

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

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU SONRASI
PRONÜKLEER SKORLAMANIN EMBRİYO GELİŞİMİ VE
GEBELİK ORANLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Biyolog Elif YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2011

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

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU SONRASI
PRONÜKLEER SKORLAMANIN EMBRİYO GELİŞİMİ VE
GEBELİK ORANLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Biyolog Elif YILMAZ

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2011

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.



Bio. Elif YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. İNFERTİLİTE.....	5
4.2. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ.....	5
4.2.1. Aşılama (IUI)	5
4.2.2. Klasik İn Vitro Fertilizasyon (IVF)	6
4.2.3. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)	7
4.2.4. Fertilizasyon.....	9
4.3. EMBRİYO SEÇİM KRİTERLERİ.....	11
4.3.1. Pronükleer Değerlendirme	12
4.3.1.1. Pronükleusların (PN) Pozisyon ve Boyutu	12
4.3.1.2. Çekirdekçik Öncül Cisimciklerinin (NPB) Sayısı, Büyüklüğü ve Dağılımı ile Kutup Cisimciklerinin (PB) Yerleşimi	13
4.3.2. Bölünme Evresi Değerlendirmesi	15
4.3.2.1. Erken Bölünme	15
4.3.2.2. Embriyo Bölünme Hızı	16
4.3.2.3. Blastomer Büyüklüğü	16
4.3.2.4. Sitoplazmik Görünüm	16
4.3.2.5. Perivitellin Alan ve Zona Özellikleri	17
4.3.2.6. Fragmantasyon Derecesi	17
4.3.2.7. Blastomerlerin Nükleer Özellikleri	17
4.3.3. Blastosist Evresi Değerlendirmesi	18
4.3.4. Transfer Günü Seçimi	19
5. MATERYAL VE YÖNTEM	20
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER	20
5.2. ÇALIŞMA GRUBU	21

5.2.1. Hasta Seçimi	21
5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER	21
5.3.1. Hastaların Hazırlanması	21
5.3.2. Oosit Toplama İşlemi	22
5.3.3. Oositlerin Soyulması	23
5.3.4. Semen Hazırlanması	23
5.3.5. Mikroenjeksiyon	24
5.3.6. Embriyoların Takibi	25
5.3.7. Transfer İşlemi	26
5.3.8. Gebelik Tayini	26
5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER	26
6. BULGULAR	27
7. TARTIŞMA	35
8. SONUÇ	38
9. TEŞEKKÜR	39
10. KAYNAKLAR	40

SİMGE VE KISALTMALAR

AHA	: Assisted Hatching (Yardımla Yuvalama)
ATP	: Adenozin Trifosfat
COC	: Kümülüs-Korona Oosit Kompleksi
FSH	: Follicle-Stimulating Hormone
GnRH	: Gonadotropin-Releasing Hormone
HCG	: Human Chorionic Gonadotrophin
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Mikroenjeksiyon)
IUI	: İntrauterin İnseminasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
MI	: Metafaz I Evre Oosit
MII	: Metafaz II Evre Oosit
MESA	: Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu
mIU/mL	: Milli-International Units Per Milliliter
mil/ml	: Milyon/Mililitre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
NPB	: Nucleolar Precursor Body (Çekirdekçik Öncül Cisimciği)
OPU	: Oosit Pick Up (Oosit Toplama İşlemi)
PB	: Polar Body (Kutup Cisimciği)
PN	: Pronükleus
PVP	: Polivinilpirolidon
PZD	: Parsiyel Zona Disseksiyonu
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikada Devir Sayısı)
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SUZI	: Subzonal İnseminasyon
TESA	: Testicular Sperm Aspiration
TESE	: Testicular Sperm Extraction
ÜYTE	: Üremeye Yardımcı Tedaviler
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri

WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
 β -hCG : β - Human Chorionic Gonadotrophin
 μ l : Mikrolitre

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 16.06.2009 tarih ve 2009/ 06-01 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Arastırma Projesi No: HE/0432009

1. ÖZET

İnfertilite, düzenli cinsel ilişkiye girilmesine rağmen bir yıl sonunda gebe kalınmaması durumu olarak tanımlanır. Böyle durumlarda çocuk sahibi olmak isteyen çiftler için üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) teknikleri kullanılabilir. ÜYTE tekniklerinden biri olan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulamasından sonra, implantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyo(lar)nun seçilebilmesi için kullanılan birçok parametreden biri olan morfolojik değerlendirme, en önemli parametredir. Yapılan araştırmalar morfolojik değerlendirme kriterleri arasında embriyonun bölünme evresi değerlendirmesinin yanında, zigot aşamasında değerlendirilmesinin de, embriyonun ileri dönem gelişimi ile ilgili bilgi verebileceği, bu nedenle embriyo kalitesini belirlemede kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda embriyonun zigot evresinde görülen, pronükleusların (PN) içinde yer alan çekirdekçik öncül cisimciklerinin (NPB) sayısı, diziliş ve dağılımlarına göre skorlamasının fertilizasyon, embriyo gelişimi, embriyo kalitesi ve gebelik üzerine olan etkileri incelendi. Bu amaçla, hastaların tüm zigotları pronükleer skorlama kriterlerine göre 6 sınıfa ayrılıp (P0, P1, P2, P3, P4, P5), toplam 149 çift, transfer edilen embriyolarının pronükleer dağılım patternlerine göre üç gruba ayrıldı. I. grupta transfer edilen embriyoların hepsi P0'dan, II. grupta en az bir tanesi P0' dan gelişirken, III. grupta transfer edilen embriyoların hiçbiri P0'dan gelişmemişti. Ortalama yaş ve toplanan oosit sayıları ortalaması gruplar arasında benzerdi. Ortalama fertilizasyon oranı, embriyo gelişimi oranı, embriyo kalitesi oranları ve ortalama gebelik oranları açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Grup ayrımı yapılmadan hastaların tüm embriyoları pronükleer patternlerine göre değerlendirildiğinde; P0'dan gelişen embriyoların diğer pattern sınıflarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kaliteli olduğu, pattern sınıfları büyüdükçe bu oranın istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü, belirlenmiştir.

Bu verilere dayanarak, zigot evresinde yapılan pronükleer skorlamanın embriyo kalitesinin belirlenmesinde prediktif olabileceği, bu nedenle de transfer edilecek embriyo(lar)nun seçiminde kullanılan morfolojik değerlendirmeler arasına girebileceği sonucuna varılmıştır. Bu konuda geniş hasta grupları ile yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

2. SUMMARY

Infertility is defined as failure to concept despite a regular sexual relationship during a year. Such couples who are willing to have a child may be treated by one of the assisted reproduction techniques (ART). Morphological evaluation of the embryo is the most useful method among many parameters used in choosing the embryo with the highest implantation potential after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) which is one of the ART techniques. Studies show that, beside the cleavage stage morphological evaluation, zygote stage morphological evaluation of the embryo may also give important information about the further stage development and thus may be used in determining the embryo quality evaluation.

In our study, we investigated the effect of the embryo score generated by the number, lining and distribution of nucleolus precursor bodies (NPB) located in pronuclei (PN) which appear at the zygote stage of an embryo, on the fertilization rates, embryo development, embryo quality and pregnancy rates. For this purpose, all the zygotes of 149 couples were classified into 6 pronuclear pattern groups (P0, P1, P2, P3, P4, P5) and the couples were assigned to 3 groups according to their pronuclear gradings of their transferred embryos. In group I, all the transferred embryos were developed from P0 pattern; in group II, at least one of the transferred embryos were developed from P0 pattern; whereas none of the transferred embryos were developed from P0 pattern. Mean age and mean number of retrieved oocytes were similar between groups. Mean fertilization rates, embryo development, embryo quality rates and mean pregnancy rates were not statistically different. When all the embryos of patients were evaluated according to their pronuclear patterns ignoring the groups they were assigned, the embryo qualities of P0 pattern embryos were statistically significantly better than the other patterns and the rate decreased statistically significantly by the increase in pattern group.

According to the given data it may be suggested that zygote stage pronuclear scoring may be predictive in determining the embryo quality, and thus it may be counted as one of the morphological evaluation methods used to select the embryos to be transferred. However, wider studies should be conducted in order to better define the effectiveness of the method.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, korunmasız olarak cinsel ilişkiye girilmesine rağmen, bir yılı aşan süre sonunda çocuk sahibi olamama durumudur. Çocuk sahibi olmak için başvuran çiftlere bazı incelemeler yapılarak, infertilite nedeni belirlenmeye çalışılır. Yapılan incelemeler sonucunda infertilite nedeni doğrultusunda gerekirse yardımla üreme teknikleri (YÜT) kullanılır. İn vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) bu amaçla kullanılan yöntemlerden ikisidir. İnfertilite tedavisinde kullanılan bu iki yöntem de dışıdan alınan oositlerle, erkek bireyden alınan spermatozoonların in vitro olarak bir araya getirilmesi ile elde edilen embriyoların anne uterusuna verilmesi temeline dayanır (1). Ciddi erkek infertilitesi nedeniyle çocuk sahibi olamayan çiftler için sıkça kullanılan yöntem ise ICSI' dir. Bu yöntem bir spermatozoonun, bir oosit içine yerleştirilmesi esasına dayanır (2).

İnfertilite tedavisinde birden fazla oosit toplanması amaçlanmaktadır (3). Birden fazla oositin dölleniş embriyo oluşturması durumunda, implantasyon potansiyeli en fazla olan embriyo/embriyoların seçilip transfer edilmesi ile gebelik şansı artmaktadır. Embriyoların morfolojik özelliklerine bakılarak yapılan embriyo seçimi uygulaması kolay, ek maliyet getirmeyen bir yöntem olması nedeniyle birçok laboratuvar tarafından rutin olarak kullanılmaktadır (4). Morfolojik olarak kullanılan bu yöntemler ile embriyo gelişimi takip edilerek, implantasyon potansiyeli yüksek olabilecek embriyo(lar) ile transfer yapılabilir ve çoğul gebelik riski azaltılabilir (5, 6). Embriyonun morfolojik olarak değerlendirilmesinde kullanılan parametreler temelde 3 ana grupta toplanır. Bu gruplar: pronükleer değerlendirme, bölünme evresi değerlendirmesi, blastosist evresi değerlendirmesidir. Pronükleer değerlendirmede: pronükleusların (PN) pozisyonu ve boyutu, çekirdekçik öncül cisimciklerin (Nucleolar Precursor Body, NPB) sayısı şekli ve dağılımı, kutup cisimciklerinin (PB) yerleşimi, sitoplazmik halonun varlığı değerlendirilebilir. Bölünme evresi değerlendirilmesinde ise erken bölünme, bölünme hızı, blastomer büyüklüğü, fragmentasyon oranı parametelerine bakılabilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar pronükleer değerlendirmenin embriyo seçiminde prediktif olduğunu göstermektedir (7, 8, 9). Bu evrede gözlenen bazı morfolojik özelliklerin ileri embriyo gelişimi ve implantasyon potansiyeli ile ilgili olarak önemli bilgi sağladığı ileri sürülmektedir (7). Bu çalışmalarda PN oluşmu sırasında meydana gelen hatalar ya da

asenkrizasyonun, embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyeceği gösterilmektedir (9). Ayrıca PN morfolojisi ile ilgili bazı düzensizliklerin embriyonun kromozomal yapısı ve anöploidi oranları ile ilgili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (10). Literatürde birçok farklı pronükleer skorlama sistemi tanımlanmıştır (9, 11). Pronükleer skorlamada esas alınan parametrelerden biri de çekirdek öncüllerinin (NPB, nucleolar precursor body) sayısı, şekli ve dağılımıdır. Çekirdekçik nclleri pronükleusların gelişimi sırasında oluşur, çok sayıda, küçük ve dağınık halde bulunurlar. Pronükleer skorlama sistemleri arasında bazı farklar bulunmasına karşın yapılan tüm çalışmalar, her iki pronkleustaki NPB'lerin eşit sayıda ve aynı biçimde düzenlenmelerinin daha yüksek implantasyon potansiyeline sahip olmalarının bir göstergesi olduğu yönündedir (9, 11).

Çalışmamızın amacı Tesarik ve Greco'nun pronükleer skorlama sistemini kullanarak pronükleer evre skorlamasının fertilizasyon, embriyo kalitesi, gelişimi ve gebelik oranları ile olan ilişkisini belirlemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite kadın ya da erkek nedenli olabildiği gibi her ikisinden de kaynaklanabilmektedir. Ya da açıklanamayan infertilite denilen durumda olduğu gibi çiftlerin ikisinde de sorun olmamasına rağmen, gebelik gerçekleşmeyebilir. Yaş faktörü kadına ait olan infertilite nedenleri arasında gösterilebilecek en önemli parametrelerden biridir. Kadınlarda 37 yaşından sonra fertilitate belirgin bir şekilde azalma göstermektedir (1). Yaş ilerlemesi ile primordial foliküllerdeki atrezi hızının artması, oosit kalitesindeki düşüş, uterin reseptivitedeki azalma beraberinde gebelik oluşturma potansiyelini de azaltmaktadır. Hastanın genç olup over rezervi sorununun olması durumunda da infertiliteden bahsedilebilir. Anovulatuvar infertilite de kadın infertilitesinin yaygın nedenleri arasındadır. Bununla birlikte düzensiz menstürasyon ve nadiren de olsa normal siklularda da infertilite problemi görülebilir. Erkek infertilitesinin nedenleri arasında spermatozoon sayı ve motilite düşüklüğü, morfoloji bozuklukları gösterilebilir. Böyle durumlarda yardımcı üreme teknikleri (YÜT) hastalara yardımcı olmaktadır (1).

4.2. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

4.2.1. Aşılama (IUI)

Erkeklerde görülen spermatozoon motilite ve/ veya konsantrasyon ve/ veya morfoloji bozukluklarında, penil anatomik defektlerde, seksüel ya da ejakülatuar disfonksiyonlarda, retrograd ejakülasyonda, sperm aglütinasyonu ya da anti-sperm-antikorları (ASA) gibi nedenlerle infertilite tanısı konmuş çiftlere aşılama (IUI) işlemi uygulanır. Kadında görülen ovulasyon bozuklukları, servikal ya da tubal bir problem de IUI işleminin uygulanmasını gerektirir. Ayrıca kadında koitusa engel olabilecek anatomik ya da psikolojik kökenli bir sorun olduğunda, açıklanamayan infertilite, minimal

endometriosis, servikal anti sperm bozuklukları gibi durumlarda da IUI işlemi uygulanır (1, 2, 4).

IUI işleminin yapılması için dikkat edilmesi gereken en önemli husus sperm parametreleridir. Toplam motil spermatozoon sayısı, spermatozoon morfoloji değeri, bayan yaşı IUI başarısı için birlikte değerlendirilmesi gereken kriterlerdir. Total hareketli spermatozoon sayısının IUI başarısını arttırdığı gösterilmiştir (12, 13). Spermatozoon morfolojisinin IUI sonrası gebelik oranlarını etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (14, 15). Bunun yanında spermatozoon morfolojisi ile gebelik oranları arasında ilişki olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (16, 17).

4.2.2. Klasik İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

İn Vitro Fertilizasyon, uygun laboratuvar ortamında spermatozoon ve oositin kültür kabında bir araya getirilerek, spermatozoonların kendi yetenekleri ile oositi döllemesi temeline dayanan bir yöntemdir (18). Günümüzde yerini mikroenjeksiyon işlemine bırakmış olmasına rağmen, uygulaması basit ve mikroenjeksiyon yöntemine göre daha ucuz bir yöntem olması, oosite uygulanan mikromanüplasyonun daha az olması, spermatozoonun herhangi bir müdahaleye maruz kalmadan oosite penetre olması sağladığı avantajlar arasında sayılabilmektedir. Yeterli sayıda spermatozoon olması durumunda IVF yöntemi anovulasyon, tubal faktör ve açıklanamayan infertilite dışında da kullanılmaya başlanmıştır (3). Sperm parametrelerinin düşük olması, normal morfolojinin % 4'ün altına düşmesi klasik IVF'te fertilizasyon oranını düşürmektedir (19). Bu nedenle spermatozoon ve oosit ilişkisini kolaylaştıracak yöntemlere gidilmiştir. Bu yöntemlerden biri hyaluronidaz ile oositin etrafında bulunan kümülüs- korona hücrelerinin uzaklaştırılmasıdır (20). Klasik IVF'te erkek subfertilitesinin fertilizasyon oranını düşürmesi, yeterli sayıda kaliteli embriyo elde etme olanağını azaltması daha etkin mikromanüplasyon tekniklerinin geliştirilmesini sağlamıştır.

Bunlar:

1. Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD): Jacques Cohen ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde zona pellusidasına düz ve derin olacak şekilde bir delik açılan oosit, içinde özel olarak hazırlanmış spermatozoonların olduğu kültür tabağına bırakılır (21).

2. Subzonal İnseminasyon (SUZI): Hareketli birkaç spermatozoonun oositin perivitellin aralığına bırakılması temeline dayanır (4).

3. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI): ICSI, SUZI uygulamaları sırasında tek bir spermatozoonun oosit sitoplazmasına bırakılması ile bulunmuş ve IVF teknikleri arasında yerini almıştır (22, 23).

1992 den beri şiddetli erkek infertilitesinde kullanılan ICSI, 1994'ten beri ülkemizde de uygulanmaktadır. Mikromanüplasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle ICSI işleminde kullanılacak olan spermatozoon, ejakülatta spermatozoon görülmediği takdirde testis biyopsisi (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu, TESE) ile, testis içinden özel iğnelerle yapılan aspirasyon aracılığı ile (TESA) ya da epididimisten aspire edilen (Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu, MESA) spermatozoonlardan da elde edilebilir (24, 25).

Geliştirilen diğer bir manipülasyon yöntemi de yardımla yuvalama (AHA)'dır (26). AHA işlemi kimyasal, mekanik ya da lazer yöntemi kullanılarak zona pellüsidanın delinmesi ya da eritilmesidir. Bu işlem tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında, kadın yaşı ileri olduğunda ve zonası kalın olan hastalarda fayda göstermektedir (27).

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) uygulamaları ile hastanın gebe kalması amaçlanırken çoğul gebelikten de kaçınılmaya çalışılmaktadır. Ovaryan stimülasyon protokolleri ile hastadan çok sayıda oosit ve böylece fazla sayıda embriyo elde edilmesi sağlanır (28). Bunun sonucunda transfer edilecek olan embriyo seçimi önemli hale gelmektedir. Çünkü transfer edilen fazla sayıdaki embriyo istenmeyen çoğul gebeliklere neden olmaktadır (29). Bunu engellemek içinse, embriyonun gelişiminin değerlendirilip, gebeliği gerçekleştirecek en iyi embriyoyu seçmek gerekir (4).

4.2.3. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI tek bir spermatozoonun özel bir pipet yardımıyla, zona pellüsida ve oolemmayı geçerek, direkt olarak oosit sitoplazmasına bırakılması işlemidir. ICSI, erkekten kaynaklanan infertilite tedavisinde en çok tercih edilen mikromanipülasyon tekniğidir.

İnfertilite tanısı konmuş bir çiftin ejakülattaki spermatozoon konsantrasyonunun 2 milyon/ ml.' den az olması (30), spermatozoon motilitesinin %5'ten düşük olması ve Kruger'e göre normal morfolojinin (Kruger'in Kesin Kriterleri) % 4'ün altında olması durumunda ICSI işlemi yapılmaktadır (31). Eğer ejakülatta spermatozoon bulunmuyor ve

cerrahi yöntemlerle epididimal ya da testiküler olarak spermatozoon elde edilmesi gerekiyorsa da kullanılacak yöntem yine ICSI'dir (32,33,34). Daha önce klasik IVF yöntemi kullanılmış ve sonuç alınamamış vakalarda da ICSI kullanılmaktadır. Bununla birlikte oosit sayısının düşük olması, ileri kadın yaşı gibi durumlarda da ICSI uygulanır (4).

Birden fazla sayıda oosit elde edebilmek için kontrollü ovaryen hiperstimülasyonu ya da ovulasyon indüksiyonu denilen işlemlerle ovaryumlar çeşitli ilaçlar kullanılarak uyarılır. Hastanın yaşına, eğer varsa önceki tedavilerine, oosit rezervine, folikül stimulan hormon (FSH) düzeyine göre özel bir indüksiyon uygulanır. Ovaryumlarda bulunan foliküller yeterli büyüklüğe ulaştığında ve östrojen seviyesi istenilen düzeye geldiğinde hastaya insan koryonik gonadotropini (HCG) enjekte edilir. Bu uygulamadan 36 saat sonra vajinal yolla ultrasonografi eşliğinde oositler toplanır. Daha sonra soyma işlemi adı verilen bir işlemle etraflarındaki kümülüs ve granüloza hücrelerinden arındırılan oositlerin olgun (Metafaz II) olanları, aynı gün erkekten alınan semenin hazırlanmasıyla elde edilen spermatozoon hücreleriyle birleştirilerek ICSI işlemi yapılır (4).

Semen yıkama işlemindeki amaç en kaliteli spermatozoonu elde etmektir. "Density Gradient" veya "Swim Up" yöntemi semen yıkama işlemlerinden ikisidir. Swim up yönteminde semen örneği gazlı inkübatörde dengelenmiş olan kültür medyumuyla birlikte santrifüj işleminden geçirilir ve pellet üzerine konulan kültür medyumu ile birlikte 45° lik bir açıyla 37° C' lik gazlı inkübatörde 1 saat bekletilir. Bu süre sonunda iyi kalitede olan spermatozoonların yüzmesi sağlanmış olur. Density gradient yöntemi farklı yoğunluğa sahip iki solüsyon tabakasının üzerine bırakılan likefiye olmuş semenin belli bir hız ve sürede santrifüj edilmesi ile hareketli ve iyi kalitede spermatozoonların süzülerek dibe çökmesi esasına dayanır. Dibe çöken bu spermatozoonlar daha sonra toplanarak uygun bir yıkama solüsyonu ile iki kez santrifüj edilerek yıkanır. Böylece ICSI işleminde kullanmak üzere hareketi iyi ve kaliteli spermatozoonlar elde edilmiş olur (35). Hareketli olan spermatozoonlardan morfolojik olarak en iyi olanı seçilmeye çalışılarak enjeksiyon pipeti ile alınır, tutucu pipet ile sabitlenen oositin sitoplazmasına bırakılır.

Bu işlemden yaklaşık 16-18 saat sonra biri dişiye, diğeri erkeğe ait olan iki pronükleusun görülmesiyle belirlenen fertilizasyon kontrol edilir. Artık iki pronükleusu görülen oosit "zigot" olarak isimlendirilmektedir. Enjeksiyon 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 kırksekizinci saatte ikinci kez bölünüp 4 blastomerli hale gelir. Üçüncü gün 8 blastomer sayısına sahip olan embriyolar, 4. gün blastomerlerin sayılmadığı kompakt bir görünüm alır ve 5. günde de blastosist evresine ulaşır (36).

4.2.4. Fertilizasyon

Fertilizasyon spermatozoon ve oositin, nükleus ve sitoplazmik komponentlerinin katılımıyla yeni bir birey meydana getirdiği olaylar bütünüdür (37). Tuba uterinanın ampulla bölgesinde gerçekleşen fertilizasyon, spermatozoon ve oositin teması ile başlayıp, oosit aktivasyonu ile devam ederek 2 hücreli embriyo oluşmasına kadar devam eder (4). Bir oositin fertilize olması için 1.mayoz bölünmeyi tamamlayarak 1. kutup cisimciğini (Polar Body, PB) atması, spermatozoonun kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu tamamlaması gerekir. Fertilizasyon üç ana aşamada gerçekleşir.

1. Spermatozoonun oosite bağlanması
2. Gametlerin füzyonu ve oositin aktivasyonu
3. Spermatozoon nükleusunun dekonsensasyonu ve pronükleusların oluşumu (38).

Dişi genital yollarında kapasitasyonunu tamamlayan spermatozoonun, zona pellusidaya iç akrozomal membran ve zona pellusidanın ZP2 tabakasındaki proteinlerle bağlandığı gösterilmiştir (38, 39). Spermatozoonda bulunan akrozomal enzimler olan akrozin, esteraz, nöraminidaz enzimleri ile zona eritilerek oosite giriş sağlanır. Spermatozoon başı fagositoz benzeri bir mekanizmayla yatay olarak ooplazmaya girer (36). Perivitellin aralığa geçtikten sonra gerçekleşen gamet membranlarının birleşmesi ile ilgili olarak kesinliği kanıtlanmamış bazı modeller vardır. Gametlerin füzyonu genel olarak her iki hücrenin plazma membranlarının önce dış, sonra iç tabakalarının birleşmesiyle gerçekleşir. Bu noktaya fertilizasyon ya da birleşme konisi adı verilir. Bu yapı oosit sitoplazmasının, spermatozoon nükleusu, mitokondri ve aksonemal kompleksini çevreleyen bölgeye doğru hareket etmesiyle spermatozoon giriş noktasında bir şişlik meydana gelmesiyle oluşur (37, 40, 41).

Spermatozoon girişinden sonra oosit sitoplazmasında oosit aktivasyonu denen birtakım yapısal ve biyokimyasal değişiklikler gözlenir. Bunlar kortikal granüllerin salınması, membranda bulunan ATPaz'ın aktivasyonu, mayozun devam edip, 2. polar cisimciğin

atılmasıyla erkek ve dişi pronükleusların oluşması ile sonuçlanan olaylardır (4). Oosit içine giren spermatozoonun oosit aktivasyonunu etkileme biçimi ile ilgili belirtilen görüşlerden biri; spermatozoonun oosite eriyebilen bir aktivasyon faktörünün geçtiği ya da spermatozoonun 2. bir reseptör yardımıyla aktivasyonun gerçekleştirildiğidir (38). Moser (1939) tarafından oosit aktivasyonunda etkin olan kortikal granüllerin salınımı için kalsiyumun gerekli olduğu gösterilmiştir (42). Aktivasyon sırasında hücre içi kalsiyum depoları harekete geçerek kalsiyum konsantrasyonunda geçici olarak artışa neden olur (38). Kortikal granüllerin ana içeriği proteazlar, mukopolisakkaritler, serin-proteaz aktivitesine sahip plazminojen aktivatörü, asit fosfataz ve peroksidaz enzimidir (4). Kortikal granüllerin içeriklerini perivitellin alana boşaltmaları, plazmalemmanın kalınlaşarak sağlamlaşmasını ve polispermiye engel olunmasını sağlar (43). Spermatozoonun oosite girişi ile oosit plazma membranında gerçekleşen elektriksel depolarizasyon da, oositi polispermiye karşı koruyan en hızlı faktörlerdendir (44). Olgun fertilize olmamış oositte elektrik potansiyeli negatiftir. Oosit zarı polarizedir ve plazmalemmanın iç yüzü dış yüzüne göre negatiftir. Spermatozoon oosit plazmalemmasına değdikten hemen sonra, oositin elektrik yükü önce nötre, daha sonra ise pozitifte değişmekte ve polarize olan zar depolarize hale gelmektedir. Kortikal granül salınımı elektriksel depolarizasyona göre daha yavaş ama daha kalıcı bir yöntemdir.

Mayozun metafaz evresinde bekleyen oosit, spermatozoon girişinden sonra mayoza devam eder ve ikinci polar cisimcik atılır. Zigottaki kromozomlar dağıldıkları sınırlar boyunca vesiküller oluşturacak şekilde kümelenmeye başlarlar. Böylece kromozom içeren vesiküller oluşmaya başlar ve kromozomlar yapısal olarak nükleer kılıfa benzeyen iki paralel membran ile çevrilirler. Daha sonra bu vesiküller birleşir ve 2. Polar cisimciğe yakın bir yerde dişi pronükleus oluşur (38, 45).

Erkek pronükleusunun oluşması ise spermatozoon nükleer kılıfının bozulması, yoğunlaşmış kromatinin dağılması, nükleer kılıfın tekrar oluşması ile gerçekleşir. Erkek pronükleus oosit sitoplazmasının ortasında oluşmaya başlar. Pronükleus membranının şekillenmesinde endoplazmik retikulum görevlidir. Birinci kutup cisimciğine yakın yerde gelişen dişi pronükleus erkek pronükleusa yaklaşıp kadar ilerler ve sonuçta pronükleuslar yanyana gelirler. Bu işlemde görev alan sentrioller spermatozoonun köken olarak mikrotübül olarak işlev yapmaktadır (46, 47). Bu hareket inseminasyondan sonraki 20. saatte tamamlanır ve zigotun ortasında yanyana yerleşirler.

Fertilizasyon bittiğinde 2. Mayoz tamamlanmış, zigotta normal diploid kromozom sayısı oluşmuş, crossing over gerçekleşmiş olur (46, 48). İnsanda 24 saat süren pronükleer evrede hücre G1, S, G2 evrelerinden geçer. Pronükleuslar merkeze yerleştikten sonra, zarları erir ve ebeveynlerden gelen kromozomlar metafaz plağı üzerinde karşılaşır asterlere doğru ilerler. Bu evrede zigot çekirdeği gözlenmez. Anne ve baba genomu ilk kez iki hücreli evrede tek bir çekirdek olarak gözlenir (37).

Ökaryot bir hücre ışık mikroskopunda incelendiği zaman çekirdek içinde en belirgin olarak gözlenen yapı çekirdekçiktir. Çekirdekçik ribozomal ribonükleik asit (rRNA)'lerin işlendiği ve ribozom yapısına katıldığı yerdir. Diğer organellerden farklı olarak çekirdekçığın etrafında zar yoktur. Bunun yerine rRNA genlerini, öncül rRNA' ları, olgun rRNA'ları, rRNA işleyen enzimleri, küçük nükleolar RNA (snoRNP)'leri, ribozomal protein altbirimlerini ve kısmen yapılanmış ribozomlar gibi makromolekülleri de içeren büyük topaklar halinde bulunur. Çekirdekçığın oluşumunda rRNA genlerinin önemli bir rolü vardır. İnsan diploid hücresinde 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomların üzerinde büyük ribozom RNA'larını kodlayan genler bulunur. Çekirdekçik ribozom biyogenezinde görevli olmasının yanında, diğer RNA (ribo nükleik asit)'ların yapıldığı ve RNA protein karışımlarının bir araya geldiği yerdir. Telomeraz ve sinyal parçacıklarında çekirdekçikte toplandığına inanılmaktadır. Protein sentezi için aminoasitleri taşıyan tRNA' lar (transfer RNA) da burada işlenir. Bundan dolayı pronükleuslar çeşitli kodlanmayan RNA'ların işlendiği, proteinlerle bir araya gelerek ribonükleoprotein karışımlarının oluşturduğu bir fabrika olarak düşünülebilir (49).

4.3. EMBRİYO SEÇİM KRİTERLERİ

Yardımla üreme teknikleri uygulamalarında ovaryum stimülasyonu için kullanılan gonadotropinler ile çok sayıda oosit ve embriyo elde edilmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinde ki amaç hastanın gebe kalmasını sağlamak olduğundan, embriyo kalitesi en yüksek olan embriyo ya da embriyolar transfer edilmelidir. Bu embriyoların seçimi için bir çok farklı yöntem kullanılmaktadır.

Bu yöntemler şunlardır:

a. Embriyonun morfolojik olarak değerlendirilmesi: pronükleer değerlendirme, bölünme evresi değerlendirmesi, blastosist evresi değerlendirmesi,

b. Kùltür medyumundaki metabolik aktivitenin belirlenmesi: prùvat tüketimi, glukoz tüketimi aminoasit kullanımının ölçülmesi,

c. Preimplantasyon genetik araştırma: polar cisimcik ya da blastomer biyopsisidir.

Bunlardaki amaç embriyonun canlılığının belirlenmesidir. Canlı olan embriyo terimi transfer sonrası canlı bir birey oluşturma yeteneğine sahip embriyolar için kullanılır (3).

4.3.1. Pronükleer Değerlendirme

Pronükleer değerlendirme embriyonun zigot dönemi değerlendirmesidir. Bu evrede değerlendirilen parametreler embriyo seçim kriterleri için önemlidir çünkü bu evrede gözlenen bazı morfolojik özelliklerin, ileri embriyo gelişimi ve embriyonun implantasyon potansiyeli ile ilgili önemli bilgiler sağladığı düşünülmektedir (7, 8, 9).

Pronükleer değerlendirme yapılırken pronükleusların (PN) pozisyon ve boyutu, nükleolar prekürsör cisimlerin (NPB) sayısı, şekli ve dağılımı, PN'lerin polar cisimcikler ile yaptıkları açı ve sitoplazmik halo varlığı gibi parametreler değerlendirilmektedir.

4.3.1.1. Pronükleusların (PN) Pozisyonu ve Boyutu

Mikroenjeksiyon işleminden 16-18 saat sonra, dişi pronükleus ikinci polar cisimciğin yakınlarında oluşurken, erkek pronükleus oosit ortasında oluşmaya başlar. Dişi pronükleus erkek pronükleusa iyice yaklaşır. Ooplazmada gözlenen bu 2 pronükleus ile fertilizasyon işleminin gerçekleştiği anlaşılır.

Yapılan çalışmalar, zigotların normal olarak değerlendirilebilmeleri için her iki PN'in sitoplazmada merkezi pozisyonda, birbirine yakın ve eşit büyüklükte olması gerektiğini göstermiştir (9). Sadowy ve arkadaşları, pronükleer dismorfizm üzerine yaptıkları çalışmada, eşit olmayan pronükleus gözlenen zigotların çoğunda gelişim duraksaması ve artmış mozaisizm insidansı belirlediklerini göstermişlerdir (50). Bazı çalışmalar, PN oluşumu sırasında meydana gelen hatalar ya da oluşum sırasındaki asenkronizasyonun, embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir (7, 8, 9). Bununla birlikte PN morfolojisinde gözlenen bazı bozuklukların, embriyonun kromozomal yapısı ve anöploidi oranları ile ilgili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (10, 50, 51, 52).

4.3.1.2. Çekirdekçik Öncül Cisimciklerinin (NPB) Sayısı, Büyüklüğü ve Dağılımı ile Kutup Cisimciklerinin (PB) Yerleşimi

PN gelişimi sırasında oluşan nükleolar prekürsör cisimcikler (NPB), PN'ler içerisinde çok sayıda, küçük ve dağınık olarak bulunan yapılardır. Bu NPB'ler daha sonra birbirleriyle kaynaşıp, büyüyüp pronükleusların interfazında yanyana dizilirler (53). Pronükleusların dizilimi ile ilgili olarak kullanılan pronükleer skolama sistemlerinin arasında bazı farklılıklar bulunmasına karşılık yapılan çalışmalar göstermiştir ki PN'deki NPB'lerin aynı sayıda ve aynı hizada olması implantasyon oranını arttırmaktadır (11, 54, 55, 56).

Tesarik ve Greco, her PN'de görülen NPB'lerin sayısının en az üç olması, PN'ler arasındaki NPB'lerin sayı farkının üçü geçmemesi ve her iki PN'deki NPB'lerin pronükleuslarda polarize ya da non-polarize olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu kriterlere uymayan embriyoların ilerde kötü morfolojiye sahip embriyolar oluşturabileceğini göstermişlerdir (9). Tesarik ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada da transfer edilecek olan embriyo seçiminde sadece pronükleer evrede normal olarak değerlendirilen embriyolar transfer edildiğinde, anormal olarak değerlendirilen gruba göre anlamlı derecede yüksek gebelik ve implantasyon oranları elde edilmiştir (55). Literatürde Tesarik ve arkadaşlarının yaptıkları bu yayını destekleyen başka çalışmalarda bulunmaktadır. Scott ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 3. gün embriyolarını PN skorumla sistemini ile birlikte değerlendirerek transfer işlemi yapmışlar ve gebelik oranları %19'dan %31'e yükselmiştir (11). Balaban ve arkadaşları da yaptıkları başka bir çalışmada da bu görüşü desteklemişler pattern 0 'dan gelişen embriyoların implantasyon yeteneklerinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (57). Wittmer ve arkadaşları da normal pronükleer morfolojiye sahip oositlerden gelişen embriyoların implantasyon potansiyellerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (56).

Diğer bir değerlendirme kriteri de pronükleusların polar cisimciklerle yaptıkları açıdır. Oositlerde bulunan çeşitli proteinlerin dağılımındaki anomalilerin embriyo gelişimi ve fetal gelişimi etkilediği düşünülmektedir (37,58). Bundan hareketle Garello ve arkadaşları da pronükleer yerleşim, polar cisimcik yerleşimi ve embriyo kalitesi arasında ki ilişkiyle ilgili olarak yaptıkları çalışma sonucunda; pronükleusları eksenlerinden kesen bir

çizgi çizildiğinde, bu çizginin 2. polar cisimcik ile yaptığı açı olan β açısı'nın büyümesiyle, embriyo kalitesinin azaldığını göstermişlerdir (59).

Çalışmamızda Tesarik ve Greco'nun skorlama yöntemini kullanıldı (9). Bu sisteme göre;

Pattern 0 (P0): Pronükleusların her ikisindeki NPB sayısı farkı 3'ten fazla değildir. NPB sayısı 7'den az olunca NPB'ler polarize, 7'den fazlaysa NPB'ler dağınık şekilde bulunur. Pronükleuslardaki NPB sayısı 3'ten az değildir.

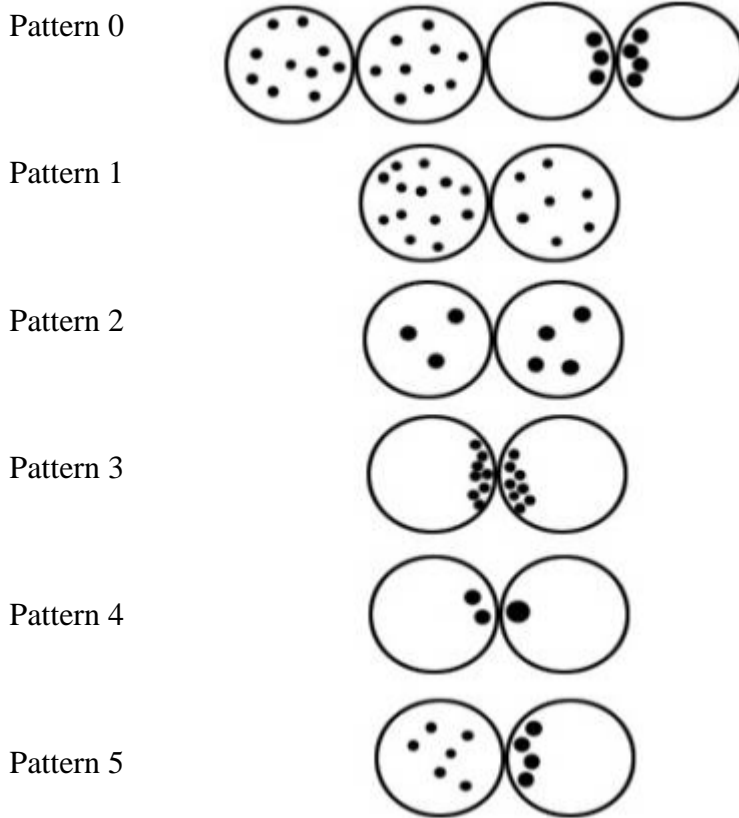
Pattern 1 (P1): Her iki pronükleustaki NPB sayıları arasında fazla (>3) fark vardır.

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 durumda NPB vardır.

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

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



Şekil 1: Tesarik ve Greco'nun pronükleer evre skorlama sistemi

Literatürde bulunan diğer bir skorlama sistemi ise, Scott ve arkadaşlarının yaptığı skorlama sistemidir (11). Buna göre;

Z1 zigotlarda bulunan NPB'lerin sayısı eşitir 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 nükleusta pronükleer bağlantı bölgesinde yerleşim gösterirken, diğerinde nükleusa dağılmış olarak bulunur. Z4 zigotlarda pronükleuslar ayrı bir şekilde yerleşim gösterirler ya da biri büyük, diğeri küçük bir boyuttadır.

Zigot evresinde değerlendirilecek diğer bir yapı da sitoplazmik halo dur. Oositte bulunan mitokondri ve diğer organellerin korteksten perinükleer alana doğru kayması ile oositoplazmanın sentral bölgesinde oluşan yoğun bölge görünümüne sitoplazmik halo denir. Oositin periferik bölgesi ise merkezi alana göre daha az yoğun bir bölge şeklinde görülür (60). Yapılan çalışmalar, sitoplazmik halo varlığının embriyo gelişim ve implantasyon potansiyelini artırdığını göstermiştir (8, 61). Mitokondrilerin perinükleer bölgede toplanıyor olması, o zigotun kalsiyum ya da ATP kullanımıyla ilgili olabilmektedir (62,63).

4.3.2. Bölünme Evresi Değerlendirmesi

Bölünme evresinin değerlendirilmesi implantasyon potansiyeli daha yüksek olan embriyoları seçebilmek için birçok laboratuvar tarafından kullanılan bir yöntemdir. Erken bölünmenin varlığı, bölünme hızı, blastomer boyutu, fragmentasyon oranı, blastomerlerin nükleer durumu, sitoplazmik görüntü, perivitellin alan ve zona pellusida özellikleri bölünme evresi değerlendirilmesi esnasında incelenen parametrelerdir (1, 4, 37).

4.3.2.1. Erken Bölünme

Oosit, fertilizasyondan yaklaşık 20 saat sonra ilk mitotik bölünmesini gerçekleştirerek 2 hücreli bir embriyo haline gelmektedir. Embriyoların 5'te biri 25. saatte 2 hücreli hale gelir. Erken bölünen embriyo (early cleaved embryo) olarak adlandırılan bu iki hücreli embriyo, 2 eliptik hücre ve blastomerlerin bölünme eksenlerinden geçen 2.

kutup cisimciği ile karakterizedir (64, 65). Erken bölünen embriyoların daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (65). Jin Fu ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada erken bölünen embriyoların bölünmeyenlere göre daha yüksek kalitede embriyo oluşturduklarını göstermiştir (66).

4.3.2.2. Embriyo Bölünme Hızı

Bölünme hızı embriyo canlılığını gösteren önemli bir unsurdur. Van Royen'e göre normal bir embriyo 2. günde (42-44. saat) 4-5 blastomer ve 3. günde (66-68. saat) en az 7 blastomere sahip olmalıdır (67). Shapiro'ya göre embriyoların normalden daha hızlı bir şekilde bölünmüş olması da, hücre sikluslarının doğru çalışmamasından ya da hücrenin nükleusu olmayan fragmanlar içermesinden kaynaklanabilir. Bu durum embriyolarda blastosist gelişimi ve implantasyon oranlarını düşürmektedir (68).

4.3.2.3. Blastomer Büyüklüğü

Embriyoda bulunan mRNA, mitokondri ve farklı hücre organellerinin iki kardeş hücreye eşit olarak dağılmaması farklı büyüklükte blastomerler oluşmasına neden olmaktadır (58). Bu nedenle embriyonun senkronize bir şekilde gelişim göstermesi embriyo kalitesi ile ilgili bilgi vermektedir. Eşit bölünmeyen embriyo transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir (69).

4.3.2.4. Sitoplazmik Görünüm

Embriyo blastomerlerinin açık renkli, şeffaf ya da hafif granüllü olması normal olarak değerlendirilir (70). Yapılan bir çalışmada sitoplazma görüntüsünün implantasyon ve gebelik oranlarını etkilemediği görülmüştür (71).

4.3.2.5. Perivitellin Alan ve Zona Pellusida Özellikleri

Embriyoların değerlendirilmesi yapılırken dikkat edilmesi gereken diğer bir hususta perivitellin alan ve zona özellikleridir. Perivitellin alanın geniş ya da dar oluşu, zona pellusida yapısı ve kalınlığı da incelenmelidir (72). Zona pellusidanın normal olan 13-15 mikrometre olan kalınlığından daha kalın olması durumunda mekanik, kimyasal ya da lazer yoluyla “Assisted Hatching (AHA) ” yapılarak zonaya delik açılabilir. Assisted Hatching yöntemi zonası kalın olan hastalara yapılmakla birlikte, bu grubun dışında kalan hastalarda çok etkili olmadığı görülmüştür (27,73).

4.3.2.6. Fragmantasyon Derecesi

Embriyonun fragmantasyon derecesinin değerlendirilmesi de embriyo seçim kriterleri arasında yer almaktadır (74). Embriyonun fragmente bir yapı göstermesi hasta ya da embriyo kaynaklı olabilmekte, embriyo gelişimi üzerindeki etkisi ise tam olarak bilinmemektedir (53). Fragmantasyon derecesi nükleusu olmayan fragmantların sayısı ve miktarının embriyo hacmine oranı ile belirlenir. Ziebe ve arkadaşları az sayıda fragmantasyon içeren 4 hücreli bir embriyonun, 2 hücreli fragmantasyon içermeyen bir embriyoya tercih edilmesi gerektiğini göstermişlerdir (69). Fragmantasyonun apopitozisten (programlı hücre ölümü) kaynaklandığı düşünülmektedir. Fragmantasyonun büyük olmasının embriyoya zararlı olduğu, belli bir bölgede bulunan ya da küçük ve dağılmış olan fragmanların ise implantasyonu etkilemediği gösterilmiştir (75).

4.3.2.7. Blastomerlerin Nükleer Özellikleri

Blastomerlerde görülen multinükleasyonun değerlendirilmesi embriyo seçiminde kullanılan diğer parametredir (76, 77). Blastomerlerde multinükleasyondan bahsedebilmek için, içinde birden daha fazla sayıda nükleusun görülmesi gerekmektedir. Bu nükleuslar fragmente durumda da olabilir. Nükleusların interfaz aşamasında görülüyor olması ve 2. günde embriyoların blastomerlerinin büyük ve az sayıda olması bu kontrolün yapılmasını kolaylaştırmaktadır (77, 78). Embriyonun blastomerlerindeki multinükleasyon, nükleusun kısmi fragmantasyonundan, kromozomların mitotik bölünmesini gerçekleştirmesi sırasında

hatalı bir mekanizma oluşmasından, sitokinez gerçekleşmeden karyokinezin gerçekleşmesi gibi durumlardan kaynaklanabilir. Jackson ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada multinükleasyon gösteren embriyoların gelişim potansiyellerinin ve klinik gebelik oranlarının daha düşük olduğunu göstermişlerdir (76). Blastomerlerinde multinükleasyon görülen embriyoların kromozomal anormallikler gösterebildiği dolayısıyla transfer edilmemesi, buna rağmen yapılan transferlerde ise embriyonun normal gelişim gösterebildiği bildirilmiştir (79). Multinükleasyon görülen embriyolarda, fragmantasyonun arttığı ve gebelik oranının azaldığı gösterilmiştir (78).

4.3.3. Blastosist Evresi Değerlendirmesi

Embriyolar gelişimlerinin 3. gününde 8 blastomerli evreden itibaren, kompaktlaşma gösterirler. Bazen 4 ya da 8 hücreli haldeyken de kompaktlaşma görülebilir. Erken kompaktlaşmanın ileri embriyo gelişimini nasıl etkilediği ile ilgili az sayıda veri vardır. Embriyoların 4.günde blastomer sayıları 16-20 hücre arasındadır. Bu aşamada hücreler arasında ki bağlantılar artar ve kompaktlaşan embriyo morula adını alır. Morulanın uterusu ulaşması ile uterus boşluğundaki sıvı hücreler arasına geçmeye başlar. Hücreler arası sıvıların birikmesiyle blastosöl denilen tek bir boşluk oluşur ve embriyo bu dönemde blastosist adını alır. Kültür sistemlerinin gelişmesi ile birlikte in vitro olarak geliştirilen embriyolar 5. güne kadar takip edilebilmektedir.

Blastosist değerlendirilmesi yapılırken embriyonun genişleme derecesi, trofoektoderm tabakasının yoğunluğu ve iç hücre kitlesinin yoğunluğu esas alınır. İyi kaliteli bir blastosistin, inseminasyondan yaklaşık 112-114 saat sonra belirli ve geniş bir blastosöle (embriyo hacminin en az yarısı kadar), kavite içerisine doğru uzanan belirli bir iç hücre kitlesine ve birbirine bağlı yassı bir epitel tabakası oluşturacak şekilde düzgün yerleşmiş trofoektoderm hücrelerine sahip olması gerekmektedir (80). Gardner ve arkadaşları blastosist skorlaması yapılarak seçilen blastosistin transfer edilmesiyle gebelik oranının % 60'ın üzerine çıktığını göstermiştir (81). Blastosist aşamasına gelmiş düşük kalitede embriyoların transfer edilmesinin, aynı kalitede olan 3. gün embriyoları ile kıyaslandığında daha yüksek implantasyon oranı gösterdiği bildirilmiştir (82).

4.3.4. Transfer Günü Seçimi

IVF ya da ICSI işlemi sonrası gelişen embriyoların transferi hastanın yaşı, gelişen embriyoların sayısı ve kalitesine bağlı olarak 2., 3. ve 5. günde yapılabilmektedir. Bazı laboratuvarlarda PN evresi transferi yapılabildiği gibi 6. günde de transfer işlemi yapılabilmektedir.

Transfer günü ile ilgili yapılan çalışmaların bazılarında, 3. gün transferlerinde 2. gün transferlerine göre daha yüksek gebelik oranları görülmüşken (83), bazılarında 2. gün ve 3. gün transferleri arasında gebelik ve implantasyon oranları açısından bir fark belirlenmemiştir (84, 85).

Racowsky ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise 3.günde oluşan 8 hücreli embriyoların sayısı ile 3. ya da 5. gün transferine karar verilebileceği gösterilmiştir. Buna göre, 3. günde hiç 8 hücreli embriyosu bulunmayan bir hastanın transferi 3. günde yapılmalıdır. 3. günde 1 ya da 2 adet 8 hücreli embriyosu bulunuyorsa 5. gün transferinin hasta için daha yararlı olabileceğini söylemek kesin değilken, 3 ya da daha fazla 8 hücreli embriyosu varsa 5. gün transfer yapılması tercih edilmelidir (86).

Blastosist aşamasında yapılan transferlerin implantasyon potansiyellerinin, 3. günde yapılanlara göre 2 kat daha fazla olduğu, 5. günde yapılan transferlerin 3. günde yapılanlara göre daha az sayıda embriyo transferine olanak sağladığı gösterilmiştir. Bununda transfer edilen embriyo sayısını azaltarak, çoğul gebelik riskini azaltacağı belirtilmiştir (87).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
Pure Sperm	Nidacon	PS100250
Pure Sperm Wash	Nidacon	PSW-100
G-IVF PLUS	Vitrolife	10136
Hyase 10X	Vitrolife	90017
ICSI 100	Vitrolife	90111
Quinn's Advantage Medium with HEPES	Sage	ART-1023
Quinn's Advantage Cleavage Medium	Sage	ART-1026
Quinn's Advantage Fertilization (HTF) Medium	Sage	ART-1020
Steril Oil For Tissue Culture	Sage	4008P
Serum Protein Substitute (SPS)	Sage	ART-3010-12
Human Serum Albümin (HSA)	Sage	ART-3001-5

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

5.2.1. Hasta Seçimi

Çalışmamıza Haziran 2009- Eylül 2010 tarihleri arasında Ferticenter Tüp Bebek Merkezi'ne başvurup infertilite tedavisi için ICSI işlemi uygulanan 149 çift dahil edildi. Çalışmanın devam ettiği 06.03.2010 tarihinde Sağlık Bakanlığı tarafından “Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Hakkındaki Yönetmelik” yürürlüğe girdi. Bu yönetmeliğe göre merkezlerde ÜYTE uygulamasında birden fazla embriyo transfer edilmemesi esastı. Ancak, 35 yaşa kadar birinci ve ikinci uygulamada tek embriyo, üçüncü ve sonraki uygulamalarda iki embriyo, 35 yaş ve üzerinde tüm uygulamalarda en fazla iki embriyo transfer edilebilirdi (Resmi Gazete, 06.03.2010, sayı: 27513).

Bu tarih esas alınarak hastalarımız yönetmelik öncesi (N: 101) ve sonrası (N: 48) olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Her grup, transfer edilen embriyoların pronükleer skora dağılımlarına göre 3 alt gruba ayrıldı. 1. grup, transfer edilen embriyolarının tümü zigot aşamasında Pattern 0 (P0)'dan gelişen (yasa öncesi ve sonrası N: 25, N: 24) olgulardan, 2. grup, transfer edilen embriyolarından en az biri P0'dan gelişen (yasa öncesi ve sonrası N: 51, N:5) ve 3.grup, transfer edilen embriyolarının hiçbiri P0'dan gelişmeyen (yasa öncesi ve sonrası N: 25, N.19) olgulardan oluşturuldu.

5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER

5.3.1. Hastaların Hazırlanması

Ovaryum stimülasyonu, gonadotropin salgılatıcı hormon GnRH analogları agonist (Lucrin; Abbott, Fransa) veya antagonistleri (Cetrotide; Serono, Aubonne, İsviçre, Orgalutran; Organon Oss Hollanda) ve insan menopozal gonadotropinleri ya da folikül stimulan hormonların (FSH) (Gonal-F; Serono, Aubonne, İsviçre, Puregon; Organon Oss Hollanda)' ı içeren protokollerin uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Ovaryumların tedaviye vermiş olduğu yanıt, ultrason takipleri ve serum östradiol seviyelerinin ölçülmesiyle belirlendi. Foliküller en az 18 mm çapına ulaştıklarında, 5000 ya da 10000 IU insan

koryonik gonadotropini (HCG) (Profasi; Serono, Pregnyl; Organon) enjeksiyonu uygulandı. Erkek partnere ise semen analizi uygulandı. 3 ile 5 günlük bir cinsel perhizin ardından mastürbasyon yolu ile steril Falcon 4013 (BD, Fransa) kabına örnek verildi. 10-15 dakika likefiye olması için 37°C'lik inkübatörde bekletilen örnek, steril Falcon 2095 (BD, Fransa) tüpüne boşaltılarak hacmi belirlendi. Likefiye olmuş semen örneğinden 10 µl makler sayma kamarasına koyulup (Makler chamber, Sefi Medikal İnstr. İsrail), faz kontrast mikroskopunda (Olympus CX 31, Japonya) 20X objektif altında tüm karelerdeki (100 adet) spermatozoonlar sayıldı. Sonuç 10'a bölünerek mil/ml olarak konsantrasyon belirlendi. Spermatozoonlar incelenerek WHO Kriterleri' ne göre ileri ve hızlı spermatozoonlar "A motil", ileri ve yavaş spermatozoonlar "B motil", yerinde hareketli spermatozoonlar "C motil" ve hareketsiz spermatozoonlar "D motil" olarak değerlendirildi. A, B ve C motiliteye sahip spermatozoon oranları toplanarak toplam motilite oranı belirlendi.

5.3.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU)

HCG enjeksiyonundan sonraki 36. saatte oositler transvajinal olarak ultrasonografi eşliğinde, özel bir iğne eşliğinde ve yıkama medyumunu kullanılarak toplandı. 13 ml'lik steril tüplere (Falcon 2001, BD Fransa) toplanmış olan folikül sıvısı embriyoloji laboratuvarında stereo mikroskop altında, steril tabaklara (Nunc 150270) boşaltılarak oosit arandı. Bulunan oositler 37°C'de ısınmış %5 Human Albümin (HSA) (Sage, Amerika) içeren Hepes (Sage, Amerika) medyumunda yıkandı. Sonra önceki gün hazırlanmış üzerleri oil (Sage, Amerika) ile kapatılmış, %5 HSA içeren Fertilization (Sage, Amerika) medyumunun bulunduğu dört kuyucuklu steril tabağına (Nunc fourwell 144444) aktarıldı. Toplanan oositler 3 saat 37°C'lik, %6 CO₂ ve %95 nem ortamı sağlayan inkübatörde (Labotect C 200, Almanya) bekletildi (88).

5.3.3. Oositlerin Soyulması

OPU işleminden sonra oositlere olgunluklarının değerlendirilip, ICSI işlemi sırasında polar body'nin düzlemini ayarlayabilmek için soyma işlemi uygulandı. İşlem için hyalüronidaz enzimi (Hyase 10X, Vitrolife, İsveç) kullanıldı.

Önceden ısıtılan %5 HSA içeren 950 µl Hepes (Sage, Amerika) medyumuna Hyase-10X eklendi. Oositler hyase içeren medyum içinde, pipet yardımıyla etrafındaki kümülüs hücrelerinden ayrıldı. Enzimatik ve mekanik olarak uygulanan bu soyma işlemi esnasında oositler tüm hücreler temizleninceye kadar sırasıyla 170 µm ve 140 µm çaplı denuding pipetlerden (Cook K-FPIP 1170, K-FPIP-1140, İrlanda) geçirildi. Soyulan oositler bir gece önceden hazırlanmış %10 SPS içeren Cleavage medyumuna (Sage, Amerika) ile hazırlanan kültür tabağına konularak, inverted mikroskopta 40X objektifte olgun olup olmadıklarına göre değerlendirildi. Kutup cisimciği olan olgun oositler Metafaz II (MII), kutup cisimciğini atmamış tek hücre görünümünde olan olgunlaşmamış oositler ise Metafaz I (MI) olarak değerlendirildi. Metafaz I oositler ilk 4 saat içinde kutup cisimciğini attıklarında ICSI işlemine dahil edildi. Kutup cisimciği olmayan ve germinal vesikülü görülenler olgun olmadıkları için ICSI işleminde kullanılmadı (88).

5.3.4. Semen Hazırlanması

Üç-beş günlük cinsel perhiz süresinin ardından mastürbasyon yoluyla steril semen toplama kaplarına (Falcon 4013, BD Fransa) semen örneği alındı. Örnek, 37°C'lik inkübatörde likefiye olana kadar bekletildi. Sonra steril bir tüpe (Falcon 2095, BD Fransa) koyulan örneğin görünüş, likefaksiyon ve hacmi not edildi. Semen örneğinden makler sayma kamarasına 10 µl koyularak, faz kontrast mikroskopunda (Olympus CX 31, Japonya), 20X objektif altında tüm kareler sayılarak konsantrasyon ve motilite belirlendi. A motilite ileri ve hızlı hareketli spermatozoon grubunu, B motilite ileri ama yavaş hareketli spermatozoon grubunu, C motilite yerinde hareketli spermatozoon grubunu ve D motilite de hareketsiz spermatozoon grubu için kullanıldı. En az 100 adet spermatozoon değerlendirilerek motilite değeri %A, %B, %C ve %D olarak belirlendi. İlk analizi yapıldıktan sonra örnek density gradient yöntemi kullanılarak ICSI işlemi için hazırlandı.

Sperm yıkama işlemi, PureSperm (Nidacon, İsveç) ve PureWash (Nidacon, İsveç) solüsyonları ile önceden hazırlanmış ve oda ısısına getirilmiş % 90'lık ve % 45'lik iki farklı yıkama solüsyonu ile yapıldı. Steril bir tüpe (Falcon 2095, BD Fransa) önce 1ml % 90'lık, sonra üzerine 1ml'lik % 45 solüsyon yavaşça konularak birbirine karışmayan iki tabaka oluşturuldu. Üzerine 1 ml semen örneği yavaş bir şekilde konuldu ve hazırlanan tüp 1300 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi (Heraeus Labofuge 400, Almanya). Süre sonunda spermatozoonları içeren 400 µl'lik pellet, steril pipet yardımıyla, başka bir tüpe (Falcon 2095, BD, Fransa) aktarıldı. Spermatozoon süspansiyonunun üzerine 2 ml G-IVF Plus (Vitrolife, İsveç) medyumunu eklenerek 2000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant steril bir pipet yardımıyla alınarak spermatozoon süspansiyonuna tekrar 2 ml G-IVF Plus solüsyonu eklendi ve tekrar 2000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibinde 400µl pellet kalacak şekilde süpernatant alınıp, kalan süspansiyon çalkalanarak karıştırıldı. Yıkama sonrası motilite ve konsantrasyon değerleri belirlendi. G-IVF Plus eklenerek tüm hastalarda yıkama sonrası spermatozoon konsantrasyonlarının benzer olması sağlandı.

5.3.5. Mikroenjeksiyon

Oositler soyulup olgunluklarının değerlendirilmesinin ardından, olgun olanlara Van Steirteghem ve arkadaşlarının belirttiği şekilde mikroenjeksiyon işlemi uygulandı (88). İşlem için %5 HSA eklentili Hepes (Sage, Amerika) medyumunu kullanılarak enjeksiyon tabağına (Falcon 1006, BD Fransa) 5µl'lik merkezi bir damla ve etrafında 8 damla olacak şekilde damlalar yapıldı. Üzeri oil ile kapatılan tabak ısıdıktan sonra, ortadaki damla pipet ile alındı ve yerine visköz yapısıyla spermatozoonları yavaşlatan polivinilpirolidon (PVP) (ICSI-100,Vitrolife, İsveç)'den 5µl koyuldu. PVP içine hazırlanmış spermatozoon solüsyonundan 1-2 µl konuldu. Çevrede bulunan damlalara ise oositler yerleştirildi.

Mikroenjeksiyon işlemi ısıtıcı tablası bulunan, Hoffman modülasyonu ve Narishige mikroenjeksiyon ünitesi ataşmanlı inverted mikroskopta (Olympus, IX71, Japonya) yapıldı. Humagen enjeksiyon (Mic-35-30-B1.0) ve tutucu pipeti (MPH-Med-30) ile 40X' lik objektif kullanıldı. Enjeksiyon pipeti ile hareketli ve normal görünümlü olan spermatozoon, kuyruğu kırılarak hareketsizleştirildi. Oosit, polar body'si 12 ya da 6 hizasına gelecek şekilde tutucu pipet ile sabitlendi ve enjeksiyon pipeti ile spermatozoon oosit sitoplazmasına bırakıldı. Oositler enjeksiyon yapıldıktan sonra, önceki günden

hazırlanmış kültür medyumuna (Quinn's Advantage Cleavage Medium, Sage, Amerika) aktarıldı. 37°C, %6 CO₂ ve %5 O₂ ortam (Labotect C200, Almanya) sağlayan inkübatörlere kaldırılan oositler kültür süresince burada muhafaza edildi.

5.3.6. Embriyoların Takibi

Mikroenjeksiyon işleminden sonra 16-20. saatlerde fertilizasyon kontrolü yapıldı. Oosit sitoplazmasında 2 pronükleus ve 2 polar body görülmesi fertilizasyonun gerçekleşmesi olarak değerlendirildi (4). Bu evrede aynı zamanda pronükleusların (PN) pozisyon ve boyutu, nükleolar prekürsör cisimlerin (NPB) sayısı, şekli ve dağılımı Tesarik ve Greco'nun skorlama sistemi kullanılarak belirlendi (9).

Fertilizasyon oranı, fertilize olan MII oositlerin, toplam MII oositlere oranı alınarak hesaplandı. İlk kontrolden sonra, zigotların içinde bulunduğu kültür tabakları, önceki gün hazırlanmış yeni kültür tabakları ile değiştirildi.

Mikroenjeksiyon işleminden yaklaşık 24 saat sonra ilk bölünme, 48. saatte ikinci ve 74. saatte üçüncü bölünmeleri değerlendirildi.

Embriyoların değerlendirilmesinde kullanılan sınıflama sistemi ve kriterleri:

Grade 1: Eşit büyüklükte blastomere sahip, fragmantasyon ve granülasyon göstermeyen embriyo.

Grade 2: Eşit blastomere sahip, <%5-10 oranında fragmantasyon veya granülasyon gösteren embriyo.

Grade 3: Eşit olmayan blastomere sahip, <%10-20 oranında fragmantasyon gösteren veya granülasyon gösteren embriyo.

Grade 4: Blastomerleri birbirinden tamamen farklı, blastomer sayısı tam olarak tespit edilemeyen, ileri derecede fragmantasyona sahip veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo (89, 90).

Embriyo gelişim oranı, bölünen embriyoların fertilize olan oositlere oranı alınarak belirlendi. Grade 1 ve Grade 2 olarak belirlenen embriyo sayılarının gelişen tüm embriyolara oranı iyi kalite embriyo oranı, Grade 3 ve Grade 4. kalite olarak belirlenen embriyoların tüm embriyolara oranı ise kötü kalite embriyo oranı olarak tanımlandı.

5.3.7. Transfer İşlemi

Anne yaşı, embriyoların kalitesi ve bölünme hızları, pronükleer skorlamaları göz önüne alınarak 2. ya da 3. gün embriyo transfer işlemi gerçekleştirildi. Seçilen embriyolar önceki gün hazırlanmış olan %50 oranında SPS içeren Cleavage medyumunun (Sage, Amerika) içine konularak yine aynı medyum ile yıkanmış Hamilton enjektör (Hamilton 1705 LT, İsviçre) yardımıyla transfer kataterine (K-JETS 7019, Cook, Avustralya) steril bir şekilde yerleştirildi. Jinekoloğa bu şekilde verilen katater ultrason eşliğinde anne adayının uterusuna yerleştirildi (91).

5.3.8. Gebelik Tayini

Transfer işleminden 12 gün sonra kanda belirlenen ≥ 15 mIU/mL β -hCG değeri ve 2 gün sonra tekrarında en az iki katına çıkmış olan β -hCG değeri, gebelik olarak değerlendirildi.

5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows 16.0 programı kullanıldı.

Çalışma verileri değerlendirilirken tamamlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında “One Way Anova” testi kullanıldı. Sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

6. BULGULAR

Çalışmamızda merkezimize Haziran 2009- Eylül 2010 tarihleri arasında başvuran ve infertilite nedeniyle ICSI tedavisine alınan yaşları 20- 35 arasında değişen çiftler değerlendirildi. Pronükleer skorlamanın fertilizasyon, embriyo gelişimi, embriyo kalitesi ve gebelik oranları üzerine etkilerini araştırmak amacıyla 35 yaş altında ve 3 denemeden az olan denemelerde tek embriyo transferini, bunun dışındaki durumlarda ise en fazla 2 embriyo transferini esas alan yeni yönetmelikten sonra her embriyonun tek başına takip edilmesi mümkün olabildiğinden hastalar, yönetmelik öncesi ve yönetmelik sonrası olmak üzere iki ana grupta değerlendirildi (Tablo 1). Her grup, transfer edilen embriyoların pronükleer skorlama dağılımlarına göre 3 alt gruba ayrıldı. 1. grup, transfer edilen embriyolarının tümü zigot aşamasında P0'dan gelişen (yasa öncesi ve sonrası N: 25, N: 24), 2. grup, transfer edilen embriyolarından en az biri P0'dan gelişen (yasa öncesi ve sonrası N: 51, N: 5) ve 3. grup, transfer edilen embriyolarının hiçbirisi P0'dan gelişmeyen (yasa öncesi ve sonrası N: 25, N: 19) olgulardan oluşmaktaydı. İlk olarak, yönetmelik öncesi (YÖ) grup değerlendirildi. Bu gruptaki 3 alt grubun, yaşları (sırasıyla; $30,8 \pm 3,7$; $29,3 \pm 3,4$; $31,0 \pm 4,5$), toplanan oosit sayıları (sırasıyla; $11,6 \pm 5,3$; $12,8 \pm 6,4$; $10,2 \pm 6,5$) ve MII oosit sayıları (sırasıyla; $8,8 \pm 4,1$; $10,1 \pm 5,7$; $7,6 \pm 5,05$) benzer ($p > 0,05$) olarak bulundu. Gruplar arasında fertilizasyon oranı, embriyo gelişim oranı, embriyo kalitesi ve gebelik oranları açısından anlamlı fark belirlenmedi ($p > 0,05$). (Tablo 2, Şekil 2) .

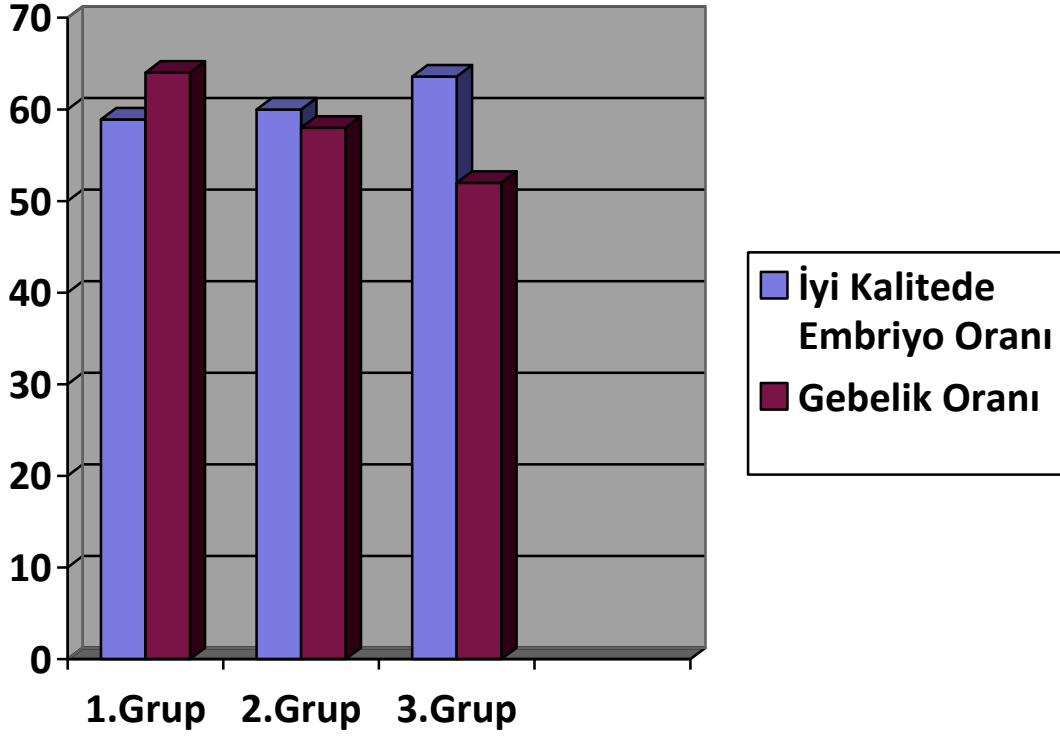
Çalışma Grubu Toplam Olgu Sayısı	Yönetmelik Öncesi Olgu Sayısı	Yönetmelik Sonrası Olgu Sayısı
149	101	48

Tablo 1: Yönetmelik öncesi ve yönetmelik sonrası değerlendirilen olgu sayısı.

YÖNETMELİK ÖNCESİ (YÖ) GRUP	Grup I (Hepsi P0)	Grup 2 (En az 1'i P0)	Grup 3 (Hiçbiri P0)	<i>p</i>
Yaş*	30,8 ± 3,7	29,3 ± 3,4	31,0 ± 4,5	NS
Toplanan oosit sayısı*	11,6 ± 5,3	12,8 ± 6,4	10,2 ± 6,5	NS
MII oosit sayısı*	8,8 ± 4,1	10,01 ± 5,7	7,6 ± 5,05	NS
2 PN sayısı*	6,7 ± 3,3	7,8 ± 4,5	5,3 ± 2,9	NS
Emb. gelişim oranı *	98,8 ± 4,1	97,5 ± 5,9	96,4 ± 9,2	NS
İyi kalitede emb. oranı *	58,9 ± 29,4	60 ± 25,0	63,6 ± 33,0	NS
Kötü kalitede emb. oranı *	41 ± 29,4	39,7 ± 25	36,4 ± 33	NS
Gebelik oranı *	0,64 ± 0,48	0,58 ± 0,49	0,52 ± 0,50	NS

* (ort ± S.D); PN: pronükleus; NS: İstatistiksel anlamı yok

Tablo 2: Yönetmelik öncesi gruplarda yaş, toplanan oosit sayısı, MII oosit sayısı, 2PN sayısı, embriyo gelişim oranı, iyi kalitede embriyo oranı, kötü kalitede embriyo oranı, gebelik oranı parametrelerinin gruplara göre dağılımları.



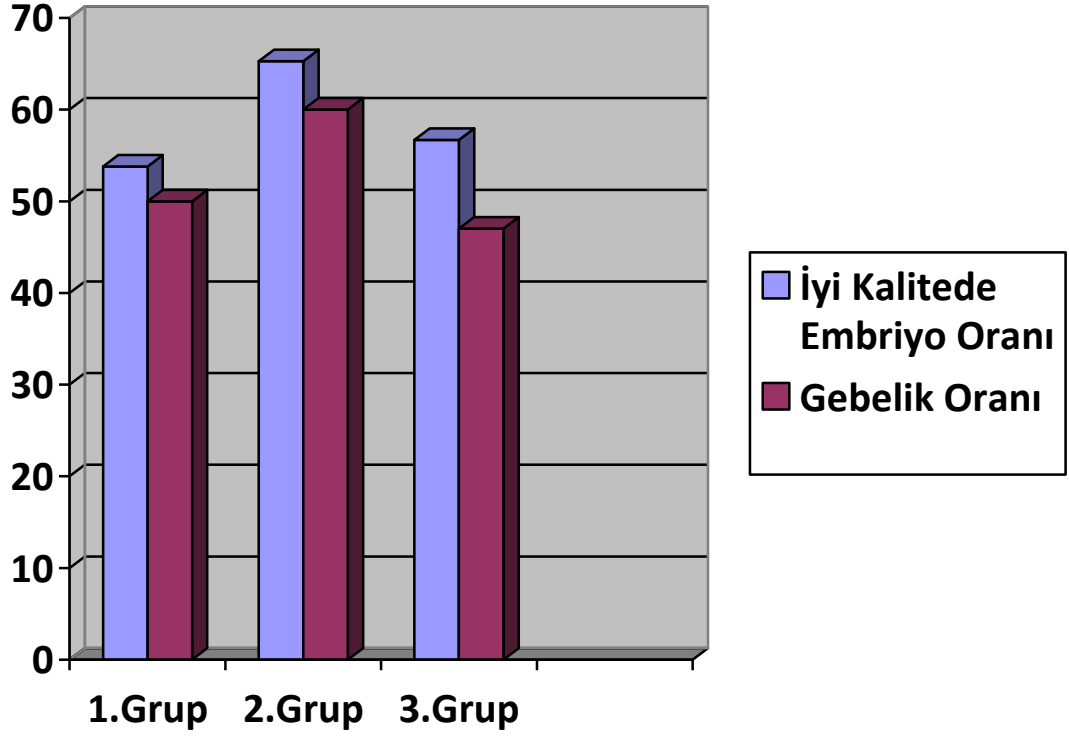
Şekil 2: Yönetmelik öncesi gruplarda iyi kalite embriyo ve gebelik oranları.

Daha sonra yönetmelik sonrası (YS) grup değerlendirildi. Bu gruptaki 3 alt grubun, yaş (sırasıyla; $29,7 \pm 3,4$; $30,2 \pm 2,9$; $29,3 \pm 2,7$), toplanan oosit sayıları (sırasıyla; $10,7 \pm 4,6$; $10,6 \pm 4,5$; $11,5 \pm 4,5$) ve MII oosit sayıları (sırasıyla; $8 \pm 3,8$; $7,6 \pm 4,4$; $7,6 \pm 3,2$) benzer bulundu ($p > 0.05$). Gruplar arasında fertilizasyon oranı, embriyo gelişim oranı, embriyo kalitesi ve gebelik oranları açısından anlamlı fark belirlenmedi ($p > 0.05$). (Tablo 3, Şekil 3).

YÖNETMELİK SONRASI (YS) GRUP	GRUP I (Hepsi 0 PN)	GRUP 2 (En az 1'i 0 PN)	GRUP 3 (Hiçbiri 0 PN)	<i>p</i>
Yaş *	29,7 ± 3,4	30,2 ± 2,9	29,3± 2,7	NS
Toplanan oosit sayısı *	10,7 ± 4,6	10,6 ± 4,5	11,5± 4,5	NS
MII oosit sayısı *	8 ± 3,8	7,6 ± 4,4	7,6 ± 3,2	NS
2 PN sayısı *	4,9 ± 2,1	5,6 ± 2,8	5,2 ± 2,3	NS
Emb. gelişim oranı *	98,9 ± 11,6	100	100	NS
İyi kalitede emb. oranı *	53,8 ± 25,8	65,3 ± 30,9	56,7 ± 34,2	NS
Kötü kalitede emb. oranı *	46,1 ± 25,8	34,6 ± 30,9	43,2 ± 34,2	NS
Gebelik oranları *	50 ± 0,5	60 ± 0,5	47 ± 0,5	NS

* (ort ± S.D); PN: Pronükleus; NS: İstatistiksel anlamı yok

Tablo 3: Yönetmelik sonrası gruplarda yaş, toplanan oosit sayısı, MII oosit sayısı, 2PN sayısı, embriyo gelişim oranı, iyi kalitede embriyo oranı, kötü kalitede embriyo oranı, gebelik oranı parametrelerinin gruplara göre dağılımları.



Şekil 3: Yönetmelik sonrası gruplarda iyi kalite embriyo ve gebelik oranları.

Çalışmamızda son olarak, tüm pronükleer sınıfların embriyo kalitesi üzerine etkisini görebilmek amacıyla hastalardan bağımsız olarak tüm embriyolar birlikte değerlendirildi. Toplam 422 embriyo pronükleer skorlama sistemine göre 6 gruba ayrıldı. 1. grupta P0'dan gelişen embriyolar, 2. grupta P1'den gelişen embriyolar, 3. grupta P2'den gelişen embriyolar, 4. grupta P3'ten gelişen embriyolar, 5. grupta P4' ten gelişen embriyolar, 6. grupta P5'ten gelişen embriyolar olacak şekilde gruplandırıldı (Resim 1).



P0



P1



P2



P3



P4



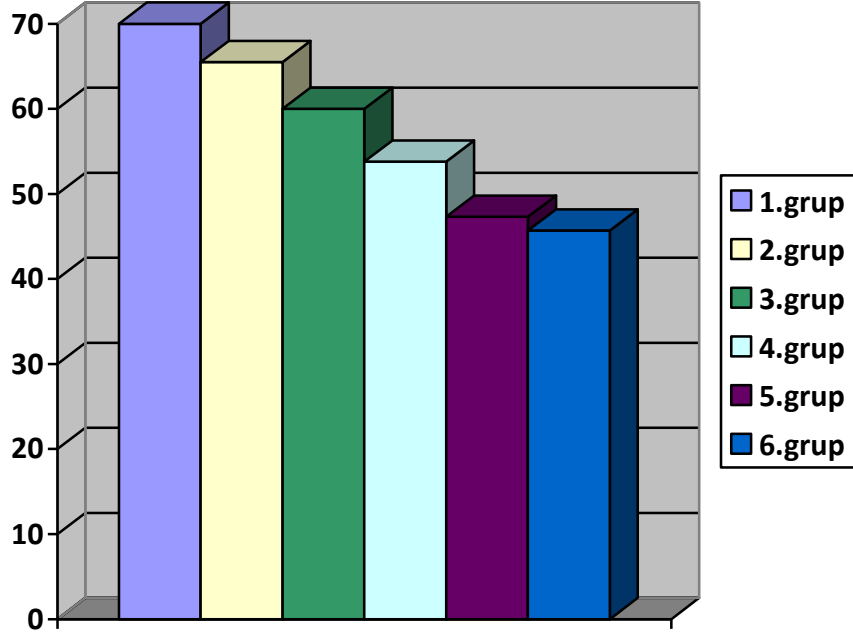
P5

Resim 1: Çalışmamıza ait olgulardan 2PN içeren fertilize olmuş, Tesarik ve Greco'nun PN skorumuna göre değerlendirilmiş oositlerin inverted mikroskoftaki görüntüleri (X200).

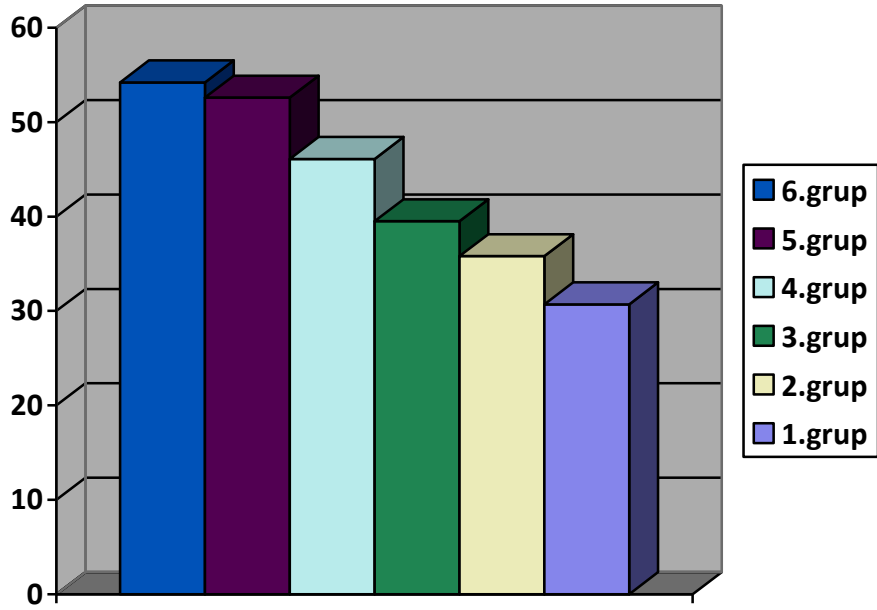
Gruplarda değerlendirilen embriyo sayıları sırasıyla; 138, 69, 66, 13, 19 ve 117' idi. İyi kalitede embriyo oranları en yüksek P0 grubunda belirlenip, P0 grubundan P5 grubuna doğru istatistiksel olarak anlamlı derecede düşmüştür (sırasıyla %70.0 ± 30.0, % 65.5 ± 42.1, %60.4 ± 44.2, %53.8 ± 51.8, %47.3 ± 45.5, %45.7± 41,3). Kötü kalitede embriyo oranları ise tersine en yüksek P5 grubunda belirlenip, P5 grubundan P0 grubuna doğru istatistiksel olarak anlamlı derecede düşmüştür (sırasıyla %54.2± 41.3, %52.6± 45.5, %46.1 ± 51.8, %39.5 ± 44.2, %35.8 ± 42.6, %30.7 ± 30.5) (Tablo 4, Şekil 4 ve 5).

	Embriyo sayıları	İyi kalite Embriyo Oranı	Kötü Kalite Embriyo Oranı	<i>p</i>
Grup 1 (Pattern 0)	138	70.0 ± 30	30,7 ± 30,5	0.000
Grup 2 (Pattern 1)	69	65.5± 42.1	35,8 ± 42,6	0.000
Grup 3 (Pattern 2)	66	60.4 ± 44.2	39,5 ± 44,2	0.000
Grup 4 (Pattern 3)	13	53.8 ± 51.8	46,1 ± 51,8	0.000
Grup 5 (Pattern 4)	19	47.3 ± 45.5	52,6 ± 45,5	0.000
Grup 6 (Pattern 5)	117	45.7 ± 41.3	54,2 ± 41,3	0.000

Tablo 4: Gelişen tüm iyi ve kötü kalite embriyo oranlarının pattern gruplarına göre dağılımı.



Şekil 4: Gelişen iyi kalitede embriyoların, P0, P1, P2, P3, P4, P5 patternlerine göre dağılımı.



Şekil 5: Gelişen kötü kalitede embriyoların, P5'den P0'a kadar olan gruplara göre dağılımı.

7. TARTIŞMA

Çalışmamızda, ICSI işlemi ile elde edilen embriyoların zigot evresi pronükleer skorlamalarının fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik oranları üzerine etkisini değerlendirildi. (54, 92). Elde edilen veriler doğrultusunda, hastanın gelişen tüm embriyoları içerisinde implantasyon potansiyeli en yüksek embriyo/ embriyoların seçilebilmesi için bu parametrenin kullanılabilirliğini araştırıldı.

Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalardan birçoğu, zigot evresindeki pronükleer skorlamanın embriyonun gelişim ve implantasyon potansiyelini belirlemesi açısından önemli olduğunu, bu nedenle de embriyo seçim kriterlerinden biri olarak kullanılması gerektiği bildirmektedir (10, 11, 54). Van Blerkom ve arkadaşları tarafından oositin sitoplazmik fenotipi ve pronükleusların simetri ve dağılımı kadar nükleolusların sayısı ve dağılımının da önemli olduğu gösterilmiştir (93). Payne D ve arkadaşları da NPB polaritesinin embriyonik eksen belirlenmesini sağlayarak farklılaşacak hücrelerin seçiminde etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (94). Daha sonra çeşitli pronükleer skorlama sistemleri geliştirilerek belli bir sistem oluşturulmaya çalışılmıştır (9, 11). Bu skorlama sistemlerinden biri Tesarik ve Greco tarafından 1999 yılında geliştirilmiş ve zigotlar pronükleolusların dağılım ve dizilişine göre 6 ana gruba ayrılmıştır. Bu araştırmacılar kendi zigot skorlama sistemlerini kullanarak yaptıkları değerlendirmede, pattern 0'dan gelişen embriyoların daha iyi kalitede embriyo oluşturduklarını ve bölünme evresi duraksamasının, diğer pattern gruplarına göre daha az olduğunu göstermişlerdir (9). Çalışmalarında implante olmuş embriyoların fertilizasyon evresindeki zigotları araştırıldığında, NPB sayısı ve dağılımındaki ortak noktaların, NPB sayısı farkının 3'ten fazla olmaması ve NPB'lerin her iki PN'de de ya polarize ya da dağınık bulunması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu özelliklere sahip optimal zigot skorunu P0 olarak belirleyerek, bu skora sahip embriyolarda görülen gelişim duraksamasının sadece %8,5 olduğunu, bu skorun dışındaki embriyoların ise düşük kalitede olduklarını belirlemişlerdir.

Skorlama sistemlerinden bir diğeri olan Z skorlama yöntemi de Scott ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve zigotlar pronükleolusların dağılım ve dizilişine göre 4 ana gruba ayrılmışlardır. Scott ve arkadaşları bu skorlama sistemini kullandıkları çalışmada, pronükleer skorlama ve 3. gün embriyo morfoloji verilerini birlikte değerlendirerek embriyoları seçip transfer ettiklerinde %31 implantasyon ve %57 gebelik oranı elde

etmişlerdir. Buna karşın sadece morfolojilerine göre değerlendirdikleri embriyolarda implantasyon ve gebelik oranlarını sırasıyla % 19 ve 33 olarak belirlemişlerdir (11).

Embriyo seçiminde PN skorlamanın önemi, Almanya gibi embriyo koruma yasası oluşturulmuş bir ülkede daha büyük bir öneme sahiptir (95). Takip edilecek embriyo sayısını 3 ile sınırlayan bu yasa nedeniyle embriyolar zigot evresinde seçilmek zorunda olduğundan pronükleer skorlamanın önemi artmıştır. Zollner ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, toplam 168 IVF ve ICSI siklusunda pronükleusların sayı ve büyüklüğü, nükleolusların dizilişi, halo yapısı, sitoplazma görünüşü ve vakuol bulunup bulunmamasına bakılarak kümülatif zigot skorlaması yaparak, en iyi skora sahip embriyoyu, 5. günde transfer edilmişlerdir. ICSI uygulanan hastalarda, iyi zigot skoruna sahip embriyoların blastosist kalitesinin de iyi olduğu gösterilmiştir (96).

Balaban ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada PN skorlamanın blastosist gelişimi ve kalitesi üzerine etkisini incelemiş ve Pattern 0'dan gelişen embriyoların daha erken ve hızlı bölünüp, daha iyi kalitede embriyo ve blastosist oluşturduklarını göstermişlerdir (57). Pattern 0'dan gelişen iyi kalite embriyoların, P0 dışındakilerden gelişen iyi kalitede embriyolara göre daha yüksek implantasyon oranlarına sahip oldukları bildirilmiştir.

Biz de çalışmamızda, hastalardan bağımsız olarak tüm embriyoların pronükleer skorlarının embriyo kalitelerine etkilerini araştırdığımızda, P0'dan gelişen embriyoların diğer sınıflardan gelişenlere göre anlamlı derecede daha iyi kalitede embriyo oluşturduklarını belirledik. Çalışmamız bu açıdan literatürdeki pronükleer skorlamanın embriyo gelişimi üzerine olumlu etkisini gösteren çalışmaları doğrular niteliktedir. Embriyo gelişim oranları ise pronükleer sınıflar arasında benzer bulunmuştur.

Literatürde pronükleer skorlamanın sonuçları etkilemediğini ve embriyonun implantasyonunu belirlemede prediktif olmadığını ileri süren oldukça az sayıda çalışma vardır (92, 97, 98). Bu çalışmalardan birinde Saluments, pronükleer morfoloji ile embriyo kalitesi, gebelik ve implantasyon potansiyelleri arasında anlamlı bir fark olmadığını ileri sürmüş, pattern 0 olan ve olmayan gruplardan gelişen iyi kalitede ki embriyoların transferiyle oluşan implantasyon potansiyellerinin benzer olduğunu göstermiştir (92).

Aidita ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada pronükleer skorlamanın gebelik ve canlı doğum oranları üzerine etkisi olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmalarında, embriyoları zigot aşamasında dört farklı gruba göre sınıflamışlardır. Bu gruplardan gelişen

embriyoların transferiyle elde ettikleri canlı doğum oranının benzer olduğunu göstermişlerdir (97).

Biz de çalışmamızda, hastaların transfer edilen embriyolarının pronükleer skor dağılımlarına göre; tüm embriyoları P0 transfer edilen, en az bir embriyosu P0 transfer edilen ve hiç P0 transfer edilmeyen olarak 3 grup altında incelediğimizde, gruplar arasında gebelik oranları arasında anlamlı fark olmadığını belirledik. Çalışmamızın sonuçları pronükleer skorumun, gebelik oranlarını etkilemediğini gösteren bu çalışmaların verilerini destekler niteliktedir.

Araştırmamızın sonuçları doğrultusunda, zigot evresinde pronükleer skorumla ile değerlendirdiğimiz embriyolardan, daha iyi skora sahip zigotlardan gelişenlerinin, diğer embriyoların kalitelerine göre anlamlı derecede yüksek kalitede belirlenmesi nedeniyle pronükleer skorumun embriyo kalitesini belirlemede prediktif değeri olduğu söylenebilir. Embriyo kalitesinin gebelik ve implantasyon oranları ile pozitif ilişkisi bilindiğinden pronükleer skorumun embriyo seçim kriterlerinden biri olarak kullanılabilmesi sonucu doğmaktadır. Pronükleer skorumun gebelik oranları üzerine etkisini incelediğimizde ise tüm embriyoları P0 transfer edilen, en az bir embriyosu P0 transfer edilen ve hiç P0 transfer edilmeyen gruplar arasında anlamlı fark olmadığını göstermemize rağmen bu durumun hasta sayısının azlığından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Hastaların yönetmelik öncesi ve sonrası olacak şekilde iki grup halinde incelenmesi de implante olan embriyonun tam olarak anlaşılabilmesini mümkün hale getirememiştir çünkü yönetmeliğin belirlediği bazı durumlarda 2 embriyo transfer edilebilmektedir. Hasta sayısı artırılarak ve sadece tek embriyo transferlerinin değerlendirildiği yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bulgularımız doğrultusunda pronükleer skorumla sisteminin, embriyo kalitesinin belirlenmesinde prediktif değeri olduğu, özellikle tek embriyo transferine geçtiğimiz yeni yasal düzenleme sonrasında, embriyo seçiminde etkin bir şekilde kullanılmasının faydalı olabileceği söylenebilir.

8. SONUÇ

Çalışmamızda embriyonun pronükleer evresinde yapılan PN skorlamanın ICSI parametreleri üzerine olan etkisini inceledi. Seçtiğimiz 149 hastanın transfer edilen embriyoları pronükleer skorlama dağılımlarına göre 3 alt gruba ayırdı. 1. grup, transfer edilen embriyolarının tümü zigot aşamasında P0'dan gelişen embriyolardan, 2. grup transfer edilen embriyolarından en az biri P0'dan gelişen embriyolardan ve 3. grup, transfer edilen embriyolarının hiçbiri P0'dan gelişmeyen olgulardan oluşturuldu.

Bulgularımız doğrultusunda NPB'lerin sayı, diziliş ve dağılımlarının embriyo gelişimi, embriyo kalitesi ve gebelik üzerine etkileri hasta grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde şunları söyleyebiliriz:

- Embriyo elde etme oranı ve gelişen iyi kalitede ki embriyo oranları ve gebelik açısından, gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

Tüm embriyolar, pronükleer sınıfların embriyo kalitesi üzerine etkisini görebilmek için hastalardan bağımsız olarak birlikte değerlendirildiğinde:

- İyi kalitede embriyo oranları en yüksek P0 grubunda belirlenip, P0 grubundan P5 grubuna doğru istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu.
- Gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Bu bulgular doğrultusunda ICSI sonrası 16-20. saatlerde değerlendirilen pronükleer skorlama sisteminin embriyo kalitesini belirlemede prediktif değeri olduğu, embriyo seçiminde değerlendirilecek kriterler arasında kullanılmasının yararlı olabileceği söylenebilir. Tek embriyo transferlerinin değerlendirileceği, daha geniş hasta gruplarıyla yapılan yeni çalışmaların yararlı olabileceği düşünülmektedir.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi hazırlamam sırasında yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda özveri ve sabırla beni cesaretlendiren kıymetli hocalarım Prof. Dr. Vildan KARPUZ ve Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e, tüm İstanbul Bilim Üniversitesi çalışanları ile her zaman arkadaşlığı ile yanımızda olan arkadaşımız İlkur KARAOSMANOĞLU'na;

Tez çalışmam boyunca, her türlü bilgi ve deneyimini benimle paylaşıp, her konuda yol gösteren Bio. Seda YILMAZ'a, çalışma arkadaşım Arın GENÇAY'a;

Tez çalışmam sırasında manevi desteğiyle beni her zaman cesaretlendiren sevgili arkadaşım Erdal ÇİÇEK'e sonsuz teşekkürlerimle.

10. KAYNAKLAR

1. Vicdan K, Isık AZ. İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Ankara, Çağdas Medikal Kitapevi, 1999.
2. Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH. Laboratory Aspects of In Vitro Fertilization. 1996.
3. Trounson A. Current perspectives of in vitro fertilization and embryo transfer. *Clin Reprod Fertil.* 1982, 1(1):55-65.
4. 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.
5. Waterstone J, Parsons J and Bolton V. Elective transfer of two embryos. *Lancet.* 1991, 337:975–976.
6. 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.
7. Van Blerkom J, Bell H, Weipz D. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis in vitro. *J Electron Microsc Tech.* 1990, 16(4):298-323.
8. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod.* 1998, 13:1003-1013.
9. 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.
10. Balaban B, Yakin K, Urman B. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution *Reprod BioMed Online.* 2004, 8:695-700.
11. 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.
12. Branigan EF, Estes MA, Muller CH. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertil Steril.* 1999, 71(3):547-551.

13. Berg U, Brucker C, Berg FD. Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 1997, 67(4):747-750.
14. Lee RK, Hou JW, Ho HY, Hwu YM, Lin MH, Tsai YC, Su JT. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *Int J Androl*. 2002, 25(5):277-280.
15. Ombelet W, Wouters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, Vereecken A, Bosmans E, Steeno O. Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J Androl*. 1997, 20(6):367-372.
16. Check ML, Kiefer D, Check JH, Hourani W, Long R. Treatment of sperm with subnormal host scores with chymotrypsin/viable pregnancy after IUI. *Arch Androl*. 2002, 48(2):155-158.
17. Karabinus DS, Gelety TJ. The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril*. 1997, 67(3):536-541.
18. Carr BR, Blackwell RE. Textbook of Reproductive Medicine. 2nd. Ed. Connecticut USA, Appleton & Lange Stamford, 1998.
19. 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):112-117.
20. Mahadevan MM, Trounson AO. Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1985, 43(2):263-267.
21. Cohen J, Talansky BE, Malter H, Alikani M et al. Microsurgical fertilization and teratozoospermia. *Hum Reprod*. 1991, 6:118-123.
22. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992, 4(340):17-18.
23. Ng SC, Bongso A, Sathanantan H, Ratnam SS. Micromanipulation: its relevance to human in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1990, 53(2):203-219.
24. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*. 1993, 13:342.

25. 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):1045-1051.
26. Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z. Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril*. 1993, 60(5):871-875.
27. Steven D, Fleming and Robert S. King. *Micromanipulation in Assisted Conception*. UK, Cambridge University Pres, 2003.
28. Trounson A, Leeton J, Wood C, Webb J. Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science*. 1981, 216:681-682.
29. Martin PM. Welch HG. Probabilities for singleton and multiple pregnancies after invitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998, 70:478-481.
30. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1993, 8(7):1061-1066.
31. 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):1118-1123.
32. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier L, Serkine AM. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod*. 2002, 17(2):362-369.
33. Pinheiro RC, Lambert J, Bénard F, Mauffette F, Miron P. Effectiveness of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection for severe male infertility. *CMAJ*. 1999, 30, 161(11):1397-1401.
34. Zollner U, Zollner KP, Dietl J, Steck T. Semen sample collection in medium enhances the implantation rate following ICSI in patients with severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod*. 2001, 16(6):1110-1114.
35. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction Cambridge University Press, Fourth Edition. 1999.
36. Trounson A, Gardner D. K. *Handbook of In Vitro Fertilization*. Florida, USA, CRC Pres, 1993.

37. In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri Lale Delibaşı: Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2007.
38. Longo FJ. Fertilization, 2nd ed. Chapman and Hall, London 1997.
39. Wassarman, P. M. Mammalian eggs, sperm and fertilisation: dissimilar cells with a common goal. *Semin Devel. Biol.* 1993, 4:189-197.
40. Zimmerberg J. Fusion in biological and model membranes: Similarities and differences, in Molecular Mechanisms of Membrane Fusion, (eds S. Ohki, D. Doyle, T. D. Flanagan et al.) Plenum Press, New York, 1988.
41. Monck, J. R. and Fernandez, J.M. The exocytic fusion pore. *J. Cell Biol.* 1992, 119:1395-1404.
42. Moser F. Studies on cortical layer response to stimulating agents in the Arbacia egg. I. Response to insemination. *J. Exper. Zool.* 1939, 80:423-471.
43. Tabakoğlu Oğuz A. Hayvan Embriyolojisi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları, 2001.
44. Longo, F. Fertilization: A comparative ultrastructural review. *Biol Reprod.* 1973, 9:149-215.
45. Holland, L.Z. and Holland, N.D. Early development in the lancelet (=Amphioxus) *Branchiostoma floridae* from sperm entry through pronuclear fusion: Presence of vegetal pole plasm and lack of conspicuous ooplasmic segregation. *Biol Bull.* 1992, 182:77-96.
46. Sathananthan AH, Kola I, Trounson A, Ng SC, Bongso A. Centrioles in the beginning of human development. *Proc Natl Acad Sci.* 1991, 88:4806-4810.
47. Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Develop Biol.* 1984, 165:299-335.
48. Moore Persaud. İnsan Embriyolojisi, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2002.
49. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cell. Philadelphia, Garland Science, 2002.
50. Sadowy S, Tomkin G, Munne S. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote.* 1998, 6:137-141.

51. Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod.* 2002, 17:3193-3200.
52. Coşkun S, Hellani A, Jaroudi K, et al. Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reprod BioMed Online.* 2003, 7:86-90.
53. 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.
54. Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S et al. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod.* 2000, 15:325-329.
55. Tesarik J, Junca AM, Hazout A et al. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod.* 2000, 15:1396-1399.
56. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieresa C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod.* 2000, 15:2591-2597.
57. 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, 6(11):2357-2361.
58. Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod.* 1997, 3(12):1067-1086.
59. 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):2588-2595.
60. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between

- blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod.* 2000, 15(12):2621-2633.
61. 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):2406-2412.
 62. Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod.* 2002, 17(2):393-406.
 63. Wu GJ, Simerly C, Zoran SS, Funte LR, Schatten G. Microtubule and chromatin dynamics during fertilization and early development in rhesus monkeys, and regulation by intracellular calcium ions. *Biol Reprod.* 1996, 5(2):260-270.
 64. Van Blerkom J., Gregory L. Essential IVF Basic Research and Clinical Applications, Boston, Dordrecht, London.
 65. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997, 12(7):1531-1536.
 66. Jing Fu, Xian-Jing Wang, Yong-Wei Wang, Jian Sun, Kristina Gemzell-Danielsson and Xiao-Xi Sun. The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2009, 26(8):437-441.
 67. 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.
 68. 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):582-586.
 69. 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.
 70. Hartshorne G. The embryo. *Hum Reprod.* 2000, 15(4):31-41.

71. Rienzi L, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Blastomere cytoplasmic granularity is unrelated to developmental potential of day 3 human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2003, 20(8):314-317.
72. Lale Delilbaşı. Tüp Bebek Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri, Baysev Vakfı Yayınları, 1997.
73. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, Wiemer K. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod.* 1990, 5(1):7-13.
74. Roseboom TJ, Vermeiden JP, Schoute E, Lens JW, Schats R. The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. *Hum Reprod.* 1995, 10(11):3035-3041.
75. 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):836-842.
76. 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):60-66.
77. Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. (2004). Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online.* 2004, 9(5):511-520.
78. Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2003, 18(5):1062-1069.
79. Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod.* 1997, 12(4):800-804.
80. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999, 11(3):307-311.

81. 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.
82. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Isiklar A. Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril*. 2001, 75(3):514-518.
83. Oatway C, Gunby J, Daya S. Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*, (2): CD004378. 2004.
84. De los Santos MJ, Mercader A, Galan A, Albert C, Romero JL, Pellicer A. Implantation rates after two, three or five days of embryo culture. *Placenta*. 2003, 24:13-19.
85. Aboulghar MM, Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Amin YM, Abou-Setta AM. Pregnancy rate is not improved by delaying embryo transfer from days 2 to 3. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003, 25; 107(2):176-179.
86. Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, Fox JH, Hornstein MD, Ginsburg ES. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril*. 2000, 73(3):558-564.
87. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*. 1998, 69(1):84-88.
88. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod*. 1993, 8(7):1055-1060.
89. Scott L. Analysis of fertilization. Textbook of assisted reproductive techniques. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
90. Sakkas D. Evaluation of embryo quality: A strategy for sequential analysis of embryo development with the aim of single embryo transfer. Textbook of assisted reproductive techniques. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.

91. Schoolcraft WB. Embryo transfer. Textbook of assisted reproductive techniques. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London, United Kingdom, Martin Dunitz Ltd, 2001.
92. Salumets A, Hydén Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod.* 2001, 16 (10):2177-2181.
93. Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod.* 1995, 1(5):429-461.
94. Payne D, Flaherty S. P, Barry M. F, Matthews C. D. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997, 12:532-541.
95. <http://www.auswaertiges-amt.de/cae/servlet/contentblob/480804/publicationFile/5162/EmbryoProtectionAct.pdf>. Erişim Tarihi:19.06.2011
96. U.Zollner, K. P. Zollner, G. Hartl, J. Dietl and T. Steck. The use of detailed zygote score after IVF/ ICSI to obtain good quality blasycyts: the German experience. *Hum Reprod.* 2002, 17:1327-1333.
97. James A. N, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod.* 2006, 21(6):1599-1604.
98. Jaroudi K, Al-Hassan S, Sieck U, Al-Sufyan H, Al-Kabra M, Coskun S. Zygote transfer on day 1 versus cleavage stage embryo transfer on day 3: a prospective randomized trial. *Hum Reprod.* 2004, 9(3):645-648.