICSI	<i>Vitrolife</i>	10111
12. Diff-3 Quick Boya	<i>Gainland Chemical Company</i>	SP300

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışmaya çocuk sahibi olmak için Hospitalium Tüp Bebek Merkezi' ne infertilite tedavisi için başvuran ve ICSI programına alınan toplam 100 hasta dahil edildi.

Çalışma gruplarına 40 yaşını aşmış; total fertilizasyon başarısızlığı olan, blastosist transferi yapılan, azospermik olup TESE uygulanan, çözülmüş embriyo transferi yapılan, preimplantasyon genetik tanı (PGD) yapılan hastalar dahil edilmedi.

Çalışmamızda kullanılan HSA solüsyonu, insan donörlerinden alınan serumdan elde edilmiş olup, hepatit ve HIV açısından kontrolleri yapılarak satışa sunulan ticari bir üründü.

1. çalışma grubundaki hastaların oositlerine uygulanan ICSI işlemi sonrasında 2PN' den gelişen embriyolar, 9,5 ml kültür mediumuna 0,5 ml HSA (Vitrolife, İsveç) solüsyonu eklenerek hazırlanmış olan %5 HSA' lı kültür mediumunda inkübatörler içinde kültüre edildi.

2. çalışma grubundaki hastaların oositlerine uygulanan ICSI işlemi sonrasında 2PN' den gelişen embriyolar, 9 ml kültür mediumuna 1 ml HSA solüsyonu eklenerek hazırlanmış olan %10 HSA' lı kültür mediumunda ve inkübatörler içinde kültüre edildi.

Her grup hastanın ICSI sonrasında 2PN' den gelişen embriyolarının gelişimleri transfer gününe kadar takip edilerek embriyo kalitelerine göre 4 alt gruba ayrılmıştır. 1. alt grup Grade 1 (1. ve 2. grup n=90, n=60) , 2. alt grup Grade 2 (1. ve 2. grup n=90, n=108), 3. alt grup Grade 3 (1. ve 2 grup n=30, n=32) ve 4. alt grup Grade 4 (1. ve 2. grup n=0, n=2) kalitesine sahip embriyolardan oluşturuldu.

5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER

5.3.1. Hastaların Hazırlanması

Kadınlara birden fazla oosit elde edebilmek amacı ile over stimülasyonu uygulandı. Bu amaçla gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları agonist (Lucrin; Abbott, Fransa) veya antagonistleri (Cetrotide; Serono, Aubonne, İsviçre, Orgalutran; Organon Oss Hollanda) ve insan menopozal gonadotropinleri (HMG) ya da folikül stimulan hormonları

(FSH) (Menogon; Ferring, Kiel, Almanya, Gonal-F; Serono, Aubonne, İsviçre, Puregon; Organon Oss Hollanda) 'nın birlikte kullanıldıkları ilaç protokolleri uygulandı.

Overlerin tedaviye verdiği yanıt ultrason kontrolleri ve serum östradiol seviyelerinin ölçümü ile takip edildi. Folikül çapı yeterli büyüklüğe (en az 18 mm) ulaştığında 5000 ya da 10000 IU insan koryonik gonodotropini (hCG) (Pregnyl; Organon) enjeksiyonu yapıldı ve enjeksiyon saatinden sonraki 36. saatte oosit toplama işlemi planlandı.

Tedavi sürecinde ön bilgi olması amacı ile erkeğe semen analizi uygulandı. Örneğin genel değerlendirilmesi World Health Organization (WHO) kriterlerine, morfolojik değerlendirmesi ise "Kruger kesin kriterleri" ne göre yapıldı (25).

3-5 günlük cinsel perhiz sonunda mastürbasyon yöntemi ile steril kaba (Falcon 4013, BD, Fransa) alınan semen örneği 10-15 dakika 37°C' lik etüvde (Heraeus B6) bekletilerek likefiye olması sağlandı. Semen örneğinin görünüm ve viskozitesi değerlendirildi. Örnek hacminin ölçülmesi için 10 ml' lik serolojik pipet (Falcon 357551, BD, Fransa) kullanıldı. Likefiye olmuş semen örneğinin 10µl' si makler sayım kamarasına (Makler chamber, Sefi Medikal Instr. İsrail) koyulup, faz kontrast mikroskobunda (Olympus CX 31, Japonya) 20X objektif altında incelendi ve tüm karelerdeki (100 adet) sperm hücreleri sayıldı, sonuç 10' a bölünerek "mil/ml" olarak konsantrasyon belirlendi. Sperm hücrelerinin motilite değerlendirmesi için 10 µl semen otomatik pipet ile lama koyulup üzerine 24 mm x 24 mm lamel kapatıldı. 40X objektif ile en az 4 mikroskop alanında 100 sperm incelendi. İleri hızlı hareketliler 'A', ileri yavaş hareketliler 'B', yerinde hareketliler 'C' ve hareketsizler 'D' olarak değerlendirilerek yüzde oranları hesaplandı. A, B ve C harekete sahip sperm hücrelerinin oranları toplanarak toplam motilite oranı belirlendi.

Morfolojik skorlama için lam üzerine yayılarak hazırlanan semen preparatları Diff-Quick yöntemi ile boyandı. Morfoloji X100 büyütmede faz kontrast mikroskopta "Kruger kesin kriterleri" ne göre değerlendirildi.

5.3.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU)

HCG enjeksiyonundan 36. saat sonra genel anestezi eşliğinde transvaginal olarak ultrason probuna çift lümenli steril OPU iğnesinin bağlantısı ile ve yıkama medyumunu olarak G-MOPS kullanılarak oosit toplama işlemi yapıldı. Aspire edilen folikül sıvısı 13 ml' lik steril tüplere (Falcon 2001, BD Fransa) alındı ve embriyoloji laboratuvarında

laminar air flow içinde stereo mikroskop altında (SZ 61 Olympus, Japonya) steril petriye (Nunc 150360, Danimarka) dökülerek korona-kumulus kompleksi arandı.

Toplanan korona-kumulus kompleksleri 9,5 ml G-MOPS medyumuna (Vitrolife, İsveç) 0,5 ml HSA solüsyonu eklenerek hazırlanmış ve 37°C' ye ısıtılmış olan %5 HSA'lı G-MOPS içinde yıkanarak, bir gün önceden hazırlanarak inkübe edilmiş 9 ml G-IVF (Vitrolife, İsveç) medyumuna 1 ml HSA solüsyonu eklenerek hazırlanmış olan %10 HSA'lı G-IVF medyumunu içeren üzeri Ovoil (Vitrolife, İsviçre) ile kapatılmış dört kuyucuklu steril kültür tabağında (Nunc 144444, Danimarka) 2-3 saat inkübe edilmek üzere hızlıca 37°C' deki %95 nem içeren, %6 CO₂ ve %5 O₂' lik inkübatöre (Labotect C60, Almanya) kaldırıldı.

5.3.3. Semen Örneğinin Hazırlanması

OPU günü semen sayı, motilite ve morfoloji yönünden tekrar değerlendirildi.

Semen analiz sonuçları not edilerek, seminal plazmanın uzaklaştırılması amacıyla Dansity Gradient Santrifügasyon yöntemi ile sperm yıkama işlemi yapıldı.

Bu amaçla Pure Sperm 100 (Nidacon, İsveç) ve Pure Sperm Buffer (Nidacon, İsveç) solüsyonları ile %90' lık ve %45' lik olmak üzere iki farklı gradient hazırlandı. Steril konik tüpe (Nunc 339651, Danimarka) önceden oda ısısına getirilmiş 1 ml %90 gradient üzerine yavaşça %45' lik gradient yavaşça eklenerek birbirine karışmayan iki tabaka oluşturuldu. Likefiye olmuş semen örneğinden 1 ml bu tabakaların üzerine yavaşça eklendikten sonra 1300 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi (Heraeus Labofuge 400, Almanya). Santrifüj sonrası tüpün süpernatantı 0,5 ml pellet kalacak kadar çekildi ve kalan pellet 1ml' lik steril serolojik pipet ile (Falcon 357521, BP Fransa) temiz bir tüpe aktarıldı. Üzerine bir gün önce CO₂' li inkübatörde inkübe edilmiş 3 ml %10 HSA' lı G-IVF eklenerek 2200 rpm' de 6 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra tüpün dibinde 0,5 ml kalacak şekilde süpernatant alındı, pellet süspanse edildi. Yıkama sonrası konsantrasyon ve motilite değerleri not edilerek ICSI' de kullanılmak üzere inkübatöre kaldırıldı.

5.3.4. Oosit Temizleme İşlemi

Oositlerin olgunluk değerlendirmesi ve mikroenjeksiyon işleminde polar body (PB)'nin pozisyonunu ayarlayabilmek için oosit etrafındaki korona-kumulus hücreleri temizlenerek uzaklaştırıldı. Temizleme işlemi, OPU' dan minimum 2 saatlik inkübasyon süresi sonrası hyalüronidaz enzimi (Hyase-10X, Vitrolife, İsveç) kullanılarak gerçekleştirildi. 10µl Hyase-10X mediumu 0,7ml %5 HSA' lı G-MOPS mediumu ile dilüe edilerek hazırlanan kültür kabına alınan oositler yaklaşık 15-20 saniye cam pasteur pipetle alınıp verileretrafındaki kumulus-korona kitlesinden kısmen temizlendi. Oosit etrafında kalan kumulus hücreleri hyalurinidaz emzimi içermeyen %5 HSA' lı G-MOPS mediumunda 170-130 µm olmak üzere farklı çaplı pipetler (Vitrolife; İsveç) kullanılarak mekanik olarak temizlendi. Pipetleme sonrası %10 HSA' lı G-IVF mediumunda yıkanan oositlerin inverted mikroskopta (Olympus IX-71, Japonya) X40 büyütmede maturasyon değerlendirilmesi yapıldı.

Sitoplazması homojen gözüken ve polar cisimciği bulunan oositler metafaz II (MII), polar cisimciği gözükmeyen oositler metafaz I (MI), germinal vesikül içeren oositler ise GV olarak değerlendirildi. ICSI işlemi sadece MII oositlere yapılırken; MI ve GV oositlere ise olgun olmadıkları için ICSI yapılmadı.

5.3.5. İntra Sitoplazmik Sperm Emjeksiyonu (ICSI)

Oositler toplandıktan 3-4 saat sonra ICSI işlemi yapıldı. Öncelikle mikroenjeksiyonun yapılacağı kültür tabağı hazırlandı. Bu tabağa (Nunc 150270, Danimarka) oosit sayısına göre önceden ısıtılmak üzere 37°C' lik etüve kaldırılmış %5 HSA' lı GMOPS medyumundan 5µl' lik damlalar, hemen yanına sperm hareketini yavaşlatan visköz yapıdaki polivinilpirolidon (PVP) (ICSI-100, Vitrolife, İsveç)'den 10µl oval bir damla yapıldı. Damlalar 6-7 ml ısıtılmış Ovoil ile kapatıldı.

PVP içine yıkanmış semen örneğinden 2-3µl, GMOPS damlalarına da oositler yerleştirildi. Mikroenjeksiyon işlemi Hoffman modülasyonu ve Narishige mikroenjeksiyon ünitesi içeren bir invert mikroskopta (Olympus, IX 71, Japonya) ısıtıcı tabla üzerinde X40 büyütme objektif altında gerçekleştirildi. İşlem enjeksiyon pipeti (COOK, K-MPIP-3330, İrlanda) ile bir tutucu pipet (Humagen, MPH-MED-30) kullanılarak gerçekleştirildi.

PVP içerisinde hareketli, morfolojik olarak normale yakın olan bir sperm seçildi. Enjeksiyon pipetinin uç kısmı sperm kuyruğunun üzerine getirildi. Sperm kuyruğu, pipet ile kültür tabağının tabanı arasında sıkıştırılarak immobilize edildi. Sperm baş kısmı önde olacak şekilde enjeksiyon pipetine çekildi. Oosit polar cisimciği saat 6 ya da 12 hizasında olacak şekilde tutucu pipet ile sabitlendi. Enjeksiyon pipeti oosit sitoplazması içine ulaştırıldığında hafif bir aspirasyon yapıldı. Ooplazmanın pipet içine yavaşça dolması ve sperm hücresinin geriye doğru hareketlenmesinin ardından yavaşça aspire edilen sitoplazma ve sperm geri verildi. Diğer yumurtalara da aynı işlem gerçekleştirildi.

İşlem esnasında sperm, oosit morfolojisi ve mikroenjeksiyon ile ilgili tüm bilgiler sıra ile ICSI takip formuna kaydedildi. Mikroenjeksiyon sonrası oositler sırayla medium damlalarının içinden alındı ve 1. çalışma grubu için %5 ya da 2. çalışma grubu için %10 HSA' lı G1 medyumunu ile hazırlanarak inkübe edilmiş petri kabında (Nunc 150270, Danimarka) alt damlalarda yıkanarak numaralandırılmış üst damlalara yerleştirildi. 37°C, %95 nem, %6 CO₂ ve %5 O₂ ortam sağlayan inkübatöre (Labotect C60) kaldırıldı.

5.3.6. Fertilizasyon Kontrolü ve Embriyo Gelişimi

Fertilizasyon değerlendirmesi mikroenjeksiyon işleminden 16-20 saat sonra inverted mikroskopta yapıldı. Oosit sitoplazmasında 2 adet PN ve 2 adet PB görülmesi normal fertilizasyon bulgusu olarak kabul edildi. Pronükleus sayısı, pronükleus pozisyonu ve boyutu, PB sayısı ve NPB' leri not edilerek fertilizasyon değerlendirildi. Sınıflama için Scott ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları skorlama yöntemi kullanıldı (40).

Fertilize olan oositler bir gün önceden hazırlanarak inkübe edilmiş 1. çalışma grubu için %5 veya 2. çalışma grubu için %10 HSA içeren G1 kültür kaplarına alınarak bir sonraki kontrole kadar tekrar inkübatörlere kaldırıldı.

Fertilizasyon kontrolünden 24 saat sonra 2. gün embriyo kontrolleri yapılarak bir gün önceden hazırlanarak inkübe edilmiş %5 veya %10 HSA içeren G1 kültür kaplarına alındı.

2. gün embriyo transferi yapılan hastalara embriyolar, G1 solüsyonu içerisinde transfer edildi.

Eğer hastaya 3. gün embriyo transferi yapılacak ise embriyolar kültür kabında inkübatörlere kaldırılarak ertesi güne kadar inkübe edilmeye devam edildi.

Fertilizasyon kontrolünden 48 saat sonra 3. gün embriyo kontrolleri yapılarak bir gün önceden hazırlanarak inkübe edilmiş %5 veya %10 HSA içeren G2 kültür kaplarına alındı.

Embriyoların blastomer sayısı not edilerek 2. gün 2-6 hücreli, 3. gün 6-10 hücreli embriyo blastomer sayısı varlığı normal kabul edildi.

Kalite değerlendirmesi için 2. ve 3. gün aynı kriterler değerlendirildi; blastomer büyüklüğü, fragmentasyon oranları ve sitoplazmik görünüm dikkate alınarak Hardarson ve arkadaşlarının 2001 yılında yayınladıkları aşağıdaki sınıflandırma yapıldı (58).

- Grade I embriyolarda fragmentasyon yoktu, eşit büyüklükte blastomerler vardır ve embriyo sitoplazması homojen görünümdeydi.
- Grade II embriyolar üç alt grupta değerlendirilmekteydi:
 - Grade IIA embriyolarda %20' den az oranda fragmentasyon bulunmaktaydı.
 - Grade IIB embriyoların blastomerleri eşit büyüklükte değildi.
 - Grade IIC embriyo sitoplazmalarının görünümü homojen değildi.

*Grade II A, B, C sınıfı embriyolarda çeşitli varyasyonlar da kullanılabilmekteydi (Örn: Grade II BC vb.).

- Grade III embriyolarda %20-50 oranında fragmentasyon vardı.
- Grade IV embriyoların fragmentasyon oranları %50' den fazlaydı.

Blastomerlerde birden fazla nükleus olup olmadığı not edilerek mümkünse transferde tercih edilmeme sebebi olarak gösterildi.

Grade I, Grade II, Grade III ve Grade IV alt grupları oluşturmak üzere not edildi. Gelişim sürecinde gelişimi duraksamış veya yavaşlamış olan embriyolar da arrest olarak not edildi.

5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Normallik testi “ Shapiro Wilk Testi ” ve histogram grafikleri çizilerek yapıldı. Ölçümsel değişkenler normal dağılmadığı için 2 grup arasındaki karşılaştırmalar “Mann-Whitney U ” testi uygulanarak yapıldı.

Kategorik değişkenler X^2 ve “ Fisher Kesin Olasılık ” testleri ile değerlendirildi.

Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alındı. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows 17.0 programı kullanıldı.

6. BULGULAR

Bu çalışmaya çocuk sahibi olmak için infertilite tedavisi için başvuran ve ICSI programına alınan toplam 100 hasta dahil edildi.

40 yaşını aşmış; total fertilizasyon başarısızlığı olan, blastosist transferi yapılan, azospermik olup TESE uygulanan, çözülmüş embriyo transferi yapılan, preimplantasyon genetik tanı (PGD) uygulanan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

1. çalışma grubundaki hastaların oositlerine uygulanan ICSI işlemi sonrasında 2PN' den gelişen embriyolar, 9,5 ml kültür mediumuna 0,5 ml Human Serum Albumin (HSA) (Vitrolife, İsveç) solüsyonu eklenerek hazırlanmış olan %5 HSA' lı kültür mediumunda inkübatörlerde kültüre edildi.

2. çalışma grubundaki hastaların oositlerine uygulanan ICSI işlemi sonrasında 2PN' den gelişen embriyolar, 9 ml kültür mediumuna 1 ml HSA solüsyonu eklenerek hazırlanmış olan %10 HSA'lı kültür mediumunda inkübatörlerde kültüre edildi.

Çalışma grubu	Grup 1* Olgu Sayısı	Grup 2** Olgu Sayısı
Toplam olgu sayısı		
100	50	50

Tablo 1: Çalışma gruplarında değerlendirilen olgu sayıları

*Kültür mediumuna %5 HSA eklenen grup; **Kültür mediumuna %10 HSA eklenen grup

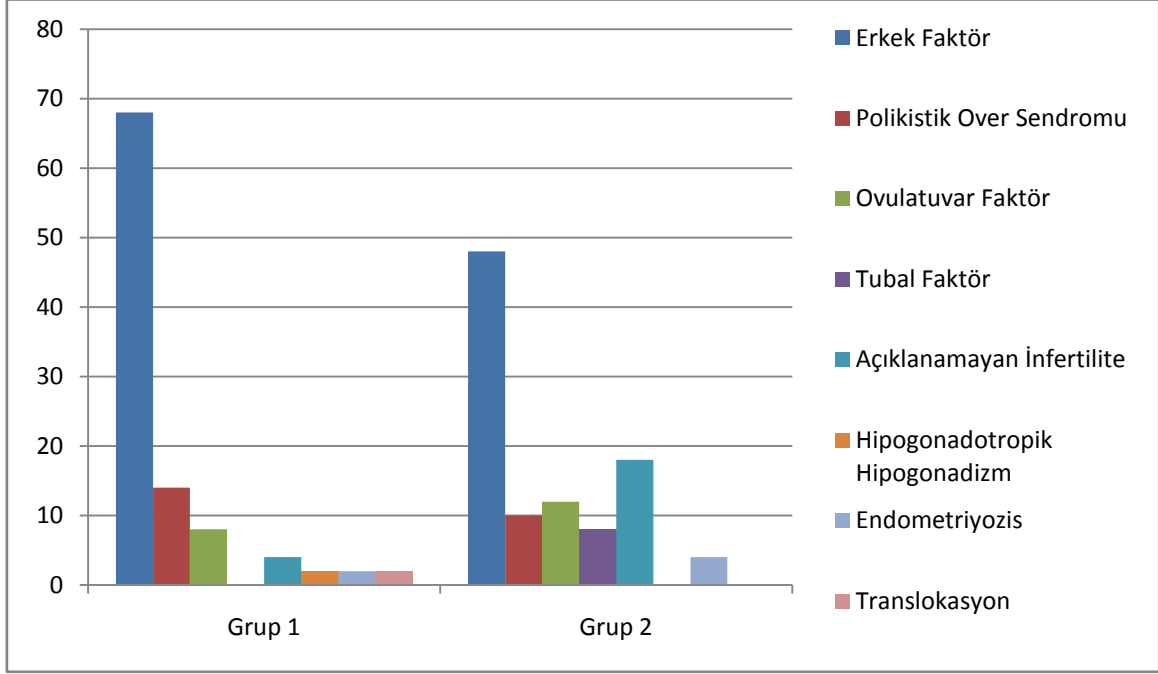
Çalışma gruplarının yaşları (sırasıyla; $29,54 \pm 5,14$; $31,16 \pm 4,78$), infertilite süreleri (sırasıyla; $5,74 \pm 4,23$; $6,56 \pm 3,93$), toplanan oosit sayıları (sırasıyla; $8,96 \pm 5,01$; $9,16 \pm 4,31$), MII oosit sayıları (sırasıyla; $6,82 \pm 4,24$; $6,66 \pm 3,47$) benzer ($p > 0,05$) olarak bulundu. Gruplar arasında fertilizasyon ve klivaj oranları açısından anlamlı fark belirlenmedi ($p > 0,05$) (Tablo 2).

	GRUP 1	GRUP 2	p
Yaş *	(29,54 ± 5,14); 30 (19-38)	(31,16 ± 4,78); 30,5 (22-39)	0,181***
İnfertilite süresi *	(5,74 ± 4,23); 4,75 (1-24)	(6,56 ± 3,93); 6 (1-17)	0,130***
İnfertilite sebebi n(%)			
• Erkek faktör	34 (%68)	24 (%48)	
• Polikistik Over Sendromu	7 (%14)	5 (%10)	
• Ovulatuvar Faktör	4 (%8)	6 (%12)	
• Tubal faktör	0 (%0)	4 (%8)	
• Açıklanamayan İnfertilite	2 (%4)	9 (%18)	
• Hipogonadotropik Hipogonadizm	1 (%2)	0 (%0)	
• Endometriyozis	1 (%2)	2 (%4)	
• Translokasyon	1 (%2)	0 (%0)	
Toplanan oosit sayısı *	(8,96 ± 5,01); 9 (2-31)	(9,16 ± 4,31); 8 (2-19)	0,709***
MII oosit sayısı * (ICSI yapılan oosit sayısı)	(6,82 ± 4,24); 6 (2-26)	(6,66 ± 3,47); 6,5 (1-15)	0,981***
Fertilizasyon * (2 PN** sayısı)	(4,94 ± 2,67); 4,5 (1-13)	(5,04 ± 2,85); 5 (1-14)	0,986***
Klivaj *	(4,76 ± 2,45); 4 (1-10)	(4,90 ± 2,81); 4 (1-14)	0,983***

Tablo 2: Çalışma gruplarında yaş, infertilite süresi, infertilite sebebi oranları, toplanan oosit sayısı, MII oosit sayısı, fertilizasyon oranı, klivaj oranı parametelerinin dağılımları.

*(ort ± S.D); medyan(min-max); **Pronükleus; ***İstatistiksel olarak fark yok

Çalışma gruplarının infertilite sebepleri incelendiğinde olgu sayıları az olduğundan dolayı istatistiksel değerlendirilmeye alınmadı (Şekil 1).



Şekil 1: Çalışma gruplarının olgularında infertilite sebeplerinin alt gruplarının oranları.

Grup 1 olgularında toplam 238 embriyodan 210 tanesi gelişmeye devam etti ve değerlendirmeye alındı. Grup 2 olgularında 252 embriyodan 202 tanesi gelişmeye devam etti ve değerlendirmeye alındı. Kaliteleri değerlendirilirken öncelikle blastomer sayılarının 2. günde 2-6 blastomer ve 3. günde 6-10 blastomer olmasına dikkat edildi. 1. alt grup Grade 1 embriyolardan, 2. alt grup Grade 2 embriyolardan, 3. alt grup Grade 3 embriyolardan ve 4. alt grup Grade 4 embriyolardan oluşturuldu (Resim 1).



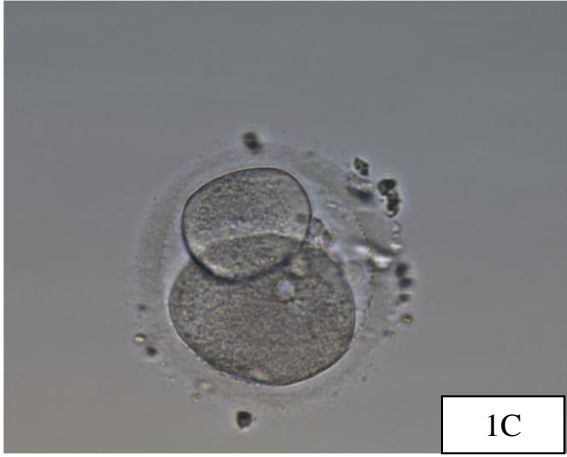
1A

2. gün 2 hücreli Grade 1 embriyo



1B

2. gün 2 hücreli Grade 2A embriyo



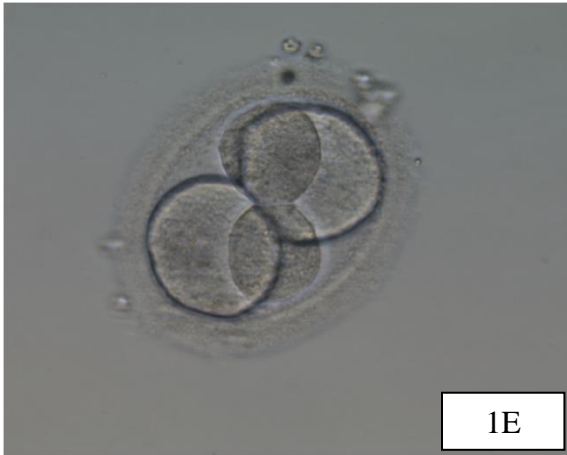
1C

2. gün 2 hücreli Grade 2B embriyo



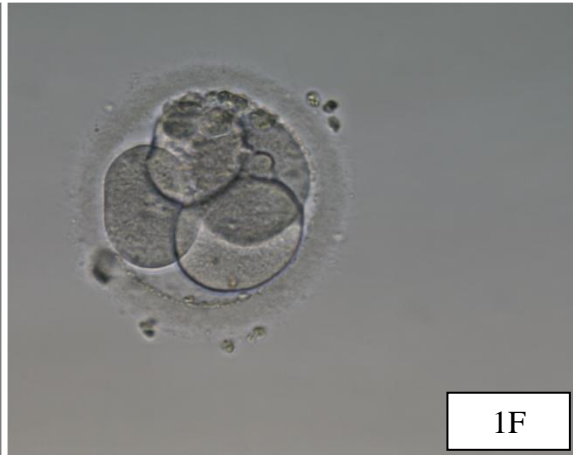
1D

2. gün 4 hücreli Grade 1 embriyo



1E

2. gün 4 hücreli Grade 2B embriyo

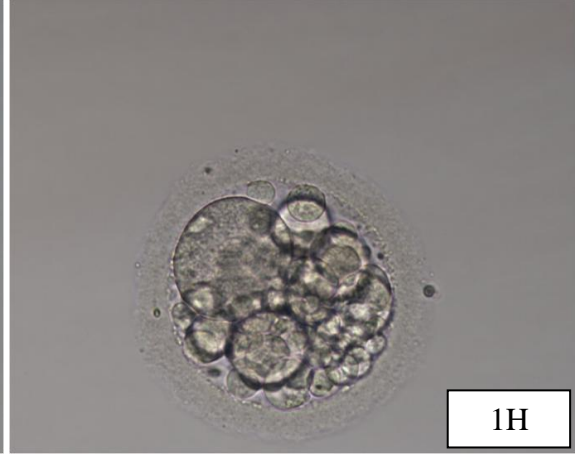


1F

2. gün 4 hücreli Grade 2AB embriyo



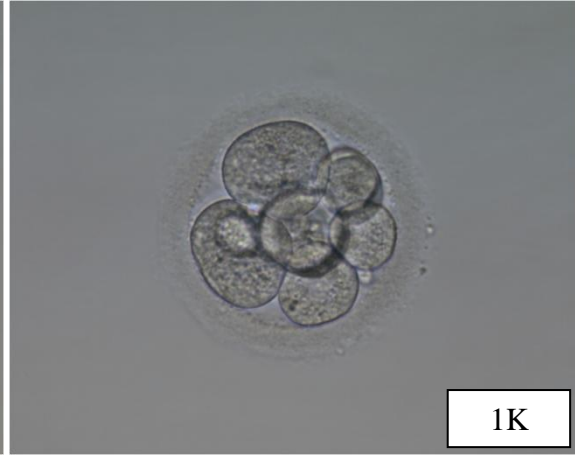
2. gün 4 hücreli Grade 3 embriyo



2. gün 4 hücreli Grade 4 embriyo



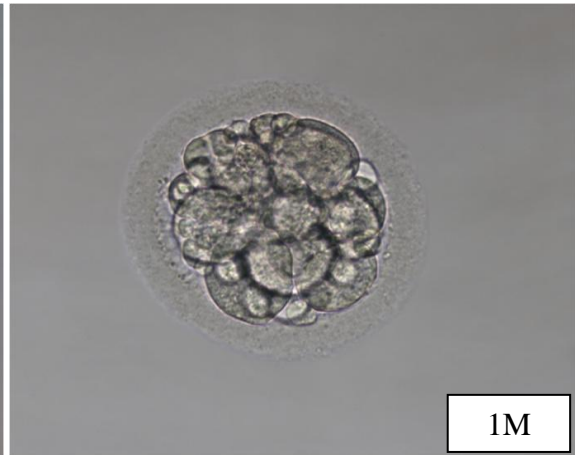
3. gün 8 hücreli Grade 1 embriyo



3. gün 8 hücreli Grade 2BC embriyo



3. gün 8 hücreli Grade 3 embriyo



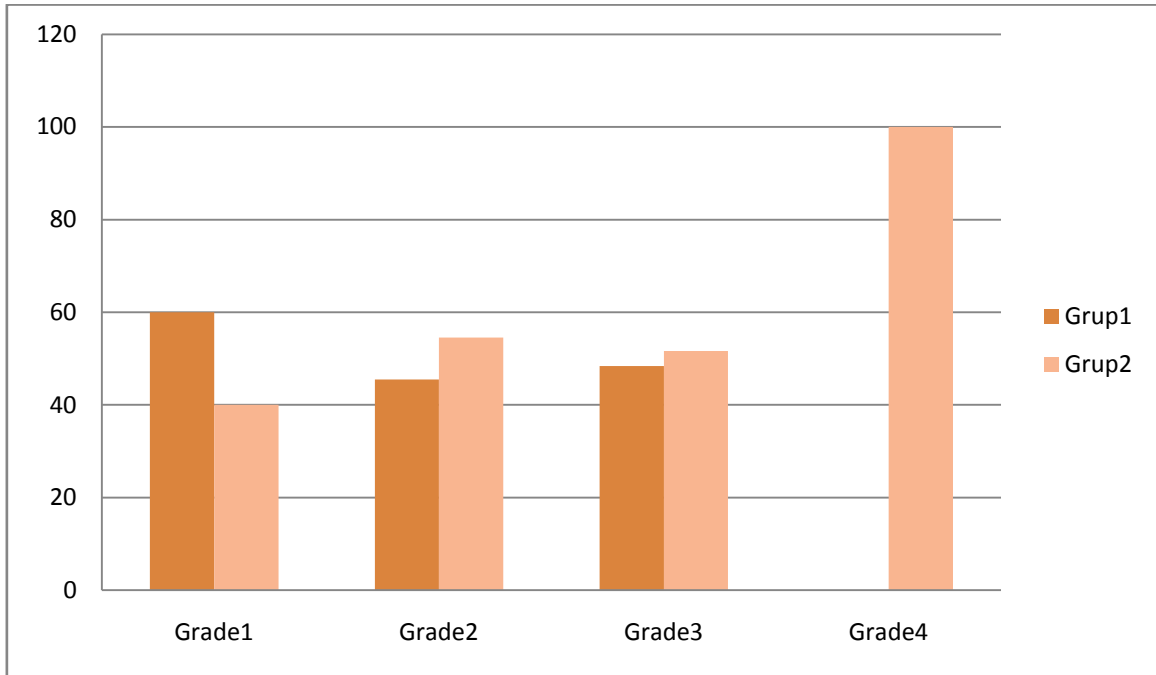
3. gün 8 hücreli Grade 4 embriyo

Resim 1 (A-M): Çalışmamıza ait olgulardan 2. veya 3. gün gelişen, Hardarson ve arkadaşlarının sınıflaması ile değerlendirilen embriyoların inverted mikroskoptaki görüntüleri (x200).

Gelişen embriyoların kaliteleri değerlendirildiğinde, çalışma grupları arasında gelişen embriyoların kalite oranları arasında anlamlı fark belirlenmedi ($p>0,07$) (Tablo 3, Şekil 2).

	Grup1	Grup 2	p
Grade 1 n (%)	90 (%60)	60 (%40)	0,74
Grade 2 n (%)	90 (%45,45)	108 (%54,55)	0,149
Grade 3 n (%)	30 (%48,39)	32 (%51,61)	0,416
Grade 4 n (%)	0 (%0)	2 (%100)	0,155

Tablo 3: Çalışma gruplarından elde edilen embriyoların kalite oranları.



Şekil 2: Çalışma gruplarından elde edilen embriyoların kalite oranları.

Her grup hastanın ICSI sonrasında 2PN' den gelişen embriyolarının gelişimleri takip edilerek transfer gününe göre 2. veya 3. gün oluşan embriyo kalitelerine göre 4 alt gruba ayrıldı: Grade 1, Grade 2, Grade 3, Grade 4.

1. grupta %46 2. gün (n=23) ve %54 3. gün (n=27) embriyo transferi yapılmıştır; 2. grupta %38 2. gün (n=19) ve %62 3. gün (n=31) embriyo transferi yapılmıştır. P=0,418 olup gruplar arasında embriyo transfer günleri benzer dağılım göstermiştir.

2. ve 3. gün embriyo transfer günleri dağılımı her bir grup içinde değerlendirildiğinde; 1. grupta 2. ve 3. gün arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı, ancak 2. grupta istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,042) (Tablo 4).

1. alt grup Grade 1 (1. ve 2. grup n=90 , n=60) , 2. alt grup Grade 2 (1. ve 2. grup n=90, n=108) , 3. alt grup Grade 3 (1. ve 2. grup n=30, n=32) ve 4. alt grup Grade 4 (1. ve 2. grup n=0, n=2) kalitesine sahip embriyolardan oluşturuldu.

Çalışma gruplarının embriyo transfer günlerine göre Grade 1 ve Grade 2 embriyo gelişmeleri benzer bulundu.

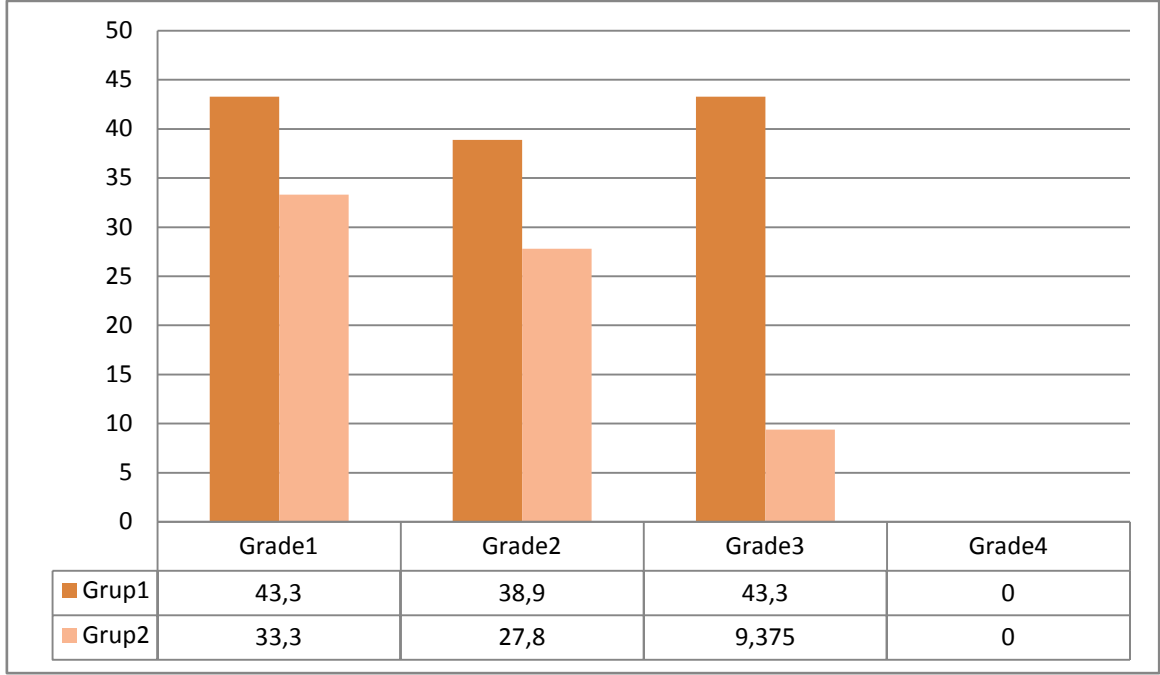
2. çalışma grubunun 3. gün embriyo transferi yapılan olgularında Grade 3 embriyo gelişimi daha fazlaydı (sırasıyla p=0,29; p=0,13); dolayısı ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,0057) (Tablo 4, Şekil 3, Şekil 4).

Embriyo transfer günü	GRUP 1		GRUP 2		
	2. gün	3. gün	2. gün	3. gün	
Grade 1	39 39/90=%43,3	51 51/90=%56,7	20 20/60=%33,3	40 40/60=%66,7	$X^2=1,12$ p=0,29
Grade 2	35 35/90=%38,9	55 55/90=%61,1	30 30/108=%27,8	78 78/108=%72,2	$X^2=2,27$ p=0,13
Grade 3	13 13/30=%43,3	17 17/30=%56,7	3 3/32=%9,375	29 29/32=%90,625	$X^2=7,64$ p=0,0057
Grade 4	0	0	0	2 2/2=%100	***
	$X^2=0,42$ p=0,81*		$X^2=6,35$ p=0,042**		

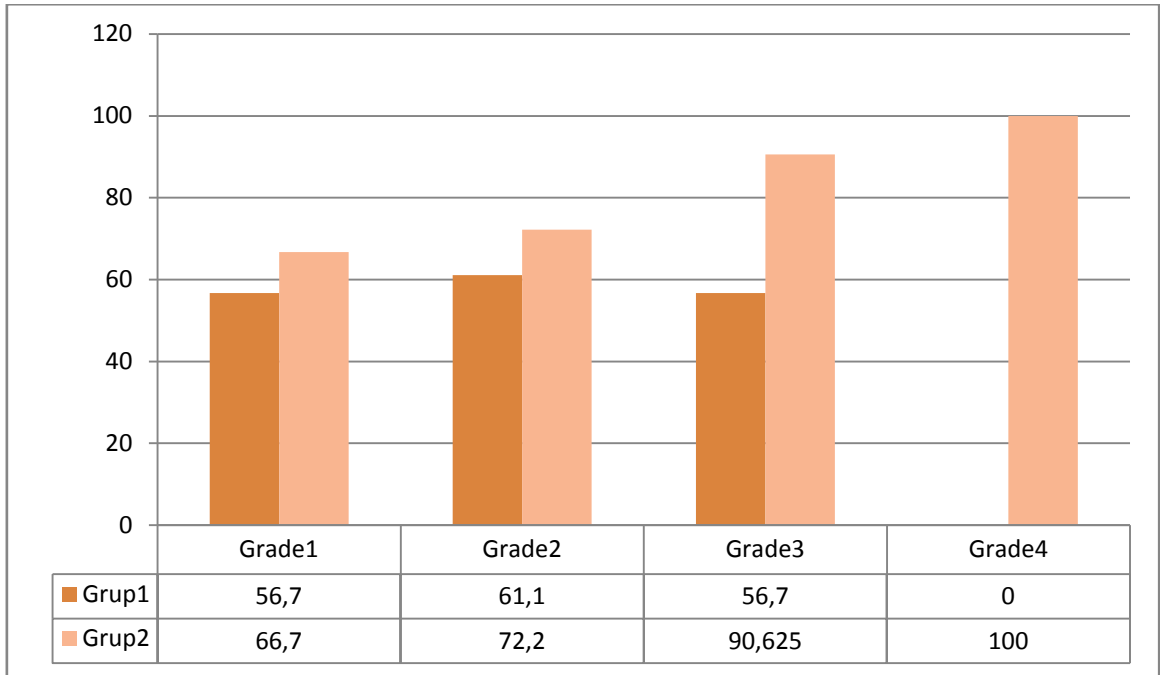
Tablo 4: Çalışma gruplarının embriyo transfer gününe göre embriyo kalite dağılımları.

*1. Grup 2. ve 3. gün arasında fark yok; ** 2. Grup 2. ve 3. gün arasında fark var.

***2 adet embriyo geliştiği için istatistik hesaplamalara dahil edilmemiştir.



Şekil 3: Çalışma gruplarının 2. gün embriyo gelişimlerinin dağılımı.



Şekil 4: Çalışma gruplarının 3. gün embriyo gelişimlerinin dağılımı.

7. TARTIŞMA

Bilindiği üzere proteinler; fizyolojik olarak osmoregülasyonda direkt rol alır, enerji kaynağı olarak görev yapar ve hormon, vitamin, metal salınımında depo olarak işlev görürler.

Albumin, kültür ortamlarında fiziksel olarak kayganlık ve kıvam sağlayarak embriyoların kültür tabaklarına yapışmasını önleyerek embriyo gelişimlerinin ilerlemesini kolaylaştırır.

Kadın üreme sisteminde bol miktarda bulunan albumin, in vitro embriyo gelişiminde kullanılan kültür mediumlarına en çok eklenen makromoleküldür.

İn vitro embriyoların koşullarını optimize etmek için, kültür sisteminde farklı makromoleküllerin rolleri incelenmiştir.

1990'ların başına kadar en çok kullanılan protein kaynağı olan insan serumu; hastanın kendisinden, gönüllülerden veya fetal kordon kanından elde edilmiştir (11).

Khan ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptıkları bir çalışmada, embriyo transfer mediumunda hasta serumunun yerine insan serum albumini kullanılmasının etkileri incelenmiştir. Bu amaçla hastalar 3 gruba ayrılmıştır. Grup A' da %75 hasta serumu, grup B' de %8 hasta serumu ve grup C' de %2,25 HSA eklenmiş embriyo transfer mediumlarının gebelik oranları sırasıyla %43, %27 ve %36 olarak verilmiş olup sonuçları benzer bulunmuştur (12). HSA'nın embriyo kültürü ve transfer mediumlarına eklenmesinin güvenli ve uygun olduğu belirtilmiştir.

Prados ve arkadaşları 2002 yılında insan embriyo kalitesini optimize etmek için kültür mediumları ve protein kaynağı üzerine bir çalışma yapmışlardır; üç farklı ticari medium ile laboratuvarlarında hazırladıkları mediumu karşılaştırırken, kendi hazırladıkları mediuma protein kaynağı olarak %5 HSA veya hastanın kendi serumu veya her ikisinin kombinasyonunu eklemişlerdir. HSA'nın hasta serumuna oranla sonuçları iyileştirmedeğini bildirmişlerdir (10).

Hepatit ve HIV taşıma riski olması dolayısıyla HSA kullanımını önermeyen otörler olsa da, ticari olarak insan donörlerden alınan serumdan albumin elde edilmesi sıkı denetimlerle yapılmaktadır. Bunun yanında HSA'nın, diğer protein kaynaklarına göre kolay elde edilmesi ve ekonomik olması sebebiyle hala sıklıkla kullanılmaya devam etmektedir.

Hasta serumu ve gönüllülerden elde edilen serum albumininin hepatit ve HIV bulaştırma riski olduğu ileri sürülerek SSS geliştirilmesinin yolu açılmıştır. Psalti ve arkadaşları 1989 yılında, SSS' in negatif sonuçlarını bildirmişlerdir (92). Fakat bu konu ile ilgili olumlu sonuçlar bildirilen çalışmalar da yapılmıştır. Meintjes ve arkadaşları 2009 yılında, kültür ortamına %10 HSA veya %10 SSS ekleyerek implantasyon oranlarını, klinik gebelik oranlarını ve blastokist seviyesine ulaşarak dondurulabilecek kalitede olan embriyo oluşum oranlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada SSS, HSA' ya göre daha kompleks globulin fraksiyonuna sahip olduğundan dolayı implantasyon, gebelik ve blastokist oluşum oranlarında anlamlı olarak artış saptanmıştır (15).

Daha sonra ticari olarak HSA üretimini rekombinant insan albumin (rec-HSA) üretimi takip etmiştir. Bungum ve arkadaşları 2002 yılında, insan embriyolarında kullanılan kültür mediumlarına HSA veya rec-HSA eklediklerinde her iki grupta da yüksek implantasyon oranlarına ve benzer gebelik oranlarına ulaşmışlardır. Aynı zamanda rec-HSA kullanılan grupta daha iyi kalitede embriyo elde ettiklerini belirtmişler, ancak gelişen embriyo oranlarını bildirmemişlerdir (93).

Yakın zamanda ilgi glikozaminglikanlara dönmüş ve hyaluronan uterusunda fazla bulunan bir makromolekül olduğundan dolayı çalışmalarda yer almaya başlamıştır. Gardner ve Lane 2000 yılında farelerle yaptıkları çalışmada, insan serumundan elde edilen albumin yerine 1.25mg/ml rec-HSA veya 0,125 mg/ml rekombinant hyaluronan eklenmiş kültür mediumları kullanmışlardır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak da 5mg/ml HSA eklenmiş kültür mediumu kullanmışlardır. Blastokist gelişimi, hücre içi kitlesindeki hücre sayısı, trofoektoderm kitlesindeki hücre sayısı ve implantasyon oranları karşılaştırıldığında benzer sonuçlar bulmuşlardır (94).

Daha ileriki çalışmalarda embriyo transferlerinde rec-HSA 4 kat azaltılarak ve hyaluronan 4 kat artırılarak viskozitesi artırılmış ve Hyaluronan-Enriched Transfer Mediumu (HETM)'nin kullanılması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Valojerdi ve arkadaşları tubal faktörlerde gebeliğin arttığını belirtmişlerdir (95). Loutradi ve arkadaşları 2007 yılındaki çalışmalarında HETM'nin kullanımı ile pozitif bir etki görmediklerini bildirmişlerdir (96). Urman ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bazı hasta gruplarında klinik gebelik oranlarının arttığını bildirmişlerdir (97).

Mmorbeck ve arkadaşları 2001 yılında; embriyo gelişimi, sperm motilitesi ve antisperm antikor bağlanması üzerine protein etkilerini değerlendirirken BSA veya HSA'lı kültür mediumları kullanmışlardır. 5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml' lik BSA ve HSA' lı kültür ortamlarında tek hücreli fare embriyolarını 96 saat boyunca kültüre etmişlerdir. Sonuçta oluşan blastokist ve hatching oranları karşılaştırıldığında, yüksek HSA içeren kültür ortamlarının embriyo gelişimini inhibe ettiği sonucuna ulaşmışlardır (13).

Bizim çalışmamızda hastalardan bağımsız olarak kültür mediumuna eklenen %5 ve %10 HSA oranlarının fertilizasyon oranlarının ve klivaj oranlarının etkilemediği belirlenmiştir. Embriyo kaliteleri transfer gününe bakılmaksızın değerlendirildiğinde 2 grup arasında oluşan embriyo kaliteleri açısından da fark belirlenmemiştir.

Mmorbeck ve arkadaşlarının çalışmalarında, tek hücreli fare embriyolarının yüksek konsantrasyonda HSA içeren medium ile kültürü sonucunda blastokist ve hatching oranlarında azalma tespit edilmiş ve embriyo gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda, 2 grup arasında transfer gününe göre 2. ve 3. gün alt grupları oluşturulduğunda, 2. grupta 3. gün gelişen embriyolarda "Grade 3 embriyo" kalitesinde artış gözlenmesi sonucunda embriyo gelişimini inhibe ettiği düşünülmüştür. Ancak bu fark, 2. gruptaki 2. ve 3. gün gelişen embriyoların dağılımının farklı olmasından dolayı olabileceği fikrini doğurmuştur.

Bu literatürün eşliğinde, hasta sayısının daha fazla olduğu, ayrıca embriyo ve gebelik sonuçlarının da değerlendirilebildiği yeni çalışmaların yapılması, bundan sonraki araştırmalarda izlenecek yol olmalı kanaatindeyiz.

8. SONUÇ

Çalışmamızda embriyo kültür mediumlarına protein olarak %5 HSA veya %10 HSA eklenmesinin ICSI sonuçları üzerine etkisi incelendi.

Çalışmaya toplam 100 hasta dâhil edildi. 1. gruptaki 50 hastadan toplanan 341 MII oosit ICSI yapıldıktan sonra embriyo transfer gününe kadar %5 HSA içeren kültür mediumlarında kültüre edildi. 2. gruptaki 50 hastadan toplanan 333 MII oosit ICSI yapıldıktan sonra embriyo transfer gününe kadar %10 HSA içeren kültür mediumlarında kültüre edildi.

Bulgularımız doğrultusunda 2 ana grupta ICSI yapılan MII oositlerin fertilizasyon ve klivaj oranları arasında anlamlı bir fark görülmedi.

Her 2 ana grup transfer günündeki embriyo kalite dağılımlarına göre 4 alt gruba ayrıldı. 1. grup, gelişen Grade 1 embriyolardan (sırasıyla 90, 60), 2. grup, gelişen Grade 2 embriyolardan (sırasıyla 90, 108), 3. grup, gelişen Grade 3 embriyolardan (sırasıyla 30, 32) ve 4. grup, gelişen Grade 4 embriyolardan (0, 2) oluşturuldu.

Bulgularımız doğrultusunda gelişen embriyoların kaliteleri 2 grupta da benzer bulundu.

Ancak her 2 grubu embriyo transfer gününe göre 2. gün ve 3. gün olarak alt gruplara ayırarak embriyo kalitelerini karşılaştırdığımızda 2. grupta 3. gün embriyo transferi yapılmış olanlarda Grade 3 embriyoların anlamlı olarak fazla olduğu bulundu.

Bu bulgular doğrultusunda daha fazla hasta sayısının olduğu, ayrıca embriyo transferi ve gebelik sonuçlarının da değerlendirilebildiği yeni çalışmaların yapılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi hazırlamam sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda özveri ve sabırla beni destekleyen hocam Prof. Dr. Vildan KARPUZ' a, Yüksek Lisans eğitimim boyunca yeni bilgiler kazandıran ve tezimle yakından ilgilenerek beni yalnız bırakmayan Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK'e ve tüm İstanbul Bilim Üniversitesi çalışanları ile arkadaşımız İlknur KARAOSMANOĞLU' na;

Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni daima destekleyen klinik şefimiz Doç. Dr. Birgül GÜRBÜZ' e ve sevgili eşim Serdar ÇELİK' e, Yüksek Lisans programım esnasında dünyaya gelerek hayata bakışımı değiştiren oğlum Berken Mert ÇELİK'e, tezimi hazırlamam sırasında oğluma bakan ve büyük bir sabırla hep yanımda olan annem Sultan, babam Ramazan CENGİZ' e sonsuz teşekkürler ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Önder Ç. Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Adana, Nobel Kitabevi, 2011.
2. Vicdan K, Işık AZ. İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Ankara, Çağdaş Medikal Kitapevi, 1999.
3. Trounson A. Current perspectives of in vitro fertilization and embryo transfer. *Clin Reprod Fertil.* 1982, 1(1):55-65.
4. Waterstone J, Parsons J and Bolton V. Elective transfer of two embryos. *Lancet.* 1991, 337:975-976.
5. Staessen C, Janssenswillen C, Van Den Abbeel E. Avoidance of triplet pregnancies by elective transfer of two good quality embryos. *Hum Reprod.* 1993, 8:1650-1653.
6. Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. Veri Medikal Yayıncılık, 2008.
7. Arny M, Nachtigall L, Quagliare J. The effect of preimplantation culture conditions on murine embryo implantation and fetal development. *Fertil Steril.* 1987, 48:861-65.
8. Menezo YJR. Embryonic Preimplantation Development, Biochemical and Metabolic Aspect. Embryology 2. Course Book, ESHRE 93, 26-30 June, 1993.
9. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (Sperm/Oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim. Ankara, Serono Yayınları, 2000-01.
10. Prados N, Calderon G, Crespo M, Remohi J, Caligara C, Navarro J. Culture media and protein source in the optimization of human embryo quality. *Fertility and Steril.* 2002, 78(1):S254.
11. Laverge H, De Sutter P, Desmet R, Van der Elst J. and Dhont M. Prospective randomized study comparing human serum albumin with fetal cord serum as protein supplement in culture medium for in-vitro fertilization. *Human Reprod.* 1997, 12(10): 2263–2266.
12. Khan I, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Human serum albumin versus: a comparative study on embryo transfer medium. *Fertility and Steril.* 1991, 56(1):98-101.
13. Mmorbeck DE, Strom E, Heltemes K, Barrett K, Widstrom J, Corfman RS. Inhibitory action of human serum albumin (HSA) on Mouse embryo blastocyst

development, human sperm motility, and binding of antisperm antibodies. *Fertility and Steril.* 2001, 76- 3(1):103.

14. Adler A, Reing AM, Bedford JM, Alikani M, Cohen J. Plasmanate as a medium supplement for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 1993, 10(1):67-71.
15. Meintjes M, Chantilis SJ, Ward DC, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, and Madden JD. A randomized controlled study of human serum albumin and serum substitute supplement as protein supplements for IVF culture and the effect on live birth rates. *Human Reprod.* 2009, 24(4):782–789.
16. Weathersbee PS, Pool TB, Ord T. Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. *J Assist Reprod Genet.* 1995, 12(6):354-60.
17. Flood LP, and Shirley B. Reduction of embryotoxicity by proteinin embryo culture media. *Mol Reprod Dev.* 1991, 30:226.
18. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988, 49(1):112-7.
19. Mahadevan MM, Trounson AO. Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1985, 43(2):263-7.
20. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives. London and New York, A Martin Dunitz Book, 2004.
21. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992, 340(8810):17-8.
22. Pinheiro RC, Lambert J, Benard F, Mauffette F and Miron P. Effectiveness of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection for severe male infertility. *CMAJ.* 1999, 30: 161-172.
23. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, Van Roosendaal E, Schoysman D. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet.* 1993, 342(8881):1237.
24. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a

new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril*. 1994, 61(6):1045-51.

25. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986, 46(6):1118-23.
26. Flaherty SP, Payne D and Matthews CD. Fertilization Failures After ICSI In: Treatment of Infertility: The New Frontiers. Ed: Filicori, M. and Flamigni, C. Comms Media for Education: Princeton Junction. 1998.
27. Thornton K. Advances in assisted reproductive technologies. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2000, 27: 517–527.
28. Martin PM, Welch HG. Probabilities for singleton and multiple pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998, 70: 478-481.
29. Trounson A, Gardner D.K. Handbook of In Vitro Fertilization. Florida, USA, CRC Pres, 1993.
30. Longo FJ. Fertilization, 2nd ed. Chapman and Hall, London 1997.
31. Moos J, Faundes D, Kopf GS, Schultz RM. Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. *Hum Reprod*. 1995, 10: 2467.
32. Sathananthan AH, Kola I, Osborne J, Trounson A, Ng SC, Bongso A, Ratnam SS. Centrioles in the beginning of human development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88(11):4806-10.
33. Sadler TW Langman's. Langman Medikal Embriyoloji 9. Baskıdan Çeviri. Ed: Prof. Dr. Başaklar AC. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005.
34. Oura C, Toshimori K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int Rev Cytol*. 1990, 122:105-51.
35. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Biyolojisi 6. Baskıdan Çeviri. Ed: Prof. Dr. Yıldırım M, Prof. Dr. Okar , Prof. Dr. Dalçık H. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2002.
36. Salumets A, Hyden-Ganskog C, Suikkari AM, Tütünen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod*. 2001,16: 2177-2181.

37. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999, 14: 1318-1323.
38. Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod.* 2002, 17(12):3193-200.
39. Coskun S, Hellani A, Jaroudi K, Al-Mayman H, Al-Kabra M, Qeba M. Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reprod Biomed Online.* 2003, 7(1):86-90.
40. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000, 15: 2394-2403.
41. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod.* 2001, 16(11):2357-61.
42. Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes. *Hum Reprod.* 1999, 14(10):2588-95.
43. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod.* 2003, 18(11):2406-12.
44. Fu J, Wang XJ, Wang YW, Sun J, Gemzell-Danielsson K, Sun XX. The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2009, 26(8):437-41.
45. Sakkas D, Pervical G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril.* 2001, 76: 1150-1156.
46. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999, 14(9): 2345-2349.

47. Han YM, Wang HW, Abeydeera LR, Petersen AL. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol Reprod.* 1999, 61: 1340-1346.
48. Shapiro BS, Harris DC, Richter KS. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril.* 2000, 73(3):582-6.
49. Bavister B. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. *Hum Reprod Update.* 1995, 1: 91-148.
50. McKiernan SH, Bavister BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod.* 1994, 9: 2123-2129.
51. Roseboom T, Vermeiden J. Evaluation of embryo scoring systems and their value in predicting in-vitro fertilization outcome. *Assist. Reprod. Rev.* 1995, 5;53-59.
52. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997, 12(7): 1545-1549.
53. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril.* 1999, 71(5):836-42.
54. Claman P, Armant DR, Seibel MM, Wang TA, Oskowitz SP, Taymor ML. The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.* 1987, 4(4):218-222.
55. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfer. *Hum. Reprod.* 1995, 10(9): 2427-2431.
56. Munne S, Cohen J: Chromosomal abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod.* 1998, 4: 842-855.
57. Veeck LL. Atlas of Human Gametes and Conceptuses. The Parthenon Publishing Group New York. 6. Chapter. 1999.
58. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001, 16(2):313-318.

59. Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 1998, 70(1):60-6.
60. Nikas G, Ao A, Winston RM, Handyside AH. Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol Reprod*. 1996, 55: 32-37.
61. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1999, 11(3): 307-311.
62. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000, 73(6): 1155-1158.
63. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online*. 2005, 10(5): 669-681.
64. Whitten WK, Biggers JD. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil*. 1968, 17(2):399-401.
65. Edwards RG. Test-tube babies, 1981. *Nature*. 1981, 293(5830):253-6.
66. Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil Suppl*. 1971 ,14:7-21.
67. Lawitts JA, Biggers JD. Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Mol Reprod Dev*. 1992, 31(3):189-94.
68. HAM RG. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp Cell Res*. 1963, 29:515-26.
69. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod*. 1995, 10(12):3243-7.
70. Bertheusse K, Forshdal F and Maltau JM. (1997). In Vitro Fertilisation and Assisted Reproduction. Eds. Gomel V, and Leung PCK, Monduzzi Editorie, Bologna, 1997.
71. Wale RG. Effects of ions on the development of the pre-implantation mouse embryo in vitro. *Aust Biol Sci*, 1970, 23:421.

72. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*. 1996, 65(2):349-53.
73. Leese HJ, Hooper MA, Edwards RG, Ashwood-Smith MJ. Uptake of pyruvate by early human embryos determined by a non-invasive technique. *Hum Reprod*. 1986, 1(3):181-2.
74. Cross PC, Brinster RL. The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. *Exp Cell Res*. 1973, 77(1):57-62.
75. Miller JG, Schultz GA. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod*. 1987, 36(1):125-9.
76. Gardner DK, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod*. 1993, 48(2):377-85.
77. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the Mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod*. 1998, 13(12):3441-8.
78. Perkins JL, Goode L. Free amino acids in the oviduct fluid of the ewe. *J Reprod Fertil*. 1967, 14(2):309-11.
79. Tsai FC, Gardner DK. Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development in vitro and reduces subsequent developmental potential after transfer. *Fertil Steril*. 1994, 61(2):376-82.
80. Lane M, Gardner DK. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod*. 1998, 13(4):991-7.
81. Hoshi M, and Toyoda Y. Effect of EDTA on preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. *Jpn J Zootech*, 56:931.
82. Nasr-Esfahani M, Johnson MH, Aitken RJ. The effect of iron and iron chelators on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod*. 1990, 5(8):997-1003.
83. Noda Y. Embryo development in vitro. *Assist Reprod* 1992, 2:9.

84. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev.* 1991, 28(4):356-60.
85. Gardiner CS, Salmen JJ, Brandt CJ, Stover SK. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod.* 1998, 59(2):431-6.
86. Magli MC, Gianaroli L, Fiorentino A, Ferraretti AP, Fortini D, Panzella S. Improved cleavage rate of human embryos cultured in antibiotic-free medium. *Hum Reprod.* 1996, 11(7):1520-4.
87. Hanson RW, Ballard FJ. Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. *J Lipid Res.* 1968, 9(5):667-8.
88. Gray CW, Morgan PM, Kane MT. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. *J Reprod Fertil.* 1992, 94(2):471-80.
89. Gardner DK, Rodriegez-Martinez H, Lane M. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for Mouse embryo culture and transfer. *Hum Reprod.* 1999, 14(10):2575-80.
90. Behzad F, Seif MW, Campbell S, Aplin JD. Expression of two isoforms of CD44 in human endometrium. *Biol Reprod.* 1994, 51(4):739-47.
91. Lavranos TC, Seamark RF. Addition of steroids to embryo-uterine monolayer co-culture enhances embryo survival and implantation in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 1989, 1(1):41-6.
92. Psalti I, Loumaye E, Pensis M, Depreester S, Thomas K. Evaluation of a synthetic serum substitute to replace fetal cord serum for human oocyte fertilization and embryo growth in vitro. *Fertil Steril.* 1989, 52(5):807-11.
93. Bungum M., Humaidan P., Bungum L. Recombinant human albumin as protein source in culture media used for in vitro fertilisation, a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2002 May-Jun; 4(3): 233-6.
94. Gardner D.K., Lane M. Recombinant Human Serum Albumin and Hyaluronan Can Replace Blood-Derived Albumin in Embryo Culture Media. *Fertility and Sterility* 2000 Sep; 74(3): 31-32.

95. Valojerdi MR, Karimian L, Yazdi PE, Gilani MA, Madani T, Baghestani AR. Efficacy of a human embryo transfer medium: a prospective, randomized clinical trial study. *J Assist Reprod Genet.* 2006 May;23(5):207-12.
96. Loutradi KE, Prassas I, Bili E, Sanopoulou T, Bontis I, Tarlatzis BC. Evaluation of a transfer medium containing high concentration of hyaluronan in human in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2007 Jan;87(1):48-52.
97. Urman B, Yakin K, Ata B, Isiklar A, Balaban B. Effect of hyaluronan-enriched transfer medium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 embryo transfers: a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2008 Sep;90(3):604-12.