

Ardışık ya da tek basamaklı embriyo kültür medyumunun preimplantasyon embriyo gelişimi ve gebelik sonuçlarına etkisi: eşleştirilmiş hastalarda retrospektif kohort çalışması

Sequential versus single-step embryo culture media in preimplantation embryo development and pregnancy rates: a retrospective matched cohort study

Şafak Olgan, Enver Kerem Dirican

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Antalya

Özet

Amaç: Ardışık kültür ortamı ile kesintisiz tek basamaklı kültür ortamının erken dönemde embriyo kaliteleri üzerine olan etkilerini araştırarak, farklı kültür ortamlarında geliştirilmiş embriyoların olası implantasyon potansiyellerini incelemek.

Gereç ve yöntem: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde, Aralık 2014 ve Aralık 2015 tarihleri arasında, in vitro fertilizasyon tedavisi uygulanmış hastalara ait bilgiler elektronik veri tabanı kullanılarak incelendi. Ardışık basamaklı kültür medyumunu uygulanan hastaların (n=144) belirlenmesinin ardından, her hasta için indeks olguya en yakın dönemde oosit toplama işlemi gerçekleştirilmiş; yaş ve metafaz-2 oosit sayıları eşleşen ancak tek basamaklı embriyo kültür medyumunun kullanıldığı hastalar (n=144) seçildi. Embriyo kaliteleri ve gebelik sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldı.

Bulgular: Gruplar arasında fertilize oosit, gelişimin 2-3. gününde yüksek kalite embriyo sayıları ile fertilize oositten yüksek kalitede klivaj embriyo gelişiminde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Ancak, hasta başına yüksek kalitede blastokist sayısının ($p=0.048$) ve yüksek kaliteli klivaj evresindeki embriyolardan yine yüksek kaliteli blastokist gelişim oranının ($p=0.043$) tek basamaklı kültür ortamında daha yüksek olduğu bulundu. Benzer şekilde, blastokist transferi yapılan olgular istatistiksel olarak tek basamaklı kültür grubunda daha fazla idi ($p<0.001$). Gebelik sonuçları değerlendirildiğinde, embriyo transferi yapılan hastalarda klinik gebelik ($p=0.038$) oranı tek basamaklı kültür ortamında daha yüksek bulundu. Ancak implantasyon oranında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamız tek basamaklı medyum uygulamalarıyla ardışık medyum ile benzer oranlarda yüksek kalitede embriyo gelişimi sağlanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, blastokist gelişim oranı artarak olası gebelik sonuçlarında iyileşme sağlanabilir.

Pam Tıp Derg 2016;9(3):212-218

Anahtar sözcükler: In vitro fertilizasyon, embriyonik gelişim, embriyo kültür teknikleri.

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate the effect of sequential vs. single-step media on early human embryo development and the embryos' implantation potential.

Materials and methods: This retrospective study included patients who underwent in vitro fertilization (IVF) treatment at the Akdeniz University Reproductive Centre between December 2014 and December 2015. The electronic database was screened to identify the type of culture media used for IVF. A hundred forty four women whose embryos were cultured in sequential media were retrospectively matched for age and metaphase-2 oocytes with 144 women whose embryos were cultured in single-step media. Embryo quality and pregnancy outcomes were compared between sequential and single-step media groups.

Results: The number of fertilized oocytes, high quality embryos on day 2-3 and developmental rate of high quality embryos from fertilized oocytes were found to be comparable between the groups ($p>0.05$). However, the number of high quality blastocysts ($p=0.048$) and developmental rate of high quality blastocysts from high quality cleavage stage embryos ($p=0.043$) were significantly higher in single-step media group. Subsequently, single-step media group had more embryos transferred at blastocyst stage ($p<0.001$). Dealing with the pregnancy outcomes, clinical pregnancy per embryo transfer was found to be higher in single-step media group ($p=0.038$). There was no significant difference in implantation rates between the groups ($p>0.05$).

Şafak Olgan

Yazışma Adresi: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Antalya
e-mail: safakolgan@gmail.com

Gönderilme tarihi: 09.02.2016

Kabul tarihi: 11.03.2016

Conclusion: We have shown that a single step culture media supports high quality embryo development equivalently to established sequential media. Moreover, higher number of blastocysts available for transfer with single step media, might result in a concurrent improve in pregnancy rates.

Pam Med J 2016;9(3):212-218

Key words: In vitro fertilization, embryonic development, embryo culture techniques.

Giriş

İn vitro fertilizasyon (İVF) tekniklerinin başarısı embriyo kültür ortamlarının içeriği de dâhil pek çok faktöre bağlıdır [1,2]. Günümüzde ideal embriyo kültür ortamının içeriğinin nasıl olması gerektiğine dair iki farklı görüş mevcuttur. Ardışık kültür ortamlarının kullanılması in vivo ortamı daha iyi taklit ediyor olabilir. Bunun nedeni erken embriyo gelişimi sırasında zigotun tuba uterinadan uterusu geçişini taklit ediyor olmasıdır [3,4]. Ardışık kültür ortamları farklı günlerdeki embriyonun ihtiyaçlarını ve ideal embriyo kalitesini sağlamak için embriyo gelişiminin gününe göre içeriğinde farklılıklar göstermektedir [5]. İmplantasyon öncesi embriyoların incelendiği deneysel hayvan modellerinde embriyoların enerji ihtiyaçlarını zaman içerisinde değiştiği gösterilmiştir [6,7]. Ayrıca, glutamin ve bazı aminoasitlerin embriyo gelişimi süresince farklı etkilerinin olabileceği belirtilmektedir [8].

Alternatif şekilde, tek basamaklı kültür ortamlarının içeriği değişken olmayıp embriyo gelişim süresince kültür ortamında sabit seviyelerde bulunur [6]. Bugünkü desteklediği çalışmalarda ideal embriyo gelişimi için ardışık kültür ortamının gerekliliğine dair direk deneysel kanıt bulunmadığı belirtilmektedir [6].

Hangi kültür ortamının 2, 3 ve 5. günlerde en iyi kalitede embriyo ve daha önemlisi embriyo transferi başına yüksek implantasyon ile ilişkili olduğu henüz açık değildir. Ardışık ve tek basamaklı kültür ortamlarında 3. ve 5. gün embriyo kaliteleri arasında fark saptanmamıştır [9]. Hem ardışık [1,10] hem de tek basamaklı [11-13] kültür ortamı ile ideal embriyo kalitelerinin sağlandığına dair yayınlar bulunmaktadır. Fakat bu çalışmalarda yeterli sayıda embriyo değerlendirmeye alınmamıştır [11]. Daha önemlisi implantasyon üzerine olan etkileri sadece birkaç çalışmada incelenmiş olup, farklı kültür ortamlarının diğerlerine göre üstünlüğü saptanmamıştır [1,13]. Benzer şekilde, bu çalışmalarda da istatistiksel olarak

anlamlı fark saptayabilmek için transfer edilen yeterli embriyo bulunmamaktadır.

Çalışmamızın amacı ardışık kültür ortamı ile kesintisiz tek basamaklı kültür ortamının erken dönemde embriyo kaliteleri üzerine olan etkilerini araştırarak, farklı kültür ortamlarında geliştirilmiş embriyoların olası implantasyon potansiyellerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine Aralık 2014 ve Aralık 2015 tarihleri arasında başvuran ve İVF/ intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu (İCSI) tedavisi uygulanan hastalar retrospektif olarak değerlendirildi. Hasta kayıtlarını içeren elektronik veri tabanı incelenerek ardışık embriyo kültür medyumunu kullanılan hastalar (n=144) belirlendi. Oosit toplama işlemi sonrası metafaz 2 (M2) oosit elde edilemeyen hastalar çalışmaya dâhil edilmedi. Bunun haricinde, seçimde yan tutmamak için, herhangi bir ek özel tanı ya da kıstas hasta seçiminde kullanılmadı. Ardışık basamaklı kültür medyumunu kullanılan hastaların belirlenmesinin ardından, seçilen her hasta için indeks olguya en yakın dönemde oosit toplama işlemi gerçekleştirilmiş; yaş ve metafaz 2 (M2) oosit sayıları eşleştirilmiş ancak tek basamaklı embriyo kültür medyumunun kullanıldığı hastalar belirlendi. Sonuç olarak, tek basamaklı (n=144) ve ardışık (n=144) kültür medyumlarının kullanıldığı toplam 288 hasta analiz edilmek üzere çalışmaya dâhil edildi.

Hipofiz baskılanması siklusun 5. gününde Gonadotropin-serbestleştirici hormon (GnRH) antagonistleri kullanılarak ya da önceki siklusun orta luteal döneminde GnRH agonistleri kullanılarak sağlandı. Hasta özelliklerine bağlı olarak kontrollü over stimülasyonu için insan menopozal gonadotropin ve/veya rekombinant folikül uyarıcı hormon kullanıldı. Her iki grupta da ≥ 2 folikül 17mm saptandığında 250 μ g insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulanarak 36 saat sonrasında oosit toplama işlemi gerçekleştirildi.

Embriyo kültür ortamlarının tamamı hem tek basamaklı hem de ardışık kültür ortamlarında İVF paraffin yağı (Ovoil, Vitrolife, İsveç) kullanılarak hazırlandı. Folikül aspiratlarından izole edilen kümülüs ooforus kompleksleri (COC) MOPS ile tamponlanmış, insan serum albumini içeren kültür ortamlarına (G-MOPS Plus, Vitrolife, İsveç) alındıktan sonra hassas iğneler yardımıyla fazla kümülüs hücrelerinden arındırarak önceden dengelenmiş fertilizasyon medyumuna (G-IVF Plus, Vitrolife, İsveç) içeren kaplara alındı. İki saat inkübasyon sonrası enzimatik sindirme (Hyase, Vitrolife, İsveç) ve hassas pipetleme ile kümülüs ooforus ve korona radyata hücrelerinden ayrılan olgun oositler G-MOPS solüsyonuna aktarılarak İCSİ yöntemi ile fertilize edildi. Ardışık basamaklı kültür medyumunu kullanılan grupta, enjeksiyon yapılan oositler dengelenmiş taze fertilizasyon medyumuna içerisine yerleştirilerek, pronükleer değerlendirme yapıncaya kadar kültüre edildiler. Fertilizasyonun başarılı şekilde gerçekleştiği zigotlar taze dengelenmiş klivaj medyumuna aktarıldılar (G-1 Plus, Vitrolife, İsveç). Tek basamaklı grupta ise, enjeksiyon yapılan oositler taze, dengelenmiş ve insan serum albumin içeren time lapse medyumlarına (G-TL Plus, Vitrolife, İsveç) yerleştirildiler. Bu gruptaki embriyolar pronükleer ve 3-5. gün değerlendirmeye kadar aynı medyumda tutuldular.

3. günde embriyo kalitesi ASEBİR klasifikasyonu kullanılarak yapıldı [14]. ≥ 6 blastomere sahip ve fragmantasyon $\leq 5\%$ olduğu, hafif şiddette ya da asimetri bulunmayan vaküolsüz embriyolar yüksek kaliteli klivaj embriyolar olarak değerlendirildi. Üçüncü gün embriyoları lazer ile yardımcı yuvalama sonrası transfer edildi. Blastokist kültürüne devam etmesine karar verilen olgularda embriyolar; ardışık grupta üçüncü gün önceden dengelenmiş blastokist medyumuna (G-2 Plus, Vitrolife, İsveç) aktarıldılar. Tek basamaklı medyum grubunda ise orjinal time lapse medyumlarında (G-TL Plus, Vitrolife, İsveç) transfere kadar gelişime bırakıldılar. Blastokist evresine ulaşmış embriyolar Gardner ve Schoolcraft [15] değerlendirme sistemi kullanılarak incelendi. Blastokistler genişleme miktarları ve iç hücre kitlesi ile trofoektodermilerin kalitelerine göre sınıflandırıldı [15]. Genişleme ve dış kılıflarından çıkmış olmalarına göre iç hücre kitleleri ve trofoektoderm kaliteleri A ya da B olan grade

3-6 embriyolar yüksek kalite blastokistler olarak değerlendirildi. Her hasta için klivaj ve blastokist evresindeki yüksek kaliteli toplam embriyo sayıları hesaplandı.

Oosit toplama işlemi sonrası 14. günde β -hCG ≥ 25 olması durumunda gebelik müspet olarak kabul edildi. İmplantasyon oranı transvajinal ultrasonografi ile gözlenen gestasyonel kese sayısının transfer edilen embriyo sayısına bölünmesi ile hesaplandı [16]. 6-8 gestasyonel haftalarda gestasyonel kese içerisinde fetal kalp atımı saptanması halinde klinik gebelik olarak tanımlandı.

Veriler SPSS (Microsoft Statistical Package for Social Sciences, Windows, sürüm 22.0) programı ile analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama ve standart dağılım kullanılarak, kategorik değişkenler ise yüzde (%) olarak belirtildi. Normal dağılım gösterip göstermemesine göre Student's t-test veya Mann-Whitney U-test'i kullanılarak sürekli değişkenler gruplar arasında karşılaştırıldı. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar Fisher's exact testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Hastalara ait demografik özellikler Tablo 1'de verilmiştir. Ardışık ve tek basamaklı kültür gruplarında, hastalar arasında yaş, vücut kitle indeksi (VKİ), öncesinde başarısız İVF denemesi, antral folikül sayıları, infertilite süresi, bazal follikül stimulan hormon (FSH), bazal estradiol ortalamalarında fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Benzer şekilde, hastaların öncesinde gebelik öyküleri, ultrasonografide polikistik over görünümü ve zayıf over rezervi oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Gruplar arasında metafaz 2 (M2) oosit ve 2-pronuclei (2PN) ortalamaları benzer bulunmuştur ($p > 0.05$) (Tablo 2). Ancak fertilizasyon oranı tek basamaklı kültür medyumunda daha düşük saptanmıştır (%61.9 ve %55.8, $p = 0.006$). Gruplar arasında İCSİ yapılan oosit ve/veya sperm kaliteleri istatistiksel olarak anlamlı oranda tek basamaklı kültür medyumunu kullanılan grupta kötüdür ($p < 0.001$). Buna karşın 2-3. günde yüksek kalite embriyo sayıları ve fertilize oositten yüksek kalitede klivaj embriyo gelişim oranı benzerdir

Tablo 1. Demografik ve fertilitite karakteristiklerinin gruplar arasında karşılaştırılması

	Ardışık Medyum (n=144)	Tek Basamaklı Medyum (n=144)	P
Yaş	32.2±4.6	32.1±4.6	0.858
VKİ (kg/m ²)	25.2±4.4	25.1±4.1	0.733
Öncesinde başarısız İVF denemesi	0.6±0.7	0.6±0.9	0.775
Antral folikül sayısı	14.6±10.1	14.3±9.3	0.754
Tedavi öncesi gebelik	28 (19.4)	30 (20.8)	0.369
İnfertilite süresi (sene)	5.4±4.0	5.8±4.5	0.162
Bazal FSH (IU/L)	6.4±2.7	6.7±4.1	0.284
Bazal Estradiol (pg/mL)	52.6±33.0	49.8±30.2	0.332
Ultrasonografide polikistik over görünümü	37 (25.7)	42 (29.2)	0.768
Zayıf over rezervi ^a	13 (9.0)	10 (6.9)	0.250

VKİ, vücut kitle indeksi; IVF, in vitro fertilizasyon; FSH, follikül stimulan hormon. Veriler ortalama ± standart sapma veya n (%) olarak gösterilmiştir
^aBologna kriteri esas alınmıştır (2011)[17]

($p>0.05$). Embriyo transfer oranları ve siklus iptal oranları arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Hasta başına yüksek kalitede blastokist sayısı ($p=0.048$) ve yüksek kaliteli klivaj evresindeki embriyolardan yine yüksek kaliteli blastokist gelişim oranı ($p=0.043$) tek basamaklı kültür ortamında daha yüksek saptandı. Benzer şekilde, blastokist transferi yapılan olgular istatistiksel olarak tek basamaklı kültür grubunda daha fazladır ($p<0.001$). Hasta başına transfer edilen ortalama embriyo sayıları gruplar arasında farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Buna karşın, gebelik sonuçları değerlendirildiğinde, embriyo transferi yapılan hastalarda pozitif β -hCG ($p=0.019$) ve klinik gebelik ($p=0.038$) oranları tek basamaklı kültür ortamında daha yüksek bulunmuştur. Ancak implantasyon ve biyokimyasal/anembriyonik gebelik oranlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tartışma

Tek basamaklı kültür ortamında fertilizasyon oranının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığını gözlemledik. Ancak vakaların oosit ve sperm kaliteleri tekrar değerlendirildiğinde, tek basamaklı kültür ortamında kötü kalitede oosit ya da sperm sıklığının diğer gruba göre istatistiksel olarak anlamlı fazla olduğunu saptadık (ardışık medyum grubu, %4.2 ve tek basamaklı medyum grubu, %15.3, $p=0.001$). Oosit veya sperm dismorfizmine bağlı olarak fertilizasyonun olumsuz etkilenebileceği bilindiğinden [18], tek basamaklı medyum grubundaki fertilizasyon oranındaki düşüklüğün daha çok oosit ya da sperm kalitesindeki bozukluğa bağlı olduğu

düşünüldü. Buna karşın klivaj evresinde yüksek kalitedeki ortalama embriyo sayılarında gruplar arasında fark saptanmadı. Her iki grup arasında fertilizasyon başarısızlığı ve total embriyo kriyopreservasyonu nedeniyle embriyo transferi yapılamayan olgular arasında da fark bulunmadı. Bulgularımız, tek basamaklı kültür uygulamalarının embriyo gelişimini olumsuz etkilemediğini gösterdi. Benzer şekilde literatürdeki çalışmalarda da ardışık ya da tek basamaklı embriyo kültür ortamlarının klivaj evresinde embriyo kalitesi üzerine etkisinin olmadığı gösterilmişti [9,11,13,19-21]. Buna karşın blastokist gelişim oranı tek basamaklı kültür ortamında belirgin olarak daha fazla idi. Yapılan çalışmalarda da tek basamaklı medyum kullanımı ile ardışık kültür medyumlarına göre daha yüksek oranda blastokist geliştirilebildiği belirtilmişti [12,13].

Bu güne kadar ardışık ve tek basamaklı kültür ortamlarının gebelik sonuçlarına üzerine etkileri araştırılmış olsa da, bu çalışmalara dahil edilen hasta sayıları yeterli olmadığından gebelik sonuçlarının optimal değerlendirilmesi mümkün olmamıştır [13,19,21]. Bizim çalışmamızda ardışık kültür ortamının kullanıldığı olgular yaş ve M2 oosit sayıları eşleştirilmiş tek basamak kültür ortamının kullanıldığı hastalarla eşleştirildi. Bu sayede literatürde gebelik sonuçlarının araştırıldığı çalışmalara göre daha fazla sayıda hasta çalışmamıza dâhil edilmiş oldu. Embriyo transferi başına gebelik sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldığında, tek basamaklı medyumlarda embriyo transferi başına pozitif β -hCG ve klinik gebelik oranının ardışık medyum uygulamalarına göre istatistiksel olarak yüksek olduğu saptandı.

Tablo 2. IVF/ICSI siklus sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması

	Ardışık medyum (n=144)	Tek Basamaklı medyum (n=144)	P
Stimulasyon süresi (gün)	9.6±2.1	9.4±2.0	0.407
Gonadotropin dozu (IU)	1810.0±702.5	1767.5±643.0	0.454
M2 oosit (M2), hasta başına	6.7±4.5	6.7±4.5	0.958
2-pronuclei oosit (2PN), hasta başına	4.2±3.6	3.8±3.2	0.341
İCSI'de kötü Sperm ve/veya oosit kalitesi	6 (4.2)	22 (15.3)	<0.001
Fertilizasyon oranı (2PN/M2) (%)	602/972 (61.9)	542/972 (55.8)	0.006
Yüksek kalitede klivaj embriyo sayısı, hasta başına	2.1±1.6	2.1±1.9	0.990
Yüksek kalitede klivaj embriyo /2PN (%)	280/602 (46.5)	268/542 (49.5)	0.321
Yüksek kalitede blastokist sayısı, hasta başına	1.2±1.1	1.9±1.8	0.048
Yüksek kalite blastokist / klivaj embriyo (%)	26/56 (46.4)	135/220 (61.4)	0.043
Siklus iptali	28 (19.4)	36 (25.0)	0.257
Fertilizasyon başarısızlığı	8 (5.6)	14 (9.7)	
Total embriyo kriyopreservasyonu	20 (13.9)	22 (15.3)	
Embriyo transferi yapılan hasta sayısı	116 (80.6)	108 (75.0)	0.257
Transfer yapılan embriyo sayısı, hasta başına	1.1±0.7	1.0±0.6	0.316
Embriyo transfer günü			
Klivaj evresi (2-3. gün)	92 (79.3)	50 (46.3)	<0.001
Blastokist evresi (5. gün)	24 (20.7)	58 (53.7)	
Kriyopreservasyon yapılan embriyo, hasta başına	0.6±1.3	0.5±1.1	0.709
Gebelik Sonuçları			
Embriyo transferi başına pozitif β-hCG	38 (32.8)	52 (48.1)	0.019
Embriyo transferi başına klinik gebelik	32 (27.6)	44 (40.7)	0.038
İmplantasyon oranı (%)	24.7	34.3	0.069
Pozitif β-hCG başına biyokimyasal/anembriyonik gebelik	6 (15.8)	8 (15.4)	0.958

Veriler ortalama ± standart sapma veya n (%) olarak gösterilmiştir. İVF, in vitro fertilizasyon; İCSI, intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu; M2, metafaz 2; β-hCG, beta insan koryonik gonadotropin; 2PN, 2-pronuclei; ET, embriyo transferi. Koyu belirtilmiş p değerleri istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (p<0.05).

Ancak, implantasyon oranları tek basamaklı kültür grubunda yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. İmplantasyon farklılıklarının değerlendirildiği literatürdeki diğer çalışmaların sonuçları incelendiğinde, toplam 147 hastanın iki gruba randomize edildiği bir çalışmada, Paternot ve ark. [19] tek basamaklı medyum grubunda implantasyon oranının daha yüksek olduğunu saptadılar. Buna karşın, kardeş oositlerin randomize edildiği (75 hasta) diğer bir çalışmada implantasyon oranlarında farklılık saptanmadı [21]. Ancak bu çalışmaların kısıtlılıklar bölümünde de belirtildiği gibi, çalışmaların gücü gebelik oranları arasındaki farklılığı değerlendirebilmek için yeterli güce sahip değildi [19,21]. Blastokist evresindeki embriyoların transfer edilmesi ile daha yüksek devam eden gebelik oranlarının sağlandığı bilinmektedir [22]. Dolayısıyla, gebelik sonuçlarındaki olası iyileşmenin nedenlerini gözden geçirdiğimiz zaman, blastokist evresine ulaşan embriyo yüzdesinde ve blastokist transferindeki artışın gebelik oranlarında da paralel bir iyileşme sağlayabileceğini düşündük.

Tek basamaklı kültür medyumlarının kullanımı olası bir kontaminasyonu, sıcaklık/pH farklılıklarını ve embriyoların ekstra pipetlenmesine bağlı oluşabilecek embriyonik stresi azaltıyor olabilir [23-25]. Bunun yanında materyal kullanımının azalmasına bağlı daha uygun maliyetler sağlayabilir [13]. Fakat dikkat edilmesi gereken bir husus, laboratuvar veya kültür ortamının uygun olmadığı hallerde yağ ve/veya suda çözünen uçucu organik bileşiklerin birikebilme riskidir. Bu nedenle laboratuvar şartlarının sıkı monitörizasyonu ve atmosferik dalgalanmalara karşı önlemler alınmasının tek basamaklı kültür uygulamalarında daha fazla önem kazanabileceğini düşünmekteyiz.

IVF çalışmalarının klinik sonuçlarının, seçilen farklı hasta popülasyonlarına, klinik protokollerdeki değişken yaklaşımlara, laboratuvar çalışmalarında tercih edilen yöntemlere ve ekibin yeterliliğine bağlı olarak, doğası gereği heterojen olduğu bilinmektedir. Embriyo kültüründe hangi kültür unsurlarının (medyum, plastikler) tercihi halinde daha iyi gebelik oranlarının elde edileceği ancak her

ünitenin kendi kalite kontrol, pratik ve tecrübe süreçlerinden aldığı dersler ile belirlenmelidir. Çalışmamızda gruplar arasında ortaya koyduğumuz farklılıkların sadece kültür stratejisine bağlı olmayabileceği, kontrol edilebilir ve edilemez birçok etkenin sonuçlara yansımalarının muhtemel olduğu bilinmelidir. Çalışmamız da, retrospektif dizaynı dolayısı ile, kontrol edemediğimiz faktörleri içeriyor olabilir. Bu nedenle, kültür sistemlerinin etkinliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için kümülatif canlı doğum oranları ve perinatal sonuçları değerlendiren büyük ölçekli prospektif çalışmaların yapılmasına halen ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışmamız, tek basamaklı medyum uygulamalarıyla ardışık medyum ile benzer oranlarda yüksek kalitede embriyo gelişimi sağlanabileceğini göstermektedir. Ötesinde, blastokist gelişim oranı artarak olası gebelik sonuçlarında iyileşme sağlanabilir.

Çıkar İlişkisi: Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

1. Aoki VW, Wilcox AL, Peterson CM. et al. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod BioMed Online* 2005;10:600-606.
2. Hentemann M, Bertheussen K. New media for culture of blastocyst. *Fertil Steril* 2009;91:878-883.
3. Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod BioMed Online* 2003;6:470-481.
4. Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? *Best Res Clin Obstet Gyn* 2007;21:83-100.
5. Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod* 1998;13:148-159.
6. Biggers JD, Summers MC. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril* 2008;90:473-483.
7. Pool TB. An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance, and safety. *Semin Reprod Med* 2002;23:309-318.
8. Gardner DK, Pool TB, Lane M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin Reprod Med* 2000;18:205-218.
9. Biggers J, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM AA medium: is a two-step protocol necessary? *RBM Online* 2002;5:133-140.
10. Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D. et al. Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril* 2010;93:1859-1863.
11. Macklon NS, Pieters MHEC, Hassan MA, Jeucken PHM, Eijkemans MJC, Fauser BCJM. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Hum Reprod* 2002;17:2700-2705.
12. Sepulveda S, Garcia J, Arriagi E, Diaz J, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. In vitro development and pregnancy outcome for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril* 2009;91:1765-1770.
13. Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertil Steril* 2009;92:1783-1789.
14. ASEBIR. (2008). Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. II Cuaderno de Embriología Clínica. Available at: <http://www.asebir.com/.../cuadernos.../ii-cuadernos-de-embriología-clínica>. Accessed February 5, 2016.
15. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In: Mortimer JR, ed. *Toward Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond 1999*. Carnforth: Parthenon Press, 1999;378-388.
16. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J. Et al. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the World health organisation (WHO) revised glossary on ART technology. *Hum Reprod* 2009;24:2683-2687.
17. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC. et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616-1624.
18. de Cássia S Figueira R, de Almeida Ferreira Braga DP, Semião-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertil Steril* 2010;94:1115-1117.
19. Paternot G, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:83.
20. Summers MC, Bird S, Mirzai FM, Thornhill A, Biggers JD. Human preimplantation embryo development in vitro: a morphological assessment of sibling zygotes cultured in a single medium or in sequential media. *Hum Fertil (Camb)* 2013;16:278-285.
21. Basile N, Morbeck D, García-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect

- embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013;28:634-641.
22. Fernández-Shaw S, Cercas R, Braña C, Villas C, Pons I. Ongoing and cumulative pregnancy rate after cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer using vitrification for cryopreservation: impact of age on the results. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:177-184.
 23. Lane M, Gardner DK. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. *Reprod Fertil Dev* 2005;17:371-378.
 24. Lane M, Gardner DK. Regulation of ionic homeostasis by mammalian embryos. *Semin Reprod Med* 2000;18:195-204.
 25. Xie Y, Wang F, Puscheck EE, Rappolee DA. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1287-1294.