T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜP BEBEK TEDAVİSİNDE DİNAMİK GÖRÜNTÜLEME SİSTEMLERİNİN GEBELİK BAŞARISINA ETKİSİ

Mehmet Şükrü UZMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
(TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

KONYA- 2015

Önsöz

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecinde destek ve ilgisini esirgemeyen hocam, danışmanım ve Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a, istatistik konusunda yardımcı olan sayın Asena İrem AKIN'a, tezime konu olan vakaların teminine yardım eden sayın Dr. Fuat ALİ, Dr. Dilek İNCESU ve Dr. Ali Sami GÜRBÜZ'e, çalışmam sırasında maddi manevi her şekilde yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım Embr. Seda Ebru KARGI ve Embr. Melek KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında yardım, ilgi ve sabırlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma ve her zaman yanımda hissettiğim eşime ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER ve KISALTMALAR iv

1.GİRİŞ

1.1. IVF'e Genel Bakış 1

1.1.1. IVF Tarihçesi 2

1.2. Semenin Genel Özellikleri 5

1.2.1. Yetişkinlerde Spermatogenezis 5

1.2.2. Spermiogenezis 6

1.2.3. Spermatozoa 7

1.2.4. Sperm Morfolojisi 8

1.3. Oositin Genel Özellikleri 9

1.3.1. Oogenezis 9

1.3.2. Foliküler Gelişim 9

1.3.3. Ovülasyon 10

1.3.4. Nüklear ve Sitoplazma Olgunlaşması 10

1.3.5. Oositin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi 11

1.4. İnsan Embriyonal Gelişiminin Değerlendirilmesi 12

1.4.1. Embriyonal Gelişim 12

1.4.2. Erken Embriyonal Gelişim 12

1.5. Tüp Bebek Laboratuvarında İnkübatörler 16

1.5.1. Standart İnkübatörler ve Dinamik Görüntüleme Sistemine Sahip İnkübatörler 16

1.5.2. Dinamik Görüntüleme Sistemine Sahip İnkübatörlerin Avantajları 19

2.GEREÇ ve YÖNTEM 20

2.1. Spermiyogram 20

2.1.1 Semen Örneğinin Alınması 20

2.1.2. Örneğin İncelenmesi 21

2.2. Oosit Toplanması 21

2.3. Mikroenjeksiyon 22

2.4. Kültürasyon 22

2.5. İstatistik 24
3. BULGULAR 25
3.1. Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi 25
3.2 İstatistik Değerlendirmesi 27
4. TARTIŞMA 29
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 32
6. KAYNAKLAR 33
7. EKLER 36
8. ÖZGEÇMİŞ 37

SİMGELER ve KISALTMALAR

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

GIFT: Gamete Intra Fallopian Transfer

hCG: Human Choronic Gonadotropin

PGD: Preimplantasyon Genetik Tanı

ICSI: Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

SGK: Sosyal Güvenlik Kurumu

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

LH: Lüteinleştirici Hormon

OAF: Oosit Aktive Edici Faktör

Sİ: Standart İnkübatör

DGS: Dinamik Görüntüleme Sistemine Sahip İnkübatör

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tüp Bebek Tedavisinde Dinamik Görüntüleme Sistemlerinin Gebelik Başarısına Etkisi

Mehmet Şükrü Uzman
Histoloji ve Embriyoloji (TIP) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA – 2015

Çalışmamızda 20-30 yaş aralığındaki 60 hasta, kullanılan inkübatör sistemlerinin başarısı açısından değerlendirilecektir. Örnek grubunun yarısı standart inkübatör kullanılan hastalardan diğer yarısı da dinamik görüntüleme sistemine sahip inkübatör kullanılan hastalardan seçilmiştir. Çiftlerden bayanlar 20-30 yaş aralığında ve normal over rezervine sahip ve oosit toplama işlemi sonrası en az 6 olgun oosit elde edilen bayanlar ve sperm parametreleri açısından 2010 WHO değerlerini karşılayan erkekler çalışmaya dahil edilmiştir.

Embriyo transferini takiben 12. gün kanda yapılan gebelik testine göre kimyasal gebelik değerlendirilmiştir. Gebelik testinin pozitif olduğu hastalarda gebelik testinden 20 gün sonra yapılan ultrason muayenesi sonucuna göre de klinik gebelikler değerlendirilmiştir.
Pearson Ki-kare testi ile yapılan istatistiki değerlendirme sonucu fertilize oosit Sİ için %83 DGS için %75 (p: 0,024) bulunmuştur. Kimyasal gebelik için Sİ %57, DGS için %73 (p: 0,018) ve klinik gebelik Sİ için %40, DGS için %63 (p: 0,022) bulunmuştur.

Embriyo kültürü için DGS kullanılması gebelik oranlarını anlamlı olarak artırmıştır.

Anahtar Sözcükler: Dinamik görüntüleme; İnkübatör; Gebelik; Tüp bebek; Embriyo transferi.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUE

The Effect of Time-Lapse Monitoring Systems on Success Rates in Ivf Treatment

Mehmet Şükrü Uzman
Department of Histology and Embryology (Medical)

MASTER THESIS / KONYA 2015

In this study, the success rate of IVF treatment in accordance with the Standard Incubator and Time-Lapse Monitoring Incubator has been assessed.

Fort his study, of the couples, females ages between 20-30, normoresponder and has at least 6 mature oocyte after oocyte pick up procedure and male are appropriate for 2010 WHO values were selected.

On the day 12. after embryo transfer, chemical pregnancy was evaluated in blood sample. On the other hand, clinical pregneancy was checked 20 days after the blood test, by ultrasound examination.

Statistic analysis done by Pearson Chi-square test. Comparing fertilizied oocyte for SI is %83, for TMS %75 (p: 0,024), chemical pregnancy rates for SI is %57, for TMS is %73 (p: 0,018) and clinical pregnancy rates for SI is %40, for TMS %63 (p: 0,022).

Using TMS for embryo culture gave a significant effect to the pregnancy rates.

Key Words: Time-lapse; Incubator; Pregnancy; Ivf; Embryo transfer.

1.GİRİŞ

İn Vitro Fertilizasyon (IVF) veya diğer adıyla "Tüp Bebek" terimi laboratuvar ortamında yumurtanın spermle bir araya getirilerekdöllenmesini ifade eder.

IVF, Latince kökenli 'İn Vitro Fertilizasyon' kelimelerinin baş harfleri kullanılarak elde edilen bir kısaltmadır. Burada in vitro 'dış ortamda yapılan', fertilizasyon ise 'döllenme' anlamına gelmektedir. Fertilizasyon, sperm ve olgun yumurta hücrelerinin birleşmesidir.

1.1. IVF'e Genel Bakış

Dünyada IVF tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların başladığı dönemde, üreme fizyolojisi ve endokrinolojisi de çeşitli araştırmalara konu olmuş ve deneysel çalışmaların sonuçlarının yorumlanmasıyla çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Tarihsel sürece bakıldığında, bu çalışmaların geçmişi 1900'lü yılların başlarına kadar gitmektedir. Bugün halen kullanılmakta olan tekniklerin geliştirilmesi ise ilk çalışmaların başlamasından itibaren yaklaşık bir asırlık sürece yayılmakla beraber en önemli gelişmeler son 15 yıllık dönemde gerçekleşmiştir (Delilbaşı 2008).

Üreme endokrinolojisinde ulaşılan bilgilerin öncülüğünde, infertilite tedavisi sadece ovulasyonun sağlanması ile sınırlı kalmışken (Lunenfeld 1963),1978'den itibaren yaygınlaşarak kullanılan IVF teknikleri, ovulasyon dışındaki infertilite nedenlerininde birçoğuna çare olabilmiştir (Steptoe ve Edwards 1978).

1.1.1.IVF Tarihçesi

Memeli oositlerinin in vitro ortamda fertilize olabilirliğini araştıran ilk çalışmaların 19. yüzyılın sonlarına rastladığı görülmektedir. Bu çalışmalarda deniz dikeni ve denizyıldızı oositlerinin fertilize olabildikleri gösterilmiştir. 1880'de

Schank in-vitro fertilizasyon çalışmalarına tavşan ve kobay oositleriyle de devam etmişse de başarılı olamamıştır(Alberda ve ark 1993).

1890'da Heape, Fallop tüplerinden elde edilen tavşan embriyolarının diğer tavşanlara transfer edilmesinin ardından sağlıklı yavruların doğabileceğini göstermiştir. Bu gün için çok önemli olan bu gelişme; o dönemde herhangi bir tekniğin geliştirilmesi amacıyla yapılmamış olmasına rağmen, taşıyıcı anneliğin (surrogate mother) olabileceğinigösteren ilk çalışmadır (Heape 1890).1939'da Pincus ve arkadaşlarıda günümüzde Gamete Intra Fallopian Transfer (GIFT) olarak bilinen tekniği tanımlamışlardır. Araştırmacılar, tavşan oositleriyle spermlerini in vitro ortamda bir araya getirerek bir başka tavşan Fallop tüplerine yerleştirmişlerdir. Buda, fertilizasyonun taşıyıcı annenin Fallop tüplerinde gerçekleştiğini ve genetik olarak biyolojik ebeveynlerinin özelliklerini taşıyan bireylerin doğabileceğini göstermesi nedeniyle son derece önemli bir gelişme olarak kaydedilmiştir (Pincus 1940). Chang ise tavşan oositlerinin in vitro fertilizasyonu ile gelişen embriyoların farklı soylara transferi sonrasında doğumların gerçekleştiğini; Heape'in verilerini destekleyen bir çalışma ile göstermiştir(Chang 1959).

İn vitro fertilizasyon tekniklerini dünyaya tanıtan Edwards, 1952'de farklı kromozom yapılarında fare embriyoları elde etme yöntemleri üzerine doktora çalışmasına başlamıştır.Doktora çalışmalarının yanında in vitro oosit olgunlaşması çalışmalarına da devam eden Edwards; tavşan, hamster ve sıçan oositleri için bu sürenin 12 saat olduğunu gözlemlemiştir. Ancak inek ve Rhesus maymunlarında bu sürecin daha uzun olduğunu ve dolayısıyla türlere özgü farklılıklar olabileceğini belirtmiştir. Edwards, insan overlerini in vitro gonadotropin içeren kültür ortamlarıyla perfüze etmesine, farklı kültür ortamları kullanması ve kültür ortamlarına hormon eklemesine rağmen; 12 saatlik sürecin insan oositlerinin in vitro matürasyonu için yeterli olmadığını gözlemlemiştir. Yaklaşık iki yıl süren araştırmasının sonunda insan oositleri için in vitro mastürasyon süresinin 36 saat olduğuna karar veren Edwards, bu bilgiyi; oostilerin inseminasyon zamanlaması için de dikkate alınması gereken önemli bir bulgu olarak yorumlamıştır (Edwards 1965).

İnsan oositlerinin in vitro ortamlarda 36 saatte olgunlaştığını daha önceki çalışmalarda gözlemleyen Edwards, kadınlara İnsan Koryonik Gonadotropin; (hCG)enjeksiyonundan sonraki 36. saatte folikül aspirasyonu yapılabileceği fikrini

geliştirmiştir (Edwards 1965). Ayrıca her ne kadar oosit matürasyonu konusunda yeterli bilgi sahibi olunsa da; in vitro fertilizasyon için kullanılacak erkek spermlerinin kapasitasyonunun nasıl sağlanacağı konusu o tarihte henüz net olarak çözümlenmemiştir(Gardner ve ark 2001).

Memeli spermlerinden farklı olarak insan spermlerinin in vitro ortamlarda, kadın genital sistem salgılarıyla karşılaşmaksızın da kapasite olabileceği ve motil spermlerin seminal plazma komponentlerinden ayrılabilmesi için santrifüj edilmesi, yıkanması veyüzdürülmesinin gerektiği ise, 1984'de tespit edilmiştir (Mahadevan ve Baker 1984).

Edwards'ın kütüphanede okuduğu bir dergi Dr. Steptoe ile yollarının kesişmesine neden olmuştur. Steptoe, dergideki makalesinde laparoskopi tekniğini tanımlamaktadır ve Edwards tarif edilen bu yöntemin overlerden oosit elde edilmesinde kullanılabilecek çok uygun bir yöntem olacağını düşünerek Steptoe'yi arar ve altı ay sonra, 1968'de Oldham'da birlikte çalışmaya başlarlar. Bu gelişmelerin hemen öncesinde in vitro kullanım amaçlı kültür ortamlarını pH'sı konusunda doktora çalışmalarına başlayan Bavister'da ekibe katılmıştır.Birlikte çalıştıkları dönemde Edwards ve Bavister yaklaşık 15 insan oositini yıkanmış spermlerle inkübe ederek ilk kez 1969 yılında insan oositlerinin fertilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Gardner ve ark 2001).

İlerleyen dönemlerde Edwards'ın ekibine katılan G. Gardner'da doktora çalışmaları sırasında tavşan blastosistlerinden elde edilen trofoektodermal hücrelerinin kromatin cisimciklerinin boyanmasıyla cinsiyet ayrımının yapılabileceğini göstermiştir. Bu gelişme o dönemde, X'e bağlı geçiş gösteren hastalıkların önlenmesinde, preimplantasyon genetik tanıda (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD) kullanılabilecek bir yöntem olarak tanımlanmıştır(Gardner ve Edwards 1968).

Natürel siklus uygulamaya başladıkları dönemde başvuruda bulunan ikinci hastanın tuba uterinaları yoktur ve aspire edilen tek bir oositten gelişen embriyonun transferiyle gebelik oluşur. 25.07.1978'de Louise Brown'un doğumu infertilite tedavisinde yeni bir çığır açmıştır. Edwards'ın 25 yıllık çalışmasının sonucu dünyadaki milyonlarca çift için umut kaynağı olmuştur (Steptoe ve Edwards 1978).

İlk tüp bebek olarak literatüre geçen Louise Brown'un doğumu tıp dünyasında heyecanla karşılanarak in vitro fertilizasyon teknikleri dünyanın bir çok yerinde uygulanmaya başlanmıştır(Steptoe ve Edwards 1978).

IVF tekniklerinin Avrupa ülkelerinde de yaygınlaşmasından sonra Türkiye'de ilk tüp bebek merkezi 1988'de Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde açılmıştır (Delilbaşı 2008).

İn vitro fertilizasyon teknikleri 1978'den itibaren tüm dünyada, özellikle tubal faktör nedeniyle infertilite problemi olan çiftlerdeki başarıları dolayısıyla yaygınlaşmaya başlamıştır. Dünyanın pek çok yerinde yeni merkezler açılırken bir yandan da IVF başarısını arttırmak amacıyla daha başarılı olacağı düşünülen alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Bu tekniklerde amaçlanan; gametlerin in vitro olarak bir araya getirilerek veya fertilizasyondan hemen sonra ya da embriyoner gelişimin ilk dönemlerinde kendi doğal ortamlarına döndürülerek yardımla üreme tekniklerinde başarı oranını arttırmaktır. Bu gün artık birçoğu kullanılmasa da bu yöntemlerle de başarılı sonuçlar alınmış ve özellikle İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI)'nun rutin kullanıma girmesinden sonra bir çoğu artık sadece adı bilinen yöntemler olarak literatüre geçmiştir (Delilbaşı 2008).

Klasik IVF'in yetersiz kaldığı şiddetli erkek infertilitesine mikromanüpülasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle çözüm getirilmiş ve ICSI çok kısa bir süre içinde obstrüktif ve non-obstrüktif azospermik bireyler için de mucizevî bir yöntem olarak tarihe geçmiştir. IVF'de yaşanan bir diğer önemli gelişme de; genetik geçiş gösteren hastalıkların embriyoner dönemde tanımlanabileceğinin gösterilmesidir. Preimplantasyon genetik tanı yöntemlerinin kullanımı, risk altındaki çiftlerde sağlıklı embriyoların seçilerek transfer edilmesiyle genetik geçiş gösteren hastalıkların önlenmesini sağlamakla kalmamış; aynı zamanda bir grup hastada da gebelik oranını arttırabilmiştir. Bu teknik gelişmelerin yanında, embriyonal gelişim için optimum koşulları sağlayacak mediumlar geliştirerek kullanıma sunulmuştur. IVF kültür mediumlarının geliştirilmesi, embriyo implantasyon oranının artışına sebep olmuş ve böylece çoğul gebelikler ile daha sık karşılaşılmıştır. Zamanla embriyo dondurma protokollerinin geliştirilmesiyleve taze sikluslarla aynı sonuçları vermesi nedeniyle transfer edilen embriyo sayısının azaltılarak kalan embriyoların

dondurulması tercih edilen bir gelişme olmuştur. Bu da çoğul gebeliklerin engellenmesinde en etkili faktörlerden biri olarak kabul edilmiştir(Delilbaşı 2008).

Tüm dünyada giderekyaygınlaşan oranlarda kullanılmakta birlikte infertilite tedavisi oldukça pahalı olması nedeniyle birçok ülkede ücretsiz sağlık hizmetleri kapsamından çıkarılmış ve sigorta şirketleri de bu tedavi masraflarını karşılamama yoluna gitmişlerdir. Ancak zamanla ülkelerdeki sağlık hizmetleri bütünlüğü göz önüne alınarak, giderlerin bir bölümü de olsa karşılanmaya çalışılmıştır.

Ülkemizde ise ilk IVF merkezinin açıldığı 1988 yılından bu yana hastaların tedavi masrafları kendilerinin karşılaması kabul edilmiş ise de 2005 yılında yapılan değişiklikle belirli koşulları sağlayan hastaların, üç deneme gideri Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK) tarafından karşılanmaktadır.

1.2.Semenin Genel Özellikleri

Semen sıvısı spermatozoaların dışında prostat, epididim, seminal kese, vas deferns, Cowper ve üretral bezlerden gelen çeşitli oranlardaki salgılardan oluşmaktadır. Seminal vezikül semen hacminin %60'nı yapar. Seminal sıvı spremlerin temel besini olan fruktozu içerdiği gibi semenin koagülasyonunu sağlayan çeşitli maddeleri de bulundurur.Prostat salgısı semen hacminin %20'sini oluşturur. Hafif asit özelliği olup bol miktarda sitrik asit içerir. Asit fosfataz ve proteolitik enzimler açısından da zengindir. Proteolitik enzimler koagüle semenin sıvılaşmasını sağlar (Delilbaşı 2008).

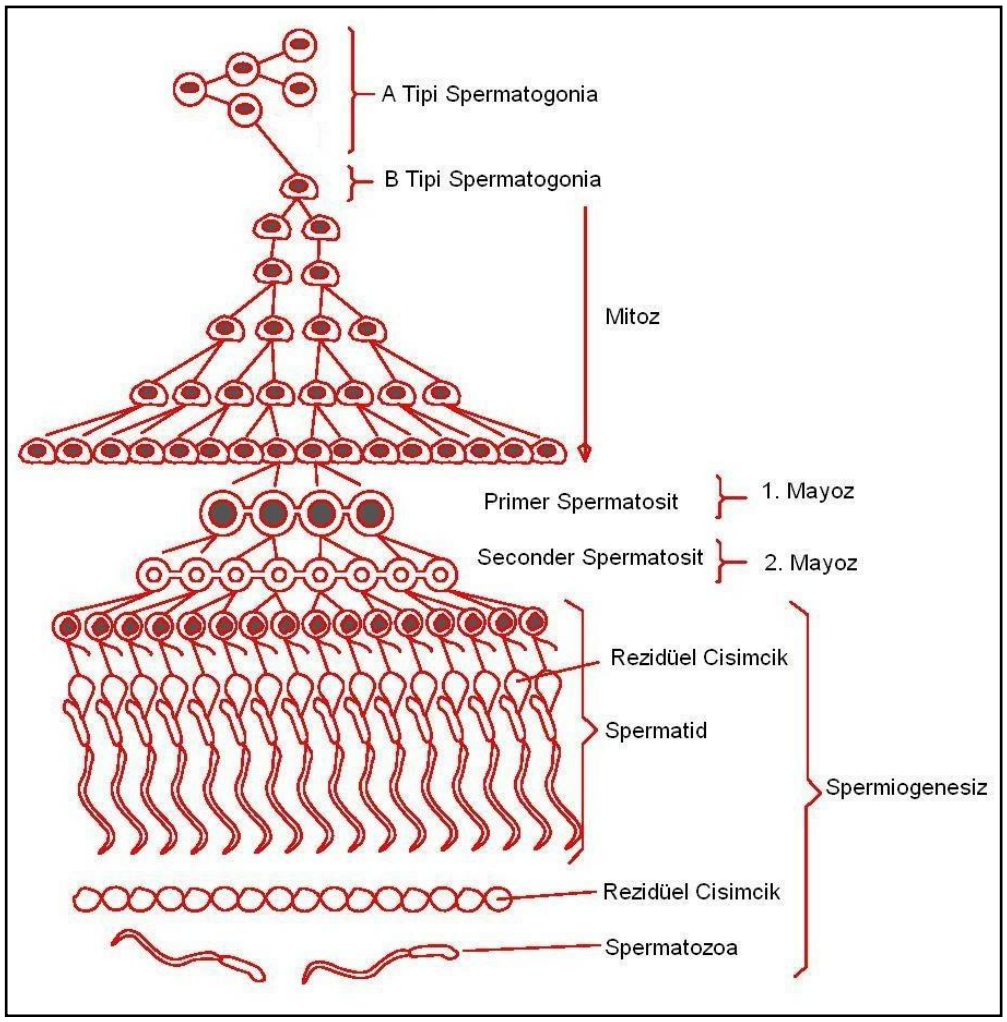
1.2.1.Yetişkinlerde Spermatogenezis

Totipotent hücrelerin spermatogonyuma farklılaşmasıyla başlar. Memeli hücrelerinde çeşitli hücre tipi bulunmaktadır. İnsanda bulunan hücre tipleri koyu tip A (A dark), soluk tip A (A pole), uzun tip A (A long) ve Tip B'dir.

Tüm A tipi spermatogonyumlar kök hücre işlevindedir. Azoospermi, kriptorşidizm, klinefelter sendromu, hipogonadotropik hipogonadizm , anti-androjen

tedavisi gibi birçok testiküler patolojide deneysel koşullarda soluk tip A bulunurken, koyu tip A bulunma olasılığı çok düşüktür.

B tipi spermatogonyumlar dinlenme evresindeki farklışmamış hücrelerdir (Şekil 1.1)(Kalaycı 1986, Delilbaşı 2008).

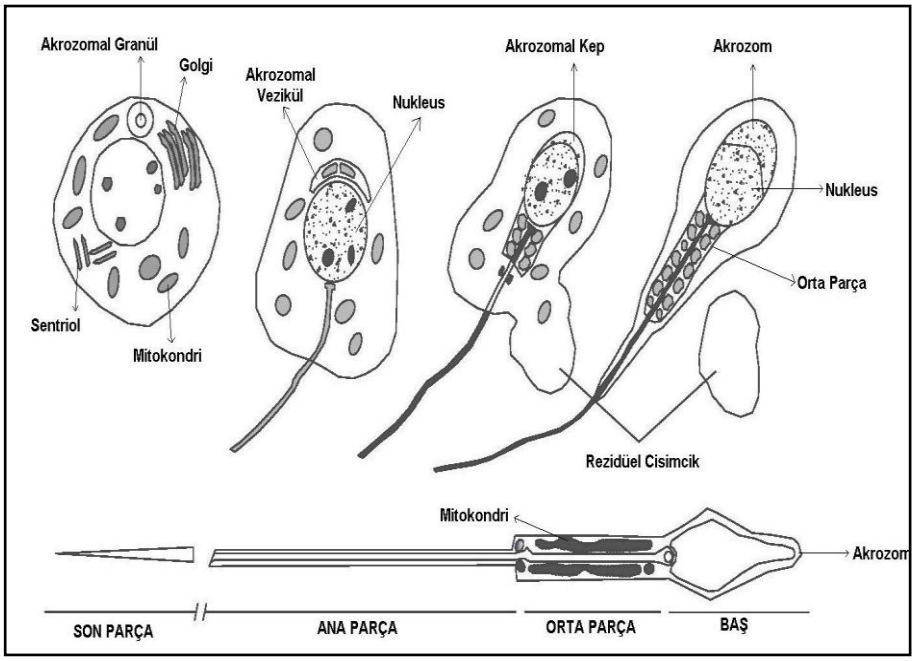


Şekil 1.1. Spermatogenezis şeması.

1.2.2. Spermiyogenezis

En önemli evresi akrozom oluşumudur. Akrozom materyalleri Golgi tarafından üretilir. Akrozomda birçok hidrolitik enzim bulunmaktadır. Bu enzimler korona radiata ve zona pellusidanın sindirilmesinde kullanılır. Akrozom büyümesi bir kutupta devam ederken karşı kutupta sentriyoller kuyruk oluşumunu başlatır. Proksimal sentriol boyun yapısına katılır. Distal ise flagellumu yapar ki aksonem de

denir ve 9+2 ile gösterilir ve yapıcı kinosilyuma benzer. Mitokondriyumlar kuyruk bölgesine göç ederek, enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere kuyruğun orta kısmı etrafında uçuca spiral şeklinde sıralanırlar(şekil 1.2) (Kalaycı 1986, Delilbaşı 2008).



Şekil 1.2. Spermiogenezis.

1.2.3. Spermatozoa

Baş, çekirdek ve akrozomdan oluşur. 2-3 µm ve 4-5 µm boyundadır. Akrozom başın %40-70' ini kaplar.

Boyun; baş ile orta parçayı bağlar. Distal sentriyol ve bundan çıkarak orta parçaya giren longitudinal fibriller bulunur. 4-5 µm uzunluğundadır. 9+2 mikrotübül yapısındadır.

Orta parça; flagellum ve mitokondrial kılıf bulunur.

Kuyruk; 45 µm uzunluğunda, başlangıç kısmında longitudinal fibriller bulunur. Mitokondri kılıf kuyrukta bulunmaz. Son kısmında flagellumun çevresinde fibröz kılıf kaybolur (Kalaycı 1986, Şeftalioğlu 1998, Delilbaşı 2008, WHO 2010).

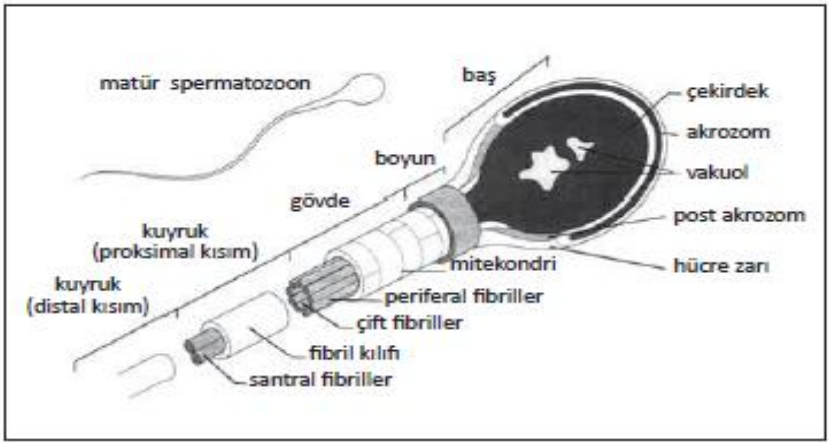
1.2.4. Sperm morfolojisi

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ışık mikroskobu, elektron mikroskobu veya farklı boyama teknikleriyle değerlendirilmektedir. Boyama tekniklerinde hematoksilen, Giemza kullanılan boyalardır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2010 yılındaki kitapçığına göre Papanicolaou boyamanın morfoloji değerlendirme için ideal olduğunu belirtilmiştir.Bunların yanında Spermac ve Diff Quik yöntemleri de kullanılmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü(WHO) morfoloji oranını Kruger–Tygerberg kriterlerini esas alarak normal kabul edilen sperm morfolojisini %4 olarak belirlemiştir.

Normal sperm morfolojisini değerlendirecek olursak;

Baş, boyun, orta parça ve kuyruktan oluşan yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Baş kısmının büyük bir bölümünde DNA'yı içeren çekirdek ve bu yapıları saran akrozom bulunur. Akrozom sperm başının %40-70'ini kaplar. Hareketi sağlayan kuyruk 45 µm uzunluğunda 0,4-0,5 µm çapındadır (Şekil 1.3, 1.4)(Orhon 1995, WHO 2010).



Şekil 1.3. Normal sperm şekli (Hoogendijk ve ark 2010).



Şekil 1.4. Normal Spermin Bölümleri(Orhon 1995).

1.3. Oositin Genel Özellikleri

1.3.1. Oogenezis

Yumurtalıklar dişide, gametlerin üretilmesi (gametogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların sentezlenip salgılanmasıyla yükümlüdür. Ovaryumlardan olgun bir oositin oluşturularak atılması (ovülasyon) pubertede başlayarak menopoza kadar devam eder. Ovülasyon, menstrüasyonun başlangıcından itibaren 13-14. günlerde gerçekleşir ve bunu takiben her 28 günde, bir adet oositin atılmasıyla tekrarlanan bu olaylar ovaryan siklus olarak adlandırılır(Ross 1985).

1.3.2. Foliküler Gelişim

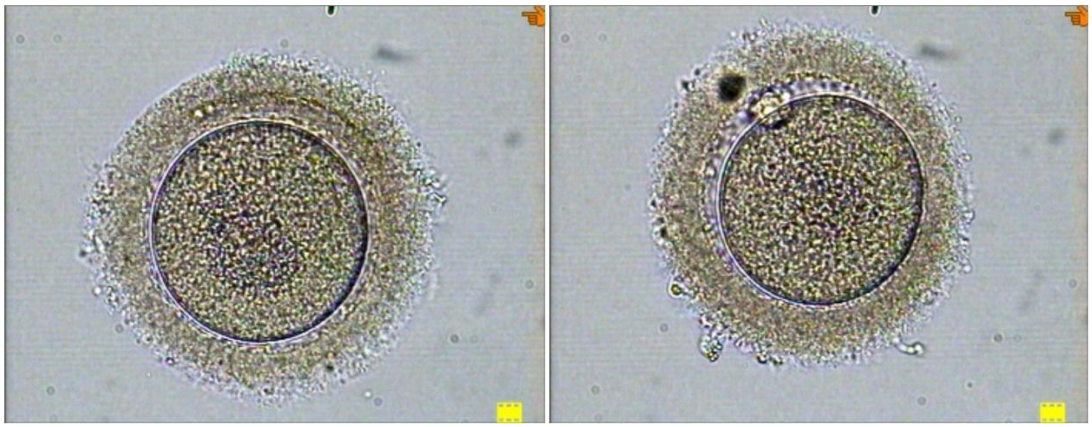
Olgunluk çağında ovaryumlarda üç tip folikül gözlenir, bunlar; primordial foliküller, büyüyen foliküller ve Graaf folikülleri'dir. Primordial foliküllerin gelişmesiyle, büyüyen foliküller meydana gelir. Büyüyen foliküller de gelişim sürecindeki değişikliklere göre üç farklı evrede incelenir; primer, sekonder ve antral foliküller(Ross 1985).

1.3.3. Ovülasyon

Ovaryumda olgun hale gelerek oositin atılmasına ovülasyon denir.

Folikül Uyarıcı Hormonun (FSH) etkisiyle erken antral safhadan ovülasyon öncesi evreye geçer. Daha sonra geç folliküler safhada lüteinleştirici hormonun (LH) en yüksek noktaya ulaşmasıyla oositte germinal vezikülün yıkılması gerçekleşir ve kromozomlar metefaz I'den telofaz I evresine geçerler. Oosit 1. mayoz bölünmeyi ovülasyondan hemen önce tamamlar.

Birinci mayoz bölünme sonrasında kromatin iki kardeş hücre arasında eşit olarak dağılırken; sekonder oositten biri yaklaşık olarak tüm sitoplazmaya sahip büyük bir hücre olarak kalırken, diğeri zona pellusida ile oosit arasındaki perivitellin aralıkta kalan küçük bir hücredir ve 1. kutup cisimciği (1. polar body) olarak isimlendirilir.Oluşan sekonder oosit haploid kromozom içerir ve nukleus 2. mayoz bölünme evresine girer. Fertlizasyon sırasında spermin oosite girmesiyle oosit 2. mayoz bölünmeyi tamamlar ve 2. kutup cisimciği'de atılır. Ovülasyonla atılan oosit sekonder, metafaz II (MII) yada olgun oosit olarak isimlendirilir(Şekil 1.5)(Ross 1985).



Şekil 1.5. MI oosit (solda), MII oosit (sağda).

1.3.4.Nükleer Olgunlaşma ve Sitoplazma Olgunlaşması

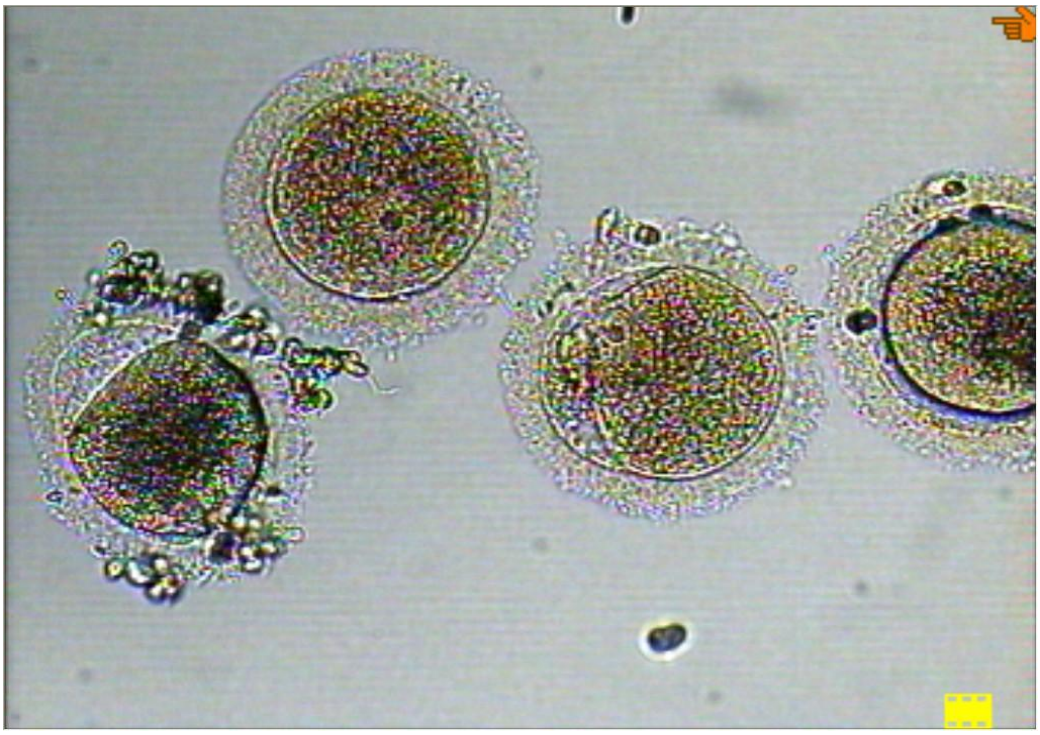
Oositin olgunlaşması (matürasyonu), germinal vezikülün dağılmasından metafaz II ye kadar geçen sürede, 1. mayoz bölünmenin başlaması ve tamamlanması olarak adlandırılır. Bu süreç aynı zamanda döllenme ve erken embriyonal gelişim için gerekli olan sitoplazmik matürasyonuda kapsamaktadır(Cha ve Chian 1993).

Oosit olgunlaşması genel olarak nükleer olgunlaşma ve sitoplazma olgunlaşması olarak iki ayrı kısımda incelensede birbirinden bağımsız süreçler değillerdir. Çünkü,nükleer olgunlaşmada sitoplazma tarafından kontrol edilmektedir. Embriyo kalitesi ve gelişiminden sorumlu temel öğe ise; oosit kalitesidir. Oosit kaliteside nukleus, sitoplazma ve membran olgunlaşması gibi öğelerin toplam gelişimiyle alakalıdır(Cha ve Chian 1993).

1.3.5. Oositin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Klasik IVF'de total döllenme defekti ile karşılaşıldığında daha önceleri sadece sperm üzerinde durulmuşsada fertilizasyon kontrollerinde döllenmeyen oositlerin bir kısmının halen olgunlaşmamış olduğunun gözlenmesi, oositlerde olgunluk değerlendirilmesinin, dolayısıyla inseminasyon zamanın önemini vurgulamıştır. Klasik IVF'de döllenmemenin nedeni sperm girişinin sağlanamaması olarak görülmesine karşın, (Dybian ve ark 1992) ICSI'dede bazı oositlerin döllenmemesi sperm tarafından oosite taşınan oosit aktive edici faktörün (Oocyte Activating Factor, OAF) yetersizliğine bağlanmıştır(Dozortsev ve ark 1995).

IVF'de fertilize olamayan oositlerin yaklaşık %13'ünde morfolojik anomalilerin gözlenmesi konuya ilgiyi daha da arttırmıştır. Klasik IVF'den farklı olarak ICSI'de işlem öncesi oositlerin çevresindeki kumulus-korona hücrelerinin uzaklaştırılması sayesinde oositlerin yapısal özellikleri daha net olarak gözlemlenebilir. Bu sayede pipetlenerek edilen oositlerin %60-70 oranında intrasellüler veya ekstrasellüler veya her iki anomaliyede sahip olabileceği görülmüştür (Şekil 1.6), (Van Blerkom ve Henry 1992).Bu çalışmalar oositin fiziksel özelliklerinin fertilizasyon, embriyonal gelişim, gebelik ve implantasyon oranlarına etkisini araştıran pek çok çalışmaya konu olmaktadır.



Şekil 1.6. Dejenere Oositler.

1.4.İnsan Embriyonal Gelişiminin Değerlendirilmesi

1.4.1.Embriyonal Gelişim

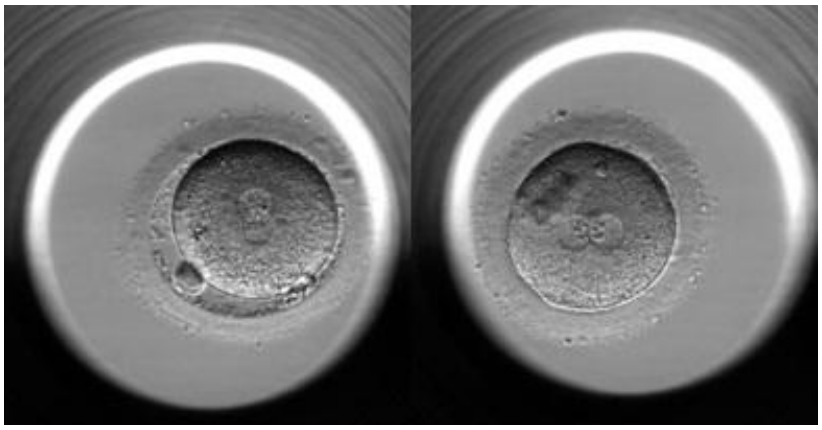
Fertilize olmuş oosit ‘zigot’ adını alır.Mitotik aktivasyonla bölünmeye başlayan zigotta hücre bölünmesiyle blastomerler oluşur. Bu bölünme şeklinin diğer hücre bölünmelerinden farkı, yeni bir bölünmeye kadar hücrenin büyüme fazına girmemesidir. Bu sebepten ötürü her yeni blastomer köken aldığı blastomerin yarısı büyüklüğündedir.

Hücre bölünmesi sırasında sitoplazma bölünmesi (sitokinezis) ve çekirdek bölünmesi (karyokinezis) senkronize şekilde gerçekleşir (Delilbaşı ve ark 2000).

1.4.2.Erken Embriyonal Gelişim

Fertilizasyonu takiben mitoz bölünme, iki haploid pronukleusun DNA’larını ikiye katlamalarıyla başlar.Oosit sperm tarafından döllendiğinde, spermin ooplazmaya taşıdığı sentriyol ve mikrotübüller erkek ve dişi pronukleuslarını bir araya getirir (Sathananthan 1991) ve inseminasyon işlemini takiben yaklaşık 16-18

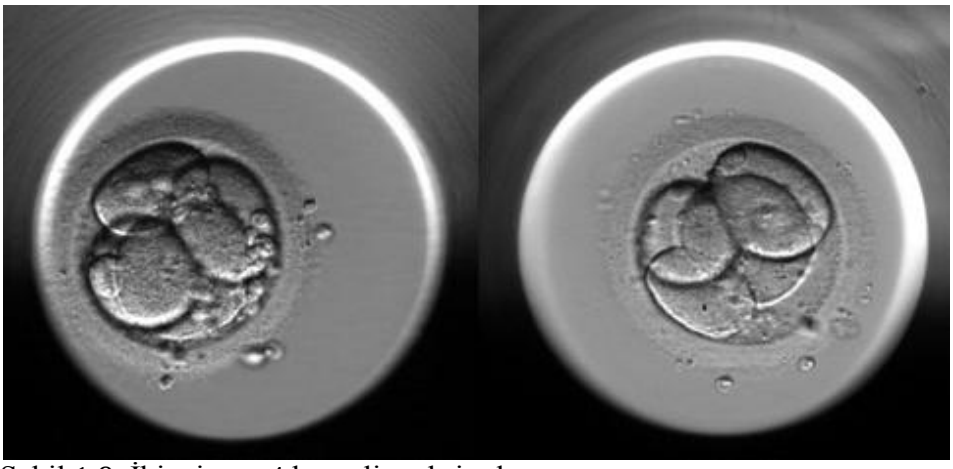
saat sonra pronukleuslar oosit sitoplazmasının ortasında en net şekilde gözlemlenirler. İnseminasyon işleminden 18-27 saat sonra iki pronukleus bir araya gelerek singami (syngamy) oluşur (Şekil1.7). Bunu 28. saatte sitoplazmanın ikiye bölünmesiyle meydana gelen iki diploid blastomerin oluşumu izler(Trounson 1982). Preimplantasyon evresinde blastomer sayısı hızlı bir şekilde artar ve her blastomer bir öncekinden hacimce daha küçüktür. İlk hücre bölünmesine girme zamanıembriyo gelişim kalitesi için bir kriter olarak kullanılır ve 2. gün embriyo transferi yapılan vakalarda, ICSI işlemini takiben ilk 25 saat içinde yarıklanan embriyoların transfere seçilmesiyle daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir. İkinci günde, embriyolar 43,5-44,7 saat sonra dört hücreli olurlar (Şekil1.9). Bir sonraki bölünme 3. günde ortalama 58,3-60,4 saat sonra 8 hücreye ulaşılarak gerçekleşir (Şekil 1.10). Embriyodaki her blastomerin bölünmesi senkronize olmayabileceği gibi blastomer sayıları 5-7 gibi tek sayılarada ulaşabilir (Sakkas 1998).



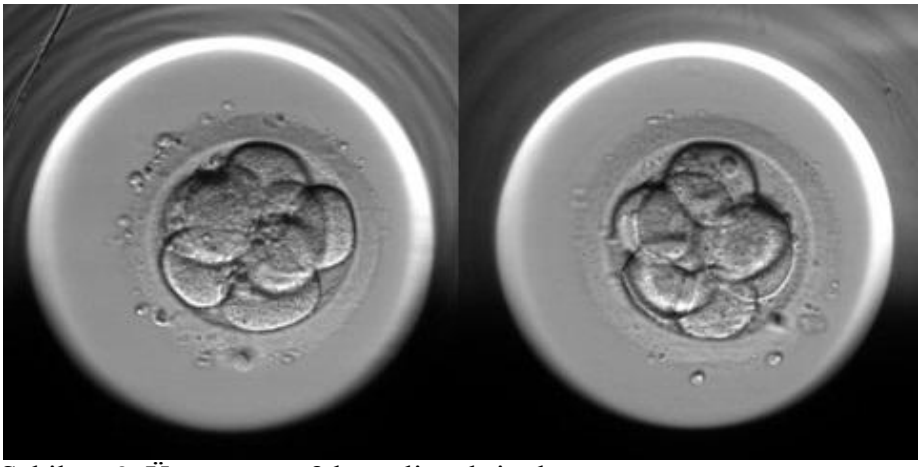
Şekil 1.7. Normal Fertilizasyon.



Şekil 1.8. Anormal Fertilizasyon.

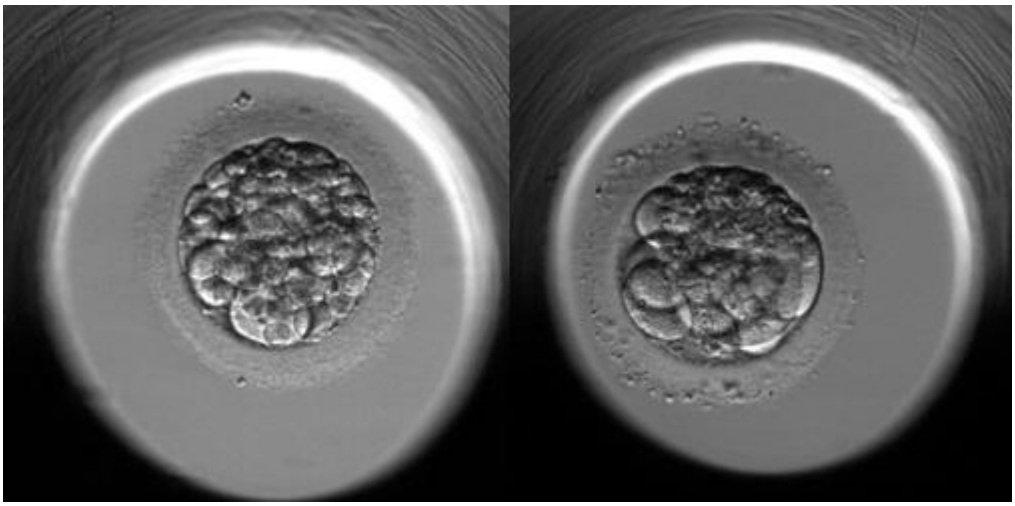


Şekil 1.9. İkinci gün 4 hücreli embriyolar.



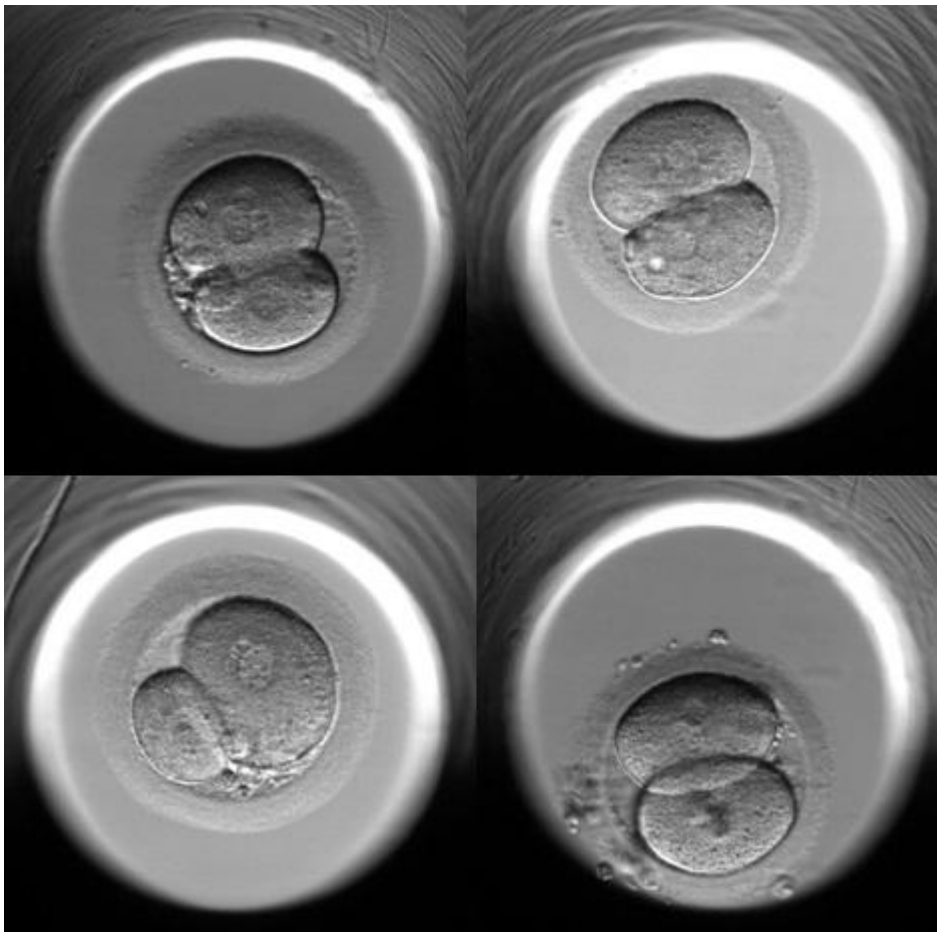
Şekil 1.10. Üçüncü gün 8 hücreli embriyolar.

IVF'de embriyo kalite değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer parametre de embriyonik fragmantasyondur (Şekil 1.11). Fragmantasyon, plazma membranının ekstrasellüler bölgeye bir atığıdır ve sitoplazma maddesi içerir. Fragmantasyon in-vitro koşullarda gelişen embriyolarda gözlemlendiği gibi in-vivo koşullardaki embriyolardada görülen doğal bir durum olduğu gösterilmiştir (Buster 1985). Sitoplazmik fragmantasyonun miktarı ve dağılımı embriyonun implantasyon başarısıyla ters orantılıdır (Giorgetti 1995). Blastomer sitoplazmalarında asimetrik olarak dağılım gösteren pek çok düzenleyici proteinin varlığı gösterilmiştir (Antczak ve Van Blerkom 1999). Oluşan fragmantasyonla bu proteinlerin miktarındaki azalma ilerleyen dönemde apoptozisi tetikleyebilir (Alikani 1999).



Şekil 1.11. Fragmante embriyolar.

İkinci veya üçüncü günde embriyonun blastomerlerinde birden fazla nukleus içermesine multinukleasyon denir (Resim 1.12). Bu embriyolar ilerleme potansiyeline sahip olmakla beraber ilerlemesi duran embriyoların %30,4'ünde multinükleasyon olduğu (Munne ve Cohen 1993) ve normal embriyolarda %32,3 olan anöploidi oranının multinüklear olan embriyolarda %74,5 olarak tespit edilmiştir (Kligman 1996). Multinukleer blastomer gelişiminin hızlı ovülasyon indüksiyonuna cevap olarak(Jackson 1998)veya sitokinetik bozukluğa bağlı olarak geliştiği ileri sürülmüştür(Munne ve Cohen 1993).



Şekil 1.12. Multinükleasyona sahip embriyolar.

1.5. Tüp Bebek Laboratuvarında İnkübatörler

1.5.1. Standart İnkübatörler (Sİ) ve Dinamik Görüntüleme Sistemine Sahip İnkübatörler (DGS)

İnkübatörler tüp bebek laboratuvalarının en önemli cihazlarından biridir. Kaliteli kültür şartları ve iyi embriyoner gelişim için inkübatörlerin çok titiz bir şekilde seçilmeleri gerekir. Örneğin inkübatörlerin ne kadar sürede kapaklarının açılmasını takiben sıcaklık ve gaz seviyelerinin normal düzeye geldiği en önemli özelliklerinden biridir. Ayrıca kalibrasyon işlemlerini takiben tekrardan kalibrasyon gerektirmeden ne kadar süre bu değerlerin sabit kaldığıda önemli kriterlerden bir diğeridir.

Embriyo kültürü için kullanılan medyumlar pH'yı 7,4 civarında tutabilmek için tampon sistemleri içerirler. Günümüzde kullanılan pek çok medyum fizyolojik bikarbonat/CO_2tampon sistemini kullandığı için IVF laboratuarlarında CO_2'li

inkübatör kullanmak gerekir. Günümüzde %5 CO_2, %5 O_2, %90 N_2 kontrollü olmak üzere iki farklı gaz sistemi içeren inkübatörler laboratuarların genelinde kullanılmaktadır.

Klasik pratikte embriyonun morfolojik değerlendirmesi daha önceden belirlenmiş zaman aralıklarında yapılır. Transfer edilecek embriyo, bu zaman aralıklarında mikroskop altında yapılan gözlemlerde blastomer simetrisi, blastomer sayısı, fragmantasyon oranı gibi kriterlere göre skorlanır. Embriyo morfolojisi ile canlılık arasında doğru orantı olduğunu gösteren pek çok yayın ve kaynak vardır. Ardışık yapılan embriyo skorlanmasının başarıya katkısı olduğunu gösteren yayınlar olduğu gibi aksini gösteren yayınlarda vardır (Neuber ve ark 2006, Finn ve ark 2010, Racowsky ve ark 2009). Ardışık gözlemler, elde edeceğimiz veri miktarını arttığı gibi embriyonun uygunsuz ortam koşullarına maruz kalma sürelerini ve inkübatörlerin tekrar istenen gaz karışım yoğunluklarına ulaşma sürelerini arttırır. Halen bu ikilem embriyologların en büyük sorunlarından biridir (Şekil 1.13).

Gelişen teknolojiyle birlikte birkaç senedir kullanılmakta olan DGS inkübatörler klasik embriyo kültürünün yapıldığı standart inkübatörlere alternatif teşkil etmektedir. Sistem temel olarak standart inkübatörlere benzemekle birlikte, çok daha gelişmiş sistemlere sahiptir. Sistem özel kamera sistemli bir inkübatör ve onun bağlı olduğu bir bilgisayardan oluşmaktadır. Sistemde kültürü yapılan embriyonun inkübatör dışına çıkarılmadan özel kamera sistemiyle görüntülenerek bu görüntülerin bilgisayara aktarılarak ilgili kişinin izlemesi sağlanmaktadır (Şekil 1.14).



Şekil 1.13. Standart İnkübatör.



Şekil 1.14 DGS İnkübatör.

1.5.2.DGS İnkübatörlerin Avantajları

Dinamik görüntüleme sistemleri embriyo gözlemleme sayısını,sürelerini yükselterek ve aynı embriyonun birkaç kişi tarafından incelenerek embriyo değerlendirme başarısını arttırmaktadır (Payne ve ark 1997, Cruz ve ark 2011). DGS embriyo kinetiği, hücre bölünme zaman aralıkları, pronükleus ve nükleus formasyonları ve fragmantasyon gibi morfolojik kriterleri detaylı biçimde değerlendirme imkânı sağlamaktadır.

Embriyo gelişim zamanlarının nicel olarak değerlendirilmesinin (morfokinetik parametreler) yakın gelecekte çok sıklıkla, embriyo canlılığı ve implantasyon potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılacağı düşünülmektedir (Lemmen ve ark 2008, Arav ve ark 2008).

DGS'nin avantajlarından bir başkası ise, kültür ortamının kararlı olmasıdır. Klasik inkübatörler normal kullanımda gayet iyi kültür ortamı sağlarlar. Ancak inkübatör her açıldığında gaz konsantrasyoları ve ısı değerleri ciddi oranlarda düştüğü için inkübatörün tekrar normal değerlerini yakalaması belirli bir süre alacaktır. Ayrıca embriyonun mikroskop altında değerlendirilmesi sırasında da ne kadar hızlı yapılırsa yapılsın embriyo tamamen farklı atmosfer koşullarına maruz kalacaktır ve bize embriyo değerlendirmesi için çok kısıtlı bir zaman verecektir.

DGS'nin avantajları yanında dezavantajlarıda vardır. Bunların başında da sistemin ilk kuruluş ve devamındaki sarf malzemesi kullanım maliyetleridir.Gelişen teknolojiyle beraber üretim maliyetlerinin düşmesini takiben DGS'nin klasik laboratuar cihazlarından bir tanesi olması beklenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Konya Novafertil Tüp Bebek Merkezi'ne tüp bebek tedavisi için başvuran 20-30 yaş aralığındaki 60 hasta, kullanılan inkübatör sistemleri klinik gebelik başarı sonucu açısından değerlendirilecektir. Örnek grubunun yarısı standart inkübatör kullanılan hastalardan diğer yarısı da dinamik görüntüleme sistemine sahip inkübatör kullanılan hastalardan seçilmiştir.

Çiftlerden bayanlar 20-30 yaş aralığında normal over rezervine sahip ve oosit toplama işlemi sonrası en az 6 olgun oosit elde edilen hastalar, erkeklerde ise sperm parametreleri açısından 2010 WHO (Ford 2010) değerlerini karşılayan hasta çiftler çalışmaya dahil edilmiştir.

Oosit toplanmasını takiben iki saat beklendikten sonra erkek eşten alınan sperm örneğiyle yapılan mikroenjeksiyon işleminden sonra hastaların yarısı standart inkübatör diğer yarısıda görüntüleme sistemine sahip inkübatörlerden faydalanmışlardır. Üç günlük inkübasyonun ardından tek embriyo transferiyle tedavi sonuçlandırılmıştır. Embriyo transferini takiben 12. gün yapılan βhCGtestine görekimyasal gebelik değerlendirilmiştir. Gebelik testinin pozitif olduğu hastalarda testi takiben 20. gün yapılan ultrason muayenesiyle klinik gebelik değerlendirilmiştir.

Çalışma için, Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2013/116no'lu kararında geçenetik kurul onayı alındı**.**

2.1. Spermiyogram

2.1.1. Semen Örneğinin Alınması

Semen örneğini kliniğimizde özel olarak hazırlanan spermiyogram odasında alındı. Semen örneği mastürbasyon yöntemi ile, laboratuar personeli tarafından verilen steril kap içerisine toplandı.

Semen örneği toplanırken hastanın uyduğu kurallar:

- Örnek vermeden önce eller ve penis su ile yıkanıp, kâğıt havlu ile kurulandı.
- Örnek kabının içerisi steril olduğu için, kabın içerisine dokunulmadı.

- Örnek kazanım sırasında herhangi bir kayganlaştırıcı madde (sabun, krem, tükürük vb.) kullanılmadı.
- Semen örneğinin hepsi kabın içerisine toplandı. Şayet semen örneğinin tamamı kabın içerisine toplanamazsa, mutlaka laboratuar personeline bilgi verilmesi konusunda uyarıldı.
- Örnek verildikten sonra örnek kabının kapağı kapatılarak tekrar pencereye yerleştirildi.
- Örnek laboratuar personeli tarafından pencereden alındı.

2.1.2. Örneğin İncelenmesi

Semen örneği mastürbasyon sırasında steril semen kabına toplandı. Semen örneği laboratuar personeli tarafından, kapağı kontrol edildikten sonra 37°C'deki su banyosuna konularak üzerine ağırlık yerleştirildi.

Sperm konsantrasyon, motilite ve morfolojisinin değerlendirilmesi:

Sperm konsantrasyonu mutlaka en az 2 kez değerlendirilerek ortalama alındı. Değerlendirme sırasında hava kabarcığının olmamasına özen gösterildi. Tüm sonuçlar değerlendirildikten sonra kayıt altına alındı.

2.2. Oosit Toplanması

Oosit toplama işleminde hastanın uyduğu kurallar:

- İşlemden dokuz saat önce yeme ve içmenin bırakılması.
- Partikül oluşumuna sebep olabilecek parfüm, deodorant gibi esans içeren ürünler kullanılmaması.
- Oositlerin olgunlaşması açısından çok önemli olan hCGenjeksiyonunun saati laboratuar personeli tarafından kontrol edildi.

Folikül takibinin ardından yapılan hCG iğnesinin yapılmasının üzerinden 36 saat geçtikten sonra oosit toplama işlemi yapıldı. Oosit toplama işlemi steril ameliyathane şartlarında ve genel anestezi altında yapıldı. Bütün hastalarda aynı marka oosit toplama iğnesi (Wallace; Smiths-Medical, United Kingdom) kullanıldı.

Opu iğnesiyle ultrason eşliğinde kadın doğum uzmanının tüplere topladığı folikül sıvıları oositlerin alınması için laboratuvar personeline verilerek kültür kaplarına aktarıldıktan sonra stereo mikroskoplar (Nikon; SMZ 1500, Tokyo, Japonya) altında incelendi. Oosit toplama işlemi sırasında kültür medyumu olarak G-Mops (Vitrolife, İsveç) hepes tamponlu kültür ortamı bulunan kültür kapları kullanıldı. Toplanan oositler kültür vasatı ihtiva eden Nunc (Thermo-Scientific, ABD) kültür kaplarına aktarılarak %6 CO_2 gaz içeren Sanyo (Tokyo, Japonya) inkübatörlerde mikroenjeksiyon işlemine kadar inkübasyona alındı.

2.3. Mikroenjeksiyon

Oositler Hyase (Vitrolife, İsveç) içinde pipetlenerek kumulus hücrelerinden arındırıldıktan sonra mikroenjeksiyon işlemine hazır hale getirildiler. Soyma işleminin ardından oositlerin en yüksek orandaolgunluk gösterdikleri, hCG enjeksiyonunu takiben 40. saatte mikroenjeksiyon işlemi yapıldı. Tüm mikroenjeksiyon işlemleri inverted mikroskop (Nikon Eclipse TI, Tokyo, Japonya) altında mikroenjeksiyon ve tutucu pipetler (Sunlight-Medical, Florida, ABD) kullanılarak yapıldı.

2.4. Kültürasyon

Mikroenjeksiyonun ardından kültür kaplarına alınan embriyolar kültüre edilmek üzere %6 CO_2 ve %5 O_2 ihtiva eden, Grup 1; standart inkübatörlere (Sanyo, Tokyo, Japonya), Grup 2; dinamik görüntüleme sistemli inkübatöre (Embryoscope, Unisense Fertilitech, Danimarka) yerleştirildi. Bütün kültür basamaklarında bikarbonat tamponlu kültür medyumları (G1 Plus, Vitrolife, İsveç) kullanıldı. Embriyo kültürü için Sİ'de standart kültür kapları (Nunc, Thermo Scientific, Danimarka), DGS'de ise (Embryoslide, Unisense Fertilitech, Danimarka) özel kültür kapları kullanıldı.

Embriyo değerlendirmeleri içinBączkowski'nin değerlendirme kriterlerinin modifiye edilmiş hali kullanılmıştır (Baczkowski ve ark 2004).

Buna göre; İlk gün, mikroenjeksiyon işleminden sonra 16. ve 18. saatler arasında fertilizasyon oranları değerlendirilerek hasta formlarına kaydedildi. Fertilizasyondeğerlendirmesinde pronükleus (PN)formasyonları göz ardı edilerek sadece 2PN varlığı dikkate alınmıştır. >2PN ve <2PN döllenmeye sahip embriyolar ise takipten çıkarılmıştır. Yine ilk gün 24. ve 25. saatler arasında erken yarıklanma değerlendirmeleri yapıldı. Erken yarıklanma değerlendirmeleri bölünme zamanı ve blastomer simetrisi kriterlerine göre yapılmış ve 24. saatte bölünen ve simetrik olan embriyolar 1. sınıf olarak kabul edilmiştir.

İkinci gün 42. ve 44. saatler arasında embriyolar blastomer sayıları, bölünme zamanları ve fragmantasyon miktarı açısından değerlendirilmiş ve 42. saatte 4 hücreli, simetrik ve fragmantasyonsuz olan embriyolar 1. sınıf olarak kabul edilmiştir.

Üçüncü gün 66. ve 68. saatler arasında embriyolar blastomer sayıları, simetrileri ve embriyo fragmantasyon miktarına göre değerlendirilmiş olup 66. saatte 8 hücreli, simetrik ve fragmantasyonsuz olan embriyolar 1. sınıf olarak kabul edilmiştir. Buna göre;

-İlk sembol hücre sayısını ifade ederken,

-İkinci sembol blastomer yapısıyla ilgilidir; simetrik blastomerler, asimetrik blastomerler, sitoplazma bozuklukları;

A. Simetrik blastomerler,

B. Asimetrik blastomerler,

C. Sitoplazma defektleri.

- Üçüncü sembol ise fragmantasyon derecesi ile ilgilidir;1. Fragmantasyon yok,

2. % 20’den az fragmantasyon,

3. % 20-50 fragmantasyon,

4. % 50’nin üzerinde fragmantasyon.

Embriyolar yukarıda belirtilen özellikler dikkate alınarak değerlendirildiğinde; 2. günde: 4A1, 3.günde ise:8A1 en iyi kalitede embriyoyu ifade eder.

Tüm hastalarda transfer edilecek embriyolar bu kriterler ışığında seçilmiştir.

Embriyo gelişim değerlendirmeleri Sİ kullanılan hastalarda inverted mikroskop altında belirtilen zaman dilimlerinde, DGS kullanılan hastalarda değerlendirmeler düzenli olarak alınan embriyo görüntü kayıtları kullanılarak yukarıda belirtilen kriterlere göre yapıldı.

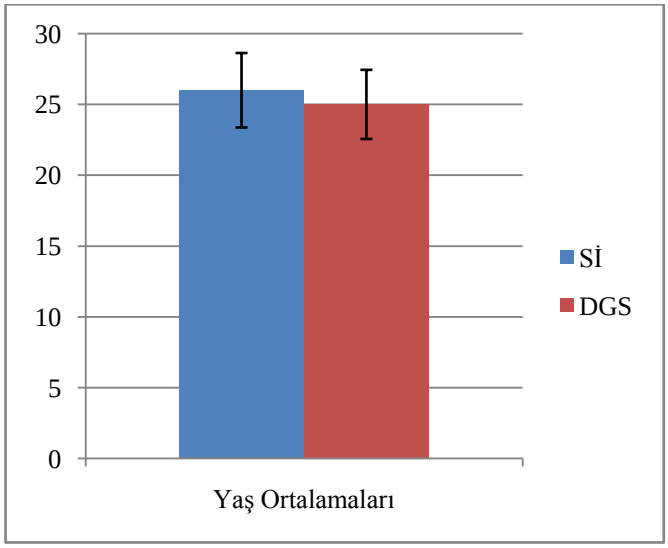
2.5 İstatistik

İstatistik değerlendirmeler için Pearson Ki-kare testi uygulandı.

3.BULGULAR

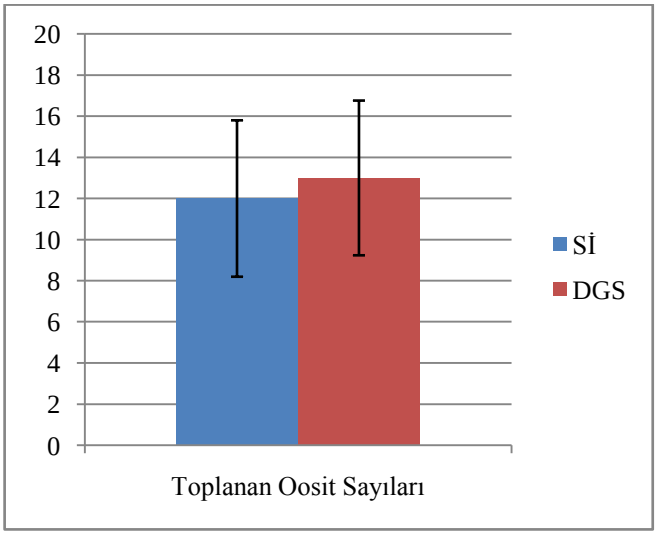
3.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılan bayanların yaş ortalamaları Sİ için 26, DGS için 25 bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir (p: 0,051) (Şekil 3.1).



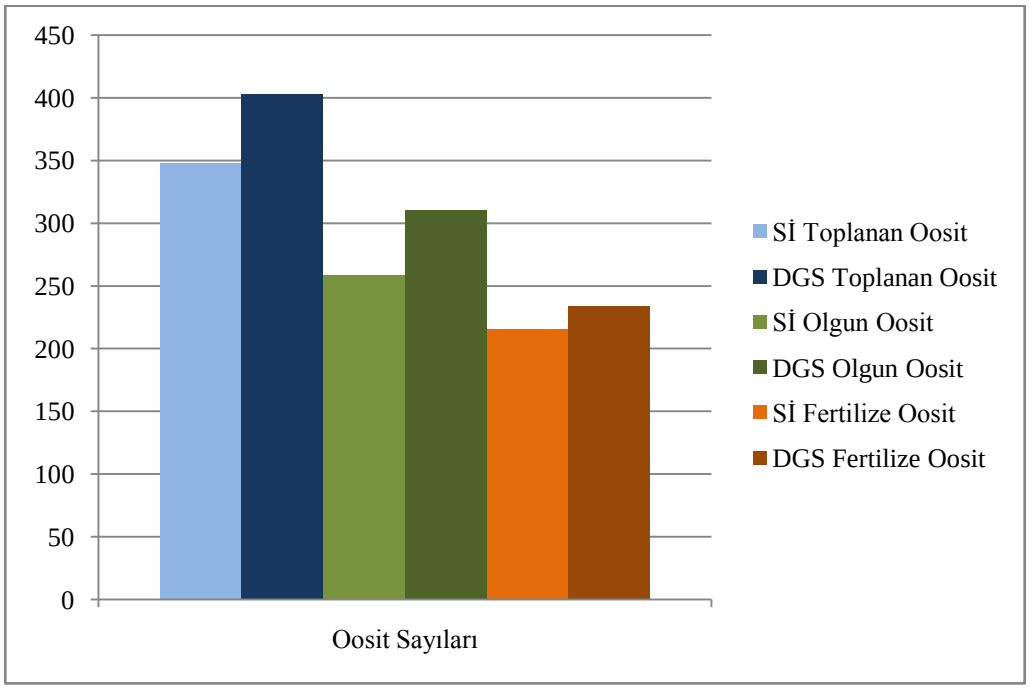
Şekil 3.1. Bayanların yaş ortalamaları.

Toplanan oosit sayıları ortalama olarak Sİ için 12, DGS için 13 bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir (p: 0,988) (Şekil 3.2).

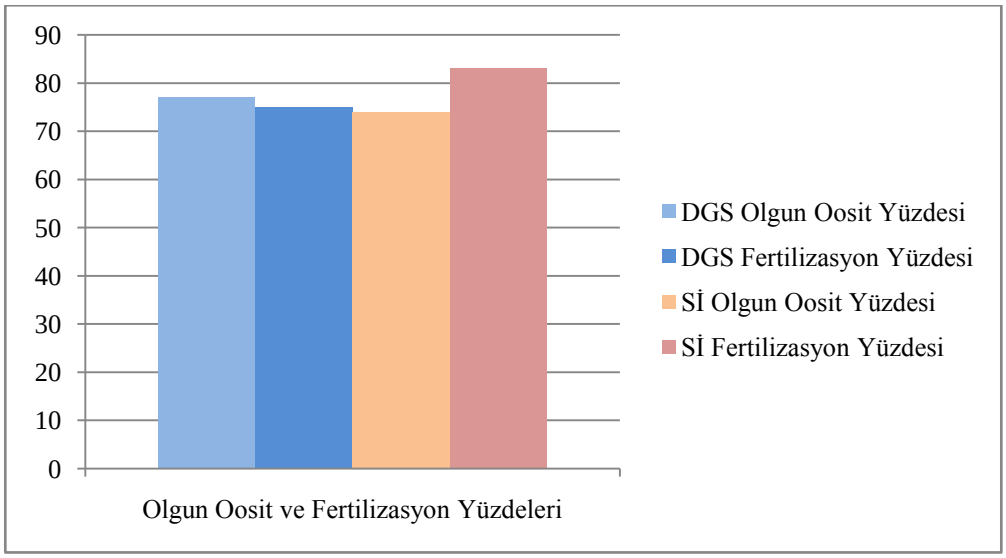


Şekil 3.2. Toplanan ortalama oosit sayıları.

Elde edilen olgun oosit sayıları Sİ için 259, DGS için 311 bulunmuş olup iki grup istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (p: 0,061). Fertilize oosit açısından ise Sİ için 216, DGS için 234 bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p: 0,024) (Şekil 3.3).

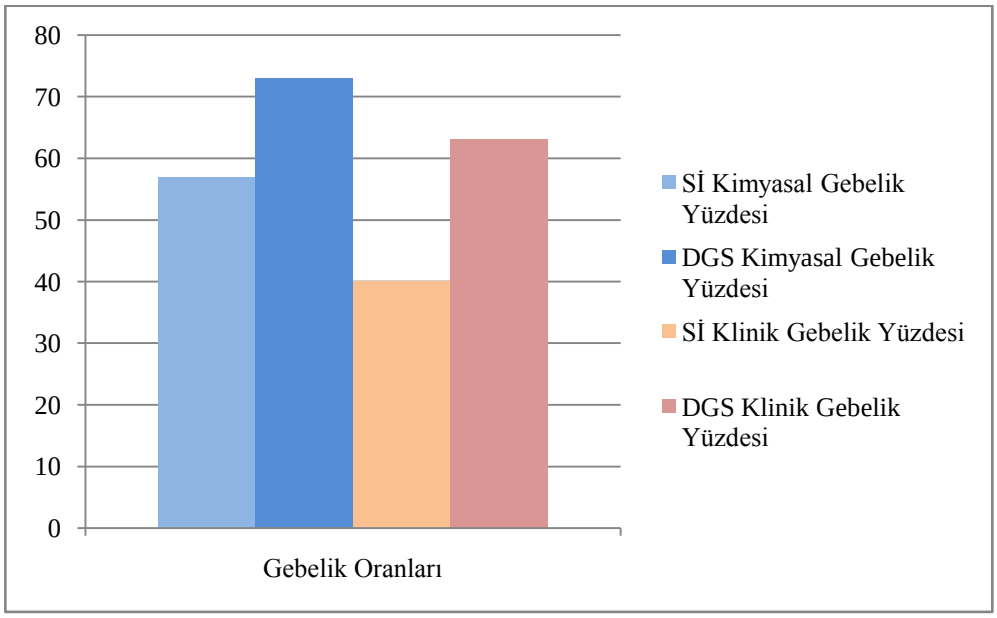


Şekil 3.3. Toplanan oosit, olgun oosit ve fertilize olan oosit sayıları.



Şekil 3.4. Elde edilen olgun oosit ve fertilizasyon yüzdeleri.

Kimyasal gebelik yüzdesi Sİ için %57, DGS için %73 bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak fark gözlenmiştir (p: 0,018). Klinik gebelik yüzdesi ise Sİ için %40, DGS için %63 bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak fark gözlenmiştir (p: 0,022) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kimyasal ve Klinik Gebelik yüzdeleri.

3.2. İstatistik Değerlendirmesi

Çizelge 3.1. Genel istatistik tablosu.

	Sİ (N:30)	DGS (N: 30)	p* değeri
Yaş	26 ± 2,63	25 ± 2.44	0,051
Toplanan Oosit	12 ± 3,80	13 ± 3,76	0,988
Olgun Oosit	259	311	0,061
Fertilize Olan Oosit	216 (83%)	234 (75%)	**0,024****
Kimyasal Gebelik	57%	73%	**0,018****
Klinik Gebelik	40%	63%	**0,022****

* Pearson Ki-Kare testi** İstatiksel olarak anlamlı

Pearson Ki-Kare testi uygulanarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda fertilize olan oosit sayısı (p: 0,024), kimyasal gebelik oranı (p: 0,018) ve klinik gebelik oranı (p: 0,022)istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yaş (p: 0,051),

toplanan oosit (p: 0,988) ve olgun oosit (p: 0,061) istatiksel olarak anlam ifade etmemektedir.

4. TARTIŞMA

Meseguer ve ark (2012) yaptıkları çalışmada 2009-2011 yılları arasında 10 merkezden elde ettikleri verileri incelemişlerdir. Toplamda 7.305 tüp bebek tedavisi çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada hasta çiftlerden 1.390 tanesi DGS, 5.915 tanesi de Sİ inkübatörler kullanılarak embriyo kültürü yapılmıştır. Sİ kullanılan hastaların 4.272 tanesine 3, 1.643 tanesinede 5. gün transferleri yapılmıştır. DGS kullanılan hastaların ise 1.126 tanesine 3. gün, 264 tanesine 5. gün transferleri yapılmıştır. Yaptıkları bu çalışmada DGS kullanıldığı zaman bir merkez haricinde, klinik gebelik oranlarında her merkezde farklı olmakla birlikte ortalama olarak %24'lük bir artış tespit etmişlerdir. Başarısız sonuç elde edilen merkezdeki sonuçları ise sosyo-demografik yapı ve yaş gibi nedenlere bağlamışlardır (Meseguer ve ark 2012).

Meseguer ve ark (2011) yaptıkları başka bir çalışmada, 285 hasta üzerinde DGS inkübatör kullanarak toplam 522 embriyonun değerlendirilmesi sonucu mikro enjeksiyon sonrası 56,6 saatten önce beş hücre ye ulaşan embriyoların implantasyon potansiyellerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca DGS inkübatörlerin kullanımıyla multinükleasyon ve tam bölünme zamanları gibi parametrelerin kesin olarak gözlenmesi sayesinde ilerleyen dönemlerde klasik değerlendirmenin dışında başka parametrelerinde embriyo değerlendirilmesi için kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Meseguer ve ark 2011).

Yaptığımız çalışmada da kimyasal gebelik yüzdesi Sİ için %57, DGS için %73 bulunarak iki grup arasında anlamlı olarak fark gözlenmiştir (p: 0,018). Klinik gebelik yüzdesi için ise; Sİ'de %40, DGS için %63 bulunarak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak fark gözlenmiştir (p: 0,022). Elde ettiğimiz sonuçlar Meseguer ve ark yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir. Embriyo kültürü için DGS kullanılan tedaviler, Sİ kullanılan tedavilere göre olarak daha yüksek oranlarla başarılı sonuçlanmıştır.

Cruz ve ark (2011) yaptıkları çalışmada, standart inkübatör ve DGS inkübatör sistemlerini embriyo gelişimi, kalitesi ve devam eden gebelik oranlarını açısından değerlendirmişlerdir. 478 embriyonun değerlendirildiği çok merkezli prospektif çalışmalarında oosit kalitesine bağlı farklı sonuçları elimine etmek adına sadece donasyon oositler kullanılmıştır. 60 çiftin dahil edildiği çalışmada hasta başına 8,84 oosit elde edilmiştir. Transfer edilen embriyo sayıları açısından iki grupta anlamlı

fark görülmemiştir. Klinik gebelik oranları açısından da herhangi bir anlamlı fark görmemişlerdir. Çalışmalarında DGS inkübatörlerin erken embriyo gelişiminin detaylı araştırılması ve klinik çalışmalarda kullanılması açısından çok faydalı olmakla beraber hasta tedavi sonuçlarında anlamlı fark oluşturmadığını belirtmişlerdir (Cruz ve ark 2011).

Bu çalışmada yaptığımız çalışmayla farklı sonuçlar elde edilmiştir. Donasyon hastalarının kullanılmış olmasına ve hali hazırda yüksek gebelik beklenecek bir grup tercih edildiğini düşündürtmektedir. Böyle bir hasta grubu seçmek embriyoya bağlı genetikanomaliler, multinükleasyon ve oosit kalitesi gibi problemleri baştan elimine etmektedir.

Çalışmamızda irdelenmesi gereken diğer bir nokta ise, Sİ için fertilizasyon yüzdesinin (%83) DGS'ye göre (%75) daha fazla bulunmasıdır. Bu sonucun nedeninin DGS hasta grubunda göreceli olarak elde edilen olgun oosit miktarının toplanan oosit miktarına oranının Sİ hasta grubuna göre düşük olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Embriyo kültürü ve implantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyonun transfer işlemi için seçimi IVF tedavisinin en kritik basamaklarındandır. Klasik prosedürde tedavi sırasında elde edilen embriyolardan hangisinin transfere seçileceği önceden de bahsedildiği gibi ardışık gözlem verilerine göre yapılmaktadır. Bu ardışık gözlemleri yapmak bize embriyonun gelişimi hakkında detaylı bilgi vermekle beraber uygun olmayan dış ortam koşullarına maruz kalma sürelerini artırmaktadır bu durum embriyologların en büyük ikilemlerinden biridir.

Her ne kadar DGS bize embriyonun bölünme zamanları, blastomer bölünmelerindeki duraklama sürelerini ve PN gibi dinamik olguları kesin olarak gözlemlememizi sağlamakla beraber, DGS'nin de daha detaylı şekilde araştırılması gereken yönlerinin olduğunu düşünmekteyiz.

Bunlardan ilki, embriyoların çok kesin zaman aralıklarına dayanılarak transfere tercih edilip edilmeme durumudur. Kesin olarak belirlenen bu zaman aralıkları her hasta için uygun olmayabilir ve implantasyon potansiyeli olan embriyolar transfere tercih edilmeyebilir.

İkinci olarak çalışmamız sırasında negatif bir etki görülmemekle birlikte embriyo kültürü sırasında her embriyonun belirli aralıklarda fotoğrafları çekilirken maruz kaldığı ışık miktarıdır (Ottosen ve ark 2007). DGS'nde kullanılan ışığın dalga boyuyla ilgili olarak ilerleyen dönemlerde daha detaylı araştırmaların yapılacağını düşünmekteyiz.

Yapılan bu çalışma, DGS'ne sahip olan inkübatörlerin tüp bebek tedavisinin başarılı sonuçlanmasında, standart inkübatörlere göre anlamlı derece de avantajlı olduğunu düşündürmekle beraber, çalışmanın retrospektif olması ve çalışmaya dahil edilen hasta sayılarının azlığından dolayı,daha yüksek vaka ve embriyo sayılarıyla çalışmanın geliştirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Sistemin yüksek kurulum ve kullanım maliyetleride diğer bir düşündürücü konudur. Bu maliyetler sebebiyle şu anda sadece belirli tüp bebek merkezleri bu yeni teknolojiye yatırım yapmaktadırlar. Bu sebeple çeşitli yayınlarda verilen yüksek başarı oranlarının dikkatli şekilde incelenmesi gerekmektedir. İlerleyen zamanlarda sistem maliyetlerinin düşmesini takiben yaygın kullanım miktarıyla daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz bu çalışmanın ışığında tüp bebek tedavisin de DGS'nin başarı şansını anlamlı derecede arttırdığını düşünmekteyiz. DGS embriyo kinetiği, hücre bölünme zaman aralıkları, pronükleus ve nükleus formasyonları ve fragmantasyon gibi morfolojik kriterleri detaylı biçimde değerlendirme imkânı sağlamaktadır. Embriyo gelişim zamanlarının nicel olarak değerlendirilmesinin (morfokinetik parametreler) yakın gelecekte çok sıklıkla, embriyo canlılığı ve implantasyon potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılacağı düşünülmektedir.

Ancak görüntüleme sistemlerinin ilk kurulum ve sarf maliyetlerinin hali hazırda çok yüksek olmasından kaynaklı olarak henüz tüp bebek merkezlerinde yaygınlaşamamıştır. İlerleyen dönemlerde maliyetlerin düşmesiyle birlikte bu cihazların yaygınlaşacağını düşünmekteyiz. Bu cihazların merkezlerde yaygınlaşmasıyla birlikte erken embriyo gelişimine dair elimizde daha detaylı bilgiler geçecektir ve bu bilgiler ışığında transfer için embriyo seçimlerinin daha isabetli olacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

Alberda AT, Grand RA, Verner HM, 1993.Studies in Profertility Series, In: Alberda AT, Grand RA, Verner HM, eds. Pioneers in In Vitro Fertilization, 1st ed., New York: The Parthenon Publishing Group, p. 10-15.

Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT, 1999. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. Fertil Steril, 71, 836-42.

Antczak M, Van Blerkom J, 1999. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. Hum Reprod, 14, 429-47.

Arav A, Arova A, Yavin S, Roth Z, 2008. Prediction of embriyonic developmental competence by time-lapse observation and "shortest-half" analiysis. Reprod Biomed Online, 17, 669-75.

Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W, 2004. Methods of embryo scoring in in vitrofertilization. Reprod Biol, 4, 5-22.

Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, Cohen SW, Hamilton M, Simon JA, Marshall JR, 1985. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. Am J Obstet Gynecol, 153, 211-17.

Cha KY, Chian RC, 1998. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. Hum Reprod Update, 4, 103-20.

Chang MC, 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature, 184, 466-67.

Cooper TG, 2010. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5 th ed. Geneva, WHO Press, p. 56-63.

Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martínez M, Pérez-Cano I, Munoz M, Meseguer M, 2011. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. J Assist Reprod Genet, 28, 569-73.

Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B, 2001. Gametler Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim. 1. baskı. İstanbul, Serono Yayınları, s. 50-51.

Delilbaşı L, 2008. In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuar Yöntemleri. Birinci Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, s.4-69.

Dyban A, De Sutter P, Verlinsky Y, 1992.Preimplantation cytogenetic analysis. In: Preimplantation Diagnosis of Genetic Diseases, Ed: Kuliev A, Verlinsky Y, First Ed. New York, Willey-Liss, p. 93-127.

Edwards RG, 1965. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. The Lancet, 286, 926-29.

Finn A, Scott L, O'Leary T, Davies D, Hill J, 2010. Sequential embriyo scoring as a predictor of aneuplodiy in poor-prognosis patients. Reprod Biomed Online, 21, 381-90.

Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, 2001. Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. First Ed. London, Crc Press, p. 1-14.

Gardner RL, Edwards RG, 1968. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferred sexed blastocysts. Nature, 218, 346-48.

Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R, 1995. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization; based on 957 single embryo transfers. Hum Reprod, 10, 2427-31.

Heape W, 1890. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. Proceedings of the Royal Society of London, 48, 457-58.

Hoogendijk CF, Kruger TF, Menkveld R, 2010. Spermatozoonun anatomisi ve moleküler morfolojisi, In: Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi, Ed: Oehninger SC, Kruger TF, Kilciler M. First Ed. İstanbul, Habitat Yayıncılık, p. 1-8.

Jackson KV,Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN, 1998. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with accelerated induction response and lower implantation and pregnancy rates in in-vitro fertilization-embryo transfer cycles. Fertil Steril, 70, 60-66.

Kalaycı Ş, 1986. Histoloji, 1. Baskı, Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, s. 260-88.

Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S, 1996. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. Hum Reprod, 11, 1492-98.

Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S, 2008. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI- fertilized oocytes. Reprod Biomed Online, 17, 385-91.

Lunenfeld, B, 1963. Treatment of anovulation by human gonadotropins. J Int Fed Gynaecol Obstet, 1, 153-75.

Mahadevan MM, Baker G, 1984. Assesment and Preparation of Semen for In Vitro Fertilization, In: Clinical In Vitro Fertilization, Ed: Wood C, Trounson A. First Ed. Berlin, Springer London, p. 83-98.

Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A, 2012. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. Fertil Steril, 98, 1481-89.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohí J, 2011.The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod, 26, 2658-71.

Munne S, Cohen J, 1993. Unsuitability of multinucleated human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. Hum Reprod, 8, 1120-25.

Neuber E, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D, 2006. Sequential embriyo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. Fertil Steril, 85,794-96.

Orhon E, 1995. Sperm Morfoloji Atlası, 1.baskı, Ankara, Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları, s. 17-29.

Ottosen LDM, Hindikjaer J, Ingerslave J, 2007. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during art procedures. J Assist Reprod Genet 24, 99-103.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD, 1997. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. Hum Reprod,12, 532-41.

Pincus G,Shapiro H, 1940. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. Proceedings of the American Philosophical Society, 83, 631-47.

Racowsky C, Ohno-Machado L, Kin J, Biggers J, 2009. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? Hum Reprod,9, 2014-13.

Ross MH, 1985. Histology A Text and Atlas. First Edition. New York, Harper&Row, p. 658-66.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi G, Campana A, 1998. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplacmic sperm injection as an indicator of embryo viability. Hum Reprod, 13, 182-87.

Sathananthan AH, 1991. Centrioles in the begining of human development. Proc Natl Acad Sci, 88, 4806-10.

Steptoe PC, Edwards RG, 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet, 2, 366.

Şeftalioğlu A, 1998. İnsan Embriyolojisi, 3. baskı, Ankara, Tıp Teknik Yayıncılık, s. 7-75.

Trounson AO, 1982. Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. Reprod Fertil Devel, 64, 285-94.

Van Blerkom J, Henry GH, 1992. Oocyte dismorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. Hum Reprod, 7, 379-90.

World Health Organization: The Influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics (editorial),1992. Fertil Steril, p. 1289-93.

8. ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Şükrü UZMAN 1982 Konya doğumludur. Lise öğrenimini Büyükkoyuncu Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2002 yılında Konya Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne başlamıştır ve 2007 yılında mezun olmuştur. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.