

**T.C**  
**İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

**FARKLI KÜLTÜR ORTAMLARININ EMBRİYO GELİŞİMİ**  
**ÜZERİNE ETKİLERİ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**Biyolog Cihan GÖKTAŞ**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Engin ORAL**

**(İSTANBUL-2015)**

**T.C.**

**İSTANBUL YENİ YÜZYIL üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

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

**Tez Savunma Tarihi: 18.09.2015**

**Prof. Dr. Tülay İrez**

**İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**Jüri Başkanı**

**Prof. Dr. Engin Oral**

**İstanbul Üniversitesi**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Gül Baktır**

**Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**Üye**

**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 çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.

Cihan Göktaş

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Klinik Embriyoloji Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Tülay İrez'e**,

Destekleri ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam **Prof. Dr. Mustafa Bahçeci'ye** ve **Bahçeci Sağlık Grubu** çalışanlarına,

Tezimin başlangıcından itibaren bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan Laboratuvar Direktörüm **Dr.Necati Fındıklı'ya**,

Çalışma disiplini ile örnek aldığım tez danışmanım **Prof.Dr. Engin Oral'a**,

İstatistik bölümünde desteğini esirgemeyen **Dr. Admir Rama'ya**,

Türlü cefalar ile beni bu tezi yazabilecek günlere getiren **Annem** ve rahmetli **Babama**,

Mutluluk kaynağım çocuklarımın güzel annesi sevgili eşim **Elif Göktaş'a**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ .....	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xii
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.Embriyo kültürü medium içerikleri .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Su.....	4
2.1.2. İyonlar.....	4
2.1.3. Karbonhidratlar .....	5
2.1.4. Aminoasitler .....	6
2.1.5. Amonyum .....	7
2.1.6. Vitaminler.....	7
2.1.7. Şelatlayıcılar.....	7
2.1.8. Antibiyotikler.....	8
2.1.9. Antioksidanlar .....	8
2.1.10. Proteinler.....	8
2.1.11. Hormonlar ve büyüme faktörleri.....	9
2.1.12. Tampon sistemleri .....	10
<b>2.2.İnkübasyon sistemleri .....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Karbondioksit .....	11
2.2.2. Oksijen.....	12
2.2.3. Sıcaklık .....	12
2.2.4. pH.....	13
2.2.5. Işık .....	13

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Çalışmada kullanılan embriyo kültür solüsyonları ve cihazlar .....</b>	<b>14</b>
3.1.1. Tek Aşamalı Kültür Mediumları (SSM) .....	14
3.1.2. İnkübatörler.....	17
<b>3.2. Çalışma gurubu.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. IVF işlemi.....</b>	<b>20</b>
3.3.1. Hastanın Hazırlanması .....	20
3.3.2. OPU İşlemi ve Oositlerin Kumulus Korona Hücrelerinden Temizlenmesi.....	20
3.3.3. Sperm Hazırlığı .....	20
3.3.4. Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI) .....	21
3.3.5. Fertilizasyon ve Embriyoların Değerlendirilmesi .....	21
3.3.6. Transfer İşlemi .....	23
<b>5. BULGULAR .....</b>	<b>24</b>
5.1. Irvine Scientific ve Life Global mediumları karşılaştırması .....	24
5.2. IKS ve MIRI inkübatörlerinin Karşılaştırması.....	26
<b>6.TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>29</b>
<b>7. ETİK KURUL KARARI .....</b>	<b>34</b>
<b>YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİK KURULU .....</b>	<b>34</b>
<b>8.KAYNAKLAR .....</b>	<b>35</b>

**ŞEKİLLER LİSTESİ**

Şekil 1. IKS Klasik tip 33 litrelik inkübatör .....	18
Şekil 2. Miri Benchtop Multi-room inkübatör .....	19
Şekil 3. Gelişmekte olan bir insan embriyosunun Embryoscope cihazından elde edilmiş görüntüleri .....	23

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 1. Çalışmada kullanılan embriyo kültür solüsyonları ve cihazlar .....	14
Tablo 2. Çalışma dahilinde karşılaştırılması yapılan ticari SSM mediumlarının bilinen içerikleri .....	15
Tablo 3. LifeGlobal ve Irvine Scientific firmaları tarafından üretilen SSM mediumlarının kimyasal bileşen (inorganik) analiz sonuçları .....	16
Tablo 4. Life Global ve Irvine Scientific firmaları tarafından üretilen SSM mediumlarının kimyasal bileşen (organik) analiz sonuçları .....	17
Tablo 5. Irvine Scientific ve Life Global mediumlarındaki ortalama oosit sayıları ve fertilizasyon istatistikleri .....	25
Tablo 6. Irvine Scientific ve Life Global mediumları ile büyütülen embriyoların 2. ve 3. gün gözlenen ortalama hücre sayıları .....	25
Tablo 7. Irvine Scientific ve Life Global mediumlarında gelişen ortalama blastosist sayıları .....	26
Tablo 8. Kullanılan inkübatör tipine göre embriyolojik gelişim değerlerinin karşılaştırılması .....	27
Tablo 9. IKS ve MIRI inkübatörlerinde büyütülen embriyoların 2. ve 3. gün ortalama hücre sayıları .....	28
Tablo 10. IKS ve MIRI inkübatörlerinde büyütülen embriyoların 5. gün gelişim oranları .....	28



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

IVF	İn-Vitro Fertilizasyon
ICSI	Intra Stoplazmik Sperm Enjeksiyonu
OPU	Ovum Pick Up
FSH	Folikül stimule edici hormon
HCG	Human chorionic Gonodotropin
PCO	Polycystic Ovary Syndrome
SSM	Single Step Medium
PVP	Poli Vinil Propilen
HEPES	Hidroksietilpiperazin-etansülfonik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
HTF	Human Tubal Fluid
MTF	Mouse Tubal Fluid
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
O <sub>2</sub>	Oksijen
ICM	Inner Cells Mass (İç hücre kitlesi)
KRB	Krebs-Ringer bikarbonat
pH	Potansiyel Hidrojen
NACL	Sodyum Klorür
CA	Kalsiyum
MG	Magnezyum
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit

## ÖZET

Tüpbebek tedavilerinde elde edilen embriyoların laboratuvar ortamında büyütülmesinde günümüzde yaygın olarak iki farklı konsepte göre üretilmiş kültür mediuamları (ardışık kültür mediuamları ve tek aşamalı kültür mediuamları) kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, tüpbebek laboratuvarlarında in vitro ortamda embriyo büyütülmesi amacı ile yaygın olarak kullanılan, tek aşamalı kültür mediuumu olarak tasarlanmış iki farklı ticari kültür mediuumunun (Irvine Scientific ve Life Global) preimplantasyon dönemi insan embriyo gelişiminde ve klinik sonuçlardaki etkileri araştırılmıştır.

Kadın yaşının 37'den küçük olduğu, preimplantasyon genetik tanı endikasyonu bulunmayan, ejakulat spermi kullanılmış ve ikiden fazla in vitro fertilizasyon denemesi bulunmayan 65 hastanın 864 oositi intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (mikroenjeksiyon) sonrası dengeli ve rastlantısal olarak iki gruba ayrılmış ve adı geçen kültür ortamları içerisinde eş zamanlı olarak büyütülmüşlerdir. Fertilizasyon sonrası günlük embriyo gelişim takibi yapılarak farklı kültür ortamlarının embriyo gelişimi üzerindeki performanslarının mümkün olduğu kadar objektif gözlenmesi sağlanmaya çalışılmıştır.

Bulgular, her iki grupta fertilizasyon ve erken klivaj döneminde embriyo gelişimi parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemesine karşın, embriyo gelişiminin 5. gününde Life Global mediuumu ile büyütülen embriyolarda anlamlı olarak yüksek oranda blastosist gelişimi sağlanabildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada ayrıca embriyo kültür sisteminde kullanılan farklı inkübasyon sistemlerinin de embriyo gelişimini etkileyip etkilenmediğini araştırmak için aynı çalışma süresi dahilinde toplam 50 hastaya ait 738 oosite mikroenjeksiyon işlemi uygulanmış ve kardeş oositlerin farklı inkübatörlerde büyütülmesi ile aynı hasta grubunda farklı tip inkübatörlerin embriyo gelişim performansları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonrasında farklı inkübasyon sistemlerinde büyütülen embriyolarda temel embriyo gelişim parametreleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, ticari olarak üretilmiş ve pazarda kullanıma sunulan farklı firmalara ait embriyo kültür mediumlarının erken embriyo gelişim döneminde ve hücrel dinamiklerde anlamlı bir farklılık oluşturmadığını, bununla birlikte ileri gelişim döneminde anlamlı blastosist gelişim farklılıklarının gözlemlendiğini göstermektedir.

## ABSTRACT

Embryos obtained by *in vitro* fertilization (IVF) treatment are cultured in artificial laboratory conditions and widely grown in two distinct concepts of culture media: sequential or single-step.

In this study, two commonly used and different commercial brands of single-step IVF culture media (*Irvine Scientific* and *Life Global*) designed for embryo culture were investigated regarding human preimplantation embryo development and clinical outcomes.

The study group included women younger than 37, with no indication of preimplantation genetic diagnosis and less than two previous IVF cycles. A total of 864 oocytes belonging to 65 patients were fertilized by ejaculated sperm using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and were randomly divided to obtain two balanced groups which were further sibling-cultured in parallel in the two aforementioned culture media. Daily embryo development was checked post-fertilization and carefully scored for an objective performance assessment of the two different culture media concerning embryo development.

Findings showed that fertilization and early cleavage rates are similar with no statistical significant difference found between both groups. However, a significant difference between embryo development parameters were observed on the 5<sup>th</sup> day of development in embryos cultured in *Life Global* medium with a significantly higher rate of blastocyst growth when compared to *Irvine Scientific*.

During the same study period, the influence of different incubation systems used in embryo culture on embryo development was investigated. For this purpose, a total of 738 oocytes belonging to 50 patients were split in order to be cultured in different incubators after ICSI. Embryos derived from sister oocytes were observed and compared for their capacity to develop embryos and thereby giving information on the performance of the different types of incubators. No significant difference in the basic parameters of embryo development was found.

The results obtained in this study showed that embryo culture media produced commercially and offered by different companies did not create significant differences neither in early embryo development nor in cellular dynamics, but that

significant disparities in post-cleavage embryo development exist, specifically in blastocyst formation.

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

In vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında elde edilen başarı, hastaya özel yada klinik uygulamalardaki yetersizlik gibi nedenlerin yanında, kötü embriyo gelişimi ve ardından canlılık kaybına neden olan sup-optimal kültür şartları sebebiyle beklenen düzeyin altında kalmıştır [1]. Ancak son yıllarda ,embriyo gelişimine ve canlılığının devamına destek olan daha etkin ve daha fizyolojik şartlara sahip kültür sistemlerinin geliştirilmesi ile bu oran arttırılmaya çalışılmaktadır [2].

Bu gelişmeler ile birlikte implantasyon oranlarında artış ve gebelik kaybı sayısında azalmalar gözlenmektedir. Kültür şartlarının iyileştirilmesi ile kriyoprezervasyondan sonra canlılığını koruma kapasitesi yüksek olan embriyolar elde edilmiştir [3]. Dünyada birçok ülkede ivf nedeniyle oluşan çoğul gebeliklerde ve buna bağlı olarak yaşanan prematüre doğum oranlarının artışı, gerekli tedbirler alma gereksinimini doğurmuştur. Ülkemizde bu riskleri aza indirmek amacıyla T.C Sağlık Bakanlığı tarafından 6 Mart 2010 tarihli ve 27513 sayılı yönetmelik ile embriyo transfer sayılarında kısıtlama getirilmiştir. Yönetmelik kapsamında sınırlandırılan transfer edilecek embriyo sayısının mevcut başarı oranlarında ciddi ve olumsuz bir azalma meydana getirmemesi amacı ile klinisyen ve embriyologların embriyo transferi için daha seçici davranma zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Bundan böyle mümkün olduğunca daha geç embriyo transferi yapmak ve genellikle blastosist transferi tercih edilmiştir. Ancak belli kalite standartını yakalayabilmiş laboratuvarlar, canlılık kaybı riskini göze alarak yüksek oranda blastosist transferi yapabilmektedir. Bu amaçla yüksek kaliteli ve güvenli embriyo kültür mediumları ve embriyo kültür inkubasyon sistemleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmamızın amacı, insan embriyolarının kültürü için kimyasal olarak optimize edilmiş ve dünya genelinde tek aşamalı olarak adlandırılan iki farklı kültür mediumunu ve iki farklı inkubator sistemini kardeş oositler üzerinde karşılaştırmak, elde edilen sonuçlar doğrultusunda daha optimal ve kaliteli embriyo gelişimi sağlanabilen embriyo kültür sistemlerinin belirlenmesi ile IVF uygulamalarındaki başarı oranlarının arttırılmasını sağlamaktır.

## 2.GENEL BİLGİLER

Embriyo kültür mediumlarının tarihsel gelişimi 1882 yılında Sydney Ringer'in kurbağa kalbinin in-vitro şartlarda atımının devamını sağlamak için geliştirdiği basit tuzlu su solüsyonu çalışmalarıyla başlamıştır. Ringer, kan serum içeriğini inceleyerek solüsyonunu da bu bileşenleri baz alarak geliştirmiştir [4]. Locke ve Rosenheim (1907), tavşan kalbi çalışmaları için bu solüsyonu modifiye ederek glukoz eklemişlerdir [5]. Krebs ve Henseleit (1932) glukoz kullanmadan sodyum bikarbonatı arttırarak sıçan dokularında çalışmalar yapmışlardır. Krebs-Ringer bikarbonat (KRB) solüsyonunda, içindeki 25 mM sodyum bikarbonatla %5 CO<sub>2</sub>' de dokular için uygun pH değerini yakalamışlardır [6]. Daha sonra Whitten (1956) KRB mediumuna 5,55 mM glukoz ilave ederek fare embriyolarından blastosist elde etmiş [7] ve McLaren ile Biggers (1958) gelişen blastosistleri anneye transfer ederek canlı yavru doğduğunu bildirmişlerdir [8].

Başlangıçta geliştirilen kültür mediumlarının büyük kısmı basit tuz tabanlı solüsyonlardır. İnsan embriyolarının in-vitro ortamda geliştirilmesinde en basitten karmaşık olana kadar birçok formül denenmiştir. Daha ileriki dönemler de artık tuba uterina ve uterus salgılarının içerikleri örnek alınarak yeni mediumlar geliştirilmeye devam etmiştir. Quinn tarafından tuba uterina örnek alınarak geliştirilen HTF (Human tubal fluid; [9]) ve sonrasında Gardner ve Leese 1990 yılında MTF (Mouse tubal fluid) formülünü geliştirmişlerdir. Daha sonra HTF solüsyonu üzerinde birçok araştırmacı değişiklikler yaparak erken embriyonel dönemde olumlu sonuçlar almıştır. 1990'lı yılların ortalarında blastosist evresine kadar geliştirilen embriyolarda implantasyon oranlarının daha yüksek olduğu gözlenmesiyle Gardner ve ekibi G1 ve G2 mediumlarını üretmişler [10] ve ardışık medium sistemi ile embriyoların farklı dönemlerdeki ihtiyaçlarını karşılayarak blastosist gelişimini arttırmışlardır. 1995 yıllarında Barnes ve arkadaşları bu mediumu kullanarak geliştirdikleri blastosistler ile tek embriyo transferi ile de gebelik elde edilebileceğini kanıtlamışlardır [11]. Gardner'ın ardışık medium prensibine bağlı kalarak birçok firma yeni mediumlar üretmiştir.

Son yıllarda medium üretiminde iki görüş ortaya çıkmıştır. Birincisi Gardner ve Lane tarafında öne sürülen “İçeriği değişken ardışık medium” görüşüdür [12]. Bu görüşe göre in-vivo ortamda tuba uterina ile uterusun salgı içeriklerinin farklılığından dolayı embriyonun gelişimini optimize etmek için embriyonun ihtiyaçlarına uygun iki aşamalı medium kullanılmalıdır. İkinci görüş ise Summers ve Biggers gibi araştırmacıların öne sürdüğü, implantasyon öncesi embriyonel gelişimin tek aşamasında kullanılabilir tek aşamalı medium ile “Basit Optimizasyon” görüşüdür [2]. Bu görüşe göre, embriyonun çevresindeki değişken sıvı içeriği embriyoyu direkt olarak etkilemez, embriyo sadece ihtiyacı olduğu kadarını kullanır. Ayrıca ilk günden başlayarak blastosiste kadar aynı formülün kullanılmasının, embriyo üzerinde daha az stres yarattığı ve embriyo gelişimini olumlu etkilediği öne sürülmektedir. Bir çalışmada tek aşamalı medium ile iki aşamalı medium karşılaştırılmış, kardeş oositler üzerinde ve Embryoscope<sup>TM</sup> cihazında takip ederek bölünme zamanlarına, blastosist gelişim oranlarına bakılmıştır. Sonuç olarak, embriyoların ilk bölünme ve 3 hücreden 4 hücreye geçişinde zamansal bir fark bulunmamış, klinik gebelik ve implantasyon oranlarında da bir anlamlı bir artış/azalış tespit edilmemiştir. Bununla birlikte 6.gün blastosist gelişimi oranı tek aşamalı medium grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve bu sonuç embriyo dondurma oranına fayda sağlamıştır [13]. Bu iki görüşe de uygun olarak üretilmiş mediumlar günümüzde başarıyla kullanılmaktadır.

### **2.1.Embriyo kültürü medium içerikleri**

Embriyo kültür mediumları içeriğini aşağıdaki 12 başlıkta toplamamız mümkündür ;

- Su
- İyonlar
- Karbonhidratlar
- Aminoaitler
- Amonyum
- Vitaminler
- Şelatlayıcılar



- Antibiyotikler
- Antioksidanlar
- Proteinler
- Hormonlar ve büyüme faktörleri
- Tampon sistemleri

### 2.1.1. Su

Su, günümüzde embriyo gelişimi için kullanılan tüm mediumların ana bileşenidir ve medium içeriğinin %99' unu oluşturur. Bundan dolayı kullanılan suyun kaynağı ve saflığı çok önemlidir. Wittingham, üç kez distile edilmiş su ile hazırlanmış mediumun bir veya iki kez distile edilerek hazırlanmış mediumlara kıyasla daha iyi blastosist geliştirdiğini göstermiştir ([14].

### 2.1.2. İyonlar

IVF için kullanılan mediumların iyonik yapıları oldukça farklıdır. İmplantasyon öncesi embriyo gelişimi için gerekli iyonlar hakkında literatürde oldukça az kaynak mevcuttur. Mediumların iyonik içeriğinin optimizasyonu, belirli fare soyundaki embriyoların geniş aralıktaki iyon konsantrasyonunda blastosiste kadar takip edilmesiyle yapılmaktadır. Fakat, mediumun uygun olduğuna karar vermek için yalnızca blastosist gelişimini baz almak tartışılabilir bir durumdur.

Wales, iyon konsantrasyon aralığını belirlemek için 2 hücreli fare embriyolarının blastosist aşamasına kadarki gelişimini izlemiştir [15]. Embriyolar, potasyum için 0,4 mM ile 48 mM, magnezyum için 0 mM ile 9,6 mM, kalsiyum için 0,1 mM ile 10,2 mM ve fosfat için 0 mM ile 7,2 mM aralıklarında değişen konsantrasyonlarda blastosiste kadar gelişmişlerdir. Kültür mediumundaki potasyum konsantrasyonunun sperm kapasitasyonu üzerine yararlı etkisi olduğu belirtilmiştir [16]. Ancak potasyum konsantrasyonunun embriyo gelişimine faydası hakkında çelişkili bilgiler de mevcuttur [17], [18]. Medium içeriğindeki NaCl' in 125 mM gibi yüksek konsantrasyonda bulunması da fare embriyolarında blast gelişiminde olumsuz etki yaratmıştır [19], [20]. NaCl konsantrasyonunun 85 mM'a düşürülmesiyle erken bölünme dönemindeki embriyolarda mRNA ve protein sentezini arttırdığını

gösteren çalışmalar da NaCl konsantrasyonunun önemini göstermektedir [21], [22]. Ca ve Mg' un etkilerine bakıldığında, Ca 'un in-vitro ortamda embriyoların kompaktlaşma aşamasında etkili olduğu, Mg 'un ise blastosist evresine gelişmede bir rolü olmadığı görülmektedir. Mediumda içerisindeki Ca/Mg oranı düşük olduğunda özellikle fertilizasyondan sonraki 6 saat içinde embriyonun hücre içi Ca oranını düzenleme yeteneği de düşmektedir. Embriyoların iyonik hemostazı düzenlemedeki düşük kapasitesi canlılık kaybına neden olabilmektedir. Ayrıca, ICSI işlemi için kümülüs hücrelerinin zamanından önce temizlenmesi, oositi iyonik strese daha da açık hale getirebilmektedir.

Kültür mediumu içerisindeki iyonlar, osmatik basınç üzerinde etkilidirler fakat insan embriosu için en uygun osmatik basınç ve iyon konsantrasyonu henüz belirlenememiştir. Bunun için genellikle geniş aralıklı osmatik basınçta ve iyon konsantrasyonlarında normal embriyo gelişimi sağlanmaktadır.

### **2.1.3. Karbonhidratlar**

Kadın üreme sisteminde tuba uterina ve uterus salgılarına bakıldığında karbonhidrat oranları siklus boyunca farklılık gösterir. Karbonhidratlar aminoasitler ile birlikte embriyonun enerji kaynağını oluştururlar. Piyasada kullanılan birçok kültür mediumu içerisinde karbonhidrat kaynağı olarak glukoz, pirüvat ve laktat bulunmaktadır. Kullanılan kültür mediumunda bunlardan biri yada birkaçı eksik ise mediuma serum eklenebilmektedir.

İnsan embrioları gelişimin erken aşamasında glukoz yerine diğer enerji substratlarını kullanırlar. Hardy, implantasyon öncesi insan embriosunu invitro olarak inceleyerek glukoz ve pirüvat alımını ölçmüştür [23]. Hardy'in sonuçlarına göre; pirüvat kullanımının 2-4 hücreli dönemde 24 pmol/saat/embriyo ,9-16 hücre aşamasında 38 pmol/saat/embriyo, morula aşamasında ise 42 pmol/saat/embriyo olduğunu tespit edilmiştir. Glukoz alımı ise 16 hücreli döneme kadar 10 pmol/saat/embriyo nun altındayken, blastosist aşamasında 24 pmol/saat/ embriyo seviyelerine çıktığı görülmüştür. Bu çalışma ve benzeri yapılan birçok çalışmalarda insan embriosunun gelişim sürecinde metabolizmanın piruvat temelinden glukozu doğru kaydığı tespit edilmiştir [24]. Buna bağlı olarak erken aşamada prüvat

eksikliği, blastosist aşamasında ise glukoz eksikliği embriyo gelişiminde olumsuz etki yaratmıştır. Glukoz kültür mediumunda yalnızca enerji substratı amacıyla bulunmaz. Glukoz aynı zamanda lipid-membran, nükleik asit ve triasilgliserol biyosentezi içinde gereklidir [25]. Bundan dolayı embriyonik genom aktive olduğunda ve biyosentetik aktivite arttıkça ortamdaki glukoz önem kazanır. Kültür mediumunda ki laktat ise, ilk bölünme evresinde çok gerekli olmasa da reaksiyon sonucu piruvattan oluşabilmektedir. Aşağıdaki reaksiyon blastosist gelişimi için oldukça önemlidir.



Lane ve Gardner yaptıkları çalışmada , blastosist aşamasında pirüvat ve laktat oranlarının değişmesi ile hücre içindeki NAD/NADH oranının da değiştiğini göstermişlerdir [26]. Ayrıca, kültür mediumundaki pirüvat ve laktat miktarı 5 mM ve üzerine çıktığında hücre içi pH nın düştüğü gösterilmiştir [27].

#### 2.1.4. Aminoasitler

Embriyo gelişimi sırasında aminoasitler; enerji kaynağı, pH tamponlayıcı antioksidan ve şelatör olarak fizyolojik görevlere sahiplerdir. Tuba uterina ve uterus sıvısında yüksek miktarda alanin, aspartat, glutamat, glisin, serin ve taurin bulunmaktadır. Kültür mediumuna eklenen aminoasitlerin, embriyoların blastosist evresine ulaşmasında etkisi olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir [28]. Eagle, minimum esansiyel mediumunda bulunan 20 aminoasitten 7 tanesini nonesansiyel aminoasitler olarak sınıflandırmıştır ve bunlar; alanin, asparjin, glutamik asit, asparjik asit, prolin, glisin ve serindir [29]. Aynı sonuçları Gardner ve Lane' de tuba uterina sıvısında yüksek konsantrasyonda bulunan aminoasitlerin nonesansiyel grupta olduğunu göstermiştir [28]. Nonesansiyel aminoasitler ve glutamin döllenenmeden 8 hücreli aşamaya kadar bölünme oranlarını arttırırken, kompaktlaşma aşamasından itibaren blastosel formasyonu ve zona pellusidanın incelerek delinmesini kolaylaştırıp iç hücre kitlesinin gelişimini arttırdığı gösterilmiştir [30]. Embriyolar kompaktlaşma aşamasına kadar henüz farklılaşmamış blastomerlere sahiptirler ve hücreler homeostasis ortamlarını korumak için eksojen aminoasitleri

kullanılır. Ancak hücreler kompaktlaşma aşamasından sonra kendi iç ortamını düzenleyebilirler ve artık nonesansiyel aminoasitlere gerek duymazlar [31].

### **2.1.5. Amonyum**

Kültür ortamındaki aminoasitler, embriyonun gelişimini düzenlerler fakat aynı anda embriyo tarafından metabolize edilerek amonyak oluşumuna da neden olurlar. Kültür ortamında 37° C' de amonyum salınımı artar ve embriyo-toksik amonyum iyonlarının yapılanmasına neden olur. İn-vivo şartlarda üreme kanalları dinamik bir yapıya sahip olduğundan bu durum gözlenmez. Mediumdaki amonyum iyonları kültür ortamında embriyonun farklılaşmasında, metabolizma ve gen ekspresyonunda değişmeye sebep olurken [32], [33] aynı zamanda transfer sonrası implantasyon ve fetal gelişim oranlarını da azaltmaktadır [30]. Amonyumun bu zararlı etkisini azaltabilmek için kültür mediumunun 48 saat ara ile yenilenmesi gerekmektedir.

### **2.1.6. Vitaminler**

Birçok medium içeriğinde vitamin bulunmasına rağmen halen vitaminlerin embriyo üzerine etkileri konusunda kesin bilgiler yoktur. Vitamin yokluğunda dahi kültür ortamında blastosist gelişimi görülebilmektedir. Tavşan embriyoları ile yapılan bir çalışmada vitaminlerin blastosölün genişlemesine fayda sağladığı bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada Ham's F-10 mediumunda bulunan B12 vitamininin blastosist genişlemesinde azalmaya neden olduğu da bildirilmiştir [34]. Aminoasitler ve vitaminler birlikte etkileşim göstererek canlılık kaybını ve metabolizmadaki dengesizlikleri engellerler. B grubu vitaminler karbonhidrat ve aminoasit matabolizmasında önemli yere sahiplerdir. Bundan dolayı vitaminlerin tam olarak fonksiyonları bilinmese de özellikle aminoasit varlığında embriyo gelişimine fayda sağladığı düşünülmektedir.

### **2.1.7. Şelatlayıcılar**

Şelatörler belli metal iyonları ile suda çözünerek kompleksler oluşturabilen kimyasallardır. Böylelikle iyonu etkisizleştirip onu başka iyonlarla tepkiye sokmayarak, medium içinde tortu oluşmasını engellerler. Şelatlayıcıların kültür

mediumuna eklenmesiyle embriyoların in-vitro gelişimi arttırılmıştır. İnsan embriyosu üzerine yapılan bir çalışmada glukoz ve fosfat içermeyen HTF mediumuna EDTA eklendiği zaman embriyoların blastosist geliştirme oranlarında artış gözlenmiştir [35]. Ancak EDTA'nın bu yararlı etkisi erken bölünme evresiyle sınırlı kalmaktadır. Kompaktlaşma aşamasından sonra kültür mediumunda EDTA varlığı blastosistin gelişim gücünü ve fetal gelişimi azalttığı gösterilmiştir [36].

### **2.1.8. Antibiyotikler**

İn-vitro ortamda embriyoları geliştirmek için belli aralıklarla embriyoların yeni kültür mediumlarına taşınması gerekmektedir. Bu taşıma sırasında kullanılan tüm malzemelerin steril olmasına ve laboratuvar koşullarına dikkat edilmesine rağmen olası bakteriyel bulaşma riski vardır. Kültür ortamlarında bakteri üremesini engellemek amacıyla genellikle penisilin, streptomisin ya da gentamisin gibi antibiyotikler kullanılmaktadır. Fakat son zamanlarda yapılan bir çalışma ile antibiyotik içermeyen kültür mediumunda, insan embriyosunun bölünme oranlarının arttığı gösterilmiştir [37]. Böylece antibiyotiklerin rutin olarak kültür mediumuna eklenmesi sorgulanmaya başlamıştır. Fakat sperm hazırlığı için kullanılan mediuma antibiyotik eklenmesi konusunda herhangi bir şüphe yoktur.

### **2.1.9. Antioksidanlar**

İn-vitro gelişen embriyoların in-vivo gelişenler ile karşılaştırıldığında biraz daha yavaş gelişim göstermesi oksidatif streten kaynaklanabileceği fikrini akllara getirmiştir. Bu nedenle bilinen birçok antioksidan madde kültür mediumlarında kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Bunlar arasında; süperoksid dismutaz, glutatyon, sisteaminin, askorbatın, piruvat sayılabilir. Piruvat zaten kullanılan bütün kültür mediumları içinde bulunur ve kuvvetli bir antioksidan olarak da görev yapar. Dolayısı ile zaten hali hazırda tüm mediumlar antioksidan içermektedirler.

### **2.1.10. Proteinler**

Kültür ortamındaki embriyoların büyümeleri ve canlılığı proteince zengin medium kullanımına bağlıdır. Embriyo kültüründe bulunan proteinlerin başlıca görevleri şunlardır;

- Embriyonun büyümesi için önemli moleküllere taşıyıcılık yapar,

- Mediumdaki ağır metalleri ve olası embriyotoksik maddeleri bağlar,
- Mediumun sürfaktan aktivitesini destekler,
- Blastomer zarına zarar verebilecek ekstrasellüler proteazlara substrat görevi yapar.

Geçmişte embriyo kültürü için hastanın kendi serumu kültür mediumuna %5-%20 konsantrasyonunda eklenmekteydi. Fakat protein olarak hasta serumu kullanılması birçok dezavantajı da beraberinde getirmiştir. Serum içinde proteinler, hormonlar, vitaminler, yağ asitleri, şelatlanmış metal iyonları ve pırpöjenler gibi makromoleküller bulunur. Bu tür makromoleküller ve diğer bileşenler, hastadan hastaya ve hatta aynı hastanın farklı menstüriyel siklusunda farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca, PCO, endometriyozis ve bilinmeyen enfeksiyon varlığında hasta serumu kullanılması embriyo üzerinde toksik etki yapabilmektedir. Bütün bunlara ek olarak embriyo kültüründe hasta serumu kullanılması serumun toplanması, işlenmesi için yapılan masraf ve zaman harcaması ve laboratuvar personelinin enfeksiyon riski de serum kullanılmasından kaynaklanan dezavantajlardandır. Geviş getiren hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda serum varlığında zigotların blastosiste kadar takibi yapıldığında mitokondri kristallerinde anormal katlanmalar olduğu gözlenmiştir [38], [39]. Bu durumun azalmış oksidatif kapasite ile ilgili olması muhtemeldir. Ayrıca oluşan blastosistler koyunlara transfer edilmiş ve doğan kuzuların normalden çok daha büyük olduğu görülmüştür [38]. Embriyolar ve gametler yüzey yüklerinden dolayı cam ve plastik yüzeylere yapışır ve laboratuvar için manipülasyonda güçlük çekilebilir. Oysaki embriyo kültüründe serum albümin kullanılması embriyo ve gametin yapışkan hale gelmesini engelleyerek manipülasyonu kolaylaştırır.

Serumun bilinmeyen etkileri ve dezavantajlarından dolayı, günümüzde embriyo kültürü için genellikle hasta serumu yerine albüminin rekombinant formu şeklinde protein kaynağı kullanılmaktadır.

### **2.1.11. Hormonlar ve büyüme faktörleri**

İnsanda büyüme faktörleri, kadın üreme kanallarındaki hücreler aracılığı ile yönlendirilmektedir. Birçok çalışma sonucunda transkriptleri belirlenen ligant ya da

reseptörler şunlardır; IGF-I, IGF-II, EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF-A, FGF-4, LIF. Martin ve arkadaşları [40] heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörünü kültür mediumuna ekleyerek, insan embriolarında hem blastosist gelişiminin hem de daha sonraki zonadan çıkışın belirgin olarak arttığını göstermişlerdir. Buna benzer olarak IGF-I eklenmesi sonucunda blastosist gelişimi uyarılmış ve ICM gelişimi arttırılmıştır [41]. Kültür ortamına tek büyüme faktörünün eklenmesi embriyo üzerinde bir cevap oluşturmayabilir. Ancak iki yada daha fazla embriyo faktörünün etkileşimi ile birbirlerinin etkilerin kuvvetlendirilebilir. Fakat birçok büyüme faktörü pleiotropik etki göstererek farklı hücrelere sinyaller gönderebilmektedir. Bundan dolayı eğer kültür ortamına uygun olmayan büyüme faktörü eklendiğinde hücreler belli farklılaşma yollarına ve hatta yanlış yollara yönlendirilebilirler. Büyüme faktörleri, mediyuma katılmasının getirdiği maliyet ve insan embriosu üzerinde kesin bilgilerin olmamasından dolayı halen günümüzde araştırma konusu olarak kalmıştır.

#### **2.1.12. Tampon sistemleri**

Embriyonun gelişebileceği en uygun 7,2-7,4 pH aralığını sağlamak için embriyo kültür mediumunda bikarbonat/CO<sub>2</sub> tampon sistemleri kullanılır. Mediyuma sodyum bikarbonat eklenmesi %5-7 CO<sub>2</sub> atmosfer ortamını zorunlu hale getirir ve bunun içinde CO<sub>2</sub> inkübatörleri kullanılır. Medium havaya maruz kalırsa pH hızla artar ve bunun sonucunda kötü embriyo gelişimi ve uzun sürmesi halinde canlılık kaybında artış görülebilmektedir. Bu sorunu azaltabilmek için IVF laboratuvarlarında kültür mediumlarının üzeri yağ ile örtülmektedir. Ancak OPU işlemi sırasında ve ICSI gibi diğer manipülasyon gerektiren işlemler sırasında embriyonun dış ortamda kalma süresi uzayabilir. Bu nedenle inkübatör dışı kullanımı için uygun olan diğer tamponlama sistemleri geliştirilmiştir. 20°C'de 7,55 pKa'sı olan N'-2-Hidroksietilpiperazin-N'2-etanülsülfonik asid (HEPES) tampon sistemi bunlardan en yaygın olanıdır.

#### **2.2.İnkübasyon sistemleri**

Embriyonun en iyi şartlarda gelişimi için yalnızca iyi bir kültür mediyumu yeterli değildir. Kullanılan tüm sarf malzemelerin kaliteli olması ve bunun yanında embriyo için en uygun fizyolojik koşulların da sağlanması gerekir. Fizyolojik

şartların sağlanabilmesi için en önemli faktör kullanılan inkübatör sistemidir. Günümüzde memeli embriyolarının laboratuvar ortamında mümkün olduğu kadar doğal gelişim ortamına yakın bir çevre sağlamayı amaçlayan birçok inkübatör sistemleri geliştirilmiştir. Birkaç yıl öncesine kadar bu amaçla en yaygın kullanılan inkübatörler genel hücre kültürü işlemlerinde de kullanılan dolap tipi büyük hacimli inkübatörler iken, son yıllarda artık genelde büyük hacimli olan bu cihazların yerini daha küçük hacimli benchtop (tezgah üzeri) inkübatörler almaya başlamıştır. Hacimdeki büyük miktarda gerçekleşen azalma, hem embriyonun bulunduğu kabın çevresindeki ortamı ve bileşenlerin büyük oranda stabil kalmasını sağlamakta, hem de inkübasyon için gerekli gaz kullanımını ciddi anlamda azaltmaktadır. Klasik inkübatörlerin yanında özellikle son yıllarda kendi içinde özel kamera ve kayıt sistemleri olan ve embriyoların hiç inkübatör dışına çıkarmadan 24 saat gelişimlerinin takibine imkan veren dinamik embriyo kültür ve inkübasyon sistemleri de geliştirilmiştir ve bu alandaki ilerlemeler ciddi bir hızla devam etmektedir. Nihai amaç, embriyoyu laboratuvar ortamında geliştirebilmek için anne rahmindeki tüm şartları optimal şekilde sağlamaktır. Bu şartları maddeler halinde şöyle sıralamak mümkündür;

- Karbondioksit
- Oksijen
- Sıcaklık
- pH
- Işık

### **2.2.1. Karbondioksit**

In-vitro embriyo kültürü için kullanılan bikarbonat tamponlu mediumun pH'ını karbondioksit kullanarak düzenlemek mümkündür. Ayrıca, karbondioksitin pH düzenlemenin dışında, implantasyon öncesi dönemde fare embriyoları tarafından protein ve nükleikasitlere dahil edildiği de gösterilmiştir [42]. Genellikle IVF laboratuvarlarında medium içeriğindeki 25 mM bikarbonat konsantrasyonunda %5 CO<sub>2</sub> kullanılarak medium pH'ı istenilen seviyede tutulmaktadır. Gerektiğinde CO<sub>2</sub> konsantrasyonu arttırılarak/azaltarak pH seviyesini değiştirmek mümkündür ve bu durumun embriyo üzerine yararlı etkileri de görülmüştür. İnkübatör içindeki CO<sub>2</sub>



seviyesi düştüğünde orantılı olarak pH yükselir ve pH değerinin tolare edilebilen pH sınırlarını geçtiği durumlarda embriyolar üzerinde granül oluşumu ve fragmantasyon gibi olumsuz morfolojik değişiklikler görülebilmektedir. Bu nedenle optimal CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, laboratuvarında bulunan embriyo inkübasyon sistemindeki sağlanması gereken en önemli şartlardan biridir. Bundan dolayı kullanılan CO<sub>2</sub> tüplerinin sertifikaları, basınç seviyeleri mutlaka düzenli olarak kontrol edilmelidir. Ayrıca her gün inkubatorların CO<sub>2</sub> seviyeleri dışarıdan bir cihazla ölçülerek takip edilmeli ve gerektiğinde kalibrasyonları yapılarak aylık veriler şeklinde düzenli kayıt altına alınmalıdır.

### 2.2.2. Oksijen

Normal şartlarda atmosferdeki O<sub>2</sub> seviyesi %21 civarındadır, insan ve fare embriyoları atmosferik O<sub>2</sub> seviyesinde gelişimlerine devam edebilmektedirler. İn-vivo şartlarda, uterus içindeki O<sub>2</sub> seviyesinin ovidukta göre daha düşük olduğu bilinmektedir. Bu bilgiye dayanarak yapılan çalışmalarda memeli embriyolarının düşük O<sub>2</sub> konsantrasyonundaki gelişiminin daha iyi olduğu gözlenmiştir [43]. Ayrıca insan embriyoları üzerine yapılan prospektif randomize bir çalışmada kardeş oositler ayrı inkubatorlarda büyütülerek atmosferik O<sub>2</sub> seviyesi ve %5 O<sub>2</sub> seviyesindeki embriyoların blastosist gelişimleri incelenmiş ve düşük konsantrasyonda blastosist verimlinin arttığı gözlenmiştir [44].

### 2.2.3. Sıcaklık

Embriyo kültür ortamının, anne rahminde olduğu gibi 37°C' de tutulması gerekmektedir. Embriyoların oda sıcaklığı seviyesindeki düşük sıcaklıklarda tutulması embriyoların kalitelerinde düşüşe hatta gelişiminin durmasına sebep olabilmektedir. Özellikle erken dönemde embriyolar ısı dalgalanmalarından daha fazla etkilenmektedirler. Fare embriyoları ile yapılan bir çalışmada, zigotların 5 dakika oda ısısında bekletilmesi bölünme oranlarında düşüşe sebep olmuştur. Bu süre 10-15 dakikaya çıkarıldığında, bölünme oranları daha da düşmüş ve blastosist gelişim oranında ciddi gerileme gözlenmiştir [45]. Ayrıca insan oositlerinin oda ısısında bekletilmesi mitotik iğ iplikçiklerini hasara uğratabilmektedir [46]. Bundan dolayı sıcaklığa OPU, mikroenjeksiyon ve diğer manipülasyon gerektirecek

işlemlerde de dikkat etmek ve gerekli çalışma zeminlerinin ısı değerlerini takip etmek gerekmektedir.

#### **2.2.4. pH**

İn-vitro embriyo gelişimi için tasarlanmış olan kültür mediumlarının genellikle dış pH'ı kullanılan CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna bağlı olarak 7,3 ile 7,4 arasında değişebilmektedir. Fare embriyoları ile yapılan bir çalışmada, zigotlar ve embriyolar geçici bir süre ile pH'ı yüksek mediumda bekletilerek gelişimi gözlenmiştir. Sonuçta blastosist gelişim oranının düştüğü görülmüş fakat yine de gelişen blastlar gözlenmiştir [45]. Bu çalışma ile embriyoların sanılandan daha geniş bir pH aralığında bile gelişebildiği gözlenmiş fakat embriyo transferi sonrası canlılığın devamı bilinmemektedir. Daha sonraki çalışmalarda hücre içi pH'ın etkisi araştırılmış ve hücre içi pH' da ki en ufak dalgalanmalar da dahi embriyo gelişimi olumsuz etkilenmiştir. Özellikle ICSI işlemi öncesi kumulus hücrelerinden temizlenmiş oositler, kendi iyonik hemoastazlarını sağlayamazlar. Ancak kullanılan mediuma aminosit eklenerek embriyonun kendi hücre içi tamponlama kapasitesi artırılabilir ve embriyodaki hücre içi pH oynamaları azaltılabilmektedir [47]. İyi bir embriyo geliştirebilmenin yolu istenilen pH oranını sağlamaktır. Bu oranı tutturabilmek için de gerekli konsantrasyonda CO<sub>2</sub> kullanmak ve uygun sıcaklığı sağlamak çok önemlidir. Bundan dolayı, en azından her ay ve her yeni lot numaralı kültür mediumu kullanıldığında pH ölçümü yapılmasında fayda vardır.

#### **2.2.5. Işık**

Embriyo kültüründe amaç daima doğal anne rahmini taklit etmek olmalıdır. Uterus kapalı karanlık bir yapı olduğundan in-vitro kültürde mümkün olduğunca karanlıkta çalışmak verimliliği arttırmaktadır. İnsanda düşük ışık altında oosit toplanmış ve 2-4 günlük kültür edildikten sonra transfer edilerek sonuçlar izlendiğinde; blastosist gelişim oranı, gebelik oranları ve canlı doğum ağırlığının arttığı bildirilmiştir [48].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada kullanılan embriyo kültür solüsyonları ve cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılan embriyo kültür ve manipulasyon solüsyonları ile cihazlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1. Çalışmada kullanılan embriyo kültür solüsyonları ve cihazlar**

ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
Single Step Medium™ (SSM™)	Irvine Scientific	90161
HTF Medium with Gentamicin	Irvine Scientific	90126
Serum Substitute Supplement™	Irvine Scientific	99193
Hyaluronidase Solution	Irvine Scientific	90101
PVP Solution	Irvine Scientific	90123
Oil for Embryo Culture	Irvine Scientific	9305
Sperm Washing Medium	Irvine Scientific	9983
Isolate Sperm Speration Medium	Irvine Scientific	99264
Single Step Medium	Life Global	LGGG-050
Miri Benchtop Multi-room Inkubator	Esco Medikal	XQ-01
33 litrelik su ceketli inkübatör	IKS International	IVS-9000GC

#### 3.1.1. Tek Aşamalı Kültür Mediumları (SSM)

Çalışmada iki farklı firmaya ait ve ticari olarak kullanımda olan, iki farklı SSM kullanılmıştır. Her iki mediumun da pH oranları 7.28-7.32 arasında, ortam CO<sub>2</sub> konsantrasyonu %6, O<sub>2</sub> konsantrasyonu %5, nem oranı %95 ve sıcaklık 37°C’ de tutulmuştur. Her grupta ki hastalara ait embriyolar rutin olarak 48 saat ara ile yeni SSM kültür kabına aktarılmıştır.

SSM üreticisi firmalar gizlilik gereği medium içeriklerini net olarak paylaşmamaktadırlar. Her iki mediumun da içerikleri hemen hemen aynı olmasına

rağmen, içeriklerinin konsantrasyonları arasında bazı farklar olduğu firma yetkilileri ve bilimsel danışmanları tarafından ifade edilmektedir. Tablo 2. de üreticilerin halka açık olarak paylaştığı dokümanlardan ve resmi internet sitelerinden alınan bilgilere göre oluşturulmuş temel içerikler yer almaktadır.

**Tablo 2. Çalışma dahilinde karşılaştırılması yapılan ticari SSM mediumlarının bilinen içerikleri**

İçerik	Irvine Scientific	Life Global
Tuzlar	NaCl KCl CaCl <sub>2</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub>	NaCl KCl CaCl <sub>2</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub>
Tampon solüsyonu	Sodyum bikarbonat	Sodyum bikarbonat
Enerji substratları	Glukoz Piruvat Laktat	Glukoz Piruvat Laktat
Aminoasitler	12 Esansiyel Aminoasit 7 Non-esansiyel Aminoasit	9 Esansiyel Aminoasit 10 Non-esansiyel Aminoasit
Dipeptit	Alanil-glutamin	Glisil-glutamin
Antioksidant	EDTA	EDTA
pH indikatörü	Fenol Red	Fenol Red
Antibiyotik	Gentamisin	Gentamisin

Yakın bir zaman önce Morbeck ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen detaylı bir çalışmada günümüzde insan embriyolarının kültürü için kullanılan mediumların kimyasal bileşenleri analiz edilmiş, Life Global ve Irvine Scientific mediumları için Tablo 3 ve Tablo 4. deki sonuçlar elde edilmiştir [49]. Morbeck' in çalışması firma yetkililerinin verdiği bilgileri doğrulamakta iki mediumunda içeriklerinin büyük kısmının aynı olduğunu fakat konsantrasyonda farklılıklar olduğunu göstermektedir.

**Tablo 3. LifeGlobal ve Irvine Scientific firmaları tarafından üretilen SSM mediumlarının kimyasal bileşen (inorganik) analiz sonuçları**

	Global Medium	Irvine Medium
Glukoz (mM)	0,2	0,5
Sitrat (mM)	0	0,01
Laktat (mM)	4,8	5,6
Piruvat (mM)	0,2	0,17
Kalsiyum (mM)	1,9	1,9
Potasyum (mM)	0,4	0,2
Klorid (mM)	112	112
Sodyum (mM)	137	135
Magnezyum (mM)	0,2	0,8
Demir ( $\mu\text{g/L}$ )	0	4
Alüminyum	1	0
Krom ( $\mu\text{g/L}$ )	0,4	0,7
Kobalt ( $\mu\text{g/L}$ )	0,1	0,2
Manganez ( $\mu\text{g/L}$ )	0,4	0,8

**Tablo 4. Life Global ve Irvine Scientific firmaları tarafından üretilen SSM mediumlarının kimyasal bileşen (organik) analiz sonuçları**

		Global Medium	Irvine Medium
ESANSİYEL AMİNOASİTLER	Arjinin ( $\mu\text{M}$ )	328	281
	Sistein ( $\mu\text{M}$ )	52	46
	Histidin ( $\mu\text{M}$ )	111	105
	İzoleusin ( $\mu\text{M}$ )	221	202
	Leusin ( $\mu\text{M}$ )	230	214
	Lizin ( $\mu\text{M}$ )	232	223
	Metionin ( $\mu\text{M}$ )	51	53
	Fenilalanin ( $\mu\text{M}$ )	112	106
	Threonin ( $\mu\text{M}$ )	216	195
	Triptofan ( $\mu\text{M}$ )	28	26
	Tirozin ( $\mu\text{M}$ )	100	95
	Valin ( $\mu\text{M}$ )	233	215
NON ESANSİYEL A. ASİTLER	Alanin ( $\mu\text{M}$ )	65	62
	Asparajin ( $\mu\text{M}$ )	52	57
	Aspartik asit ( $\mu\text{M}$ )	55	47
	Glutamik asit ( $\mu\text{M}$ )	54	46
	Glisin ( $\mu\text{M}$ )	63	58
	Prolin ( $\mu\text{M}$ )	51	48
	Serin ( $\mu\text{M}$ )	58	55

### 3.1.2. İnkübatörler

Çalışmada klasik dolap tipi inkübatör (Resim 1) ve benchtop multi-room inkübatör (Resim 2) kullanılmıştır. İki inkübatörün de avantaj ve dezavantajları

vardır. Her hastaya ait embriyolar yarı yarıya aynı kültür mediumu kullanılarak iki farklı inkübatöre yerleştirilmiştir. İki inkübatörün de set up değerleri aynı tutularak sıcaklık 37°C, %6 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve 7.28-7.32 pH aralığı sağlanmıştır. Ayrıca her gün gaz ve sıcaklıkları ölçülerek kalite kontrol kurallarına uygun çalışılmıştır.

### 3.1.3.1. IKS Klasik Su Ceketli 33 lt. İnkübatör



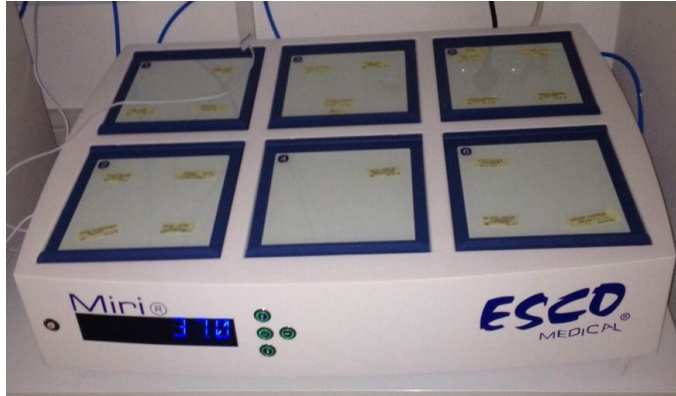
Şekil 1. IKS Klasik tip 33 litrelik inkübatör

- Bu inkübatör su ceketli sayesinde ortamda homojen ısı dağılımını sağlar ve olası elektrik kesintisi vb. durumlara karşı ortam sıcaklığını daha uzun süre muhafaza edebilmektedir.
- İç ve dış kapak olmak üzere çift kapaklıdır. İnkübatörün içi 6 bölmeye bölünmüştür. Fakat bölümler birbirinden tamamen izole değildir. Bundan dolayı her bir hasta için inkübatör kapağı açıldığında olası ortam değişiminden diğer hastalara ait embriyolarda etkilenebilmektedir.
- Klasik tip inkübatörlere göre daha küçük oluşu (33 litre), açılıp kapanmalara karşı daha hızlı ortam şartlarını toparlayabilmeyi kolaylaştırmaktadır. Fakat hacim olarak benchtop multi-room inkübatör ile karşılaştırmak mümkün değildir.
- İsteğe bağlı CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ve sıcaklık ayarlanabilir. Dışarıdan herhangi bir cihaz ile bu parametreler ölçülebilir. Ayrıca entegre xilatrix alarm

sistemi sayesinde 24 saat ortam parametreleri uzaktan takip edilebilir.

- İnkübatör alt tabanına yerleştirilmiş 2 lt kapasiteli distile su tepsi sayesinde ortam nemlendirilmektedir.

### 3.1.3.2. Esco Miri® Benchtop Multi-room İnkübatör



**Şekil 2. Miri Benchtop Multi-room inkübatör**

- Altı (6) bölmeden oluşur, her bölme birbirinden izoledir ve her bölmeye ait CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> sıcaklık sensörleri ayrı çalışmaktadır. İstenildiğinde her kısım farklı CO<sub>2</sub> veya O<sub>2</sub> değerine ayarlanabilmektedir
- Her bölüme 4 hasta yerleştirilebilir ve toplam 24 hasta kapasitesi vardır. Bir hasta ile işlem yapıldığında yalnızca açılan bölümdeki embriyolar etkilenir.
- Su ceketini bulundurmaz ve küçük hacimli olduğundan sıcaklığı 1 dakikada, gaz oranlarını 3 dakikada dengeleyebilir.
- İstenildiğinde entegre alarm sistemi bağlanabilir ve yazılımı kullanılarak 24 saat parametreler takip edilebilir.
- Hacim olarak küçük olduğundan klasik inkübatörlerdeki gibi distile su deposuna ihtiyaç yoktur ve böylelikle kontaminasyon riski düşüktür.



### **3.2. Çalışma gurubu**

İnfertilite nedeni ile kliniğimize başvurmuş OPU işlemi yapılan, kadın yaşı 37 ve altında, ikiden fazla IVF denemesi olmayan, implantasyon öncesi genetik tanı endikasyonu bulunmayan, ejakulat spermi kullanılmış ve en az 4 matür oosite sahip olan 115 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada toplam 1428 matür oosite mikroenjeksiyon yapılarak oluşan 1085 adet embriyonun gelişimi izlenmiştir.

### **3.3. IVF işlemi**

#### **3.3.1. Hastanın Hazırlanması**

Overlerin stimülasyonu, GnRH analogları yada folikül stimulan hormonlar (FSH) birlikte kullanılarak induksiyon protokolü gerçekleştirildi. Hastanın folikülleri yeterli büyüklüğe (18 mm ve üzeri) ve östrojen seviyesi istenilen seviyeye ulaştığında HCG enjeksiyonu yapılarak 35-36 saatler arasında OPU işlemi yapıldı.

#### **3.3.2. OPU İşlemi ve Oositlerin Kumulus Korona Hücrelerinden Temizlenmesi**

Transvajinal ultrasonografi eşliğinde ve genel anestezi altında tek yada çift lümenli steril iğneler kullanarak aspirasyon işlemi gerçekleştirildi. İşlem sırasında Heps tamponlu mHTF medium kullanıldı ve oositlerin zarar görmemesi için uygun sıcaklık ve şartlar sağlanarak hızlıca OPU işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonrası oositler SSM içine alınarak 2 saat beklemek üzere %6 CO<sub>2</sub> ve %5 O<sub>2</sub> içeren 37°C inkübatöre alındı. 2 saat sonunda hyaluronidaz enzimi yardımı ile mHTF içerisinde oosit kumulus disseksiyonu gerçekleştirildi ve M2 fazındaki oositler ayrılarak ICSI işlemine kadar tekrar SSM' a alındı.

#### **3.3.3. Sperm Hazırlığı**

Sperm hazırlığı için standart olarak tüm vakalara Isolate Sperm Speration Medium kullanılarak gradient yöntemi uygulandı. Gradient sonrası pellet kısmı alınarak farklı tüpde Sperm Washing Medium ile santrifüj edilerek yıkandı. Daha sonra ICSI işlemine kadar hazırlanan tüm spermler oda sıcaklığında Sperm Washing Medium içerisinde bekletildi.

### 3.3.4. Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI)

ICSI işlemi Hoffman modülasyonu olan inverted mikroskop kullanılarak 37°C ' de X400 büyütme kullanılarak yapıldı. ICSI işlemi önceden hazırlanarak 37°C ' de minimum 30 dakika bekletilmiş ICSI kabı içerisinde ve yine mikroskopun sıcak zemini üzerinde yapıldı. Ayrıca bu işlem sırasında gametlerin pH dengelerini korumak amacı ile Hepes tamponlu MHTF medium kullanıldı.

Mikroenjeksiyon işleminde morfolojik olarak normal görünümlü motil spermler seçildi. Seçilen spermler, ICSI pipeti kullanılarak PVP içerisinde spermlerin kuyruk kısmına hafifçe birkaç kez darbe yaparak immobilize edildi. Daha sonra herbir sperm hücresi oosit stoplazması içerisine enjekte edildi. Bilgi formuna işlem yapılan oosit sayıları kaliteleri ve ICSI saati not edildi. Oositler birinci çalışma için farklı SSM içeren kültür kaplarına alınarak aynı inkübatör içerisinde takip edildi. İkinci çalışma için ise; aynı kültür mediumu kullanılarak farklı tip inkübatör içerisinde takip edildi.

### 3.3.5. Fertilizasyon ve Embriyoların Değerlendirilmesi

Mikroenjeksiyon işleminden sonra birinci gün sabahı 16-18 saatlerde döllenme kontrolleri yapıldı. Döllenen oositler birgün önceden hazırlanmış kültür kaplarına aktarıldı ve takip için tekrar inkübatörlere yerleştirildi. Embriyolar transfer edilecekleri yada dondurulacakları güne kadar 4.gün hariç diğer günler kontrol edildiler. Embriyoların ilk 3 günlük gelişimleri özellikle aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilerek not edildi.

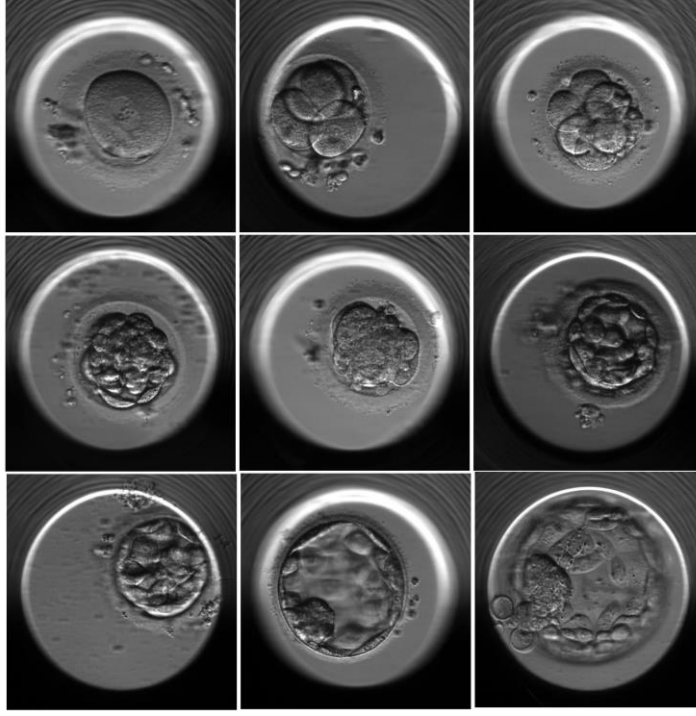
- Döllenme durumu; 16-18 saatler arasında görülen pronukleus sayıları değerlendirildi.
- Hücre sayıları; 2.gün ve 3.gün hücre sayıları değerlendirildi.
- Blastomer morfolojisi ; blastomer hacimleri birbirlerine eşit olup olmamasına göre değerlendirildi
- Multinukleasyon varlığı ;2. Ve 3.günlerde blastomerlerde ki multinukleasyon varlığı not edildi.
- Fragmantasyon oranları; fragmantasyon miktarları 0, %20 yada daha az, %20 ile %50 arası ve %50 ve üzeri olmak üzere değerlendirilerek not edildi.

- Stoplazma görünümü; Stoplazma görüntüleri parlak, normal ve koyu granüler olmak üzere not edildi.

Vakaların bir kısmı 2.ve 3. gün hastalara transfer edilirken bir kısmı blastosist transferi yapıldı. Bazı vakalar ise endometriumu uygun olmadığından veya progesteron seviyesi yüksek olduğundan transfer edilmeden bütün embriyolar donduruldu. Blastosist dönemi embriyolar sınıflandırılırken ise kavite oluşumuna göre aşağıdaki şekilde değerlendirildi.

- Erken Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından daha az olan embriyolar
- Blastosist :Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından fazla olan embriyolar
- Tam Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo hacminin tamamını kaplayan embriyolar
- Ekspanse Blastosist: Blastosel kavitesi volümü iyice artmış, çap büyüyerek zonası iyice incelmış olan embriyolar
- Hatching Blastosist: Trofoektoderm hücrelerinin bir kısmı zonayı patlatarak dışarı çıkan embriyolar
- Full Hatching Blastosist: Tamamen zonasını terkeden embriyolar

Blastosistlerin trofoektoderm ve ICM kısımları ise hücre kitlelerinin birbirine bağlanma sıklığı ve düzenliliğine göre iyiden kötüye doğru A,B,C olarak değerlendirildi. Şekil 3.te normal bir embriyonun embriyoscop cihazından çekilmiş ilk günden itibaren ki gelişmelerini görebiliriz.



**Şekil 3. Gelişmekte olan bir insan embriyosunun Embryoscope cihazından elde edilmiş görüntüleri**

### **3.3.6. Transfer İşlemi**

Embriyo transfer sayısı ve günü hastanın klinik durumuna ve embriyoların kalitesine göre belirlendi. Transfer edilecek embriyolar seçilerek ayrı bir SSM içeren kültür kabına alındı ve steril olarak hızlıca embriyo transfer kataterine çekilerek yaklaşık 20-25 mikrolitre SSM ile hastaya transfer edildi.

## 5. BULGULAR

Bu çalışma, tüp bebek laboratuvarlarında embriyo geliştirilmesi/büyütülmesi amacı ile yaygın olarak kullanılan, tek aşamalı kullanım şeklinde tasarlanmış iki farklı ticari kültür mediumunun preimplantasyon dönemi insan embriyo gelişiminde ve klinik sonuçlardaki etkilerinin ölçülmesi/karşılaştırılması amacı ile gerçekleştirilmiştir.

Karşılaştırmada, sonuçların üzerinde ve sonuçların değerlendirmesindeki olası yanlı çıkarımların önüne geçebilmek amacı ile iki farklı strateji güdülmüştür. İlk olarak adı geçen mediumların karşılaştırılması kardeş oositler üzerinde gerçekleştirilmiş ve böylelikle aynı hastaların oositleri her iki gruba da rastlantısal ve dengeli olarak dağıtılarak her iki gruptaki performansın mümkün olduğu kadar objektif gözlenmesi sağlanmaya çalışılmıştır. İkincil olarak, aynı kültür mediumu içerisinde büyütülen kardeş oositler/embriyolar dengeli ve rastlantısal olarak iki farklı inkübatör içerisinde takip edilmiş ve böylelikle inkübasyon sistemlerinin medium performanslarındaki olası etkileri de değerlendirilmiştir.

### 5.1. Irvine Scientific ve Life Global mediumları karşılaştırması

Bu aşamada tüp bebek tedavisi gören 65 hastanın kardeş yumurtaları karşılaştırılmıştır. Tanımlayıcı istatistik analiz ile hastaların ortalama yaşının  $31.6 \pm 3.3$  olduğu, elde edilen yumurta hücrelerinin ortalama sayısının hasta başına  $13.3 \pm 5.8$ , olgun yumurta hücrelerinin (M2) ortalama sayısının ise  $10.6 \pm 3.7$  olduğu görülmüştür.

Karşılaştırmaya dahil olan 51 hastada blastosist transferi yapılmış, diğer hastalara 2.gün, 3.gün veya 4.gün embriyo transferi yapılmış, yada çeşitli nedenlerden dolayı transfer yapılmadan embriyolar 2 veya 3. gün dondurulmuştur.

Tablo 5 ve Tablo 6'da her iki kültür mediumunda büyütülen kardeş oositlerin ICSI sonrası dağılımları ve embriyo gelişim performansları sayısal ve yüzdesel olarak görülmektedir.

ICSI uygulanmasından sonra yumurta hücrelerinin kullanılan medium markasına göre fertilizasyon sonuçlarına bakılmış, her iki grupta da döllenmiş yumurta hücrelerinin ortalama sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

saptanmamıştır ( $t=0,618$ ;  $p=0,539$ ). Irvine Scientific mediumu kullanılan gruptaki fertilizasyon oranı **%75,1**, Life Global marka medium kullanılan gruptaki fertilizasyon oranı ise **%78,2** olarak görülmektedir (Tablo 5).

**Tablo 5. Irvine Scientific ve Life Global mediumlarındaki ortalama oosit sayıları ve fertilizasyon istatistikleri**

ICSI uygulanan ortalama yumurta sayısı							
	N	Mean	SD	SEM	t	df	
Irvine Scientific	354 (n=65)	5,44	2,08	0,25	2,258	64	0,012
Life Global	330 (n=65)	5,07	1,67	0,20			
Fertilize olan ortalama yumurta sayısı							
	N	Mean	SD	SEM	t	df	
Irvine Scientific	266 (n=65)	4,09	1,83	0,22	0,618	64	0,539
Life Global	258 (n=65)	3,96	1,73	0,21			

**Tablo 6. Irvine Scientific ve Life Global mediumları ile büyütülen embriyoların 2. ve 3. gün gözlenen ortalama hücre sayıları**

2. Gün embriyolarında ortalama hücre sayısı						
	Mean	SD	SEM	t	df	P
Irvine Scientific	3,63	0,85	0,10	1,073	64	0,287
Life Global	3,50	0,81	0,10			
3. Gün embriyolarında ortalama hücre sayısı						
	Mean	SD	SEM	t	df	P
Irvine Scientific	7,45	1,04	0,13	1,641	64	0,106
Life Global	7,19	1,22	0,15			

Tablo 6’da, gelişiminin 2.ve 3.günü, Irvine Scientific ve Life Global mediumlarında büyütülen embriyolardaki ortalama hücre sayısı ve istatistiki değerlendirme sonuçları görülmektedir. Bu aşamadaki veriler arasında T testi uygulandıktan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 6).

Blastosist transferi yapılmış 51 hastada, gelişimin 5.ve 6. günü Irvine Scientific ve Life Global mediumlarında gelişen toplam blastosist sayıları incelenmiştir. Irvine mediumunda blastosist gelişim oranı %45,6 (100/219), Life Global mediumunda ise %60,6 (129/213) olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ( $p= 0,010$ ) (Tablo 7).

**Tablo 7. Irvine Scientific ve Life Global mediumlarında gelişen ortalama blastosist sayıları**

	Mean	SD	SEM	t	df	P
1. Gün fertilize olmuş yumurta sayıları						
Irvine Scientific	4,29	1,87	0,26	0,535	50	0,595
Life Global	4,17	1,82	0,25			
5. ve 6. Gün gelişen toplam blastosist sayıları						
Irvine Scientific	1,96	1,32	0,18	-2,683	50	0,010
Life Global	2,52	1,31	0,18			

## 5.2. IKS ve MIRI inkübatörlerinin Karşılaştırması

Çalışmanın ikinci kısmında, ilk aşamadaki sonuçların üzerindeki olası inkübasyon şartları etkisi, yine kardeş oositler kullanılarak fakat bu kez iki farklı tasarımda çalışan inkübatör sistemlerinin karşılaştırılması şeklinde değerlendirilmiştir.

Araştırma, tüp bebek tedavisi gören 50 hasta üzerinde yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistik analiz ile hastaların ortalama yaşının  $31.5\pm 3.8$  olduğu saptanmıştır. Elde edilen yumurta hücrelerinin ortalama sayısı hasta başına  $17.8\pm 7.5$ ,

olgun yumurta hücrelerinin (M2) ortalama sayısı ise  $14.8 \pm 6.7$  olarak hesaplanmıştır. Toplanan yumurta hücreleri IKS ve MIRI inkubatorlerine dengeli ve rastlantısal olarak bölünmüştür. T testi uygulanmasından sonra farklı inkubatorlere konulan yumurta hücrelerinin ortalama sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $t=-1.273$ ;  $p=0,209$ ). Çalışmada 22 hastaya blastosist transferi yapılmış, diğer hastalara 2.gün, 3.gün, 4.gün embriyo transferi yapılmış ya da embriyolar 2 veya 3. gün döneminde çeşitli nedenlerden dolayı transfer yapılmadan dondurulmuştur.

ICSI uygulanmasından sonra yumurta hücrelerinin inkubator tipine göre döllenesine bakılarak döllenen yumurta hücrelerinin ortalama sayısında inkubator tipine bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $t=-1.376$ ;  $p=0.175$ ). IKS inkubatoründe döllene başarıları **%74.6** (273/366), MIRI inkubatoründe ise **%77.0** (288/374) olarak hesaplanmıştır (Tablo 8).

**Tablo 8. Kullanılan inkubator tipine göre embriyolojik gelişim değerlerinin karşılaştırılması**

	Mean	N	SD	SEM	t	df	P
ICSI uygulanan ortalama yumurta sayısı							
IKS	7,32	366 (n=50)	3,38	0,47	-	49	0,209
MIRI	7,48	374 (n=50)	3,45	0,48			
Fertilize olan ortalama yumurta sayısı							
IKS	5,46	273 (n=50)	2,88	0,40	-	49	0,175
MIRI	5,76	288 (n=50)	3,21	0,45			

Gelişiminin 2. ve 3.günü, IKS ve MIRI inkubatorlerinde bulunan embriyolarda ki ortalama hücre sayısı hesaplanmış ve T testi uygulandıktan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 9).



**Tablo 9. IKS ve MIRI inkübatörlerinde büyütülen embriyoların 2. ve 3. gün ortalama hücre sayıları**

	Mean	SD	SEM	t	df	P
2. Gün embriyolarında ortalama hücre sayısı						
IKS	3.71	0.84	0.11	-1,375	49	0,175
MIRI	3.87	0.74	0.10			
3. Gün embriyolarında ortalama hücre sayısı						
IKS	7.14	1.01	0.14	-0.526	49	0.601
MIRI	7.22	1.11	0.15			

Blastosist transferi yapılmış 22 hastada, gelişimin 5.ve 6. günü IKS ve MIRI inkubatorlerinde gelişen toplam blastosist sayıları incelenmiştir. IKS inkubatoründe blastosist gelişim oranı %40,2 (45/112) , MIRI inkubatoründe %35,0 (43/123) olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 10).

**Tablo 10. IKS ve MIRI inkübatörlerinde büyütülen embriyoların 5. gün gelişim oranları**

	Mean	SD	SEM	t	df	P
1. Gün fertilize olmuş yumurta sayıları						
IKS	5.09	2.40	0.51	-1.56	21	0.134
MIRI	5.59	2.44	0.52			
5. ve 6. Gün gelişen toplam blastosist sayıları						
IKS	2.45	1.84	0.39	1.254	21	0.221
MIRI	1.95	1.73	0.36			

## 6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Yardımcı üreme teknikleri laboratuvarında başarılı bir uygulama için gerekli olan en önemli bileşenlerden biri, in vitro şartlarda üretilen embriyoların doğal ortamlarına mümkün olan en yakın şartları sağlayabilme özelliğine haiz bir embryo kültür mediumu seçimi/kullanımıdır. Bu amaçla dizayn edilmiş bir embriyo kültür mediumunun temel görevleri, gamet hücrelerinin uygun şartlarda birleşimi ve fertilizasyonunun sağlanması, rahme tutma potansiyeli yüksek embriyoların gelişiminin desteklenmesi ve in vitro şartlarda kültür sırasında gamet ve embriyoların olası dış etkenlerden mümkün olduğunca korunmasının sağlanmasıdır [50].

1980’li yılların sonlarına kadar embriyologlar embriyo kültür mediumlarını günlük olarak laboratuvarında kendileri hazırlamak zorunda iken, günümüzde pazarda 8’den fazla ticari firma farklı içeriklerde kullanıma hazır embriyo kültür mediumu üretmekte ve satmaktadır. Farklı konseptte ve içerikte üretilmiş olan bu mediumların tümü inorganik tuzlar, enerji kaynağı moleküller, serum katkıları, aminoasitler, tampon solüsyonları, antibiyotikler, vitaminler, büyüme faktörleri, nukleotidler ve diğer nadir bulunan elementler ve ajanlar (nükleaz inhibitörleri vb.) içermektedir. Bu ürünler yüksek güvenilirli sistemlerde ve standartlarda üretilmiş olup, klinik kullanımda yüksek başarı oranları elde etme amacı ile kullanıcıların hizmetine sunulmaktadır. Bununla birlikte formülasyonları en temel bileşenlerinde bile farklılık göstermekte ve bu konuda uluslararası bir konsensus bulunmamaktadır [51].

Yakın bir süre önce, embriyo kültüründe kullanım amacı ile üretilen bu ürünlerin arasından kullanım etkinliği en yüksek olan ürünün tespiti amacı ile geniş kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmesine rağmen, elde edilen sonuçlar halen bu konuda net bir sonuç sunabilmek için yetersizdir [52]. Mantikou ve arkadaşları gerçekleştirdikleri sistematik derlemede mevcut 22 prospektif randomize çalışmanın sonuçlarını analiz etmeye çalışmışlar, fakat adı geçen çalışmalardaki dizayn ve temel çıktılar konusundaki mevcut ciddi değişkenlikler nedeni ile bir meta analiz değerlendirmesi gerçekleştirememişlerdir [53]. Bu yetersizlikte rol oynayan başlıca nedenler sırası ile çalışmalara dahil edilen olgu sayısının azlığı, çalışmaların tasarım hataları, gerekli güç analizinin yapılmamış olması, ana ve ara ölçüm kriterlerindeki farklılıklar vb. gelmektedir [54]. Pek çok araştırmacı embriyo kültür mediumları ve

içeriklerinin klinik başarı oranlarının yanında implantasyon öncesi dönemdeki embriyo gelişimi ve kalitesi üzerinde ve hatta doğan yavrular üzerinde de anlamlı farklılıklar yaratabildiklerini belirtmişlerdir [55], [56], [57].

İnsan embriyo kültür mediumlarının laboratuvar ve klinik etkinliklerinin karşılaştırılması amacı ile günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmaların çoğu, mevcut farklı felsefelerle göre (“içeriği değişken ardışık medium” ve “basit optimizasyon”) üretilmiş olan ardışık veya tek aşamalı kültür mediumlarının, aynı felsefe ile üretilmiş veya farklı felsefe ile üretilmiş ürünler bazında performanslarının ölçümü amacıyla gerçekleştirilmiştir [58], [59], [60]. Çalışmalar içerisinde bazı embriyo gelişim parametrelerine göre farklılıklar bulunmuş olsa da, genel olarak gebelik oranları benzer bulunmuştur. Bu grup çalışma içerisinde dikkat çekici bir nokta, tek aşamalı kültür mediumları ile gerçekleştirilen karşılaştırmalarda bu mediumlar ile büyütülen embriyoların özellikle ileri embriyo kültürü sırasında ardışık embriyo kültür mediumlarına kıyasla daha yüksek sayıda blastosist oluşturduğudur [61], [62].

Sepulveda ve arkadaşları ardışık (ECM/Multiblast; Irvine Scientific) ve tek aşamalı (Life Global) kültür mediumlarını diğer çalışmalardan farklı olarak donör oositler ile elde edilmiş embriyolar üzerinde karşılaştırmışlardır. Fertilizasyon oranı her iki grupta da benzer iken erken kliyaj ve blastosist oluşum oranları tek aşamalı medium lehine anlamlı olarak farklı bulunmuştur [63].

Bahsi geçen güncel çalışmalar dışında, aynı felsefe kapsamında üretilen tek aşamalı mediumların karşılaştırıldığı çalışma sayısı son derece sınırlıdır. Her ne kadar içerik ve uygulama mantığı birbirine benziyor olsa da, içerik ve bileşenlerin konsantrasyonu bakımından mevcut olabilecek bazı farklılıklar laboratuvar performansları ve embriyo gelişimi üzerine etkileri gerekse klinik açıdan sağlanabilecek başarı oranları arasında olumlu veya olumsuz farklılıklar yaratabilir.

Bu çalışmada, mevcut literatür bilgisine katkı sağlayabilmesi ve klinik kullanımda daha yüksek başarı oranlarının elde edilebilmesi amacı ile, aynı felsefe ile üretilmiş tek aşamalı iki farklı ticari kültür mediumu (SSM – Irvine Scientific ve Global – Life Global) kardeş yumurtalar üzerinde değerlendirilmiş ve

karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma, tüp bebek tedavisi gören ve gebelik elde edilmesi şansı yüksek olan hasta grubunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında 65 hastaya ait 864 kardeş oosit bahsi geçen iki farklı tek aşamalı kültür mediumu içerisinde büyütülerek her bir mediumun embriyo gelişimi üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, fertilizasyon ve erken klivaj dönemi embriyo kinetiği ve kalitesi ile ilgili incelenen parametrelerde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte blastosist aşamasına kadar gelişimi takip edilen embriyolar arasında SSM mediumu ile karşılaştırıldığında Global mediumu ile büyütülen embriyoların blastosist aşamasına ulaşma oranı anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (%45,6 ve %60,6; p=0,01).

Çağdaş bir tüp bebek laboratuvarında başarılı sonuçlar elde edebilmek için etkin bir embriyo kültür mediumunun seçilmesinin yanında, kültür sisteminin pH değeri, ısı ve kültür sistemini çevreleyen hava kalitesi de son derece önemlidir [64]. Adı geçen bu parametrelerin tümü, embriyo kültürünün gerçekleştirildiği inkübatör sistemi ile doğrudan ilişkili olduğundan, çalışmanın ikinci aşamasında, iki farklı tek aşamalı kültür mediumu karşılaştırması sırasında gözlenen blastosist oluşum oranları arasındaki bu farklılığın, laboratuvar bünyesinde kullanılan inkübasyon sistemleri ile olası ilişkisi, farklı konseptte çalışan inkübatör sistemleri (standart masa üstü dolap tipi inkübatör ve yatay tezgah üstü inkübatör) kullanılarak incelenmiştir. İlk aşamada gerçekleştirilen kültür mediumu karşılaştırılması ile eş zamanlı olarak, 50 hastaya ait 738 oosite mikroenjeksiyon işlemi uygulanmış ve kardeş oositlerin IKS International firması tarafından üretilen 33 litrelik standart inkübatörlerde ve ESCO International firması tarafından üretilen ve her biri 0,9 litrelik 6 farklı odacıktan oluşan ESCO Miri marka inkübatörlerde büyütülmüştür. Böylelikle aynı hasta grubunda farklı tip inkübatörlerin embriyo gelişim performansları mümkün olduğu kadar tarafsız olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu karşılaştırma sonrasında farklı inkübasyon sistemlerinde büyütülen embriyolarda temel embriyo gelişim parametreleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmamızın ikinci kısmında elde edilen sonuçlar, ilk kısımda elde edilen benzerlikler ve farklılıkların, mevcut inkübatör sistemlerine göre değişiklik gösterme olasılığının belirlenebilmesi açısından önem taşımaktadır. Karşılaştırma sonucu her

iki inkübatör grubunda da embryo gelişim parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması, embriyoların farklı mediumlarda büyütülmelerinden kaynaklanabilecek farklı kinetik özelliklerinin kullanılan inkübatör sistemlerinden etkilenmediğini göstermektedir. Zira günümüzde her iki konseptte de üretilmiş ve halihazırda dünya genelinde pek çok laboratuarda kullanılmakta olan pek çok ticari inkübatör mevcut olmasına rağmen, mevcut literatür bu farklı konsept ve markalardaki cihazların etkinliklerinin karşılaştırılabilmesi bakımından son derece yetersizdir [65], [66] [67]. Referans olarak alınabilecek az sayıda çalışmadaki teknik ve tasarım eksiklikleri, karşılaştırmada kullanılan cihazların uygunsuzluğu, yetersiz sayıda hasta ve embriyonun çalışmaya dahil edilmemesi gibi nedenler, inkübatör sistemleri arasındaki benzerlik veya farklılıkların objektif olarak değerlendirilebilmesine olanak vermemektedir [68].

Standart inkübatörlere kıyasla daha yakın bir dönemde geliştirilerek ticari kullanıma giren tezgah üstü inkübatörler, küçük inkübasyon odacıklarına sahip olmaları nedeni ile düşük gaz tüketimi oluşturmaları, hızlı ortam dengeleme (equilibrium) imkanı ve ayrı odacıklar olarak tasarlandıklarından dolayı tam kapasite çalıştırıldıklarında standart inkübatörlere kıyasla daha az kapak açma/kapama ihtiyacı ve dolayısı ile daha az embriyonik stres oluşturma imkanı gibi olanaklar nedeni ile her gün artan sayıda laboratuarda kullanım imkanı bulmaktadır. Adı geçen özellikler/avantajlar, embriyo gelişimi ve dolayısıyla klinik sonuçlara olumlu etki yapmaları beklenmesine rağmen, çalışmamızda karşılaştırılan sınırlı sayıda kardeş yumurta/embriyoda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmamıştır. Bu durum, çalışmaya dahil edilmiş olan hasta ve embriyo sayısının kısıtlı olması ile ve özellikle tüm embriyo kültür aşamalarında embriyo kültürünün mineral yağ altında gerçekleştirilmiş olması ile açıklanabilir. Zira literatürde mineral yağ kullanımının veya yokluğunun kültür mediumlarının inkübatör içerisindeki inkübasyon süresince osmalite dengesinde ciddi farklılıklar oluşturduğunu, bu farklılıkların da embriyo gelişim karşılaştırma çalışmalarında anlamlı derecede taraflı bir değerlendirme yapılma riskini de beraberinde getirdiği sıklıkla bildirilmektedir [69] [64].

Sonuç olarak, çalışmamız dahilinde gerçekleştirilen karşılaştırmalarda:

- Klinik kullanımda olan ticari tek aşamalı mediumların (SSM ve Global) her ikisinin de erken klivaj döneminde güncel insan embriyo kültürü ve klinik tedavi süresince etkin olarak kullanılabilmesi,
- Bununla birlikte Global marka tek aşamalı mediumun özelliklerinin, ileri aşama embriyo kültürü (Blastosist kültürü/transferi) sırasında istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi yüksek olacak şekilde daha fazla sayıda blastosist aşaması embriyonun gelişimini desteklemekte olduğu,
- Yüksek sayıda blastosist elde edilmesinin getirebileceği bir avantaj olarak hastalarda embriyo transfer sonrası arta kalan embriyo dondurma ve saklama imkanları,  
Mevcut literatür verilerinin ve bu çalışmadaki verilerimizin etkinliğin klinik olarak ta onaylanması için daha fazla sayıda hastaya ve incelemeye gerek olduğu,
- Tek aşamalı kültür mediumları karşılaştırmamız sırasında kullanılan farklı inkübatör ve inkübasyon sistemlerinin, çalışma verilerinin toplanması, değerlendirilmesi ve incelenmesi aşamalarında karşılaştırma süresince ek ve görünmeyen bir olumsuzluk oluşturmadığı saptanmıştır.

## 7. ETİK KURUL KARARI

### YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİK KURULU

Sayı: BAEK 2014/2/6

03.04.2014

- İlgi:** a) 10 Şubat 2014 tarihli dilekçeniz  
b) 02 Nisan 2014 tarihli raportör yazısı

Sayın Cihan Göktaş,

**“Farklı kültür ortamlarının embriyo gelişimi üzerindeki etkileri”** konulu çalışmanız, 14.02.2014 tarihli başvurunuz kapsamında, Kurulumuzca incelenmiş olup etik açıdan onaylanmıştır.

Araştırmanız süresince çalışmanızda özellikle gereç ve yöntemler konusu ile ilgili olarak değişiklikler söz konusu olursa tekrar değerlendirilmesi önerilir.

NOT: İşbu belge Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurul Yönergesi temelinde kaleme alınmıştır.



Prof. Dr. Ersi Abacı Kalfoglu  
Başkan

## 8.KAYNAKLAR

- [1] Gardner, D.K., (1998). "Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture", *Theriogenology*, 49: 83-102.
- [2] Summers, M.C. ve Biggers, J.D., (2003). "Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues", *Hum Reprod Update*, 9: 557-582.
- [3] Lane, M. Maybach, J.M. Hooper, K. Hasler, J.F. ve Gardner, D.K., (2003). "Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan", *Mol Reprod Dev*, 64: 70-78.
- [4] Ringer, S., (1882). "Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle", *J Physiol*, 3: 380-393.
- [5] Locke, F.S. ve Rosenheim, O., (1907). "Contributions to the physiology of the isolated heart: The consumption of dextrose by mammalian cardiac muscle", *J Physiol*, 36: 205-220.
- [6] Alexandre, H., (2001). "A history of mammalian embryological research", *Int J Dev Biol*, 45: 457-467.
- [7] Whitten, W.K., (1956). "Culture of tubal mouse ova", *Nature*, 177: 96.
- [8] Mc, L.A. ve Biggers, J.D., (1958). "Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early as early embryos", *Nature*, 182: 877-878.
- [9] Quinn, P. Kerin, J.F. ve Warnes, G.M., (1985). "Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid", *Fertil Steril*, 44: 493-498.
- [10] Gardner, D.K., (2000). "Blastocyst culture: toward single embryo transfers", *Hum Fertil (Camb)*, 3: 229-237.
- [11] Barnes, F.L. Crombie, A. Gardner, D.K. Kausche, A. Lacham-Kaplan, O. Suikkari, A.M. Tiglias, J. Wood, C. ve Trounson, A.O., (1995). "Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes,



- intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching", *Hum Reprod*, 10: 3243-3247.
- [12] Gardner, D.K. ve Lane, M., (1998). "Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media", *Hum Reprod*, 13 Suppl 3: 148-159; discussion 160.
- [13] Ciray, H.N. Aksoy, T. Goktas, C. Ozturk, B. ve Bahceci, M., (2012). "Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study", *J Assist Reprod Genet*, 29: 891-900.
- [14] Whittingham, D.G., (1971). "Culture of mouse ova", *J Reprod Fertil Suppl*, 14: 7-21.
- [15] Wales, R.G., (1973). "Biochemistry of the developing embryo", *J Reprod Fertil Suppl*, 18: 117-125.
- [16] Roblero, L.S. Guadarrama, A. Ortiz, M.E. Fernandez, E. ve Zegers-Hochschild, F., (1990). "High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa", *Fertil Steril*, 54: 328-332.
- [17] Gardner, D.K. ve Sakkas, D., (1993). "Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition", *Hum Reprod*, 8: 288-295.
- [18] Wiley, L.M. Yamami, S. ve Van Muyden, D., (1986). "Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro", *Fertil Steril*, 45: 111-119.
- [19] Lawitts, J.A. ve Biggers, J.D., (1992). "Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media", *Mol Reprod Dev*, 31: 189-194.
- [20] Biggers, J.D. Lawitts, J.A. ve Lechene, C.P., (1993). "The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro", *Mol Reprod Dev*, 34: 380-390.
- [21] Ho, Y. Wigglesworth, K. Eppig, J.J. ve Schultz, R.M., (1995). "Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression", *Mol Reprod Dev*, 41: 232-238.

- [22] Anbari, K. ve Schultz, R.M., (1993). "Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos in vitro", *Mol Reprod Dev*, 35: 24-28.
- [23] Hardy, K. Hooper, M.A. Handyside, A.H. Rutherford, A.J. Winston, R.M. ve Leese, H.J., (1989). "Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos", *Hum Reprod*, 4: 188-191.
- [24] Gott, A.L. Hardy, K. Winston, R.M. ve Leese, H.J., (1990). "Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos", *Hum Reprod*, 5: 104-108.
- [25] Rieger, D. McGowan, L.T. Cox, S.F. Pugh, P.A. ve Thompson, J.G., (2002). "Effect of 2,4-dinitrophenol on the energy metabolism of cattle embryos produced by in vitro fertilization and culture", *Reprod Fertil Dev*, 14: 339-343.
- [26] Lane, M. ve Gardner, D.K., (2000). "Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo", *Biol Reprod*, 62: 16-22.
- [27] Edwards, L.J. Williams, D.A. ve Gardner, D.K., (1998). "Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids", *Mol Reprod Dev*, 50: 434-442.
- [28] Gardner, D.K. ve Lane, M., (1993). "Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture", *Biol Reprod*, 48: 377-385.
- [29] Eagle, H., (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures", *Science*, 130: 432-437.
- [30] Lane, M. ve Gardner, D.K., (1994). "Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions", *J Reprod Fertil*, 102: 305-312.
- [31] Gardner, D.K. ve Lane, M., (2014). "Mammalian preimplantation embryo culture", *Methods Mol Biol*, 1092: 167-182.
- [32] Lane, M. ve Gardner, D.K., (2003). "Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and

- subsequently alters fetal development in the mouse", *Biol Reprod*, 69: 1109-1117.
- [33] Zander, D.L. Thompson, J.G. ve Lane, M., (2006). "Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages", *Biol Reprod*, 74: 288-294.
- [34] Kane, M.T., (1988). "The effects of water-soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts in vitro", *J Exp Zool*, 245: 220-223.
- [35] Quinn, P., (1995). "Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate", *J Assist Reprod Genet*, 12: 97-105.
- [36] Gardner, D.K. ve Lane, M., (1996). "Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters", *Hum Reprod*, 11: 2703-2712.
- [37] Magli, M.C. Gianaroli, L. Fiorentino, A. Ferraretti, A.P. Fortini, D. ve Panzella, S., (1996). "Improved cleavage rate of human embryos cultured in antibiotic-free medium", *Hum Reprod*, 11: 1520-1524.
- [38] Thompson, J.G. Gardner, D.K. Pugh, P.A. McMillan, W.H. ve Tervit, H.R., (1995). "Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos", *Biol Reprod*, 53: 1385-1391.
- [39] Del Collado, M. Saraiva, N.Z. Lopes, F.L. Gaspar, R.C. Padilha, L.C. Costa, R.R. Rossi, G.F. Vantini, R. ve Garcia, J.M., (2015). "Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos", *Reprod Fertil Dev*.
- [40] Martin, K.L. Barlow, D.H. ve Sargent, I.L., (1998). "Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium", *Hum Reprod*, 13: 1645-1652.
- [41] Lighten, A.D. Moore, G.E. Winston, R.M. ve Hardy, K., (1998). "Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture", *Hum Reprod*, 13: 3144-3150.

- [42] Graves, C.N. ve Biggers, J.D., (1970). "Carbon dioxide fixation by mouse embryos prior to implantation", *Science*, 167: 1506-1508.
- [43] Thompson, J.G. Simpson, A.C. Pugh, P.A. Donnelly, P.E. ve Tervit, H.R., (1990). "Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos", *J Reprod Fertil*, 89: 573-578.
- [44] Ciray, H.N. Aksoy, T. Yaramanci, K. Karayaka, I. ve Bahceci, M., (2009). "In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes", *Fertil Steril*, 91: 1459-1461.
- [45] Scott, L.F. Sundaram, S.G. ve Smith, S., (1993). "The relevance and use of mouse embryo bioassays for quality control in an assisted reproductive technology program", *Fertil Steril*, 60: 559-568.
- [46] Pickering, S.J. Braude, P.R. Johnson, M.H. Cant, A. ve Currie, J., (1990). "Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte", *Fertil Steril*, 54: 102-108.
- [47] Edwards, L.J. Williams, D.A. ve Gardner, D.K., (1998). "Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH", *Hum Reprod*, 13: 3441-3448.
- [48] Noda, Y. Goto, Y. Umaoka, Y. Shiotani, M. Nakayama, T. ve Mori, T., (1994). "Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination", *Fertil Steril*, 62: 1022-1027.
- [49] Morbeck, D.E. Krisher, R.L. Herrick, J.R. Baumann, N.A. Matern, D. ve Moyer, T., (2014). "Composition of commercial media used for human embryo culture", *Fertil Steril*, 102: 759-766 e759.
- [50] Chronopoulou, E. ve Harper, J.C., (2015). "IVF culture media: past, present and future", *Hum Reprod Update*, 21: 39-55.
- [51] Biggers, J.D., (2000). "Ethical issues and the commercialization of embryo culture media", *Reprod Biomed Online*, 1: 74-76.
- [52] Youssef Mohamed, A.F.M. van Wely, M. Al-Inany Hesham, G. Van der Veen, F. ve Repping, S., (2009). "Culture media for human preimplantation embryos in assisted reproductive technology cycles", *Journal*.

- [53] Mantikou, E. Youssef, M.A. van Wely, M. van der Veen, F. Al-Inany, H.G. Repping, S. ve Mastenbroek, S., (2013). "Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review", *Hum Reprod Update*, 19: 210-220.
- [54] Bolton, V.N. Cutting, R. Clarke, H. ve Brison, D.R., (2014). "ACE consensus meeting report: culture systems", *Hum Fertil (Camb)*, 17: 239-251.
- [55] Pool, T.B., (2004). "Development of culture media for human assisted reproductive technology", *Fertil Steril*, 81: 287-289.
- [56] Lane, M. ve Gardner, D.K., (2007). "Embryo culture medium: which is the best?", *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 21: 83-100.
- [57] Schwarzer, C. Esteves, T.C. Arauzo-Bravo, M.J. Le Gac, S. Nordhoff, V. Schlatt, S. ve Boiani, M., (2012). "ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses", *Hum Reprod*, 27: 2627-2640.
- [58] Aoki, V.W. Wilcox, A.L. Peterson, C.M. Parker-Jones, K. Hatasaka, H.H. Gibson, M. Huang, I. ve Carrell, D.T., (2005). "Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture", *Reprod Biomed Online*, 10: 600-606.
- [59] Xella, S. Marsella, T. Tagliasacchi, D. Giulini, S. La Marca, A. Tirelli, A. ve Volpe, A., (2010). "Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium", *Fertil Steril*, 93: 1859-1863.
- [60] Van Langendonck, A. Demylle, D. Wyns, C. Nisolle, M. ve Donnez, J., (2001). "Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study", *Fertil Steril*, 76: 1023-1031.
- [61] Reed, M.L. Hamic, A. Thompson, D.J. ve Caperton, C.L., (2009). "Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study", *Fertil Steril*, 92: 1783-1786.

- [62] Paternot, G. Debrock, S. D'Hooghe, T.M. ve Spiessens, C., (2010). "Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study", *Reprod Biol Endocrinol*, 8: 83.
- [63] Sepulveda, S. Garcia, J. Arriaga, E. Diaz, J. Noriega-Portella, L. ve Noriega-Hoces, L., (2009). "In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system", *Fertil Steril*, 91: 1765-1770.
- [64] Wale, P.L. ve Gardner, D.K., (2015). "The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction", *Hum Reprod Update*.
- [65] Lee, M. Grazi, R. ve Seifer, D., (2010). "Incorporation of the Cook K-Minc incubator and media system into the IVF lab: the future of IVF", *J. Clin. Embryol*, 13: 21-32.
- [66] Fujiwara, M. Takahashi, K. Izuno, M. Duan, Y.R. Kazono, M. Kimura, F. ve Noda, Y., (2007). "Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator", *J Assist Reprod Genet*, 24: 5-9.
- [67] Cooke, S. Tyler, J.P. ve Driscoll, G., (2002). "Objective assessments of temperature maintenance using in vitro culture techniques", *J Assist Reprod Genet*, 19: 368-375.
- [68] Swain, J.E., (2014). "Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators", *Reprod Biomed Online*, 28: 535-547.
- [69] Martinez, C.A. Nohalez, A. Cuello, C. Vazquez, J.M. Roca, J. Martinez, E.A. ve Gil, M.A., (2015). "The use of mineral oil during in vitro maturation, fertilization, and embryo culture does not impair the developmental competence of pig oocytes", *Theriogenology*, 83: 693-702.