

ASİSTE KONSEPSİYONDA MİKROMANİPÜLASYONLAR:

Dr. V. Dayıoğlu(*)

Asiste konsepsiyonda mikromanipülasyonlar başlığı altında incelenen mikromanipülasyonlar; gametler ve implantasyon öncesi embryolar üzerinde uygulanan çeşitli teknikleri ve araştırmaları içine almaktadır (41).

Mikromanipülasyon uygulamaları arasında; zona pellusidanın ortadan kaldırılması, blastomerlerin ayrılması, çıplak hale getirilmiş embryo ve blastomerlerin birleştirilip biraraya geterilmesi, erkseblastokist kavitesine, tek ya da grup halinde hücrelerin enjeksiyonu, izole blastomerlerin, yabancı zona pellusida içine enjeksiyonu gibi işlemler yer almaktadır (20).

Konunun incelenmesini Tablo I de sunulan başlıklar altında sürdürmek uygun olacaktır (Tablo I).

Mikromanipülasyon teknikleri, intervertebralılarda ve alt grup hayvanlarda yaklaşık olarak, bir asırdır uygulanmaktadır. Ovumun içine sperm enjeksiyonu işlemi, ilk olarak 1962 de, Hiramoto tarafından deniz

kestanelerinde denenmiş; deniz yıldızları üzerinde de araştırmalar sürdürülmüştür. Memeliler üzerinde ilk ovum enjeksiyonu işlemi, 1966 da, Lin tarafından, fare deneyleri şeklinde sunulmuştur (43).

İn vitro fertilizasyonu gelişiyle; erken dönem insan embryoları da mikromanipülasyon materyali olmuştur. 1976 da Hamster ovumlarına insan ve Golden Hamster spermi mikroinjeksiyonu; kendi ailesinin oositleri içinde mikroinjeksiyonu tekniği tebliğ edilmiştir. 1986 da Gorden ve ark. tarafından, fare modeli üzerinde, oligospermide fertilizasyon sağlayabilme amacına yönelik ilk araştırma sunulmuştur. 1988 de, mikromanipülasyon teknikleri ile ulaşılabilen ilk insan gebeliği, son 2-3 yılda bu sahaya ilgiyi daha da arttırmıştır. Nihayet 1989'larda, bu tekniklerden biri sayesinde, insanlarda vibal gebelik elde etmek düzeyine ulaşılabilmektedir (10).

Zona pellusida, bilindiği üzere, aselüler, glikoprotein yapılı bir oluşum olup;

(*) Zeynep Kâmil Hastahanesi Şef Muavini

ZEYNEP KÄMİL TIP BÜLTENİ

spontan iyileşmesi, kendini onarması mümkün deildir (32). Öte yandan zona pellusidanın; insanlarda sperm penetrasyonunun engelleyici ana blok olduğu kabul edilmektedir. Böylece, spermin zonayı penetre etme yeteneğinin sınırlı olabileceği durumlarda; bu engeli aşmayı sağlayıcı işlemler yararlı olabilir.

Tablo 2'de, zona pellusidanın, fertilizasyon ve preimplantasyon aşamalarındaki yapısal ve fonksiyonel rolü izlenmektedir (16).

Gordon, zonayı, ince bir mikropipet yoluyla verilen, asit tyrode solüsyonu ile delmiştir. Bu amaçla; tyripsin, pronase gibi enzimler de kullanılmıştır. Zona üzerindeki işlemlerde, değişik fiziksel temele dayalı çeşitli teknikler denenmiştir.

Tablo 3'de, zonanın delinmesi ve benzeri işlemler sunulmaktadır.

"Zonanın delinmesi", genel bir terim; olup zonanın, fiziksel, kimyasal ya da kombine tekniklerle tahribini içerir (3, 26).

Örnek olarak Gordon ve ark.nın, 1988 de, 47 insan oositi üzerinde infertil erkek spermi kullanarak, fertilizasyon arama sonuçlarını görelim: Bu işlemlerde, araştırmacılar, esas olarak asit tyrode kullandılar. Bazılarında ise, kemotripsin ile zonayı yumuşayıp; mekanik perforasyon yaptılar. 10 olgularından 9 tanesi, en azından bir kez, önceye ait, fertilizasyonla sonuçlanmamış ve IVF girişimi öyküsü taşıyordu. 47 oositte 31 yaşantı sürdürdü ve bunlardan 10 tanesi fertilite oldu. Üç olguda, elde edilen embriyolar, transfer edildi, ancak gebelikle sonuçlanmadı (12).

Zona drilling tekniğinde karşılaşılan önemli bir sorun; bu işlem nedeniyle; ovu-

mun, ikinci meiotik bölünmesinin muhtemelen anafaz 11 aşamasında arrestine yolaçabilemesiyle ilgilidir. Zona üzerinde, sperm mikropipeti kullanımından önce, kalınlığının 3/4'ü kadar çukur açılması da denenmiş ve gene aynı nedenle başarılı olamamıştır. (Bazı otörler ise, bu meiotik arrestten, zona delme işleminde kullanılan asit fosfat buffered salini sorumlu tutmuşlar; cytochalasin D varlığında ise, aynı arresti görmediklerini bildirmişlerdir (8).

Zonanın kesilmesi tekniği; esasında, fertilize ovumlarda nüklear manipülasyonları kolaylaştırmak için geliştirilmiştir. Bu teknikte de, meiotik arrest sorunu ile karşılaşmıştır (6). Zonanın kırılması, mikromanipülatör yardımıyla yönlendirilen ince cam kanca arasında, zonanın mekanik olarak kırılması işlemine verilen isimdir. Fare ovumları ile yapılan bir araştırmada; 10.000 motil sperm/ml ile inseminasyon yapılan kırık zonalarda; 60 ovumdan 24 tanesinde (%40) "Hatching blastokist" olduğu ve bu oranın, kontrol grubu ovumlardakine göre belirgin yükseklik gösterdiği (6/45 = %13.3) bildirmiştir (42).

Zona kırılması tekniğinin bir modifikasyonu da; Cohen tarafından 1988 de sunulmuştur: Bu teknikte, zona gene mekanik kuvvet kullanılarak ve fakat "parsiyel" olarak açılmış; bu tekniğe de "Parsiyel zone disseksiyonu" (PZD) adı verilmiştir (18, 21, 44).

Tablo 4'de, PZD ile alınan ilk sonuçlardan bir örnek görülmektedir. PZD yapılan oositler, daha sonra, makroinseminasyonlardakine benzer şekilde inseminasyon mediasına konulmuş; kontrol grubuna göre fertilizasyon başarısı daha yüksek bulunmuş (%24'e karşılık, %63) ve iki de gebelik elde edilebilmiştir.

Sayılan teknikler içinde; insanlarda sadece PZD ile viabl gebelik düzeyine ulaşılabilmektedir (1, 2, 5).

“Assisted hatching” tekniği, parsiyel zona disseksiyonunun bir modifikasyonudur. Teknikleri hemen hemen aynı olup, farkı şudur: “Assisted hatching”, oluşan embryonun, zonadan kurtulmasını sağlayıcı bir yaklaşımdır ve teknik olarak da, hyaluronidaz ve sukroz kullanılmamaktadır (7).

Asiste üreme teknolojilerinde embryonik kayıp nedenleri arasında folliküler çevre ve endometrial reseptivite; gamet ve embryoların maruz kaldıkları lokal şartlar; embryonik implantasyon sorunları; birçok erken konseptusun, genetik olarak bozuk yapı içermesi gibi faktörler üzerinde durulmaktadır (42a). Bu faktörlere ek bir madde olarak da, bazı otörler, embryonun, zona pellusidadan kurtulma aşamasındaki yetersizlikleri eklemektedir ki; “asisted hatching” yöntemine de, bu alanda yer verilmektedir.

“Mikrofertilizasyon”, mikromanipülatör yardımıyla ulaşılmış ovumun fertilizasyonu anlamına gelir. Fertilizasyon; spermin, ovumla bütünleşmesi sonucunun ifadesidir. Öte yandan “inseminasyon” terimi ise, basit olarak; sperm ilave etme işlemi anlamına gelir. Mikroinseminasyon terimi de, makroinseminasyon terimine karşılık teklif edilmiştir ki, burada, vaginal ya da herhangi bir düzlemde, ovuma sperm ilavesi işlemi aklı gelir. İlgili bazı otörler, şu terimleri önermişlerdir: (28)

Mikroinseminasyon ile sperm transferinde; sperm tek olarak ya da grup halinde, perivitellin mesafeye-zona altına uygulanır ve yöntem: “Mikroinseminasyon sperm

transfer” (MIST) olarak isimlendirilir. Yahut da sperm; direkt olarak sitoplazma içine enjekte edilir ve yöntem “Sitoplazma içinde mikroinseminasyon-mikrofertilizasyon” (MİMİC) olarak isimlendirilir (28).

Tablo 5 de, MIST tekniğinin olumlu yanları sunulmaktadır. Sperm ya da spermeler; uç kısmında 4-6 milimikron iç çapı olan incelikteki bir mikropipet yardımı ile, zona arkasında, perivitellin mesafeye konulur. Perivitellin mesafe, bu transferi kolaylaştırmak için genişletilebilir. Pipet kalınlığı, oolemma ya da zonaya hasar verici sayılmaz. Bu yöntem ile, normaldakine yakın, sperm ovum ilişkisi sağlanmış olur (13).

Tablo 6 da, MIST’in olumsuz yönleri sunulmaktadır (37).

Sperm ve ovumun yanyana getirilmesi; füzyon için yeterli değildir. Mesela akrosomu intakt olan insan spermi perivitellin mesafeye transfer edildiğinde, ovum ile füzyon yapmamaktadır (39).

Kemiricilerde aksorom reaksiyonu daha uniformdur. Örneğin farelerin epididimlerden toplanıp, kapasitasyon mediumunda inkübe edilen spermelerin, yarım saat sonra %8’i, iki saat sonra %25 ila %40 kadarı, akrosom reaksiyonunun tamamlama konusunda, belli süreler için, daha düşük yüzdeler göstermektedir. Mesela kapasitasyon mediumunda altı saat inkübasyon yapılmış spermelerin sadece %10-30 kadarı kapasitasyon yapabilmektedir (27).

1987 de King ve ark; spermi gece boyunca enkübe etmek için, kalsiyumdan fakir; strontium temelli mediumlar kullanmışlar; spermin, daha sonra kalsi-

ZEYNEP KÄMİL TIP BÜLTENİ

yumlu medium içinde yıkanması ile de, "senkronize akrosom reaksiyonu" başlatmayı başardıklarını ileri sürmüşlerdir.

Tek sperm transferi için, akrosom reaksiyonu senkronizesasyonu sağlama ve geliştirmeye yönelik yeni bilgilere ihtiyaç olduğu söylenebilir.

Subzonal sperm transferi (MIST) tekniğinde fertilizasyon etkinliği benzer koşullarda yapılan in vitro fertilizasyona göre, daha düşük bulunmuştur ve bu durum, hem tek, hem de multipl sperm transferi halinde geçerlidir (4,34).

Tablo 7'de, spermin, ovum sitoplazması içinde direkt verilmesi tekniği özetlenmektedir. Tek sperm, teknik olarak, çok minimal miktarda suspansiyon mediumu içinde, ooplazma içine enjekte edilmekte; bu medium da, ovum metabolizmasını destekleyici özellikte olup; %10-20 oranında, poly vinyl pryolidon içermektedir. Spermin ovum sitoplazmasına direkt enjeksiyonu, oolemma'nın seçicilik özelliğini aşmakla eşanlı tutulabilir.

Tablo 8'de, spermin ovum içine direkt enjeksiyonun olumsuz yanları sunulmaktadır: Örneğin 1988'deki bir araştırmada, 20 insan oositinden 5-8 kadarının, sitoplazma içine direkt enjeksiyonları sonrası, dejenere oldukları bildirilmiştir (28).

Multipl sperm enjeksiyonu yapılan ovumların birçoğu, dejenerasyon belirtisi göstermektedir. Kullanılan sperm başlarının; akrosom reaksiyonunu yapmamış, yapmakta ya da tamamlamış olmasının da, başarı yüzdesini fazla etkilemediği; sperm nükleusunun, akrosom reaksiyonuna rağmen, genişlemeyebildiği bilinmektedir (30).

Enjekte edilen sperm nükleusunun gelişimine devam edebilmesi için; oositin, enjeksiyon prosedürü ile "aktive edilmesi" gereği vardır (31). Hamster oositlerinin aktivasyonu; sperm nükleusu enjekte edilmeden önce, sitoplazmanın bir kısmının emilmesi ile indüklenebilmektedir. Bu tür işlemler, sperm başının, kuyruğundan ayrılmış olmasını da gerektirmektedir. Sonuçta dış akrosom membranı da ortadan kalkmakta; sperm başının "parsiyel demembrasyonu" sağlanmakta, böylece sperm nükleusu; dekonpanse olabilmekte = genişleyebilmektedir (27).

Fertilizasyon başarısını artırmak için denenen mikromanipülasyon tekniklerinde; tek sperm mi? çok sayıda sperm mi kullanılması daha iyi sonuç vermektedir?

MIST uygulamalarında, "Multipl sperm transferi", teorik olarak avantajlı görülmektedir. Çünkü oolemma düzeyinde sperm seleksiyonu şansı sağlanmış olur. Bu özellikle erkek subfertilitesi durumunda önem kazanır: Çünkü bu durumda, yapısal ya da genetik olarak anormal spermeler daha fazla oranda varolabilir ve sperm seleksiyonu mümkün değildir. Örneğin; subfertilite kliniğine başvuran erkek olguların %2 kadar, kromozomal olarak da anormal bulunmuştur. Bu oran, sayımı 20 mil/ml altında olanlarda %6 ya; azospermik erkekler arasında %15'e yükselmektedir (28).

Mamafih, sperm motilitesinde azalma ile, genetik anomali arasında; immotil silia sendromu hariç tutulmak kaydı ile, kesin bir bağlantı olduğu da söylenememektedir. Diğer yandan bakıldığında, kromozomal olarak anormal olan infertil erkeklerin çoğunluğu; oligozoospermik veya azospermiktir.

Oo varlığına 1972'ler miştir ki miyi önl 1988'ler rinde ya teklemek oolemma sperm bl mi hızı, men düş

Oole varlığını nın düşü inanılma den Ham temeldir spesifik d balık sper na enjekt mel prote sentezi y araştırılm saatte, he oranda p DNA sent maktadır sperm nü nüşmesi i nonspesifi (26).

İnsan multipl in sonuca ula spermeler hamster ov say (SPA) olmuş oosi

Oolemma üzerinde sperm reseptörleri varlığına ilişkin deliller giderek artmaktadır. 1972'lerde yapılan ilk araştırmalar göstermiştir ki; oolemma üzerinde, aşırı polispermiyi önleyici, bir çeşit blok söz konusudur. 1988'lerde Ng ve ark.nın fare ovumları üzerinde yaptıkları araştırmalar şu hipotezi desteklemektedir: Zona intakt ovumlarda, oolemma üzerinde, sperm reseptörleri veya sperm blokları mevcuttur. Çünkü polispermi hızı, çok sayıda sperm transferine rağmen düşük bulunmuştur (25).

Oolemma üzerinde sperm reseptörleri varlığının; türler arası fertilizasyon hızlarının düşük oluşunu da izah edebileceğine inanılmaktadır. (Bunun bir istisnası, Golden Hamster ovumlarıdır. Bu türlerde muhtemeldir ki, sperm reseptörleri, o kadar spesifik değildir: Hamster, sıçan, tavşan ve balık sperm nükleusları; hamster ovumlarına enjekte edilmiş; ovum nükleusunda, temel protein kontentini farklılaştırıcı DNA sentezi yeteneği kazanılıp kazanılmadığı araştırılmıştır. Enjeksiyondan sonraki altı saatte, herbir tipin nükleusunun, yüksek oranda pronükleus şekline dönüştüğü ve DNA sentezi olduğu görülmüştür. Anlaşılmaktadır ki, DNA sentezinin etkilenmesi ve sperm nükleusunun pronükleus şekline dönüşmesi için; hamster oositleri tarafından nonspesifik mekanizmalar kullanılmaktadır (26).

İnsan ve golden hamster ovumlarına multipl insan spermi transfer edildiğinde ne sonuca ulaşılır? Üç normal donörden alınan sperm enjekte edildiğinde; zona free hamster ovumlarında sperm penetrasyon assay (SPA) sonucu; %20'den, fazla, penetre olmuş oosit hızı elde edilmiştir. Polispermi

hızının, kullanılan sperm sayısı artışına paralel olarak arttığı da bildirilmiştir (19). İnsan oositlerine multipl sperm transferi de denenmiş ve aynı sonuca ulaşılmıştır. Bu durum şöyle izah edilmektedir: Multemeldir ki, yüksek sayıda sperm ile; oolemma üzerinde mevcut olduğu varsayılan reseptörler; (muhtemelen kortikal granül serbestleşmesi sonucu) inaktive olmadan önce; birden fazla sayıda sperm; oolemma üzerindeki bu reseptörlere ulaşabilmektedir (47).

Mikromanipülasyon - mikroinseminasyon teknikleri, esasında "fertilizasyon araştırmaları" için geliştirilmiştir ve şimdi; "erkek subfertilitesinde" uygulama olasılığı da vardır (24, 33).

Örneğin; 1988 de, 9 yıllık subfertil Çinli bir bayandan, 7 ovum alınmış ve ortalama sperm sayımı, 2 mil/ml, normal oranı %30, motilitesi az özellikteki eşinin sperminden yararlanılıp; MIST tekniği uygulanmış ve PROST tekniği ile transfer sonrası, gebelik amacına ulaşılmıştır.

İnsanlarda mikroinseminasyon endikasyonları; immotil sperm, şiddetli oligozoospermi, ovum kabuğu penetrasyonunda yetersizlik, multipl erkek faktörleri başlıkları altında özetlenebilir.

Semen örneklerinde immotil sperm olmasının nedeni; ilaç tedavileri gibi çevresel, ya da immotil silia sendromu = silier diskinetide olduğu gibi konjenital olabilir. Motilite azlığına yolaçan çevresel sorunlar, sebebini ortadan kaldırılması, veya özel sperm yıkama teknikleri ile hafifletilebilir. Konjenital sorunların hayli daha güçtür. Üstelik, problemlili genlerin üremede rol almaya zorlanması, etik sorun da oluşturabilir.

ZEYNEP KÂMİL TIP BÜLTENİ

ve iyi motiliteye sahip spermatozoa varlığına rağmen, fertilizasyon sağlanamayan birçok olgu vardır. Zona penetrasyon testlerindeki gelişmelerin bu sorunlara ışık tutacağına inanılmaktadır.

Zona pellusida; spontan olarak "sertleşmektedir". Nitekim bu tür sertleşmeyi önleyici faktörler araştırılmış ve, glikoz amino glikan içeren folliküler mayi, bu amaçla ilgili vasatlara ilave edilmiştir. (27)

Aslında birçok semen problemi; seminifer tübül defekti nedeniyle en az üç defekti birarada içermektedir ve bu durum varlığında IVF tekniklerinin başası, %1'in altına düşmektedir. (38)

Özetle söylemek gerekirse, hernekadar mikroinseminasyon özellikle de MIST teknikleri, erkek subfertilitesi tedavisinde bazı ümitler vadetmekte ise de; yaygın kullanım için, halen şiddetli sınırlamaların varlığı da bir gerçektir. Yöntem, pahalı gereç ve ihtisaslaşma gerektirmektedir; çok zaman alıcıdır ve başarısı bugün için hayli düşük düzeydedir. (15)

Bir ovum birden fazla spermin penetrasyonu; iki pronükleusdan fazla sayıda pronükleus sorununa neden olabilmektedir. Polispermiyi bloke ediş sisteminde bozukluk varsa, bu özellikle ortaya çıkmaktadır. Ovum, eğer aşırı derecede yaşlanmış ya da, metafaz I aşamasında olacak kadar immatür ise; polisperminin, daha sıklıkla görülebileceğini savunanlar vardır.

Bazen de pseudopronükleus, ilave pronükleus gibi aldatıcı olabilmektedir. Pseudopronükleuslar; tripronüklear zigotların %40'ında görülmektedir ve muhtemelen, normal fertilize olan, ve gelişim yönünden

Silier diskinezili bir olgudan alınan; immotil ve fakat diğer yönleriyle normal sanılan sperm de; insan ovumuna transfer edilmiştir: MIST yoluyla, tek sperm transferi tekniği, beş ovum üzerinde denenmiş; üç tanesinde fertilizasyon sağlanmış ve klivaj yaptığı görülüp, anneye transfer edilmiştir. Fakat gebelikle sonuçlanmamıştır. Burada esas şudur ki; insanda, immotil spermin, perivitellin mesafeye girişi; fertilizasyon ile sonuçlanabilmiştir. (Farelerde ise; fertilizasyon sağlanamamış ve bu farklılık; türler arası farklılıkla izah edilmiştir. (46)

Sperm sayımı, 5 mil/ml altına düştüğünde; normal IVF teknikleri ile fertilizasyon şansı da hayli düşmektedir. 1988'lerden bu yana, pronüklear stage transfer (PROST) ve tubal embryo transfer (TEST) olarak isimlendirilen ve aynı sıra ile; pronükleer evre zigotların veya klivaj yapmakta olan embryoların, fallop tüpüne transferlerini içeren yöntemler ile; fertilizasyon sonrası dönemde, daha başarılı sonuçlar alınmıştır; ancak fertilizasyon olayının bizzat kendisi, daha başarılı sonuç için gene de, ilk semen örneğinde, 5 mil/ml üzerinde sperm gerektirmektedir.

Şiddetli oligozoospermide MIST sonuçlarıyla ilgili bir örnek verelim: Eşlerin ortalama sperm konsantrasyonu 2,6 mil/ml olan 7 olgudan, 38 ovum alınıp; acide zona drilling sonrası ve direkt zona ponksiyonu ile, multipl sperm transferi yapılmış; 38 hasar görmeyen oositten sadece bir tanesi fertilize olmuştur. (25)

"Ovum kabuğunu penetrasyondaki yetersizlik", literatürde yeterince tanımlanmamışsa da; iyi bilinmektedir ki, matür oosit

dir ve memelilerde ortaya çıkabilen embriyolar; yaşama potansiyeline kadar ulaşamamaktadır.

“Nükleer yerine koyma”, eniküle edilmiş ovum içine nükleer transplantasyon; 1952’lerde kurbağalarda denenmiştir. Nükleusun konulması ile, belirli genetik özelliklerin naklinde çeşitli varyasyonların elde edilebileceği umulmaktadır. Bu tür işlemlerin, bazı nadir türlerin korunmasında ve çiftlik hayvancılığında yararlı olabileceği düşünülmekte, insanlarda uygulanmamaktadır. (28)

Blastomer ayrılması konusunda şunlar irdelenebilir: İzole blastomerlerin full gelişim potansiyeli limiti, türden türe değişmektedir. (1986) Bu sınır; fareler için 4 hücre, koyunlar ve tavşanlar içine 8 hücre evresidir. 17 ila 32 hücreli sığır embryosundan elde edilen tek blastomerler; eniküle edilmiş oositlerin içine transfer edildiklerinde; blastokist evresine kadar gelişebilmektedirler.

Türler arası nükleer transfer, farklı sıçan türleri arasında denenmiş, pronükleus transferi yapılanlarda; 4 hücre evresinde ya da daha öne, gelişimsel arrest olduğu izlenmiştir. Bu başarısızlıktan, uygun olmayan nükleer-sitoplazmik ilişki sorumlu tutulmuştur.

Blastomer ayrılması veya blastokist bölünmesi; monozigoit özellikle hayvan temini için, çeşitli hayvan türlerinde başarı ile denemekte olup; blastokist bölünmesi, çiftlik hayvanlarında ve özellikle sığırlarda, bugün, artık standart bir işlem haline gelmiştir.

İnmatür sitoplazma içine matür nükleus yerleştirmeye; nükleer substitüsyonun

de problemi olmayan ovumların, morfolojik varyantıdır.

Geğinden (= birden) fazla sayıdaki erkek pronükleusu; özel işlemler ile uzaklaştırılabilmektedir. Sitoskeletal inhibitörler kullanarak; pronüklear zigota kolayca işlem yapılabilen ve pronükleus; küçük bir çevreyici sitoplazma ve zigot membranı ile birlikte çıkarılabilmektedir. Sonuçta, manipülasyon yapılan zigotun surveyi artabilmektedir. Ayrıca özel teknikler sayesinde, sonuçta ortaya çıkan embriyoya, maternal ve paternal katkıların tayini de yapılabilir.

Fazla pronükleusun çıkarılması sırasında, normalden fazla sayıdaki erkek pronükleusu yerine; yanlışlıkla ovumun pronükleusu çıkarılabilir. Bu durum androgenom ile sonuçlanır. Bu tür androgenomlar, düşük gelişme kapasitesine sahiptirler ve sadece 6-8 somit evresine kadar ulaşabilmektedirler.

İki spermin aynı ovuma simultane penetrasyonu ile, insan tripronüklear zigotu oluşabildiği bilinmektedir. Bir grup araştırmacı, 1988 de, insan zigotlarında tripronüklear halleri düzeltme çabalarını içeren ön araştırma sundular: Manipüle ettikleri üç insan zigotundan birinde, klevaj gözlenmediyse de syngami oluşmuş, ikinci zigot, dejenere olmuş, üçüncü zigot da işlem sırasında tarhibolmuştur...

Tablo 9 da, nükleer, hücre ve blastomer transferleri özetlenmektedir. Hücrenin bir kısmının (özellikle nükleusunun); tüm hücrenin ya da hücreler grubunun transferi; mikromanipülasyon teknikleri ile artık kolayca yapılabilir hale gelmiştir. Mamafih, füzyon düzeyinde sorunlar devam etmekte-

ZEYNEP KÄMİL TIP BÜLTENİ

diğer bir modeli gözüyle bakılabilir. Hernekadar bu teknik, cytokinesis olayında matür ve imamatür sitoplazmaların rolünü tayinde yararlı ise; kullanımı sınırlı görülmektedir. (28)

Erken germ hücrelerinin transferi konusunda özetle şunlar kaydedilebilir: Normal sperm başlarının, imamatür fare oositlerine injeksiyonu; ya da değişik evredeki imamatür erkek germ hücrelerinin (pachytene spermatosit ve golgi fazı spermatidler) olgun oositler ile füzyonu denenmiştir. Bunlara "meiotik asenkroni" araştırmaları denilebilir ve bazı sonuçlar şöyle özetlenebilir: Spermatositlerin; ovumun içinde iken, meiotik bölümlerine devam edebildikleri tespit edilmiştir. Bunun nedeni, muhtemelen, ovumun ikinci meiotik bölünmesini devam ettirmek üzere faaliyetini sürdürmekte olan sinyallerin; aynı zamanda, nonspesifik olarak, erkek kromozomları üzerinde de etki gösterebilmesidir. Bu tür bir araştırmanın sonucunda, küçük bir oranda (%10), erkek kromozom kitlelerinden birisinin, dişi kromozomları ile kombine olabildiği; diploid embryo oluşturabildiği ve fakat gelişim potansiyeli azalmış olduğundan, morula evresinin ötesine ilerleyemediği bildirilmiştir. (26)

Golgi fazı spermatidleri, metafaz II oositler ile füzyon yaptırılmak istendiğinde, erkek ve dişi kromozomların kombinasyonunun oluşmadığı ve sadece haploid embryoların ortaya çıktığı görülmüştür.

Bu araştırmaların, insan subfeertilitesi ile ilgisi şudur: Erken gelişme dönemindeki veya aşırı gelişmiş erkek germ hücreleri; metafaz II oositleri ile genellikle füzyon yapamamakta; mamafih bu; füzyon

öncesi, erkek germ hücrelerinin değişimi sonucunda, nadiren mümkün olabilmektedir.(40).

Ooplazmik transfüzyon araştırmaları da sürdürülmektedir. Bir görüşe göre, metafaz II ooplazm; profaz I oositlere, gelişim potansiyeli verebilmektedir.

Ovum-Embryo Biyopsileri teknikleri arasında; konsepsiyon öncesinde, birinci poler cismin çıkarılması, blastomer biyopsileri, çeşitli dönemlerdeki blastokistlerin biyopsileri sayılabilir. (14, 36)

Erken embryoların "totipotensi" özelliği vardır. Bir veya iki blastomerin çıkarılmasından sonra, geride bırakılan embryo, normal bir vücut oluşturacak şekilde gelişimine normal olarak devam eder. Çıkarılan blastomerler de, genetik anormallikler ya da seks tayini amacıyla, preimplantasyon tanısı için kullanılabilir. Ayrılan blastomerlerde, tek gen defektlerinin tanısı için gerekli olan DNA amplifikasyon teknikleri ve DNA problemlerinin gelişimi sayesinde; bu artık teorik olarak, yapılması mümkün bir incelemedir. Bundan başka, ayrılan blastomerlere, embryo kryopreservasyon metodları da uygulanmaktadır.

Bu blastomerlerin; embryonik bankalarda muhafazası ve böylece şahsın, ihtiyacı olduğunda, kendi dondurulmuş deposunda = totipotent hücrelerine müracaatı mümkün olabilir. (Böbrek naklinde olabileceği gibi...) Mamafih bu umut, gelecekte de uzak bir olasılık gibi görülmektedir, çünkü bugün için, totipotent hücrelerden, yönlendirilmiş organogenezis sağlama olasılığı mümkün değildir (28).

Bir araştırmacı grubunun raporuna göre;

4 ile 8 hücre da, klevajın embryo zamanı hücre çıkarılır tanesi morula maktadır.

Kemiriciler tokistler; in vitro sonra, bunlarda labilmiştir: İnsanoide tropektoderm biyopsisi arasında. Trbakıma, koryon lebilir. Çünkü he reler, kesinlikle farkı, tropektode evrede-blastokist

Tropektoderm makale; 42 insan nipülasyonu yapıldı si yönde zonanın tropektoderm hücre asyonunun gözlen lüğü yaklaşık olduğunda da, bu dığı belirlenmekte nipülasyonu yapıldı sonraki gelişmeleri farklı olmamıştır. lerde daha başarılı

Ulaşılan sonuç biyopsisi; genetik tasyon döneminde rarlı bir tekniktir. I yeteri miktarda eks elde edilebilmekte embryonik olduğu tur. Bu tür biyopsi last hücrelerin

4 ile 8 hücre arasındaki fare embriolarında, klevajın artarak devam etmesi, yani embryo zaman görülmektedir. İki ya da hücre çıkarılırsa; 40 embriyodan sadece bir tanesi morula evresine kadar ulaşabilmektedir.

Kemiricilere ve maymunlara ait blastokistler; in vitro ortamdakültüre edildikten sonra, bunlardan trofblast biyopsileri yapılabilmektedir. İnsanlarda ekstraembryonik tropektoderm biyopsileri, yeni gelişmeler arasındadır. Tropektoderm biyopsisi, bir bakıma, koryon villus biyopsisine benzetilebilir. Çünkü her ikisinde de çıkarılan hücreler, kesinlikle ekstraembroyiktir. Tek farkı, tropektoderm biyopsisinin; çok erken evrede-blastokist aşamasında yapılmasıdır.

Tropektoderm biyopsileriyle ilgili bir makale; 42 insan blastokistinde mikromanipülasyon yapıldığı; iç hücre kitlesinin aksi yönde zonanın geçildiği, 12-24 saat sonra, tropektoderm hücrelerinin, kontrollü herniasyonunun gözlemlendiği; herniasyon büyüklüğü yaklaşık olarak blastokist kadar olduğunda da, bu hücrelere biyopsi yapıldığı belirlenmektedir. Görülmüştür ki, manipülasyon yapılan embrioların daha sonraki gelişmeleri, kontrol grubundan pek farklı olmamıştır. Teknik, erken blastokistlerde daha başarılı sonuç vermiştir. (9)

Ulaşılan sonuç şudur: Tropektoderm biyopsisi; genetik hastalıkların preimplantasyon döneminde tanılabilmesinde, yararlı bir tekniktir. Fetüse zarar vermeksizin yeteri miktarda ekstra-embryonik materyel elde edilebilmektedir. Hücreler ekstra-embryonik olduğundan, etik sorun da yoktur. Bu tür biyopsi ile ayrılmış olan trofoblast hücrelerinin daha sonraki

proliferasyonları, in vitro olarak henüz yeterince gözlemlenmemiştir. Daha sonraki proliferasyonun devamı için, ilk alınan hücre sayısının kritik sınırı bilinmemektedir. İnsan tropektoderm dokusunun proliferasyonunun; farelerde olduğu gibi iç hücre kitlesine bağımlı mı (1973); yoksa maymunlarda olduğu gibi bağımsız mı (1988) olduğu da henüz açıklık kazanmamıştır. (28)

Tropektoderm biyopsisi sonrası blastokistlerin implantasyon sonuçları; koyunlarda (1966), tavşanlarda (1968), farelerde (1971) ve maymunlarda (1988) denenmiştir; insanlarda bu tür araştırmalar yenidir.

Yakın tarihli bir makalede, birinci poler cismin çıkarılıp analiz edilmesinin; pre-embryonik veya ekstraembryonik hücrelerden biyopsi yapılmasına nazaran çeşitli üstünlükler taşıdığı ve bunun teknik olarak mümkün olduğu belirtilmektedir. (45)

Somatik hücreler içine veya embryoya "cloned" genlerin yerleştirilmesiyle ilgili birçok metod vardır. DNA'nın fertilize ovum içine mikroinjeksiyonu ile, gen sistemlerini değiştirebilmekte ve bunun dramatik etkileri görülebilmektedir. Sıçandan alınan büyüme hormonu genlerinin enjekte edildiği farenin aşırı büyümesi buna örnektir. (17)

İnsanlarda infertilite sorununu aşmada yararlanılan mikroinseminasyon teknikleri arasında, ilginç sayılabilecek yeni yöntemler de sokulmuştur. Nitrojen laser kullanılarak zona pellusida delme yöntemi; spermin perivitellin mesafeye bilgisayar kontrolünde otomatik mikroinjeksiyonu bunlar arasında sayılabilir. (11, 35)

TABLO I: IVF ARAŞTIRMALARINDA MİKROMANİPÜLASYON TEKNİKLERİ

- Zonanın delinmesi ve benzeri zonal işlemler
 - Mikroinseminasyon-Mikrofertilizasyon
 - Fazla pronükleusun çıkarılması
 - Nüklear-Hücre-Blastomer transferleri
 - Embryo biyopsileri
 - Transgenik hayvanlar
-

TABLO2:ZONA PELLUSİDANIN;FERTİLİZASYON VE PREİMLANTASYON AŞAMALARINDAKİ YAPISAL VE FONKSİYONEL ROLÜ:

- Bazı türlerde,fertilizasyon sırasında,bağlı spermatozoada akrosom reaksiyonunu indükler
 - Oolemanın da katkısı ile;multipl sperm penetrasyonunu kontrol eder ve önler
 - Klivaj sırasında,özellikle fiziksel temelde rol alır:Blastomerlerin dağılmasını ve embryonun diğer yabancı hücreler ile direkt temasını önler
 - Embryonun falopian tüpünden pasajını kolaylaştırır
 - Pre-kompakt embryolarda,varlığı ve nisbeten intakt olması zorunludur.
-

TABLO 3:ZONANIN DELİNMESİ VE BENZERİ ZONAL İŞLEMLER:

- Zonanın delinmesi (zona drilling)
 - " kesilmesi (zona cutting)
 - " kırılması (zona cracking-zona breaching)
 - " parsiyel açılması (Partial zona dissection)
 - " " " modifikasyonu (assisted hatching)
-

TABLO 4: PARSİYEL ZONA DİSSEKSİYONU İLE ALINAN SONUÇLAR:

- 16 oosit üzerinde PZD yapıldı
- İnseminasyon ile, 10 PZD oositte(%63), monospermik fertilizasyon elde edildi. (Kontrol grubunda: 4/17=%24)
- 4 Yerine koyma sonrası, her ikisi de ikiz olan iki gebelik elde edildi.

TABLO 5: SUBZONAL SPERM TRANSFERİ (MIST):

- Bir tane ya da az sayıda spermin, zona altına mikroinjeksiyonu ve sonra normal füzyonun, spontan olarak oluşması esasına dayanır.
- Mikroinjeksiyondan farklı olarak, gamet yüzey ilişkisi sağlar ki, bu da, oosit aktivasyonu için önemlidir.
- Enjeksiyon tekniğine kıyasla, fertilizasyon oranı daha yüksektir ve tekniği daha basittir.

TABLO 6: SUBZONAL SPERM TRANSFERİ (MIST): (-)

- Manipülasyon için tek sperm seçilmiş ise, akrosom reaksiyonunu tamamladığına emin olmak gerekir.
- Sperm, oosit ile uygun ilişki gösteremeyecek ise bu teknik kullanılmaz.
- Çok sayıda sperm enjeksiyonu, polispermik fertilizasyon riski taşır
- Fertilizasyon etkinliği, benzer koşullarda yapılan in vitro fertilizasyona (IVF) göre daha düşüktür.

TABLO 7:SPERM MİKROİNJEKSİYONU:(MIMIC)

- En agresif metod olup;sperm başı,direkt ooplazm içine bırakılır.Spermin motil olması ya da oosit membranı ile normal ilişki yeteneğine sahibolması gerekmez
- Gelecekte,şiddetli oligosperminin,bu teknikle sorun olmaktan çıkması sağlanabilir

TABLO 8:SPERM MİKROİNJEKSİYONU (MIMIC): (-)

- Tüm doğal bariyerleri aşan bir teknik olduğundan, biyolojik selektivite ortadan kalkmaktadır
- Gametlerarası tüm doğal ilişki ortadan kalktığı için,oosit aktive olmayabilir
- Mikropipet,mekanik olarak ooplazmaya zarar verebilir
- Sperm,girişten önce;akrosom reaksiyonuna ilerlemek zorundadır.Random olarak seçilen sperm,bu işlemi tamamlamamış olabilir.
- MIST öncesinde,sperm popülasyonunun akrosom reaksiyonunu tamamlaması için ön tedaviye tabi tutulması diğer sperm yapılarına da zarar verebilir.

TABLO 9:NÜKLEAR-HÜCRE VE BLASTOMER TRANSFERLERİ:

- Nüklear yerine koyma
- Blastomer ayrılması
- Blastokist bölünmesi
- İmmatür sitoplazma içine,matür nükleus yerleştirme
- Erken germ hücrelerinin transferi
- Ooplazmik transfüzyon

İnsan preimplantasyon embryoları ile ilgili araştırmalar, açılı ve temel yönünden; etik ve lisanser kontrol altında yapılmaktadır. Oosit ve embryo mikromanipülasyon teknikleri; "eksperimental işlemler" arasında yer almaktadır. Diğer bir deyişle, sorumlu komitelerin gözetimi altında yapılmasına izin verilen araştırmalardır ve genel uygulama alanına girmesi "henüz erken" olarak kabul edilen araştırmalar grubundadır.

Sonuç olarak şunlar söylenebilir: "Mikromanipülasyon"; halen yaygın klinik kullanımdan ziyade, önemli, bir araştırma sahası durumundadır. Gametogenez, fertilizasyon, preimplantasyon dönemi embryonik gelişim, genetik kontrol konularında, bilime çok önemli katkıları olmaktadır. Hayvan çiftliklerinde de belirli sahalarda kullanım alanı bulmuştur. Bugün için, tıpta rutin uygulamaya dönülmesini sağlayıcı aşamalar, henüz sağlanamamıştır. Ancak yakın gelecekte, insanlarda mikromanipülasyonun, klinik olarak daha yaygın şekilde kullanım alanına gireceği söylenebilir. (28)

LİTERATÜR

1. Antinori S: Evaluating 6 pregnancies established by subzonal insemination (Suzi.) Helsinki world congress (262), 1990.
2. Barnard G.: A clinical background to fertility. (Booklet) (pharmacia), 1990.
3. Barriere P.: Zona drilling: a method to assist human in vitro fertilisation. Abstracts of the 2.joint ESCO-ESHRE meeting. Milan, 1990.
4. Bauer O: Preliminary results on transvaginal tubal embryo stage transfer (TV-TEST) without ultrasound guidance. Human Reprod. Vol. 5 No. 5 pp.553-56.
5. Biggers JD.: Arbitrary partitions of prenatal life. Human Reprod Vol 5, No.1 pp, 1-6, 1990.
6. Chang SY.: A simple method of zona cutting increases fertilisation of human oocytes in couples with abnormal semen characteristics. Helsinki World Congress, (399), 1990.
7. Cohen J.: Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. Human Reprod. Vol.5, No.1, pp:7-13, Jan. 1990.
8. Depypere HT: The intracytoplasmic PH change during zona drilling of mouse oocytes. Abstracts of the 2. joint ESCO-ESHRE meeting, Milan (22), 1990.
9. Dokras A: Trophectoderm biopsy in human blastocysts. Human Reprod vol.15, No.7 pp:821-825, Oct. 1990.
10. Gianarolli L: The succesful use of sub zonal sperm injection in human in vitro fertilization. Abstracts of the 2.joint ESCO-ESHRE meeting, Milan (20) 1990.
11. Godke RA: A method for zona pellucida drilling using a compact nitrogen laser. Helsinki World Congress (258), 1990.
12. Gorbun JW: Fertilisation of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. Fertil. Steril. vol.50, no.1, pp.68-73, July 1988.
13. Goyanes VJ: Morphometric categorisation of human oocyte and early conceptus. Human Reprod. vol.15, no.5, pp.613-618, 1990.
14. Handyside AH: Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. Lancet. pp.347-49. feb.18, 1989.
15. Hinting, A.: Possibilities and limitations of techniques of assisted reproduction for the treatment of male infertility. Human reprod vol.15, no.5, pp.544-48, 1990.
16. Indira N: Ultrastructure of the cortex in the human egg. Human Reprod. vol.15 no.1 pp:66-70, 1990.
17. Kola I.: Chromosomal analysis of human oocytes, fertilised by microinjection of spermatozoa into the perivitelline space. Human Reprod. vol.15, no.5, pp:575-577, 1990.
18. Leuron J.: Human sperm and hamster oocyte interaction: a model system to assess sperm entry into the oocyte after partial zona dissection. Fertil Steril. Vol.154, no.2, p.242, Aug 1990.

ZEYNEP KÄMİL TIP BÜLTENİ

19. Leur V.: Microinsemination with more than one sperm. Abstracts of the 2. joint ESCO-ESHRE meeting, Milan (21), 1990.
20. Macnamee MC: New approaches to assisted human conception. Abstracts of the 2. joint ESCO-ESHRE meeting, Milan, 1990.
21. Malter HE.: Partial zona dissection of the human oocyte. a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril.* vol.151, no.1, pp.139-148, Jan. 1989.
22. Malter HE.: Embryonic development after microsurgical repair of polyspermic human zygotes. *Fertility Sterility.* Vol.52, no.3, p.373-380, sep. 1989.
23. Menkuel R: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reprod* vol.15 no.5 pp:586-92, 1990.
24. Morris N: The cromwell centre for IVF and fertility (Mez. sonrası eđt. kursu-Ankara, 1990).
25. NgSC: Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* p.790, oct1, 1988.
26. NgSC: MIST: A technique of subzonal sperm transfer. Helsinki world congress (256), 1990.
27. NgSC: Microinjection of human oocytes: Need for de-Membranation of spermatozoa? Helsinki World Congress (257), 1990.
28. NgSC: Micromanipulation: Its relevance to human in vitro fertilization *Fertil Steril* vol.153, No.2, pp:203-219, Feb. 1990.
29. Nilsson L.: Monitoring reproductive hormones and steroids in assisted reproduction (Booklet) (Pharmacia), 1990.
30. Oehninger S.: Complex carbohydrate moieties inhibit tight binding of human spermatozoa to human zona pellucida under hemizona assay (HZA) conditions. Helsinki World Congress (292), 1990.
31. Oehninger S: Hemizona assay (HZA): A diagnostic method for assesment of human sperm-oocyte interactions with good predictive value for in vitro fertilization (IVF) outcome. Helsinki World Congress (298), 1990.
32. Pritchard JA: Reproductive success and failure:Ovulation and fertilization. In ed:Pritchard JA: Williams obstetrics. Appleton century crofts 18th ed. p.893, 1989.
33. Psalti I.: Partial zona dissection in couples without fertilization in previous attempts. Abstracts of the 2. joint ESCO-ESHRE meeting, Milan (199), 1990.
34. Punjabl U.: Comparison between different pretreatment technique for sperm recovery prior to intrauterine insemination, GIFT or IVF. *Human Reprod.* vol.5, no.1, pp:75-83, 1990.
35. Saga M.: Automatic microinjection of sperm into the perivitelline space under personal computer control. Helsinki world congress (259), 1990.
36. Schmutzler A.G.: Polar body and blastomere biopsy in teh mouse, abstracts of the 2. joint ESCO-ESHRE meeting, Milan (25), 1990.
37. Simon A.: Zona pellucida slitting as an assisted fertilization technique in subfertile males. Abstracts of the 2. joint ESCO-ESHRE meeting, Milan (389), 1990.
38. Speroff L.: In vitro fertilization in ed: Speroff: Clinical Gyneco logic Endocrinology and Infertility. p:611-20, 1989.
39. Sullivan R.: Protein synthesis and acrosome reaction inducing activity of human cumulus cells, *Human Reprod* vol.15, no.7, pp.830-34, 1990.
40. Tesarik J.: Zona pellucida penetrability of metaphase I and II human oocytes afteraging and salt treatment. *Fertil Steril.* vol.154 No.2, p.346-47, Aug. 1990..
41. Trounson A.: Developments in new technologies involved in assisted conception. Helsinki World Congress (190), 1990.
42. Tucker M.: Assisted hatching for improvement of implantation of frozen/thawed human embryos. Helsinki World Congress (7), 1990.
43. Ünlü C.: Fare embryo preparasyonları ve invitro gelişimlerinin incelenmesi. *Kadın Doğum Dergisi.* Cilt:6, sayı:1, s.44.
44. Veiga A.: Partial zona dissection for male factor in IVF. Abstracts of the 2. joint ESCO-ESHRE meeting. Milan (19), 1990.
45. Verlinsky Y.: Analysis of the first polar body: Preconception genetic diagnosis. *Human Reprod.* vol.15, no.7, pp:826-29, Oct. 1990.
46. Wittemer C.: Microinjection of spermatozoa into oocytes: preliminary results obtained with mouse gametes. Helsinki World Congress (260), 1990.
47. Zarutskie PW.: The Predictive role of enhanced sperm penetration assay on fertilization rates in in vitro fertilization (IVF) microinjection. Helsinki World Congress (261), 1990.

