

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

**ERKEN BÖLÜNME DEĞERLENDİRMESİNİN
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU
SONUÇLARIYLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Biyolog Mehtap TÖLÜ AZİRET

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2008

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

ERKEN BÖLÜNME DEĞERLENDİRMESİNİN
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU
SONUÇLARIYLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Biyolog Mehtap TÜLÜ AZİRET

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Vildan KARPUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. ÜREME BİYOLOJİSİ	5
4.1.1. Gametogenez.....	5
4.1.1.1. Spermatogenez	5
4.1.1.2. Oogenez	6
4.1.2. Fertilizasyon.....	7
4.1.3. Zigotun Yarıklanması.....	8
4.1.4. İmplantasyon.....	8
4.2. İNFERTİLİTE VE ÜREMEYE YARDIMCI TEDAVİ YÖNTEMLERİ	9
4.3. İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (ICSI) VE SONRASINDA DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER	9
4.3.1. ICSI	9
4.3.2. ICSI Sonrası Embriyo Değerlendirme Parametreleri.....	10
4.3.2.1. Pronuklear Değerlendirme	11
4.3.2.2. Bölünme Evresi Değerlendirmesi	13
4.3.2.3. Blastosist Evresinde Embriyo Değerlendirmesi.....	15
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER.....	17
5.2. ÇALIŞMA GRUBU.....	18
5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER	18
5.4. ICSI	19
5.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER	24
6. BULGULAR	25
7. TARTIŞMA.....	37
8. SONUÇ	41
9. TEŞEKKÜR	43
10. KAYNAKLAR	44

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP	:Adenozin trifosfat
COC	:Kumulus-korona oosit kompleks (Toplanan oosit)
DNA	:Deoksi ribonukleik asit
FSH	:Folikül stimulan hormon
GnRH	:Gonadotropin salgılatıcı hormon
HCG	:İnsan koryonik gonadotropini
ICSI	:İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (Mikroenjeksiyon)
IVF	:İn vitro fertilizasyon (Tüp bebek)
MI	:Metafaz I evresindeki olgun olmayan oosit
MII	:Metafaz II evresindeki olgun oosit
mIU/mL	:Miliunit/Mililitre
mil/ml	:Milyon/Mililitre
ml	:Mililitre
mm	:Milimetre
NPB	:Çekirdekçik öncül cisimciği (Nucleolar precursor body)
OPU	:Oosit toplama (Oosit pick up)
PB	:Kutup cisimciği (Polar body)
PN	:Pronukleus
PVP	:Polivinilpirolidon
PZD	:Parsiyel zona disseksiyonu
rpm	:Dakikada devir sayısı (Revaluation per minute)
SUZİ	:Subzonal inseminasyon
YÜT	:Yardımla üreme teknikleri
β-hCG	: β -insan koryonik gonadotropini
μl	:Mikrolitre

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 19.11.2007 tarih ve 2007/035 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi No :HE/0272007

1. ÖZET

İnfertilite, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre sonunda gebe kalınmaması şeklinde tanımlanır. Yardımla üreme teknikleri gebelik elde edilmesi için başvurulan uygulamalardır. Bir in vitro fertilizasyon (IVF) siklusunda başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri transfer edilecek en iyi embriyonun seçimidir. Transfer edilecek embriyolar morfolojilerine ve kültürde gelişim oranlarına göre belirlenmektedir. Embriyoların gelişimlerinin ve diğer embriyolarla arasındaki farklılıkların belirlenmesi için kritik zaman noktalarında gözlenmesi gerekmektedir.

İnseminasyon veya mikroenjeksiyondan sonraki 25. saat kritik zaman noktası olarak kullanılmaktadır. 25. saatte iki hücreye bölünmüş embriyo erken bölünmüş embriyo olarak adlandırılır. Yapılan araştırmalar erken bölünen embriyoların daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir.

Çalışmamızda transfer edilecek en iyi embriyonun seçim sürecinde ICSI den 25-27 saat sonra gerçekleşen erken embriyo bölünmesinin ICSI parametreleri üzerine etkileri incelendi. 202 hasta transfer edilecek erken bölünen ve bölünmeyen embriyoların varlığına göre iki gruba ayrıldı. I. grup en az bir tane erken bölünen embriyo transferi yapılan 109 hastadan, II. grup ise erken bölünmeyen embriyolarla transferi yapılan 93 hastadan oluşturuldu.

Çalışma sonunda erken embriyo bölünmesinin ICSI parametrelerinden embriyo elde etme, embriyo bölünme hızı, kalitesi ve gebelik oranları üzerine etkisi değerlendirildi. Embriyo elde etme oranı açısından erken bölünen ve bölünmeyen grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Grup ayrımı yapılmadan tüm embriyolar değerlendirildiğinde, erken bölünen embriyodan gelişen embriyo bölünme hızı ve kalitesi, erken bölünmeyen embriyoya göre anlamlı yüksek bulundu. Gebelik oranları incelendiğinde; I. grupta gebelik oranı %72.5 ve II. grupta %31.2 bulundu. Erken bölünen embriyolarla transfer yapılan hastalarda gebelik oranı istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

Bu verilere dayanarak transfer edilecek embriyoların seçiminde fertilize olmuş oositin ilk hücre bölünme zamanının önemli bir kriter olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

2. SUMMARY

Infertility is described as not to become pregnant though having regular and exposed sex. Assisted reproductive techniques are the ways to have pregnancy that used. The most important criteria that affects the success of an IVF cycles is the selection of the best embryo. The embryos that will be transferred are selected upon their morphology and maturity of the culture. To determine the maturity of the embryos and differences between the other embryos critical time points should be observed.

25th hour after insemination or microinjection is used as critical time point. The embryo cleaved into 2 cell in 25th hour called as early cleaved embryo. Researchs shows that early cleavage embryos have higher pregnancy and implantation potential.

In our research, selection period of the best embryo that will be transferred, affects on ICSI parameters of early cleavage after 25-27 hours from ICSI. 202 patients are divided into 2 groups as early cleavage and non early cleavage. The first group constituted 109 patients which transferred at least 1 early cleavage embryo; the second group constituted 93 patients which transferred non early cleavage embryo. There were no significant difference on age, mature oocyte, fertilized oocyte, embryo and number of embryo transferred between two groups.

As a result of the research, affects of early cleaved embryos on ICSI parameters, derivation embryos, evolution and quality of the embryos are evaluated. There were no significant difference on providing embryos between early cleaved and non early cleaved embryos. Evolution and the quality of the embryo found in early cleaved embryos is significantly higher than non early cleaved embryos. Pregnancy rate is %72.5 in the first group and %31.2 in the second group. Pregnancy rate on patients which transferred with early cleaved embryos is significantly higher.

According to these outputs, in selection of embryo transferred, first cleavage time of the fertilized oocyte shall be evaluated as an important criteria.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre sonunda gebe kalınmaması şeklinde tanımlanır. Yardımla üreme teknikleri (YÜT) tıbbi ve cerrahi yöntemlerle gebeliğin elde edilemediği hastalarda gebelik elde edilmesi için başvurulan uygulamalardır (1).

YÜT uygulamalarında kullanılan ovaryan stimülasyon protokolleri fazla sayıda oosit ve bunun sonucunda fazla sayıda embriyo elde edilmesini sağlamaktadır (2). Gebe kalma olasılığını arttırmak için çok sayıda embriyonun transfer edilmesi ise istenmeyen çoğul gebeliklere yol açmaktadır (3). Amaç implantasyon için en fazla potansiyele sahip embriyoları seçip, transfer edilecek embriyo sayısını azaltmaktır. Bu da elde edilen çok sayıda embriyodan hangilerinin seçilip transfer edileceği sorununu beraberinde getirmektedir. Bu problemi çözmek için her bir embriyonun kalitesini belirleyip yaşama potansiyeli yüksek embriyoların transferini yapmak gerekmektedir. Bu nedenle embriyoların morfolojileri ve kültürde gelişim oranları değerlendirilmelidir (4).

Embriyoların gelişimlerinin ve diğer embriyolarla arasındaki farklılıkların belirlenmesi için kritik zaman noktalarında gözlenmesi gerekmektedir. Rastgele zamanlarda yapılan kontroller yanlış yönlendirici olabilmektedir (5).

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

İnseminasyon veya mikroenjeksiyondan sonraki 25. saat kritik zaman noktası olarak kullanılmaktadır. 25. saatte iki hücreye bölünmüş embriyo erken bölünmüş embriyo olarak adlandırılır. Yapılan araştırmalar erken bölünen embriyoların daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduklarını bildirmektedir (6-10). Bu verilere dayanarak transfer edilecek embriyoların seçiminde fertilize olmuş oositin ilk hücre bölünme zamanı önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir.

IVF ya da ICSI (İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) sonrası embriyoların transferinde implantasyon potansiyeli en yüksek embriyoların seçilebilmesi için gamet morfolojisi, pronuklear ve erken bölünme evresi gibi tüm morfolojik kriterler birlikte değerlendirilmelidir. Böylece hem laboratuvar verimliliği artmakta ve hem de daha az sayıda embriyo transfer edilmesine bağlı olarak çoğul gebelik oranları azalmaktadır (11).

Bu bilgiler ışığında planlanan tez çalışmamızda, transfer edilecek en iyi embriyonun seçim sürecinde ICSI'den 25-27 saat sonra gerçekleşen erken embriyo bölünmesi değerlendirilecektir. Çalışma sonunda erken bölünmenin gebelik oranları, embriyo bölünme hızı ve kalitesi üzerine etkisinin tanımlanması amaçlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. ÜREME BİYOLOJİSİ

İnsan gelişimi, erkek gamet hücresi sperm ile kadın gamet hücresi oositin zigot adı verilen tek hücreli yapıyı oluşturmak üzere bir araya gelmesi yani fertilizasyon ile başlar. Zigot, anne ve babadan gelen kromozom ve genleri içerir. Tek hücreli bir organizma olan zigot defalarca bölünür. Bölünen hücreler göç ederek, büyüyerek ve farklılanarak çok hücreli bir organizma olan insanı oluşturur (12).

İnsan gelişim aşamalarının anlaşılabilmesi için gametogenez oluşumunun açıklanması faydalı olacaktır.

4.1.1. Gametogenez

Gametogenez, germ hücrelerinden özelleşmiş üreme hücreleri olan gametlerin oluşum ve gelişme sürecidir. Gametler embriyonik gelişimin ikinci haftasında epiblast tabakasında oluşan primordial germ hücrelerinden köken alırlar. Bu hücreler, dördüncü haftada embriyonun arka duvarında gelişmekte olan gonadlara göç etmeye başlar. Bu göç sırasında mitoz bölünmeyle sayıları artar ve dişi gonadlarda oogonium, erkek gonadlarda ise spermatogoniumlara farklılırlar. Erkeklerde spermatogoniumların sperm haline dönüşmesine spermatogenez, dişilerde ise oogoniumların oosite dönüşmesine oogenez denir (13).

4.1.1.1. Spermatogenez

Spermatogoniumların sperm haline dönüşmesini sağlayan olayların tümünü kapsayan bir süreç olan spermatogenez, pubertede başlar ve ileri yaşlara kadar devam eder. Primordial germ hücreleri puberteye kadar sessiz kalır ancak puberteden sonra spermatogoniumlara farklılırlar (13). Spermatogoniumların pubertede sayıları artar ve çok sayıda mitoz bölünmeden sonra seminifer tübüllerin en büyük hücresi olan primer spermatosit oluşturur. Primer spermatosit daha sonra birinci mayoz bölünmeyi geçirir ve

yarısı büyüklüğünde iki tane haploid sekonder spermatosit oluşur. Sekonder spermatositin ikinci mayoz bölünmesinden sonra da yarısı büyüklüğündeki haploid spermatid oluşur. Spermatidler spermiyogenez denilen farklılaşma süreci sonucunda dört olgun sperme dönüşür. Spermiyogenez tamamlandığında spermiler seminifer tubülün lümenine geçer. Spermatogenezin tamamlanmasında rol aldığı düşünülen sertoli hücreleri seminifer tubüldeki germ hücrelerini besler ve destekler. Spermiler seminifer tubülden, depolandıkları ve fonksiyonel olarak olgunlaştıkları epididimise pasif olarak taşınır. Oldukça kıvrımlı bir tubül olan epididimis spermileri üretraya ileten duktus deferens ile devam eder.

Olgun sperm baş, boyun ve kuyruktan oluşmuştur. Spermin başı, en büyük kısımdır ve haploid sayıda kromozom içeren nukleusu taşır. Başın 2/3 ön kısmı akrozom ile kaplıdır. Kep şeklindeki bu kese yapının içinde en önemlisi akrozom olan çok sayıda enzim bulunur. Fertilizasyon sırasında salınan bu enzimler, spermin korona radiata ve zona pellusidayı geçmesini kolaylaştırır. Sperm kuyruğu orta, esas ve son parçalar olmak üzere üç parçadan oluşur. Kuyruk, spermin hareket etmesini ve böylece fertilizasyonun gerçekleşeceği bölgeye ulaşmasını sağlar. Kuyruğun orta bölümünde bulunan mitokondriler hareket için gerekli olan adenozin trifosfatı (ATP) sağlar (14). Spermatogoniumdan olgun sperm oluşması için geçen süre 64 gündür (13).

4.1.1.2. Oogenez

Oogenez, oogonium denilen primordiyal germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesini sağlayan olayların tümünü kapsayan bir süreçtir. Oogenez doğumdan önce başlar ve pubertede tamamlanır.

Fetal yaşamın ilk evrelerinde oogoniumlar birbirini izleyen mitotik bölünmelerle çoğalır. Oogoniumların çoğu mitozla bölünmeyi sürdürürken bir kısmı birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde duraklayarak primer oositleri oluşturur. Primer oositler tek katlı yassı epitel hücreleriyle çevrelenmiştir. Bu haliyle primer oositler primordiyal follikül adı alır.

Puberte sırasında primer oositin büyümesiyle folikül epitel hücreleri önce kübik daha sonra silindirik bir şekil alarak primer foliküle dönüşür. Bu sırada oositin etrafı zona pellusida denilen glikoprotein yapısında hücresiz bir tabaka ile çevrilir.

Primer oositler puberteye kadar birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde kalırlar. Pubertede luteinizan hormonun etkisiyle birinci mayoz bölünme tamamlanır ve sekonder oosit ile birinci kutup cisimciği oluşur. Ovulasyonda sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeye başlar; ancak bu bölünmenin metafaz evresinde bekler. Eğer bir sperm sekonder oosite penetre olursa, ikinci mayoz bölünme tamamlanır (14).

4.1.2. Fertilizasyon

İnsanın gelişimi, oositin fertilizasyonu ile başlar. Fertilizasyon; spermin oosite temasıyla başlayan ve zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz evresinde, maternal ve paternal kromozomların kaynaşmasıyla sonlanan bir olaylar dizisidir. Bu olayların herhangi bir evresinde oluşan bir defekt, zigotun ölmesine neden olabilir (15).

Fertilizasyonun evreleri:

Spermin akrozom enzimlerinden olan hiyaluronidaz etkisiyle ve kuyruk hareketi yardımıyla oositi koruyan bariyerlerden birincisi olan korona radiatayı geçtiği düşünülmektedir.

Oositi koruyan ikinci bariyer zona pellusidadır. Akrozomdan salınan enzimlerden en önemlisi olan akrozin (16), zona pellusidada spermin geçeceği bir yol açar. Sperm zona pellusidaya dokunduktan sonra hızla penetre olur ve başı oosit yüzeyi ile temas ettiğinde, zona pellusidanın içeriği değişir (17). Zona reaksiyonu denilen bu olaydan sonra zona pellusida, diğer spermelere karşı geçirgenliğini kaybeder. Böylece polispermi önlenmiş olur.

Spermin oosit hücre membranına temasıyla birlikte, iki plazma membranı hemen kaynaşır. Spermin baş ve kuyruk bölümü, plazma membranı dışarıda kalacak şekilde, oosit sitoplazmasına girer.

Spermin oosit sitoplazmasına girmesiyle ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde bekleyen oosit, bu bölünmeyi tamamlar ve olgun oosit ile ikinci kutup cisimi oluşur. Bundan sonra oositin nükleusuna dışı pronükleusu denir. Oosit sitoplazmasındaki spermin nükleusu ise genişleyerek erkek pronükleusu oluşturur.

Her iki pronükleus kendi DNA larını replike ettikten sonra maternal ve paternal kromozomlar kaynaşır ve mitotik hücre bölünmesi için düzenlenir (13). Fertilize olan oosit veya zigot tek hücreli embriyodur (14).

4.1.3. Zigotun Yarıklanması

Fertilize olan oosit, tuba uterina içinde ilerlerken, yarıklanma adı verilen bir seri hücre bölünmesine uğrar ve hücre sayısı giderek artar. Her yarıklanma bölünmesi sonrasında, hacmi giderek küçülen bu hücrelere blastomer denir (13). Zigotun blastomere bölünmesi, fertilizasyondan yaklaşık 30 saat sonra başlar (14). Dokuz hücreli evreden sonra blastomerlerin şekli değişmeye başlar ve birbirlerine sağlam bağlarla tutunan kompakt bir hücre topu halini alır. Kompaksiyon denilen bu süreçle iç hücre kümesi dış hücrelerden ayrılır. Fertilizasyondan 3 gün sonra hücre sayısı 12–15 blastomere ulaştığında, embriyo morula adını alır. Morulanın içindeki hücreleri iç hücre kitlesini, dış hücreler de dış hücre kitlesini oluşturur.

Morula uterusu girdiğinde uterus boşluğundaki sıvı iç hücre kitlesinin hücrelerarası boşluğunda toplanmaya başlar. Bu boşlukların genişleyip birleşmesiyle blastosel denilen tek bir boşluk oluşur. Bu dönemdeki embriyo blastosist adını alır. Blastosistin bir kutbuna yerleşmiş iç hücre kitlesi embriyoblast, dış hücre kitlesi trofoblast adını alır. Blastosist, uterus salgısı içinde yaklaşık 2 gün kaldıktan sonra zona pellusidanın kaybolması, blastosistin hızla büyümesine ve implante olmasına olanak verir.

4.1.4. İmplantasyon

İmplantasyon, insanlarda normal olarak embriyonun blastosist aşamasında gerçekleşir. Fertilizasyondan yaklaşık 6 gün sonra, blastosist iç hücre kitlesine komşu trofoblastlar sekretuar fazdaki endometriyum epiteline tutunmaya başlar. Yaklaşık 8 gün sonra blastosist endometriyum içine kısmen gömülür. Trofoblastlar içte tek nukleuslu sitotrofoblastlar ve dışta çok nukleuslu sinsityotrofoblastlar olmak üzere iki tabakaya ayrılır ve bu aşamada endometriyum içerisine tamamen yerleşir (1).

4.2. İNFERTİLİTE VE ÜREMEYE YARDIMCI TEDAVİ YÖNTEMLERİ

İnfertilite, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre sonunda gebe kalınamaması olarak tanımlanır. YÜT tıbbi ve cerrahi yöntemlerle gebeliğin elde edilemediği hastalarda gebelik elde edilmesi için başvurulan uygulamalardır.

Tarihi gelişim içerisinde standart IVF ilk olarak kadında bilateral tubal blok olması nedeniyle infertilite problemi olan çiftlere uygulanmıştır (18). Standart IVF için kullanılacak sperm laboratuvarında işleminden geçirildikten sonra en hareketlileri seçildiği ve oosit başına kullanılacak sperm sayısı az olduğu için erkek subfertilitesinde de kullanımına başlanmıştır (19).

Klasik IVF de fertilizasyonun gerçekleşmediği şiddetli erkek infertilitesi olguları için yeni arayışlara girilmiş ve farklı mikromanipülasyon teknikleri uygulanmaya başlanmıştır:

Zona Drilling ve Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD): Zonada bir açıklık meydana getirildikten sonra klasik IVF deki gibi inseminasyonun yapılmasıdır.

Subzonal İnseminasyon (SUZİ): Spermilerin zona pellusidayı aşmasına gerek kalmaksızın doğrudan perivitellin aralığa bırakılmasıdır.

Mikroenjeksiyon (ICSI): Tek bir sperm mekanik yolla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesidir (18).

4.3. İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (ICSI) VE SONRASINDA DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER

4.3.1. ICSI

IVF, oosit ve sperm insan vücudu dışında in vitro ortamda birleştirilerek fertilizasyonun sağlanması ve gelişen embriyoların uterusu yerleştirilmesi işlemidir (1). Semen analizi sonuçlarına göre konsantrasyon, motilite ve morfoloji değerleri düşük olduğu halde in vitro koşullarda oositi dölleyebilme yeteneğinde sperm sahne sahip olan hastalara IVF yöntemi uygulanır (20). ICSI şiddetli erkek infertilitesi çözümü için

geliştirilen bir yardımcı üreme tekniğidir (21). Daha önceki konvansiyonel IVF uygulamalarında düşük fertilizasyon gözlenen ileri derecede anormal semen parametrelerine sahip, epididimden veya testisten cerrahi yöntemlerle elde edilen spermelerin kullanıldığı işlemlerde ve ileri kadın yaşı, oosit sayısının az olması gibi düşük fertilizasyon riski taşıyan hastalarda ICSI işlemi tercih edilir (1, 4).

ICSI tek bir sperm hücrenin zona pellusida ve oolemmayı atlayarak, direkt olarak oosit sitoplazmasına enjeksiyonu işlemidir. ICSI, erkekten kaynaklanan infertiliteyi tedavide uygulanan en güçlü mikromanipülasyon tekniğidir (4). Fazla sayıda oosit elde edebilmek için hastaya göre en uygun ovulasyon indüksiyon protokolü uygulanır. Folikül boyutu oosit matürasyonu için yeterli seviyeye ulaştığında ve östrojen miktarı istenilen düzeye geldiğinde insan koryonik gonadotropin (hCG) enjeksiyonu ile ovulasyon tetiklenir (1). Enjeksiyon uygulamasından 36 saat sonra vajinal yolla ultrasonografi eşliğinde oositler toplanır. Toplanan oositler etrafındaki kümülüs ve granüloza hücrelerinden arındırılır. Oositleri soyma işlemi denilen bu uygulamadan sonra olgun olan metafaz II evresindeki oositler aynı gün erkekten alınan semenin yıkanmasıyla elde edilen spermle birleştirilir (4). Uygun semen yıkama yöntemiyle semen yıkanarak ICSI işleminde kullanılmak üzere hareketli ve kaliteli sperm elde edilir. Spermlerden biri enjeksiyon pipetinin içine alınarak, tutucu pipetle sabitlenen oositin sitoplazmasına bırakılır. Bu işlemden 16-18 saat sonra dişi ve erkeğe ait iki pronukleusun görülmesiyle karakterize olan fertilizasyon kontrolü yapılır. Enjeksiyondan yaklaşık 24 saat sonra embriyo ilk hücre bölünmesini gerçekleştirir ve iki blastomerli embriyo oluşur. İn vitro ortamda takip edilen embriyolar 2. gün 4 blastomerli, 3 gün 8 blastomerli embriyo haline gelir. 4. gün blastomerlerin sayılmadığı kompakt bir görünüm alır ve 5. günde de blastosist evresine ulaşır (22).

4.3.2. ICSI Sonrası Embriyo Değerlendirme Parametreleri

YÜT uygulamalarında kullanılan ovaryan stimülasyon protokolleri fazla sayıda oosit ve sonuçta da fazla sayıda embriyo elde edilmesine neden olmaktadır (2). Gebe kalma olasılığını arttırmak için çok sayıda embriyonun transfer edilmesi de istenmeyen çoğul gebeliklere yol açmaktadır (3). Amaç implantasyon için en fazla potansiyele sahip embriyoları seçip, transfer edilecek embriyo sayısını azaltmaktır. Bu da elde edilen çok

sayıda embriyodan hangilerinin seçilip transfer edileceği sorununu beraberinde getirmektedir. Bu problemi çözmek için her bir embriyonun kalitesini belirleyip yaşama potansiyeli yüksek embriyoların transferini yapmak gerekmektedir. Bu nedenle embriyoların morfolojileri ve kültürde gelişim oranları değerlendirilmektedir (4).

Embriyoların gelişimlerinin ve diğer embriyolarla arasındaki farklılıkların belirlenmesi için kritik zaman noktalarında gözlenmesi gerekmektedir (5). Mc Kiernan ve Bavister'in en doğru zamanın belirlenmesi için yaptıkları çalışmada aynı zaman diliminde 8 hücre olan embriyo ile olmayan embriyo karşılaştırılmıştır. 8 hücre aşamasına gelen embriyonun blastosist oluşturma ve transfer sonrası canlılık ihtimalinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (23). Rastgele zamanlarda yapılan kontroller de yanlış yönlendirici olabilmektedir. İkinci gün sabah dört hücre olan embriyo ile öğleden sonra dört hücre olan embriyonun gelişimi aynı kabul edilmemelidir (5).

Transfer için embriyo seçerken kritik zaman noktalarında farklı evredeki embriyoların morfolojileri değerlendirilmektedir. Mikroskop altında embriyonun morfolojik özelliklerine bakarak canlılığın belirlenmesi en çok kullanılan seçim kriteridir. Bu parametreler embriyonun farklı evrelerinde değerlendirilir.

4.3.2.1. Pronuklear Değerlendirme

Embriyonun zigot dönemi değerlendirmesidir. Embriyo gelişimi ve kalitesi pronuklear evre embriyosuna bakılarak tahmin edilebilmektedir.

Fertilize olan zigotlarda pronukleusların (PN) pozisyonu ve boyutu değerlendirilir. Mikroenjeksiyon ya da inseminasyon işleminden 16-18 saat sonra, oosit sitoplazmasının ortasında erkek pronukleus, ikinci kutup cisimciğine (Polar Body, PB) yakın bir yerde ise dişi pronukleus oluşmaya başlar. Dişi pronukleus erkek pronukleusla yan yana gelene kadar ilerler (24). Ooplazmada 2 pronukleusun varlığı, oositin fertilize olduğunu gösterir. Yapılan çalışmalar, pronuklear evre embriyosunun normal olarak değerlendirilebilmesi için her iki pronukleusun sitoplazmada merkezi pozisyonda, birbirine yakın ve eşit büyüklükte olması gerektiğini göstermektedir (25). PN morfolojisindeki belirli bazı düzensizliklerin, embriyonun kromozomal yapısı ve anöplidi oranları ile ilgili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (26).

Her bir pronukleusta bulunan ve embriyoların implantasyonunu sağlayan çekirdekçik öncül cisimciklerin (Nucleolar Precursor Body, NPB) sayısı, şekli ve dağılımı değerlendirilir (25, 27). Yapılan çalışmalar her iki pronukleustaki çekirdekçik öncül cisimciklerin eşit sayıda ve aynı biçimde düzenlenmelerinin yüksek implantasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (27).

Kutup cisimciklerinin yerleşimi ve pronukleustalarla yaptıkları açı da pronuklear değerlendirme kriterleri arasındadır. Pronukleustaların orta eksenlerinden geçen çizginin ikinci kutup cisimciğı ile yaptığı açı “ β ” açısıdır. Bu açının artmasıyla, ileri evre embriyo kalitesinin azaldığı gösterilmiştir (28).

Pronuklear evrede sitoplazmik halonun varlığı da değerlendirilir. Sitoplazmik halo, sitoplazmanın merkezi bölgesinde daha yoğun, periferik bölgede ise daha az yoğun bölge görünümünü ile karakterizedir (29).

Pronuklear evre değerlendirilmesinde kullanılan farklı skorlama sistemleri mevcuttur (25, 30, 31, 32, 33). Sık kullanılan skorlama sistemlerinden biri olan Tesarik ve Greco'nun, 1999'da önerdiği skorlama sistemi Şekil 1'de gösterilmiştir.

Bu skorlama sistemine göre; (25).

Pattern 0 (P0): Pronukleustaların 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. Pronukleustadaki NPB sayısı üçten az değildir.

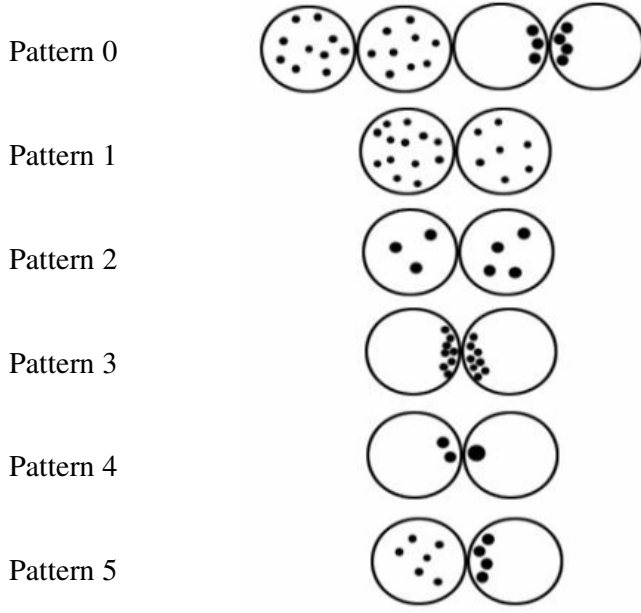
Pattern 1 (P1): Her iki pronukleustaki NPB sayıları arasında fazla (>3) fark vardır.

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

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

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

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



Şekil 1: Tesarik ve Greco'nun pronuklear evre skorlama sistemi (25)

4.3.2.2. Bölünme Evresi Değerlendirmesi

Transfer için yüksek implantasyon potansiyeline sahip embriyoları seçebilmek için, pronuklear evre ile birlikte bölünme evresi de değerlendirilmelidir. Bölünme evresinde erken bölünmenin varlığı ve daha sonra bölünme hızı, blastomer boyutu, fragmentasyon oranı, blastomerlerin nuklear durumu, sitoplazmik görüntü, perivitellin alan ve zona pellusida özellikleri değerlendirilmektedir.

Bu süreçte en kritik faktör, embriyoları karşılaştırmak için en uygun zaman noktalarını belirlemektir.

Erken Bölünme

İnseminasyon veya mikroenjeksiyondan sonraki 25. saat, kritik zaman noktası olarak kullanılmaktadır. 25. saatte iki hücreye bölünmüş embriyo erken bölünmüş embriyo olarak adlandırılır (34). İki hücreli embriyo, Resim 1'de görüldüğü gibi 2 eliptik hücre ve blastomerlerin bölünme eksenlerinden geçen 2. kutup cisimciği ile karakterizedir (35).

Yapılan araştırmalar erken bölünen embriyoların daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir (11, 34, 37). 2 hücreye erken

bölünmenin embriyo seçim kriterleri arasındaki önemini vurgulayan başka bir çalışmada Saluments ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Tek embriyo transferinde erken bölünen embriyonun transfer edilmesiyle, daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir. Erken bölünen embriyoların transfer edildiği grupta gebelik oranı %50 iken, erken bölünme gözlenmeyen grupta gebelik oranı %26.4 olarak saptanmıştır (37).



Resim 1: 25. saatte erken bölünme gözlenen 2 hücreli bir embriyo, X400

Çeşitli çalışmalarda inseminasyondan sonraki 25-27. saatte 2 hücreye bölünen embriyolardan, daha yüksek embriyo kalitesi ve bölünme hızına sahip embriyo elde edildiği gözlenmiştir (36, 37).

Bu verilere dayanarak, transfer edilecek embriyoların seçiminde, fertilize olmuş oositin ilk hücre bölünme zamanı önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir.

Embriyo Bölünme Hızı

Bölünmenin zamanında gerçekleşmesi ve sürekli olması embriyonun canlılığını gösteren önemli bir özelliktir. Embriyonun, 1. günden itibaren sırasıyla 2, 4 ve 8'e bölünmesi tüm hücrelerin yaşadığının en önemli göstergesidir. 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 (38, 39).

Normal bölünen bir embriyonun, fertilizasyonu takiben 2. günde (42-44. saat) 4-5 blastomer ve 3. günde (66-68. saat) en az 7 blastomere sahip olması gerekmektedir (40).

Embriyo Kalitesi

Embriyo kalitesi değerlendirilirken, blastomerlerin biçim ve büyüklüğü sitoplazmik özellikleri ve fragmantasyon oranı gibi özellikler dikkate alınır. Embriyolar bütün bu özelliklerin birlikte değerlendirdiği çeşitli embriyo kriterlerine göre sınıflandırılırlar (38).

Eşit olmayan hücresel bölünme, embriyo kalitesi ve gelişim kapasitesi ile ilgili bilgi veren önemli parametredir. Yapılan çalışmalar, eşit bölünmeyen embriyoların transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir (41).

Blastomer boyutuyla birlikte embriyo fragmantasyonu da embriyo kalitesi belirlenirken değerlendirilmelidir. Yapılan çalışmalar, fragmantasyon içeren embriyoların ikinci gün transfer edilmesiyle düşük implantasyon oranları elde edildiğini göstermiştir (41). Embriyo kalitesi, ICSI başarısını etkileyen önemli bir faktördür çünkü iyi kalitedeki embriyoların gelişim potansiyeli daha yüksek olacağından implantasyon ve gebelik şansları da daha yüksek olacaktır (38).

Embriyoların değerlendirilmesi sırasında blastomerlerin sitoplazmik özellikleri de değerlendirilmelidir. Embriyo blastomerlerinin sitoplazması açık renkli, şeffaf ya da hafif granülasyona sahipse, normal olarak değerlendirilir (42).

Perivitellin alandaki genişlik, darlık ve inklüzyonlar not edilmelidir. Ayrıca zona pellusida yapısı ve kalınlığı da değerlendirilmelidir.

Transfer edilecek embriyonun seçiminde kullanılan diğer bir morfolojik parametre ise blastomerlerde gözlenen multinukleasyondur. Blastomer multinukleasyonu, bir blastomerin içinde fragmante olmuş çok sayıda nukleusun bulunması ile karakterizedir. Multinukleasyon gözlenen embriyolarda implantasyon oranının düşük olduğu saptanmıştır (43).

4.3.2.3. Blastosist Evresinde Embriyo Değerlendirmesi

Bölünme evresinde olduğu gibi blastosist morfolojisini değerlendirmede de zaman büyük öneme sahiptir.

Blastosist evresinde embriyonun genişlemesi, iç hücre kitlesi ve trofoektoderm hücrelerinin yoğunluğu ve düzeni değerlendirilir. İyi kalitede bir blastosistin, inseminasyondan yaklaşık 106-108 saat sonra geniş bir blastosele, belirgin bir iç hücre kitlesine ve birbirine düzgün bağlanmış trofoektoderm hücrelerine sahip olması gerekmektedir (44). Gardner ve arkadaşları kaliteli bir blastosistin implantasyon ve gebelik oranlarını olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir (45).

Transfer edilecek embriyoların seçiminde uzun zamandır bölünme evresi embriyoları tercih edilirken, geliştirilmiş kültür mediumlarının kullanıma başlanmasıyla blastosist evresi embriyoları da tercih edilmeye başlanmıştır. Blastosist transferinin, implantasyon potansiyeli en yüksek embriyoların seçimine olanak sağladığı halde (46), inseminasyon sonrası fertilize olan oositlerden yalnızca %40-50'sinin blastosist evresine kadar ulaşabildiği ve bunların da sadece %30-50'sinin implante olabildiği gösterilmiştir (47).

IVF ya da ICSI sonrası embriyoların transferinde, implantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyoların seçilebilmesi için gamet morfolojisi, pronuklear evre ve erken bölünme evresi gibi tüm morfolojik değerlendirme kriterlerinin birlikte değerlendirilmesi daha faydalıdır. Böylece laboratuvar verimliliği artırılabilir ve daha az sayıda embriyo transfer edilmesine bağlı olarak çoğul gebelik oranları azaltılabilmektedir (48).

Uygun embriyo seçildikten sonra 2., 3., 4. ya da 5. gün anne adayının uterusuna bir katater yardımıyla yerleştirilir (39). Transfer işleminden 12 gün sonra kanda β -hCG değeri ölçülerek gebelik olup oluşmadığı kontrol edilir (20).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
Pure Sperm	Nidacon	PS100-10
G-Sperm plus	Vitrolife	10107
G-Mops	Vitrolife	10068
G-Mops plus	Vitrolife	10108
G1.3 plus	Vitrolife	10104
G2.3 plus	Vitrolife	10105
Hyase 10X	Vitrolife	10017
ICSI 100	Vitrolife	10016
Ovoil	Vitrolife	10026

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışmaya çocuk sahibi olmak için Ocak 2006- Eylül 2007 arasında Ferticenter Tüp Bebek Merkezi'ne başvurup ICSI programına alınan 202 hasta dahil edildi. Çalışmanın amacı ICSI'den 25-27 saat sonra gerçekleşen erken embriyo bölünmesinin, transfer edilecek en iyi embriyonun seçim sürecinde kullanılmasıdır. 21-36 yaş arası hastalar transfer edilecek erken bölünen ve bölünmeyen embriyoların varlığına göre iki gruba ayrıldı. 1. grup en az bir tane erken bölünen embriyo transferi yapılan 109 hastadan, 2. grup ise erken bölünmeyen embriyolarla transferi yapılan 93 hastadan oluşturuldu. İki grup arasında embriyo elde etme oranı, erken bölünen ve bölünmeyen embriyoların kalitesi, bölünme hızı ve gebelik durumları karşılaştırıldı.

5.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER

Kliniğimize başvuran çiftlerden ilk olarak erkek partnere spermiyogram testi uygulandı. Kadın partnere ise birden fazla oosit elde edebilmek amacıyla ovaryan stimülasyon uygulandı.

Ovaryan Stimülasyon

Ovaryan stimülasyon, GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) analogları ile insan menopozal gonadotropinleri veya FSH'nın (folikül stimulan hormon) birlikte kullanımlarını içeren protokol ile gerçekleştirildi. Overlerin tedaviye yanıtı, ultrason taramaları ve serum östradiol seviyelerinin ölçülmesiyle takip edildi. Foliküller en az 18 mm çapına ulaştıklarında ve östrojen seviyesi istenilen seviyeye geldiğinde hCG (insan koryonik gonadotropini) enjeksiyonu uygulandı. HCG enjeksiyonundan sonraki 36. saatte oositler toplandı.

Semen Analizi

3-5 günlük cinsel perhiz süresinin ardından mastürbasyon yoluyla steril örnek kabına (Falcon 4013) verilen semen, 37°C'lik inkübatörde 10-15 dakika likefiye olana

kadar bekletildi. Semen steril tüplere (Falcon 2095) boşaltılarak tüpün üzerinden hacim belirlendi.

Likefiye olmuş semen örneğinden 10 µl makler sayma kamarasına koyulup, faz kontrast mikroskobunda (Nikon E-400) 20X objektif altında tüm karelerdeki (100 adet) spermeler sayıldı ve sonuç 10'a bölünerek mil/ml olarak konsantrasyon belirlendi.

10 µl semen otomatik pipet ile lama koyulup üzerine 24x24 lamel kapatıldı. 40X objektif ile en az 4 mikroskop alanında 100 sperm incelendi. Motilite A, B, C, D olarak sınıflandırılarak motilite yüzdesi belirlendi. İleri ve hızlı spermeler "A motil", ileri ve yavaş spermeler "B motil", yerinde hareketli spermeler "C motil" ve hareketsiz spermeler "D motil" olarak değerlendirildi. Total motilite A, B ve C motiliteye sahip sperm oranları toplanarak elde edildi.

5.4. ICSI

0. Gün

İşlem günü kadının oositleri toplanırken erkekten alınan sperm önce sayısal olarak değerlendirildi. Daha sonra da ICSI işleminde kullanılmak üzere yıkandı.

ICSI İşleminde Kullanılmak Üzere Semen Örneğinin Yıkınması

Semenin 1 ml'sine 1 tüp olacak şekilde "density gradient" tüpü hazırlandı. Density gradient tüpünü hazırlamak için Falcon 2095 tüpüne 1 ml %90'lık Pure sperm solüsyonu koyuldu. Üzerine 1 ml %45'lik Pure sperm solüsyonu gradientlerin birbirine karışmaması için çok yavaşça koyulup iki gradientin üzerine 1 ml semen örneği yavaşça ilave edildi. 1300 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Tüpün pelletinden steril pipet ucu ile 400 µl alınarak başka bir tüpte toplandı. Bunun üzerine 3 ml'ye kadar bir gün önce CO₂'li inkübatöre koyulmuş G-Sperm plus solüsyonu eklendi ve 2200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 0,5 ml'ye kadar steril serolojik pipetle (Falcon 7543) alınıp, tüpte kalan pellete aynı işlem bir kere daha tekrar edildi. Örneğin dibinde, spermin konsantrasyonuna göre istenen hacimde pellet bırakılıp karıştırıldı.

Yıkama öncesinde uygulanan yöntemler kullanılarak yıkama sonrası motilite ve konsantrasyon değerleri belirlendi. Yıkama sonrası sperm konsantrasyonu, bulunan sonucun tüpün dibinde bırakılan pellet miktarı ile çarpılmasıyla elde edildi.

Çalışmamıza dahil edilen tüm hastalarda ICSI işleminde kullanılmak üzere sperm hazırlanırken, yıkama sonrası istenen oranda sperm konsantrasyonlarını elde edebilmek için pellete G-Sperm eklendi. Tüm hastalarda yıkama sonrası sperm konsantrasyonları benzer olacak şekilde ayarlandı.

Oosit Toplama (OPU) İşlemi

HCG enjeksiyonundan sonraki 36. saatte oositler transvajinal olarak ultrasonografi eşliğinde ve yıkama mediumu olarak G-Mops kullanılarak toplandı. 13 ml'lik tüplere (Falcon 2001) toplanmış olan foliküler sıvıda embriyoloji laboratuvarında stereo mikroskop altında oosit arandı. Bulunan oositler önce G-Mops plus (Vitrolife, İsveç) medyumunda yıkandı ve G 1.3 plus (Vitrolife, İsveç) koyulup üzerleri Ovoil (Vitrolife, İsveç) ile kaplanan Nunc multidish tabağının 1. kuyusuna işlem bittiğinde 2. sonra da 3. kuyuya geçirilerek yıkandı. Toplanan oositler 1-2 saat 37°C'lik, %5 CO₂ içeren ve %90 nem ortamı sağlayan inkübatörde (Heraeus BB6220, Almanya) bekletildi (49).

Oosit Soyma İşlemi

Oositler toplama işleminden sonra olgun olup olmadıklarının değerlendirmesi ve mikroenjeksiyon işlemi sırasında oositin uygun pozisyonda tutulabilmesi için bir dizi soyma işleminden geçirildi. Bu amaçla hyalüronidaz enzimi (Hyase 10X, Vitrolife, İsveç) kullanıldı.

Hyase-10X'e önceden ısıtılan 900 µl G-Mops eklendi. Oositler hyase içinde en fazla 30 saniye pipete alınıp verilerek etrafındaki kümülüs hücrelerinin bir kısmı temizlendi. Enzimatik soyma işleminden sonra oositler tüm hücreler temizleninceye kadar sırasıyla 170 µm, sonra 140 µm çaplı denuding pipete (Cook K-FPIP 1170, K-FPIP-1140, İrlanda) alınıp verilerek mekanik soyma işlemi tamamlandı ve bir gece önceden G 1.3 plus medyumuna ile hazırlanan kültür tabağına alındı. Soyulan oositlerin olgun olup olmadıkları inverted mikroskopta 40X objektifte değerlendirildi.

Oositin Olgunluğunun Değerlendirilmesi

Kutup cisimciği olan olgun oositler Metafaz II (MII), kutup cisimciğini atmamış tek hücre görünümünde olan olgunlaşmamış oositler Metafaz I (MI) olarak değerlendirildi. Metafaz I oositler ilk 4 saat içinde kutup cisimciğini attıklarında ICSI işlemine dahil edildi. Kutup cisimciği olmayan ve germinal vesikül görülenler olgun olmadıkları için ICSI işleminde kullanılmadı (49).

Mikroenjeksiyon

Oositler soyulduktan sonra olgun olanlar (MII) ve 4 saat içinde olgunlaşan metafaz I (MI) oositlere, Van Steirteghem ve arkadaşlarının protokolüne uygun olarak mikroenjeksiyon işlemi yapıldı (49). Bunun için mikroenjeksiyon işleminde kullanılmak üzere enjeksiyon tabağı hazırlandı. Kültür tabağına (Falcon 1006, Fransa) G-Mops plus (Vitrolife, İsveç) mediumu ile merkeze bir, çevresine 8-10 adet damla yapıldı ve üzeri Ovoil (Vitrolife, İsveç) ile kaplandı. Orta damladaki medium pipetle alınıp atıldı ve yerine visköz yapısından dolayı spermleri yavaşlatan polivinilpirolidon (PVP) (ICSI-100, Vitrolife, İsveç) koyuldu. PVP içine daha önceden yıkanmış sperm solüsyonundan 1-2 µl ilave edildi. Etrafındaki damlalara ise, her damlaya bir tane gelecek şekilde oositler yerleştirildi.

Mikroenjeksiyon işlemi, Hoffman modülasyonu ve Narishige mikroenjeksiyon ünitesi ataşmanlı inverted mikroskopta (Nikon Eclipse TE 300, Japonya) ısıtıcı tabla üzerinde, 40X objektif altında ve bir enjeksiyon pipeti (Cook, K-MPIP 1035, İrlanda) ile bir tutucu pipet (Cook, K-HPIP-1035, İrlanda) kullanılarak gerçekleştirildi. Enjeksiyon pipeti ile kuyruğu kırılan sperm, kuyruk tarafından enjeksiyon pipetine çekildi. Oosit, tutucu pipet yardımıyla kutup cisimciği saat 3 ya da 6 hizasında kalacak şekilde sabitlendi ve sperm, enjeksiyon pipeti yardımıyla oositin sitoplazmasına bırakıldı. Enjekte edilmiş oositler bir gece önceden G 1.3 plus medyumumu ile hazırlanan kültür tabağına (Falcon 3801, BD, Fransa) alındı ve inkübatöre kaldırıldı (49).

1. Gün

Pronuklear Değerlendirme (Fertilizasyon Takibi)

Mikroenjeksiyondan 16-20 saat sonra inverted mikroskopta pronukleus sayısı, pozisyonu ve boyutu, PB sayısı ve NPB'leri not edilerek fertilizasyon değerlendirildi. Oositlerin sitoplazmasında 2 pronukleus ve 2 PB görülmesi fertilizasyon bulgusu olarak değerlendirildi (50). Bu takip için Tesarik ve Greco'nun skorlama sistemi kullanıldı (25).

Bölünme Evresi Takibi

Erken Bölünme

Mikroenjeksiyondan sonraki 25-27. saatte erken bölünme varlığı açısından değerlendirildi. Mikroenjeksiyondan 16-20 saat sonra fertilize olan oosit, 25-27. saatte 2 hücreye bölünmüşse erken bölünen embriyo olarak değerlendirildi. 2 hücreye bölünmeyenler erken bölünmemiş embriyo olarak kabul edildi.

2. Gün

Embriyo değerlendirmesi yaparken kullanılan skorlama sisteminde 2. ve 3. gün embriyoların bölünme hızı ve kalitesi değerlendirildi. Embriyo bölünme hızı değerlendirilirken 2. gün blastomer sayısı 4 ve dörtten fazla olan embriyolar normal, dörtten az blastomeri olan embriyolar anormal bölünmüş embriyo olarak değerlendirildi (40, 50). Kalite değerlendirilmesi için kullanılan skorlama sistemine göre;

1. Kalite Embriyo: Blastomerler eşit büyüklükte, fragmentasyon oranı %20'den az ve blastomerlerde multinukleasyon yok
2. Kalite Embriyo: Blastomerler eşit büyüklükte, fragmentasyon oranı %20'den fazla
3. Kalite Embriyo: Blastomerler eşit büyüklükte değil, fragmentasyon oranı %50'den fazla
4. Kalite Embriyo: Blastomer büyüklüğü, sayısı ve fragmentasyon oranı ayırtedilemiyor şeklinde değerlendirildi (1).

3. Gün

Embriyo bölünme hızı değerlendirilirken blastomer sayısı 8 ya da 8'den fazla olan embriyolar normal, 8'den az blastomeri olan embriyolar anormal bölünmüş embriyo olarak değerlendirildi (40,50). Kalite değerlendirilmesi için ikinci gün uygulanan skorlama sistemi kullanıldı (1).

Blastomerlerde nukleusların olup olmadığı, birden fazla nukleusu olup olmadığı not edildi. Transfere uygun embriyolar forma işaretlendi.

Çalışmamızda transfer günü normal sayıda blastomeri olan 1. kalitedeki embriyolar iyi gelişen embriyo olarak kabul edildi.

Transfer

Anne yaşı, daha önceki deneme sayısı, embriyoların kalitesi, bölünme hızları ve embriyo sayısı göz önüne alınarak uygun olan embriyolar 2. ya da 3. gün anne adayının uterusuna yerleştirildi. Transfer yapılmasına karar verilen günden bir gün önce G2.3 plus transfer mediumu hazırlanırdı.

Transfer günü seçilen embriyolar aynı medium damlasında toplandı. Yine aynı medium ile yıkanmış enjektör ve ucuna takılmış embriyo transfer kateterine (Edwards-Wallace Emb. Rep. Cat., İngiltere) yüklenerek anne adayının uterusuna yerleştirildi.

Gebelik

Transfer işleminden 12 gün sonra kanda belirlenen ≥ 20 mIU/mL β -hCG değeri ve 2 gün sonra tekrarında en az iki katına çıkmış olan β -hCG değeri, çalışmamızda gebelik olarak değerlendirildi.

5.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken, çalışma grupları yaş ortalaması student t-testi ile hesaplandı. Grup ayrımı yapılmaksızın tüm embriyolar değerlendirildiğinde embriyo bölünme hızı oranları ve embriyo kalite oranları Wilcoxon Signed Ranks Test ile belirlendi. Gruplar arası gebelik oranlarının karşılaştırılmasında Chi-Square Test kullanıldı. Anlamlılık sınırı $P < 0.005$ olarak alındı.

6. BULGULAR

Çalışma, yaşları 21-36 arasında değişen toplam 202 olgu üzerine yapıldı. Olgular transfer edilecek erken bölünen ve bölünmeyen embrioların varlığına göre iki gruba ayrıldı. I. grup en az bir tane erken bölünen embriyo transferi yapılan 109 hastadan, II. grup ise erken bölünmeyen embriyolarla transferi yapılan 93 hastadan oluşturuldu.

Bu çalışmada OPU sonrası oositler ve ICSI sonrası parametreler değerlendirildi. Çalışmamızda toplam 202 hastadan 2391 adet oosit toplandı ve bu oositlerden olgun olan (Resim 2) 2003 tanesinde ICSI işlemi gerçekleştirildi.



Resim 2: Olgularımızdan birine ait olgun oosit, X400

ICSI işleminden sonra oositlerden % 80.66'sı fertilize oldu. Oositin fertilize olduğu sitoplazmasında 2 pronukleus ve 2 kutup cisimciği varlığı ile belirlendi (Resim 3).



Resim 3: Olgularımızdan birine ait fertilize olan oosit, X400

Fertilize olan oositlerin % 30.12'si erken bölündü. 25. saatte 2 hücreye bölünmüş embriyo erken bölünen embriyo olarak belirlendi (Resim 4).



Resim 4: Olgularımızdan birine ait erken bölünen embriyo, X400

Bulgular dikkate alınarak erken bölünmenin ICSI parametreleri üzerine olası etkileri değerlendirildi. Bu parametreler embriyo elde etme oranı, embriyo kalitesi, embriyo bölünme hızı ve gebelik oranıdır.

Çalışma grupları arasında sonuçları etkileyebilecek faktörlerden olan sperm konsantrasyonu ve kadın yaşı benzer değerlere sahip bireylerden oluşturuldu.

Grupların yaş ortalamaları I. grup için 30.52 (± 4.16), II. grup için ise 31.18 (± 3.84) olarak belirlendi (Tablo 1).

	Grup I	Grup II
Yaş (ort \pm S.D)	30.52 \pm 4.16	31.18 \pm 3.84

Tablo 1: Yaş ortalamasının gruplara göre dağılımı

Grupların OPU günü toplanan oosit (COC) sayıları ile olgun oosit (MII) sayıları ve ICSI sonrası fertilize olan oosit sayıları, embriyo sayıları ve transfer edilen ortama embriyo sayıları Tablo 2’de gösterilmektedir.

	Grup I	Grup II
Siklus sayısı	109	93
Toplanan oosit sayısı (ortalama \pm S.D.)	1335 (12.24 \pm 7.02)	1056 (11.35 \pm 6.05)
Olgun oosit sayısı (ortalama \pm S.D.)	1159 (10.63 \pm 6.39)	844 (9.07 \pm 4.45)
Fertilize olan oosit sayısı (ortalama \pm S.D.)	924 (8.47 \pm 5.02)	657 (7.06 \pm 3.53)
Embriyo sayısı (ortalama \pm S.D.)	898 (8.23 \pm 4.70)	636 (6.83 \pm 3.44)
Transfer edilen ortalama embriyo sayısı \pm S.D.	2.73 \pm 0.50	2.81 \pm 0.48

Tablo 2: Toplanan oosit sayısı, olgun oosit sayısı, fertilize olan oosit sayısı, embriyo sayısı ve transfer edilen ortalama embriyo sayısı parametrelerinin gruplara göre dağılımı

Embriyo Elde Etme Oranı

Grupların ICSI sonrasında elde edilen embriyo oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.052$). I. grupta ortalama 8.23 (± 4.70) embriyo, II. grupta ise 6.83 (± 3.44) embriyo elde edildi (Tablo 2).

Çalışmaya katılan tüm hastalardan toplam 1534 adet embriyo elde edildi. Bu embriyoların 479 tanesi 25. saatte 2 hücreye bölündü ve erken bölünen embriyo olarak değerlendirildi. Erken bölünmeyen embriyo sayısı 1055 olarak belirlendi (Tablo 3).

	Grup I + Grup II (N:202)
Toplam embriyo sayısı (ort \pm S.D.)	1534 (7.59 \pm 4.22)
Erken bölünen embriyo sayısı (ort \pm S.D.)	479 (2.37 \pm 2.83)
Erken bölünmeyen embriyo sayısı (ort \pm S.D.)	1055 (5.22 \pm 3.73)

Tablo 3: Tüm gruplardaki toplam ve ortalama embriyo sayısı ile tüm gruplardaki erken bölünen ve erken bölünmeyen embriyo sayısı ve ortalaması

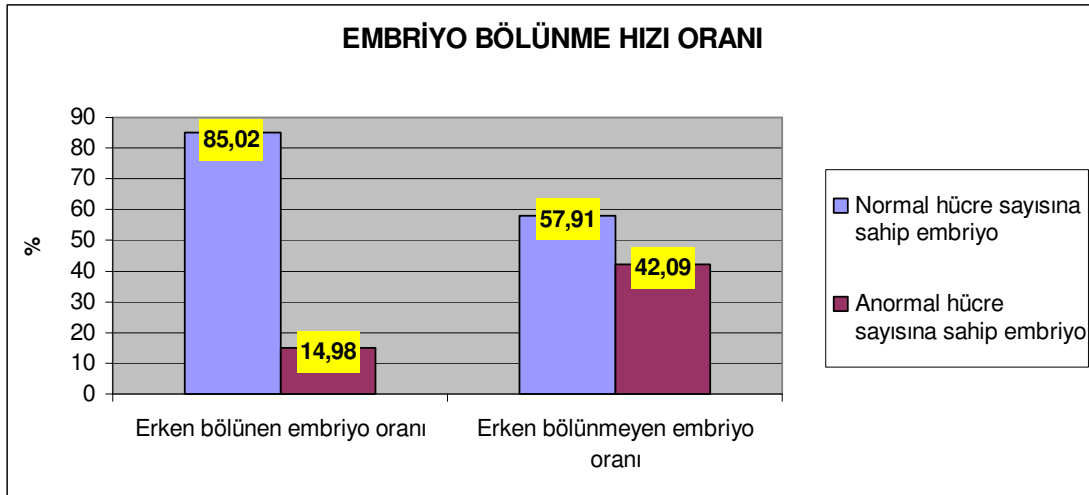
Embriyo Bölünme Hızı Oranları

Erken bölünen embriyodan gelişen embriyonun bölünme hızı, erken bölünmeyen embriyoya göre istatistiksel olarak anlamlı fark gösteriyordu (Tablo 4).

Erken bölünen 479 embriyonun %85.02'sinden normal hücre sayısına sahip embriyo (Resim 5, 7) gelişirken, %14.98'inden anormal embriyo (Resim 6, 8) gelişti. Erken bölünmeyen 1055 embriyonun %57.91'inden hücre sayısı normal embriyo gelişirken, %42.09'undan anormal embriyo gelişti (Şekil 2).

	Erken Bölünen Embriyo *	Erken Bölünmeyen Embriyo *	p
Toplam embriyo sayısı	479	1055	
Normal hücre sayısına sahip embriyo sayısı (oranı)	394 (%85.02 ± 24.70)	598 (%57.91 ± 32.04)	0,000
Anormal hücre sayısına sahip embriyo sayısı (oranı)	85 (%14.98 ± 24.70)	457 (%42.09 ± 32.04)	0,000

Tablo 4: Erken bölünen ve bölünmeyen embriyodan gelişen embriyoların bölünme hızı oranları (* : Grup ayrımı yapılmaksızın toplam 202 hastada erken bölünen ve bölünmeyen embriyolar)



Şekil 2: Erken bölünen ve bölünmeyen embriyodan gelişen embriyoların bölünme hızı oranları



Resim 5: 2. gün normal bölünmüş 4 blastomerli embriyo, X400



Resim 6: 2.gün anormal bölünmüş 3 blastomerli ve blastomerleri eşit olmayan embriyo, X400



Resim 7: 3.gün normal bölünmüş 8 blastomerli embriyo, X400



Resim 8: 3.gün anormal bölünmüş 6 blastomerli ve blastomerleri eşit olmayan embriyo, X400

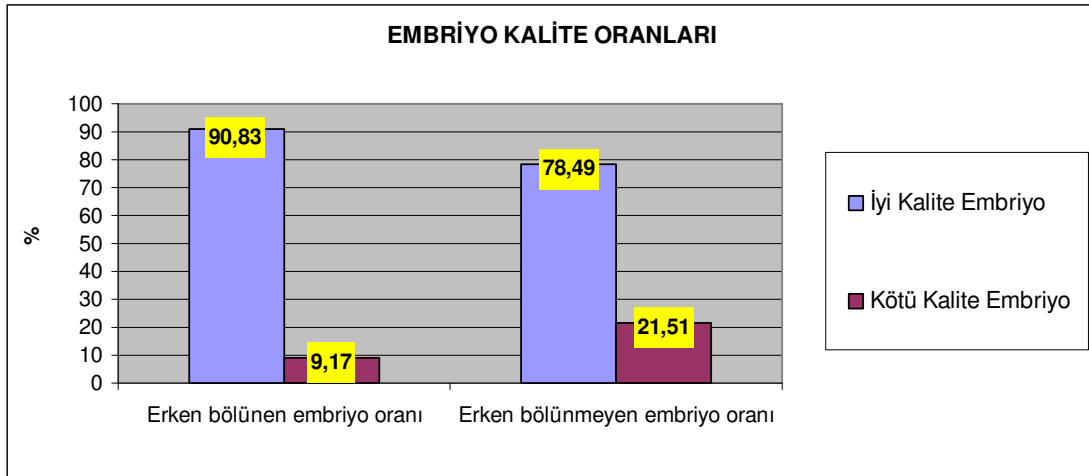
Embriyo Kalite Oranları

Erken bölünen embriyodan gelişen embriyonun kalitesi ile erken bölünmeyen embriyodan gelişen embriyo kalitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 5).

Erken bölünen 479 embriyonun % 90.83'ünden iyi kalite embriyo (Resim 9, 11) gelişirken, % 9.17'sinden kötü kalite embriyo (Resim 10, 12) gelişti. Erken bölünmeyen 1055 embriyonun % 78.49'undan iyi kalite embriyo gelişirken, % 21.51'inden kötü kalite embriyo gelişti (Şekil 3).

	Erken bölünen embriyo *	Erken bölünmeyen embriyo *	p
Toplam embriyo sayısı	479	1055	
İyi kalite embriyo sayısı (oranı)	423 (%90.83 ± 19.12)	832 (%78.49 ± 29.59)	0,000
Kötü kalite embriyo sayısı (oranı)	56 (%9.17 ± 19.12)	223 (%21.51 ± 29.59)	0,000

Tablo 5: Erken bölünen ve bölünmeyen embriyodan gelişen embriyo kalite oranları



Şekil 3: Erken bölünen ve bölünmeyen embriyodan gelişen embriyo kalite oranları



Resim 9: 2.gün 4 blastomerli iyi kalite embriyo,X400



Resim 10: 2.gün 4 blastomerli kötü kalite embriyo, X400



Resim 11: 3.gün 8 blastomerli iyi kalite embriyo, X400



Resim 12: 3.gün 6 blastomerli kötü kalite embriyo, X400

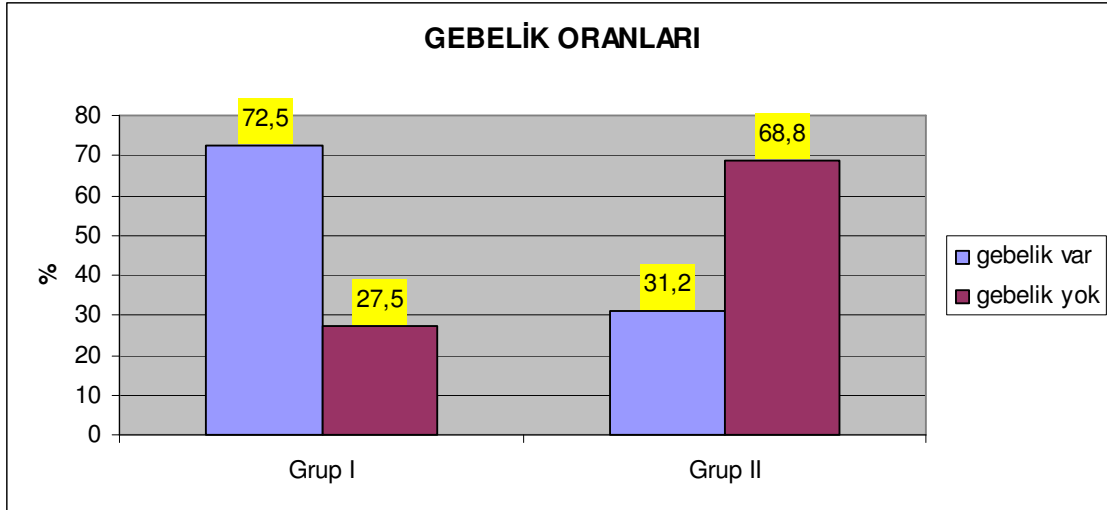
Gebelik Oranları

En az bir tane erken bölünen embriyo transferi yapılan I. grup hastalar ile erken bölünmeyen embriyolarla transferi yapılan II. grup hastaların gebelik oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 6).

Grup I'de 109 hastadan 79'unda gebelik elde edilirken, Grup II'deki 93 hastanın 29'unda gebelik elde edildi. Gebelik oranı I. grupta %72.5 iken II. grupta %31.2 bulundu (Şekil 4).

	Grup I	Grup II	Toplam	p
Hasta sayısı	109	93	202	
Gebe hasta sayısı	79	29	108	0.000
Gebe olmayan hasta sayısı	30	64	94	0.000

Tablo 6: Gruplara göre gebelik dağılımı



Şekil 4: Gruplara göre gebelik oranları

7. TARTIŞMA

İnseminasyon sonrası fertilize olmuş bir oosit, yaklaşık 20 saat sonra ilk mitoti 36 bölünmeye başlayarak 2 hücreli bir embriyo oluşturmaktadır. Nagy ve arkadaşları 1994 yılında ICSI'den 20 saat sonra oositlerin %11'inin, 27 saat sonra ise %30.5'inin iki hücreye bölündüğünü saptamıştır (51).

25. saatte fertilize olmuş oositlerin yaklaşık %20'si, 2 hücreli evrede bulunmaktadır. Bu embriyolar, erken bölünen embriyo olarak adlandırılmaktadır (34). Bizim çalışmamızda da ICSI sonrası 25-27. saatte oositlerin %30'unun erken bölündüğü saptanmıştır.

Lundin ve arkadaşları zigotun erken bölünmesinin oosit kalitesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (52). Ayrıca paternal faktörler de zigot evresinde pronuklear morfolojiyi dolayısıyla da embriyo gelişimi, bölünme hızı ve kalitesini etkilemektedir (35).

Yapılan çalışmalar erken bölünen embriyoların daha iyi morfolojiye (52) ve ICSI ya da inseminasyondan iki gün sonra daha fazla blastomere (11) sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca 2 hücreye erken bölünen embriyoların daha yüksek oranda blastosist oluşturduğu (53) ve daha iyi blastosist formülasyonu sağladığı gösterilmiştir (54).

Birçok ICSI programında transfer edilecek en iyi embriyonun seçimi için erken bölünme, embriyo hücre sayısı ve kalitesi gibi morfolojik kriterler kullanılmıştır. Sakkas ve arkadaşları çoklu embriyo transferinde erken bölünme değerlendirmesinin embriyo seçimini geliştireceğini göstermiştir (11).

Yapılan araştırmalar erken bölünen embriyoların daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir (55-60). Bizim çalışmamızda bu çalışmaları destekler niteliktedir. Çalışmamızda erken bölünmenin gebelik oranları, embriyo kaliteleri ve bölünme hızları üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Gebelik oranları değerlendirildiğinde erken bölünen embriyolarla transfer yapılan grupta klinik gebelik oranı erken bölünmeyen gruba göre anlamlı yüksek bulunmuştur.

IVF'de transfer edilecek embriyolar morfolojilerine ve embriyo gelişim oranlarına göre belirlenmektedir (36). Embriyo kalitesi ve gelişim oranlarının yüksek olması, gebelik oluşma ihtimalinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (61). Edwards ve arkadaşları daha hızlı bölünmenin implantasyonda daha yüksek şansa sahip olduğunu ortaya koymuştur.

İnseminasyondan 55 saat sonra 8 hücreli blastomer aşamasına ulaşan embriyonun transfer edilmesiyle elde edilen gebelik oranı (%31), 56. saatte ulaşan embriyoya göre (%17) daha yüksek bulunmuştur. 2 hücreye en erken bölünen embriyonun transfer edilmesiyle de benzer gebelik oranları elde edilmiştir (62).

Çeşitli çalışmalarda inseminasyondan sonraki 25-27. saatte 2 hücreye bölünen embriyodan daha iyi kalitede ve yüksek implantasyon potansiyeline sahip embriyo elde edildiği gözlenmiştir (59, 63). Bizim çalışmamızda da tüm embriyolarda embriyo bölünme hızı ve kalite oranı değerlendirilmiş ve erken bölünen embriyoların bölünme hızı ve kalitesi bölünmeyen gruba göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Sonuçlarımız bu çalışmaları doğrular ve tamamlar niteliktedir.

Sakkas ve arkadaşları 1998 yılında transfer edilecek embriyoları ICSI'den 27 saat sonra görülen erken bölünme parametresine göre seçmiştir. 88 siklus üzerinde çalışılmış ve erken bölünme gözlenen grupta klinik gebelik oranı (%25.9), erken bölünme gözlenmeyen gruptaki klinik gebelik oranından (%5.9) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca transfer edilen embriyo hücre sayısı ve kalite oranları erken bölünen embriyolarda daha yüksek bulunmuştur (36). Bizim çalışmamızda da toplam embriyolar değerlendirildiğinde erken bölünen embriyodan gelişen embriyoların bölünme hızı ve kalitesinin erken bölünmeyen embriyoya göre anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir. 2001 yılında Petersen ve arkadaşları ICSI'den 25-27 saat sonra erken bölünme varlığının incelenmesinin, implantasyon gücü daha fazla olan embriyoların seçiminde kullanılabileceğini göstermiştir (7).

İki hücreye erken bölünmenin embriyo seçim kriterleri arasındaki önemini vurgulayan başka bir çalışmada Saluments ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada transfer için tek embriyo seçiminde erken bölünme varlığı değerlendirmiştir. 178 hastaya tek embriyo transferi yapılmıştır. Bunlardan 72'sine erken bölünen embriyo transferi yapılırken 106'sına erken bölünmeyen embriyo transferi yapılmıştır. Erken bölünen embriyoyla yapılan transferde %50 daha fazla gebelik elde edilmiş ve daha iyi embriyo gelişim oranları saptanmıştır (37). Bu çalışmada tek embriyo transferi uygulandığı için sadece iyi kalitede embriyo transferi yapılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda transfer edilecek iyi kalite embriyo sayısı yeterli olmadığında kötü kalitede embriyo transferi yapılmış olsa da gebelik ve embriyo gelişim oranları açısından benzer sonuçlar bildirilmiştir (34, 36, 52). Bizim çalışmamızda bu sonuçları desteklemektedir.

Tek embriyo transferinde erken bölünme değerlendirmesi için farklı görüşler ileri sürülmüştür. 2003'te Emiliani tek embriyo transfer politikasında embriyo seçimini test etmiştir. Tek embriyo transferi yapılan 196 siklustan 1.grupta erken bölünen en iyi kalitedeki embriyo transfer için seçilirken 2. grupta erken bölünme değerlendirmesi yapılmayıp sadece embriyo kalitesi transfer için baz alınmıştır. Böylelikle iki gruba da iyi kalitede tek embriyo transferi yapılmıştır. Sonuç olarak iki grup arasında benzer doğum oranları (1. grup %27.6 iken 2. grup %24.5) gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada erken bölünen embriyodan gelişen embriyoların hücre sayısı ve embriyo skoru erken bölünmeyen embriyoya göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu çalışma, erken bölünen embriyolardan daha iyi embriyo gelişimi elde edildiğini göstermesine rağmen, tek embriyo transferi yapılacaksa en iyi kalitedeki embriyoyu seçmek için erken bölünme parametresinin değerlendirilmesinin fazladan bir işlem olduğu görüşündedir (64).

Çıray ve arkadaşlarının 2005 ve 2006 yıllarında yaptıkları çalışmalarda erken bölünme ve 2. gün mononukleasyonunu beraber değerlendirerek yüksek implantasyon potansiyeline ve gebelik oranına sahip embriyoları belirlemişlerdir. Erken bölünen embriyolarda bölünmeyenlere göre daha yüksek oranda mononukleasyon gözlenmiştir. Erken bölünen ve mononukleasyon gözlenen embriyoların 3. gün kalitesi yüksek bulunmuş ve daha yüksek gebelik ve implantasyon oranı elde edilmiştir (65, 66).

Bu zamana kadar erken bölünmenin önemini anlatan, yapılmış bir çok çalışmanın aksine Rehman ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada en iyi embriyonun seçim sürecinde erken bölünmeden daha önemli parametreler olduğunu belirtmişlerdir. Erken bölünmenin embriyo kalitesinin işaretçisi olduğunu fakat geç aşamadaki embriyo gelişiminin klinik gebeliğin tahmininde erken bölünmeye göre daha hassas ve spesifik olduğunu gözlemlenmiştir. Embriyo seçiminde kültür sürecinin uzatılmasını ve transfer için embriyo seçiminin blastosist kalite skora göre yapılmasının klinik gebelik için daha iyi tahmin verdiğini ileri sürmüşlerdir (67).

Çoğul gebeliklerin azaltılması için daha dikkatli ve kritik embriyo seçimi yapılması gerekmektedir. Genel olarak inseminasyondan 2 ya da 3 gün sonra embriyo seçimi yapılırken embriyoların morfolojik durumları ve embriyo gelişim oranları değerlendirilir (68, 69). Bazı çalışmalarda embriyo seçiminin pronuklear morfoloji değerlendirmesinin geliştirilmesiyle yapılabileceği gözlemlenmiştir (25, 70). Bazı çalışmalar da embriyoların blastosist aşamasına kadar gelişmesini bekleyerek transfer için en iyi embriyoların

seçiminin sağladığını göstermiştir. Blastosist transferinde yüksek gebelik (%50-70) ve implantasyon (%30-50) oranları raporlanmasına rağmen embriyoların sadece bir kısmının blastosist evresine ulaşabildiği düşünüldüğünde, blastosist transferinin tercih edilmesi hala tartışma konusudur (71, 72).

Erken bölünen embriyonun blastomer simetrisi ve fragmentasyon derecesi blastosist oluşumunu tahmin eden bir parametredir. 2 hücreye erken bölünen embriyoların belirgin derecede daha yüksek blastosist oluşturduğu gözlemlenmiştir (53, 73).

Bu verilere dayanarak transfer edilecek en ideal embriyo seçiminde, ICSI'den 25-27 saat sonra değerlendirilen erken bölünme parametresinin analizi gereklidir.

8. SONUÇ

Çalışmamızda transfer edilecek en iyi embriyonun seçim sürecinde ICSI'den 25-27 saat sonra gerçekleşen erken embriyo bölünmesinin ICSI parametreleri üzerine etkilerini inceledik. Çalışmamızda 202 hasta 2 grupta incelendi. I. grup en az bir tane erken bölünen embriyo transferi yapılan 109 hastadan, II. grup ise erken bölünmeyen embriyolarla transferi yapılan 93 hastadan oluşturuldu.

Bulgularımız doğrultusunda erken embriyo bölünmesinin ICSI parametrelerinden embriyo elde etme, embriyo bölünme hızı, kalitesi ve gebelik oranları üzerine etkisi şöyle sıralanabilir.

- Embriyo elde etme oranı açısından erken bölünen ve bölünmeyen grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı.
- Embriyo bölünme hızı değerlendirildiğinde, erken bölünen embriyodan gelişen normal bölünen embriyo oranı %85.02 iken, erken bölünmeyen embriyodan gelişen normal bölünen embriyo oranı %57.91 bulundu. Erken bölünen embriyodan gelişen embriyonun bölünme hızı ile erken bölünmeyen embriyodan gelişen embriyonun bölünme hızı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.
- Embriyo kalitesi değerlendirildiğinde, erken bölünen embriyodan gelişen iyi kalite embriyo oranı %90.83 iken, erken bölünmeyen embriyodan gelişen iyi kalite embriyo oranı %78.49 bulundu. Erken bölünen embriyodan gelişen embriyo kalitesi ile erken bölünmeyen embriyodan gelişen embriyo kalitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.
- Gebelik oranları incelendiğinde; I. grupta 109 hastadan 79 gebe, II. grupta 93 hastadan 29 gebe elde edildi. Gebelik oranları sırasıyla %72.5 ve %31.2 bulundu. Erken bölünen embriyolarla transferi yapılan I. grup hastalar ile erken bölünmeyen embriyolarla transferi yapılan II. grup hastaların gebelik oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Bu bulgular doğrultusunda ICSI sonrası 25. saatte embriyonun erken bölünmesinin embriyo elde etme oranını etkilemediğini ancak gelişen embriyonun bölünme hızı ve kalitesini etkileyen önemli bir faktör olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla bütün bu sonuçlardan erken bölünmenin gebeliği etkileyen olumlu bir parametre olduğu sonucuna varıldı.

Yapılacak daha ileri araştırmalarda m¼mk¼nse oluşturulan bu gebeliklerin ne oranda sağlıklı doğumla sonuçlandığını tespit edebilmiş olmak b¼yle bir çalışmayı ve benzerlerini daha anlamlı kılar d¼ř¼ncesindeyiz.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi hazırlamam sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda özveri ve sabırla beni destekleyen hocam Prof. Dr. Vildan KARPUZ'a, ilgilerinden dolayı Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e ve tüm İstanbul Bilim Üniversitesi çalışanları ile her zaman ilgisini ve desteğini hissettiren arkadaşımız İlknur KARAOSMANOĞLU'na,

Her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak her konuda yol gösteren Bio. Seda YILMAZ'a ve çalışma arkadaşım Bio. Elif YILMAZ'a, desteğinden dolayı Dr. Nuri DELİKARA'ya ve tüm Ferticenter Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan ve beni her koşulda destekleyen sevgili eşim Fırat AZİRET'e, Yüksek Lisans programını benimle beraber tamamlayan oğlum Aras AZİRET'e, tezimi hazırlamam sırasında oğluma bakan ve büyük bir sabırla bizi destekleyen kardeşim Elif, annem Rabiye, babam Enver TÜLÜ'ye ve tüm aileme teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Vicdan K, Işık AZ. İn vitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. Çağdaş Medikal Kitapevi, 1999.
2. 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.
3. Martin PM, Welch HG. Probabilities for singleton and multiple pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998, 70: 478-481.
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. Bavister B. Culture of preimplantasyon embryos: facts end artefacts. *Hum Reprod Update*. 1995, 1: 91-148.
6. Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2001, 16(12): 2658-2666.
7. Petersen CG, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RL, Franco Junior JG. Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. *J Assist Reprod Genet*. 2001, 18(4): 209-212.
8. Ciray HN, Ulug U, Bahçeci M. Transfer of early-cleaved embryos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI- embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 2004, 8: 219-223.
9. Tsai YC, Chung MT, Sung YH, Tsai TF, Tsai YT, Lin LY. Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002, 76: 293-297.
10. Isıklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Med*. 2002, 47: 540-544.
11. 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.
12. Gilbert SF. Developmental biology. 5th ed. Sunderland, Sinauer Associates, 1997.

13. Sadler TW Langman's. Langman medikal embriyoloji 9. baskıdan çeviri. Ed: Prof. Dr. Başaklar AC. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005.
14. Moore KL, Persaud TVN. Klinik yönleri ile insan biyolojisi 6. baskıdan çeviri. Ed: Prof. Dr. Yıldırım M, Prof. Dr. Okar İ, Prof. Dr. Dalçık H. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri. 2002.
15. Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G. The stages at which human fertilization arrest: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod.* 1995, 10: 1897.
16. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. St Louis Mosby, 1994.
17. Moos J, Faundes D, Kopf GS, Schultz RM. Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. *Hum Reprod.* 1995, 10: 2467
18. Delilbaşı L. Tüp bebek yardımcı üreme tekniklerinde laboratuvar yöntemleri. Ankara, Bayındır Sağlık Eğitim ve Araştırma Vakfı, 1997.
19. Cohen J, Edwards RG, Fehilly CB. A treatment for male infertility. *Fertil Steril.* 1985, 43: 422-433.
20. Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization, 1996.
21. 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.
22. Trounson A, Gardner DK. Handbook of in vitro fertilization. CRC Press, Victoria, Australia, 1993.
23. McKiernan SH, Bavister BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod.* 1994, 9: 2123-2129.
24. Gardner DK. Lane M. Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod Update.* 1997, 3: 367-382.
25. 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.
26. Sadowy S, Tomkin G, Munne S et al. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote.* 1998, 6: 137-141.

27. 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.
28. Garello C, Baker H, Rai J et al. Pronuclear orientation, polar body placement and embryo quality after intra cytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod.* 1998, 13: 1003-1013.
29. Barnett DK, Kimura J, Bavister BD. Translocation of active mitochondria during hamster preimplantation embryo development studied by confocal laser scanning microscopy. *Dev Dyn.* 1996, 205(1): 64-72.
30. 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.
31. 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.
32. Salumets A, Hyden-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 : 2177-2181.
33. Senn A, Urner F, Chanson A, Primi MP, Wirthner D, Germond M. Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum Reprod.* 2006, 21(1): 234-239
34. 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: 1531-1536.
35. Tesarik J, Mendoza C and Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod.* 2002, 17(1): 184-189.
36. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonne D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod.* 1998, 13: 182-187.
37. Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod.* 2003, 18: 821-825.

38. Staessen C, Camus M, Khan I, Smits J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC. An 18-month survey of infertility treatment by in vitro fertilization, gamete and zygote intrafallopian transfer, and replacement of frozen-thawed embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1989, 6(1): 22-29.
39. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler fertilizasyon ve embriyoner gelişim. Ankara, Bayındır Eğitim ve Araştırma Vakfı, 1997.
40. 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.
41. 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.
42. Hartshorne G. The embryo. *Hum Reprod.* 2000, 15 Suppl 4: 31-41.
43. 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.
44. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999, 11(3): 307-311.
45. 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.
46. Gardner D, Balaban B. Choosing between day 3 and day 5 embryo transfers. *Clin Obstetrics Gynecol.* 2006, 49(1): 85-92.
47. Milki AA, Hinckey MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril.* 2000, 73: 126-129.
48. 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.
49. 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.

50. Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives. Martin Dunitz, United Kingdom, 2001.
51. Nagy Z, Liu J, Joris H et al. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994, 9: 1743-1748.
52. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod.* 2001, 16: 2652-2657.
53. Platteau P, Fenwick J, Herbert C, Murdoch A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage: pregnancy, implantation rate and blastocyst formation. Presented at the 11th world congress on in vitro fertilization and human reproductive genetics, 1999.
54. Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod.* 2002, 17: 407-412.
55. Miller KF, Sinoway CE, Fry KL, Falcone T. Early cleavage of zygotes is indicative of the inherent development potential of the cohort. *Fertil Steril.* 2001, 76(Suppl 1): 125-126.
56. Guilherme P, Rossi LM, Iaconelle A, Rocha CC, Locambo CV, Borges E. Early cleavage assessment in embryos from ICSI cycles. *Fertil Steril.* 2003, 80(Suppl 3): 103.
57. Joo SB, Moon SH, Park SH, Lee SK, Lee MS, Kim KS. Determining factors of early embryo cleavage to 2-cell stage for predicting the pregnancy outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2003, 80(Suppl 3): 153.
58. Summers-Chase D, Horwath D, Yuan W, Barci H, Check JH. Pregnancy rates with and without transferring embryos, which showed early cleavage. *Fertil Steril.* 2004, 82(Suppl 2): 220.
59. Van Montfoort APA, Dumoulin JCM, Kester ADM, Evers JLH. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod.* 2004, 19: 2103-2108.

60. Hammoud I, Vialard F, Casanovas P, Lefebvre G, Vauthier-Brouzes D, Poirot C. How viable are zygotes in which the PN are still intact at 25 hours? Impact on the choice of embryo for transfer. DOI: 10. 1016 *Fertil Steril*. 2007. 01. 103.
61. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1986, 3: 284-295.
62. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1984, 1: 3-23.
63. Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Biomed Online*. 2004, 8: 212-218.
64. Emiliani S, Fasano G, Vandamme B, Vannin AS, Verdoodt M, Biramane J, Delbaere A, Englert Y, Devreker F. Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod Biomed Online*. 2006, 13: 255-260.
65. Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M. Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2005, 84: 1411-1416.
66. Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M. Early cleavage morphology affect the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril*. 2006, 85: 358-365.
67. Rehman KS, Bukulmez O, Langley M, Carr BR, Nackley MD, Doody KM, Doody KJ. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril*. 2007, 87: 1041-1052.
68. Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Jeroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod*. 1987, 2: 705-708.
69. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod*. 1992, 7: 117-119.
70. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 1998, 13: 1003-1013.

71. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Helsa J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1998, 13: 3434-3440.
72. Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doddy KM, Doddy KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 1999, 72: 1035-1040.
73. Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod.* 2001, 16: 1970-1975.