

İN VİTRO FERTİLİZASYON'A GENEL BİR BAKIŞ

Nadir Çıray*

İnsan vücudunun dışında oluşan ilk bebek olan Louise Brown, Temmuz 1978'de doğduktan, 1987 yılına kadar, 6.000 klinik gebelik sonucuna gelindi (6).

IVF süreci üç tekniğin bileşiminden oluşur :

- 1 — Birçok oosit elde edebilmek için ovülasyon indüksiyonu,
- 2 — Laboratuvarda oositlerin döllenişmesi ve erken embriyoların geliştirilmesi,
- 3 — Embriyoların rahim içine transferi (embriyo transferi : ET).

Bu basamaklardan herhangi birinden kaynaklanan sorunlar, IVF programının başarısını düşürecektir.

IVF programına alınan hastalar, önceleri Fallop tüpleri hasarına bağlı sekonder infertiliteli çiftlerdi. Günümüzde bu programa en sık alınan ve en başarılı sonuç veren grup da tubal infertilitelere dir. Gerçekte kapalı Fallop tüplerinin açılmasına ilişkin ilk cerrahi yaklaşım, 1895'de Morris adlı bir Amerikalı tarafından over dokusunun rahim içine greftlenmesiyle uygulanmıştır (4). Sonraları, 1922'lerde bu cerrahi yaklaşımın modifiye şekilleri, Estes operasyonu olarak anılmaya başlanmıştır. Son 40 yıldır bu operasyon gene moda olmuştur. Günümüzde bu metodu IVF'e tercih eden merkezler vardır.

Tubal infertilite, artık IVF için tek endikasyon olmaktan çıkmış, buna, nedeni açıklanamayan infertilite, hafif endometriozis ve zayıf semen kalitesi gibileri eklenmiştir (Tablo 1).

Bazı otörler IVF prosedürünün infertil çiftlerde son çare olarak kabul edilmesinden yakınmaktadırlar (3). Gerçekten de koca spermikle tekrarlanan suni döllenişme (AIH), tüplerin mikrocerrahisi ve hatta işi zamana bırakmak gibi yöntemlerden fayda umanların sa-

* A. Ü. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalında Uzman Doktor

Tablo I : IVF Endikasyonları

| Endikasyon | Döllenen Yumurta Oranı (%) |
|---------------------|----------------------------|
| Tubal | 95.2 |
| İdiopatik | 85.2 |
| Erkek infertilitesi | 58.3 |
| İmmünolojik | 90.0 |
| Endometriozis | 85.7 |
| Servikal nedenli | 91.3 |
| Diğer | 93.2 |

yısı az değildir. Doğal olarak olduğu gibi, IVF programında da gebelik oranı, 35 yaşın üzerinde oldukça düşmektedir. Dolayısıyla IVF merkezleri, hasta seçiminde çeşitli kriterleri gözönüne almak zorundadırlar (Tablo II).

Tablo II : Hasta Seçiminde Norfolk Laboratuvarı Endikasyonları.

1. Genel olarak sağlıklı bir çift (evli)
2. Cerrahi operasyona uygun overler
3. Normal fonksiyon gören bir rahim
4. Normal yada düzeltilebilir menstrual fonksiyon
5. 40 yaşın altında olmak
6. Düzeltilecek bir problem. (bkz. Tablo I)

KLİNİK UYGULAMALAR : OVULASYON İNDÜKSİYONU

Patrick Steptoe ve Dr. Robert Edwards'ın çalışmalarının sonucu 1978'de doğan ilk IVF bebeği, bir spontan (doğal) siklusun ürünü idi. Daha sonraları spontan sikluslarla varolan zorluklar, otörlerin IVF'de stimülasyonun gerekliliğine inanmalarına yol açtı. 1981'de Trounson ve arkadaşları, ilk defa stimüle siklusu başarıyla uyguladılar (=ovulasyon indüksiyonu).

Günümüzde insan IVF'inde başarının artımı, büyük oranda over uyarımının sağlanmasında uygulanan metodların gelişimine bağlıdır.

IVF - ET için ovulasyon indüksiyonunda üç amaç vardır (2) :

- 1 — Mümkün olduğunca fazla oosit elde etmek; birçok otör 3 ya da 4 embriyo elde etmenin takip eden basamaklarda gebelik oranını artırdığını ispatlamıştır,

- 2 — Oosit olgunluğunda asenkronizasyondan kaynaklanan başarısızlığı minimale indirmek; uyarılmış ya da doğal bir siklusta, follikül havuzundan olgunlaşacak oositler değişik fazlarda olurlar. Sorunun endojen gonadotropik aktiviteden kaynaklandığı ileri sürülmektedir.
- 3 — Elde edilen oositlerin iyi kalitede olmasını sağlamak, dejenera ve atretik oositlerin miktarını düşürmek.

Ovulasyon indüksiyonunun neden olduğu follikül asenkronizasyonu, değişik büyüklük ve olgunluktaki folliküllere sebep olur. Daha büyük bir follikülde daha olgun bir oositin bulunacağı tezi doğru değildir (2). Optimum ovum kalitesi yumurtanın iyi döllenebilme ve gelişimine rahim içinde devam edebilme karakterine sahip olması demek olduğuna göre, ovum kalitesini geliştirmek en önemli bir faktördür.

Oosit toplanması sırasında başlıca üç tip yumurta elde edilir; olgun olmayan, ara ve olgun. Bu sınıflandırma, korona ve kumulus hücrelerindeki musifikasyon ve yayılıma göre yapılmıştır. Çünkü ooplasm ve perivitellin mesafe direk olarak incelenemez. Olgun olmayanlar birkaç sıkı korona ve kumulus hücre tabakasına sahipken, olgunlaşma ile korona ve kumulus hücreleri yayılır ve sperm geçişine imkan tanırırlar. Dr. DeCherney, Yale protokolünde % 6 olgun olmayan, % 66 ara ve % 28 olgun ovum toplandığını belirtiyor (2). Trounson ve ark. 1982'de, Veeck ve ark.'da 1983'de preovulatuvar (ara ve olgun) oositlerin, spermatozoa ile karşılaştırılmalarından önce 6 saat inkübe edilmelerinin, döllenme oranlarını yükselttiğini ileri sürdüler. Öte yandan bu süre olgunlaşmamış oositler için 24 saattir. Korona ve kumulus hücrelerinin uzaklaştırılmasından sonra, oosit sınıflaması yapılabilir. Bu durumda germinal vezikül olgunlaşmamış bir yumurtayı, bu vezikülün parçalanması ara fazı ve kutup cisimciğinin atılması ise olgun bir yumurtayı belirtir.

OOSİT TOPLANMASI :

Uyarılmış bir siklusta, ilk amacın gelişimini tamamlamış maksimum sayıda oosit toplamak ve aynı zamanda, çok sayıda follikülün büyüme ve gelişiminden doğan asenkroniyi minimale indirmek olduğunu belirtmiştik. Prensipten olarak bunu sağlamak siklusun erken folliküler fazında, yani negatif feed-back mekanizmasının FSH düzeyini aşağıya çekmesinden önceki 4. - 5. günlük «FSH penceresi» denen zamanda, yüksek FSH düzeylerine çıkabilmekle başarılabilir (7).

Öyle görünmektedir ki, FSH penceresi sırasında yapılacak hiperstimulasyonlar, birçok follikülleri değişik safhalarda gelişime başlatacak, bu da asenkroniyi artıracaktır. Asenkroni ne kadar geniş olursa, folliküllerdeki oositler için o kadar farklı endokrin çevre oluşacak, bu da, o kadar farklı dölleme, yarıklanma ve implantasyon oranları ile bunlara sebep sayılabilecek hasarlı veya asenkron bir luteal çevreye yol açacaktır. Hangi protokol kullanılırsa kullanılsın, oosit toplanması sırasında üç ya da dört, 16-18 mm çapında yumurta elde edilmelidir. Oosit toplanması, HCG verimini takiben 34-36. saatlerde, ya da idrar LH yükselmesini takiben 26-28. saatte yapılmalıdır. Protokol mükemmel bile uygulansa, oosit toplanma zamanlaması da çok iyi olsa, bazı oositler gene de asenkron olacaktır, bundan dolayı son olgunlaşma için, inseminasyondan önce bir miktar inkübe edilir.

Günümüzdeki verilere göre (4) toplanan oositlerle dölleme oranı çoğu programla % 70-80 dolaylarındadır. Gebelik oranlarındaki % 16-20 oranı ise embriyo transferi sırasındaki kayıplara bağlanmaktadır.

Oosit toplanmasında dört faktör gözönüne alınmalıdır :

- 1 — Folliküllerden mümkün olan en çok sayıda oosit toplamak,
- 2 — Oosit çevresine minimal hasar vermek,
- 3 — Hasta riskini minimale indirmek,
- 4 — Kullanılan teknik basit ve ucuz olmalıdır.

Laparotomi ile oosit toplanması, morbiditesi ve daha üstün tekniklerin gelişmesi nedeniyle, kısıtlı bazı endikasyonların dışında kullanılmamaktadır. Günümüzde, laparoskopi ya da ultrason gözleminde oosit aspirasyonu en sık kullanılan metodlardır.

Laparoskopi eşliğinde aspirasyon endikasyonları açısından da bazı sınırlamalar vardır; şiddetli pelvik yapışıklığı olan vakalarda kullanılamaz. Oysa IVF/ET programına dahil olan vakaların çoğu önceden çeşitli pelvik operasyonlar geçirmiş ve bu özelliğe sahip vakalardır. Üstelik laparoskopik hâlâ invaziv bir metod sayılıp, genel anestezi gerektirmektedir. Bu nedenle ultrason eşliğinde aspirasyon yöntemi geliştirilmiştir.

Ultrason eşliğinde aspirasyonda iğne yerleşimi üç yoldan olur :

- 1 — Transvezikal yol : abdominal bir transduser ile,
- 2 — Transvajinal yol : abdominal veya vajinal bir transduser ile,
- 3 — Transuretral yol : abdominal bir transduser ile.

Transvezikal yol, lokal ya da spinal anestezi ile yapılır. Mesane 300-500 ml FTS ile doldurulur. Aspire edilecek follikül yerleşimi saptanır, ultrason ile en iyi kalitede görüntü sağlanır. Transduser aspirasyon hattının, follikülün en büyük çapını çaprazlayacak şekilde ayarlanır. Aspiratör kontrol edildikten sonra, iğne hızla ve kuvvetlice mesaneye sokulur, ultrason ile iğne takip edilir. İğne follikül yüzeyine getirilir. Folliküle hızla batırılır, hemen aspirasyona başlanır, bu sırada iğne daire şeklinde ve yukarı aşağı hareket ettirilir. Sabit emiş devam ederken, iğne hızla çekilir ve medium ile çalkalanır.

Follikül içi küretaj, teflon tüpe kanlı sıvı gelene kadar devam ettirilmelidir. Ancak follikül sıvısı kanlanmadan önce alınacak bir miktar sıvı, embriyolojistin işine yarayacaktır. 8 mm'yi geçen her follikül, birer birer aynı yöntemle aspire edilmelidir. Aspire edilen folliküller sıvı hemen tetkik edilmeli, eğer hiç oosite rastlanmazsa, tekrar girilmelidir. İşlem follikülün içi kanla dolana kadar sürdürülmelidir. Transvezikal yol ile başarı oranı % 70-90 arasındadır. Hasta karın içi kanama yada hematürinin kontrolü açısından operasyondan sonra 2-3 saat hastanede tutulur.

Transvajinal yolda, aspirasyon vajina yolu ile yapılır. Avantajı, daha kısa bir mesafe katedilmesi ve mesanenin önceden doldurulmasına ihtiyaç olmamasıdır.

Transuretral yol, gene abdominal bir transduser ile ve dolu bir mesane ile yapılır. İğne mesaneye bu kez uretra yolu ile ulaştırılır. Bu yöntemin avantajı, ultrason ile iğnenin kolay görülür olmasıdır. Zorluğu ise, tecrübeli bir el gerektirmesi ve rahimin arkasında kalan ya da pelviste çok yukarılarda yerleşik overlere ulaşamamasıdır.

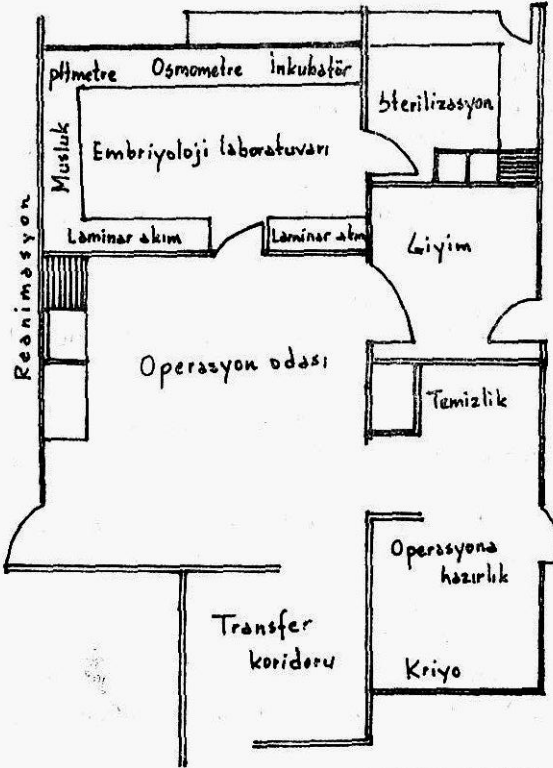
IVF programına alınan hasta önceden herhangi bir nedenle tubal cerrahi geçirmiş, yada şüphelenilen bir tubal hastalığı olmuş ise, oosit toplanmasına geçilmeden önce bir kez laparoskopiye tabi tutulmalıdır. İleride ektopik gebelik riskine girilmemesi açısından bu tetkik çok önemlidir.

IVF LABORATUVARI :

IVF laboratuvarına ilk gerekli olan iyi bir embriyolojisittir. Çünkü yukarıda da bahsedildiği gibi, yüksek bir gebelik oranı, iyi kalitede birkaç oosit ile mümkündür ve bu kalite değerlendirmesini de iyi bir embriyolojist yapabilir. Zira günümüzde oosit kalitesini değerlendirme kriterlerinde, klinik bulguların (östrojen değerleri) morfolojik bul-

gular kadar iyi sonuç vermediği anlaşılmıştır. Embriyolojist, gereğinde henüz olgunlaşmamış oositleri saptayarak, koca spermliyle inseminasyona geçmeden 6 - 8 saat daha inkübasyona karar verebilir.

Programın başarısı laboratuvar koşullarıyla da çok ilgilidir. En iyi IVF laboratuvarı, kültür odasının veya embriyoloji laboratuvarının, cerrah ile embriyolog arasında direk sözlü ve görsel temasına imkan verecek şekilde, operasyon odasının komşuluğunda olduğu şekildedir (Şekil I). Diğer bir deyimle IVF laboratuvarında oosit, follikül ve kültür plağı arasında, embriyo da kültür plağı ile hasta arasında en kısa mesafeyi katetmelidir.



Şekil 1 - IVF laboratuvarının şeması

Laboratuvar, değişik tipte mikroskop sistemleri ve kontrollü inkübasyon sistemleri içermelidir. Çoğunlukla yumurta, sperm ve embriyo kültüründe standart herhangi bir ısı kontrollü CO₂ inkübatörü yeterlidir. Kullanılan gaz karışımı çoğunlukla 90 % nitrojen, 5 % CO₂ ve 5 % O₂ şeklindedir. Bazıları ise 5 % CO₂ - hava karışımını kullan-

makta ve diğerlerinin gereksiz ve masraflı olduğunu söylemektedirler (4). Oositin folliküler sıvı aspiratında kolay ve çabuk görülebilmesi çok önemli olduğundan, diseksiyon mikroskobu gerekecektir. Oosit görüntülenmesinde 5 - 50 arası büyütme yeterlidir. Oositlerin olgunlaşmanın değişik fazlarında olmaları, oosit olgunluğunun tespiti açısından sitoplazmik yapıların kolay görüntülenmesini, dolayısıyla da faz-kontrast mikroskobunu gerektirir. Semen ayırımından önce ve sonra değerlendirilmesi ve sayımı açısından ışık mikroskoba ihtiyaç vardır. Laboratuvarında laminar hava akımı sistemleri gereklidir, ancak mikroskop sistemlerinin bu akım içinde olmaması lazımdır. Çünkü bu akım, ısıyı düşürerek kültür ortamındaki oosit kalitesini bozabilir. Sperm ayırımı için, değişik hızda santrifüjlere ihtiyaç vardır. Diğer ihtiyaçlar arasında medium osmolaritesinin kontrolünde kullanılacak osmometre, pH kontrolü için pH metre ve çeşitli plastik malzeme sayılabilir.

Kullanılacak media için bir sınıflama yoktur. Çeşitli merkezler değişik media kullanmaktadır (Tablo III). Media içeriği açısından en önemlisi kullanılan suyun saflığıdır. Çoğu merkezler 2 - 5 kez distile edilmiş deiyonize su kullanırlar. Herhangi bir kültür mediumu için en önemlilerinden biri, kalite kontrol tayınidir. Bu açıdan en basit

Tablo III : IVF'de Kullanılabilen Kültür Media'sı.

| | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Earle'ün Dengeli Tuz Solüsyonu | Hoppe ve Pitts |
| Ham'ın F - 10 | B ₂ (Menezo) |
| B ₃ (Menezo) | Modifiye T ₆ |
| CMRL 1066 | HTF (Quinn, Warnes) |
| Tyrode'ün (ve modifiye şekilleri) | |

test, sperm yaşam sürdürmesidir. İnsan spermatozoası yıkandıktan sonra kültüre alınır, 72 saat süresince spermin yaşamını ve motilitesini devam ettirmesi, kültür mediumunun oosit - embriyo kültürüne uygun olduğunu gösterir. Kimi otörlerde, in vivo döllendirilen fare embriyolarının iki hücreli dönemde alınıp, 96 saat kültür ortamında blastosist oluşumunun gözlenmesini önerdiler.

Mediumun besin kaynağı içerdiği protein ile ilişkilidir. Protein kaynağı hasta serumu olabileceği gibi (4), fetal kordon serumu da olabilir. Birinin diğerine üstünlüğü kanıtlanmamıştır (7). Fetal kordon serumu üzerinde yapılan fraksinizasyon çalışmaları, tek hücreli embriyolarda 1000 - 5000 mol. a.g. arası proteinlerin destekleyici, 1000'-

den az ve 30.000'den fazla mol. ağırlıklı proteinlerin ise inhibitör etkili olduklarını göstermiştir (7). Kültür mediumu içinde ayrıca sodyum piruvat, penisilin, sodyum bikarbonat gibi maddeler çeşitli oranlarda bulunabilir (4).

OOSİT-SPERM KÜLTÜR TEKNİKLERİ, İN VİTRO BÜYÜME VE EMBRİYO TRANSFERİ :

Operasyonda alınan follikül sıvısı özel toplama havuzları ile laboratuvara getirilip, petri plağına boşaltılır.

IVF kültür prosedürlerinde ilk basamak, elde edilen folliküler sıvı aspiratında preovulatar oositi saptamaktır. Folliküler sıvı alımı ve kumulus - korona oosit kompleksini ayırmada çeşitli teknikler vardır. Folliküler aspiratı alır almaz 1 - 2 ml'lik parçalar halinde kültür tabakalarına ayırıp, düşük büyütme diseksiyon mikroskobu ile taramak bir yöntemdir. Görüntülenen kumulus kompleksleri, içlerinde oosit olup olmadığını saptamak için yüksek büyütmede gözlenir. Oosit varsa, tabaktan folliküler sıvı uzaklaştırılır. Bu işlem, folliküler sıvının uzaklaştırılması sırasında oosit-kumulus kompleksinin bu sıvı ile yıkanması ve petri plağı içindeki bir kültür damlasına «dölllenme mediumu»nun yerleştirilmesi şeklinde olur. Petri plağı 37°C'deki bir ısıtıcı tabaka üzerinde olmalı ve bir ters filtre bacası ile gaz faz sağlanmalıdır. Yıkama mediumu yada folliküler sıvının ısıtıcı tabaka üzerinde parafin ile kaplanmadıkça bırakılmamasına dikkat etmelidir, aksi halde buharlaşma ile osmolarite artacaktır. Bu işlem kumulus - korona kompleksinde gerilmeye neden olur. Kumulus kitlesi gerilince, korona hücreleri üzerine odaklaşma gerçekleştirilebilir ve I. kutup cisimciğini içeren II. metafaz oositi görüntülenebilir. İlk görüntüleme için kullanılan petri plaklarının altı, oosit varsa işaretlenir, böylece diseksiyon mikroskobundan ters faz-kontrast mikroskoba geçilirken tanınır.

Bundan sonra oosit sınıflaması yapılır. Çeşitli yöntemlerin kullanıldığı bu basamakta çoğunlukla sitoplazmik olgunlaşma gözlenir. Kumulus kitlesinin yaygınlığına göre yapılacak sınıflama kullanılan protokoldeki ilaçlara göre değişeceğinden yanlış olabilir. Oysa sitoplazmadaki germinal vezikülün yada I. kutup cisimciğinin faz-kontrast mikroskobu ile saptanması, daha kesin bir yöntemdir. Sitoplazmanın,

korona-kumulus kompleksinin kalınlığı ya da yayılmaması nedeniyle seçilemediği durumlarda hyaluronidaz enzimi dilue edilerek kullanılabilir. Oosit 300 IU/ml Ham'ın mediumu, 7.5 % serum ve hyaluronidaz içeren solüsyonda, Pasteur pipeti ile çekilip bırakılarak bu işlem yapılır. 60 saniye içinde, hücreler ayrılmış olur.

Oositler bu işlemlerle sınıflandırıldıktan sonra, iki kez yıkanıp kültür mediumunu içeren dölleme plaklarına alınır. Aspirasyondan bu basamağa kadarki işlemler 60 - 90 saniye sürer. Kısa gibi görünen bu süre yeterlidir çünkü oosit folliküler sıvının ya üst 1 ml'lik kısmında yüzer yada dibe çöker. Eğer her ikisinde de yoksa diğer kısımların hızlıca taranması gerekir (4).

IVF programına başlarken, semen analizi ve seminal plazmada bakteriyolojik kültür yapılmalı, mediumun kontaminasyonu önlenmelidir. Sperm, oosit toplanmasından yarım saat önce toplanmalıdır. Son anda bir aksilik ihtimaline karşı, önceden bir miktar sperm örneği alınıp dondurulmalıdır (4).

Farklı sperm hazırlama teknikleri içinde en çok kullanılan seminal plasma dilüsyonu ve motil spermatozoa toplanması için santrifugasyonunu takiben yüzdürme tekniğidir (7). Serum desteğindeki medium ile üç defa yıkanan spesimen, x 300 g'de santrifuj edilir, üstte kalan kısım atılır, 2 ml taze medium'da yeniden yayılır ve x150 g'de 10 dakika tekrar santrifuj edilir. Üstte kalan kısım tekrar atılır, alttaki sperm pıhtısı 1 ml santrifuj tüpündeki mediaa yayılıp 30-45 dakika inkübe edilir. Bu sürenin sonunda üstteki kısım atılır, altta sperm kalite tayini yapılır. Kalite tayini için, sperm profili incelenmesinin yeterli olmadığı bilinmektedir. Yapılması gereken, sperm fonksiyonel kapasitesini, yani dölleme yeteneğini saptamaktır. Kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu, zona'sız hamster oosit penetrasyonu testi ile anlaşılır. Sperm hareketinin direk analizi, zamanlı fotomikrografi ile yapılır. İndirek olarak da servikal mukus reaksiyonu ile tayin edilir. Bu test domuz ya da insan servikal mukusunun insan spermatozoa'sı ile penetrasyonunu ifade eder ve sperm başının yansal yer değişimlerinin yeterliliği ile ilgilidir. Yansal yer değişim hareketine «hiperaktive motilite» de denir ve sperm zonayı delerken yaptığı harekettir. Bu test, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve vitellin zar ile kaynaşma hakkında bilgi vermez. Bu bilgi için, zona'sız hamster oosit penetrasyon testi gerekir. Testin biyolojik anlamı,

sperm-oosit kaynaşmasının, yalnızca spermatozoonun kapasite olup, akrozom reaksiyonuna gittiği halde gerçekleşmesidir. Bu test ile % 10 un altında oosit penetre olursa, insan oositinin penetre olamadığı saptanmıştır.

İnseminasyonda kullanılacak sperm sayısı 20.000 - 1.000.000 motil sperm/oosit olmalıdır. Eğer erkek kaynaklı bir infertilite söz konusu değilse, bu sayı 50.000'e kadar inebilir. Erkek problemine bağlı olarak sperm ayırım metodu değişebilir. Zona'sız hamster oosit testi ile penetrasyon yeteneği olmadığı ve motilitesinin azlığı saptanan spermeler, Percoll'ü gradient olarak kullanan ayırım tekniklerine maruz bırakılırlar. Percoll, yüksek motiliteye sahip, dolayısıyla gelişmiş penetrasyon yeteneğine sahip spermatozoayı ayırdeden bir gradienttir. Bu yöntemle bile çok az motil spermatozoa toplanırsa, sperm konsantrasyonunu artırıcı metodlar uygulanır. Motil spermatozoa içeren medium mikrodamları, kültür plağının dibine konur ve oosit direk bu mikrodamla üzerine bırakılır. Ardından parafin içinde kültür işlemi yapılır. Oositler spermatozoa ile karşılaştırıldıktan sonra, 12-18 saat pronukleus oluşumunun kontrolü açısından gözlenir. Bu 12-18 saat süresinde oosit-sperm karışımı ellenmez. Sonra diseksiyon mikroskobu ve Pasteur pipeti yardımı ile kalan kumulus-korona kompleksi temizlenir. Oositin pronukleer fazını görüntülemek iki nedenle çok önemlidir, ilki döllenmenin olduğunu anlamaktır. İki pronukleus ve II. kutup cisimciğinin saptanması bunu gösterir. İki pronukleus oluştuysa, normal bir döllenme beklenir. Ancak ikiden fazla ise polispermik döllenme olmuştur. Polispermik döllenmede normal bir morfolojik gelişme çoğunlukla gerçekleşir (4). Bu riski azaltmak için motil spermatozoa sayısının 20.000/ml'ye indirmenin bir çözüm olacağı iddia edilmektedir (4). Rastlanabilen diğer anomaliler, blastomer ebadlarındaki düzensizlik ve sitoplazmik fragmanlardır. Eğer tüm embriyolar aynı morfolojik özelliklere sahip ise, gelişmenin en ileri safhasındaki veya en çabuk yarıklananlar seçilmelidir (4).

Döllenme olmamışsa, taze bir semen örneği ile 18-24 saat içinde yeniden inseminasyon denenirse, % 40-50 döllenme ve yarıklanma şansı vardır. Döllenmenin 24 saat içinde olmaması büyük oranda oositin yeterli olgunluğa ulaşmamasından kaynaklanır ve «gecikmiş döllenme» adını alır (4). Ancak 36 saati geçen sürede olmaması, oositin fazla yaşlı olmasına bağlanmaktadır (7).

Döllenme olduktan sonra medium, taze ve serum konsantrasyonu daha yüksek olanı ile yenilenir. Embriyo transferinden önce, 24-48 saat bu ortamda kalır. Döllenme olduktan sonra yarıklanma durması olabilir. Kromozom anomalileri de sık rastlanan ancak çoğunlukla implantasyondan önce kaybolan olgulardır.

Günümüzde ciddi IVF merkezlerinde kriyo üniteleri vardır. Gamet dondurulması rutin hale gelmiştir. Oositin elde edilip, kocanın taze sperm üretilmediği hallerde, ya da annenin durumunun ET için uygun olmadığı hallerde, bu işlemin faydası vardır. Aynı zamanda elde edilen embriyo adedinin, transfer edilecekten fazla olduğu hallerde de kriyo ünitesine ihtiyaç vardır.

Embriyo kriyoprezervasyonunda, gliserol, dimetilsulfoksit ve propanediol gibi kriyoprotektanlar kullanılır. Embriyolar, 4 ya da 8 hücreli safhada dondurulabileceği gibi, blastosist oluşumundan sonra da dondurulabilir.

Embriyo transferinde Wallace kanülü kullanılır. Önceden ultrason ile uterus ebadı hakkında fikir edinilirse, kanül eksternal os'tan sokulduğunda kavite tepesinden 1 cm aşağıda embriyo zerki kolaylaşır. Kanül çıkarılınca embriyolojist tarafından mikroskopik olarak parça kalmaması için kontrol edilir.

Multipl implantasyon yapılan hastalar, fetuslarının bir ya da daha fazlasını, diğerlerinin gelişimi sırasında kaybederler. Bunlara «kaybolan fetuslar» denir (3).

IVF ile gebelik tayininde beta-HCG tayini yanıltıcı sonuç verebilir (1,5). 100 siklus ile yapılan bir çalışmada, hassas beta-HCG tayinleri ile 60 gebelik saptanmış, bunlardan klinik olarak 25 gebelik meydana gelmiştir.

SUMMARY

IVF : A Brief Overview

In this article, an introduction to in vitro fertilization has been made, followed by the clinical management, oocyte pick-up, IVF laboratory and oocyte-sperm culture techniques, growth of human conceptus in vitro and finally, embryo transfer.

The importance of this process is tried to emphasize with particular attention on the presence of the embryologist in the procedure.

KAYNAKLAR

1. DeCherney AH : IVF and Embryo Transfer : A brief overview. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 59 : 409-414, 1986.
2. DeCherney AH Tarlatzis BC Laufer N : Follicular development : Lessons learned from human in vitro fertilization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 153 (8) : 911-923, 1985.
3. Edwards RG : IVF : past and future. *Annals of Biological Clinics*, 45 : 321-329, 1987.
4. Fishel S Symonds EM (ed) : *In vitro fertilisation, past, present, future*. IRL Press, Oxford, Washington DC, 1986.
5. Jones HW ve ark : What is a pregnancy? A question for programs of in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 40 (6) : 728-733, 1983.
6. Li-zhu Z ve ark : Pregnancies following IVF and ET and following GIFT. *Chinese Medical Journal*, 101 (5) : 303-304, 1988.
7. Marrs RP (ed) : *Human IVF*. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 29 (1) : 117-188, 1986.
8. Tesarik L Testart J : Human sperm-egg interactions and their disorders : implications in the management of infertility. *Human Reproduction*. 4 (7) : 729-741, 1989.
9. Tesarik L : Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of human cleaving embriyos obtained by IVF. *Human Reproduction*. 2 (2) : 127-136, 1987.