

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

**OKSİJEN KONSANTRASYONUNUN
İMLANTASYON ÖNCESİ EMBRİYO GELİŞİMİ VE
GEBELİK ORANI ÜZERİNE ETKİSİ**

Tıbbi Biyolog Ufuk Kutlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2006

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

**OKSİJEN KONSANTRASYONUNUN
İMLANTASYON ÖNCESİ EMBRİYO GELİŞİMİ VE
GEBELİK ORANI ÜZERİNE ETKİSİ**

Tıbbi Biyolog Ufuk Kutlu

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Meral Koyutürk

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. İNFERTİLİTE VE TEDAVİ YÖNTEMLERİ	6
4.2. ICSI VE EMBRİYO KÜLTÜRÜ	7
4.2.1. ICSI	7
4.2.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ	8
4.2.2.1. Fertilizasyon Dönemi	10
4.2.2.2. Embriyo Dönemi	11
4.2.2.3. Blastosist Dönemi	11
4.3. OKSİJENLİ SOLUNUM VE ROT	12
4.3.1. Reaktif Oksijen Türevleri (ROT)	12
4.3.2. ROT'nin Oosit ve Embriyo İçinde Üretimi	14
4.3.3. ROT'ne Karşı Savunma Mekanizmaları	15
4.4. ROT'UN EMBRİYODAKİ ETKİLERİ	16
5. MATERYAL VE YÖNTEM	17
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER	17
5.2. ÇALIŞMA GRUBU	18
5.3. ICSI	18
5.3.1. Hastanın Hazırlanması	18
5.3.2. Yumurta Toplama İşlemi ve Kumulus ve Korona Hücrelerinin	18
Temizlenmesi	
5.3.3. ICSI İçin Sperm Hazırlığı: Swim-Up Tekniği	19
5.3.4. Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI)	19

5.3.5. Fertilizasyonun Değerlendirilmesi (1.gün)	20
5.3.6. Embriyo Değerlendirilmesi (Klivaj Dönemi)	20
5.3.7. Blastosist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi	21
5.3.8. Transfer İşlemi	22
5.3.9. Gebelik	23
5.4. İSTATİSTİKSEL DEğERLENDİRME	23
6. BULGULAR	24
7. TARTIŞMA	34
8. SONUÇ	37
9. TEŞEKKÜR	38
10. KAYNAKLAR	39

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
CO₂	Karbondioksit Gazı
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon (Follicule Stimulating Hormone)
G₃PDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (Gonadotrophin Releasing Hormone)
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon Peroksidaz
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropini (Human Corionic Gonadotrophin)
HMG	İnsan Menopozal Gonadotropinleri
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
ICM	İç Hücre Kütlesi (Inner Cell Mass)
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Intracytoplasmic Sperm Injection)
IL-2	İnterlökin 2
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
MII	Metafaz II
NAD(P)H	Nikotinamid Dinükleotid Fosfat (Nicotinamide Dinucleotide Phosphate)
OXPHOS	Oksidatif Fosforilasyon
.OH	Hidroksil Radikali
.O₂⁻	Süperoksit Anyonu
PVP	Poli Vinil Propilen
ROT (ROS)	Reaktif Oksijen Türevleri

T. C. Kadir Has Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından alınan 17/02/2006 tarih ve 2006/003 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Proje Numarası : HE/0192004

1. ÖZET

Fertilize oosit dişi genital kanallar içerisinde, %5 O₂ konsantrasyonu etkisi altında bulunmaktadır. Üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinden biri olan mikroenjeksiyon yönteminde embriyolar in vitro ortamda atmosferik oksijene (%20 konsantrasyonda) maruz kalabilmektedirler. Bu oranın olası olumsuz etkilerini ortadan kaldıracılabilmek amacıyla O₂ kontrollü inkübatörler üretilmiştir.

Bu çalışmada, çocuk sahibi olmak isteyen infertil çiftlerin tedaviye alınmasını takiben mikroenjeksiyon işlemi uygulandı. Elde edilen embriyolar randomize şekilde %20 ve %5 konsantrasyonda O₂ içeren inkübatörlerde ayrı ayrı inkübe edildi. Mikroenjeksiyondan sonraki birinci günde, üçüncü günde ve uygun vakalarda beşinci günde kontrol edilen embriyolar, skorlanarak fertilize oosit sayısı, üçüncü günde blastomer sayısı, üçüncü günde fragmantasyon, üçüncü gün iyi kalite embriyo sayısı, üçüncü gün kompaktlaşma, beşinci gün blastosist oluşturma, beşinci gün iyi kalite iç hücre kütlesi, beşinci gün iyi kalite trofoblast, implantasyon ve gebelik oranları bakımından karşılaştırıldı. Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Buna göre üçüncü günde kompaktlaşma oranı, beşinci gün blastosist oluşturma oranı ve beşinci günde iyi kalitede iç hücre kütlesine sahip olma oranı %5 O₂ grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu (p<0.005). Beşinci günde iyi kalitede iç hücre kütlesine sahip olma oranındaki anlamlılık ileri düzeydeydi. Diğer parametrelerde fark gözlenmedi. İmplantasyon oranı %5 O₂ grubunda daha yüksek olmasına karşın bu fark anlamlılık düzeyinde değildi.

Bu bulgular %5 O₂ konsantrasyonu grubunda elde edilen embriyoların daha kaliteli olduğunu, bu etkilerin özellikle üçüncü günden sonra morula ve blastosist aşamalarında belirgin olduğunu, fakat bu durumun embriyo ve gebelik elde etme oranlarını etkilemediğini göstermiştir. Yine de embriyo kalitelerindeki bu farkın uzun dönem etkilerini inceleyen ileri araştırmaların yürütülmesi gerekmektedir.

1. SUMMARY

The zygote in the female reproductive tract of human is under 5% O₂ concentration. On the other hand, the embryos of infertile couples formed via the microinjection method may be subjected to atmospheric oxygen level. Oxygen controlled incubators are derived in order to decrease the possible negative effects of it.

The infertile couples with the desire of having a child were included to this study. The embryos obtained were assigned to 5% and 20% O₂ concentrated incubators randomly way. The embryos were controlled on the first, third and in some cases fifth days following the microinjection procedure and the results were recorded. Number of fertilized oocytes, number of blastomeres on the third day, fragmentation on the third day, number of good quality embryos on the third day, compaction on the third day, blastocyst formation on the fifth day, good quality ICM formation on the fifth day, good quality trophoblast formation on the fifth day, implantation and pregnancy rates were compared according to Mann-Whitney U test. Compaction rate in the third day, blastocyst formation rate in the fifth day and good quality ICM formation in the fifth day were statistically significantly higher in 5% O₂ concentration group ($p < 0.005$). This significance was high for good quality ICM formation on the fifth day. There was no difference for other parameters. The implantation rate was slightly higher in the 5% O₂ group, but this difference was not statistically significant.

Those findings show that the embryos obtained in 5% O₂ concentration group had better qualities, being significant especially in the morula and blastocyst stages, but this did not have any effect on the pregnancy and implantation outcomes. However further studies should be designed in order to investigate the long term effects of this difference in the qualities.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, 1 yılı aşkın süre ile korunma yöntemlerinden birini kullanmaksızın cinsel ilişkiye girilmesine karşın çiftlerin çocuk sahibi olamaması durumunda kullanılan terimdir. Bu süre sonunda merkezlere başvuran çiftler bu konuda ayrı ayrı değerlendirilerek uygun tedavi sürecine başlatılırlar (1). Bu süreçte erkek hastadan semen örneği alınarak analiz edilir ve yardımcı üreme tekniklerinden biri için uygun olup olmadığı değerlendirilir. Kadın hastanın da çeşitli tetkikleri yapılarak uygun zamanda overlerine indüksiyon uygulanır ve fazla sayıda oosit elde edilmeye çalışılır. Toplanan oositler çeşitli işlemlerden geçirildikten sonra sperm hücreleri ile döllenmeye hazır hale getirilir (2).

Klasik IVF (in vitro fertilizasyon) veya ICSI (intrasiytoplazmik sperm enjeksiyonu) yöntemleriyle yumurta hücrelerinin sperm hücreleriyle birleşmesi sağlanır (2). Elde edilen zigotlar, işlemin ertesini günü başlangıç olmak üzere her gün, hücre sayısı ve kalite bakımından değerlendirilip not edilir. Normal şartlarda 1. günde 2 adet pronükleus, 2. günde 4 hücreli embriyo, 3. günde ise 8 hücreli embriyo gözlenmesi gerekir. Uygun zaman sonra (genellikle 2., 3. veya 5. gün) anne uterusuna yerleştirilirler.

Genellikle embriyo sayısının çok fazla olmadığı ya da embriyo kalitesinin çok iyi olmadığı durumlarda 2. veya 3. gün transferi tercih edilir. Bunun nedeni elde edilen embriyoların tamamının 5. gün blastosist oluşturamamasıdır.

Embriyo kültürlerinin devamı için %95 nem, %5-6 CO₂ içeren 37°C sıcaklığındaki inkübatörler kullanılır. Günümüzde rutin olarak kullanılan inkübatörlerin çoğunda oksijen kontrolü bulunmamaktadır. Oksijen kontrollü inkübatörlerde fazladan bir azot gazı (N₂) girişi mevcuttur. Bu gazın girişiyle, inkübatörün içindeki atmosferik oksijen konsantrasyonu (%20), %5'e indirgenir. Bugüne kadar yayınlanmış olan çalışmalarda oksijen kontrolünün embriyo kültürleri üzerindeki önemi vurgulanmaktadır.

Oksidatif stres, hücresel düzeyde çeşitli reaktif oksijen türevlerinin (ROT) durağan faz konsantrasyonlarındaki artış olarak tanımlanmaktadır. Endometriozis, folikül sıvısı ve polikistik over sendromu üzerindeki önemli bazı etkileri dışında defektif embriyo gelişimi etyolojisinde de etkili olduğu bildirilmiştir (3).

Reaktif oksijen türevleri embriyo metabolizması sonucu ve/veya embriyoyu çevreleyen ortamdan kaynaklanarak oluşabilmektedir. Bu türevlerin birçok hücresel

molekölü değişikliğe uğratmalarının yanı sıra (örneğin DNA hasarı), erken embriyonik gelişimi bloke ettiği ya da geciktirdiği bildirilmiştir (4).

Embriyoların in vitro gelişiminde, maruz kaldıkları oksidatif stres ve bunların etkilerini nötralize edebilme kapasiteleri arasındaki denge önemlidir. Embriyolar genellikle oksijen kullanımı sonucu üretilen reaktif oksijen türevlerini (intrinsek ROT) nötralize edebilirken, çevresel kaynaklı türevleri (ekstresek ROT) nötralize etmede yetersiz kalabilmektedirler (5).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, birçok hayvan modelinde ve birkaç insan çalışma grubunda oksijen konsantrasyonunun kültüre edilmiş embriyolar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda atmosferik oksijenin embriyolara zarar verebileceği sonucuna varılmıştır (6-15)

İn vivo şartlarda embriyolar hiçbir zaman atmosferik oksijene (%20) maruz kalmaz (16). Bu nedenle, embriyo kültürlerinde %20 oksijen konsantrasyonu kullanmak fizyolojik olarak uygun görünmemektedir ve yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kalan embriyolarda çeşitli gelişimsel defektler inkübasyon koşullarıyla ilişkilendirilmektedir. Yapılan birçok çalışmada embriyo kültürlerinde %5 ve %20 konsantrasyonlarında oksijen uygulanmıştır. Bu çalışmaların çoğunda varılan sonuç; fertilizasyon, 2-3. günlerde embriyo gelişimi, implantasyon ve gebelik oranları arasında fark olmadığı fakat %5 oksijen konsantrasyonunun blastosist gelişimini belirgin şekilde artırdığı yönündedir. Gelişen blastosistlerin iç hücre kütesinin (ICM) hücre sayısında ve trofoekdoderm hücre sayısında da %20 oksijen konsantrasyonuna oranla artış olduğu kaydedilmiştir (17-18-19). Fakat incelenen bu blastosistler transfer edilmeyip, yalnızca takip edilen embriyolardır. Çünkü tüm bu çalışmalarda embriyo transfer günü olarak 2 ya da 3.günler seçilmiştir (20).

Tüm bu bilgiler ışığında embriyoların atmosferik koşullarda, düşük oksijen konsantrasyonuna oranla daha az sayıda blastosist oluşturacağını, oluşan blastosistlerin hücre sayısının da daha düşük olacağını söylemek mümkündür (21). Hücre sayısı yeterli olsa dahi bu embriyolarda daha ileri gelişimsel aksaklıkların gözlenme ihtimali yüksek olabilir. Nitekim yapılan hayvan çalışmalarında, embriyonik gelişimin erken evrelerinde yüksek oksijen konsantrasyonu altında inkübe edildiklerinde, bu dönemde genomik aktivasyon gözlendiği için genetik birtakım bozukluklarla karşılaşılabilen öne sürülmüştür (7).

Bu çalışmada farklı oksijen konsantrasyonlarının (%5 ve %20) implantasyon öncesi embriyo gelişimi ve gebelik oranları üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İNFERTİLİTE VE TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Sağlıklı bir çiftin korunmadan ve düzenli cinsel ilişkiye girdiği halde 1 yıl süreyle çocuk sahibi olamaması durumu infertilite olarak adlandırılmaktadır (1). Toplumun yaklaşık %10-15'inde gözlenmesine karşılık bu oranın giderek arttığı tahmin edilmektedir. İnfertilite kadın, erkek ya da eşlerin her ikisinden kaynaklanan sorunlara bağlı olabileceği gibi ikisinde de herhangi bir problem gözlenmediği halde gebelik elde edilemiyor olabilir. Bu durumda ise açıklanamayan infertiliteden söz edilmektedir.

Üremeye yardımcı tedaviler ile çocuk sahibi olma şansı olan infertil çiftler, anamnezleri alındıktan sonra çeşitli tetkik aşamalarından geçirilmektedir. Kadınlarda jinekolojik muayene, hormon ölçümü, histerosalpingogram gibi tetkikler yapılırken, erkekler de semen değerleri yönünden incelenir. Bu incelemeler sonrasında çiftler uygun tedaviye yönlendirilir. IVF ve ICSI bu amaçla kullanılan yöntemlerden ikisidir. Her iki yöntemde de anneden, çeşitli hormon ilaçları uygulanarak geliştirilen oositlerin toplanması ve babadan alınan sperm hücreleri ile in vitro ortamda döllenen embriyoların belli süre laboratuvar ortamında kültüre edildikten sonra anne uterusuna yerleştirilmesi söz konusudur (2).

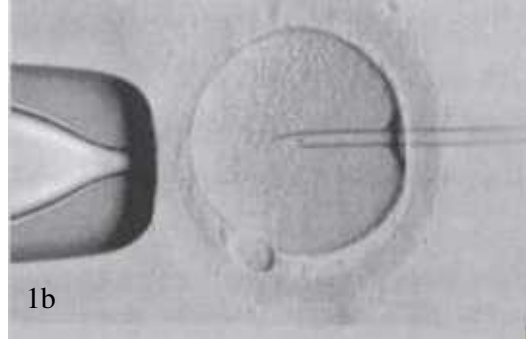
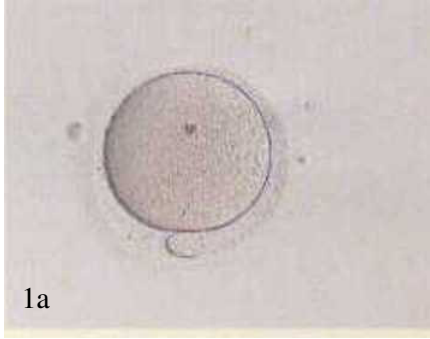
Semen parametreleri uygun olduğunda kullanılan IVF yönteminde, kumulus-oosit kompleksi ile sperm hücreleri, oosit başına 100 bin sperm olacak şekilde aynı ortama bırakılırlar. Sperm hücreleri zona pellusida engelini aşarak yumurtayı dölleyebilmek için yarışır.

Sperm parametrelerinin IVF için yetersiz olduğu durumlarda kullanılan ICSI yöntemi ise tek bir sperm hücrenin mikroenjeksiyon pipeti ile tutularak yumurta sitoplazması içine bırakılması esasına dayanır. Böylece sperm hücresi zona engelini aşmak zorunda kalmaz (1).

4.2. ICSI VE EMBRİYO KÜLTÜRÜ

4.2.1. ICSI

ICSI, semen örneğindeki sperm sayısının, sperm hareketliliğinin veya normal yapıdaki sperm sayısının az olduğu durumlarda ya da normal sayıda sperm olmasına rağmen spermlerin oositi döllemede başarısız olduğu durumlarda uygulanan bir yardımcı üreme yöntemidir (1,2). ICSI işlemi uygulanacak olan oositlerin olgun olup olmadıkları önceden tespit edilmelidir. Bunun için oositi çevreleyen kumulus hücreleri enzimatik olarak oositten uzaklaştırılır ve kutup cisimciği görülür hale gelmiş olan metafaz II evresindeki matür oositler seçilir (Resim 1a). Uygun solüsyonlar içinde ve uygun koşullar altında oosit ve sperm hücreleri aynı petri kabı içine yerleştirilir. Oosit, tutucu pipet ile doğru pozisyonda tutularak sabitlenir. Uygun morfolojiye sahip sperm hücresi ise kuyruk kırma hareketini takiben enjeksiyon pipeti içine çekilir. Yatay pozisyonda oosit içine sokularak sırayla zona pellusida ve oolemma geçilir ve sperm oosit içine bırakılır (21) (Resim 1b). İşlem sonrasında embriyo kültürü aşamasına geçilir.

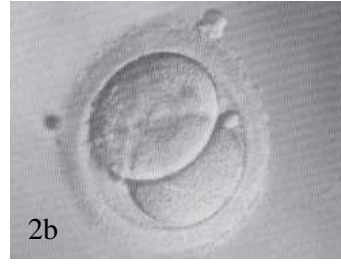


Resim 1. Metafaz II oosit (a), mikroenjeksiyon (ICSI) işlemi (b).

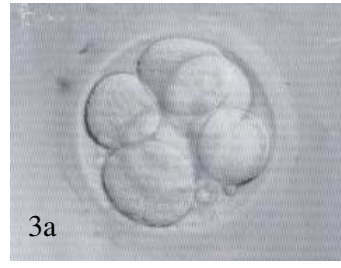
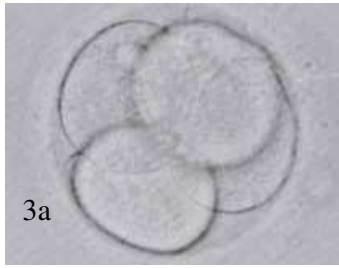
4.2.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ

Oosit toplama işleminden başlamak üzere, embriyoların uterusu transferine kadar geçen süre içinde, embriyoların kültüre edilmelerinde yapay ortamlar kullanılır. Ardışık medyumlar serisi olarak birçok firma tarafından üretilip piyasaya sunulan bu ortamlar, basit bazı farklılıklar dışında benzer aminoasit, mineral, glukoz, vb içeriklere sahiptir. Embriyolar bu in vitro ortamlarda 2-5 gün boyunca inkübe edilirler. Bu süre boyunca zaman zaman farklı ihtiyaçlar gösterirler. Kültür medyumları olarak kullanılan bu yapay ortamlar, oosit ve/veya embriyonun o anki ihtiyacına göre, kadın üreme organlarındaki ortamlar taklit edilerek üretilmişlerdir.

Mikroenjeksiyon işlemi takip eden 16-20. saatler arasında döllenme işleminin gerçekleşmesi beklenir. Bunun göstergesi her iki cinsiyete ait pronükleusların belirgin hale gelmesidir (Resim 2). Döllenen oosite “zigot” adı verilir. Her ikisi de haploid sayıda kromozom taşıyan pronükleuslar birbiri içine geçip kaynaşır. Bu olaya “singami” adı verilir. Oluşan yeni nükleus diploid sayıda kromozom taşımaktadır. Mikroenjeksiyondan yaklaşık 24 saat sonra zigot ilk mitoz bölünmesini gerçekleştirerek 2 hücreli embriyo halini alır (Resim 2). Bu bölünmeler yarıklanma bölünmesi şeklinde gerçekleşir ve klivaj olarak adlandırılır. Yarıklanma bölünmesi sonrasında hacmi küçülen hücrelere blastomer adı verilir. Bundan sonraki günde 4 hücreye (Resim 3), üçüncü günde ise 8 hücreye sahip olan embriyoda (Resim 3) blastomerlerin sıkı bağlantılarında artma sonucu kompakt hücre topluluğu meydana gelir. Kompaksiyon dönemi olarak bilinen bu süreçte iç ve dış hücre kitlelerinin ayrımı gerçekleşir. Dördüncü günde hücre sayısı artar ve 16 hücre evresine ulaşır, bu evrede embriyo “morula” adını alır (Resim 4). Beş günlük embriyoda, uterus sıvısı iç hücre kitlesindeki hücrelerarası boşluğa sızarak blastosel denen tek bir boşluğun oluşmasına yol açar ve bu evre blastosist adını alır (Resim 4). Embriyonun endometriyuma tutunması, zona pellusidanın yırtılmasını takiben dış hücre kitlesinden gelişen trofoblast hücrelerinin endometriyuma penetrasyonu ile gerçekleşir (Resim 5) (22).



Resim 2. Fertilize olmuş oosit (a), ikiye bölünmüş embriyo (b).



Resim 3. Dört hücreli embriyo (a), Sekiz hücreli embriyo (b).



Resim 4. Morula (a), blastosist (b).



Resim 5. Zona pellusidası yırtılmış (hatched) blastosist.

Mikroenjeksiyon yöntemiyle elde edilen embriyolar her zaman birinci kalitede olmayabilir. Bunda anne yaşı, genetik faktörler, oosit ve sperm kalitesi gibi nedenler etkili olmaktadır. Genellikle embriyonun içerdiği blastomer sayısının, embriyonun içinde bulunduğu saate göre normal olduğu, blastomer boyutlarının birbirine eşit olduğu ve fragmentasyon yani blastomer dışı parçacıkların olmadığı durumlarda birinci kalitede bir embriyodan söz edilebilmektedir. Embriyonun içerdiği fragmentasyon oranına, blastomer boyutlarındaki farklılıklara göre embriyo kalitesi değişen skorlarla değerlendirilmektedir (23).

4.2.2.1. Fertilizasyon Dönemi

Fertilizasyon, kısaca tek bir sperm nükleusunun aktive olmuş oosit sitoplazması içinde oosit nükleusu ile birleşmesi olarak özetlenebilir. Yakın zamanda yapılan bilimsel araştırmalar bize fertilizasyonun uygun şekilde gerçekleşebilmesi için gerek hücre içinde gerekse hücre dışında birtakım olaylar dizisinin oluşmasının şart olduğunu göstermiştir. Nükleuslar fertilizasyonunun en basit ve kolayca gözlemlenebilen işaretleridir. Normal fertilizasyonda 2 pronükleus ve birinci ve ikinci kutup cisimciği gözlenir. Her iki nükleusta meydana gelen olayların eş zamanlı olması döllenme ve ileri embriyo gelişimi açısından önem taşımaktadır. Erken zigot oluşumunda pronükleus ve nükleolusa bağlı oluşumlar büyük önem taşır. Eş zamanlı gelişim göstermeyen döllenme aktivitelerine sahip zigotlarla yapılan araştırmalarda yüksek oranda kromozomal anomali, anormal klivaj ve gelişim blokajı nedeni ile nadir blastosist oluşumu gözlenmiştir (24).

Embriyo transferi sonrası implantasyon oranları ile zigot kalitesi arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre belirli formlardaki pronükleus ve nükleolar prekürsör cisimciklere (Nucleolar precursor bodies-NBP) sahip embriyolarda diğerlerine kıyasla daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları sağlanmaktadır. Salumets ve arkadaşları da benzer değerlendirme kriterlerini kullanmış ve bu kriterlere göre seçilen embriyolar ile embriyo transferi sırasında üç yerine iki embriyo transferi ile benzer gebelik oranları elde etmişlerdir. Genellikle döllenme sonrası dört ana kriter dikkate alınmaktadır: Bunlar pronükleus büyüklüğü, nükleolar prekürsör cisimciklerin sayıları, büyüklükleri ve dağılımıdır (25).

4.2.2.2. Embriyo Dönemi (Klivaj Dönemi)

Zigot aşamasından 4-8 hücreli bir embriyo oluşumuna kadar geçen süre erken klivaj dönemi olarak tanımlanır. Bu dönem içerisinde zigot birbiri ile yapısal anlamda değişiklik göstermeyen iki-üç bölünme geçirir. Klivaj hızı embriyolar arasında değişiklik gösterebilir fakat bu bölünmeler sonrasında normal bir embriyo birbirine eş büyüklükte 6-8 hücreden oluşur. Yapılan araştırmalar bu parametrenin dışında, eşit olmayan blastomer veya fragman denilen sitoplazmik parçacıklar içeren embriyoların ileri gelişim yönünden diğerlerine göre daha riskli olduklarını göstermiştir. Bu özelliklere sahip embriyolar ayrıca daha yüksek oranda kromozomal anomali içerirler ve çok çekirdekli blastomer oluşturma şansları yüksektir (26). Bu dönem ayrıca pronükleusların birleşmesi sonrası oluşan embriyoya ait genomun da devreye girdiği dönemdir. Normal olarak yapılanmamış bir genoma sahip embriyoların çoğu bu dönem sonrası ileri gelişim göstermezler (27). Bu dönem ayrıca hücreler arası bağların (sıkı bağlantılar, tutucu bağlantılar ve oluklu bağlantılar) kuvvetlenerek arttığı bir dönemdir. Bu bağların bir kısmı hücreleri birbirine sıkıca bağlayarak geçirgen olmayan bir tabaka oluştururken diğer bir kısmı seçici olarak bazı moleküllerin taşınmasını ve böylece ileri embriyo gelişim döneminde hücreler arası sinyal mekanizmalarının oluşumu sonucu gerçekleşen başkalaşımını sağlarlar. Birleşme (kompaksiyon) olarak ta adlandırılan bu dönemde artık hücrelerin sınırlarını belirlemek zordur (28).

4.2.2.3. Blastosist Dönemi

Üçüncü günü takip eden bölünmeler ile embriyonun hücre sayısı artar ve 16-32 hücreden oluşan sıkı bir kitle haline gelir. Bu aşamadaki bir embriyoya morula adı verilir. Normal bir morulada iç kısımda yerleşik olarak bulunan hücreler ile dış kısımdaki hücreler ileri gelişim aşamasında başkalaşımına devam eder. Blastosist aşamasına geldiğinde sırasıyla, iç hücre kütlesi embriyoblast dış hücre kitlesiyle trofoblast tabakasını oluşturur. Uterus sıvısının iç hücre kitlesindeki hücrelerarası boşluğa sızması sonucu blastosel denilen boşluk oluşur. Blastosel içerdiği değişik iyon ve protein konsantrasyonu bakımından iç hücre kütesinin ileri gelişimi için son derece kritik bir önem taşır. Bu aşamada oluşan embriyonun yapısal değerlendirmesinde kullanılan üç temel kriter; blastosel kavitesinin

yapısı, trofoblast hücrelerinin yapısı ve dizilimi ile iç hücre kütleini oluşturan hücrelerin sayısı ve yapısıdır (29).

Yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması sırasında embriyolar in vitro ortamda buldukları sürece, dışı üreme organlarındaki ortamlar imite edilerek üretilen inkübatör denilen cihazlar içinde tutulurlar. Bu cihazlar embriyolara nem, ısı ve uygun pH ortamı sağlarlar. %5-6 konsantrasyonda CO₂ sağlayan klasik inkübatörlerin uzun süreli kullanımından sonra günümüzde piyasaya sürülen ve oksijen kontrol sistemi ile de hizmet veren inkübatörler, embriyoya hem O₂, hem de CO₂'i kontrollü olarak sağlamaktadırlar. Bu gelişmeyle birlikte doğala daha yakın bir ortamda kültüre edilen embriyoların daha kaliteli olabileceğini gösteren çalışmalar rapor edilmiştir (13,15,17).

4.3. OKSİJENLİ SOLUNUM VE ROT

Memeli hücrelerindeki solunum şekli olan oksijenli solunum mekanizması, oksijenin besinlerin yakılması sırasında kullanılması ile enerji üretilmesi esasına dayanır. Buna göre solunum; hidrojen ile oksijenin suyu oluşturmak üzere gelişen kontrollü reaksiyonundan, hücrelerin enerjiyi ATP şeklinde ürettikleri işlem olarak tanımlanabilir. Üretilen enerji, ısı dahil, yaşam için gerekli olan tüm eylemlerde tüketilir. Enerji tüketimi ise çeşitli metabolitlerin ortaya çıkması ile sonuçlanır (4).

Oksijenin kullanılması ve enerji üretim işlemi, hücrenin mitokondri denen organellerinde gerçekleştirilir. İki adet membranla kaplı olan bu organelin iç ve dış membranları ile membranarası bölgesinde, oksidatif fosforilasyon ve elektron taşıyıcı sisteme ait bileşik ve enzimlerin bulunduğu bilinmektedir (30).

4.3.1. Reaktif Oksijen Türevleri (ROT)

Serbest radikaller, tüm aerobik hücrelerde normal mitokondrial respirasyon yani oksijenli solunum sırasında oluşan, özelleşmiş fagositik hücreler tarafından bakterilerin yok edilmesinde kullanılan, toksik ilaçlar ve metabolitlerinin intraselüler metabolizmasının yan ürünü olarak ortaya çıkan moleküllerdir (4). Hücresel hasar, mutagenез, kanser ve biyolojik yaşlanmayla ilgili dejeneratif süreçte aldıkları rolün dışında, guanilat siklaz aktivasyonu, T-hücre büyüme faktörü olan interlökin-2 (IL-2)'nin üretimi, heme oksijenaz

gen ekspresyonu ile memeli hücrelerinde nükleer faktör κ B (NF- κ B) transkripsiyon faktörünün aktivasyonu, damar tonusunun düzenlenmesi, oksijen basıncının algılanması, oksijen konsantrasyonu ile kontrol edilen fonksiyonların düzenlenmesi, çeşitli membran reseptörlerinde sinyal iletiminin artırılması ve redoks homeostazisinin korunması gibi yararlı işlevleri de vardır (31).

Oksijen radikalleri aerobik solunumda oksijen kullanımının bir sonucu olarak tüm memeli hücrelerinde sürekli üretilirler. Triplet haldeki moleküler oksijenin univalan indirgenmesi ile süperoksit anyonu meydana gelir. Bu olaya nikotinamid dinükleotid fosfat (NAD(P)H) oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler ile mitokondrial elektron transport zincirinin semi-ubiquinon bileşeni gibi non-enzimatik redoks-reaktif bileşikler aracılık eder. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksiti enzimatik olarak hidrojen peroksite dönüştürür. İndirgenmiş geçiş metalleri varlığında (örneğin ferröz ve küpröz iyonlar) hidrojen peroksite (H_2O_2), ileri düzeyde reaktif olan hidroksil radikaline ($\cdot OH$) dönüştürülebilir (4). Bu türevler hücre membranlarından kolayca geçerek lipid, protein ve nükleik asit gibi birçok hücresele moleküle hasar verirler. Sonuçta mitokondrial değişimler, hücresele blok, ATP eksikliği veya apoptoz (progamlanmış hücre ölümü) gibi hücresele olaylarla sonuçlanabilir (4).

Lipidler: ROT, lipid peroksidasyonunu indükleyerek hücre bölünmesi, metabolit transportu ve mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına yol açabilir. Fare embriyolarındaki 2-hücreli aşamada gelişen blok olayında lipid peroksitlerinde artış saptanmıştır (5).

Proteinler: ROT, protein sülfidril oksidasyonu ve disülfid oluşumunu indükler. Oksidatif stresteki artış hücre içindeki disülfid bağı sayısındaki artışa ve mikst disülfid formasyonlarına neden olur. Sonuç olarak, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (G_3PDH) gibi enzimlerin inaktivasyonu meydana gelebilir (5).

DNA: ROT, nükleer DNA iplik kırıklarına yol açar. Spermatozoa hücreleri ROT'ne maruz kaldıklarında nükleer DNA fragmentasyonunda 4 katlık bir artış gözlenmiştir. Bu tür DNA lezyonları embriyoda gelişimsel duraklamaya neden olabilmektedir (5).

Mitokondrial değişimler: Oksidatif stres mitokondriyal hasara neden olur. Mitokondriyal DNA (mtDNA) mutasyonlara özellikle duyarlıdır, çünkü normalde ROT'ni etkisizleştirebilen histon proteinlerinden yoksundur. Oksidatif stres esnasında mtDNA'daki mutasyonlar, nükleer DNA'dakinin yaklaşık 4 katı kadar gözlenmektedir. mtDNA

OXPPOS (oksidatif fosforilasyon) sistemine ait esansiyel enzimleri kodlamaktadır. Embriyo mtDNA'sının bozuk olması metabolik disfonksiyona neden olarak embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyecektir. Bu olumsuz etkiler embriyoda gelişimsel gecikme veya duraklama, metabolik disfonksiyon ve apoptoz gibi olayları kapsamaktadır (5,30).

4.3.2. ROT'un Oosit ve Embriyo İçinde Üretimi

Embriyo tarafından başlıca H_2O_2 , süperoksit anyonu (O_2^-) ve OH üretilmektedir. Bu üretimin miktarı in vitro kültür koşullarında özellikle önem taşımaktadır. Yapılan fare embriyo çalışmalarında in vitro ortamda embriyoların in vivo ortama göre daha yüksek miktarda H_2O_2 ürettikleri gösterilmiştir (5). Üretilen ROT miktarı gelişimsel evreye göre farklılık göstermektedir. Farelerde ROT'nde artış iki ayrı zamanda gözlenmektedir: fertilizasyon aşamasında ve ikinci hücre bölünmesinin G_2/M fazında.

ROT, direkt olarak gamet veya embriyolardan kaynaklanabileceği gibi çevresel kaynaklı da olabilir.

ROT'nin endojen kaynakları: ROT'nin endojen kaynakları arasında oksidatif fosforilasyon gibi çeşitli metabolik yollar, ve NADPH oksidaz, ksantin oksidaz gibi çeşitli enzimler gösterilebilir.

Ekzojen kaynaklı ROT üretiminde ise oksijen konsantrasyonu, metalik katyonlar, ışık, amin oksidaz enzimi ve spermatozoa rol oynamaktadır.

Oksidatif fosforilasyon: İmplantasyon öncesi bir embriyo OXPPOS ve glikoliz yoluyla ATP üretmektedir. OXPPOS'un inhibisyonu ROT oluşumunu azaltır, domuz ve sığır embriyolarında in vitro gelişim üzerinde pozitif etkisi vardır. Fare embriyosunda oksijenin %70'i blastosist aşamasında, %30'u da 2-4 hücreli dönemde OXPPOS yoluyla metabolize edilmektedir (5).

NADPH oksidaz: Tavşan blastosist yüzeyinde süperoksit anyonu ve H_2O_2 'in NADPH aracılı üretimi tanımlanmıştır. Ayrıca, 2 hücreli fare embriyolarının NADPH oksidaz inhibitörü ile inkübasyonunun, H_2O_2 üretiminde konsantrasyona bağımlı bir azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir (5).

Ksantin oksidaz: Ksantin, farede implantasyon öncesi gelişim süresince purin metabolizmasının esas son ürünü olduğu ileri sürülmektedir. Ksantin oksidazın inhibisyonu, embriyolardaki ROT miktarında azalmayı indüklemektedir. Hipoksantin ise

fare embriyolarında 2 hücreli aşamada blok oluşturmaktadır. Pürin ise in vitro koşullarda fare embriyosunun gelişimini inhibe etmektedir (5).

Siklooksijenaz: Araşidonatın prostanoidlere dönüştürülmesine aracılık eden bir enzim olan siklooksijenazın miktarı inflamatuvar koşullarda artar. Bu da ROT üretimine neden olur (32).

P450 sistemi: Kolesterolde steroid hormon sentezlenmesi sırasındaki metabolik süreçte görev alır.

ATP'nin tükenmesi: Hücrede G₃PDH ve/veya glikolitik ve mitokondrial yolların inaktivasyonu ATP tükenmesine yol açar. Oksidatif stres GSH (Glutasyon peroksidaz) gibi çeşitli indirgeyici ekivalanların tüketimini indükler. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi GSH endojen havuzunun korunmasını sağlar. GR, NADPH bağımlıdır ve monofosfat yolundaki (pentoz fosfat yolu) NADPH'ın ana kaynağıdır. İndirgeyici ekivalanların yarışmalı tüketimi yolu ile oksidatif stres, önemli metabolik fonksiyonları bozabilir ve monofosfat yolunu indükleyerek glukozu diğer yollardan ayırır.

4.3.3. ROT'ne Karşı Savunma Mekanizmaları

Aktif metabolizma ve steroidogenez nedeniyle ROT'nin üretimi üreme sistemindeki dokularda fazla olduğundan, bu dokular devamlı oksidatif stres altındadır. Bu yüzden in vivo ortamda embriyo ve çevresinde çeşitli savunma mekanizmaları mevcuttur. ROT'den kaynaklanan riskin en aza indirilmesi için çeşitli antioksidatif sistemler gelişmiştir. Çeşitli enzimler ve non-enzimatik bileşikleri içeren bu antioksidanlar foliküler sıvıda ve ovidukt sıvısında ROT savıcısı görevi yaparak oksidatif stresin hasarlarından korunmada rol oynarlar (5).

Fizyolojik miktarlarda ROT, hücrenin antioksidan sistemleri ile zararsızlaştırılabilirken, daha yüksek miktarda üretildiklerinde mitokondriyal hasar, embriyonel blok, ATP depleksyonu ve apopitoz gibi kötü sonuçlar doğurabilirler (5).

4.4. ROT’NİN EMBRİYODAKİ ETKİLERİ

ROT normal embriyo metabolizması sırasında da üretilir ve bunu hemen takiben savunma mekanizmalarının aktivasyonu gözlenir. ROT oluşumuna karşı savunma hem endojen hem de eksojen mekanizmalar aracılığıyla olur. Endojen yolla savunma daha önce sözü geçen savunma mekanizmaları aracılığıyla yapılır. Eksojen savunma ise oviduktal çevredeki salgı maddeleri yoluyla gerçekleştirilir (33).

ROT düzeyindeki artışın embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur (10). Yüksek ROT oranlarına maruz kalındığında 1.gün embriyolarında yavaş gelişim (3. günde <7 hücre), fragmentasyon artışı (> % 10) ve normal morfolojide blastosist elde etme yüzdesinde azalma bildirilmiştir (10). Ayrıca ICSI uygulamalarında fertilizasyon oranlarında da anlamlı azalma kaydedilmiş, klinik gebelik oranları ise hem IVF hem de ICSI uygulamalarında daha düşük bulunmuştur (10).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
1. GSperm	Vitrolife	10070
2. HTFw/Hepes	LifeGlobal	GMHH-250
3. HTF	LifeGlobal	GMHT-100
4. Global	LifeGlobal	LGGG-050
5. PVP	LifeGlobal	LPVP-001
6. HSA	LifeGlobal	GHSA-005
7. Hyaluronidase	LifeGlobal	LGHY-010
8. Paraffin Oil	LifeGlobal	LGPO-100

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

İnfertilite nedeni ile başvuran standart grup (5 ve üzeri MII yumurta elde edilmiş, 37 yaşını aşmamış, motil ve normal morfolojiye sahip spermiler ile enjeksiyonu yapılmış, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıpları gibi implantasyon öncesi genetik tanı endikasyonları içermeyen) 214 vaka bu çalışmaya dahil edilmiştir. Vakalar %5 O₂ ve %20 O₂ konsantrasyonu içeren inkübatörlere randomize olarak yerleştirilmiştir.

5.3. ICSI

5.3.1. Hastanın Hazırlanması

Overlerin stimülasyonu, gonadotropin salgılatıcı hormon GnRH analogları (Suprecur; Hoechst AG, Frankfurt, Almanya) ve insan menopozal gonadotropinleri (HMG; Pergonal; Serono, Aubonne, İsviçre, Humegon; Organon, Oss, Hollanda) ya da folikül stimulan hormonların (FSH) birlikte kullanımlarını içeren protokol ile gerçekleştirildi. Hastanın folikülleri yeterli büyüklüğe (18 mm ve üzeri) ve östrojen seviyesi istenilen seviyeye ulaştığında insan koryonik gonadotropini (HCG) enjeksiyonu (5000 ya da 10000 IU: Profasi; Serono, Pregnyl; Organon) uygulandı. Overlerin tedaviye verdiği yanıt, ultrason taramaları ve serum östradiol seviyelerinin ölçülmesiyle takip edildi.

5.3.2. Yumurta Toplama İşlemi ve Kumulus ve Korona Hücrelerinin Temizlenmesi

Oosit toplanması işlemi transvajinal ultrasonografi eşliğinde genel anestezi altında yapıldı. İşlem için tek yada çift lümenli steril iğneler kullanıldı. İşlem sırasında oosit kalitesini ve embriyo gelişimini etkileyebilecek olan ısı, osmolarite ve pH değişimlerini en aza indirmek için, oositler en kısa zamanda kültür medyumuna (Global, LifeGlobal, Amerika) alınıp inkübatöre kaldırıldı.

Daha sonra oosit kumulus diseksiyonu gerçekleştirildi. Etrafında kumulus hücresi kalmamış olan oositlerin stereo mikroskop altında X110 büyütmede maturasyon değerlendirmesi yapıldı. Metafaz II fazındaki oositler (sitoplazması homojen görünümlü ve

birinci polar cisimciği bulunan oositler) belirlendi ve HTF (GMHT-100, LifeGlobal, Amerika) içeren 8+3 petri kaplarına aktarıldı.

5.3.3. Swim-Up Tekniği

Swim-up uygulamasında progressif motiliteye sahip spermatozoaların yıkanmış peletten ayrılıp, taze kültür medyumuna yüzmesi sağlandı. Swim-up uygulaması şu şekilde gerçekleştirildi:

Likefaksiyon tamamlandıktan sonra bir pastör pipeti ile semen birkaç kez pipetlendi. Semen 5 veya 10 ml lik pipet (Falcon 7543 ve Falcon 7551) vasıtasıyla 15 ml (Falcon 2095) konik santrifüj tüpüne alındı. Bu sırada hacmi ölçülüp kaydedildi. 5 µl alınarak makler sayma kamarasına yerleştirildi. Aynı miktarda sperm yıkama mediumu tüpe ilave edilip birkaç kez pipetlenerek karışmaları sağlandı. Bu süspansiyon 4 adet (Falcon 2095) santrifüj tüpüne paylaştırıldı (aynı tüp + üç yeni tüp). 10 dakika 800 rpm' de santrifüj (Heraus –Labofuge 400) edildi. Supernatant pastör pipeti kullanılarak 10 ml (Falcon 2001) tüp içerisine aktarıldı ve bu tüp atıldı. Her tüpe 0.5'er ml sperm yıkama mediumu (G-sperm, Vitrolife, USA) ilave edilip birkaç kez pastör pipeti ile pipetlenerek karışması sağlandı. 10 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant pastör pipeti kullanılarak 10 ml (Falcon 2001) tüp içerisine alındı. Her tüp üzerine 0.25 ml sperm yıkama mediumu yavaş yavaş ilave edildi. Bu dört tüp bir saat inkübasyona bırakıldı. Supernatantlar pastör pipeti kullanılarak bir 5 ml (Falcon 2003) tüp içerisine alındı. 5 µl alınarak Makler sayma kamarasına yerleştirildi, sperm parametreleri değerlendirildi.

5.3.4. Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI)

Mikroenjeksiyon işlemi Hoffman modülasyonu olan inverted mikroskopun ısıtıcı tablası üzerinde X400 büyütme ile yapıldı.

Mikroenjeksiyon işleminde morfolojik olarak normal görünümlü ve motil spermier seçildi. Mikroenjeksiyon pipetinin uç kısmı ile sperm boynuna yakın kısmından hafifçe immobilize edildi ve kuyruğa doğru pipet ucu ileri geri kaydırılarak sperm kendi etrafında döndürüldü. Sonunda ani bir hareketle kuyruğun kıvrılması ve sperm membranının zedelenmesi sağlandı. Bu işlem poli vinil propilen (PVP) (LPVP-001; LifeGlobal,

Amerika) içinde gerçekleştirildi. Enjeksiyon pipeti oosit sitoplazması içine ulaştırıldığında hafif bir aspirasyon yapıldı. Ooplazmanın pipet içine yavaşça dolması ve spermin geriye doğru hareketlenmesi oolemma membranının aşıldığının göstergesiydi. Yavaşça aspire edilen sitoplazma ve sperm geri verildi. Bu işlem tüm oositlerde aynı sıra ile uygulandı. İşlem esnasında sperm, oosit morfolojisi ve mikroenjeksiyon ile ilgili tüm bilgiler sıra ile ICSI takip formuna kayıt edildi. Mikroenjeksiyon sonrası oositler sırayla dropletlerden alındı ve aynı kişiye ait petri kabında orta dropletlerde 3 kez pipetlenerek Hepes'li (HTFw/Hepes, LifeGlobal, Amerika) solüsyondan temizlendi. Yerleştirme işlemi bittikten sonra oositlere işlem sırasına göre verilen numaralar droplet yanına yazıldı ve inkübatöre kaldırıldı.

5.3.5. Fertilizasyonun Değerlendirilmesi (1.gün)

Fertilizasyon kontrolü mikroenjeksiyon işleminden 12-18 saat sonra yapıldı. Fertilizasyon 2 pronükleus ile birinci ve ikinci kutup cisimciğinin tespiti ile değerlendirildi.

Sabah yapılan fertilizasyon kontrolünden sonra takip formuna fertilizasyon görülen oositler, fertilizasyon gözlenmeyen (intakt) oositler kaydedildi. Daha sonra fertilizasyon gözlenen oositler bir gün önce hazırlanan yeni Global (LGGG-050; LifeGlobal, Amerika) medyum dropletleri içeren kültür kaplarına (6+1) sırasıyla alındı.

5.3.6. Embriyo Değerlendirilmesi (Klivaj Dönemi)

Üçüncü gün dönemindeki embriyolar değerlendirilirken blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, embriyonun içerdiği fragmantasyon ve sitoplazma yapısı göz önüne alındı. Klivaj hızına göre embriyonun sahip olduğu blastomer sayısı şayet günün beklenen limitleri arasında ise normal gelişen bir embriyo, eğer bu sayı düşükse yavaş gelişen bir embriyo olarak değerlendirildi. Normal klivaj hızına sahip bir embriyo 24-25. saatte 2 hücre, 2.günde 3-4 hücre, 3.günde 6-8 hücre ve 4.günde ise birleşme işaretlerine bağlı olarak 10 ve üzerinde hücreye sahip olan embriyo olarak değerlendirildi.

Gelişim günlerine bağlı olarak embriyoların değerlendirilmesinde kullanılan sınıflandırma sistemi ve her bir sınıfa ait tanımlama kriterleri aşağıdadır:

1. Eşit blastomer morfolojisine sahip, fragmentasyon veya granülasyon işaretleri göstermeyen embriyo.
2. Eşit blastomer morfolojisine sahip, %5-10 oranında fragmentasyon içeren veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
3. Blastomerler birbirinden hafifçe farklı, %10 üzerinde fragmentasyona sahip veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
4. Blastomer sayısı net sayılamayan, %30 dan fazla fragmentasyona sahip, blastomerler birbirinden belirgin derecede farklı veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo.

5.3.7. Blastosist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi

Bu aşamada oluşan embriyonun yapısal değerlendirmesinde kullanılan üç temel kriter blastosel kavite yapısı, trofoektoderm hücrelerinin yapısı ve dizilimi, ve iç hücre kütlelerini oluşturan hücrelerin sayısı ve yapısıdır. Blastosel kavite oluşumuna göre sınıflandırma kriterleri aşağıdadır:

1. Erken Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından azdır.
2. Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından fazladır.
3. Tam Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün tümünü kaplamıştır.
4. Geniş Blastosist: Blastosel kavitesi volümü artmış, çap büyümüş, zona iyice incelmıştır.
5. Zona Pellusidasından Çıkmakta olan Blastosist: Trofoektoderm hücrelerinin bir kısmı zona katmanı dışına çıkmaya başlamıştır.
6. Zona Pellusidasından Tamamen Çıkmış Blastosist: Embriyo tümüyle zona katmanı dışına çıkmıştır.

İç Hücre Kitlesi (ICM) Yapısına Göre Sınıflandırma:

- a) Sıkı, paket şeklinde çok sayıda hücre içermesi.
- b) Gevşek bir grup halinde çok sayıda hücre içermesi.
- c) Çok az hücre içermesi.

Trofoektoderm Yapısına Göre Sınıflandırma:

- a) Birbirine sıkıca bağlı birçok hücreden oluşan epitel.
- b) Daha gevşek bağlı birkaç hücreden oluşan epitel yapı.

Bu çalışmada fertilizasyon oranı, fertilize olan yumurta sayısının enjeksiyon işlemi uygulanan yumurta sayısına oranı olarak hesaplanmıştır.

İyi kaliteli embriyo oranı, 3. günde grade 1 ve 2 olan embriyoların tüm embriyolara oranı, kötü kaliteli embriyo oranı ise grade 3 ve 4 olan embriyoların tüm embriyolara oranı, 5. günde ise blastosist oluşturan embriyoların tüm embriyolara oranı olarak hesaplanmıştır. 5. günde grade a ve b ICM içeren embriyoların tüm embriyolara oranı iyi kalite ICM, grade a trofoektoderme sahip embriyoların tüm embriyolara oranı iyi kalite trofoektodermi belirtmektedir.

Normal bölünme hızına sahip embriyo oranı, 3. günde 6 veya daha fazla blastomerli embriyo sayısının toplam embriyo sayısına oranı alınarak hesaplanmıştır.

5.3.8. Transfer İşlemi

Steril transfer kateteri, içinde kültür ortamı bulunan tüpe daldırılıp air-tight enjektör ile 0.5-1.0 ml serum çekilerek boşaltıldı. Bu işlem 3-4 kez tekrarlandı. Ardından içinde tranfer edilecek tüm embriyoların bulunduğu droplete gidildi ve embriyolar katetere alınmadan önce 20-25 mikrolitre medyum çekildi. Daha sonra embriyolar çekildi. Kateter kılıfı içerisinde transfer odasına götürüldü. Transfer sonrası kateter enjektörden çıkarıldı ve içerisinde embriyo kalıp kalmadığı kontrol edildi.

5.3.9. Gebelik

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. Bu çalışmada adı geçen gebelik oranı, gebe vaka sayısının toplam vaka sayısına oranı alınarak hesaplanmıştır. İmplantasyon oranı ise fetal kalp atımı gözlenen kese sayısının transfer edilen embriyo sayısına oranı olarak değerlendirildi.

5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney-U ve Chi-Square testleri kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

6. BULGULAR

Çalışma, yaşları 22 ile 37 arasında değişmekte olan toplam 214 ICSI olgusu üzerinde yapılmıştır. Olguların tamamı standart olarak tanımlanan gruba ait olup yaş ortalamaları 30.25 ± 4.69 dur. Çalışmaya erkek infertilitesi, <5 MII oosit sayısı, >37 yaş ve herhangi bir genetik tanı endikasyonu taşıyan vakalar dahil edilmemiştir. Tüm olgulara ICSI işlemi uygulanmıştır. Olgular, embriyoları oksijen kontrollü ($\%5$ O_2 konsantrasyonu içeren) ve oksijen kontrollü olmayan ($\%20$ O_2 konsantrasyonu içeren) inkübatörlere yerleştirilen olgular olmak üzere randomize şekilde iki gruba ayrılmıştır. Bu kriterlere uygun 113 olgu $\%5$ 'lik, 101 olgu ise $\%20$ 'lik gruba dahil edilmiştir. Embriyolara ait skorlamalar birinci, üçüncü ve gerekli durumlarda beşinci günlerde yapılmıştır.

ICSI uygulanan 214 olgunun tamamına transfer işlemi yapılabilmektedir. Embriyolara ait olarak değerlendirilen parametreler fertilize oosit sayısı, üçüncü günde blastomer sayısı, üçüncü günde fragmantasyon, üçüncü gün iyi kalite embriyo sayısı, üçüncü gün kompaktlaşma, beşinci gün blastosist oluşturma, beşinci gün iyi kalite iç hücre kütlesi oluşturma ve beşinci gün iyi kalite trofoblast oluşturma kriterlerinden oluşmaktadır. Değerlendirilen diğer parametreler ise gebelik oranları ve implantasyon oranlarıdır. Bu parametreler dikkate alınarak oksijen konsantrasyonunun ICSI sonrası embriyo gelişimi ve gebelik üzerine olası etkileri değerlendirilmiştir.

İki grup, yaş, oosit sayısı, embriyo sayısı ve transfer edilen embriyo sayısı açısından benzerdir.

Grupların yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$), (Tablo 1).

Elde edilen total oosit sayıları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$), (Tablo 1).

ICSI uygulanan olgun oosit (MII) sayıları, gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir ($p>0.05$), (Tablo 1).

Grupların transfer edilen embriyo sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$), (Tablo 1).

	%5 O₂ (Ort ± SD)	%20 O₂ (Ort ± SD)	p
Yaş	29.76 ± 4.82	30.75 ± 4.56	0.165
Total oosit sayısı	15.06 ± 6.12	14.86 ± 6.27	0.701
Olgun yumurta (MII) sayısı	11.69 ± 7.00	14.86 ± 6.27	0.346
Fertilize oosit sayısı (2 PN)	85.30 ± 12.06	85.07 ± 11.79	0.854
3. günde ≥ 6 blastomer sayısı oranı (%)	77.51 ± 20.24	73.02 ± 24.00	0.266
3. günde fragmantasyon oranı (%)	3.66 ± 3.94	3.79 ± 4.12	0.571
3. gün iyi kalitede embriyo oranı (%)	87.58 ± 16.96	87.43 ± 17.20	0.894
3. gün kompaktlaşma oranı (%)	26.27 ± 26.85	19.09 ± 24.43	0.024
5. gün blastosist oluşturma oranı (%)	83.73 ± 18.57	66.29 ± 23.74	0.006
5. gün iyi kalitede iç hücre kütlesi oranı (%)	98.35 ± 6.24	77.66 ± 22.63	0.000
5. gün iyi kalitede trofoblast oluşumu	61.03 ± 29.09	51.42 ± 37.00	0.345
Transfer edilen ortalama embriyo sayısı	2.66 ± 0.71	2.82 ± 0.66	0.101
Gebelik oranı (%)	65	57	0.247
İmplantasyon oranı (%)	56.96 ± 26.48	50.20 ± 22.32	0.232

Tablo 1. Parametrelerin gruplara göre dağılımı. İstatistiksel anlamlılık: p<0.05.

Fertilizasyon Oranları

%5 O₂ grubu olgularının fertilizasyon oranları ortalaması %85.30 ± 12.06, %20 O₂ grubu olgularının fertilizasyon oranları ortalaması ise %85.07 ± 11.79 olarak saptanmıştır. İki grup arasında fertilizasyon oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı saptanmıştır (p=0.854).

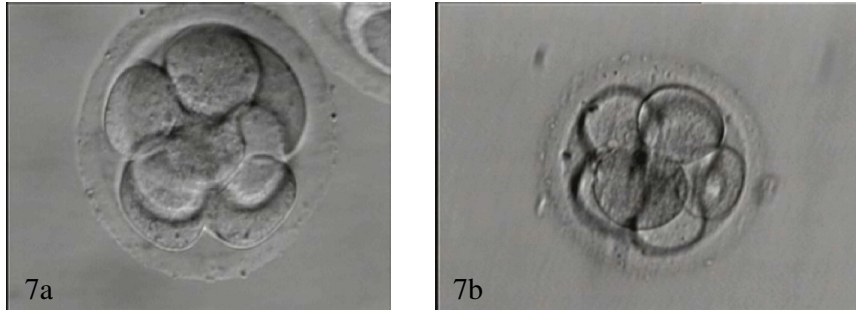
Olgularımızdan birine ait fertilize olmuş bir yumurta, sitoplazmasındaki 2 pronükleus ile görülmektedir (Resim 6).



Resim 6. Olgu 21'e ait fertilize olmuş bir oosit görülmektedir X400.

Üçüncü Günde ≥6 Blastomerli Embriyo Elde Etme Oranları

%5 O₂ grubu olgularının üçüncü günde ≥6 blastomerli embriyo elde etme oranları ortalaması %77.51 ± 20.24, %20 O₂ grubu olgularının ortalaması ise %73.02 ± 24.00 olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.266). Resim 7a'da %5 O₂ grubuna ait bir embriyo ile 7b'de %20 O₂ grubuna ait bir embriyo görülmektedir.



Resim 7. Sekiz blastomerli embriyolar; %5 O₂ grubunda 66. vakaya ait embriyo (a), %20 O₂ grubunda 9. vakaya ait embriyolar (b) X200.

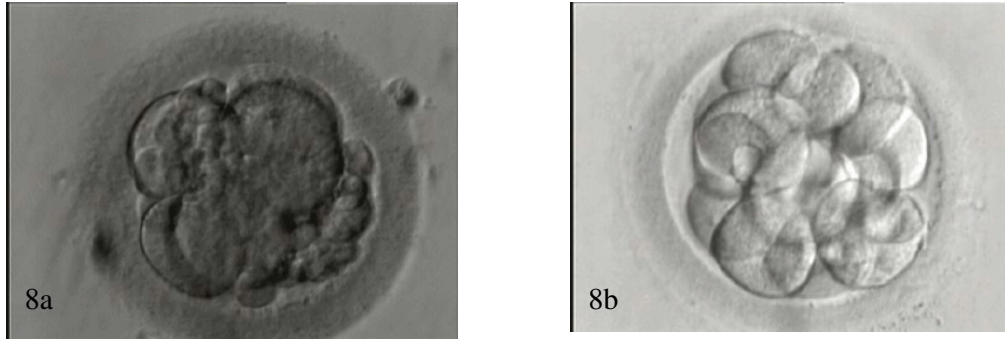
Üçüncü Günde Fragmantasyon Oranları

%5 O₂ grubu olgularının üçüncü günde fragmantasyon oranları ortalaması %3.66 ± 3.94, %20 O₂ grubu olgularının ortalaması ise %3.79 ± 4.12 olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.571).

Üçüncü Günde İyi Kalitede Embriyo Elde Etme Oranları

%5O₂ grubu olgularının üçüncü günde iyi kalitede embriyo elde etme oranları ortalaması %87.58 ± 16.96, %20 O₂ grubu olgularının ortalaması ise %87.43 ± 17.20 olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.894).

%20 O₂ grubundaki iki farklı vakada embriyo kaliteleri gösterilmektedir (Resim 8).

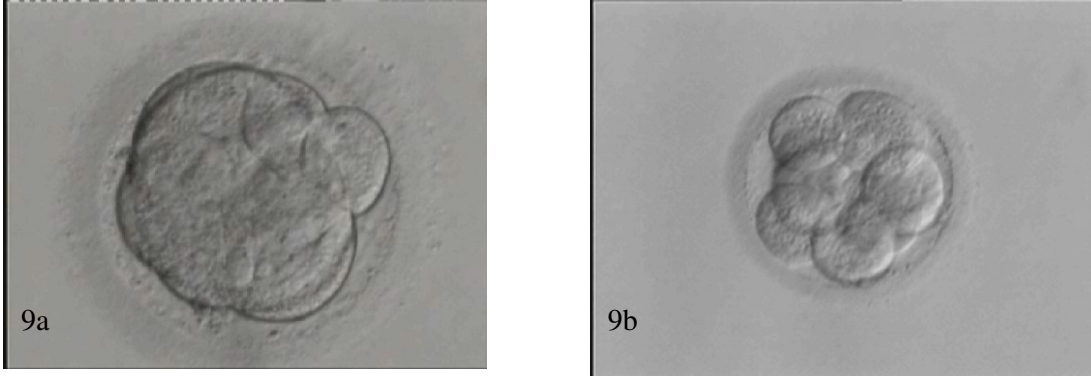


Resim 8. %20 O₂ grubuna ait 2 olguda 3. gün embriyolar; (a) 60. vakaya ait kötü kaliteli bir embriyo, 25. vakaya ait iyi kalite bir embriyo (b) X200.

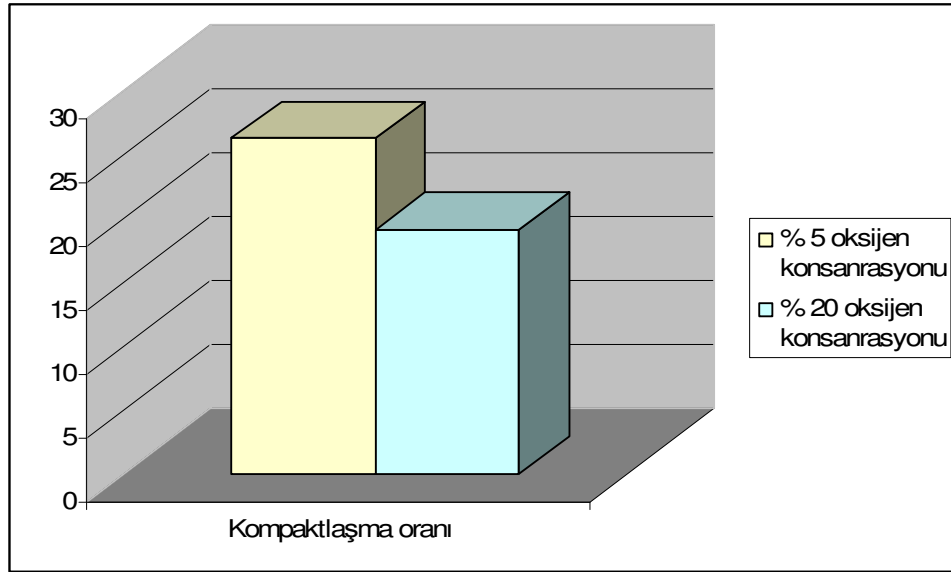
Üçüncü Gün Kompaktlaşma Oranları

%5 O₂ grubu olgularının üçüncü gün kompaktlaşma oranları ortalaması %26.27 ± 26.85, %20 O₂ grubu olgularının ortalaması ise %19.09 ± 24.43 olarak belirlenmiştir. %5 O₂ grubunda kompaktlaşma oranları, %20 O₂ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (p=0.024), (Şekil 1).

Resim 9a'da %5 O₂ grubuna ait bir embriyo ile 9b'de %20 O₂ grubuna ait bir embriyo görülmektedir.



Resim 9: %5 O₂ grubunda 49. vakaya ait 3 günlük embriyoda kompaktlaşma gözlenmektedir (a), %20 O₂ grubunda 23. vakaya ait 3 günlük embriyo gözlenmektedir. Kompaktlaşma henüz başlamamıştır (b) X200.

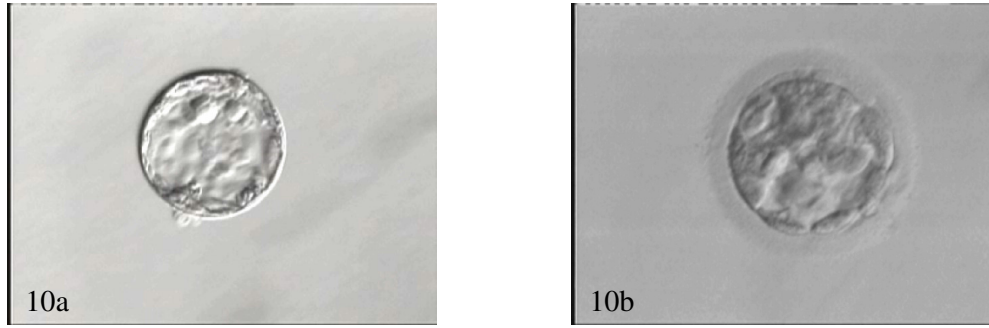


Şekil 1. Her iki grubun kompaktlaşma bakımından karşılaştırılması.

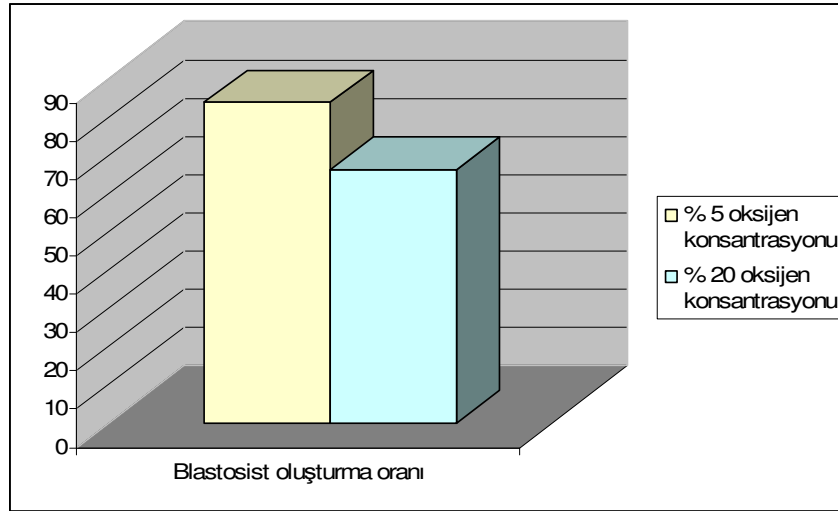
Beşinci Gün Blastosist Oluşturma Oranları

%5 O₂ grubu olgularının beşinci gün blastosist oluşturma oranları ortalaması %83.73 ± 18.57, %20 O₂ grubu olgularının ortalaması ise %66.29 ± 23.74 olarak belirlenmiştir. %5 O₂ grubundaki blastosist oluşturma oranları, %20 O₂ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (p=0.006), (Şekil 2).

Resim 10a'da %5 O₂ grubuna ait bir embriyo ile b'de %20 O₂ grubuna ait bir embriyo görülmektedir.



Resim 10: %5 O₂ grubunda 20. vakaya ait 5 günlük embriyoda blastosist oluşturma gözlenmektedir (a). %20 O₂ grubunda 51. vakaya ait 5 günlük embriyo izlenmektedir (b), kavitasyon henüz başlamıştır X200.

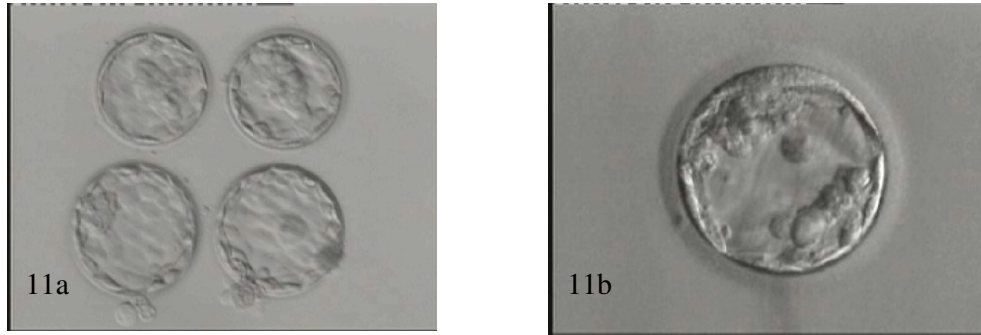


Şekil 2. Her iki grubun blastosist oluşturma oranları bakımından karşılaştırılması.

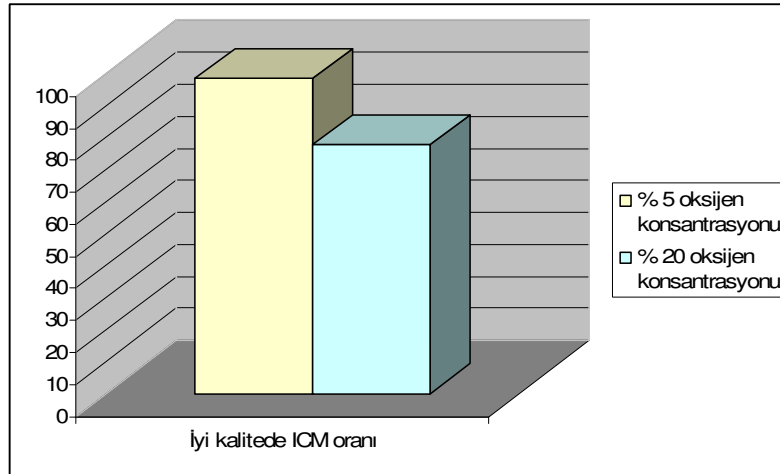
Beşinci Gün İyi Kalitede İç Hücre Kütlesine Sahip Olma Oranları

%5 O₂ grubu olgularının beşinci gün iyi kalitede iç hücre kütlesi oluşturma oranları ortalaması 98.35 ± 6.24 , %20 O₂ grubu olgularının ortalaması ise 77.66 ± 22.63 olarak belirlenmiştir. %5 O₂ grubunda beşinci günde iyi kalitede iç hücre kütlesine sahip olma oranları %20 O₂ grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farkla daha yüksek bulundu ($p < 0.001$), (Şekil 3).

Resim 11a'da %5 O₂ grubuna ait bir embriyo ile 11b'de %20 O₂ grubuna ait bir embriyo görülmektedir.



Resim 11: %5 O₂ grubunda 38. vakaya ait 5 günlük embriyolarda iyi kalitede iç hücre kütlelerinin varlığı görülmektedir (a). %20 O₂ grubunda 59. vakaya ait 5 günlük embriyoda iç hücre kütlesi dağıktır ve hacim olarak küçüktür (b) X200.

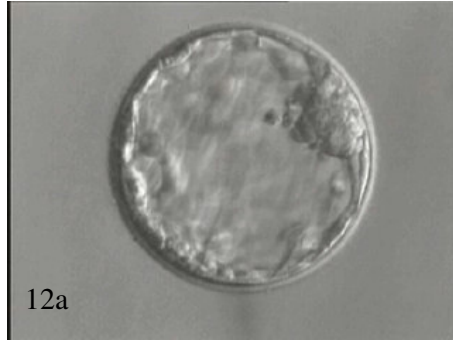


Şekil 3. Her iki grubun iç hücre kütleleri bakımından karşılaştırılması.

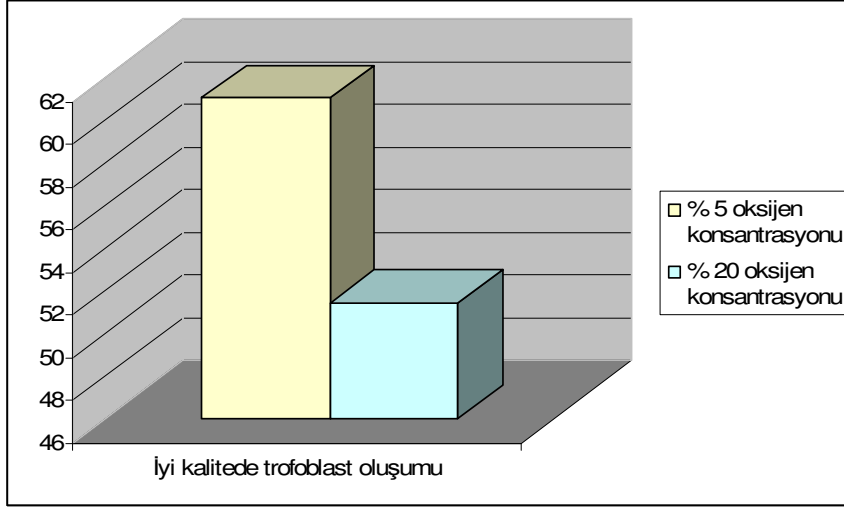
Beşinci Gün İyi Kalitede Trofoblast Hücre Tabakasına Sahip Olma Oranları

%5 O₂ grubu olgularının beşinci gün iyi kalitede trofoblast hücre tabakası oluşturma oranları ortalaması %61.03 ± 29.09, %20 O₂ grubu olgularının ortalaması ise %51.42 ± 37.00 olarak belirlenmiştir. %5 O₂ grubunda beşinci günde iyi kalitede iç hücre kütesine sahip olma oranları %20 O₂ grubuna göre yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.345), (Şekil 4).

Resim 12a'da %5O₂ grubuna ait bir embriyo ile b'de %20 O₂ grubuna ait bir embriyo görülmektedir.



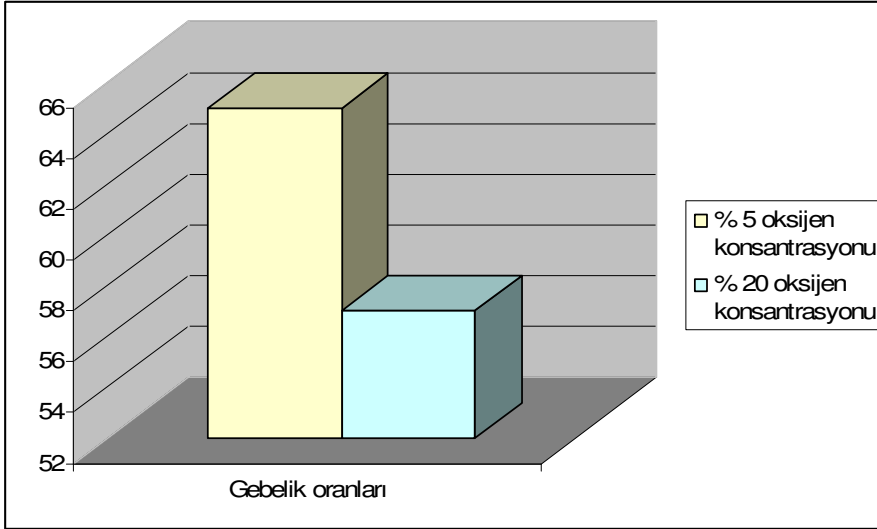
Resim 12: %5 O₂ grubunda 75. vakaya ait 5 günlük embriyolarda iyi kalitede trofoblast hücre tabakasının varlığı görülmektedir (a). %20 O₂ grubunda 14. vakaya ait 5 günlük embriyoda trofoblast hücre tabakası (b) X200.



Şekil 4. Her iki grubun trofoblast hücre tabakası gelişimi bakımından karşılaştırılması.

Gebelik Oranları

%5 O₂ grubu olgularının gebelik oranları ortalaması %65 ile %20 O₂ grubu olgularının gebelik oranları ortalaması %57 olarak belirlenmiştir. Gebelik oranları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın %5 O₂ grubunda biraz daha yüksek bulunmuştur (p=0.247), (Şekil 5).



Şekil 5. Her iki grubun gebelik oranları bakımından karşılaştırılması.

İmplantasyon Oranları

%5 O₂ grubu olgularının implantasyon oranları ortalaması %56.96 ve %20 O₂ grubu olgularının implantasyon oranları ortalaması %50.20 olarak belirlenmiştir. İmplantasyon oranları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın %5 O₂ grubunda biraz daha yüksek bulunmuştur (p=0.232).

6. TARTIŞMA

Embriyonun in vivo koşullarda maruz kaldığı oksijen oranı ovidukt ve uterusu farklı türlere bağlı olarak %2 ile %8 arasında değişmektedir (17). Ovidukt içindeki oksijen basıncı, atmosferik basıncın yaklaşık dörtte birine eşittir. Hücre içi fizyolojik oksijen konsantrasyonu yaklaşık ~10 mikromol/litre iken atmosferik oksijenle inkübe edilen medyumlarda bu miktarın 224 mikromol/litre olduğu bildirilmiştir. Yani fizyolojik koşullarda embriyolar hiçbir zaman atmosferik oksijene (%20) maruz kalmaz. In vitro kültür ortamında embriyoların atmosferik oksijene maruz bırakılması sonucunda ise embriyoda fazla miktardaki oksijenin toksik etkileri gözlenir (17).

ROT üretimi in vitro kültür şartlarında özellikle önemlidir. Bu ortamda gamet ya da embriyoların maruz kaldığı yüksek oksijen konsantrasyonu ROT üretiminde artışa ve antioksidan savunmada azalmaya neden olur (17).

Yapılan birçok hayvan çalışmasında in vitro ortamda atmosferik oksijenin embriyo gelişimini olumsuz etkilediği gösterilmiştir. %20 oksijen içeren koşullarda oluşan blastosistlerin hücre sayısının az olduğu ve normal morfolojiye sahip olsalar bile %5 oksijen koşullarına göre daha düşük olasılıkla gebelik meydana getirdiği gösterilmiştir (17,35).

İnsanda yapılan çalışmalarda ise %5 oksijenin aynı şekilde daha fazla sayıda blastosist oluşumunu sağladığı ve bu blastosistlerin hücre sayısının %20 oksijene göre daha fazla olduğu gösterilmiş fakat gebelik oranlarında fark olmadığı gözlenmiştir (36). Gebelik oranlarının neden değişmediği incelendiğinde ise bu vakalara ait embriyo transferlerinin 2. veya 3. günde yapıldığı gözlenmiş ve uterus içi ortamın bu embriyolardaki dezavantajı yok edebileceği üzerinde durulmuştur (37). Nitekim Karagenc ve arkadaşlarının 2004'te yaptıkları bir çalışma, embriyonun oksijen konsantrasyonuna en çok duyarlı olduğu aşamanın zigot aşaması olduğunu göstermiştir (17). Catt ve Henman 2000 yılında yaptıkları geniş kapsamlı bir çalışma ile %5 O₂ kullanılan kişilerde gebelik ve implantasyon oranlarının belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir (38).

%20 gibi yüksek konsantrasyonda oksijen içeren ortamda kültüre edilen embriyolarda süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türevlerine maruz kalma sonucu oksidatif stres gözlenmektedir. Oksijen

konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak embriyo içerisindeki H₂O₂ konsantrasyonunda aşamalı bir artış olduğu gösterilmiştir (39).

Biz bu çalışmada, yüksek oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak gözlenen fazla miktarda ROT üretiminin, embriyo üzerindeki olası olumsuz etkilerini incelemekteyiz.

şimdiye kadar yürütölen oksijen konsantrasyonu çalışmaları, transfer edilme günü bakımından 2., 3. ve 5. günleri aynı anda olacak şekilde dizayn edilmemiştir. Bu çalışmada ise 2., 3. ve 5. gün transferleri aynı çalışma içinde uygulanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada ayrıca, 2. ve 3. günde yapılan transferlerde uterin çevrenin yüksek oksijen konsantrasyonunun olası dezavantajını kompanse etme ihtimali de değerlendirilmiş olmaktadır.

Yine diğer bazı çalışmalarda embriyolar költüre edildikleri %20 oksijen konsantrasyonuna sahip inkübatörden, 2 veya 3 gün sonra oksijen konsantrasyonu %5 olan bir inkübatöre aktarılmıştır. Bu da sonucu etkileyebilmektedir. Biz bu çalışmada embriyoları költüre edildikleri konsantrasyonda sabit tutarak sonuçların güvenilirliğini artırdık. Böylece embriyolar oksijen konsantrasyonunun en önemli olduğu fertilizasyon aşamasında buldukları konsantrasyonda bırakıldılar.

Sonuçlarımız, şimdiye kadar yürütölen çalışmaları teyit eder niteliktedir. Buna göre; oksijen konsantrasyonunun %20'den %5'e indirilmesi fertilizasyon, bölünme, 3. günde kaliteli embriyo geliştirme ve 3. güne kadar bölünme hızı parametrelerini etkilemezken, morula ve erken morula oluşumu, erken ve zamanında blastosist gelişimi parametreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde iyileşme göstermiştir. Embriyo skorlarının daha yüksek oluşu ile kendini gösteren kalitenin, gebelik veya implantasyon olasılığının haricinde fetal gelişim sırasında da görölmesi muhtemel olumsuz etkileri en aza indirebileceği düşünölmektedir.

Düşük oksijen konsantrasyonunda gelişen blastosistlerde iç hücre kütlelerinde artış bulgumuzda yine literatür ile uyumludur. Yapılan bazı çalışmalarda blastosiste ait iç hücre kitlesindeki kalitenin gebelik parametrelerini olumlu yönde etkileyebileceği gösterilmiştir (34). Aynı şekilde trofoblast hücre tabakası da %20 oksijen konsantrasyonunda inkübe edilen embriyolara oranla daha fazla sayıda (daha yoğun) hücre içermektedir (34).

Gebelik ve implantasyon oranlarına bakıldığında iki grup arasında anlamlı fark olmamasına rağmen %5'lik oksijen grubu oranında bir miktar artış kaydedilmiştir. İki grup arasında transfer günleri bakımından fark olmamasına karşın gebelikte gözlenen bu

iyileşme, %5 oran ile kullanılan oksijen gazının embriyolar üzerinde olumlu etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

7. SONUÇ

Bu çalışmada, infertilite nedeniyle Yardımcı Üreme Teknikleri ve Genetik Merkezine başvuran vakalara ait embriyolarda, atmosferik ve %5'lik oksijen konsantrasyonlarının, implantasyon öncesi embriyolojik gelişim ve gebelik oranları üzerine etkilerini inceledik.

Bulgularımız göstermiştir ki, uterus oksijen konsantrasyonuna uygun olan %5'lik oksijen konsantrasyonunun, atmosferik oksijen konsantrasyonuyla karşılaştırıldığında implantasyon öncesi embriyolojik gelişim ve gebelik oranları üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. İstatistiksel olarak bakıldığında, %5'lik oksijen konsantrasyonu grubunda 3. gün kompaktlaşma oranı, 5. günde blastosist oluşturma oranı ve iyi kalite iç hücre kütle oranı anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bununla beraber gebelik oranları %5'lik oksijen konsantrasyonu grubunda %20'lik grupla karşılaştırıldığında bir miktar yüksek bulunmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bu bulgular ışığında, %5 oksijen konsantrasyonu grubunda 3. ve daha sonraki günlerde embriyo kalitesinde gözlenen bu artışın daha ileri embriyonel ve fetal gelişimler sırasında sonuçları nasıl etkileyebileceği ve daha fazla olgu sayısı ile gebelik oranlarında gözlenmesi olası farkların hangi boyutta olabileceği konusunda daha fazla çalışma yürütülmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

8. TEŞEKKÜR

İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programım süresince sabır, anlayış ve bilimsel katkılarını benden esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Doç. Dr. Nedret Altıok'a, eğitim konusundaki daimi destekçimiz, İstanbul Memorial Hastanesi Tüp Bebek ve Genetik Merkezi direktörümüz Prof. Dr. Semra KAHRAMAN'a, iyi niyet ve anlayışlarıyla hep arkamda olan laboratuvar sorumlum Semra SERTYEL ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans hayalimi gerçeğe dönüştürmeme olanak sağlayan sevgili babam, her dersimi benim kadar ciddiye alıp her sınavı benimle birlikte veren canım annem, katkılarından dolayı ağabeyim ve yengem, uzaktaki özlemim ablam, varlığımız için teşekkürler...

Korkulu rüyam istatistikteki yardımcım Seda Yılmaz'a çok teşekkürler...

Ve... Hayatımdaki önemini, yerini, desteğini kelimelerle ifade edemeyeceğim büyük aşkım Pelin Kutlu, iyi ki varsın...

10. KAYNAKLAR

1. Aksel S, Beksaç MS. Reproductive Endocrinology & Infertility Medical Network. 1993, 143-146.
2. Bras M, Lens JW, Piedeiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. Vy T. K. Phan, *National Medicine Publisher of Vietnam*, 2001.
3. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Op Obs Gyn*. 2006, 18(3):325-332.
4. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002, 82: 47-95.
5. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001, 7: 175-189.
6. Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *Jour Exp Zool*. 1978, 206: 73-80.
7. Pabon JE, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effects of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril*. 1989, 51: 1022-1027.
8. McKiernan SH, Bavister BD. Enviromental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod*. 1990, 43: 404-413.
9. Batt PA, Gardner DK, Cameron AWN. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 1991, 28: 601-607.
10. Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. 1992, 31: 28-33.
11. Goto Y, Noda Y, Mori, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radical Biol Med*. 1993, 15: 69-75.

12. Liu Z, Foote RH. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod.* 1995, 53: 786-790.
13. Berthelot F, Terqui M. Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the in vitro development of individually cultured porcine one and two-cell embryos. *Reprod Nutr Devel.* 1996, 36: 241-251.
14. Gardner DK, Schoocraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Op Obs Gyn.* 1999, 15: 69-75.
15. Takahashi Y, Kanagawa H. Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during in vitro insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development in vitro. *Vet Med Sci.* 1998, 60: 365-367.
16. Mastroianni L, Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *Reproduction.* 1965, 147: 99-102.
17. Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahceci M. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed.* 2004, 9:409-17.
18. Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online.* 2004, 9: 484-486.
19. Dumoulin JCM, Meijers CJJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JPM, Evers JLH. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod.* 1999, 14: 465-469.
20. Bahceci M, Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2005, 11: 438-443.
21. Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory and Clinical perspectives. *Taylor and Francis Press*, London, 2004.
22. Trounson A, Gardner D K. Handbook of in vitro fertilization. CRC Press, 2000.
23. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (sperm/oosit) fertilizasyon ve embriyoner gelişim. *Serono Yayınları*, Ankara, 2000.

24. 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.
25. Salumets A, Hyden-Ganskog C, Suikkari AM, Tütönen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod.* 2001,16: 2177-2181.
26. 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.
27. Han YM, Wang HW, Abeydeera LR, Petersen AL. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol Reprod.* 1999, 61: 1340-1346.
28. Nikas G, Ao A, Winston RM, Handyside AH. Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol Reprod.* 1996, 55: 32-37.
29. Klun V, Tomazevic T, Zorn B, L. Bacer-Kermavner, J. Mivsek, and H. Meden-Vrtovec. Blastocyst formation- Good indicator of clinical tests after ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2003, 18: 1070-1076.
30. Schatten H, Prather RS, Sun QY. The significance of mitochondria for embryo development in cloned farm animals. *Mitochondrion* 2005, 5: 303-321.
31. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao J-H, Xue X and Okumura K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- κ B and JNK. *Cell Death Differ.* 2006, 13: 730-737.
32. Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ. Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression and lowered prostaglandin E2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes.* 1999, 48: 813-820.
33. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod.* 2003, 18: 2270-2274.
34. Zakova J, Ventruba P, Crha I, Petrenko M, Stastna J. Does transfer of embryo at the blastocyst stage increase the risk of multiple pregnancy? *Scripta Medica.* 2000, 73: 195-200.

35. Harlow GM, Quinn P. Foetal and placental growth in the mouse after pre-implantation development in vitro under oxygen concentrations of 5 and 20%. *Austr Biol Sci.* 1979, 32: 363-369.
36. Dumoulin JC, Vanvuchelen RC, Land JA, Pieters MH, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on in vitro fertilization and embryo culture in the human and the mouse. *Fertil Steril.* 1995, 63: 115-119.
37. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.* 1995, 1: 91-148.
38. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod.* 2000, 15: 199-206.
39. Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS. Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *J Obstet Gynaecol Res.* 1999, 25:359-366.