

T.C.  
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**MONODÜZLEMDE ELDE EDİLMİŞ OTOLOG ENDOMETRİAL KOKÜLTÜR  
ÜZERİNDE GELİŞTİRİLEN EMBRİYOLAR İLE TEKRARLAYAN  
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLGULARINDA ARTAN GEBELİK VE  
HEDEF HASTA GRUBUNUN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazike Semra SÜMER**

DANIŞMAN  
**Prof. Dr. Tülay İREZ**

İSTANBUL - 2015

**T.C.  
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Tez Savunma Tarihi : 23 /10 / 2015**

**Prof.Dr.Tülay İrez  
Biruni Üniversitesi  
Jüri Başkanı**

**Prof.Dr.İmer Okar**

**Yrd.Doc.Dr.Shiva Akhavantabasi**

**Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

HAZİKE SEMRA SÜMER

## İTHAF

Bu mesleği seşmemi sağlayan ve her zaman tım kalbimle  
özlediğim canım babam FARUK SÜMER'e ...



## TEŞEKKÜR

Tezimin oluşturulmasındaki yardımlarından ve çalışmamın tüm aşamalarında destek ve ilgisini benden asla esirgemeyen Yenyüzyıl Üniversitesi Mütevelli Heyet Başkanı . Dr. Azmi Ofluoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Türkiye'de ilk Klinik Embriyoloji Programını kuran ve beni kabul ederek, yüksek lisansa başlamamı sağlayan , her aşamada yardım ve destek gösteren ,sadece benim değil Türkiye deki bir çok embriyoloğun eğitiminde emeği olan Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Tülay İrez'e minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmam ve tez aşaması süresince, fikir ve önerileri ile her zaman yanımda olan ve bu zorlu dönemin her aşamasında gösterdiği ilgi, sabır ve yardımlarından dolayı hocam Prof. Dr. Recai Papuccu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım aşamamda yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarımla **Emb.Sinem DEMİR'e,Emb. Doğuş DEMİRKIRAN'a** ve **Emb.DENİZ YILDIRIM'a** ve tezimin yazılımda desteğini esirgemeyen sayın **Dr. EMRE PABUÇCU'ya** çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren sevgili annem **Bülent SÜMER'e** ve biricik kızım **Zeynep SERTYEL'e** bu süreçteki destek ve sabırları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>BEYAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>İTHAF</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>GRAFİKLER LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>RESİM LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. IVF Çalışmalarında Otolog Endometial Ko-Kültürün Yeri ve Avantajları	4
2.2. IVF Çalışmalarında Otolog Endometial Ko-Kültürün Dezavantajları	.....6
2.3. Otolog Endometrial Ko-Kültürün Çalışma Mekanizması.....	7
2.3.1. LIF (Lösemi İnhibitör Faktör).....	7
2.3.2. GM-CSF (Granulosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör).....	8
2.3.3. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü).....	9
2.3.4. IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü).....	9
2.3.5. IL (İnterlökin).....	9
2.3.6. TGF (Transforming Growth Factor).....	9
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>10</b>
3.1. Kokültür Hazırlama Protokolü.....	10
3.1.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlığı .....	11
3.1.1.1. Maternal Serumun Hazırlanması.....	11
3.1.1.2. Solüsyon I (Örnek Alınma ve Yıkama Solüsyonu) Hazırlanması.....	11
3.1.1.3. Solüsyon II (Kollajenaz Solüsyonu) Hazırlanması:.....	11
3.1.1.4. Solüsyon III (İnkübasyon Solüsyonu/Besiyeri) Hazırlanması:	12
3.1.2. Dokunun Laboratuara Aktarılması .....	12
3.1.3. Dokuların Pıhtı ve Artıklardan Arındırılıp Yıkanması.....	13
3.1.4. Mekanik Parçalanma .....	14

3.1.5. Enzimatik Parçalama .....	15
3.1.6. Stromal ve Glandular Hücrelerin Ekimi (Inoculation):.....	18
3.1.7. Dondurma Protokolü .....	19
3.1.8. Çözme Protokolü .....	22
3.1.9. Ko Kültür Hücrelerinin Tanımlanması.....	24
3.1.9.1. Endometrial Stromal Hücreler: .....	24
3.1.9.2. Endometrial Glandular Hücreler:.....	25
3.2. Oosit Toplanması (Opu) .....	25
3.3. Oositlerin Soyulması (Denüdasyon İşlemi):.....	27
3.4. Intra Sitoplamik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) İşlemi: .....	29
3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar: .....	29
3.4.2. ICSI protokolü .....	29
3.5. Fertilizasyonun Değerlendirilmesi (1.Gün) .....	31
3.6. Embriyo Sınıflandırması .....	32
3.6.1. Klivaj Dönemi.....	32
3.6.2. Blastosist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi.....	34
3.7. Ko-Kültür Üzerinde Embriyo Gelişimi .....	36
3.8. Embriyo Transfer .....	38
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
4.1. Çalışma amacı .....	41
4.2. Çalışma Modeli.....	42
4.3. Çalışma Sonuçları .....	43
4.3.1. Kokültür (GRUP I ) ve Konvansiyonel Kültür Gruplarının (Grup II) Klinik Gebeliklerinin Karşılaştırılması .....	43
4.3.2. Kadın yaş ortalamasına göre gebelik sonuçları.....	45
4.3.3. GRUP I ve GRUP II hastalarının daha önceki deneme sayılarına göre klinik gebelik oranlarının karşılaştırılması: .....	47
4.3.4. GRUP I ve GRUP II Hastalarının Son Denemelerinde Elde Edilen MII Oosit Sayılarına Göre Elde Edilen Gebelik Oranları:.....	50
4.4. İstatiksel Değerlendirmeler .....	53
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>54</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>57</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>58</b>

8. ÖZET .....	64
9. SUMMARY .....	67
10. ÖZGEÇMİŞ .....	69
11. ETİK KURUL ONAYI .....	81





## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Klivaj Dönemi Embriyo Sınıflandırması .....	34
<b>Tablo 2:</b>	Grup I ve Grup II Klinik Gebelik ve İmplantasyon Oranı Karşılaştırmaları .....	44
<b>Tablo 3:</b>	Grup I ve Grup II Siklus Veri Karşılaştırmaları .....	44
<b>Tablo 4:</b>	Grup I ve Grup II 3. Gün Embriyo Gelişim Verilerinin Karşılaştırmaları.....	44
<b>Tablo 5:</b>	Yaşlara Göre Grup I ve Grup II'nin Klinik Gebeliklerinin Karşılaştırılması.....	46
<b>Tablo 6:</b>	38 Yaş Altı Grup I ve Grup II Hastalarının Deneme Sayılarına Göre Klinik Gebeliklerinin Karşılaştırılması.....	47
<b>Tablo 7:</b>	38 Yaş Üstü Grup I ve Grup II Hastalarının Deneme Sayılarına Göre Klinik Gebeliklerinin Karşılaştırılması.....	48
<b>Tablo 8:</b>	38 Yaş Altı Grup I ve Grup II Hastaların Elde Edilen M2 Sayılarına Göre Klinik Gebeliklerinin Karşılaştırılması.....	50
<b>Tablo 9:</b>	38 yaş üstü Grup I ve Grup II Hastaların Elde Edilen M2 Sayılarına Göre Klinik Gebeliklerinin Karşılaştırılması.....	51

## GRAFİKLER LİSTESİ

- Grafik 1:** Tekrarlayan implantasyon olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası , kadın yaş gruplarına göre gebeliğe ulaşma oranları. .... 46
- Grafik 2:** Tekrarlayan implantasyon olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası, 38 yaş altı olgularda önceki başarısız deneme sayılarına göre klinik gebelik oranları. .... 48
- Grafik 3:** Tekrarlayan implantasyon olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası , 38 yaş ve üstü olgularda önceki başarısız deneme sayılarına göre klinik gebelik oranları. .... 49
- Grafik 4:** Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası , 38 yaş altı olgularda elde edilen MII sayılarına göre klinik gebelik oranları..... 51
- Grafik 5:** Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası, 38 yaş ve üstü olgularda elde edilen MII sayılarına göre klinik gebelik oranları. .... 52

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1:** Endometrial ko kültür hücrelerinin etki mekanizması tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen ortamdaki potansiyel toksik maddelerin uzaklaştırılması ve büyümeye yardımcı faktörlerin ortama salgılanması yönünden embriyo gelişimine katkı sağladığı gözlenmiştir. Embriyo ile aralarında parakrine bir iletişim söz konusudur. .... 5
- Şekil 2:** PN döneminde ko-kültür üzerine alınan embriyolar gelişimin ileri dönemlerine kadar ko-kültür düzleminde kültüre edilirler. Bu dönemde ortamda endometriyal hücrelerden kaynaklanan büyüme faktör ve bunların reseptör modülatör oranları artar. .... 8
- Şekil 3:** Otolog Endometrial Ko-Kültürün şematik özeti. Hasta tedaviye alınmadan önce luteal fazın son döneminde pipel yardımı ile endometriyal örnekler alınır. Değişik sentrifügasyon ve sedimentasyon süreleri ile stromal ve glandular hücreler ayrılır ve ayrı flasklarda inkübe edilirler. Hücreler, kültür flaskının %70-80'ini kapladıktan sonra (%70-80 konfluent) hücreler ayrı ayrı dondurulur. OPU gününden 3 gün önce çözülüp 1:1 oranında hücreler karıştırılıp 4-gözlü petrilere birlikte ekilir. PN oluşumu gözlenen 1.gün pre-embriyoları bu hücrelerin üzerine alınır ve blastosist evresine dek burada inkübe edilirler.. .... 10
- Şekil 4:** İşlemler sonrası elde edilen stromal ve glandular hücreler %50 oranında olacak şekilde dondurulur ve işlemde 3 gün önce çözülerek çok gözlü petrilere ekim yapılır. .... 23
- Şekil 5.** Blastosist dönem gelişimi ..... 36

## RESİM LİSTESİ

- Resim 1:** Ko-kültür öncesi işlem kazırlıkları: 10ml'lik ve 5ml'lik ayrı iki tüp sporu, önceden fluskların içine hazırlanmış olan solüsyon I,II ve III, değişik ölçülerde serolojik tüp ve pipetler, pipet tabancası, bunsen burner, ince uçlu doku makası, ince uçlu penset, petripetri. .... 13
- Resim 2:** Dokuların penset ile ayrılıp petri petri içinde yıkanması (solüsyon I ile). .... 14
- Resim 3:** Son petride medyum çekilip, ince uçlu makas yardımıyla dokuların küçültülmesi. .... 15
- Resim 4:** Petrinin yıkanıp dokuların toplanması ve konik tübe aktarımı ve üzerine enzim (solüsyon II) eklenmesi. .... 16
- Resim 5:** Dokuların enzim eşliğinde 370C 'lik su banyosunda bekletilmesi ile enzimatik parçalanma süresinin başlatılması. .... 16
- Resim 6:** Parçalanma sonrası ilk ayrılan hücre grubu: Glandular hücreler. .... 17
- Resim 7:** Glandular hücreler ayrıldıktan sonra, farklı sedimentasyon ve sentrifigasyonlar sonrası ayrılmış 4 ayrı stromal hücre çökeltisi (Stroma I,II,III,IV). .... 18
- Resim 8:** Ayrılmış glandular ve stromal hücrelerin flask ekimi. .... 19
- Resim 9:** Ekimi tamamlanmış ve inkübatör içine yerleştirilmiş ko-kültür flaks görüntüsü. .... 19
- Resim 10:** Ko-kültür dondurma sıvısının hazırlanışı. .... 20
- Resim 11:** Ko-kültür dondurulması. .... 21
- Resim 12:** Dondurulmuş ko-kültür hücrelerinin saklanması. .... 21
- Resim 13:** Çözülen hücrelerin sentrifügasyon sonrası tüpte görünümü. .... 22
- Resim 14:** Yıkanmış hücreler hücre sayma kamarasına 1µl, trypan blue 1µl olacak şekilde karıştırılmak suretiyle yerleştirilir ve faz mikroskop ile sayılır. (Trypan blue ile boyama sonrası içine mavi renkli boyayı almamış hücreler vital olarak değerlendirilip sayısal orantı ile seyreltme ve ekim miktarı hesaplanır). 4Gözlü kuyucuklara (her kuyucuğa yaklaşık 300.000 canlı hücre gelecek şekilde) ekim gerçekleştirilir. .... 23
- Resim 15:** 4 gözlü kuyucuk yüzeyine yapışmış çözme sonrası hücreler. .... 24
- Resim 16:** Endometriyumda salgı meydana getiren küçük bez grupların aralarını dolduran stroma hücreleri adını alan destek hücrelerinden oluşurlar. Bu hücreler büyüyerek yaygınlaşırlar.. 24

- Resim 17:** Endometrial hücrelerin proliferasyon evresi salgı hücreleridir. Bu hücreler kalınlaşıp uzayarak yaygınlaşırlar. .... 25
- Resim 18:** (a-b) Ko-kültür üzerinde 2. gün embriyo gelişimi ..... 36
- Resim 19:** (a-b) Ko-kültür üzerinde 3. ve 4. gün embriyo gelişimi ..... 37
- Resim 20:** (a-b) Ko-kültür üzerinde 5. gün embriyo gelişimi ve gelişen iç hücre kütlesi ( iner cell mass) ayrıntısı. .... 37



## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>AECC</b>	Autolog Endometrial Coculture- Otolog Endometrial Kokültür
<b>ET</b>	Embriyo Transferi
<b>M I</b>	Metafaz I
<b>M II</b>	Metafaz II
<b>HSA</b>	Human Serum Albumin
<b>HTF</b>	Human Tubal Fluid
<b>HYASE</b>	Hyaluridase enzimi
<b>ICM</b>	İç hücre kütlesi-Inner Cell Mass
<b>ICSI</b>	Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
<b>IVF</b>	In Vitro Fertilizasyon
<b>IN VITRO</b>	Vücut dışı
<b>IN VIVO</b>	Vücut içi
<b>KOK</b>	Kümüls-Oosit-Korona kompleks
<b>ML</b>	Mililitre
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>OEK</b>	Otolog Endometrial Kokültür
<b>OPU</b>	Oocyte pick up- Oosit aspirasyonu
<b>PGT</b>	Preimplantasyon Genetik Tanı
<b>PN</b>	Pronükleus
<b>PSA</b>	Penicilinle, Streptomisine ve Amphotericin
<b>PVP</b>	Polyvinlypyrolidone
<b>TİB</b>	Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı

## **KULLANILAN MALZEMELER**

G-MOPS

G-FERT

G-G1

G-G2

ICSIX100

HYASE

FALCON 2001

FALCON 2003

FALCON 3014

FALCON 3801

Falcon 3803

FALCON 7551

TOP-LINE FILTER TIPS(1-100 $\mu$ l)

TOP-LINE FILTER TIPS(5-10 $\mu$ l)

ICSI DISH(THERMO SCIENTIFIC)

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Laboratuvar şartlarında, in vitro kültür ortamının başarılı çalışması, embriyo transferi sonrası yüksek gebelik sonuçları için gerekli olan en önemli etkenlerdendir. In vitro kültür ortamlarının elektrolit ve enerji kaynaklarının modifikasyonları sonrası yükselen gebelik oranları elde edilmesi ile beraber tekrarlayan implantasyon grubu hastalar üzerine tartışmalar gündeme gelmiştir. Başarısızlık nedeni tam olarak açıklanamayan bir grup hastanın konvansiyonel kültür ortamları ile iyi embriyo gelişimi veya gebelik sağlanamadığı ortaya konmuştur.

Bu şartlarda konvansiyonel kültür ortamlarına alternatif olarak yardımcı vücut hücreleri üzerinde in vitro ortamda insan embriyolarında daha yüksek kalitede gelişimler sağlanmıştır (1-8). Yapılan birçok çalışmada bu hücrelerle kurulan sistemlerde embriyotropik faktör üretiminin arttığı ve kültür solüsyonlarının detoksifiye edildiği gözlenmiştir (24-30). Özellikle otolog endometrial kokültür hücrelerinin embriyo morfolojisinin kalitesini ve blastosist gelişim oranlarını arttırdığı ortaya konmuştur (12,19,30,41). Ayrıca embriyo gelişimi ve uterin ortam arasında senkronizasyon sağlanabilme olasılığı artmaktadır.

Bununla birlikte uygulanması hayli zaman alıcı ve maliyetli olan bu tekniğin uygulanabilirliği beraberinde birçok tartışmayı getirmiştir. Kokültür sistemi olmadanda tekrarlayan IVF denemelerinde konvansiyonel kültür ile gebelik sağlanabilirliği, kokültürün hangi aşamada daha başarılı olduğunu tartışmaya açmıştır.

Bu çalışmanın amacı otolog endometrial kokültür ile IVF tedavisi uygulanacak hastalar için, daha kesin bir endikasyon grubu belirleyebilmektir. Böylelikle bu tekniğin önerilebileceği ve sonuçların konvansiyonel kültür ortamına göre daha avantajlı olabileceği, hedef bir hasta grubu oluşturulabilecek ve bu grup için tedavi programlarına otolog endometrial kokültür tekniği daha güvenle dahil edilebilecektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde yardımcı üreme teknikleri ile sağlanan başarı oranlarının embriyo transferi başına %35-40 oranında olduğu gözlenmektedir. Bununla beraber, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) gözlenen alt hasta grubunun, infertilite problemi somut olarak ortaya konulamamış olmakla beraber embriyo gelişim kalitesinin artırılması yönünde yoğun çalışmalar gösterilmektedir. Başarılı bir implantasyonun oluşumuna engel olan henüz tanımlanmamış birçok etken ortaya konulmuş olmasına rağmen bazı fizyolojik, immünolojik, genetik ve endokrinolojik faktörlerin bu başarısızlığa neden olduğu kanıtlanmıştır. Tüm faktörlerin, laboratuvar şartları ve manüplasyon tekniklerinin optimize edildiği şartlarda, ideal embriyo gelişimi şartlarına göre kurgulanmış hazır kültür ortamları bazı hastalarda yetersiz kalabilmekte, embriyonun beslenme ve gelişimini sağlayan reseptörlerin aktivasyonu sağlamamaktadır. Sonuçta embriyoların gelişim duraksaması, yavaşlaması, kalitesinin bozulması veya embriyo ile gelişim ortamı arasında uyum sağlanamaması gibi sonuçlar gözlenmektedir. Genetik veya fizyolojik problem olmamasına rağmen negatif gebelik sonuçlarına sebep olabilmektedir (2). Genel olarak bu grup hastalarda yavaş yada düşük kalitede embriyo gelişimi gözlenmiştir. Embriyo kültür ortamlarının optimize edilmesinin yanında, hergün yeni gelişimler gösteren (konvansiyonel) kültür ortamı modellerinin kullanımı, laboratuvar ortamlarının çok daha *in vivo* şartlara yakınlaştırılıp kontrol altına alınabilmesi gündeme gelmiştir. Bunlarla birlikte Bu grup hastalarda çalışılan bazı deneysel ko-kültür modellerindeki hücre grupları ile daha yüksek kalitede embriyo eldesi ile kazanılmış çok değerli gebelikler sağlanmıştır.(1-5)

Özellikle tek düzlemlı otolog endometrial ko-kültür (OEK) hücreleri (autologous endometrial coculture) ile umut verici birçok sonuç rapor edilmiştir (6,7,8) . Bu yaklaşım farklı kokültür hücrelerinden olası bir kontaminasyon olasılığında ortadan kaldırmaktadır. Bu konudaki sonuçlarda, araştırmacıların sonuçlarında sıkça vurgulanan yüksek oranda ve daha fazla blastomer sayısına sahip blastosist eldesinin yanı sıra daha düşük oranda fragmantasyon ve blastomer büyüklüklerindeki eşitlik, bunların doğal sonucu olarak sağlanan yüksek gebelik ve implantasyon oranlarıdır (9,10,11). Embriyo gelişimi hakkında bilğimiz her geçen gün artmasına rağmen, gelişen bir embriyo için gerekli olan tüm ihtiyaçların gerekli

konfögürasyonlarda sağlanabildiği bir embriyo kùltür ortamı henüz tanımlanabilmiş değildir. Bu nedenle anne ortamına en yakın ve otolog bir sisteme duyulan ihtiyaç sonrası destekleyici bir sisteme ihtiyaç duyulmuştur. Basal olarak hazır kùltür ortamı kullanılırken aynı ortamda destekleyici ve besleyici bir hücre yapısında bu kùltür ile embriyo arasında tampon olarak yer almaktadır. Döllenmiş gamet hücrelerinin embriyo transfer işlemine kadar olan süre içerisinde tek bir düzlemde çoğaltılarak kùltüre edilen özel somatik hücreler ile aynı ortamda geliştirilmesi ko-kùltür embriyo gelişim sistemi olarak tanımlanmaktadır.

Bununla birlikte sonuçlar halen tartışmalı bulunmakta ve OEK tekniği halen IVF uygulamalarında yaygın olarak kullanılmamakla beraber bu sistem sonuçlara göre artık tanımlanmış bir endikasyon çerçevesinde kullanılmaktadır(10).

- En az iki başarısız tüp bebek denemesi
- Gelişen embriyolarda belirgin yavaş gelişim izlenmesi (3.günde <6 blastomer)
- Kötü Morfolojide embriyo gelişimi (düzensiz klivaj, birbirine eşit olmayan -uneven blastomer, yüksek fragmantasyon)

Günümüze değin ko-kùltür ortamı olarak bir çok hücre tipi kullanılmıştır. Bunlardan sonuçları rapor edilmiş bazı çalışmalar şunlardır:

Koyun (2), ve tavşan tubal epitel hücreleri (12)

Sığır fibroblast hücreleri (13) , (14)

Vero hücreleri (15)

İnsan ampüller hücreleri (16)

İnsan granuloza hücreleri (17), (18)

İnsan endometrial hücreler (19), 20-21)

## 2.1. IVF Çalışmalarında Otolog Endometrial Ko-Kültürün Yeri ve Avantajları

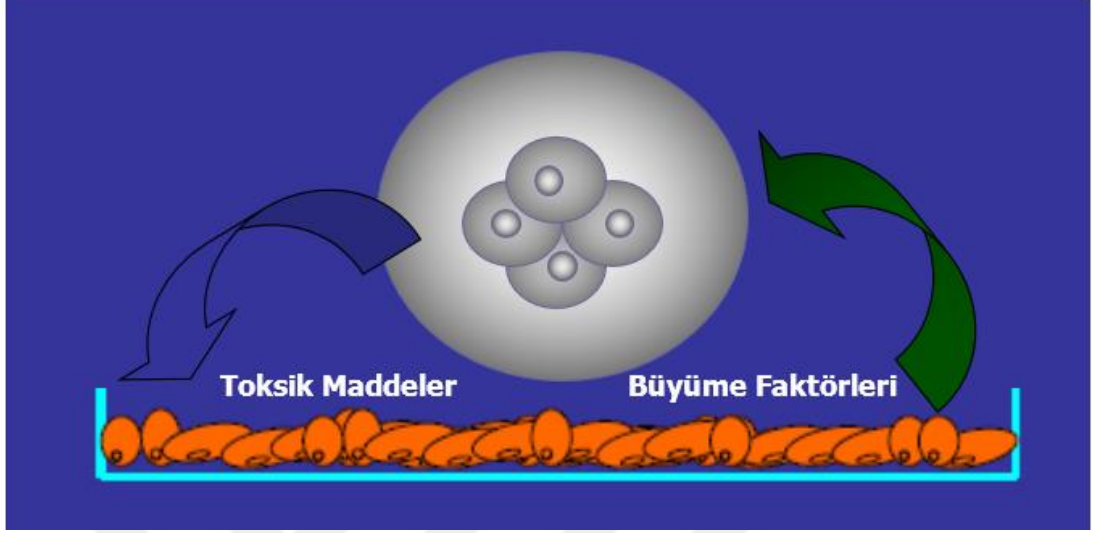
IVF teknolojisinde tanımlanmış pek çok ko-kültür kaynağı denenmiş olmakla birlikte, sonuçları en çok yayınlanmış ve yaygın olarak benimsenmiş olan sistem anne adayının kendi rahim hücreleri ve serumunun kullanıldığı (otolog) endometrial ko-kültür sistemi olduğu görülmektedir ( 20 ). Bu çalışmaların çoğu sonuç olarak daha düşük fragmantasyon oranı, eşit ve gelişim gününe uygun sayıda blastomer oluştuğunu belirtmişlerdir (20-28). IVF teknolojisinde tanımlanmış pek çok ko-kültür kaynağı bulunmasına rağmen bir çok merkezin otolog endometrial hücreleri tercih etmeleri bir çok nedene dayanmaktadır:

**Metabolik kilitlemeyi önler:** Ko-kültür sistemindeki hücrelerin sağladığı metabolitler embriyo metabolizmasına süreklilik getiren genetik aktivasyonu sağlarlar. Böylece embriyoda metabolik gelişim bozuklukları, gelişim geriliği ve duraksaması engellenir ve dondurma işlemine karşı toleransı artırılmış olur. (24),(29)

**Güvenlidir:** Hastanın kendi hücreleri ve serumu kullanıldığı için diğer sistemlerine göre daha güvenli, fizyolojik, etik ve etkilidir (28).

**Dengelidir:** Embriyo gelişimini destekleyen ve düzenleyen maddelerin, büyüme faktörleri ve sitokinlerin ortamda dengeli ve sürekli bulunmasını sağlaması yanında , bu faktörlerin embriyonik ekspresyonunun sağlanması ile hücre reseptörü düzeyinde otokrin ve parakrin düzenlemeler ile embriyo gelişim kalitesini arttırmaktadır. Böylece hücresel düzeyde alışverişi düzenleyerek , sitokin ve büyüme faktörü salgılanması ve kullanımını düzenlemekte , ortamın detoksifikasyonunu sağlamaktadırlar (21,30).

**Kontrol Mekanizması sağlar:** Ortam içerisinde antioksidan sistemler oluşturarak embriyo için zararlı olabilecek metabolik artıkların embriyo çevresinden uzaklaştırılmasını sağlarlar (31).



**Şekil 1:** Endometrial ko kültür hücrelerinin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen ortamdaki potansiyel toksik maddelerin uzaklaştırılması ve büyümeye yardımcı faktörlerin ortama salgılanması yönünden embriyo gelişimine katkı sağladığı gözlenmiştir. Embriyo ile aralarında parakrin bir iletişim söz konusudur.

**Stromal ve glandular hücrelerin daha düzenli etkileşimi sağlanır:** İlk hücre pasajı dondurulmuş otolog endometrial ko-kültür sistemi glandular ve stromal hücre popülasyonlarını aynı kalite ve miktarda içerir. Bu yönüyle ardışık pasajlamalar sonrası elde edilen ko-kültür çalışmalarından daha fazla oranda hücreler arası ilişki sağlanabilmektedir (32,33).

**İmplantasyonu Arttırır:** Endometriyal hücrelerin embriyonik parakrin molekül salgılanması ( $\beta 3$  integrin) sonucu özellikle TİB hastalarında endometrial reseptivite arttırılır (34).

**Embriyo Gelişim Kalite ve Hızını etkiler:** TİB hastalarının 3. gün embriyo gelişiminin PGT öncesi biyopsi kriterlerine daha uygun düzeye getirilmesi sağlanır. Aynı nedenle hastalara daha yüksek oranda embriyo dondurma tekniklerinin uygulanabilmesini mümkün kılar (23) (24).

## 2.2. IVF alışmalarında Otolog Endometrial Ko-Kültürün Dezavantajları

Bu özellikleri otolog endometrial ko-kültür sistemi embriyo kalite ve gelişim hızının artmasını sağlayarak gebelik sonuçlarına olumlu etkileri yanında embriyo dondurulması, preimplantasyon genetik tanı gibi önemli teknikleri uygulama başarısında arttırmaktadır.

Tüm bunlarla beraber bu sistem halen bir çok IVF laboratuvarında ve hasta gruplarında yaygın olarak kullanılamamaktadır, bunun değişik sebepleri ise kısaca şöyle tanımlanabilir:

- Ko-kültür hazırlanması ve takibi, laboratuvar çalışmalarına ek olarak yoğun bir iş gücü ve teknik donanım gerektirmektedir.
- Kontaminasyon riski vardır.
- Bir çok IVF laboratuvar çalışanı, oosit, sperm ve embriyo dışındaki hücre kültürü konusunda yeterli bilgi ve tecrübeye sahip değildir.
- Konvansiyonel kültür ortamlarına göre çok daha fazla zaman alması

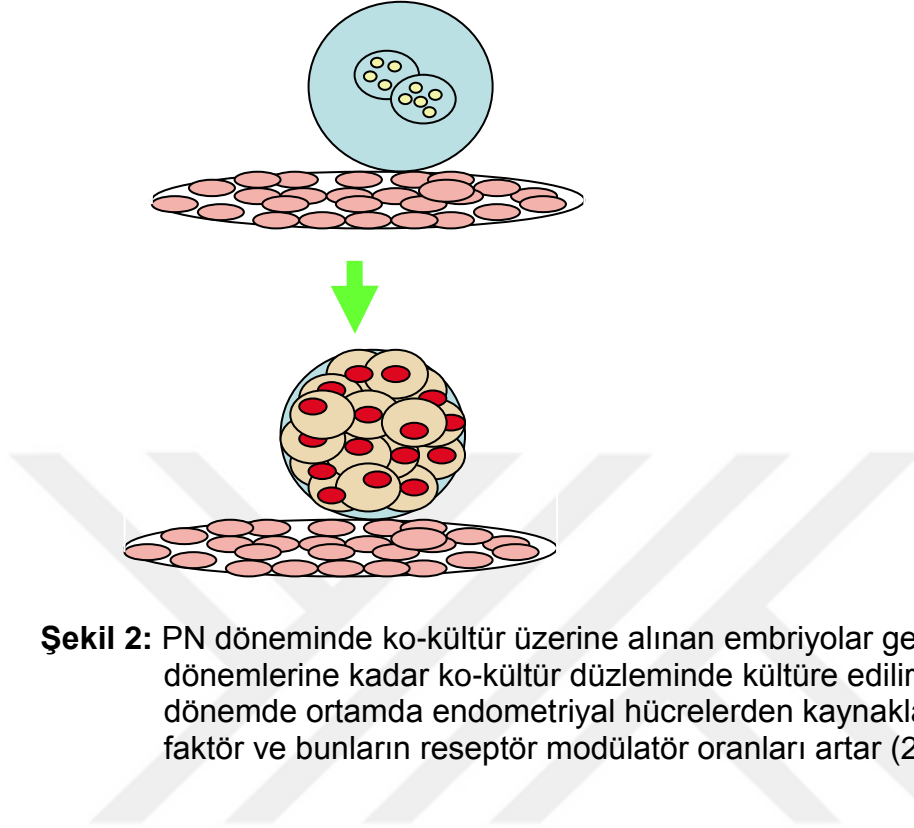
Tüm bu dezavantajlar ko-kültürün etkili bir sistem olmasına rağmen neden tüm hasta gruplarına uygulanamadığını da ortaya koymaktadır.

## **2.3. Otolog Endometrial Ko-Kültürün Çalışma Mekanizması**

Ko-kültür üzerine yapılan çok sayıdaki çalışma, embriyo gelişiminde önemli rol oynayan büyüme faktörü mekanizmasının bu teknikle çok daha aktif kullanıldığı üzerine yoğunlaşmaktadır. Özellikle bazı büyüme faktörlerinin embriyolar tarafından tüketimi bu sistem ile çok daha yüksek oranda ve kontrollü olabildiği gözlenmiştir (27,28,29,30). En yoğun olarak mekanizmasının etkilendiği saptanan büyüme faktörleri ve işlevlerini şöyle özetlemek mümkündür:

### **2.3.1. LIF (Lösemi İnhibitör Faktör)**

- Embriyo ile endometrial hücreler arasında parakrin sinyalizasyonu sağlar
- Diğer sitokinlerin aktivasyonunda rol oynar
- Uterin reseptivitenin düzenlenmesinde rol oynar
- Embriyonun iç hücre kitlesinin pluripotent özelliğinin devamlılığını sağlar.
- Blastosist oluşumunu indükleyici etkisi vardır.
- Böylece implantasyonda önemli rol oynar (36).



**Şekil 2:** PN döneminde ko-kültür üzerine alınan embriyolar gelişimin ileri dönemlerine kadar ko-kültür düzleminde kültüre edilirler. Bu dönemde ortamda endometriyal hücrelerden kaynaklanan büyüme faktör ve bunların reseptör modülatör oranları artar (28)

### 2.3.2. GM-CSF (Granulosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör)

- Endometrial hücrelerden salgılanan GM-CSF blastosist yüzeyindeki reseptörüne bağlanarak proteinkinaz C'yi aktif hale geçirir. Proteinkinaz C ise blastosistten, implantasyonda önemli bir rolü olan interferon salınımını uyarır.
- Oksitosin reseptör sayısını azaltarak corpus luteumun devamlılığını sağlar (36).

### 2.3.3. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)

- Endometriumdan blastosiste parakrin sinyalizasyonu sağlayarak implantasyonda rol oynar.
- ICM hücre sayısını arttırıcı etkisi vardır.
- Blastosist formasyonunda rol oynar (24,30).

### 2.3.4. IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)

- Endometrial stroma hücrelerinden salgılanan IGF, 8 hücreli aşamadan sonra embriyo yüzeyinden de salgılanmaya başlar (33,34).
- Protein sentezi, endositoz, glukoz transportu, metabolizma ve gen ekspresyonu üzerinde etkileri vardır.
- Apoptozu baskılar (30,33,34).

### 2.3.5. IL (İnterlökin)

- Embriyo gelişiminin erken evrelerinde hücre artışının düzenli ve normal bir hızda gerçekleşmesini sağlar (27,35).

### 2.3.6. TGF (Transforming Growth Factor)

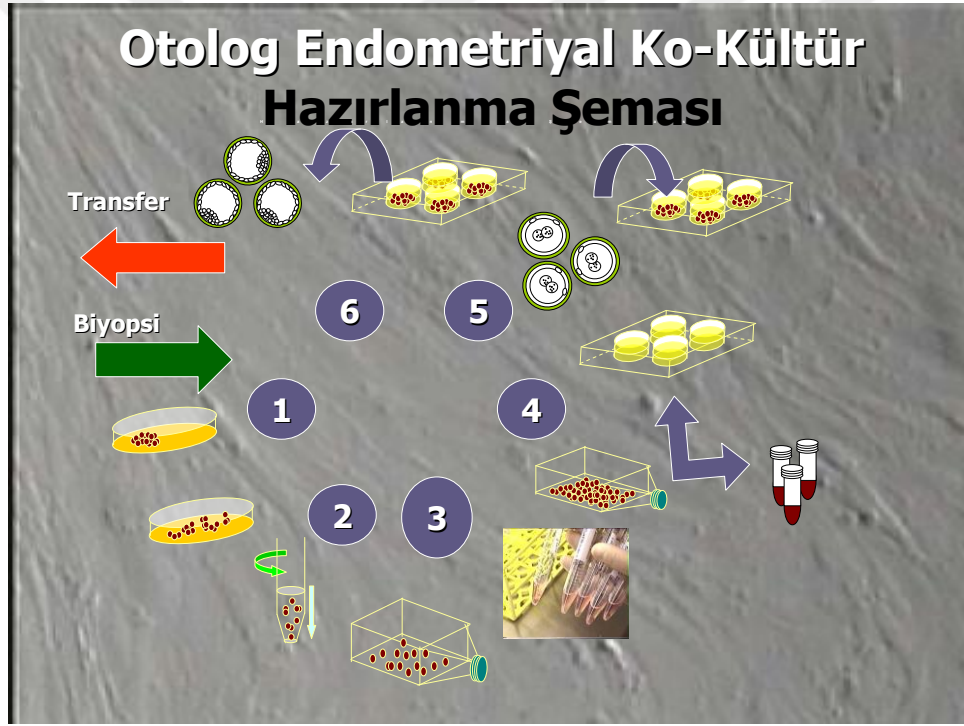
- Blastosist hücre sayısını, ekspansiyonunu arttırır .
- Apoptozu baskılar.
- İmplantasyonu arttırıcı etkisi vardır (27,36-40).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kokültür Hazırlama Protokolü

Hasta, endometrial doku kültürü için adetinden 17-24 gün sonra (luteal faz süresince) kliniğe gelir. Pipel yardımı ile yaklaşık 3-4 mm<sup>3</sup>'lük doku parçaları alınarak laboratuvar işlemleri başlatılır (41,42).



**Şekil 3:** Otolog Endometriyal Ko-Kültürün şematik özeti. Hasta tedaviye alınmadan önce luteal fazın son döneminde pipel yardımı ile endometriyal örnekler alınır. Değişik sentrifügasyon ve sedimentasyon süreleri ile stromal ve glandular hücreler ayrılır ve ayrı flasklarda inkübe edilirler. Hücreler, kültür flasksının %70-80'ini kapladıktan sonra (%70-80 konfluent) hücreler ayrı ayrı dondurulur. OPU gününden 3 gün önce çözülüp 1:1 oranında hücreler karıştırılıp 4-gözlü petrilere birlikte ekilir. PN oluşumu gözlenen 1.gün pre-embrioları bu hücrelerin üzerine alınır ve blastosist evresine dek burada inkübe edilirler.

### **3.1.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlığı**

#### **3.1.1.1. Maternal Serumun Hazırlanması**

Hastadan alınan kan,

- 3000 RPM'de 15 dk. santrifüj edilir.
- Süpernatant yeni bir steril konik tüpe alınıp, 56C<sup>0</sup>'de 1 saat inaktive edilir.
- 0.22 ve 0.45 µm'lik mikro filtrelerden geçirilir.

#### **3.1.1.2. Solüsyon I (Örnek Alınma ve Yıkama Solüsyonu) Hazırlanması**

%1'lik PSA (penicilinle, streptomisine ve Amphotericin B: önceden 0.5 ml'lik bölünmüş miktarlar oluşturulup -18 C<sup>0</sup>'de saklanır) ve HEPES tampon içeren HTF (Human Tubal Fluid) ile hazırlanır. 49.5 ml Hepseli HTF 50 ml'lik konik tabanlı tüpe alınır ve üzerine 0.5 ml PSA eklenir (kullanılmayan kısmı sonraki işlemlere kadar +4<sup>0</sup>C'de saklanır). Bu solüsyonun 30 ml'si ayrı bir tüpe (kollajenaz solüsyonu hazırlamak için) bölünür.

#### **3.1.1.3. Solüsyon II (Kollajenaz Solüsyonu) Hazırlanması:**

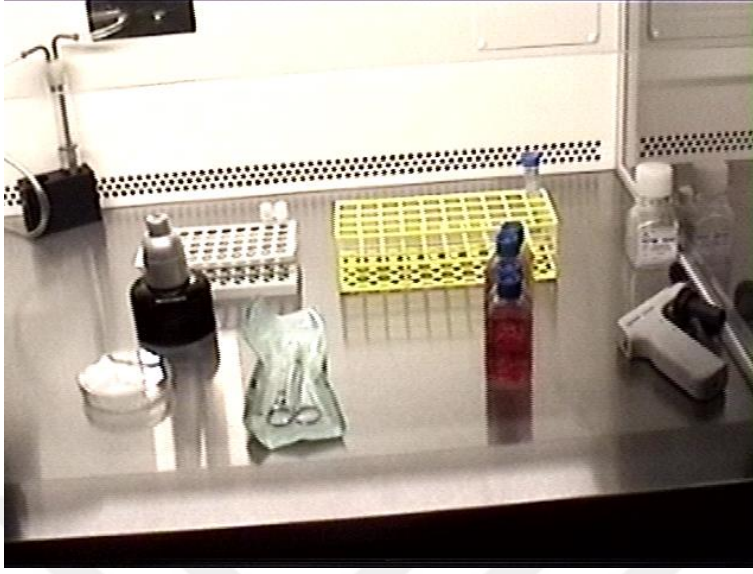
- 30 ml PSA içeren solüsyon (Solüsyon I),
- 4 ml solüsyon I içerisinde 7,5 mg kollajenaz bulunan tüpe koyulup vortekslenir,
- Steril etmek için 0.22 µm'lik mikro filtreden geçirilip filtre edilerek enzimatik işleme kadar inkübatöre kaldırılır.

#### **3.1.1.4. Solüsyon III (İnkübasyon Solüsyonu/Besiyeri) Hazırlanması:**

- %1'lik PSA ve %1'lik L-Glutamin içeren Glutaminsiz RPMI (without glutamine) medyumundan [önceden 50 ya da 100 ml'lik ambalaja sırasıyla 0.5 ve 1 ml PSA ve L-Glutamin eklenir ve kullanılmayan kısmı sonraki işlemlere kadar +4 °C'de saklanır ve üzerine PSA (+) ve L-Glutamin (+) olarak not edilir ve 30 ml'si bir flaska koyulur.
- Üzerine 3.3 ml inaktive edilmiş hasta serumu (%10 oranında) eklenir.

#### **3.1.2. Dokunun Laboratuara Aktarılması**

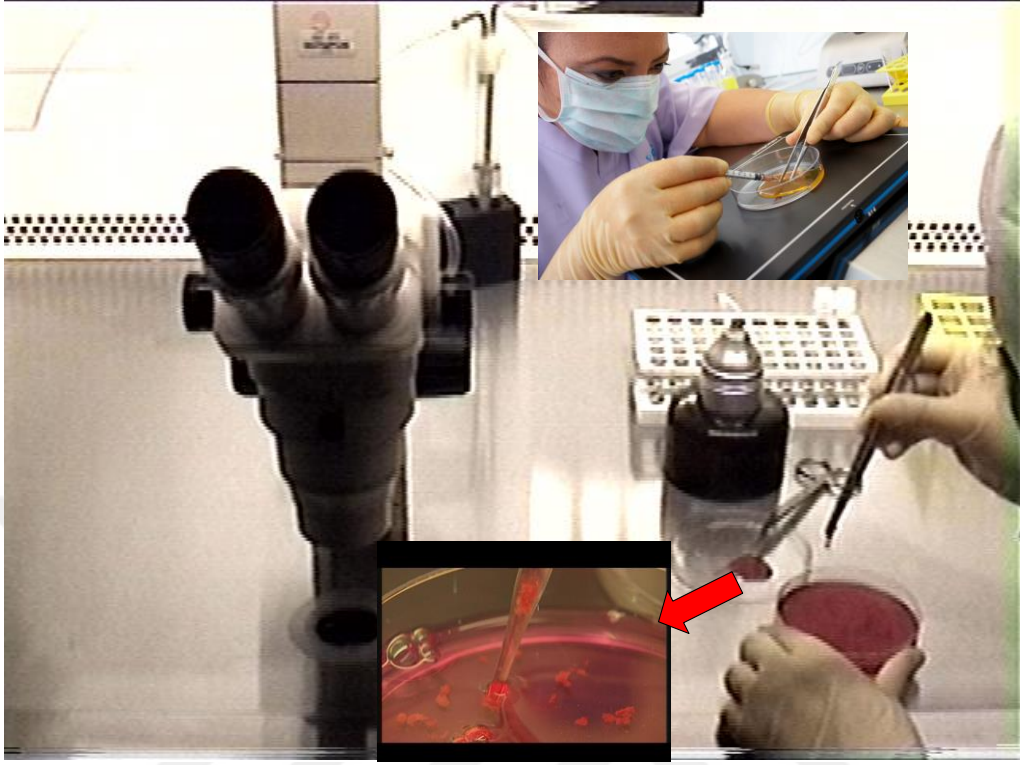
Önceden hastanın isminin üzerine ve kapağına yazılmış olan doku örnek kabının içine 5 ml Solüsyon I konulup örnek alınana dek inkübatörde saklanır. Örnek pipelden kaba aktarıldıktan sonra hemen bekletilmeden laboratuara aktarılıp işlem başlayana kadar inkübatör şartlarında bekletilir (37°C , %20 O<sub>2</sub>, %5CO<sub>2</sub>).



**Resim 1:** Ko-kültür öncesi işlem kazırlıkları: 10ml'lik ve 5ml'lik ayrı iki tüp sporu, önceden flaskların içine hazırlanmış olan Solüsyon I,II ve III, değişik ölçülerde serolojik tüp ve pipetler, pipet tabancası, bunsen burner, ince uçlu doku makası, ince uçlu penset, petripetri.

### **3.1.3. Dokuların Pıhtı ve Artıklardan Arındırılıp Yıkanması**

Doku kabında Solüsyon I içinde laboratuvara aktarılan dokular, ince uçlu penset aracılığı ile büyük boy (10 cm çapında) petriye 5 ml Solüsyon I ile aktarılır. İşlem bir kez daha tekrar edilerek dokular yıkanır.



**Resim 2:** Dokuların penset ile ayrılıp petri petri içinde Solüsyon I ile yıkanması .

#### **3.1.4. Mekanik Parçalanma**

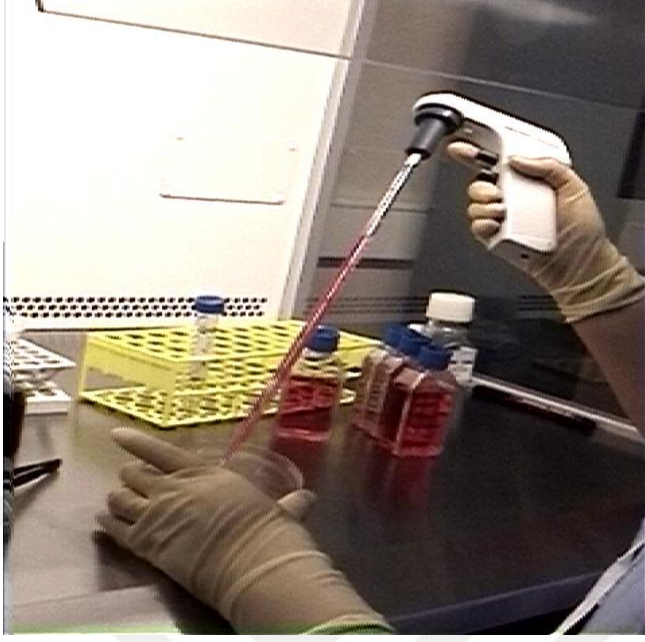
Enzimatik parçalanma öncesi; yüzey alanını genişleterek enzim reaksiyonun etkisini arttırmak amacı ile doku makası yardımı ile dokular mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıştırılır (En büyük parça  $1\text{mm}^3$  oluncaya kadar parçalanır).



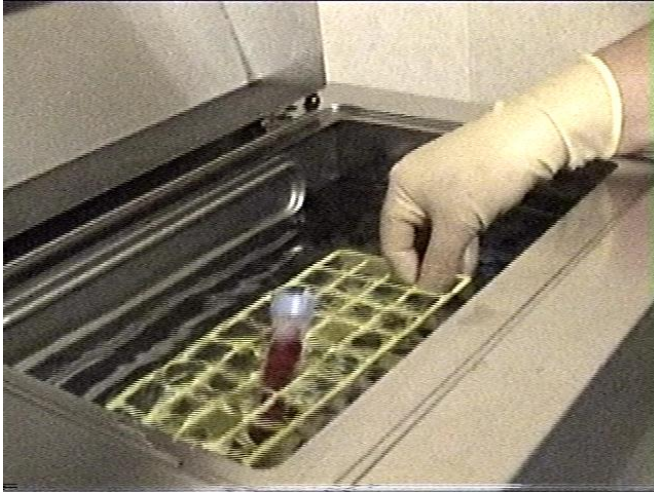
**Resim 3:** Son petride medyum çekilip, ince uçlu makas yardımıyla dokuların küçültülmesi.

### 3.1.5. Enzimatik Parçalama

10 cm çapındaki petriye (Falcon Corning 351029 North Carolina, United States) 10 ml kollajenaz solusyonu (Solüsyon II) ilave edilir. Petri yüzeyi bu Solüsyonla yıkanarak tüm dokular pipetle toplanır. Toplanan dokular 15 ml'lik konik tüpe aktarılır. 37C<sup>0</sup>'deki su banyosunda 5 dakika bekletilir. Su banyosundan alınan dokular, homojenize edilir, 5 sn beklenir, daha iri parçalar aşağıya inmeye başladığında üstteki küçük parçalar medyumun bir kısmı ile birlikte alınıp yeni bir konik tüpe koyulur. Kalan tüp (ve içindeki dokular) üzerine hasta adı, tarih ve gland yazılır ve içindeki fazla medyum atılır. Yeni tüp ise stroma 1 tüpü olarak adlandırılır ve hasta adı ve tarih eklenir. Bu stroma 1 tüpü 1500 g'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılıp, 5 ml kollajenaz eklenir. 37<sup>0</sup>C'deki çalkalamalı su banyosunda 5 dk bekletilir. Pastör pipeti ile homojenize edilip, 10 sn beklenir. Süpernatant, pellet altta çok az kalana kadar çekilip, stroma 2 tüpüne aktarılır.



**Resim 4:** Petrinin yıkanıp dokuların toplanması ve konik tübe aktarımı ve üzerine enzim (Solüsyon II) eklenmesi.



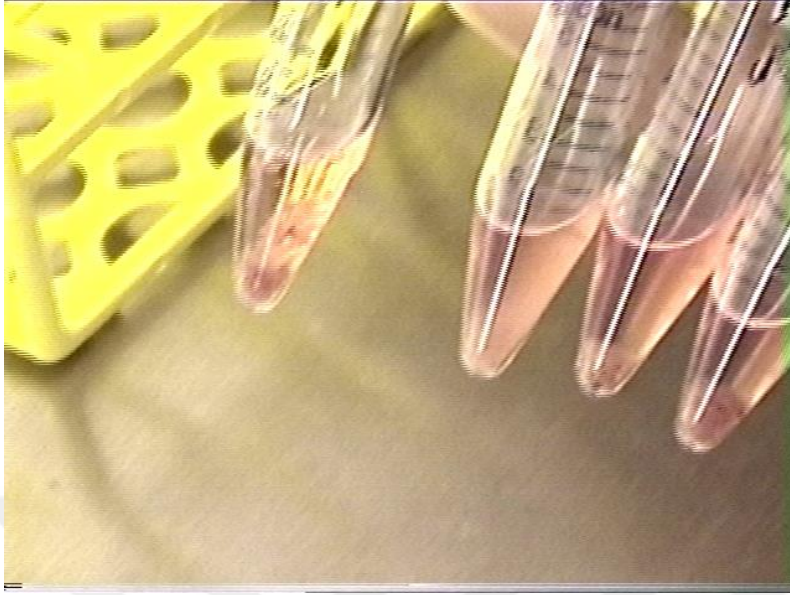
**Resim 5:** Dokuların enzim eşliğinde 37°C 'lik su banyosunda bekletilmesi ile enzimatik parçalanma süresinin başlatılması.



**Resim 6:** Parçalanma sonrası ilk ayrılan hücre grubu: Glandular hücreler.

- 1 nolu stroma tüpü beklerken, 2 nolu stroma tüpü 1500 g'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır, 5 ml kollajenaz eklenir.
- 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda 5 dk bekletilir.
- Pastör pipeti ile homojenize edilip, 10 sn beklenir. Süpernatant, pelet altta çok az kalana kadar çekilip, stroma 3 tüpüne aktarılır.
- 2 nolu stroma tüpü beklerken, 3 nolu stroma tüpü 1500 g'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır, 5 ml kollajenaz eklenir.
- 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda 5 dk bekletilir.
- Pastör pipeti ile homojenize edilip, 10 sn beklenir. Süpernatant, pelet altta çok az kalana kadar çekilip, stroma 4 tüpüne aktarılır.
- 3 nolu stroma tüpü beklerken, 4 nolu stroma tüpü 1500 g'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır, 5 ml kollajenaz eklenir.
- 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda 5 dk bekletilir.
- Süpernatant atılır.





**Resim 7:** Glandular hücreler ayrıldıktan sonra, farklı sedimentasyon ve sentrifigasyonlar sonrası ayrılmış 4 ayrı stromal hücre çökeltisi (Stroma I,II,III,IV).

### **3.1.6. Stromal ve Glandular Hücrelerin Ekimi (Inoculation):**

- Her bir tüp için 5 adet 50 ml'lik flask alınıp, üzerlerine hasta adı, tarih, gland, stroma 1,2,3 ve 4 yazılır.
- Tüm tüplerdeki (gland, stroma 1,2,3 ve 4) üstte kalan fazla medyum çekilir ve her birine 5'er ml ko-kültür kültür sıvısı eklenir. Homojenize edilir ve her bir tüp kendi flaskına ekilir. Ardından ko-kültür için ayrılmış bir inkübatöre yerleştirilir.



**Resim 8:** Ayrılmış glandular ve stromal hücrelerin flask ekimi.



**Resim 9:** Ekimi tamamlanmış ve inkübatör içine yerleştirilmiş ko-kültür flaks görüntüsü.

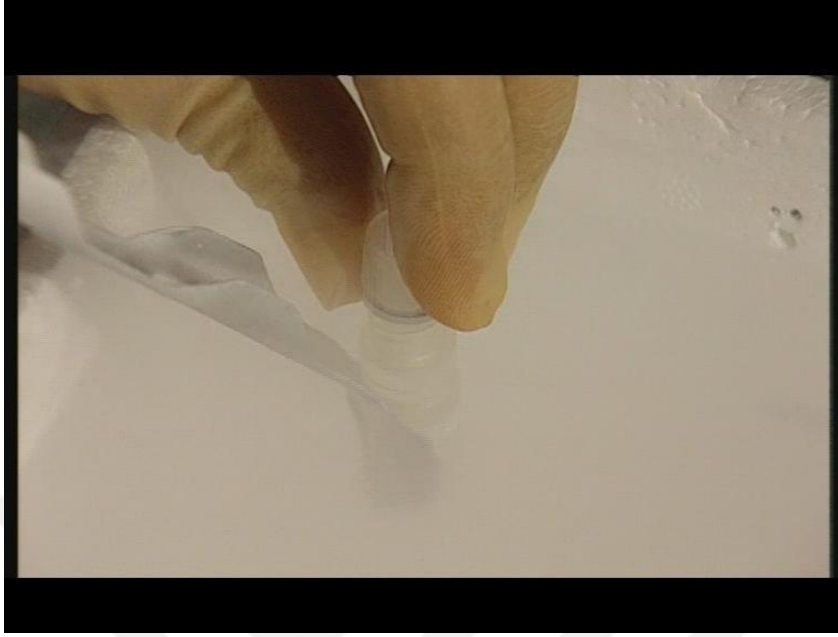
### 3.1.7. Dondurma Protokolü

**Dondurma Solüsyonu:** 2.25 ml hasta serumu + (damla damla çalkalayarak) 0.25 DMSO eklenir ve vortekslenir.

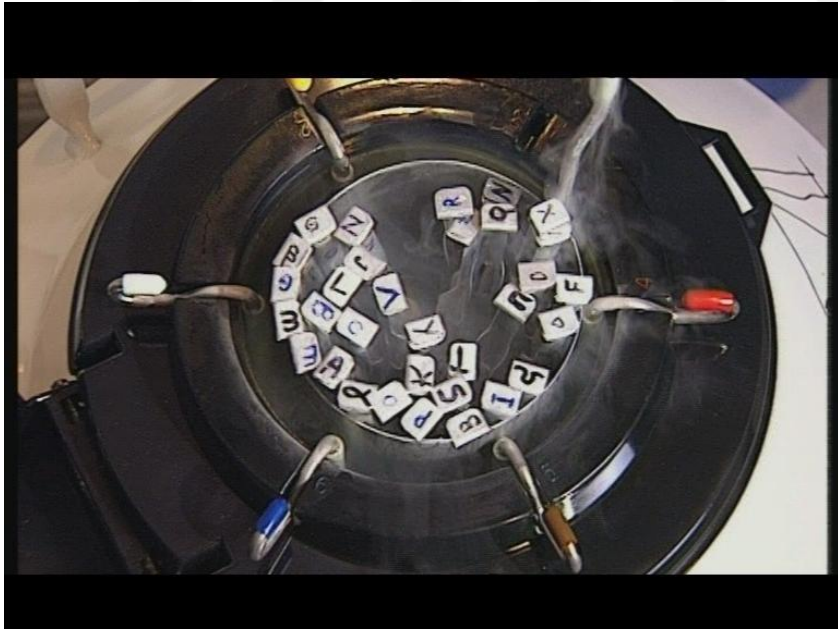


**Resim 10:** Ko-kültür dondurma sıvısının hazırlanışı.

- Dondurulan hücreleri saklamak için kullanılacak vialler buzlukta kutu içerisinde soğutulur.
- Eğer hücreler flaskta ise kontrol edilir ve kültür kabına alma protokolü uygulanarak falcon 2095 tüp içerisine alınır.1500 devirde 5dak. Santrifuj edilir.
- Santrifüj sonrası üst kısım atılır ve pellet üzerine 0.5ml hasta serumu ile hazırlanmış RPMI'lı medium eklenerek dilüe edilir.
- 1 ml Freezing solüsyonu, dilue edilmiş pellet üzerine damla damla çalkalayarak 2 dk içerisinde eklenir.
- Buzlukta bekletilen viallere konur.
- Çizgiye kadar sıvı Nitrojen doldurulmuş köpükte şeritler üzerinde 30 dk bekletilir ve son olarak Nitrojen 'e daldırılarak adresine yerleştirilir.



**Resim 11:** Ko-kültür dondurulması.



**Resim 12:** Dondurulmuş ko-kültür hücrelerinin saklanması.

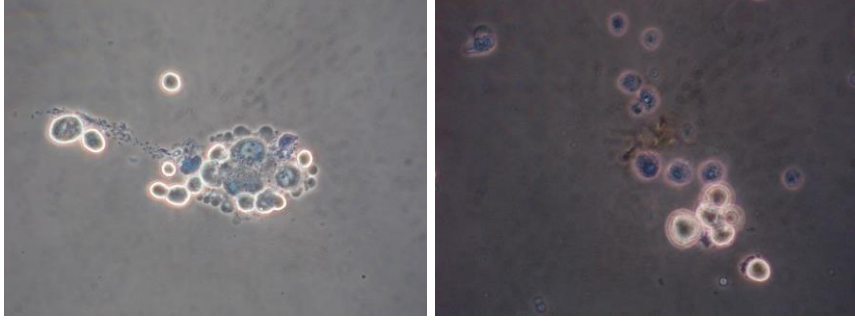
### 3.1.8. Çözme Protokolü

- Hastaya ait doku adresinden bulunur ve oda ısısında
- Vial içerisindeki hücreler, falcon 2095 tüpe aktarılır ve üzerine 5 ml DPBS eklenir.1500 devirde 5dk santrifuj edilir.
- Santrifuj sonrası üst kısım atılır ve pellet üzerine 0.5ml kültür kabına alma solüsyonu ekleyerek dilue edilir ve 1.5ml daha ekleyerek 1500 devirde 5 dk. Santrifuj edilir. Santrifuj sonrası; üst kısımdan 1.5ml çekilir.orta kısımda kalan 0.5ml lik kısım pelleti dağıtmayacak şekilde alıp verilerek tamamen çekilir.

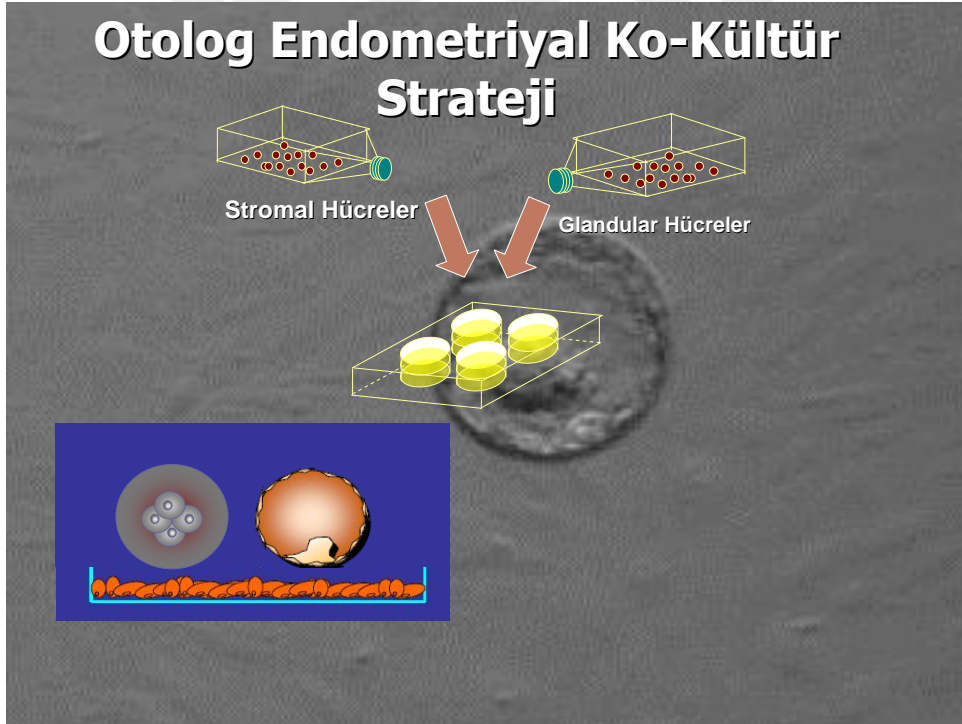


**Resim 13:** Çözülen hücrelerin sentrifügasyon sonrası tüpte görünümü.

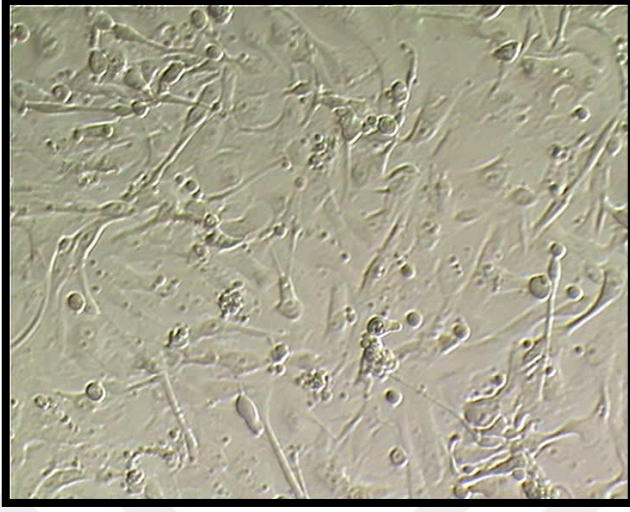
- Pellete hazırlanmış solüsyondan 0.5ml eklenerek ve homojenize edilir. Hücre sayma kamarası ile hücreler sayılır. Trypan blue ile yapılan viabilite ölçümünden sonra her kuyucuğa ortalama 300.000 /ml canlı hücre gelecek şekilde ekim yapılır (hücre sayısına göre inkübasyon solüsyonu ile dilüe ederek kullanılır. Burada elde edilen hücre kültürü %50 glandular % 50 oranında stromal hücrelerden oluşmaktadır.



**Resim 14:** Yıkanmış hücreler hücre sayma kamerasına 1 $\mu$ l, trypan blue 1 $\mu$ l olacak şekilde karıştırılmak suretiyle yerleştirilir ve faz mikroskop ile sayılır. (Trypan blue ile boyama sonrası içine mavi renkli boyayı almamış hücreler vital olarak değerlendirilip sayısal orantı ile seyreltme ve ekim miktarı hesaplanır).



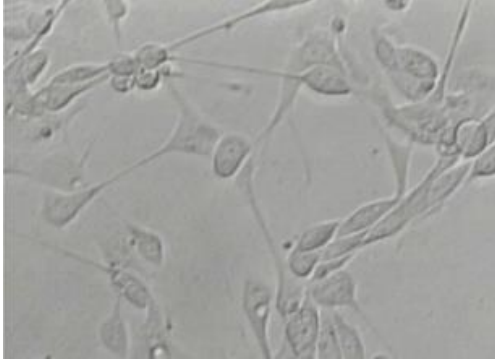
**Şekil 4:** İşlemler sonrası elde edilen stromal ve glandular hücreler %50 oranında olacak şekilde dondurulur ve işlemden 3 gün önce çözülerek çok gözlü petrilere ekim yapılır.



**Resim 15:** 4 gözlü petri yüzeyine yapışmış çözüme sonrası hücreler.

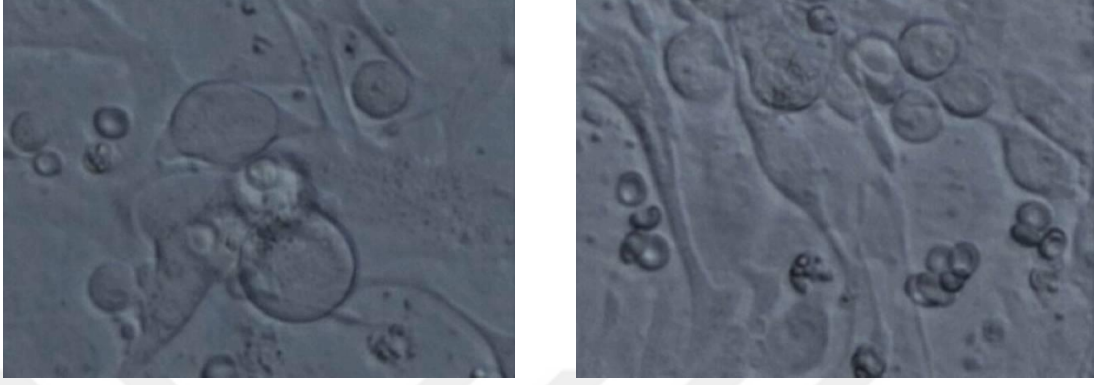
### 3.1.9. Ko Kültür Hücrelerinin Tanımlanması

#### 3.1.9.1. Endometrial Stromal Hücreler:



**Resim 16:** Endometriumda salgı meydana getiren küçük bez grupların aralarını dolduran stroma hücreleri adını alan destek hücrelerinden oluşurlar. Bu hücreler büyüyerek yaygınlaşırlar.

### 3.1.9.2. Endometrial Glandular Hücreler:



**Resim 17:** Endometrial hücreler kalınlaşıp uzayarak yaygınlaşırlar.

### 3.2. Oosit Toplanması (Opu)

Oosit toplama, Ovaryum folliküllerinden yumurtaların toplanmasıdır. İğne ile follikülün içine girilir, buradaki sıvı ve yumurtalar iğne ile emilir ve yumurtalar içlerine kültür sıvısı konulmuş kaplara yerleştirilir. Yıkama ve karşılama kültür sıvılarında basal kültür olarak HTF-HEPES kullanılıyor ancak tek farkları ek olarak kullanılan katkı maddeleridir. Yıkama sıvısı içinde ek olarak bulunan heparin, kanın pıhtılaşmasını önleyici bir etki yaratmaktadır. Bunun yanı sıra karşılama sıvısındaki HSA da oositlerin petri kabına yapışmasını engellemek amacıyla eklenmektedir.

1. OPU transvajinal ultrasonografi eşliğinde genel anestezi altında yapılır.
2. Oosit kalitesini ve neticesinde embriyo gelişimini etkileyebilecek olan ısı, osmolarite ve pH değişimlerini en aza indirmek için, tüm işlem ekip olarak en kısa sürede gerçekleştirilmeli ve oositler en kısa zamanda kültür



ortamına (%10 HSA içeren HTF) alınıp inkübatöre kaldırılmalıdır.

3. Otomatik aspirasyon pompasının ısıtılmalı zemininde duran 18 ml'lik tüplere aspire edilen folikül sıvısı hemşire ısını koruyarak laminar air flow'un ısıtılmış yüzeyinde duran 35 mm çapındaki steril petri kabına döker. Embriyolog kaç folikül aspire edildiği konusunda hemşire tarafından bilgilendirilir. Daha sonra tüp enfekte atık torbasına atılır.
4. Petri kabın içindeki foliküler sıvıda oosit aranmasını embriyolog stereomikroskop yardımı ile gerçekleştirilir. İlk önce, petri kap mikroskopun ışığının üzerinde eğimlendirerek çevrilir ve KOK (kümü-lüs-oosit-korona kompleks ) varlığı kontrol edilir. Görülen KOK'lar önceden hazırlanmış olan geniş çaplı steril pastör pipet yardımı ile stereomikroskop altında ve ısıtıcı yüzey üstünde bulunan ve oosit karşılama medyumunu içeren petri kaba dikkatli şekilde aktarılır. Mümkün olduğunca az miktarda folikül sıvısı ve eritrosit transferi yapılmasına dikkate edilir
5. İşlem sonunda embriyolog sağ ve sol overden toplam kaç oosit alındığı hakkında, hemşire ve doktoru bilgilendirir.
6. Toplanan son folikül sıvısının laboratuara teslim edilmesinden sonra embriyolog, insülin enjektörlerinin yardımı ile oosit karşılama sıvısındaki tüm oositleri, petri kabın eritrosit içermeyen bölgesine toplar.
7. Daha sonra oosit kumulus diseksiyonu gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında sağ ve sol elde bulunan insülin enjektörleri ile kumulus-mass içerisinde bulunan oosit kumulus-mass'ın kenarına getirilir ve oosite yakın kısımdan kumulus-mass kompleksi kesilerek oositten uzaklaştırılır. Diseksiyon

tamamlandıktan hemen sonra, inkübatörde bulunan 1 gece önceden hazırlanmış üzeri 3 ml'e mineral oil ile kaplanmış olan %10 HSA'lı HTF medyumuna alınır oositlerin konulduğu damlacığın etrafı cam kalemi ile işaretlenir ve hastanın adı-soyadı tekrar kontrol edildikten sonra petrinin altına yazılır.

8. Diseksiye edilmiş oosit çapına uygun olarak ucu yuvarlatılmış olan steril pastör pipeti ile oositlerin alınacağı petri kabından bir miktar kültür medyumunu(~5µl) çekilir ve diseksiye edilmiş oositlerin tümü, az miktarda medium ile toplanır.
9. Oositler, damlacık içeren petri kabı içinde eritrositlerinden uzaklaştırılmak için kültür damlacıklarında birkaç kez pipetlendikten sonra az miktarda kültür sıvısı ile toplanır ve temiz olan damlacığa bırakılır.

### **3.3. Oositlerin Soyulması (Denüstasyon İşlemi):**

1. OPU ve diseksiyon sonrası inkübatöre kaldırılan oositler yaklaşık 2 saat sonra çevresindeki korona-kümüllüs yapısının uzaklaştırılması için tekrar işleme alınırlar. İşlemden önce hyaluronidase enzimi (HYASE) enzimi ve farklı çaplardaki elle çekilmiş pastör pipetleri kullanılır. Hyase ile soyma işlemi ICSI uygulanacaksa yapılır. IVF yapılacaksa bu işlem yapılmamalıdır.
2. İşlemden önce kullanılacak miktarda hyase bölünür ve 37 °C' ye gelmesi için ağzı kapalı şekilde inkübatöre kısa bir süre bekletilir. Daha sonra işlem esnasında kullanılacak olan 1 (en küçük çap ~130-140µm) 'den 5 (en büyük çap ~170-180µm ) kadar elle çekilmiş pastör pipetleri çekilir ve sıralanır.

3. apların ayarlı ve pipetlerin uçlarının çentikli olmamasına kesinlikle çok dikkat edilmelidir. Çok dar pipet kullanılması oositin patlamasına, geniş pipet kullanılması ise korona-kümülüs yapısının tamamıyla uzaklaştırılmamasına ve işlemin uzun sürmesine sebep olur.
4. 37 °C' deki hyaluronidase enziminden (80 IU/ml) 60-80ul kadar ucu yuvarlatılmış pastör pipeti ile, disekkiye edilmiş oositlerin de içinde bulunduğu petri kabında yeri boşaltılmış damlaya konur.
5. Oositler postör pipeti ile alınarak hyaluronidase enzimi bulunan damlaya transfer edilir ve burada 3-5 kez nazikçe pipetlenir. Oositlerin 10 saniyeden fazla hyaluronidase enzimiyle doğrudan temasından kaçınılmalıdır.
6. Oositler en az iki farklı damlalarda pipetlenerek yıkanır, mükün olduğunca hyaluronidase seyreltmeye çalışılır.
7. Oositler, nazikçe pipetlenir ve pipetleme esnasında korona-kümülüs yapısının uzaklaştığı görülür. Bu işleminde aynı anda 3 den fazla oosite gerçekleştirilmez ve pipetten pipete geçişte her zaman temiz damlaya geçilir.
8. Etrafı korona-kümülüs yapısında temizlenmiş olan oositler, petri kabının ortasındaki damlacıklara konur ve ICSI işlemine kadar inkübatördeki yerine, yaklaşık 2 saat kadar kültüre edilmek üzere kaldırılır.
9. Soyma (denüstasyon) işleminin 3 dakikayı aşmamasına çok dikkat gösterilmeli, oosit sayısının çok fazla olduğu hastaların oositleri birden fazla petri kabına bölünmeli ve işleme alınmalıdır.

### **3.4. Intra Sitoplamik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) İşlemi:**

#### **3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar:**

Polyvinlypyrolidone (PVP), Fertilizasyon sıvısı ve human tubal fluid (insan tuba sıvısı) HTF sıvısıdır (inkübatör dışı çalışılması nedeni ile hepes tampon içeren HTF kullanılmaktadır). PVP, ICSI işleminden önce spermin akrozom'una hasar vermeden hareketini yavaşlatmada kullanılmaktadır. Fertilizasyon sıvısı ise in vitro fertilizasyonu, erkek ve kadın gametlerinin hazırlanmasını desteklemek amacı ile dizayn edilmiştir.

Fertilizasyon sıvısı karbonhidrat ve amino asitleri içererek fertilizasyonu desteklemektedir.

#### **3.4.2. ICSI protokolü**

1. Gerekli ayarlardan sonra, ICSI işleminde kullanılan ICSI pipeti (30° uç eğimli) ve holding pipeti (30° uç eğimli), pipet tutuculara yerleştirilir. Zeminle yaklaşık 45°'lik açı yapacak şekilde getirilir ve uçları zemine paralel olacak şekilde mikroskop altında ayarlanır.
2. ICSI işlemi, Hoffman modülasyonu olan inverted mikroskopun ısıtıcı tablası üzerinde yapılır ve X400 büyütme kullanılır.
3. ICSI için kullanılan kabı %10 tampon ve % 10 HSA içeren HTF mediumu ile 50µl lik sperm damlası, 5µl lik PVP(%10 luk) damlası ve 5 er µl lik 11 adet oosit damlası olacak şekilde hazırlanır. Tüm damlalar 4 ml mineral yağ ile kapatılır

4. ICSI işleminde sperm hazırlama talimatına uygun olarak hazırlanmış ve ICSI kabında sperm inseminasyonunun yapıldığı 50µl 'lik damladan, morfolojik olarak normal görünümlü ve eğer mevcutsa hareketli spermler seçilir.
5. Spermlerin bulunduğu damladan alınan spermler, polyvinylpyrrolidone (PVP) damlasında ICSI pipeti ile kuyruğun boyun kısmına yakın 2/3 lük kısmından immobilize edilir ve kuyruğa doğru pipet ucu ileri geri kaydırılarak sperm kendi etrafında döndürülür.
6. Sonunda ani bir hareketle kuyruğun kıvrılması ve sperm zarının zedelenmesi sağlanır. Kuyruğundan aspire edildikten sonra enjeksiyon işlemi için oositin bulunduğu damlacığa yağdan çıkmazsızın gidilir.
7. Damlacık içindeki oosit, holder ile saat 9 hizasından hafifçe aspire edilerek sabitleştirilir.
8. Enjeksiyon pipeti ile oositte rotasyon yapılarak 1.kutup cisimciği'nin yeri saat 12 veya 6 hizasına gelecek şekilde tespit edilir ve oositin polar segmentini içeren granüler görünümlü alan belirlenir
9. Oositte, bu alan saat 9 hizasına gelecek şekilde tesbit edilmelidir. İşlem esnasında oositin ekvatoryal düzlemi ile yakalama pipetinin iç ağız açıklığı aynı düzlemde olmalıdır.
10. Enjeksiyon pipeti oositin saat 3 hizasına getirilir ve oolemanın dış çizgisi ile aynı düzlemde olması sağlanır.
11. Sperm yavaşça pipetin uç kısmına getirilir ve zona pellusida delininceye kadar aspirasyon yapılmaksızın ilerletilir.

12. Oosit stoplazması içine ulaştırıldığında hafif bir aspirasyon yapılır. Ooplazmanın pipet içine yavaşça dolması ve spermin geriye doğru hareketlenmesi oolemma membranının kırıldığını gösterir Yavaşça aspire edilen stoplazma ve sperm geri verilir
13. Bu işlem tüm oositlerde aynı sıra ile uygulanır.
14. Mikroenjeksiyon sonrası oositler sırayla dropletlerden alınır ve aynı kişiye ait petri kabında orta dropletlerde pipetlenerek tamponlu solüsyondan temizlenir ve %10 HSA içeren uygun fertilizasyon solusyonuna aktarılır. Yerleştirme işlemi bittikten sonra oositlere inkübasyon için belirlenmiş ve önceden etiketlenmiş inkübatörde hastaya ait lokasyona kaldırılır.

### 3.5. Fertilizasyonun Değerlendirilmesi (1.Gün)

Fertilizasyon kontrolü IVF veya mikroenjeksiyon işleminden 12-18 saat sonra yapılmalıdır. Daha sonra oositler temiz 1.aşama kültür solusyonu dropletlerine alınarak inverted mikroskop altında incelenir.

Fertilizasyon, kısaca tek bir sperm çekirdeğinin oositten gelen çekirdek ile aktive olmuş oosit sitoplazması içinde 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. Çekirdekler döllenmenin en basit ve kolayca gözlemlenebilen işaretleridir. Normal fertilizasyonda 2 pronükleus ve birinci ve ikinci kutup cisimciği gözlenir. Her iki çekirdekte meydana gelen olayların eş zamanlı olması döllenme ve ileri embriyo gelişimi açısından önemlidir. Erken zigot oluşumunda çekirdekçik ve çekirdekçiğe bağlı oluşumlar büyük önem taşır.

Eş zamanlı gelişim göstermeyen döllenme aktivitelerine sahip zigotlarla yapılan araştırmalarda bu zigotlarda yüksek oranda kromozomal anomali, anormal klivaj ve gelişim blokajı nedeni ile nadir blastosist oluşumu gözlenmiştir (42,43,44).

Zigot değerlendirmesinde döllenme sonrası dört ana kriter dikkate alınmaktadır: Bunlar çekirdek büyüklüğü, çekirdekçik-öncesi cisimciklerinin sayıları, büyüklükleri ve dağılımıdır. Sabah yapılan fertilizasyon kontrolünden sonra takip formuna pronükleus sınıflandırması, anormal fertilizasyon görülen oositler, fertilizasyon gözlenmeyen (intakt) oositler yazılır. Daha sonra fertilizasyon gözlenen oositler bir gün önce hazırlanan taze 1.aşama kültür mediumu dropletleri içeren kültür kaplarına alınır. 3 yada daha fazla pronükleus içeren oositler ayrı bir kültür kabında takip edilmelidir.

### **3.6. Embriyo Sınıflandırması**

#### **3.6.1. 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 yapısında çekirdek bulunmayan 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 (42,43,44). Bu dönem ayrıca çekirdeklerin birleşmesi sonrası oluşan embriyoya ait genomun da devreye girdiği dönemdir. Normal

olarak yapılanmamış bir genoma sahip embriyoların çoğu bu dönem sonrası ileri gelişim göstermezler. Bu dönem ayrıca hücreler arası bağların (tight junctions, adherens junctions ve gap junctions) 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, böylece ileri embriyo gelişim döneminde hücreler arası sinyal mekanizmaları oluşturarak başkalaşmalarını sağlarlar. Birleşme (compaction) olarak ta adlandırılan bu dönemde artık hücrelerin sınırlarını belirlemek zordur (43,44).

Günümüzde birçok IVF merkezinde değişik embriyo sınıflandırma kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterler düzenlenirken göz önüne alınan en önemli iki nokta embriyo kontrolleri sırasında harcanan zaman ve embriyonun zarar görme ihtimalidir.

2. günden 4. güne kadar olan klivaj dönemindeki embriyolar değerlendirilirken göz önüne alınan kriterler blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, embriyonun içerdiği fragmantasyon ve sitoplazma yapısıdır. 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 değerlendirilir. 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 embriyodur. Değerlendirilen embriyo eşit büyüklükte blastomer yapısına sahipse, % 0-5 arasında fragmantasyon içeriyorsa ve sitoplazmasında belirgin granüler yapı gözlenmiyorsa 1.kalite, %10-%20 arasında fragmantasyon içeriyor, blastomerler hafifçe birbirinden farklı veya granülasyon gösteriyorsa 2.kalite olarak sınıflandırılır. Daha yüksek oranda fragmantasyon veya granülasyon içeren embriyolar 3. Ve 4. kalite olarak tanımlanır (Tablo:1).



Gelişim günlerine bağlı olarak embriyolarının değerlendirilmesinde kullanılan sınıflandırma sistemi ve her bir sınıfa ait tanımlama kriterleri aşağıdadır ( 43):

**Tablo 1.** Klivaj Dönemi Embriyo Sınıflandırması

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.

### 3.6.2. Blastosist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi

3. günden sonra 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 ederek blastosist aşamasına gelindiğinde sırasıyla iç hücre kütlelerini (inner cell mass) ve trofektoderm tabakasını oluştururlar. Trofektoderm tabakasını oluşturan hücreler arası bağlar sıktır ve başkalaşım sırasında bu hücreler tarafından iç kısımda blastosel adı verilen sıvı oluşturulur. Blastosel içerdiği değişik iyon ve protein konsantrasyonu bakımından iç hücre kütlelerinin ileri gelişimi için son derece kritik bir önem taşır. Bu aşamada oluşan embriyonun yapısal değerlendirmesinde kullanılan üç temel kriter blastosel kavitenin yapısı , trofektoderm hücrelerinin yapısı ve dizilimi, ve iç hücre kütlelerini oluşturan hücrelerin sayısı ve yapısıdır(44).

### **Blastosel Kavite Oluşumuna Göre Sınıflandırma**

1. **Erken-Early Blastosist:** Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından azdır.
2. **Blastosist:** Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından fazladır.
3. **Tam-Full Blastosist:** Blastosel kavitesi embriyo volümünün tümünü kaplamıştır.
4. **Genişlemiş-Expanded Blastosist:** Blastosel kavitesi volümü artmış, çap büyümüş, zona iyice incelmıştır.
5. **Çatlayan-Hatching Blastosist:** Trofoektoderm hücrelerinin bir kısmı zona katmanı dışına çıkmaya başlamıştır.
6. **Çatlamış-Hatched Blastosist:** Embriyo tümüyle zona katmanı dışına çıkmıştır.

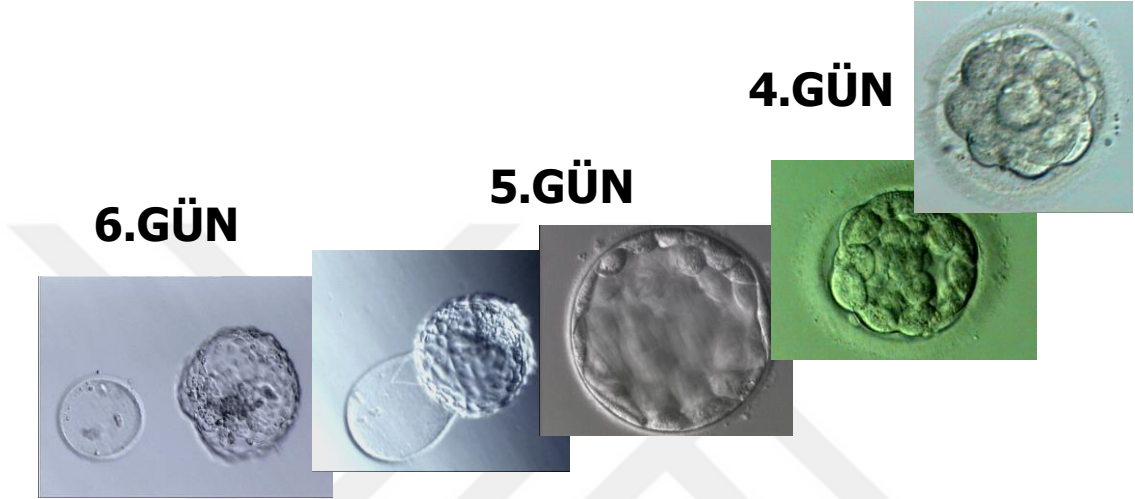
### **İç hücre kütlesi-Inner Cell Mass (ICM) Yapısına Göre Sınıflandırma**

- A) Sıkı, paket şeklinde çok sayıda hücre içermesi
- B) Gevşek bir grup halinde çok sayıda hücre içermesi.
- C) Çok az hücre içermesi

### Trofektoderm Yapısına Göre Sınıflandırma

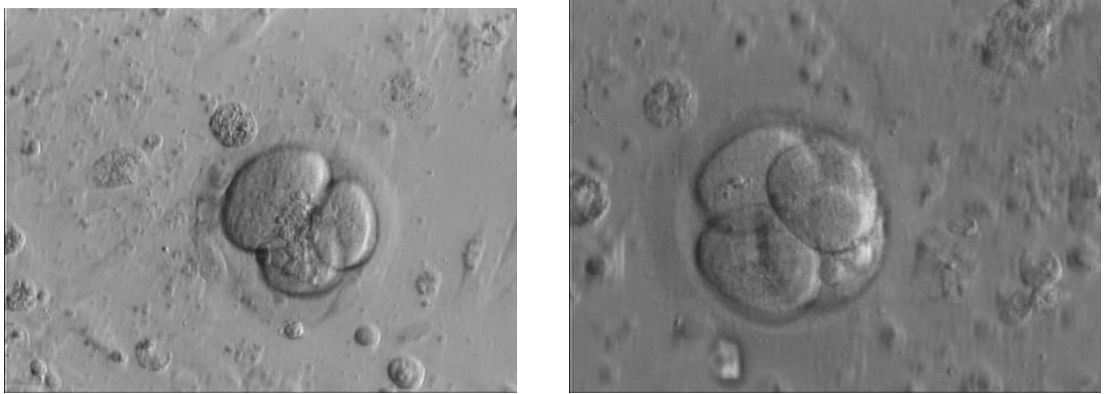
A) Birbirine sıkıca bağlı birçok hücreden oluşan epitelium.

B) Daha gevşek bağlı birkaç hücreden oluşan epitel yapı.

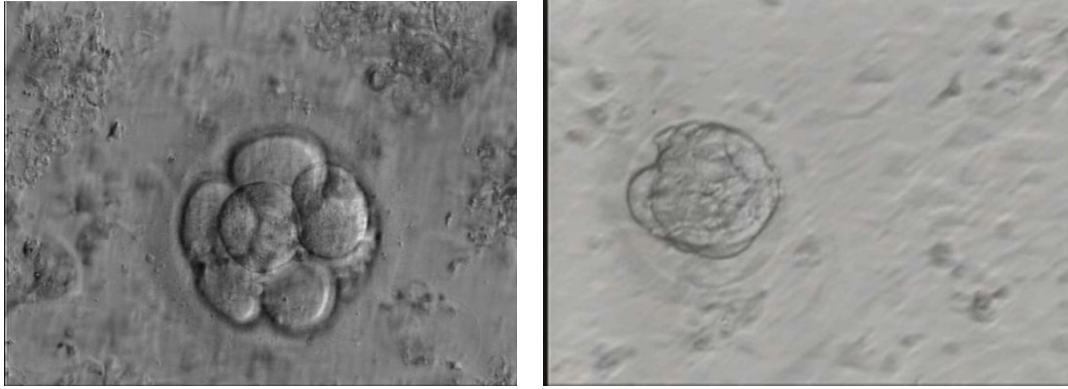


Şekil 5. Blastosist dönem gelişimi

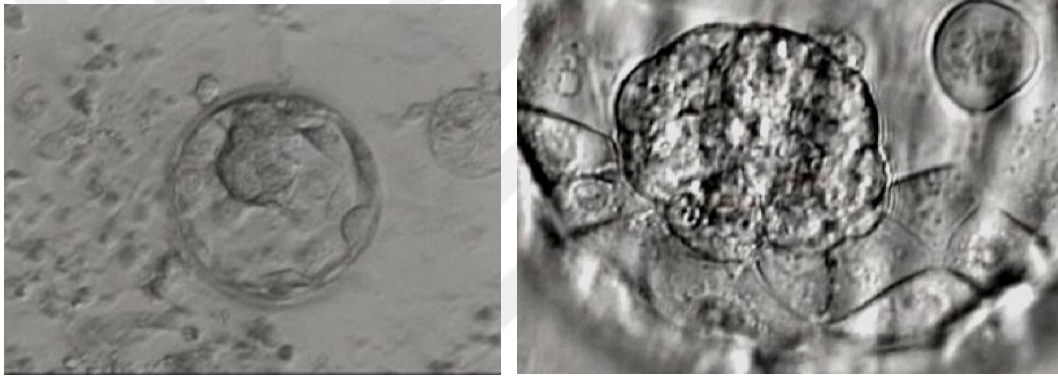
### 3.7. Ko-Kültür Üzerinde Embriyo Gelişimi



Resim 18: (a-b) Ko-kültür üzerinde 2. gün embriyo gelişimi



**Resim 19:** (a-b) Ko-kültür üzerinde 3. ve 4. gün embriyo gelişimi



**Resim 20:** (a-b) Ko-kültür üzerinde 5. gün embriyo gelişimi ve gelişen iç hücre kütlesi ( inner cell mass) ayrıntısı.

### 3.8. Embriyo Transfer

1-Transfer işlemi için seçilen embriyolar inkübatörden çıkarılmadan, transferde kullanılan malzemeler hazırlanır. Her bir transfer için bir adet steril eldiven, bir adet insülin enjektörü, bir adet transfer enjektörü, petri kabı/kapağı ve transferde kullanılması planlanan katater hazırlanır.

2-Laminal flow içi küçük inkübatörde daha 37°C 'ye gelmiş ve 6% CO<sub>2</sub> ve %5 O<sub>2</sub> ile gazlanmış, tüpler içinde yaklaşık 1 ml olarak önceden bölünmüş kültür mediumlarından her transfer için 2 adet çıkarılır ve spor içine konur. Embriyo transferinden hemen önce çıkarılan bu tüpler kataterin yıkanmasında ve kataterin sıvı ile doldurulmasında kullanılır. Doğrudan embriyo ile temas etmez.

3-Embriyonun katatere çekilmesinden evvel kataterin hazır hale getirilmesi gerekmektedir bu işlem için sırası ile şunlar yapılır:

- Öncelikle işlemin steril koşullarda yapılması ve işlem esnasında sterilitenin korunması son derece önemlidir. Bu nedenle steril eldiven giyilir ve hazırlıklar steril eldivenin açılması ile çıkan steril alan üzerinde gerçekleştirilir.
- İnsülin enjektörü ile inkübatörden çıkarılmış tüplerden birinden yaklaşık 0.5ml kültür sıvısı çekilir, katater enjektörün başına takılır ve medium petri kabın kapağına boşaltılır. Bu şekilde katater yıkanmış olur.
- Enjektöre takılı olarak duran katater tüplerden birinin içine sokulur ve enjektör ile içine medium çekilir. Bu şekilde enjektörün içi medium ile doldurulmuş olur. Enjektör çıkarılmadan steril alan üzerine bırakılır.

- Cam transfer enjektörü alınır ve pistonun sertliği kontrol edilir, eğer yumuşak ise pistonun ucundaki conta steril petri kapına bir kaç kez hafifce vurularak ucu düzleştirilir
- Transfer enjektörü ile petri kabında bulunan küçük bir kültür sıvısı damlasından zemine bastırarak (hava çekmeyi önlemek için) yaklaşık 10 ul çekilir ve steril alana bırakılır.
- Steril alan üzerinde bulunan içi kültür sıvısı ile dolu ve ucunda insulin enjektörü bulunan katater bir ele alınır, yere paralel şekilde tutulur, ucundaki enjektör çekilir ve yerine hızlı şekilde içinde 10ul sıvı bulunan transfer enjektörüne çekilir.
- Bu işlem esnasında nemli olan katatere havanın girmesine engel olmaktır. Eğer katatere hava girmiş ise veya içindeki sıvı boşalmış ise işlemler hızlı şekilde tekrarlanır.
- Katatere embriyo çekme işlemi stereo mikroskop altında gerçekleşir ve laminar flow'un ışıklarının kapalı olması gerekmektedir. Embriyoları getiren embriyolog embriyoların petri kaptaki saat 12 pozisyonunda olacak şekilde stereo mikroskop altına koyarak ve objektifin büyüklüğünü ve görüntüyü transfer edilecek embriyoloğun gözüne uygun şekilde ayarlar ve kontrol eder.
- Transfer kataterinin ucuna takılı olan ve ucundan yaklaşık 5 ul kadar içeri hava çekilmiş kataterin ucu embriyoların içinde bulunduğu damlaçığın içine konur ve katatere yaklaşık 5 ul kadar solüsyon çeker. Kataterin ucunu solüsyondan çıkarır ve yine 5 ul solüsyonun geleceği seviyeye kadar hava çeker.
- Hava çektikten sonra kataterin uçunu embriyoların bulunduğu damlacık içine çeker ve yaklaşık 10ul kadar solüsyon çeker. Bu işlem esnasında embriyoları da katatere

eker ve embriyoların 10µl lik solüsyon ortasında olmasına dikkat eder. Embriyoları katatere çektikten sonra kataterin ucunu çıkarır ve yaklaşık 5 µl lik solüsyonun gelecegi seviyeye kadar hava çeker.

- Son olarak tekrar kataterin ucunu tüpteki solüsyona sokar ve 5 µl kadar transfer sıvısı çeker. Kataterin ucunu steril petri kabın kapağında bulunan solüsyon ile yıkanır.
- Transfer işlemleri tamamlandıktan sonra embriyolog katateri alır ve içini, uç kısmı petri kabın kapağında bulunan solüsyonu içinde tutar, transfer enjektörü kataterden çıkarılır ve yerine içinde bir miktar solüsyon olan insülin enjektörünü takar ve kataterin içindeki solüsyonu boşaltıp, kataterde embriyo kalıp kalmadığını stereo mikroskopu altında kontrol eder.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma amacı

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı sonucu altında değerlendirilmiş (en az iki en fazla onbir kez embriyo transferi sonrası başarısız tüp bebek denemesi yaşamış olan) toplam 678 hasta bu çalışmada yer almıştır. Bu hastalar kadın yaşı, gebelik elde edilene dek geçirdikleri ICSI deneme sayıları ve siklus başına elde edilen ortalama MII oosit sayısına göre değerlendirilmişlerdir. Burada amaç, tüp bebek tedavisi sürecine konvansiyonel kültür ortamları ile devam edilerek sonuçta gebeliğe ulaşma sürecinin ko-kültür çalışması ile ne kadar değiştirilebileceğini yaş ve elde edilen matür oosit oranları göz önüne alınmak suretiyle ortaya koyabilmektir. Ko-kültür uygulamasından fayda görebilecek olan hedef hasta grubunun saptanması ve sonrasında bu hastaların özelliklerini taşıyan olgulara endometrial kokültürün tedavi seçeneği olarak tanımlanabilmesi bu çalışmanın nihai hedefi olacaktır. Bu şartlarda ko-kültürün tam olarak hangi hasta grubunda ve hangi oranda daha etkili olabileceğini net olarak belirlemek suretiyle IVF çalışmalarındaki etkinlik sınırları ortaya konulabilecektir.

**Olgu sayısı:** transferi gerçekleşmiş tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tanımlanmış olgu sayısı.

**Gebelik:** Kalp atışı saptanmış gebelikler değerlendirmeye alınmıştır. Tümü doğumla sonuçlanmış ve sağlıklı devam eden klinik gebeliklerdir.

**Gebelik oranı (%):** (Gebelik sayısı/olgu sayısı)X100



**NS:** Sonucun istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması (not significant),

- Bu çalışma 2009-2015 tarihleri arasında Taksim Alman Hastanesi ve Ankara Centrum Klinikte uygulamaya alınmış olan toplam 678 hastayı kapsamaktadır. Retrospektik dizayn edilmiş bir çalışmadır.)
- (Çalışma sürecinde TürkiyeÜremeye Yardımcı Teknikler yasasındaki transfer edilen embriyo sayısı konusundaki değişiklikler nedeni ile , transfer edilen embriyo sayısı değişiklik göstermesi nedeniyle verilerin değerlendirilmesinde klinik gebelik oranları çalışmada değerlendirilmiştir.)
- (Hasta yaş sınırı olarak en düşük yaş 20 ve en üst yaş olarak 44 yaşlar sınır olarak belirlenmiştir)

#### **4.2. Çalışma Modeli**

A) Bu çalışmada embriyo transferi gerçekleştirilmiş, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı endikasyonu konulmuş, toplam 678 olgu 2 farklı grup altında değerlendirildi.

I. Grupta yer alan toplam 329 olgu ,önceki denemeleri aynı konvansiyonel kültür ortamında başarısızlıkla sonuçlanması nedeni ile son denemelerinde basal olarak aynı konvansiyonel kültür solüsyonu baz alınmak suretiyle hazırlanmış ko-kültür hücreleri eşliğinde kültüre edilmiş olan ve ortalama 3.3 deneme sayısına sahip hastalardan oluşmaktadır.

II. Grupta değerlendirilen hastalar gebeliğe ulaşana dek tüm denemelerini aynı konvansiyonel kültür ortamında tamamladılar, bu grupta yer alan toplam 349 hasta ortalama 4.8 deneme sayısına sahipler. Bu

gruplar devam eden sağlıklı klinik gebelik sonuçlarına göre değerlendirilmişlerdir.

B) Kokültür ve konvansiyonel kültür ortamı grupları kadın yaş gruplarına göre tekrar değerlendirilmişlerdir. İlk grupta 20-38 yaş grubu olgular, ikinci grupta 38 yaş ve üzeri olgular bu iki ayrı kültür sistemine göre klinik gebelikleri değerlendirilmiştir.

C) İki ayrı yaş ve kültür grubu tamamen sınıflandırılmış olarak olguların önceki başarısız deneme sayılarına göre tekrar değerlendirmeye alınmışlardır.

D) İki ayrı yaş ve kültür grubu tamamen sınıflandırılmış olarak olgular, son denemelerinde elde edilen olgun (MII OOSİT) sayılarına göre tekrar değerlendirmeye alınmışlardır.

### **4.3. Çalışma Sonuçları**

#### **4.3.1. Kokültür (GRUP I ) ve Konvansiyonel Kültür Gruplarının (Grup II) Klinik Gebeliklerinin Karşılaştırılması**

Kokültür ve konvansiyonel kültürde inkübe edilmiş olgular klinik gebelik oranlarına göre değerlendirildiklerinde kokültür grubu %38,3 ve konvansiyonel kültür grubu %27,2 oranında klinik gebelik göstermişlerdir.5,1 oranında daha yüksek gebelik kokültür ile sağlanmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir (NS).

**Tablo 2:** Grup I ve Grup II klinik gebelik ve implantasyon oranı karşılaştırmaları

	<b>GEBELİK</b>	<b>%</b>	<b>İMLANTASYON %</b>	<b>P</b>
<b>GRUP I</b>	126/329	38,3	12,39	NS
<b>GRUPII</b>	95/349	27,2	7,31	NS

CHİ-SQUARE DEĞER:1,1739  
P DEĞER:0,278594

**Tablo 3:** Grup I ve Grup II siklus veri karşılaştırmaları

	<b>GRUP I</b>	<b>GRUP II</b>	<b>P</b>
♀ <b>YAŞI</b>	34,4±3,3	32,2±4,0	NS
♂ <b>YAŞI</b>	37,6±4,1	36,3±5,3	NS
<b>DENEME ORT.</b>	3,3±2,4	4,8±2,8	NS
<b>OOSİT ORT.</b>	14,4±6,9	14,7±7,2	NS
<b>MII ORT.</b>	9,8±5,1	11,6±5,3	NS
<b>FERT. OR.(%)</b>	78,6	78,3	NS

İki ayrı kültür ortamında geliştirilen hasta grubu embriyolarının kadın ve erkek yaşı, önceki başarısız deneme ortalamaları, elde edilen toplam ve MII oosit ortalamaları ve fertilizasyon oranları yönünden istatistiksel olarak farklılık göstermedikleri gözlenmiştir.

**Tablo 4:** Grup I ve Grup II 3. Gün embriyo gelişim verilerinin karşılaştırmaları

<b>3. gün embriyo verileri</b>	<b>GRUP I</b>	<b>GRUP II</b>	<b>P</b>
<b>Pn Duraksama oranı(%)</b>	2,62	7,04	P<0,01
<b>3. Gün Duraksama oranı (%)</b>	3,35	11,45	P<0,01
<b>&gt;6 blastomer oranı(%)</b>	72,9	44,7	P<0,01
<b>1.Kalite emb. Oranı(%)</b>	68,5	54,2	NS
<b>Fragmantasyon Oranı(%)</b>	9,7	18,3	P<0,05

Embriyo gelişimi yönünden farklı günlerde transfer seçenekleri kullanıldığı için (3., 4. Ve 5.gün) sadece 3. Gün embriyo gelişim bilgilerine yer verilmiştir. 3.günde özellikle embriyo gelişim duraksamalarında büyük

farklılıklar ortaya konmuştur. Döllenme sonrası klivaja geçemeyen embriyo yüzdelerinde (grup1/grup2: %2,62/%7,04) ( $p<0,01$ ) istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiştir. 3. gün embriyo gelişim duraksaması gene anlamlı bir farklılık göstermektedir (grup1/grup2: %3,35/%11,45) 3. gün embriyo gelişiminde 6 hücre üzeri embriyo eldesinde anlamlı farklılıklar ortaya konmuştur (grup1/grup2: %72,9/%44,7) ( $p<0,01$ ). 1. Kalite embriyo gelişimi oranında anlamlı olmamakla birlikte kokültür grubu daha avantajlı görünmektedir (grup1/grup2: %68,5/%54,2). Embriyo gelişim kalitesini ve hızını etkileyen en önemli verilerden biri olan embriyo fragmentasyon yüzdeleri karşılaştırınca gene anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (grup1/grup2: %9,7/%18,3) ( $p<0,05$ ).

#### **4.3.2. Kadın yaş ortalamasına göre gebelik sonuçları**

Çalışma değerlendirilen tekrarlayan implantasyon başarısızlığı endikasyonuna sahip transferi gerçekleşmiş toplam 329 kokültür olgusunun (GRUP I) 126'sında klinik olarak gebelik sağlanmıştır (%38,3). Bu hastaların 222'si 20-38 yaş aralığında bulunmaktadır ve 94'ü gebedir (%42,3). 107'si ise 38 yaş ve üzeridir ( $38\leq$ ) ve 32'si gebedir (%29,9).

Konvansiyonel kültür kullanılmış (GRUPII) toplam 349'unda ise 95 kişi klinik gebelik göstermiştir (%27,2). Bu grupta bulunan 223 olgu 20-38 yaş grubu arasında bulunmaktadır ve 75'inde klinik gebelik tespit edilmiştir (%33,6). 126 olgu ise 38 yaş ve üstüdür ( $38\leq$ ) ve 20 klinik gebelik elde edilmiştir (%15,9). Bu gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir (NS).

**Tablo 5:** Yaşlara göre Grup I ve Grup II'nin klinik gebeliklerinin karşılaştırması

	20-38	%	38≤	%	P DEĞERİ
<b>KOKÜLTÜR GEBELİĞİ</b>	94/222	42,3	32/107	29,9	NS
<b>KONVANSİYONEL KÜLTÜR GEBELİĞİ</b>	75/223	33,6	20/126	15,9	NS

CHI-SQUARE DEĞER:1,1739

P DEĞER:0,278594



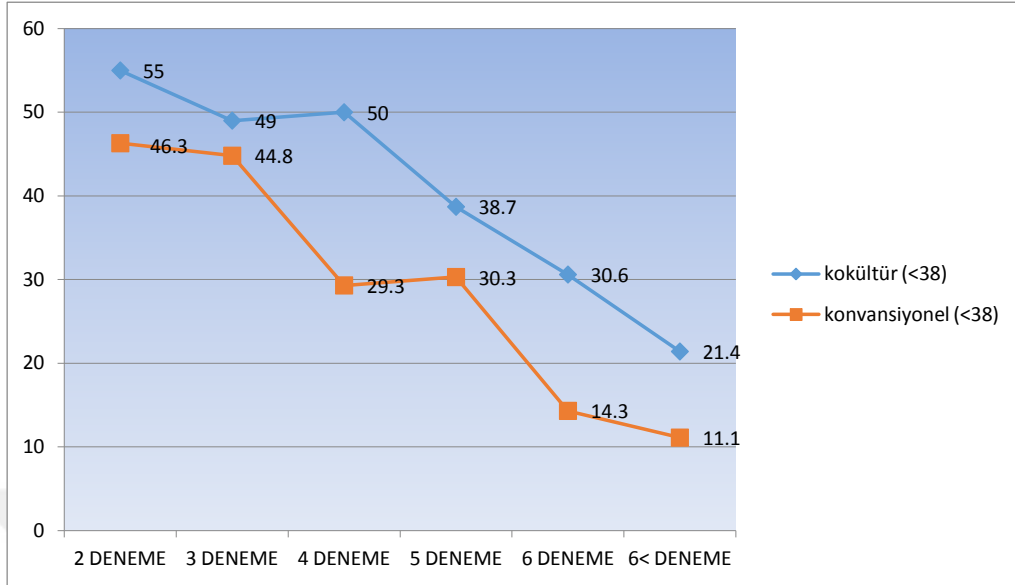
**Grafik 1:** Tekrarlayan implantasyon olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası , kadın yaş gruplarına göre gebeliğe ulaşma oranları.

**4.3.3. GRUP I ve GRUP II hastalarının daha önceki deneme sayılarına göre klinik gebelik oranlarının karşılaştırılması:**

Çalışma Grubundaki hastalar bu kez hastaların gebelik öncesi geçirdikleri başarısız IVF deneme sayısına göre değerlendirildiler.Öncelikle 38 yaş altı hastalar daha önceki 2,3,4,5,6 ve üzeri deneme sayılarına göre tekrar değerlendirildiler.Aralarında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık gösteren veriye rastlanmadı (NS)

**Tablo 6:** 38 yaş altı Grup 1 ve Grup 2 hastalarının deneme sayılarına göre klinik gebeliklerinin karşılaştırılması

	<b>KOKÜLTÜR(YAŞ&lt;38)</b>	<b>%</b>	<b>KONVANSİYONEL (YAŞ&lt;38)</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
<b>2 DENEME</b>	22/40	55	25/54	46,3	NS
<b>3 DENEME</b>	25/51	49	22/49	44,8	NS
<b>4 DENEME</b>	18/36	50	12/41	29,3	NS
<b>5 DENEME</b>	12/31	38,7	10/33	30,3	NS
<b>6 DENEME</b>	11/36	30,6	4/28	14,3	NS
<b>6&lt; DENEME</b>	6/28	21,4	2/18	11,1	NS



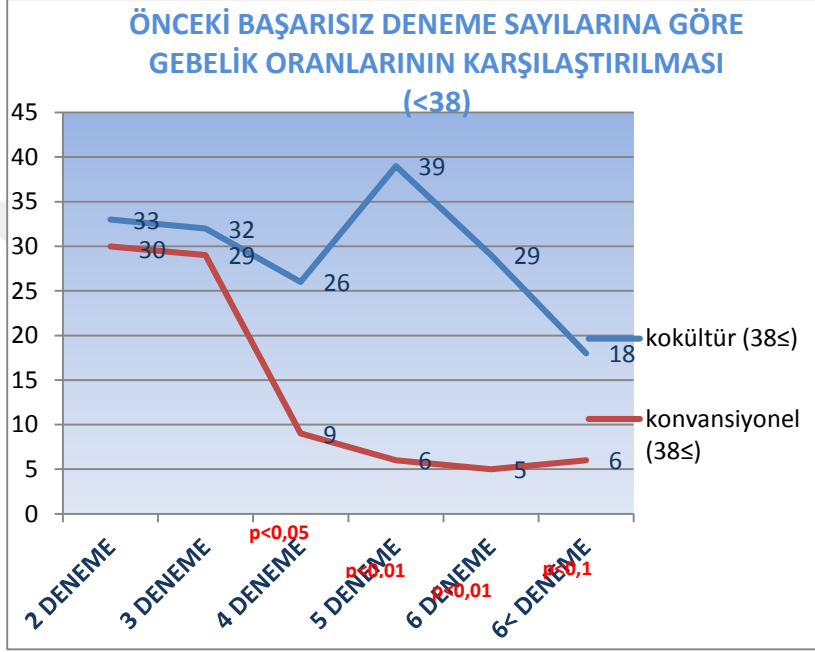
**Grafik 2:** Tekrarlayan implantasyon olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası , 38 yaş altı olgularda önceki başarısız deneme sayılarına göre klinik gebelik oranları.

Aynı grup bu kez 38 yaş ve üzeri değerlerine göre değerlendirildiler (38≤).

**Tablo 7:** 38 yaş üstü Grup 1 ve Grup 2 hastalarının deneme sayılarına göre klinik gebeliklerinin karşılaştırılması

	KOKÜLTÜR (YAŞ 38≤)	%	KONVANSİYONEL (YAŞ 38≤)	%	P ARALIĞI
2 DENEME	8/24	33,3	8/27	29,6	NS
3 DENEME	7/22	32	7/24	29,2	NS
4 DENEME	6/23	26	2/22	9,1	P<0,05
5 DENEME	5/13	38,5	1/18	5,6	P<0,01
6 DENEME	4/14	28,6	1/19	5,3	P<0,01
6< DENEME	2/11	18,2	1/16	6,3	P<0,1

4. Deneme kadar anlamlı bir farklılık gözlenmekle birlikte daha önce 4 başarısız denemesi olan gruptan başlayarak anlamlı olarak kokültür grubunda 38 yaş ve üzeri olgu profilinde anlamlı gebelik sağlanmıştır fakat altı denemenin üzerinde bu anlamlılık düşmüştür.



**Grafik 3:** Tekrarlayan implantasyon olgu grubu konvansiyonel tabanlı kokültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası, 38 yaş ve üstü olgularda önceki başarısız deneme sayılarına göre klinik gebelik oranları.



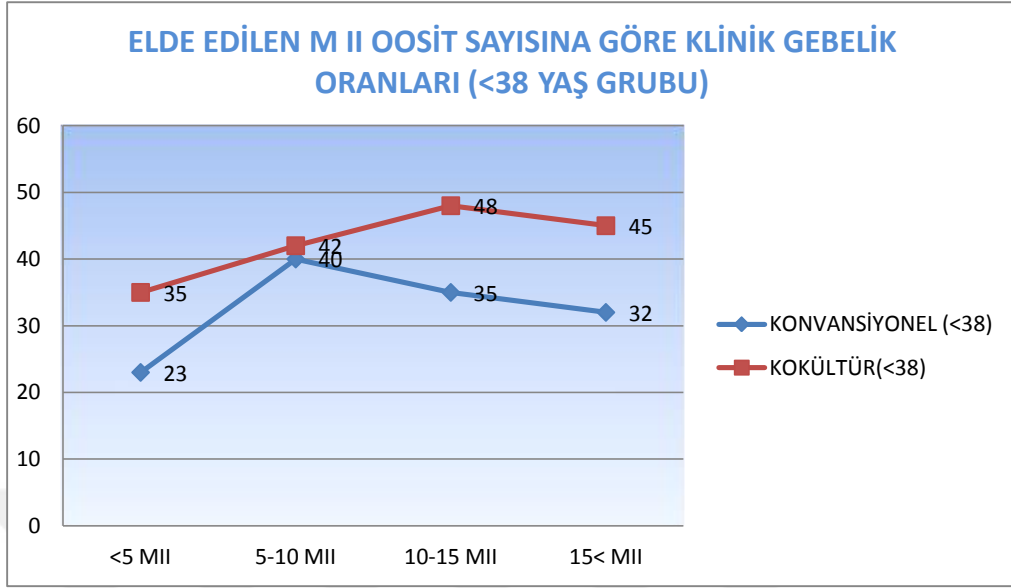
**4.3.4. GRUP I ve GRUP II Hastalarının Son Denemelerinde Elde Edilen MII Oosit Sayılarına Göre Elde Edilen Gebelik Oranları:**

Çalışma grubundaki 38 yaş altı olguların son denemelerinde elde edilen MII sayılarına göre gebelik oranları karşılaştırılmıştır.

**Tablo 8:** 38 yaş altı grup 1 ve grup 2 hastaların elde edilen MII sayılarına göre klinik gebeliklerinin karşılaştırılması

	KOKÜLTÜR (YAŞ<38)	%	KONVANSİYONEL (YAŞ <38)	%	P
<5 MII OOSİT	18/52	34,6	11/48	22,9	NS
5-10 MII OOSİT	28/67	41,8	27/67	40,3	NS
10-15 MII OOSİT	31/65	47,7	24/69	34,8	NS
15< MII OOSİT	17/38	44,7	13/41	31,7	NS

Son denemelerinde elde edilen MII sayılarına göre değerlendirildiğinde 38 yaş altı kokültür ve konvansiyonel kültür grubu klinik gebeliklerinde anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



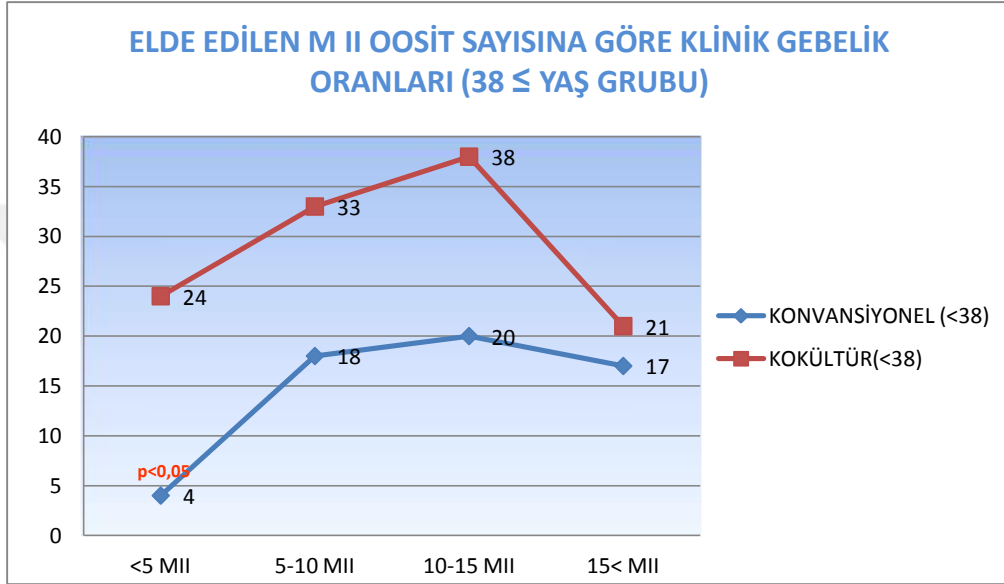
**Grafik 4:** Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası , 38 yaş altı olgularda elde edilen MII sayılarına göre göre klinik gebelik oranları.

Çalışma grubundaki 38 yaş ve üstü olguların son denemelerinde elde edilen MII sayılarına göre gebelik oranları karşılaştırılmıştır.

**Tablo 9:** 38 yaş üstü grup 1 ve grup 2 hastaların elde edilen M2 sayılarına göre klinik gebeliklerinin karşılaştırılması

	KOKÜLTÜR (YAŞ 38≤)	%	KONVANSİYONEL (YAŞ 38≤)	%	P ARALIĞI
<b>&lt;5 MII OOSİT</b>	5/21	23,8	1/23	4,3	P<0,05
<b>5-10MII OOSİT</b>	10/30	33,3	7/38	18,4	NS
<b>10-15 MII OOSİT</b>	12/32	37,5	8/41	19,5	NS
<b>15&lt; MII OOSİT</b>	5/24	20,8	4/24	16,7	NS

Son denemelerinde elde edilen MII sayılarına göre değerlendirildiğinde 38 yaş üstü kokültür ve konvansiyonel kültür grubu klinik gebeliklerinde sadece 5 MII oositin altında anlamlı bir klinik gebelik gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).



**Grafik 5:** Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olgu grubu konvansiyonel tabanlı ko-kültür ve konvansiyonel kültür ortamı ile inkübe edilmesi sonrası, 38 yaş ve üstü olgularda elde edilen MII sayılarına göre göre klinik gebelik oranları.

Sonuç olarak bu çalışmalar sonrasında ko-kültür hücreleri eşliğinde uygulanan IVF denemeleri sonrasında anlamlı oranlarda farklılık sağlanan hasta grubu ortaya konulabilmiş ve hedef hasta grubu ko-kültür yönünden daha belirgin bir hasta endikasyonu oluşturabildiği gösterilmiştir. Daha önceki IVF denemelerinde konvansiyonel kültür ortamları kullanılmış bu hastalar, önceki deneme sayısı, yaşları ve over rezervleri ile değerlendirildiğinde bu teknikten yararlanabilen hasta grubu belirlenmiştir.

#### 4.4. İstatiksel Değerlendirmeler

İstatiksel değerlendirmeler n ve yüzdeler üzerinden hesaplanmıştır. Data analizleri pierson correlation analysis ve qui-square test analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir.



## 5. TARTIŞMA

Ko-kültür sistemlerinin *in vitro* fertilizasyon çalışmalarında uygulanabilirliği son yıllarda çok tartışılır olmakla birlikte yapılan tüm çalışmalar bu tekniğin belirli endikasyonlar dahilinde tüp bebek laboratuvarlarında yerini aldığını göstermektedir.

İmplantasyonun oluşabilmesindeki en önemli faktörlerden biri olan embriyo kalitesi, blastomerlerin sayısı ve birbirine eşitliği, fragmentasyon ve sitoplazmik granulasyon gözlenmemesi gibi ayrıntılara göre şekillenir. Elde edilen sonuçlar endometrial ko-kültür ile embriyo kalitesinde kesin bir farklılık gözlenirken gebelik ve implantasyon oranları üzerinde bu farklılığın sonuçlarını ortaya koymuştur (3,23,27,29,36,37).

Endometrial hücrelerin çalıştırdığı olası mekanızmada erken dönem embriyo gelişimi ile endometrial hücrelerin uyumu sözkonusudur. Bir çok farklı araştırmacı büyüme faktörlerinin bu konudaki etkilerini ve embriyo gelişim kalitesini nasıl arttırdığını çalışmaları ile göstermiştir .(20-27,32,33,35,43).

Başarılı bir endometrial kültür düzlemi için, stromal ve glandular hücrelerin bir arada ve eşit oranlarda varlığının gerekliliği gene bir çok çalışmada belirtilmiştir (38). Bu hücreler tarafından birlikte yönlendirilen parakrin düzenlemeler sonrası genetik ekspresyonlar, hücresel gelişim ve büyüme faktörlerinin ortamda bulunmasının embriyo gelişimi üzerine etkileri gözlenmiştir. Bu parakrin etkilerde rol oynayan glykodelin (placental protein-14 veya  $\alpha$  2-PEG olarak bilinir) arttığı ortamlarda bu iki hücre tipinin varlığı, çalışma mekanizmaları ortaya konmuş , embriyo gelişimi, gebelik ve implantasyon oranları üzerine etkileri yayınlanmıştır (36,37,38).

Sonuç olarak yapılan tüm olgu sonuçlarının tartışıldığı ya da bu sonuçların mekanizmasını açıklaya yönelik çalışmalar endometrial ko-kültürün doğru endikasyona sahip hasta grupları üzerine başarılarını ortaya koymaktadır. Zahmetli ve uzun süren bu protokoller bu seçilmiş olan hasta grubunda önemli bir alternatif oluşturmakta ve günümüz IVF labotatuvarlarında yerini almaktadır.

Bununla birlikte çok fazla iş gücü ve zaman alan böyle bir tekniğin uygulanabilirliği ve anlamlılığı olguların daha spesifik alt gruplarda değerlendirilmesi ve istatiksel olarak anlamlı olduğu hedef hasta grubunun daraltılması, tekniğin daha başarılı sonuçlarla uygulanabilirliğini ve yaygınlaştırılabilirliğini göstermiştir.

Ko kültür üzerinde geliştirilmiş embriyoların gelişim özelliklerine bakıldığında kokültür grubunun daha düzenli ve mitotik bölünme kalitesi daha yüksek olarak gelişim gösterdiğini görmekteyiz, döllenme sonrası klivaja girebilen ve 3. Günde altı hücrenin üzerine çıkabilen embriyo gelişiminin daha yüksek olduğunu görmekteyiz ( $p<0,01$ ) (Tablo:3,4). Bununla birlikte embriyo gelişim kriterlerinde bölünmeyi yavaşlatmış embriyo gelişim kalitesini etkileyen embriyo fragmentasyon oranları yönünden kokültür grubunun konvansiyonel kültür ortamına göre daha az oranlarda fragmentasyon gözlemlendiği ortaya konmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo:4). Tüm bu özellikler kokültür ortamında daha yüksek kalitede embriyo transferi yapılabilmesini sağlamaktadır.

Ko kültür uygulanmış gruplarda konvansiyonel kültür grubuna göre avantajlı klinik gebelikler elde edilmekle birlikte özellikle 38 yaş ve üzeri gruplarda bu yüzdesel artış oranı yükselmiştir. İstatiksel olarak anlamlılığı kazanması ise özellikle önceki başarısız denemesi 4 olan grup ile başlamıştır. 4 ( $p<0,05$ ), 5 ( $p<0,01$ ), 6 ( $p<0,01$ ) başarısız denemeye sahip 38 yaş ve üzeri grupta istatiksel olarak anlamlı olarak ko kültür grubunda gebelik

oranı artışı sağlanmıştır (Tablo:7). Altı denemeden sonraki artış ise değerlendirmenin altındadır ( $p<0,1$ )(Tablo:7). Aynı şekilde elde edilen MII oranlarının 5 MII'nin altına düşmesi ile ko kültür grubu 38 yaş ve üzeri olgu grubunda anlamlı olarak daha yüksek gebelik göstermiştir ( $p<0,05$ ) (Tablo:9).



## 6. SONUÇ

Bu durumda 38 yaş altı tüm gruplarda ve 38 yaşın üzerindeki 2,3 ve altının üzerinde başarısız denemesi olan veya ileri yaştaki kötü over rezervi yanıtı olan hastalar dışındaki tüm gruplarda ko kültür tekniği yapmak klinik gebelik yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir başarı sağlamamaktadır (Tablo7,9)

38 yaş üstü, uygulanan 3 başarısız IVF denemesi sonrası gebelik sağlanamamış hasta grubunda konvansiyonel kültür ortamından elde edilen gebelikler anlamlı olarak düşüklük göstermektedir (Tablo:7 ). Aynı şekilde 38 yaş üstü düşük over rezervi olan hasta grubunda da konvansiyonel kültür ortamı gebelik oranları düşük seyretmektedir (Tablo.9). Bu iki tanımlanmış grupta otolog endometrial kokültür ortamı anlamlı olarak konvansiyonel kültürden dah yüksek oranda sağlıklı ve devam eden gebelikler sağlamıştır.

Bu tekniğin uygulanarak yarar sağlanacak hedef grubun belirlenmesi, hem ko kültür tekniğinin yararları yada yararsızlığı hakkındaki bir çok tartışmanın sonlanması hemde gerçekten yarar görecektir hedef grubun bilgilendirilmesi ve gebeliklerinin artırılması yönünden önemlidir. Böylelikle tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları grubunda gebeliklerin artırılması için sunulabilecek bu teknik, daraltılmış bir grupta daha anlamlı sonuçlarla gebeliğe sebebiyet verecektir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Bongso A, Ng SC, Fong C-Y, Ratman S. Co cultures: a lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991;67: 120–2.
2. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Veek I, Damario M, Rosenwaks Z. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. *Fertil Steril* 1998;70:1109–1113.
3. Abramovici H. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertil Steril* 1997;67:120–2.
4. Feng HL, Wen XH, Amet T, Pesser SC. Effect of different coculture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 1996;11:1525–8.
5. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut A, Nicollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. *Hum Reprod* 1992;7(Suppl 1):101–6.
6. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patient with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995;63:109–14.
7. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD. Autologous endometrial coculture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization- embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:121–7.

8. Rubio C, Simon C, Mercader A. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 6):31–8.
9. Mercader A, Garcia-Velazco J, Escudero E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells. *Fertil Steril* 2003;80:1162–8.
10. Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veeck L, Davis OK, et al. Autologous endometrial co-culture in patients with IVF failures: outcome of the first 1030 cases. *J Reprod Med* 2004;49:463–7.
11. Spandorfer S, Park J, Davis O, Clarke R, Rosenwaks Z. A case controlled study evaluating autologous endometrial coculture (AECC) as an effective tool for young patients (age<36 years) with multiple failed IVF attempts and diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2007;88(Suppl 1).
12. Gandolfi F. , Brevini T. , Moore RM . Co culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells . *Molecular reproduction and development* (1989).
13. Yeung W.S.B. , Ho P.C., Lau E.Y.L., Chan S.T.H.: Improvement development of human embryos in vitro by a human oviductal cell coculture system. *Human Reproduction* 1992;7/8 (1144-1149).
14. Weimer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlenberg B, Fiore I et al. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following coculture on bovine oviductal epithelial cells. *Human Reproduction* (1993) 8:97-101.
15. Menezes Y., Guerin J.F., Czyba J.C.: Improvement of human early development in vitro by co-culture on monolayers of vero cells.(1996) *Biol. Reprod.* (42) (301-306).

16. Lai Y.M., Lee C.L., Chang S.Y.: Mouse embryos co-cultured with various generations of human ampullary cells. J. Formos Med. Assoc. (1992) Suppl.2: (139-143).
17. Plachot M., Mandelbaum J., Cohen J. : Fertilization and early embryology: Coculture with granulosa cells does not increase the fertilization rate an couples with previous fertilization failures. Human Rep. September :1993 (8) :1455-1458.
18. Quinn P., Margelit R.: Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embriyos. Journal of assisted reproduction and genetics. 1996: Vol:13 No:1
19. Barmat L., Spandorfer S.D., Xu K.: Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. Fertility and Sterility 1998; 70:1109-1113.
20. Liu H.C., Mele C., Rozenwaks Z.: Production of insulin like-growth factor binding proteins (IGFBPs)By human endometrial stromal cells is stimulated by the presence of of embryos. Journal of assisted reproduction and genetics. 1995: Vol:12 (78-87)
21. Liu H.C., Mele C., Veeck L.L.: Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin-like growth factors and their receptors in cocultured human preimplantation embryos. Fertility and Sterility 1999; 71(361-367).
22. Simon C, Pellicer A. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. Hum Reprod 1995;10(Suppl 1):11.
23. Simon C., Mercader A., Garcia-Velasco J.,:Coculture of human embryos with autologous human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. The

journal of clinical endocrinology and metabolism(1999);84 (2638-2646)

24. Simon C., Gimeno M.J., Mercader A. : Embryonic regulation of integrins  $\beta 3$ ,  $\alpha 4$  and  $\alpha 1$  in human endometrial epithelial cells in vitro. Journal of clinical endocrinology and metabolism (2000. Vol: 82 no:8 (2607-2616).
25. Spandorfer S.D., Barmat L.I., Liu H.C.: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by autologous endometrial coculture is associated with outcome for IVF patients with a history of multiple implantation failures. American Journal of Reproductive Immunology(1998);40: (377-381).
26. Spandorfer S.D., Clarke R., Bovis L. Liu H.C: Interleukin-1 levels in the supernatant of conditioned media of embryos grown in autologous endometrial coculture: correlation with embryonic development and outcome for patients with a history of multiple implantation failures after IVF. American Journal of Reproductive Immunology (2000);43 (6-11)
27. Spandorfer S.D., Clarke R., Liu H.C: Leukemia inhibiting factor (LIF) production by autologous endometrial co-culture (AECC) is associated with outcome for patients with a history of multiple implantation failure. American Journal of Reproductive Immunology (2001);46 (375-380).
28. Spandorfer S.D., Barmat L.I., Navvaro J., Liu H.C.: Importance of the biopsy date in autologous endometrial co-cultures for patients with multiple implantation failures. Fertility and Sterility 2002a; 77 (1209-1213).
29. Spandorfer S.D., Barmat L.I., Navvaro J., Liu H.C.: Autologous endometrial co-culture in patients with a previous history of poor

quality embryos for patients with multiple implantation failures. of assisted reproduction and genetics. 2002b; 19 (309-312).

30. Hardy K., Spanos S. : Growth factor expression and function in the human and Mouse preimplantation embryo (review) ; Journal of endocrinology (2002) 172, (221-236).
31. BO SUN JOO , MI KYUNG KIM ,YONG JIN NA ;The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertility and sterility (2001), vol.75(1) (193-199)
32. Liu HC., Mele C., Catz D., Noles N., Rozenwaks Z.: Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by human endometrial stromal cells is stimulated by the presence of embryos. JARG (1995);12 (78-87).
33. Liu HC., Mele CA., Veeck LL., Davis O., Rozenwaks Z.: Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin-like growth factors and their receptors in cocultured human preimplantation embryos. Fertility and sterility (1999) (71) (361-367).
34. De los Santos MJ, Mercader A., Frances A., Portales E., Simon C.: Immunoreactive human embryonic interleukin-1 system and endometrial factors regulating their secretion during embryonic development. Biol Reprod.(1998) 54:563–574.
35. Imakawa K., Chang K., Christenson R.:Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: Molecular Events Leading to Successful Implantation. Journal of Rep. And Dev. (2004) 50:2 (Review)
36. Nieto F., Watkins W., Lopata A.:The effect of coculture with autologous cryopreserved endometrial cells on human in vitro

- fertilization and early embryo morphology a randomized study. J. Assist Rep. Gen. (1996);13;(386-389)
37. Eyheremendy V. Et al. Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure. *Fert. Steri-2008*
  38. Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA. :Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* 2001;16:836–45.
  39. Namita Kattal, Jerry Cohen and Lary Barmat: Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fert. Steri-2008*
  40. Nina Desai, Faten AbdelHafez, James Goldfarb: Live births in poor prognosis IVF patients using a novel non-contact human endometrial co-culture system. *RBM Online-vol:16 no:6 -2008(869-874)*.
  41. Alexis P. Melnick, Erin M. Murphy, Alexis K. Masbou, S.D. Spandorfer: Autologous endometrial coculture biopsy: is timing everything?. *Fert. Steri-2015, vol:104, no:1*
  42. Rienzi L., Ubaldi F., Iacubeli M. et al.: Day3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum. Reprod* (2002);17:1852-1855).
  43. Gardner D.K., Schoolcraft W.B., Wagley L., et al: A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*(1998);13:3434-3440.
  44. Veeck L.L., Zaninovic N.: *An atlas of human blastocysts.* (2003).

## 8. ÖZET

**AMAÇ:** Günümüzde yardımcı üreme teknikleri laboratuvarlarında uygulanan embriyo kültür sistemlerindeki kaydedilen tüm gelişmelere rağmen halen başarı sağlanamamış bir grup bulunmaktadır ve embriyonun kendisinden kaynaklanan embriyolojik artıklar embriyo gelişiminde sorun yaratmaktadırlar. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının (TİB) nedenleri multifaktöryel görünmekle birlikte, son yıllarda yapılan bir çok çalışma otolog endometrial kokültürün TİB grubu hastaların embriyolarında embriyo kalitesini arttırmak suretiyle artan klinik gebelikler sağlandığını göstermiştir. Diğer yandan, zaman alıcı ve masraflı bir işlem olması nedeniyle TİB hastaları içinde asıl yararı görecektir bir hedef endikasyon grubu yaratabilmek için gebelik sonuçlarına parametrelere göre ayrılarak analiz edildi ve istatistiksel anlamlılıkları karşılaştırıldı.

**Materyal ve Method:** Toplamda, TİB ( $n \geq 3$ ) endikasyonu taşıyan 678 olgu Mart 2010 ve Mayıs 2015 arasında gerçekleştirilmiştir. Hastalar retrospektif olarak kullanılan kültür sistemlerine göre sınıflandırılmışlardır. 329 Olgu (Grup I) son denemelerini otolog kokültür üzerinde ve 349 olguda yine konvansiyonel kültür ortamı kullanılmıştır. Prezigt evresinden embriyo transferine dek, günlük embriyo gelişim parametrelerine göre skorlanarak ve klinik gebelik oranları karşılaştırılarak, kadın yaşı, önceki deneme sayıları ve elde edilen MII sayılarına göre sonuçlar analiz edilmiştir.

**Sonuçlar:** Kokültür uygulanmış gruplarda konvansiyonel kültür grubuna göre avantajlı klinik gebelikler elde edilmekle birlikte özellikle 38 yaş ve üzeri gruplarda bu artış daha fazla yüzdeler göstermiştir. İstatistiksel olarak anlamlılığı kazanması ise özellikle önceki başarısız denemesi 4 olan grup ile başlamıştır. 4 ( $p < 0,05$ ), 5 ( $p < 0,01$ ), 6 ( $p < 0,01$ ) başarısız denemeye sahip 38 yaş ve üzeri grupta istatistiksel olarak anlamlı olarak kokültür grubunda gebelik

oranı artışı sağlanmıştır. Altı denemeden sonraki artış ise değerlendirmenin altındadır ( $p<0,1$ ). Aynı şekilde elde edilen MII oranlarının 5 MII'nin altına düşmesi ile kokültür grubu 38 yaş ve üzeri olgu grubunda anlamlı olarak daha yüksek gebelik göstermiştir ( $p<0,05$ ).

<b>3. gün embryo verileri</b>	<b>GRUP I</b>	<b>GRUP II</b>	<b>P</b>
<b>Pn Duraksama oranı(%)</b>	<b>2,62</b>	<b>7,04</b>	<b>P&lt;0,01</b>
<b>3. Gün Duraksama oranı (%)</b>	<b>3,35</b>	<b>11,45</b>	<b>P&lt;0,01</b>
<b>&gt;6 blastomer oranı(%)</b>	<b>72,9</b>	<b>44,7</b>	<b>P&lt;0,01</b>
<b>1.Kalite emb. Oranı(%)</b>	<b>68,5</b>	<b>54,2</b>	<b>NS</b>
<b>Fragmantasyon Oranı(%)</b>	<b>9,7</b>	<b>18,3</b>	<b>P&lt;0,05</b>

	<b>KOKÜLTÜR (YAŞ 38≤)</b>	<b>%</b>	<b>KONVANSİYONEL (YAŞ≤38)</b>	<b>%</b>	<b>P ARALIĞI</b>
<b>2 DENEME</b>	8/24	33,3	8/27	29,6	NS
<b>3 DENEME</b>	7/22	32	7/24	29,2	NS
<b>4 DENEME</b>	6/23	26	2/22	9,1	P<0,05
<b>5 DENEME</b>	5/13	38,5	1/18	5,6	P<0,01
<b>6 DENEME</b>	4/14	28,6	1/19	5,3	P<0,01
<b>6&lt; DENEME</b>	2/11	18,2	1/16	6,3	P<0,1

	<b>KOKÜLTÜR (YAŞ 38≤)</b>	<b>%</b>	<b>KONVANSİYONEL (YAŞ 38≤)</b>	<b>%</b>	<b>P ARALIĞI</b>
<b>&lt;5 MII OOSİT</b>	18/52	34,6	11/48	22,9	P<0,05
<b>5-10 MII OOSİT</b>	28/67	41,8	27/67	40,3	NS
<b>10-15 MII OOSİT</b>	31/65	47,7	24/69	34,8	NS
<b>15&lt; MII OOSİT</b>	17/38	44,7	13/41	31,7	NS

**Tartışma:** Bu durumda 38 yaş altı tüm gruplarda ve 38 yaşın üzerindeki 2,3 ve altının üzerinde başarısız denemesi olan veya ileri yaştaki kötü over rezervi yanıtı olan hastalar dışındaki tüm gruplarda kokültür tekniği yapmak klinik gebelik yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir başarı sağlamamaktadır.



Bu tekniğin uygulanarak yarar sağlanacak hedef grubun belirlenmesi, hem otolog kokültür tekniğinin yararları yada yararsızlığı hakkındaki bir çok tartışmanın sonlanması hemde gerçekten yarar görece hedef grubun bilgilendirilmesi ve gebeliklerinin arttırılması yönünden önemlidir.



## 9. SUMMARY

**Objective:** Although tremendous improvements have been implemented in current embryo culture systems, embryo wastage is still a major concern during extended culture. Although the cause of repeated implantation failure (RIF) seems to be multifactorial, several studies have indicated a possible beneficial role of endometrial coculture systems on RIF cases via improving embryo quality and viability. On the other hand, coculture preparation is time consuming and costly procedure, for this reason we want to narrowing the group to determine a clearer indication of this RIF cycles. This study is undertaken to analyze the cumulative contribution of endometrial coculture (EC) in such cases compare with convantional culture results and to determine the most effective features to work.

**Materials & Methods:** Overall, 678 cycles in which coculture with the indication of recurrent implantation failure ( $n \geq 3$ ) have been performed were included in the study between March 2010 and May 2015. Patients were retrospectively grouped according to culture media systems used. In 329 patients (group I) endometrial coculture has been of choice throughout the culture period and in 349 cycles convantional culture media has been utilized. From pre-zygote stage to embryo transfer, daily embryo growth parameters were scored and clinical pregnancy rates compared between groups according to female age, the number of previous attempts and number of mature oocytes obtained.

**Results:** No statistically significant difference in main patient and cycle parameters such as female age, male age, BMI, gonadotrophine ampoules used, MII oocytes collected and fertilized were found between groups. However, when embryo development characteristics were compared,

PN arrest, cleavage arrest and 3 rd day blastomer number and embryo fragmantation rates.

<b>3 rd day embryo growing outputs</b>	<b>GROUP I</b>	<b>GROUP II</b>	<b>P</b>
Pn arrest rate(%)	2,62	7,04	P<0,01
3 <sup>rd</sup> day arrest rate (%)	3,35	11,45	P<0,01
>6 blastomer rate(%)	72,9	44,7	P<0,01
1 <sup>st</sup> grade emb. rate(%)	68,5	54,2	NS
Fragmantation rate(%)	9,7	18,3	P<0,05

	<b>GROUP I (AGE38≤)</b>	<b>%</b>	<b>GROUP II (AGE≤38)</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
2 <sup>ND</sup> TRIAL	8/24	33,3	8/27	29,6	NS
3 <sup>RD</sup> TRIAL	7/22	32	7/24	29,2	NS
4 <sup>TH</sup> TRIAL	6/23	26	2/22	9,1	P<0,05
5 <sup>TH</sup> TRIAL	5/13	38,5	1/18	5,6	P<0,01
6 <sup>TH</sup> TRIAL	4/14	28,6	1/19	5,3	P<0,01
6< TRIAL	2/11	18,2	1/16	6,3	P<0,1

	<b>GROUP I (AGE38≤)</b>	<b>%</b>	<b>GROUP II (AGE≤38)</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
<5 MII OOCYTE	18/52	34,6	11/48	22,9	P<0,05
5-10MII OOCYTE	28/67	41,8	27/67	40,3	NS
10-15 MII OOCYTE	31/65	47,7	24/69	34,8	NS
15< MII OOCYTE	17/38	44,7	13/41	31,7	NS

**Conclusions:** Our results show that culturing embryos on endometrial monolayer cells seems to increase the cleavage rate and the quality of embryos in recurrent implantation failure cases. Furthermore, by comparing all of the results the main target group of this coculture patients defined (older than 38 age and higher than 2 items ) is very important for identified in order to assure the usefulness of coculture.

## 10.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	HAZİKE SEMRA	Soyadı	SÜMER
Doğ.Yeri	KONYA	Doğ.Tarihi	07.02.1970
Uyruğu	TC	TC Kim.No	16564133054
Email	semrasertyel@gmail.com	Tel	05321647688

### Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu kurumun adı	Mez.Yılı
Lisans	ODTÜ Fen Bilimleri –Biyoloji Bölümü	1993
Lise	Mustafa Kemal Lisesi	1988

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sırala)

Görevi	Kurum	Yılı
Biyolog	ANKARA CENTRUM TÜP BEBEK MERKEZİ	2014-Halen Çalışmakta
Biyolog	TAKSİM ALMAN HASTANESİ	2009-2014
Biyolog	ANKARA HRS KADIN DOĞUM HASTANESİ	2008-2009
Biyolog	OKMEYDANI MEMORIAL HASTANESİ	2000-2008
Biyolog	ANKARA SEVGİ HASTANESİ	1996-2000

Yabancı dilleri	Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İLERİ DÜZEY	İLERİ DÜZEY	İLERİ DÜZEY

## POSTER SUNUMLARI:

1	(2002) Yakin K., Kahraman S., Vanlioğlu F., Kumtepe Y., Dönmez E., and Sertyel S. <i>Prolonged coasting over 3 days adversely affects the outcome in ART cycles.</i> European Society of Human Reproduction and Embryology, 18th Annual Meeting, Vienna, July 1-3 2002.
2	(2002) S. Kahraman, A Biricik, S Sertyel, K Yakin. <i>Round spermatid injection and preimplantation genetic diagnosis results: from intact oocytes to day 4 embryos.</i> M. Benkhalifa, 4 <sup>th</sup> World Conference of A PART. Vienna, Austria. June 28-30, 2002.
3	(2002) S Sertyel, S. Kahraman, K Yakin, E Dönmez, S Unal, S Melil. <i>Comparative use of testicular or pooled frozen thawed or fresh ejaculated spermatozoa for ICSI in cases with virtual azoospermia.</i> 4 <sup>th</sup> World Conference of A PART. Vienna, Austria. June 28-30, 2002.
4	(2002) Donmez E., Kahraman S., Yakin K., Biricik A., Sertyel S. and Melil S. <i>May condensed or fragmented DNA in biopsied blastomeres signify arrest the further development of the embryo?</i> 18th Annual Meeting of the ESHRE. Vienna, Austria, 2002.
5	(2002) D. Sevim, A Biricik, S. Sertyel, İ. Güney, S. Kahraman. <i>Sperm morphology and Y chromosome microdeletions: preliminary findings.</i> 5th Balkan Meeting on Human Genetics. August 29, September 01, 2002.
6	(2001) Kayhan Yakin, Semra Kahraman, Ersan Dönmez, Semra Sertyel, Necati Fındıklı: <i>Assisted hatching with diode laser is associated with an increased risk of monozygotic pregnancy.</i> International Congress on Reproductive Medicine, Kemer-Antalya, Turkey 3-6 May 2001.
7	(2000) Kahraman S. , Yakin K, Dönmez E, Sertyel S, Şamlı H: <i>Outcome of ICSI cases with centrally located cytoplasmic granular oocytes.</i> 56th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, 21-26 October 2000, San Diego, California, USA.
8	(2000) Kahraman S. , Şamlı M, Evrenkaya T, Yakin K, Dönmez E, Sertyel S, Cengiz S: <i>Analysis of simultaneous testicular histopathology, wet preparation, touch print cytology and sperm recovery in non-obstructive azoospermic males.</i> 56th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, 21-26 October 2000, San Diego, California, USA.
9	(2002) Sevinç D., Biricik A., Sertyel S., Güney A.İ., Kahraman S. : <i>Sperm morfolojisi ve Ykromozom mikrodelesyonları : ilk bulgular.</i> 5.Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi 09-12 ekim 2002 KONYA.
10	(2003) E.Dönmez,S.Kahraman,S.Sertyel,S.Melil,N.Fındıklı : <i>ICSI olgularında oosit morfolojisinin embryo gelişimine ve aneoplidi oranlarına olan etkisi.</i> Ululararası katılımlı güncel infertilite ve yardımcı üreme teknikleri sempozyumu:24-27 nisan 2003 İZMİR
11	(2003) Semra Sertyel, Ersan Dönmez , Necati Fındıklı , Sevil Ünal, Melih Aygün, Semra Kahraman: <i>Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında endometrial kokültürün embryo gelişimi üzerine etkileri .</i> Ululararası katılımlı2 güncel infertilite ve yardımcı üreme teknikleri sempozyumu:24-27 nisan 2003 İZMİR

12	(2003) N.Fındıklı, S.Kahraman, Y.Kumtepe, E. Dönmez , A.Biricik , S.Sertyel , H.Berkil , S.Melil : <i>Translokasyon hastalarında embryo gelişim ve PGT sonuçları</i> . Uluslararası katılımlı 2 güncel infertilite ve yardımcı üreme teknikleri sempozyumu: 24-27 nisan 2003 İZMİR
13	(2003) S.Melil , S.Sertyel , A.Biricik , E.Dönmez , N.Fındıklı, S.Ünal , H.Yelke , M.Aygün , H.Berkil: <i>Increased sperm chromosomal abnormalities and possible contribution to preimplantation embryos: Case report</i> . Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
14	(2003) E.Dönmez , S.Kahraman , A.Biricik , S.Melil N.Fındıklı , S.Sertyel , M.Benchalifa, H.Berkil: <i>Effect of oocyte morphology on embryo development and aneuploidy rates in ICSI cases</i> . Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
15	(2003) A.Biricik , H.Berkil , H.Karadayı , E.Bakırcıoğlu , S.Kahraman , F.Fiorentino , S.Sertyel , E.Dönmez , F.Vanlıoğlu , G.Karlıkaya. <i>Molecular and cytogenetic analysis results in severe infertile males and their prognostic value for PGD in Turkish population</i> . Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
16	(2003) M.Mucci , S.Sertyel , S.Kahraman , A.Biricik , E.Dönmez , MB Quimseyeh , M.Benchalifa: <i>Apoptotic index assesment on days 3 blocked embryos after round spermatid injection</i> . Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
17	(2003) N.Fındıklı , S.Kahraman , A.Biricik , E.Dönmez , S.Sertyel , S.Melil , Faruk Vanlıoğlu , G.Karlıkaya : <i>Effect of zona manipulation on somatic cell nucleus transfer</i> . Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
18	(2003) NC Yılanlıoğlu , S.Kahraman , E.Dönmez , B.Kumbak , H.Berkil , A.Biricik , S.Sertyel , Faruk Vanlıoğlu : <i>Outcome of pregnancies achieved through preimplantation genetic diagnosis</i> . Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
19	(2003) S.Kahraman S.Sertyel , A.Biricik , S.Melil , E.Dönmez , N.Fındıklı, S.Ünal, H.Yelke , Y.Kumtepe : <i>Outcomes of ART and preimplantation genetic diagnosis in dominantly macrocephalic sperm samples</i> . V.Kongress der Deutsch-Türkischen Gynakologengesellschaft II. Internationaler Kongress für Reproduktionsmedizin-ANTALYA.
20	(2003) S.Sertyel , S.Kahraman , E.Dönmez , N.Fındıklı , S.Ünal, H.Yelke , S.Melil : <i>Comparison of two ART approaches on patients with transient azoospermia</i> . V.Kongress der Deutsch-Türkischen Gynakologengesellschaft II. Internationaler Kongress für Reproduktionsmedizin-ANTALYA.
21	(2003) S.Sertyel , S.Kahraman , E.Dönmez , N.Fındıklı , S.Ünal, M.Aygün : <i>Effects of autologous endometrial co-culture on recurrent implantation failure patients</i> . V.Kongress der Deutsch-Türkischen Gynakologengesellschaft II. Internationaler Kongress für Reproduktionsmedizin –ANTALYA.

22	(2003) E.Bakircioğlu,S.Kahraman,S.Sertyel,N.Fındıklı,E.Dönmez,S.Ünal, H.Yelke : <i>Can histology of testis predict sperm recovery by microdissection TESE in patient with azoospermia.</i> V.Kongress der Deutsch-Türkischen Gynakologengesellschaft II. Internationaler Kongress für Reproduktionsmedizin-ANTALYA.
23	(2003) S.Sertyel ,S.Kahraman ,E.Dönmez ,N.Fındıklı ,S.Ünal, H.Yelke,S.Melil,F.Vanlıoğlu , M.Benchalifa. : <i>Comparison of two different globozoospermia groups in the initial semen sample.</i> V.Kongress der Deutsch-Türkischen Gynakologengesellschaft II. Internationaler Kongress für Reproduktionsmedizin –ANTALYA.
24	(2003) S.Sertyel ,S.Kahraman ,E.Dönmez ,N.Fındıklı ,S.Ünal,Aygün M. : <i>How effective is your culture media?Results of endometrial co-culture in recurrent implantation failure cases.</i> American Society for reproductive medicine , 59 <sup>th</sup> Annual Meeting , October 11-15 , 2003,San Antonio,TEXAS.
25	(2003)Kahraman S ,Dönmez E. ,Biricik A.,Sertyel S. , Fındıklı N.,Berkil H.: <i>The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques.</i> American Society for reproductive medicine , 59 <sup>th</sup> Annual Meeting , October 11-15 , 2003,San Antonio,TEXAS.
26	(2003)Fındıklı N.,Kahraman S., Sertyel S. ,Dönmez E. ,Melil S.,Vanlıoğlu F. : <i>Cumulative embryo scoring (CES) :Not all embryos are equal.</i> American Society for reproductive medicine , 59 <sup>th</sup> Annual Meeting , October 11-15 , 2003,San Antonio,TEXAS.
27	(2003)Bakircioğlu E.,Kahraman S.,Dönmez E.,Fındıklı N. , Sertyel S. ,Unal S.,Berkil H.,Yelke H.,Mlil S. : <i>Comperison of testicular sperm extaction of microdissection and multi-biopsy techniques in patients with klinefelter’s syndrome.</i> 19 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE ,Madrid –29 June to 2 July 2003.
28	(2003) Sertyel S. ,Kahraman S.,Dönmez E. ,Fındıklı N.,Unal S.,Yelke H.,Melil S.,Vanlıoğlu F.Benchalifa M. : <i>ART and PGD Results of severe oligoashtenoteratozoospermia patients.</i> TWIN –Meeting Alpha – Andrology –Antwerb 2003.(24 september-27 september)
29	(2003) Sertyel S. ,Kahraman S.,Dönmez E. ,Fındıklı N.,Unal S.,Yelke H.,Melil S.,Vanlıoğlu F.Benchalifa M. : <i>Comperison of two different globozoospermia groups in the initial semen sample.</i> TWIN –Meeting Alpha –Andrology –Antwerb 2003.(24 september-27 september)
29	(2003) Sertyel S. ,Kahraman S.,Dönmez E. ,Fındıklı N.,Unal S.,Yelke H.,Melil S.,Vanlıoğlu F.Benchalifa M. : <i>Can Acridine Orange test be predictive value for chromosomal abnormalities?</i> TWIN –Meeting Alpha – Andrology –Antwerb 2003.(24 september-27 september)
30	(2003) Sertyel S. ,Kahraman S.,Dönmez E. ,Fındıklı N.,Unal S.,Yelke H.,:Comperison using ejaculated or testicular sperm in patients with transient azoospermia. TWIN –Meeting Alpha –Andrology –Antwerb 2003.(24 september-27 september)
31	(2003)Biricik A., Sertyel S. ,Kahraman S.,Dönmez E. ,Fındıklı N.,Unal S.,Yelke H.,:Assesment of embriyological development in PGD – Performed non-obstructive azoospermia patients. TWIN –Meeting Alpha –Andrology –Antwerb 2003.(24 september-27 september)

32	(2003)PGD in 2003 : Sertyel S.,Bakırcioğlu E.,Karlıkaya G.,Biricik A.,Vanlıoğlu F.,Fındıklı F.,Oncü N.,Gürkan S.,Gür A.,Berkil H.,Oral E.,Kahraman S. :Results of preimplantation genetic diagnosis in patients with Klinefelter's syndrome.A genetic odyssey-Eshre Campus 2003-Brussels,Belgium-5 and 6 December 2003
33	(2003)PGD in 2003 : Melil S. , Sertyel S.,Bakırcioğlu E.,Biricik A.,Karlıkaya G.,Oncu N.,Berkil H.,Karagözoğlu H.,Vanlıoğlu F.,Unal S.,Yekle H.,Fındıklı N.,Kahraman S.:Outcome of Preimplantation Genetic Diagnosis in Cases with Severe Sperm Morphological Defects .A genetic odyssey-Eshre Campus 2003-Brussels,Belgium-5 and 6 December 2003
33	(2003)PGD in 2003 : Fındıklı N.,Oncü N.,Biricik A.,Berkil H.,Sertyel S.,Kragözoğlu H.,Aygün M.,Unal S.,Yekle H.,Oral E.,Kahraman S.: The contribution of chromosomally abnormal spermatozoa in ART efficiency in severe male infertility cases. A genetic odyssey-Eshre Campus 2003-Brussels,Belgium-5 and 6 December 2003
34	(2003)PGD in 2003 : Berkil H.,Biricik A.,Oncu N.,Fındıklı N.,Donmez E.,Sertyel S.,Vanlıoğlu F.,Karlıkaya G.,Aygün M.,Oral E.,Kahraman S.,: Results of PGD for Aneuploidy Testing in Cases with Advanced Maternal Age (AMA) , Repeated Implantation Failure (RIF) , Recurrent Early Miscarriage and Severe Male Infertility. A genetic odyssey-Eshre Campus 2003- Brussels,Belgium-5 and 6 December 2003
35	(2004) Mustafa E.Bakırcioğlu, Semra Sertyel ,Hakan Berkil,Necati Fındıklı,Hakan Yekle, Semra Kahraman :Comparison of intracytoplasmic injection outcomes for patients with globozoospermia.AUA Annual Meeting 2004 –Sanfransisco.
36	(2004)E.Enginsu, N.Fındıklı , S.Sertyel, S.Melil, Z.Atayurt, G.Karlıkaya,F.Vanlıoğlu, S.Kahraman:Increasing hyaluronan concentrations in the embryo transfer medium has no effect on ART outcome.20 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE -2004 Berlin.
37	(2004)F.Fiorentino , A.Biricik, H.Karadayı, H.Berkil, G.Karlıkaya, S.Sertyel,D.Podini, M.Baldi , M.C. Magli , L.Gianaroli,S.Kahraman: Development and clinical application of a strategy for PGD of single gene disorders combined with HLA matching.20 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE -2004 Berlin.
38	(2004) S.Kahraman, G.Karlıkaya, S.Sertyel ,F.Vanlıoğlu,H.Karadayı, N.Fındıklı ,N.Öncü, A.Biricik, F.Fiorentino:Preimplantation Genetic Diagnosis for B-Thalassemia with or without HLA-typing.20 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE -2004 Berlin.
39	(2004) S.Melil, N.Fındıklı,S.Sertyel,S.Ünal, H.Yelke , M.Aygün , H.Karagözoğlu, S.Kahraman: Day 5 embryo development and chromosomal status of embryos after PGD.20 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE -2004 Berlin.
40	(2004) H.Yelke, S.Sertyel ,E.Bakırcioğlu, N.Fındıklı ,S.Ünal ,S.Melil, F.Vanlıoğlu,G.Karlıkaya,S.Kahraman:Comparison using ejaculated or testicular sperm in patients with transient azospermia.20 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE -2004 Berlin.
41	(2004) H.Karadayı ,S.Kahraman, Y.Sağlam, B.Umay ,S.Sertyel, F.Fiorentino:Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) for B-Thalassemia with or without HLA-typing.60 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ASRM -2004 Philadelphia.



42	(2004) Y.Sağlam,N.Fındıklı,C.Oğur, S.Sertyel, E.Enginsu, S.Kahraman:Results of aneuploidy testing in ART cases with repeated spontanous abortion and recurrent implantation failure.60th Annual Meeting of the ASRM -2004 Philadelphia.
41	(2004)S.Sertyel,M.Aygün,H.Karagözoğlu,F.Vanlıoğlu,G.Karlıkaya, S.Kahraman :Can endometrial coculture be an alternative culture system for repeated ART failures ?60th Annual Meeting of the ASRM - 2004 Philadelphia.
42	(2004)N.Fındıklı S.Kahraman,S.Sertyel,S.Melil,O.Akcin:Isolation and characterization of human embriyonic stem cells: Turkey's experience.60th Annual Meeting of the ASRM -2004 Philadelphia.

### YAYINLAR :

1	(2000) Kahraman S.,Yakın K., Dönmez E., Şamlı H., Bahçe M.,Cengiz G.,Sertyel S., Şamlı M., Imirzalioglu N. : <i>Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection</i> . HUMAN REPRODUCTION 15 (11) : 2390.
2	(2001) Kahraman S., Yakın K., Şamlı M.,Vanlıoğlu F.,Karlıkaya G., S Sertyel, Dönmez E. : <i>A comparative study of three techniques for the analysis of sperm recovery : Touch print cytology , wet preparation and testicular histopatology</i> . JOURNAL OF ASISSTED REPRODUCTION AND GENETICS 18(7) 357-363 .
3	(2002) Kahraman S., Kumtepe Y., Sertyel S. Dönmez E.,Benkhalifa M., Fındıklı N., Vanderzwalmen P. : <i>Pronuclear morphology scoring and chrosomal status of embryos in severe male infertility</i> .HUMAN REPRODUCTION 17 (12) :3193-3200.
4	(2004) Kahraman S.,Benkhalifa M., Dönmez E., Biricik A.,Sertyel S., Fındıklı N., Berkil H. : <i>The results of aneupleudy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques</i> . Journal of Prenatal Diagnosis Preimplantation Genetics and Diagnosis :24(307-311).
5	(2003) Kumtepe Y.Yakın K.,Kahraman S.,Sertyel S., Vanlıoğlu F.,Cengiz S.,Dönmez E. : <i>Male age is not an independent factor to affect the outcome of assisted reproductive techniques.</i> : (International Journal of Andrology.:26:161-165(2003)
6	(2003)Fındıklı N., Kahraman S.,Kumtepe Y., Dönmez E., Biricik A.,Sertyel S., Berkil H.,Melil S. : <i>Embryo development charecteristic in Robertsonian and Reciprocal translocations :A comperison of the results with non – translocation cases</i> . (RBM – Online-Vol:7.No:5 (563-571)
7	(2003)D.Sevinç, A.Zehir , A.Biricik , S.Sertyel, S.Kahraman,i.Güney : <i>The releation between human Y chromosome microdeletions and sperm morphology</i> : MEDİCAL JOURNAL 15:4
8	(2003) Kahraman S.,Fındıklı N.,Berkil H.,Bakircioğlu E., Dönmez E., Sertyel S., Biricik A.,: <i>Results of preimplantation genetic diagnosis in patients with Klinefelter's syndrome</i> . (RBM – Online-Vol:7.No:3 ( 346-352)
9	(2003) Fındıklı N., Kahraman S.,Kumtepe Y., Dönmez E.,Benchalifa M., Biricik A.,Sertyel S.,Berkil H.,Oncü N.: <i>Assessment of DNA fragmentation and aneuploidy on poor quality human embryos</i> . (RBM – Online-Vol:8.No:2 (196-206)

10	(2004) Kahraman S.,Sertyel S.,Fındıklı N.,Kumtepe Y.Oncu N,Melil S.,Ünal S.Yelke H.Vanderzwalmen P.: Effect of PGD on implantation and ongoing pregnancy rates in cases with predominantly macrocephalic spermatozoa. (RBM – Online-Vol:9.No:1 (79-85)
11	(2004) Kahraman S.,Karlıkaya G.,Sertyel S.,Karadayı H.,Fındıklı N.: Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing . (RBM – Online-Vol:9.No:5 (529-532)
12	(2004) Moncef Benkhalifa,Semra Kahraman ,Anıl Biricik , Semra Sertyel , Ersan Dönmez,Yakup Kumtepe , Mazin B.Qumsiyeh:Cytogenetic abnormalities and the failure of development after round spermatid injections.Fertility and Sterility Vol:81 No:5 (1283-1288)
13	(2004) F.Fiorentino,A.Biricik,H.Karadayı,H.Berkil,G.Karlıkaya ,S.Sertyel,D.Podini,M.Baldi,M.C..Magli,L.Gianaroli,S.Kahraman: Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching .Molecular Human Reproduction Vol:10 No:6 (1-16)
14	(2004):Necati Fındıklı , Semra Kahraman, Ersan Dönmez, Semra Sertyel, Süreyya Melil, Moncef Benkhalifa:Comparison of embryo development in sibling oocytes cultured in two different sequential media.Middle East Fertility Society Vol:9 No:2 (150-156).
15	(2003):Necati Fındıklı ,Semra Kahraman, Ersan Dönmez, Semra Sertyel, Süreyya Melil, Moncef Benkhalifa:Aynı siklusta elde edilen oositlerin inseminasyon sonrası iki farklı ardışık embryo kültür ortamında büyütülmesi sonrası elde edilen embryo gelişiminin karşılaştırılması. Türk İnfertilite Dergisi Cilt:11 Sayı :2 Yıl:2004 (95-107)
16	(2004):S.Kahraman,G.Karlıkaya, Y.Kumtepe, S.Sertyel, H.Karadayı, N.Fındıklı,E.Enginsu,N.Öncü, A.Biricik, F.Fiorentino:Tek gen hastalıklarında preimplantasyon genetik tanı ve HLA doku tiplemesi uygulamalarının klinik değerlendirmesi. Türk İnfertilite Dergisi Cilt:12 Sayı :1 Yıl:2004 (43-53)
17	(2004):Kumtepe Y., Kahraman S, Sertyel S.,Fındıklı S.,Oncu N.,Melil s.,Unal S.,Yelke H.:Ejakülat ve testis örneğinde belirgin makrosefalik sperm içeren olgularda implantasyon öncesi genetik tanı. Türk İnfertilite Dergisi Cilt:12 Sayı :1 Yıl:2004 (24-42)
18	(2004):Y.Kumtepe,S.Kahraman,N.Fındıklı,S.Sertyel,Y.Sağlam:Klinefelter's sendromu olgularında preimplantasyon genetik tanı sonuçları.Türk İnfertilite Dergisi Cilt:12 Sayı :1 Yıl:2004 (64-74)
19	(2005):N.Fındıklı,S.Kahraman,O.Akçın,S.Sertyel,Z.Candan:Establishment and characterization of new human embryonic stem cell lines . (RBM – Online-Vol:10.No:5 (617-627)
20	(2008) Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Sertyel S, Karadayı H, Cottone G, Baldi M, Caserta D, Moscarini M. Rapid protocol for pre-conception genetic diagnosis of single gene mutations by first polar body analysis: a possible solution for the Italian patients. Prenat Diagn. 2008 Jan;28(1):62–4.
21	(2007) S Kahraman, N Findikli, G Karliklaya, S Sertyel, Y Saglam, H Karadayi, F Fiorentino. Medical and social perspectives of PGD for single gene disorders and human leukocyte antigen typing. Reproductive Biomedicine Online Volume 14, Suppl. 1, 104–108.

22	(2006) S Kahraman, N Findikli, A Biricik, N Oncu, C Ogur, S Sertyel, G Karlikaya, H Karagozoglu, Y Saglam. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. Reproductive Biomedicine Online. Volume 12, No 6.
22	(2006) N Findikli, S Kahraman, Y Saglam, C Beyazyurek, S Sertye, G Karlikaya, H Karagozoglu, B Aygun. Symposium: Embryo implantation failure and recurrent miscarriage Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage. Reproductive Biomedicine Online Vol 13. No 1.
24	(2006) N Findikli, S Kahraman, Y Saglam, C Ogur, S Sertyel, G Karlikaya, H Karagozoglu, B Aygun. Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage Reproductive Biomedicine Online Vol 13. No 1. 2006 38–46.
25	(2005) Fiorentino F, Kahraman S, Karadayi H, Biricik A, Sertyel S, Karlikaya G, Saglam Y, Podini D, Nuccitelli A, Baldi M. Short tandem repeats haplotyping of the HLA region in preimplantation HLA matching. European Journal of Human Genetics Vol: 13, Issue: 8, p.953–8.
26	(2005) Necati Findikli, Semra Kahraman, Oya Akçın, Zafer Candan, Semra Sertyel. İnsan embriyonik kök hücre dizilerinin elde edilmesi, tanımlanması ve farklılaşma potansiyellerinin araştırılması. Journal of Turkish German Gynecological Association Vol. 6(3): 210–216.
27	(2009) Semra SERTYEL, Ersan DÖNMEZ:Embriyo dondurma teknikleri - . In Vitro Fertilization: Temel Klinik ve Embryolojik Uygulamalar. Editör: Doç. Dr. Önder ÇELİK, Nobel Tıp Kitapevi.(Baskıda)
28	(2009) Semra SERTYEL, : O tolog endometrial kokültür- . In Vitro Fertilization: Temel Klinik ve Embryolojik Uygulamalar.Editör: Doç. Dr. Önder ÇELİK, Nobel Tıp Kitapevi.(Baskıda)
29	(2009) Semra SERTYEL, : Otolog endometrial kokültür-Embriyoloji Atlası Editör: Doç. Dr. Lale Delilbaşı, Nobel Tıp Kitapevi.(Baskıda)
30	(2007)(çeviri) Semra SERTYEL, : Yavaş dondurma yöntemleri ile insan embriyolarının dondurulması.: Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Kitabı Edidörler: Gardner.D.K., Weissman A. ,Howless C.M.,Shoham Z.Çeviri Editörü: Prof. Dr. Tülay Erez, Prof. Dr. Oktay Arda, Prof. Dr. Semih Kaleli.
31	(2012) Sevtap KILIC,Nese LORTLAR,Semra SERTYEL,Setac BATIOGLU: Environmental tobacco smoke exposure during intrauterine period promotes granulosa cell apoptosis: a prospective, randomized study: The journal of maternal fetal and neonatal medicine: vol:25,no:10(1904-1909)

## ORAL SUNUMLAR:

1	(2001) Fındıklı N., Kahraman S.,Yakın K., Dönmez E., Sertyel S.: <i>Pronuclear scoring as an alternative prognostic tool in the selection of embryos with better developmental capacity</i> . Third Biennial Alpha Conference (8-11 September 2001 ) , New York City , New York , USA .
2	(2002) Sertyel S. : <i>Intrauterin İnseminasyon İşleminde Sperm Hazırlama Teknikleri</i> . : 2. Ulusal Invitro Fertilizasyon Sempozyumu (24-27 Nisan 2002 ) ANKARA
3	(2002)Yakın K.,Kahraman S.,Vanlıoğlu F.,Kumtepe Y., Dönmez E.,Sertyel S. : <i>Prolonged coasting over 3 days adversely affects the outcome in ART cycles</i> .ESHRE 2002 , 18 <sup>th</sup> Annual Meeting ,July 1-3 2002,Vienna.
4	(2002) Kahraman S.,Kumtepe Y.,Benkhalifa M.,Dönmez E. , Sertyel S.,Fındıklı N., Vanderzwalmen P. : <i>Pronuclear morphology scoring and chromosomal complements of embryos</i> . 4 <sup>th</sup> World Conference of A PART .Vienna ,Austria , June 28-30,2002.
5	(2002)Fındıklı N.,Dönmez E.,Kahraman S.,Sertyel S., Yakın K., : <i>Comperison of two different sequential media for cultivation of sibling embryos</i> . 4 <sup>th</sup> World Conference of A PART .Vienna ,Austria , June 28-30,2002.
6	(2002) Benkhalifa M., Kahraman S., Biricik A., Sertyel S., Yakın K., : <i>Round spermatid injection and preimplantation genetic diagnosis results : from intact oocytes to day 4 embryos</i> . 4 <sup>th</sup> World Conference of A PART .Vienna ,Austria , June 28-30,2002.
7	(2002) Kahraman S.,Yakın S., Benkhalifa M., Sertyel S., Biricik A.,: <i>High aneuploidy rate in preimplantation embryos developed from macrocephalik sperm injection</i> . 4 <sup>th</sup> World Conference of A PART .Vienna ,Austria , June 28-30,2002.
8	(2002) Kahraman S., Yakın Y., Benkhalifa M., Sertyel S., Berkil H.,Kumtepe Y. : <i>High aneuploidy rate in preimplantation embryos developed from macrocephalic sperm injection</i> . Fourth International Symposium on Preimplantation Genetics . Limasol , Cyprus , April 10-13 , 2002.
9	(2002) Benkhalifa M., Kahraman S., Biricik A., Sertyel S. Yakın K., Kumtepe Y., : <i>Round spermatid injection and PGD results from intact oocytes to day 4 embryos</i> . Fourth International Symposium on Preimplantation Genetics . Limasol , Cyprus , April 10-13 , 2002.
10	(2002) Kahraman S.,Cengiz S , Kumtepe Y., Benkhalifa M., Dönmez E., Sertyel S., Fındıklı N., Vanlıoğlu F., Yakın K.,Vanderzwalmen P. : <i>Pronuclear morphology scoring and chromosomal complements of embryos</i> . Fourth International Symposium on Preimplantation Genetics . Limasol , Cyprus , April 10-13 , 2002.

11	(2001) Kahraman S., Yakın K., Şamlı M., Vanlıoğlu F., Karlıkaya G., Sertyel S., Dönmez E., : <i>A comparative study of three techniques for the analysis of sperm recovery : Touch print cytology , wet preperation and testicular histopathology .</i> Global Congrees on Gynecologic Endoscopy , Infertility & ART , December 6-9 , 2001 , Goa , India.
12	(2002) Berkil H.,Biricik A., Kahraman S.,Dönmez E., Vanlıoğlu F., Karlıkaya G., Karagözoğlu H., Fındıklı N., Sertyel S., Benkhalifa M.: <i>Yardımcı üreme teknikleri uygulanan hastalarda preimplantasyon genetik tanı sonuçları.</i> 5.Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi 09-12 Ekim 2002 KONYA .
13	(2003)G. Karlıkaya , S.Kahraman ,H.Berkil , A.Biricik , H.Karagözoğlu , E.Dönmez , S.Sertyel , F.Vanlıoğlu , M.Aygün , S.Melil ,M.Benchalifa: <i>Preimplantation genetic diognosis results for the recurrent implantation failure cases with or without advenced maternal age.</i> Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
14	(2003) S.Sertyel , E.Bakircioğlu , S.Kahraman , A.Biricik , E.Dönmez , N.Fındıklı , S.Ünal , H.Yelke ,S.Melil ,H.Karagözoğlu,H.Berkil : <i>Outcome of PGD in cases of severe sperm morphological defects .</i> Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
15	(2003)E.Dönmez , S.Kahraman , S.Sertyel ,S.Melil , A.Biricik , N.Fındıklı , G.Karlıkaya , H.Karagözoğlu , H.Berkil : <i>Couples in which embryo transfer was cancelled due to the lack of chromosomally normal embryos .</i> Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
16	(2003) N.Fındıklı,S.Kahraman,E.Dönmez , A.Biricik ,H.Berkil , S.Sertyel , F.Vanlıoğlu: <i>Embryo Development and PGD outcome in translocations.</i> Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
17	(2003)A.Biricik , H.Berkil ,S.Kahraman , M.Benchalifa , N.Öncü,A.Gür , S.Gürkan,S.Sertyel,S.Ünal,H.Karagözoğlu : <i>Detection of chromosomal abnormalities by FISH infertile males with abnormal karyotypes.</i> Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
18	(2003) N.Fındıklı , A.Biricik , N.Öncü , S.Kahraman ,E.Dönmez , ,S.Sertyel , S.Melil , M.Benchalifa , F.Vanlıoğlu , H.Berkil: <i>Assesment of DNA fragmentation and aneuploidy on slow growing embryos.</i> Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.
19	(2003)E.Bakircioğlu , S.Kahraman , N.Fındıklı , A.Biricik , S.Sertyel , E.Dönmez , S.Ünal , H.Yelke , H.Berkil , N.Öncü ,M.Aygün : <i>Preimplantation Genetic Diognosis for Klinefelter's:Evidence for increased chromosomal abnormalities.</i> Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics 05-07 June , Antalya , Turkey.

20	(2003) N.Fındıklı ,S.Kahraman , E.Dönmez , A.Biricik , S.Sertyel : <i>Embryo development and PGD outcome in translocations.v.Kongress der Deutsch-Türkischen Gynakologengesellschaft II. Internationaler Kongress für Reproduktionsmedizin.</i>
21	(2003) Fındıklı N.,Kahraman S.,Dönmez E.,Sertyel S.,Melil S.,.:Effect of zona manipulation on somatic cell nucleus transfer.: 59 <sup>th</sup> Annual Meeting , October 11-15 , 2003,San Antonio,TEXAS.
22	(2003)Oncu N.,Biricik A.,Berkil H.,Kahraman S ,Karagozoğlu H.,Gur A.,Gurkan S.,Sertyel S.,Benchalifa M.:Chromosome segregation analysis in sperm cells from infertile males with abnormal karyotypes. .19 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE ,Madrid –29 June to 2 July 2003.
23	(2003)Bakırcıoğlu E.,Kahraman S.,Sertyel S.,Fındıklı N., ,Unal S.,Berkil :Comperison of two TESE procedures and PGD outcomes for patients with Klinefelter’s Syndrome . 59 <sup>th</sup> Annual Meeting , October 11-15 , 2003,San Antonio,TEXAS.
24	(2003)Fındıklı N.,Kahraman S., Dönmez E.,Sertyel S.,Melil S.: Effect of zona manipulation on somatic cell nucleus transfer . 59 <sup>th</sup> Annual Meeting , October 11-15 , 2003,San Antonio,TEXAS.
25	(2004) Mustafa E.Bakırcıoğlu, Semra Sertyel ,Necati Fındıklı,Hakan Yelke,Sevil Ünal,S.Melil, Semra Kahraman :Comparison of intracytoplasmic injection outcomes using ejaculated or testicular sperm in patients with cryptozoospermia.AUA Annual Meeting 2004 –Sanfransisco.
26	(2004)N.Fındıklı,N.öncü,S.Sertyel,S.Ünal,Y.Sağlam,S.Kahraman:A possible prognostic value of sperm FISH analysis and the outcome of PGD in difficult ART cases .60 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ASRM -2004 Philadelphia.
27	(2004)S.Sertyel,N.Fındıklı,S.Melil,S.Ünal,E.Enginsu,S.Kahraman:Effect of oocyte morphology on embryo development and aneuploidy rate in ICSI cases.60 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ASRM -2004 Philadelphia.
28	(2004)M.E.Bakırcıoğlu,S.Kahraman,S.Sertyel,N.Fındıklı,H.YelkeS.Ünal: Microdissection testicular sperm extraction (TESE) outcomes in patients with azoospermia and cryptozoospermia for intra cytoplasmic sperm injection .60 <sup>th</sup> Annual Meeting of the ASRM -2004 Philadelphia.
29	(2005) Semra Kahraman, Hüseyin Karadayı, Güvenç Karlıkaya, Semra Sertyel, Necati Fındıklı, Yaman Sağlam. Tek Gen Hastalıklarında Preimplantasyon Genetik Tanı. 10. Ulusal Perinatoloji Kongresi & International Workshop on Multiple Pregnancy. 10–13 Nisan 2005. Antalya, Türkiye.
30	(2005) Fiorentino F, Kahraman S, Karadayi H, Biricik A, Sertyel S, Karlıkaya G, Saglam Y, Nucitelli A, Baldi M. Experience on PGD combined with HLA matching. Sixth International Symposium on Preimplantation Genetics 2005. London, UK. May 19–21, 2005.

31	(2005) H. Karadayı, S. Ozkan, Y. Saglam, A. Gur, S. Isin, Sertyel S.,H. Yelke, S. Unal, S. Kahraman. Outcome of 732 infertile men for Y chromosome microdeletions and karyotype analysis. 13th World Congress on in-vitro Fertilization Assisted Reproduction & Genetics, Istanbul, Turkey, May 26-29, 2005.
32	(2005) S. Sertyel, H. Karagozoglu, S. Unal, Z. Atayurt, U. Kutlu, G. Karlikaya, E. Oral, O. Akcin, N. Findikli, S. Kahraman. Endometrial co-culture can be an effective culture system in cases with preimplantation genetic diagnosis for recurrent implantation failure. 13th World Congress on in-vitro Fertilization Assisted Reproduction & Genetics, Istanbul, Turkey, May 26-29, 2005.
32	(2006) Güvenç Karlıkaya, S. Kahraman, Hüseyin KARadayı, Semra Sertyel, Burcu Umay, Yaman Sağlam, Francesco Fiorentino. Tek gen hastalıklarında preimplantasyon genetik tanı. 2. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi (TSRM 2006). 7–10 Eylül 2006, Antalya, Türkiye.
32	(2006) Semra Sertyel,, S. Kahraman, Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında yeni uygulamalar2. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi (TSRM 2006). 7–10 Eylül 2006, Antalya, Türkiye.
32	(2006) S. Sertyel: How do we handle gametes and embryos?:Practical aspects: The 1st International workshop on current techniques and future trends on gamete and and embriyo manipulation.Istanbul , Turkey, March 4-5, 2006

## 11.ETİK KURUL ONAYI



YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Tarih; 06.05.2015

Sayın , Hazske Semra SÜMER

İstanbul yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik kurulunun 06.05.2015 tarihinde yaptığı toplantı sonucunda "Monodüzlemde elde edilmiş olog endometrial kokültür üzerinde geliştirilen embriyolar ile tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olgularında artan gebelik ve implantasyon oranlarına göre hedef hasta grubunun belirlenmesi' isimli çalışmanız etik kurulumuzca uygun bulunmuştur.( karar no: 2015/1)

  
Prof. Dr. Tülay İrez

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurul Başkanı