

Profesyonelliği mantıkla değiştirmekten zarar gelmez

Oosit ve embriyolar hakkında

*Genç embriyologlar için
pek geleneksel olmayan bir kılavuz
(yaşlılar zaten dinlemez)*

Gábor Vajta, Mustafa Kaymaz

2022

© Yazarlar: Gábor Vajta, Mustafa Kaymaz

© Editör: László Molnár

ISBN 978-615-01-4169-5

KUCSÁK
KÖNYVKÖTÉSZET ÉS NYOMDA

www.kucsaknyomda.hu

Kapak: Ágnes Marcali

Dizgi, baskı: Kucsák Könyvkötészet és Nyomda

İÇERİK

Ön Söz.....	5
1. Giriş.....	8
<i>Büyük bir macera başlamak üzere</i>	
2. İlkeler.....	10
<i>Bilim adamının rolü, Doğa yasalarını çiğnemektir</i>	
3. Yapı.....	15
<i>Bir işin iyi yapılmasını istiyorsan kendin yap</i>	
4. İnkubatörler.....	26
<i>Amerikalılar yer çekimsiz ortamda yazı yazabilmek için bilyeli tükenmez kalem icat ettiler.</i>	
5. Oosit toplama.....	40
<i>Genel verimlilik, bir seri etkileşimle katlanarak azalır...</i>	
6. Parçaları bir araya getirme.....	42
<i>Seks hareket halindeki bir duygudur</i>	
7. Kültür yöntemimiz... ..	48
<i>Elinizden gelenin en iyisini yapmak artık yeterli değil. Artık imkânsız gibi görüneni yapmak zorundayız.</i>	
8. Harika !.....	64
<i>Hay aksi, eğer'den daha iyidir.</i>	
9. Ekler.....	84
<i>Bir çıkmaz sokak ne kadar uzunsa o oranda cadde gibi görünür.</i>	
10. Keşif ve yenilikler.....	88
<i>Sindirim sürecini tam anlamadığım için akşam yemeğimi reddetmeli miyim?</i>	
11. Yayınlama	96
<i>Çoğu doktor küçük bir böbrek taşı olgusunu yayın haline getirmeyi düşünmez.</i>	
12. Düzeltme ve önleme.....	110
<i>Dünyada yaklaşık dört milyon farklı türde hayvan ve bitki bulunmaktadır. Hayatta kalmaları için de dört milyon farklı çözüm bulunmaktadır.</i>	

13. Görevimiz.....	117
<i>Yüksek teknoloji mi? Unut gitsin. IVF düşük bir teknolojidir.</i>	
Son söz – son uyarı.....	125

ÖN SÖZ

Beşeri tıp, yüzyıllardır en iyi çabalarımızı ortaya koymamıza rağmen savunmacı bir bilim ve uygulamadır. Oluşan dejeneratif, kardiyovasküler, otoimmün, malin veya enfeksiyöz hastalıkların elimine edilmesi veya en azından kontrol altında tutulması gerekir. Çoğu bölgede koruyucu hekimlik daha etkiliyken geçtiğimiz pandemi olgusu bu uygulamaların sınırlı bir çerçevede etkili olabildiğini göstermiştir. Öte yandan, çoğu koruyucu yaklaşım da savunmacı yaklaşımdır.

Yardımcı üreme teknikleri ve bunun laboratuvar kısmı farklı bir karakterdedir. Bunun saldırgan bir tarafı olduğunu söylemiyoruz (aslında dünya çapında azalan sayıdaki insana göre hala öyledir). Bunun yaratıcı olduğunu belirtmek daha uygun olacaktır.

Yaratıcı çünkü yeni hayatlar yaratıyoruz. Çalışmalarımızın en heyecanlı bölümü fertilizasyonu indüklemek ve erken embriyonik gelişimine yardımcı olmaktır. Preimplantasyon dönemindeki embriyoları in vitro kültürde destekleyebildiğimiz kadar desteklemek ve sonunda bu embriyoları doğal ortamları olan uterusu basit bir enjeksiyonla uğurlamak için çalışıyoruz.

Kapsamlı bilimsel anlayış ve dikkatli risk değerlendirmesi yapmadan sadece sezgisel olarak geliştirildiği için de yaratıcı. Geçmişe baktığımızda, tavşan (Chang, 1959) ve fare (Whittingham, 1968) gibi sadece iki türde sınırlı sayıda IVF başarısı elde edilmişken 1978 yılında IVF yoluyla ilk insanı oluşturan öncü bilim adamlarının cesaretini anlamak oldukça zor (Steptoe and Edwards, 1978). İlk insan bebek, başarılı sığır (Brackett et al., 1982), domuz ve koyun (Cheng et al., 1986), kedi (Goodrowe et al., 1988), at (Palmer et al., 1991) ve köpek (sadece 2015'te doğmuştur, Nagashima et al., 2015) IVF uygulamalarından önce doğmuştur. Sınırlı da olsa mevcut bilgimizle Louise Brown'ın yaratılmasının oldukça şanslı bir süreç olduğunu biliyoruz. Sonuç daha farklı olabilirdi. Bu durum doğa ananın bizim tarafımızda olduğu nadir durumlardan biridir.

Bu seviyedeki bir cesaret günümüz insan embriyolojisinde karşılaşılan tipik ve değerli bir yaklaşım değildir. Karşılaştırıldığında günümüzdeki yasal sınırlamalar çok daha kısıtlayıcı durumdadır. In vitro fertilizasyonun endüstrileşme ve ticarileşmesi yaratıcılığı engellemekte ve sıkı protokoller ve kurallar yaratıcı düşüncüyü engellemektedir. Her ne kadar “*Ordnung muß sein*” (düzen olmak zorundaysa da), düzenin yarattığı negatif etki sonucunda bilimsel çıktılar azalmış, teknolojik gelişmeler yetersiz kalmış ya da duraksamış ve genelde etkinlik azalmıştır. Bir çıkış noktası bulmamız gerekiyor.

Bu düşünme sürecinde, hazırladığımız kitabın amacı teorik, teknik ve mental olarak sizlere yardımcı olmaktır. Kitapta, en uygun çözümü bulmak için en önemli konulara odaklanılmış, bazen standart görüşler zorlanmış, alternatifler sunulmuş, daha iyi çözüm arayışları ve yaratıcı düşünce teşvik edilmiştir. Yasal ve disiplin konuları bir yana, manevi görev ve sorumluluklarımızı da unutmamamız gerektiği hatırlatılmıştır. Sonuçta, verilen bu çerçevede çözüm bulmaya çalışılacaktır.

Umarız yardımcı olur.

Laboratuvar embriyolojisi ile ilgili olarak, birçok ekip tarafından düzenlenen ve önde gelen birçok bilim adamlarından oluşan etkileyici gruplar tarafından yazılan çok sayıdaki kapsamlı kitaba karşı değiliz. Kitaptaki içerik sınırlamaları ve belirli alanlardaki sınırlı veya yetersiz bilgi/ilgi eksikliği bizi yalnızca belirli konularda ilgilenmeye, boşlukları doldurmaya, dikkati belirli alanlara odaklamaya veya bazı görüşlere karşı çıkmaya zorladı. Özel ilgi alanınız burada tartışılan konular arasında değilse özür dileriz.

1.

GİRİŞ

*Büyük bir macera başlamak üzere
Winnie the Pooh*

İklim değişikliği ve diğer yıkıcı olaylar sonucunda hayatta kalsak bile dünya nüfusunun bu yüz yılın sonunda belirgin bir şekilde azalacağı tahmin edilmektedir. Yirmi üç gelişmiş ülkenin nüfusu neredeyse yarısını kaybedebilir. Bunun nedeni 1950 yılında 4.5'ten 2017 yılında 2.4'e düşen ve 2100 yılında da 1.7'nin altına düşmesi beklenen küresel fertilite oranının hızla düşmesidir (<https://www.bbc.com/news/health-53409521>) (<https://focusonreproduction.eu/article/News-in- Reproduction-Population>). Her ne kadar çevre bu değişiklikten fayda sağlasa da, genç ve yaşlılar arasındaki dengesizlik sosyal gerginliğin artmasına neden olmaktadır. Bu durumu durdurmak veya yavaşlatmak için olası herhangi bir yolu devreye sokmak için düşünülmelidir.

İnfertilite küresel olarak çiftleri %8-12 oranında etkilemekte ve bu oranın bazı bölgelerde %30'a kadar yükseldiği görülmektedir (Inhorn and Patrizio, 2015). Çok kesin olmamakla birlikte en çok kabul gören oran %15 olarak belirtilmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinden (ART) elde edilecek sonuçlar, sorunu yaratan neden, hastanın yaşı, vücut kitle endeksi, coğrafi konum ve uygulamayı yapan ünitenin etkinliği gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. En etkili tekniklerin kullanılması sayesinde gelecekte infertil çiftlerin yaklaşık %40-50'si çocuksuz bir gelecekte kurtarılabilir.

Dünyada her yıl doğan 130 milyon bebek dikkate alındığında ART, bu sayıya yılda $130 \times 0,15 \times 0,4 = 11,4$ milyon çocuk daha ekleyerek gelecekte nüfusun azalmasını yavaşlatan önemli bir etken olacaktır. Şu anda yıllık doğum oranı 500.000 civarında hesaplanmış ve bu oranın teorik olarak hesaplanan ihtimallerden ve talepten %5 daha az olduğu tespit edilmiştir (Fauser, 2019). Talepten bahsettiğimizde, toplum beklentisinin tek ve muhtemelen baskın olmayan bir faktör olduğu görülmektedir. Sağlık çalışanları olarak bizim temel amacımız, bireylerin yararına olmalı veya bu gibi bir durumda, çiftlerin veya tüm ailenin mutluluğu üzerine olmalıdır.

Gerçekleri ihtiyaçlara döndürmenin üç ana yolu vardır: nicel yaklaşımda, IVF kliniklerinin sayısını ve kapasitelerini artırmak; nitel yaklaşımda, her uygulamadaki canlı doğum oranını artırarak verimliliği yükseltmek ve finansal yaklaşımda ise, tüm coğrafi bölgelerdeki nüfusa en yüksek kalitede IVF hizmeti sunabilmektir. Laboratuvar embriyologlarının birinci seçeneğe katkıda bulunma şansları çok fazla değildir ancak ikinci seçenekte önemli rolleri varken üçüncü seçenekte önemli ölçüde katkıda bulunabilirler.

Bunun nasıl olabileceğini tartışalım.

2.

İLKELER

“Bilim adamının rolü, Doğa yasalarını çiğnemektir”
Steen Malte Willadsen

İnsan yardımcı üreme teknikleri konusunda oldukça şanslıyız. Çoğu evcil türden farklı olarak, insan oositi birçok manipölasyona rağmen yaşayabiliyor ve embriyo in vivo gelişimine devam edebiliyorsa, bunların oldukça büyük bir miktarı in vitro dönemin stres dolu sürecini telafi ederek sağlıklı bir bebeğin doğmasını sağlayabilmektedir. Doğal olmayan ve aşırı müdahalelere rağmen ölü doğum veya gelişim anomalileri gibi uzun dönem yan etkilerle karşılaşılma oranı şaşırtıcı derecede düşüktür. “Sağlıklı olur veya iz bırakmadan kaybolur” yaklaşımı çoğunlukla sınırlı seviyedeki bilğimiz nedeniyle yaptığımız yanlış seçim ve uygulamaların ciddi duygusal, ahlaki ve yasal sonuçlarından korunmamızı sağlamaktadır. Ancak bunun bir ayrıcalık olduğunu unutmamamız ve bunu suiistimal etmemeliyiz.

Disiplinimizin 40 yıllık sonuçlarını kutlamak için yayınlanan özel sayılara baktığımızda veya 8 milyon bebeğin doğmasından bahseden ve bu konuda yayımlanan harika istatistikler göz önüne alındığında başarıyı kimse küçümsememelidir. Kimse de yapmaz. Aslında birkaç çatlak ses dışında herkes memnun, kendine güvenen ve geleceğe dair iyimser bir duruş sergiliyor. Genel kanı iyi işler yaptığımız ve ilerlemenin etkileyici yönde olduğu yönündedir.

Tüm saygımla soruyorum: neye kıyasla?

Hatalı yaklaşımlarımız ve yenilikçi uygulamaları bilime çok geç sunduğumuz için geçtiğimiz kırk yıl boyunca infertil olan ve sonsuza dek infertil kalacak olan çiftlerin büyük bir kısmından mı bahsediyoruz? Maliyetleri son derece yüksek tutmak elde edilen sonuçların olumsuz olmasına yol açmaktadır. Dünya genelinde çoğu toplum için infertilite tedavisini bilgili, varlıklı ve şanslı kesimin ayrıcalığı olarak sürdüren katı bir yapı bulunmaktadır.

Harcayacak zamanımız yoktur. İlk olarak bazı eski ilkeleri yeniden gözden geçirmemiz gerekmektedir.

1. Doğal yol

Onlarca yıldır in vivo ve in vitro embriyo üretimi arasındaki mevcut boşlukları daraltarak ve sonucunda ortadan kaldırarak in vitro sistemleri geliştirmeye çalışıyoruz (Bavister, 1995; Mortimer et al., 2018). In vitro kültür ortamlarına “yetersiz”, “stresli”, “oldukça güzel” ve “ovidukt ve uterusun sağlayabileceği kadar mükemmel” şeklinde tanımlamaların getirilmesi gerekmektedir.

Bununla birlikte bazı gerçekler doğal yolun şüpheli üstünlüğünü çürütmektedir. Geniş çalışma alanımız göstermektedir ki, beşeri tıp için en ikna edici söylem, bu bilimin doğanın başarısızlıkları üzerine dayanmasıdır. İnsanlarda yardımcı üreme teknikleri doğal sürecin bir fiyaskosu olan infertiliteyi tedavi etmek üzerine kurulmuştur.

Canlı doğumla sonuçlanan doğal bir gebelik sırasında bile, ovidukt-uterus ortamı embriyo gelişimini tamamen destekleyici olmayabilir. Ovidukt sıvısı sadece epitel hücrelerinin ürünü değildir. Salgılanmanın yanı sıra, epitel tabakası yoluyla farklı çözünebilir faktörlerin pasif ve aktif taşınmasında da rol oynar. Bu faktörler, gerçek durumu yansıtır ve fetüsün ve yavruların geleceği üzerinde ciddi hasar ve uzun vadeli olumsuz etkiler de dahil olmak üzere derin sonuçları olabilecek toksik maddeler (alkol ve nikotin gibi) içerir (bkz. referanslar: Vajta et al., 2010).

Doğal yolu gizemli hale getirerek, in vivo sürecin nicel verimliliğinin in vitro karşılığından daha yüksek olmadığını da göz ardı ediyoruz. İnsanlarda, yakın zamanda yapılan bir analize göre, in vivo olarak elde edilen embriyoların %40 ila 60'ı fertilizasyonun ardından kaybedilebilmektedir (Jarvis, 2016). Sığırlarda, gelişim oranı antral folikül aşamasından veya spermatozoondan blastosiste kadar ölçüldüğünde in vitro embriyo üretiminin genel verimliliği, in vivo süreçten yaklaşık 100 kat daha yüksektir. Bu fark, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulandığında insanlarda daha da yüksek olabilmektedir.

İn vitro memeli embriyo üretimi, in vivo uygulamaların kusurlu bir kopyası olarak değil, kendi çerçeveleri, sınırlamaları ve olasılıkları olan yapay bir süreç olarak görülmelidir. Mevcut koşullar, gelecekteki uygulamaların arayışını kısıtlamamalıdır. Memeli embriyo gelişiminde in vitro sistemler kullanıldığında, geleneksel ortam, gaz, sıcaklık, yağ çerçevesinin ötesinde yeni

koşullar oluşturmak için sonsuz seçenek bulunmaktadır. Bu süreçte, doğal sürecin bir parçası olmayan faktörleri de göz önünde bulundurmak zorundayız. İn vitro ortam, anne vücudunun potansiyel ya da zararlı etkilerinden de arındırılmış olabilir.

2. Neye ihtiyaç var/yok

Diğer sorun grubu, in vivo durumu yanlış yorumlayarak veya in vivo koşulların özelliklerini mekanik olarak in vitro kültüre uygulayarak embriyolara neyi tercih etmeleri gerektiğini dikte eden otokratik yaklaşımla ilgilidir. Örneğin, gebe memelilerde, özellikle de insanlarda yaygın olarak bahsedilen bazı oviduktal faktörlerin veya fenomenlerin varlığı in vivo olarak doğrulanmamıştır. Ovidukt sıvısının fizyolojik olarak belirlenen birçok bileşeni, in vitro ortamda zararlı etkiye neden olabilir (basit bir iyon olan potasyumu düşünün). Ovidukta belirlenmeyen bazı maddeler ise in vitro ortamda varsayılan zararlı etkiye sahip olmayabilir (örneğin EDTA). Embriyonun çevresinde bulunan hyaluronik asit ve içinde bulunan yağ damlacıkları gibi bazı faktörlere in vitro sistemlerde ihtiyaç duyulmaz. İn vivo ortamı yakalamak için yapılacak herhangi bir girişim in vitro ortamda tüm dengeleri bozabilir.

Bu zihniyetin daha aşırı bir örneği olarak, geleneksel inkübatörlerdeki sürekli gaz akışının sözde 'canlandırıcı' etkisi verilebilir. Buna karşın, yedi günlük kesintisiz embriyo kültürü sırasında 200 sığır embriyosu için 30 ml statik gaz hacmi, toplanan oositlerin %50'sinin blastosist aşamasına kadar gelişmesini desteklemek için fazlasıyla yeterlidir. Benzer yanlış yaklaşımlar, embriyo kültürü sırasında toksik maddelerin birikimini önlemek ve dejenere ve ölü embriyoların zararlı etkilerini azaltmak amacıyla önerilen sık sık medyum değiştirilmesi ile ilgiliydi. Ancak bu etki hiçbir zaman kanıtlanamadı.

Bu gibi hataları önlemenin en mantıklı yolu ofisinizde daha az zaman geçirip laboratuvarda daha fazla zaman harcamanızdır. Bırakın embriyolar yapay zekâyı kullanmadan sizlere neye ihtiyaçları olduğunu söylesin. Onları izleyin, yardım edin ve sevin.

3. Faktörler

“Bir IVF laboratuvarında tek bir önemli şey vardır; o da her şey!” diyen 2018 Kahire Konsensus Grubu (Mortimer et al., 2018), daha sonra bu faktörlerden çoğunu sıralamış- birkaç eklemeyle birlikte - ancak laboratuvarın ortam sıcaklığı gibi bazı temel konuları unutmuştur. "Her şey" hakkında konuşmak bayağıdır, bu tür klişeler pratik uygulamalarda hiçbir şekilde

yardımcı olmaz. Bir sıralama oluşturulacaksa en yaygın hatalardan kaçınmak için hayati önem taşıyan ve sıklıkla göz ardı edilen faktörlere öncelik verilmelidir.

Üzerinde durulması gereken temel faktörler;

- Sıcaklık
- Zaman
- pH ve ozmolarite
- Toksik hasar ve enfeksiyon kaynaklarının eliminasyonu (Yüksek oksijen konsantrasyonu buna dahildir)
- Mikro çevre
- Kültür medyumunun temel bileşenleri ve
- Bahsedilen bu konulardaki devamlılıktır.

İzleyen bölümlerde bu konular ayrı ayrı ele alınacaktır. Yaygın olarak üzerinde durulan kural ve çözümler yerine laboratuvarımızda yaratılan veya doğrulanan alışılmamış yöntemlere odaklanılacaktır.

4. Beceriler ve görevler

Embriyologların temel becerilerinden bahseden yeni bir kitapçıkta bunlar; gizlilik, kayıt tutma, izlenebilirlik, aseptik teknik, mikroskoplar, gamet ve embriyolarda yapılacak pratik manipülasyonlar ve risklerin azaltılması şeklinde listelenmiştir. Embriyologlar canlı insanlarla¹ çalışırlar ve yaşamlarının özellikle en önemli ve hassas evrelerinden birinden sorumludurlar. Embriyo laboratuvarları bir hizmet birimi olmamakla birlikte, embriyologlar hekimlerin egemen ve eşit ortaklarıdır.

Bir embriyologla personel arasındaki temel fark zihniyettir. Bu mesleğin değerini, ayrıcalığını ve sorumluluğunu yerine getirmek için bir tür Hipokrat Yeminine ihtiyaç vardır.

¹ Herhangi bir ahlaki veya hukuki tartışmaya girmeyi düşünmüyoruz. Bu kitapta "insan", "bebek" vb. gibi terimler empati, sevgi, özen ve sorumluluk gibi olumlu duygu ve yaklaşımlar yaratmak amacıyla bilinçli olarak kullanılmıştır.

3.

YAPI

“Bir şeyin iyi yapılmasını istiyorsanız, kendiniz yapın”
Napoleon Bonaparte

Başarının gizli anahtarı iyi başlangıçtır. Bu konuda çok da şanslı değiliz. Didaktik yaklaşım ve gelenekler bizlere alt yapısı ve tüm ihtiyaçları ile birlikte bir IVF laboratuvarını oluşturmamız konusunda baskı kuruyor.

Bir embriyoloğun mütevazı geliri özel özel altyapı projelerinde çalışmalarını gerektirse de bizler kendimizi kalifiye tasarımcı, duvarcı, malzeme uzmanı veya tasarımcı olarak tanımlayamayız. Bunun ötesinde IVF laboratuvarları neredeyse tüm embriyoloji kitaplarında detaylı bir şekilde açıklana özel standartlara sahiptir. Tek yapmanız gereken bu sayfaları fotokopi çektiirmek ve bunları bir sağlık hizmetleri inşa uzmanına vermek ve ön kapısında anahtarını beklemektir.

Dünya çapında yüzlerce IVF laboratuvarını ziyaret ettikten sonra, vakaların büyük çoğunluğunda bu yaklaşımın kullanıldığını gözlemledik. Sonuçta, kayda değer istisnalar dışında, oldukça hayal kırıklığı yaşadık. Önceden belirlenmiş koşullar ve birbiriyle çelişen pratik gerekliliklerin hiçbir zaman mükemmel bir insan embriyoloji laboratuvarı yaratmaya izin vermediğini ancak bunun yine de uğruna çabalamamız gereken bir hedef olduğunu anladık.

Konum

Kliniği makul ölçüde meşgul ve yaşayabilir tutmak için, konumunun 200.000 ile 1.000.000 kişinin işe gidip gelme yolu üzerinde bulunması gerekir. Bunun yanında, çoğu ülkede yasal gereklilikler içinde tanımlanan güncellenmiş altyapıya, acil durum ve hastane hizmetlerine ve nitelikli iş gücüne de ihtiyaç vardır. Çevredeki üniversite binaları, hastaneler ve gökdelenler bir tür profesyonellik ve güvenlik hissi yaratır.

Gürültülü bir ortam, kirli ve pis kokulu hava ve ağır atmosfer; sokaklardan veya çeşitli kurumlardan gelen geniş ölçekli farklı kimyasalların varlığı veya farklı seviyelerde gerçekleştirilen faaliyetler de dâhil olmak üzere çok sayıda öngörülemeyen, potansiyel olarak zararlı faktöre rağmen belirlenen faydalar sayısal olarak bu dezavantajlardan daha fazla olabilir. Çevredeki insan kalabalığı çoğu zaman göz ardı edilse de ciddi kimyasal ve psikolojik strese neden olabilir. Tüm bu olumsuz etkileri telafi etmek için, IVF ünitelerinde birçok araç ve önlem geliştirilse de bunların koruyucu etkisi sadece kısmi olup ek sorunlar da yaratabilirler. Çeşitli filtreleme ve havalandırma ünitelerinin yarattığı titreşim ve evaporasyonu düşünecek olursak laminar akış kabinlerinin embriyoloji çalışmaları üzerindeki etkilerinden hiç bahsetmememiz gerekir.

Sakin bir banliyöde, tek başına çekici bir binada bu sistemi kurmak seçenekler arasında olmalıdır. Bu şekilde kurulacak bir insan IVF ünitesinin devamlılığını sağlamak, katı kuralları olan ve kuralları sık sık değişen ve birçok kısıtlaması olan bir mega yapıda çalışmaktan çok daha kolay olacaktır.

Bu konuda kişisel bir deneyimimi anlatmak istiyorum (GV). Danimarka'nın en nüfuzlu kıta parçası olan Jylland'ın orta kesiminde yerleşim alanlarından kilometrelerce uzak bir bölgede son derece şanslı tesadüfler sayesinde bir embriyo laboratuvarında çalışma şansına sahip oldum. Havayı kirleten tek kaynak araştırmacıların küçük arabalarıydı. Araştırmacıların çoğu zaten hava sağanak hatta kar yağışlı da olsa bisikletle gelip gidiyordu. Laboratuvarımızda klima, pozitif basınç, özel hava filtreleri yoktu ve tüm embriyo çalışmalarımızı laminar kabin dışında eldiven kullanmadan, ağız pipetiyle ve maskesiz biçimde gerçekleştiriyorduk. Bunun yanında vibrasyon sorunu da yaşamıyorduk. Mikromanipülatörlerimiz basit tahta tezgâhlarda duruyordu. Haftalarca ziyaretçilerin gelmediği, aylarca özel etkinliklerin düzenlenmediği bir ortamda uluslararası standartlara göre oldukça etkileyici bir sayıda oldukça uyumlu 7-10 kişi (zaman zaman değişiyordu) çalışıyorduk.

Steril çalışma kurallarını doğru bir şekilde uygulayarak, 12 yıl boyunca bir milyondan fazla oosit üzerinde sığırlarda IVF işlemi yaptığımızda toplanan oositlerin %50'si blastosist evresine ulaşıyordu. Benzer bir durum sığır ve domuz partenogenik aktivasyonunda ve somatik hücre nükleer transferinde de söz konusuydu. Bu sonuçlar yayınlanmış en iyi sonuçlardandır ve hala da bu özelliğini sürdürmektedir. Toplamda 6 kontaminasyonla karşılaştık. Kontamine biyolojik kaynak süratle belirlendi ve elimine edildi. Bu durum gizemli hava kirliliği ile hiçbir zaman ilişkilendirilmedi.

Bunlar evcil hayvanlardaydı diyebilirsiniz. Ancak insan ve hayvan embriyolarını karşılaştırma şansı bulduğumuzda sığır ve domuz embriyolarına göre insan embriyolarının daha az duyarlı olduğunu tespit ettik. Bunun yanında sığır embriyolarının transfer edilebilir hale 7 günlük bir kültürden sonra ulaştığını da unutmamak gerekir.

Yukarıda anlattıklarım sadece bir örnekti. Sizlere laboratuvarınızı Gobi Çölü'nde veya Antarktika'da kurmanızı önermiyoruz. Biz sadece, embriyolarımızı umutsuzca korumaya çalıştığımız zararlı etkilerden birçoğunun bizim tarafımızdan yaratıldığını ve bazı küçük çözümlerle önlenebileceğini belirtmek istiyoruz.

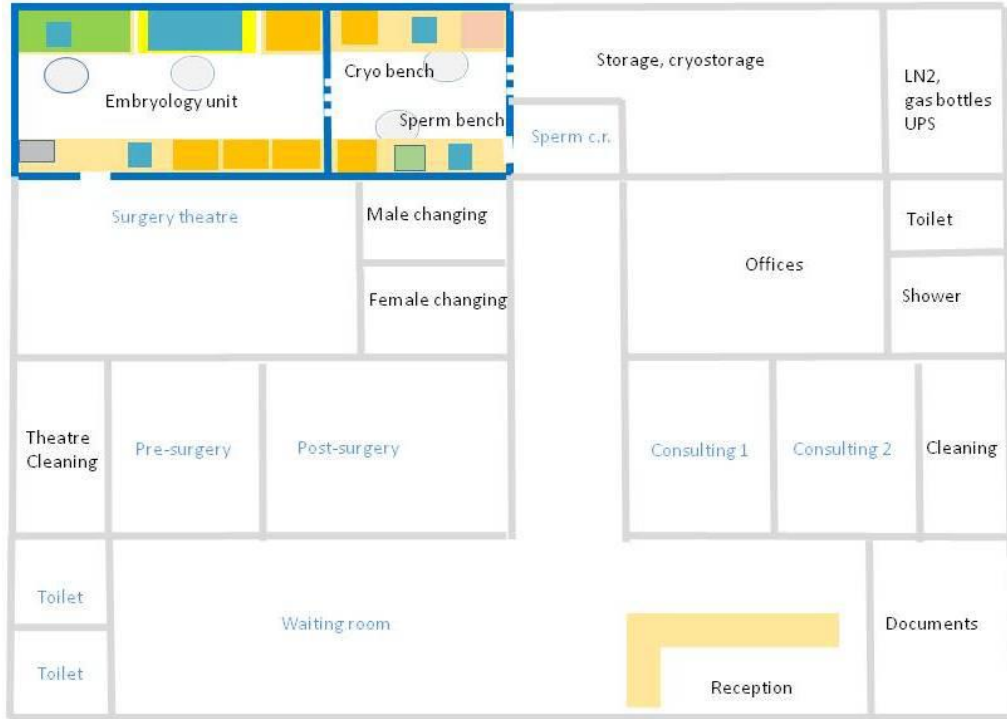
Zemin Planı

Yalnızca yeni inşa edilmiş veya tamamen yeniden yapılandırılmış bir bina gibi istisnalar dışında düzenlemenin optimum şartlarda yapılabilmesi oldukça ender görülür.

Öncelikler aşağıdaki şekildedir;

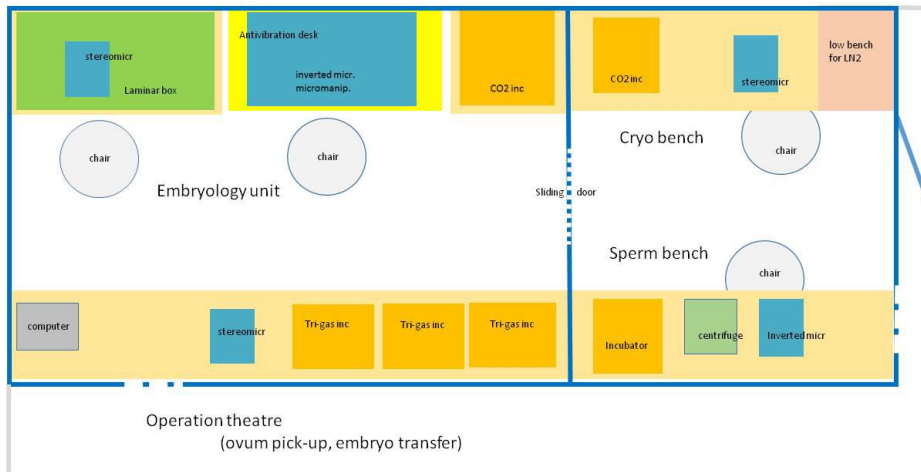
- Oosit, semen ve embriyo çalışma alanları, inkübasyon ve saklama, kimyasallar ve kullan at malzemeler ve operasyon salonu gibi yerlere kontrolsüz insan giriş çıkışı mümkünse çift kapılı bir sistemle engellenmelidir.
- Aşağıdaki üniteler arasında doğrudan bağlantı gereklidir;
 - o Laboratuvar ve operasyon salonu (kliniğin rutin çalışma düzenlemesine göre pencere veya kapılarla veya her ikisi birden) arasında,
 - o Laboratuvar ve saklama/kriyo saklama üniteleri arasında,
 - o Operasyon salonu ve pre ve post-operatif alanlar arasında.
- Gaz tüpleri, sıvı azot konteynerleri, kesintisiz güç kaynakları (UPS) (şiddetle tavsiye edilir) gibi kirli malzemelerin ayrı bir girişi olmalı ancak laboratuvar ve saklama/kriyo saklama üniteleri ile bağlantılı olmalıdır. Sıvı azotun laboratuvar içinde kat ettiği yol hasarı engellemek için özel zemin malzemesiyle kaplanmalıdır.
- Konsültasyon odası, ofis, başvuru bölümü ve resepsiyon gibi alanlar laboratuvar ve operasyon alanlarından ayrı olmalıdır.
- Son olarak, semen toplama odasının girişi, bekleyen hastaların meraklı bakışlarına maruz kalmamalıdır.

Genellikle tüm bu gereksinimleri karşılamak zor olsa da şansa bağlı olarak mümkün olabilir. Biz insan ve evcil hayvanlarda kullanılabilecek birkaç çözüm geliştirdik. Bunlardan bazıları standart büyüklükteki konteynerlerden yapıldı.



Şekil 1. Küçük ölçekli insan ART merkezinin şematik görünümü. Taban alanı yaklaşık 200 m². Kapasite: Yılda 200-400 siklus. Bu düzenleme standart konteyner kullanımına izin vermektedir.

Tasarım: G. Vajta



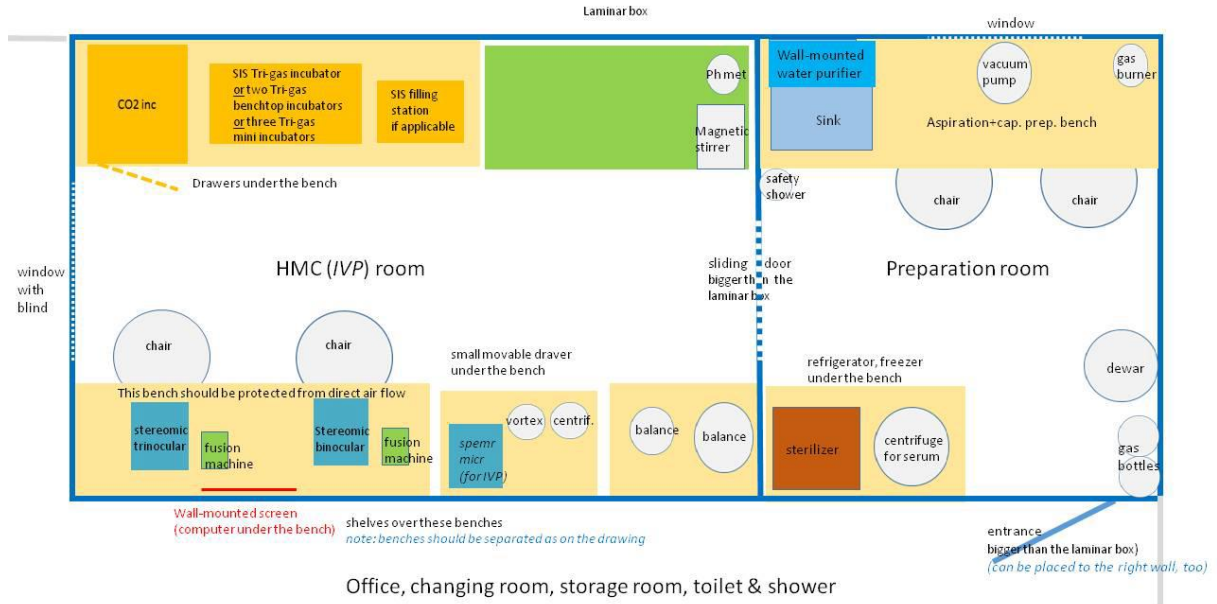
Şekil 2. Küçük ölçekli insan ART merkezinde embriyo laboratuvarının şematik görünümü. Taban alanı yaklaşık 25 m². Düzenlemeler taşınabilir konteynerlere uygun olacak şekilde yapılmıştır.

Tasarım: G. Vajta



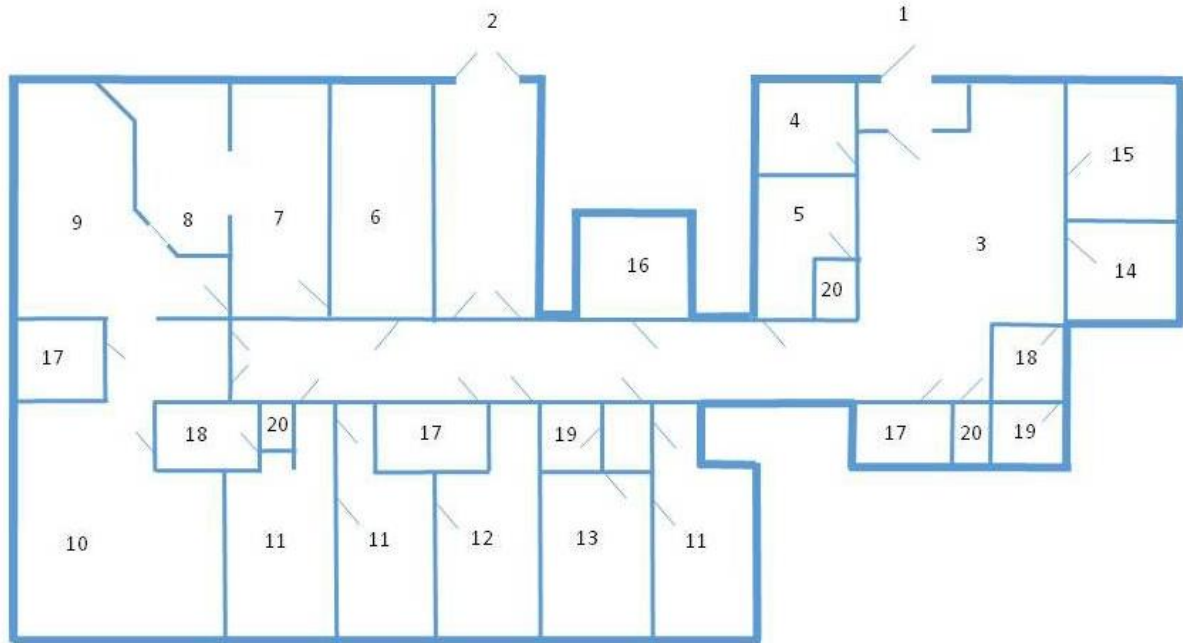
Şekil 3. Büyük hayvanlarda, mezbahadan toplanan ovaryumlardan oosit elde etmek, in vitro maturasyon, fertilizasyon, somatik hücre nükleer transferi, in vitro embriyo kültürü ve kriyoprezervasyon için tasarlanmış laboratuvar. Taban alanı yaklaşık 100 m². Kapasite: 4-6 araştırmacı, 3-4 teknik personel ile yılda 100.000 in vitro matür oosit üretimi. Düzenlemeler taşınabilir konteynerlere uygun olacak şekilde yapılmış olmasına rağmen bazı ayrı servis ünitelerinin olması gereklidir.

Tasarım: G. Vajta



Şekil 4. Küçük hayvan embriyo laboratuvarı. Taban alanı: yaklaşık 25 m². Kapasite: 2-3 araştırmacı/teknisyenle yılda yaklaşık 20.000 in vitro matür oosit üretimi. Düzenlemeler taşınabilir konteynerlere uygun olacak şekilde yapılmasına rağmen bazı ayrı servis ünitelerinin olması gereklidir.

Tasarım: G. Vajta



Şekil 5. Eski bir üniversite binasının bodrum katında önceden var olan bir alanın insan ART laboratuvarı için tasarlanmış olan planı. Bu düzenleme yukarıda listelenen neredeyse tüm

gereksinimleri karşılayan ve zor zamanlarda uygun çözümlerin bulunabileceği nadir bir örnektir.

Lejant: 1. Ana giriş, 2. Servis girişi, 3. Resepsiyon, 4. Kan alma, 5. Sperm alma, 6. Hormon ve androloji laboratuvarı, 7. Kriyoprezervasyon ve ICSI laboratuvarı, 8. Embriyo laboratuvarı, 9. Operasyon salonu, 10. Dinlenme odası, 11. Konsültasyon odası, 12. Toplantı odası, 13. Doktor odası, 14. Arşiv, 15. Mutfak, 16. Kriyo saklama, 17. Depo, 18. Giyinme odası, 19. Duş, 20. Tuvalet.

Tasarım: Dr. Béla I.Bodnár ve Dr. Zoltán Tándor. İzinleri için teşekkür ederiz.

Düzenleme

İnsan ART laboratuvarları ile ilgili birçok kitapta; yapı malzemeleri, boyalar, solventler, yapıştırıcılar, zemin malzemesi, mobilyalar, farklı amaçla kullanılacak borular, havalandırma-iklimlendirme-filtrasyon, aydınlatma ve elektrik donanımı gibi birçok güvenli kullanım gerektirecek konudan detaylı bir şekilde bahsedilmiştir. Bu konularda yapılacak en küçük hatanın boyutu okuduğunuz kitabın fiyatından daha fazla olacaktır. Doğru seçilmiş iç mimar ve inşaatçılar bölgesel veya ülkesel boyuttaki düzenlemelere hâkim olabilseler de bazı durumlarda ortaya atılan öneriler izin/akreditasyon sürecindeki gecikmelerin önlenmesine yardımcı olabilir.

Bu kısa bölümde, yazarlar, girişimciler ve iş adamları tarafından çok da önem gösterilmeyen ancak sorunların önlenmesinde yardımcı olacak birkaç pratik konu üzerinde duracağız.

İlk olarak, embriyoloji ünitelerinde sıklıkla göz ardı edilen önemli bir güvenlik konusundan bahsedelim. Sıvı azotun depolandığı tankların (pratik olarak her insan embriyo laboratuvarında 50 litreden fazla bulunan) bulunduğu odalar güvenli bir havalandırmaya sahip olmalı ve buna ek olarak alarm sistemiyle bağlantısı bulunan düşük oksijen sensörleri bulunmalıdır. Bu sensörlerin kumanda üniteleri odaların hem içinde hem de dışında bulunmalıdır. Düşük oksijen (%18'den az) olması durumunda odada tehlike altında olan bir personelin kurtarılması için hava destekli bir solunum cihazı mutlaka bulundurulmalıdır. Depo odasının kapısına yakın bir şekilde konumlandırılmış bir veya iki adet bu gibi kurtarma cihazı hayat kurtarır. Bu tip önlemler almamış olan bir evcil hayvan embriyo laboratuvarında ölümcül bir kaza meydana gelmiştir.

Bina tasarımıyla ilgili olmasa da hatırlatmamız gereken bir diğer önemli konu da sıvı nitrojenin hiçbir koşulda kapalı bir araçta taşınmaması gerektiğidir. Bununla birlikte taşıma kabı ve personel aynı kabinde bulunmamalıdır.

Embriyo laboratuvarlarında filtresiz hava girişini önlemek için genel bir kural olarak 0,2-0,4 su/cm oranında pozitif basınç yaratılması önerilirken bu kural operasyon salonları için ciddi düzenlemelerle ortaya konmuştur. Bu ikilem resmi olarak çözülemezse ve denetçiler ART laboratuvarlarının özel ihtiyaçlarına hâkim değillerse bariz önceliklerin farkına varmak zorlaşır.

Duvar, tezgâh ve zemin renkleri nadiren tartışılan konulardandır. Biz nötr ve tek renkli yüzeyleri öneriyoruz. Modaya göre seçilmiş desenli tezgâhlarda cam kapıllarları bulmak zorlu ve tehlikeli bir durum haline gelebilir. Zemindeki her türlü kirli noktayı fark edecek şekilde bir düzenleme yapın. Bunun aksine mozaik görünümlü bir zemin kaplamasıyla yerdeki kiri gizlemeye kalkarsanız kontamine kültürlerle karşılaşsınız.

Aydınlatma konusuna gelince; biz çoğu embriyoloğun aksine normal tavan aydınlatmasının embriyolarımız üzerine herhangi bir olumsuz yönünü gözlemlemedik. Hatta hafifçe kısılmış doğal ışık – tabi ki direkt güneş ışığı değil- embriyolar tarafından iyi tolere edildi. Bizler oda için sade ve ılık bir aydınlatma ve her çalışma istasyonu için masa lambası kullanmayı tercih ediyoruz. Bu şekildeki bir aydınlatma ile özellikle de mikroskobik ve makroskobik çalışmalarda özel alan hissi yaratılmaktadır.

Embriyo laboratuvarının ortam sıcaklığı çok önemli bir konu olmasına rağmen, ilginçtir ki en çok ihmal edilen konulardan biridir. “Oda sıcaklığı” “ortam sıcaklığı” en sık kullanılan ifadeler arasında yer almakta ve ne şekilde ifade edilirse edilsin ya da anlaşılırsa anlaşılсын havalandırma/iklimlendirme sistemine bağlı olarak 18 ile 26 °C arasında değişmektedir (farklı kıtalarda farklı laboratuvarlardaki kişisel deneyimlere göre belirlenmiştir).

Bir embriyo laboratuvarında kontrol edilmesi çok güç olan birçok faktör yer almaktadır. Oda sıcaklığı bunlardan biri değildir. Ancak diğer yandan, preimplantasyon dönemindeki embriyoların gelişimi için oda sıcaklığının ne kadar önemli bir faktör olduğunun anlaşılınmaması memeli embriyolojisinin gelişimini 70 yıldır geciktirdi. Edindiğimiz izlenime göre bu sorun hala varlığını sürdürmekte ve birçok tutarsız sonuca neden olmaktadır.

Tıpkı anne vücudunda olduğu gibi embriyoların sabit parametreleri tercih ettiği konusunda hepimiz hemfikiriz. Embriyoları inkübatörden çıkarmak her zaman kontrolsüz bir strese neden

olmaktadır. Her ne kadar ısıtma tablaları bu durumun önlenmesinde yardımcı olsa da, soğuk havada meydana gelen dalgalanmalar kaçınılmaz olmakta ve kontrol edilememektedir. Daha da önemlisi aktivasyon, ekilibrasyon, dilüsyon gibi parametreler sıcaklığa bağlıdır ve bunlar belirli sıcaklıklar için optimize edilmiştir. Rastgele bir oda sıcaklığında yapılan bu gibi uygulamalarda sonuçlar da belirsiz olacaktır.

İnsan embriyo ve oositlerinin dondurulmasında ilk baştan beri kullanılan 25°C'lik ortam sıcaklığı hem embriyologlar ve hem de embriyolar için uygun bir sıcaklık aralığı olarak kabul edilmektedir. Bu sıcaklık kontaminasyon ihtimalini artırmasa da embriyoların strese maruz kalmasını belirgin bir şekilde azaltmaktadır. İnkübatör dışındaki tüm uygulamalar için kabul edilebilir seviyede olan bu sıcaklık derecesi günlük çalışmalarda karşımıza çıkabilecek tutarsızlıklardan birini de elimine etmektedir.

Embriyo çalışmalarının yapıldığı alanlarda doğru ve güvenilir tipte havalandırma ve ısıtma sistemlerinin bulunmasını ve odaların duvarlarına büyük dijital termometrelerin yerleştirilmesini şiddetle önermekteyiz.

Aletler

Küçük ve büyük alet ve donanım için genel anlamda önerilerimiz olacaktır. Para sıkıntısı dışında, güçlü nedenleriniz olmadığı sürece ev aletlerinde olduğu gibi ucuz modelleri almayın. Öte yandan, oldukça donanımlı son modelleri alırken de dikkatli olun. Üreticinin pazar araştırmasını yaptığı gizli çalışmaların bir parçası olmamaya gayret edin. Üretiminin üzerinden 3-5 yıl geçmiş, iyi referanslara sahip bir cihaza sahip olmak işlev ve güvenilirlik anlamında daha güvenli bir yatırım olabilir.

Isıtma tablaları ve ısıtıcı cihazların sayısında hiçbir masraftan kaçınmayın. İhtiyacınız olandan fazlasını alın ancak çok özel özelliklerin sizi kandırmasına da izin vermeyin. Biz klon laboratuvarımızda yıllarca lokal bir eczaneden aldığımız ısıtıcı pedleri paslanmaz çelik levhanın çevresine sararak ve sadece başlangıçta ısı ayarlamasını yaparak başarılı sonuçlar elde ettik.

Aynı çözüm yolunu insan IVF'i için önermesek de çoklu sensörlerin, yazılımların ve göstergelerin varlığının gereksiz bir lüks olduğunu savunuyoruz.

Tüm bunlara rağmen emin olmanız gereken konular aşağıda sıralanmıştır.

- Yağ da dâhil olmak üzere medyum içeren her tüp 37°C'de veya türe özgü ısıda tutulmalıdır. Bu amaç için ayrı test tüpü almanıza gerek yoktur. Eğer bir metal ustanız varsa ona uygun silindirik delikleri olan alüminyum bloklardan birçok sayıda yaptırdıktan sonra bunları ısıtıcı tabla üzerine yerleştirirsiniz.
- Mikroskop altında petrideki medyum içerisinde bulunan oosit veya embriyolarla direkt manipülasyon yapmayacaksanız bu kapların üzerini yarı saydam plastik kaplarla örtünüz. Bu amaç için plastik pipet uçlarının bulunduğu kutuların kapakları oldukça uygundur.

Zamanlayıcılarla ilgili olarak sağlam, tezgâh üstü, basit ve klavyesi kolay kullanılabilen tiptekileri öneriyoruz. Bunun için Jadco marka zamanlayıcıları örnek verebiliriz. Bu cihazlar yardım almadan tek elle ve bakmaya bile gerek duymadan başlatılıp durdurulabilmelidir. Kıyafetinize tutturulmuş küçük renkli saatler ilgi çekici olmakla birlikte size çalışma alanından uzaklaşma özgürlüğü verebilir. Jadco tipi saatler aynı zamanda cebinize de konabilir. Küçük bir tavsiye; laboratuvarınızda farklı tiplerde zamanlayıcılar kullanmayın. *Varietas delactat* (çeşitlilik keyiflidir) ancak bu durumda hata kaynağı da olabilir.





Şekil 6. Alüminyum ısıtıcı bloklar ve tezgâh üstü zamanlayıcı.

Çalışma alanınızda özellikle de aynı alanda ve benzer aktivitelerde birden fazla kişi çalışıyorsa titizlikle bir düzen sağlayın. Çalıştığınız konuda ihtiyacınız olmayan her şeyi ortamdan uzaklaştırın. Çalışacağınız tüm malzemenin (mikroskop, pipetler, pipet uçları, ısıtıcı bloklar, plastik kapaklar, zamanlayıcılar) her zaman aynı pozisyonda olmasına özen gösterin. Görsel temas olmadan ve düşünmeksizin her şeyi bulabilmelisiniz. Hızlı ve etkili bir iş için askeri tarzda bir düzen oluşturmak vazgeçilmez olmalıdır.

Son olarak *inkübatörlerden* bahsedelim. Bir IVF laboratuvarının birden fazla inkübatöre ihtiyacı vardır. Bunlar;

- Kısa süreli inkübasyonlar ve bikarbonat tamponlu boş kapların preinkübasyonu için bir veya iki adet “dolap tipi” inkübatör,
- HEPES veya MOPS tamponlu medyumların ön ısıtması için gaz içermeyen basit inkübatör,
- Son olarak, en önemlisi embriyo kültürü için özel 3 gaz sistemli inkübatörler.

Son örnek özel bir bölümde anlatılacaktır.

4.

İNKUBATÖRLER

“Amerikalılar yer çekimsiz ortamda yazı yazabilmek için birkaç milyon dolar harcayarak bilyeli tükenmez kalem icat ettiler. Ruslar ise kurşun kalem kullandılar”

Doğru olmayabilir ama tipik bir durum. Embriyoloji ile ilgili olarak Amerikalıları suçlamamalıyız. Daha doğrusu sadece onları değil.

Macaristan’da “Veteriner atı” şeklinde çevrilebilen “Állatorvosi ló” deyimini vardır. Bu deyim 19. yüzyılda birisinin bir atın sahip olabileceği tüm olası dış ve iç hastalıkları sergileyen bir at resmi oluşturmasıyla ortaya çıkmıştır. Günümüzde ise bu deyim, tüm olumsuz koşulları tanımlamak için kullanılmaktadır. Buna benzer bir deyim İngilizcede bulunmamaktadır. Bunun yerine makul bir şekilde “Embriyoloji inkübatörü” denmesini öneriyoruz.

Her şey daha farklı gelişebilirdi. Doksanlı yıllarda çok uluslu büyük şirketlerde yaratıcılık esas değildi. Endüstrinin böylesine önemli bir konudaki ihmali nedeniyle, başarılı laboratuvarlar ve bilim adamlarından pratik problem çözme becerisi ve el becerilerinin fazla olması istenirdi.

Geçtiğimiz yüzyılın son on yılında hem insan hem de hayvan embriyo üretimindeki artış yeni girişimlerin başlamasına neden oldu. Farklı tipteki hücre ve doku kültürlerinde başarıyla çalışan dolap tarzı inkübatörlerde, kullanılan farklı programların başlangıç, bitiş ve ara dönem kontrolleri sırasında kapağın açılıp kapanması istenilen kararlılığın ve doğruluğun sağlanmasını engelledi.

Tüm pre-inkübasyonlar ve maturasyon, fertilizasyon ve embriyo kültürü sırasındaki manipülasyonlar için sadece bir karbondioksitli inkübatörünüz varsa bu durumda inkübatörün kapağı günde 15-20 defa açılacaktır. Bu durumda tüm sistem çökecek ve blastosist gelişimi %25-30’dan sıfıra düşecektir. Sonuçta patron veya klinik şefi üzülecek, uygulamaların durmasını isteyip herkesin cihazı temizlemesini, havalandırılmasını ve yeni medyumların hazırlanmasını isteyecektir.

Bir veya iki programla yapılan yeni başlangıçlar genellikle başarılı olur. Ortamda bir rahatlama hissi başlar, haftadan haftaya artan sayıda başarılar elde edilir ve sonunda yeni bir çöküşle karşılaşılır. Bilgi alışverişinin bugünkünden bile yavaş ve etkisiz olduğu ve kritik veya sağlıklı embriyo gelişiminde şiddetli dalgalanmaların meydana geldiği zamanlarda, çoğu laboratuvar olayların arkasındaki gerçekleri zor yoldan öğrenmek zorunda kalıyordu.

İlk tasarımlar

Çoğu laboratuvarında basit ve ev yapımı bir çözüm yaratılarak kullanılmaya başlandı. Bazı kimyasalların saklanması için kullanılan *geniş, kalın duvarlı cam desikatör kapları* yeni bir işleve sahip oldu. Her programa ait petriler bunların içine yerleştiriliyor, daha sonra uygun gaz karışımıyla doldurulup dolap tipi inkübatörlere yerleştiriliyorlardı. Ortam ısısının istenilen sıcaklığa ulaşması saatler sürse de ilerleyen süreçte sabit parametrelerle daha iyi ve daha tutarlı sonuçlar elde edildi. Tek problem kapların büyüklüğüydü ve dolap tipi tek bir inkübatör çoğu zaman tek olsa da bazen de iki desikatör kabı alabiliyordu.

O günlerde Danimarka evcil hayvan embriyoloji araştırmalarının en önemli noktasıydı ve *amaca yönelik üretilmiş ilk embriyo inkübatörü* Kopenhag'da K-system adı verilen yerel ve küçük bir firmanın az da olsa desteğiyle kullanıma sunuldu (Avery ve Greve, 1992). Bu cihaz ısıtma için harici sirkülasyonlu bir pompaya bağlanan su ceketli küçük bir metal kutudan oluşuyordu. İhtiyaç duyulan gaz karışımı önceden hazırlanıp küçük bir delikten veriliyor, diğer taraftaki başka bir delikten de dışarı alınıyordu. Gazın içeri verilip birkaç dakika sonra kutunun diğer tarafından çıkınca bu iki delik elektrik yalıtım bantlarıyla kapatılıp türe bağlı olarak 5-7 gün süreyle bırakılırdı. Sistem basit, tutarlı ve güvenilir, mükemmel kalitede embriyolar elde ediliyordu. Bazı pratik manipülasyonlarla insan ve hayvan laboratuvarlarının en gözde cihazı haline geldi. Ne yazık ki bu cihazın kullanımı Danimarka'daki birkaç hayvan laboratuvarında sınırlı kaldı ve on yıl içinde tamamen unutuldu.

Endüstrinin ilgisi

Bu noktadan sonra işler ilerledi ancak ne yazık ki tam olarak doğru yönde olmadı. Yeni yüzyılın ilk yılında, bir firma devrim niteliğinde bir tasarımla *üstten yüklemeli masaüstü inkübatörü* geliştirdi. Bizim sığır embriyo laboratuvarı da diğer birimlerle birlikte cihaz prototipinin testi

için seçildi. Biz de bu cihazla 1. günden itibaren veya klonlamada kullandığımız 0.-7.günler arasında tek kültür sistemlerini çalıştık. Yeni modelde geleneksel sistemler kadar olmasa da oldukça tatmin edici sonuçlar aldık. Blastosistlerin görünümünden pek memnun kalmadık.

Bulgularımız alakasız olarak değerlendirildi ve inkübatör pazara sunulup çoğu insan IVF laboratuvarında yerini aldı. Diğer firmalar ilk modeli modifiye ederek süslü eklentilere sahip yarı klon modeller yapmaya başladılar. Önceden hazırlanmış gaz karışımının yerini, her bölme için farklı gaz kombinasyonları sağlayan cihaz içindeki karıştırıcılar aldı. Oldukça pahalı olan bu cihazlara insan IVF laboratuvarında kesinlikle gerek bulunmamaktadır. Üreticiler, her odacık için bireysel analizlerde kullanılmak üzere ayrı gaz girişleri ve rutin uygulamalarda asla ihtiyaç olmayacak sıcaklık aralıklarına sahip ayarlanabilir sofistike ısıtma sistemleri yarattılar. Şirketin mali işler sorumlusunu daha da mutlu etmek için bir de günlük verileri kaydeden - hiçbir pratik değeri olmayan- ilgi çekici renkli ekrana sahip bilgisayar bağlantısı eklediler.

Bununla birlikte özellikle üstten yüklemeli masa üstü inkübatörlerde, kompartmanlara ayırma ve ısı ve gazın istenilen düzeye süratle geri dönüşü tartışılmaz avantajlar arasında geliyordu. Bu avantajlar *geleneksel dolap tipi inkübatör* üreticilerinin yenilik yapması gerekliliğini doğurdu. Bu yenilikler arasında daha hassas sensörler ve dolayısıyla parametreler ve çift iç kapı sistemli yarı izole bölmeli 3 gaz karıştırıcılı sistemler yer alıyordu. Bir diğer mantıklı adım ise, daha az hastanın örneklerinin bulunabileceği şekilde (en uygunu hasta başına bir inkübatör) cihaz büyüklüğünün azaltılması olmuştur. Ancak maalesef ki küçük cihaz düşük maliyet demek değildir ve çok az sayıda klinik bu kadar büyük yatırımı, geniş alanı ve düzinelerce cihazın işletme maliyetini karşılayabilmektedir. Küçük kapasiteli cihazlarda kapak açılması sonrasında optimum ısı-gaz ortamına dönüş dolap tipi olanlara göre daha süratli olmaktadır. Bu parametreler, dolap tipi inkübatörlerde üstten yüklemeli modellerin çok gerisinde kaldı.

Gelişmeler burada bitmedi. Yenilikçi düzenlemelerle birlikte hibrit cihazlar üretildi. Time-lapse özellikli cihazlara gelişmiş bir görünüm kazandırılarak bu ek seçeneklerle hastadan alınan paraların çoğunun inkübatörlere gitmesi sağlandı. Geliştirilen bu yeni sistemlerin yararı ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Bunun yanında time-lapse uygulamalarında kullanılan petri kaplarıyla ilgili sorun da ortaya çıkmıştır. Bu konu ilgili bölümde tartışılacaktır.

Ortamdaki *nem* konusu üreticiler ve embriyologlar tarafından neredeyse tamamen atlanmaktadır. Üreticiler inkübatörlerdeki nemli atmosferin sensörlerle ilgili sorunlar ortaya çıkardığını ve doku kültürü şişelerinden farklı olarak embriyo kültür droplarında kullanılan yağın evaporasyonu engellediğini belirtmişlerdir. Bu nedenle üreticiler sadece “*ortam nemine*”

(“ortam” tıp dilinde absurd biçimde “idiopatik” terimine benzemekte ve *Ihavenoclue* ya da bir başka deyişle “hiçbir fikrim yok“ un akademik dille söylenen şeklidir) sahip inkübatörler geliştirip bunun faydalarını (örn; azalan fungal enfeksiyonlar) gururla reklam aracı olarak kullandılar.

Doku kültürüyle uğraşan eski dostlar, neme bağlı kontaminasyon tehlikesini en aza indirmenin yöntemlerini çok iyi bilirler. 2005 yılında önce yayımlanmış ilgili makalelerin materyal metot bölümlerinde “maksimum nem” standart bir açıklama olarak kullanılıyordu. Biz de herhangi bir değişiklik yapmadık. Embriyo laboratuvarlarında sorun giderme her zaman zorlu bir konu olmuştur. Ancak ya mantar enfeksiyonu? Hatırladığımız kadarıyla 25 yılda sadece 2 vaka oldu ve biri inkübatörün açık durumda bulunan su tepsisinden kaynaklandı.

Fungal enfeksiyonlar oldukça nadir görülür ve önlemesi oldukça kolaydır. Tehlikeyi önlemek için geliştirilen yeni “kuru” sistemler olumsuz sonuçları belirlenmediği sürece rahatlıkla kullanılabilir.

Bir, iki, bir

Embriyolojide kuru sistemin kullanılmaya başladığı sırada talihsiz bir tesadüfle başka bir sistem olan iki aşamalı kültür büyük bir popülerlik kazanmıştır. Yeni yüzyılın ilk 10 yılının ortalarında ART klinikleri ya bölünme aşamasında embriyo transferi yapmışlar ya da kültürün 3.gününde kültür medyumunu değiştirmişlerdir. Bu yeni moda yaklaşıma direnmeye cesaret eden az sayıdaki şirket bile 3.günde medyum değişikliği rüzgârına yakın bir şekilde hareket etti. Neden olarak da gizlice; durumun “bilimsel olmadığını sadece şirket avukatları tavsiyesine göre” hareket ettiklerini belirttiler. Geriye dönüp bakıldığında kuru inkübatörlerin oldukça iyi performans gösterdiklerini söylemek gerekir (Mori et al., 2011).

Bazı laboratuvarların 1-5.günler arasında kesintisiz kültüre dönmesiyle problemler ortaya çıkmaya başladı. Bu durum yeni bir moda akımının ortaya çıkmasına neden oldu. Bu da, embriyologların kültürün 3.gününde standart olarak yaptığı embriyo değerlendirme işlemini inkübatörün kapağını açmadan yapabilen time-lapse cihazlar kullanmaktı. Bunun yanında bazı kliniklerde kesintisiz kültür, hem embriyo kalitesinde hem de transfer sonrası sonuçlarda azalmaya neden oldu ve besin eksikliği ve toksik metabolik ürünlerin birikimi gibi eski şüphelileri suçlayarak tekrar 3.günde medyum değişimine geçildi. İlginçtir ki nemlendirilmiş

inkübatörlerin kullanıldığı diğer laboratuvarlarda sorun oluşmadı. Dropların üzerinde bulunan ince yağ tabakasının evaporasyonu tamamen engellemediğini ve kademeli olarak artan ozmolaritenin embriyo gelişimini olumsuz etkilediğini anlamak uzun yıllar aldı. Dört-5 günlük süre embriyoların tolere edemeyeceği kadar uzundu.

Birkaç ay önce, 20 yıl önce benchtop inkübatör projesinden sorumlu bir kişiyle iletişime geçme şansımız oldu. Bu kişi şimdi aynı şirketin patronu olmuştu. Kendisi yazışmalarımızı ve yaptığı son yorumlarını hatırladı ki bunlar doğrudu: “*Evet haklısınız; zaten biz de şimdi nemlendirmeye doğru gidiyoruz*”.

Onların web sayfasını kontrol ettik; nemlendirici oldukça basit bir tasarımla gerçekten orada bulunuyordu. Hiç şüphemin yok ki 10 yıl içerisinde çoğu şirket, kurşungeçirmez özellikte, sensörlü, çevrim içi alarm özellikleri olan de lüks modeller geliştirecektir. Bu yeni geliştirilen modellerin fiyatları saçlarınızı havalandıracaktır.

Ama bu gerçekten gerekli mi? Daha basit olamaz mı?

Sizi uyarıyoruz: aşağıda okuyacaklarınız kalbi zayıf olanlar ve kesinlikle akreditasyon protokollerini yapan ve yürüten yetkililer için değildir.

Şaşırtıcı bir düşünce

Sürücüsüz arabaların, süper bilgisayarların ve makine öğreniminin olduğu 2021 yılında şu ana kadar olanları unutmanızı öneriyoruz. Kısa bir süre için taş devrine yakın bir beyinle donatılmış halde düşünelim. Preimplantasyon sürecinde bulunan insan embriyolarını petrilere kültüre etmek için neye ihtiyacımız var (ya da yok)?

- Sıcaklık, nem, oksijen, azot ve karbondioksit gibi temel parametrelerde tutarlı, doğru ve güvenilir değerlere sahip olunmalı;
- Bu değerler inkübasyonun başlamasından hemen sonra en uygun değerlere hızla ulaşmalı;
- Minimum ve kontrol edilebilir seviyede toksik hasar veya enfeksiyon olmalı ve çapraz kontaminasyon şansı bulunmamalı;
- Embriyolar hakkında içinizin rahat olması için, en az miktarda tutarsızlık ve risk faktörleri içeren bir akış planlaması sağlamalı;

- Embriyologlar hakkında iinizin rahat olması için, sistemin programlanmaya, ayarlamaya, günlük kontrollere, karışık el kitaplarına, bakıma ve endişeye ihtiyacı olmamalı;
- Kliniklerin ve hastaların btçeleri düşünüldüğünde, inkübasyon metodu minimum yatırım ve son derece düşük işletme giderine sahip olmalı;
- İnsan ART'si için, günlük hayatı ilgilendiren endişe ve düşünceleriniz laboratuvarın dışında bırakılmalıdır.

Hayal gibi görünse de aslında buna çok yakınız. Bu gereksinimleri karşılayabilmemiz için aşağıdaki maddelere ihtiyacımız bulunmaktadır.

- Her hasta için disposable steril duvarlı bireysel inkübatör;
- İnkübasyon sırasında gaz değışimine ihtiyaç duymayan kapalı bir sistem;
- İnkübasyona başlamadan hemen önce bile neredeyse en uygun seviyede bir ortam ve sistemin doğru ve tutarlı bir şekilde çalıştığını belirlemek için sofistike kontrol sistemlerine ihtiyaç duyulmaması;
- alışan sistemin mümkün olan en az cihazla kurulması (Biyolojik bir laboratuvarda sürekli çalışan cihazların en güvenilir cihazlar olması gerekir);
- Çok düşük olasılık da olsa başarısızlık durumunda basit ve kolay bir şekilde acil duruma müdahale edilebilmeli;
- Altı aya kadar dayanabilen ve yalnızca bir defa konsantrasyon ve biyolojik kontrollerin yapıldığı bir gaz kaynağı;
- Laboratuvar havasındaki herhangi bir değışiklikten bağımsız olarak altı aylık bir süre boyunca aynı gaz atmosferini sağlayan, mevcut inkbatrlerle kıyaslanamayacak bir tutarlılık.

Bu ihtiyaçları karşılayabilmek için birçok çözüm yolu olabilir. Biz aşağıda verdiğimiz çözüm dışında hiç birini bulamadık:

- Kullanacağınız 3 gaz karışımındaki bileşenlerin hiç birini *geçirmeyen sterilize edilmiş lamine bir folyo torba* alın;
- Kültür petrisini içine yerleştirin, geniş bir demir aracılığı ile mümkün olan en düşük sıcaklığı kullanarak torbayı kapatın;
- Torbanın bir köşesine 18 G iğne kullanarak delik açın ve petrinin kapağını torbanın üzerinden tutarak hafifçe kaldırın ve daha *nceden ısıtılmış, nemlendirilmış ve filtre edilmiş gaz karışımını* torbaya enjekte edin;

- İğneyi çıkarın ve şişen torbadaki gaz karışımına bastırın;
- Doldurma/boşaltma işlemini içerideki gaz değişimi tamamlanana kadar 3 defa *tekrarlayın*;
- Torbanın %70'ini gaz karışımıyla doldurun ve daha sonra *deliği kapatıp torbayı sirkülatörlü su banyosuna daldırın*.

SIS'e (Submarine Incubation System- Denizaltı İnkübasyon Sistemi) hoş geldiniz. Bu sistem ilk olarak 1998 yılında Vajta et al., tarafından yayınlanmış ve bir milyondan fazla insan, sığır ve domuz embriyosunun sürekli ve kesintisiz bir şekilde sırasıyla 1+4, 5 ve 7 gün boyunca kültüre edilmesini sağlamıştır. İlgili videoyu bu linkte bulabilirsiniz: <https://vimeo.com/34544754>

Kalan konuları açıklığa kavuşturmak ve varsa endişeleri ortadan kaldırmak için *birkaç pratik öneri*.

1. Gaz kaynağı. İstenilen üç gaz karışımıyla doldurulmuş büyük (1,5 m) bir gaz tüpü, SIS kullanan orta büyüklükteki (300-500 siklus/yıl) bir ART kliniğinin 6 aylık ihtiyacını karşılar. Üretci firmanın önerilerine göre değiştirilen karbon filtre ile tüp regülatörü arasına bir şişe yerleştirilerek otoklavlanabilir steril suyla filtre edilebilen nemlendirici elde edilmiş olur. Nemlendirici türe göre 37-39°C arasında olmalıdır. Nemlendirilen ve ısıtılan gaz karışımı daha sonra tekrar 0,2 µm disposable steril filtreden geçirildikten sonra 18G disposable iğneye bağlanır.
2. Folyo torba. Bilinen tek katlı plastik torbalar gazı geçirebildiği için bu amaç için UYGUN DEĞİLDİR. Lamine edilmiş folyo torbalar da, içerdiği katmanların sayısı, permeabilite özelliği ve yüksek ısıda kapatılma sırasında potansiyel toksisite yaratması nedeniyle birbirlerinden ayrılırlar. Doğru ürünü bulmada üretici firmanın belirttiği özelliklerden yararlanmak tatmin edici olmayabilir. Yirmi yıldır başarıyla kullandığımız bu torbayı almak için BİZLERLE BAĞLANTIYA GEÇMENİZİ ŞİDDETLE TAVSİYE EDERİZ.
3. Kapatıcı. Basınçla çalışan demir kapatıcılar (Şekil 9) birçok farklı çevrimiçi kaynaktan temin edilebilir. En ucuzunu almanızı önermesek de sofistike olanlara da ihtiyacınız olmadığını bilin. Maksimum 100 USD'lık bir ürün sizin için yeterlidir.

Öncelikle, içinde EMBRİYO OLMAYAN bir folyo torbada istenilen kapatma sıcaklığını elde etmek için test yapın. Üstteki kolu nazikçe bastırın ve ısıtma işlemi

bitinceye kadar basılı tutun. Folyo tüm yüzeyleriyle boylu boyunca birbirine yapışırken, ısıtıcı yüzeye yapışmamalıdır.

4. Su banyosu. Ticari tüm su banyoları bu amaç için uygundur. Biz, sıcaklık stabilitesi 0,1 °C ve sıcaklık dağılımı 0,01°C olan Thermo-Fisher Precission CIR, 35 TSCIR35 (*ticari çıkarımız yoktur*) gibi büyüklük açısından uygun olan güvenilir markaları öneriyoruz. Plastik test tüplüklerine içi su dolu tüplerle ağırlık yaparsanız hazırladığınız folyo torbaları suyun altında tutabilirsiniz. Bir su banyosu 12-16 hastanın embriyolarını barındırabilir.

Avustralya’da 20 yıl önce bu amaca yönelik olarak 24 folyo torba/hasta kapasiteli profesyonel su banyoları (vidoda görüldüğü gibi) geliştirilmiştir. Ancak firma sahibi emekli olduktan sonra yeni sahibi bu ürünü üretmemiştir. İlgilenenler için tanımlamalar ve teknik detaylar mevcuttur.

Kontaminasyonun önlenmesi için, sıklıkla kullanılan su banyosu dezenfektanları (SigmaClean su banyosu temizleyicisi, S5525) kullanılabilir. Suya temas ederken aynı zamanda disposable eldivenler de kullanabilirsiniz.

İki farklı seçenek daha. Embriyoların transferinden önce veya kültürü sırasında uzun süreli bir mesafe kat edilecekse taşınabilir su banyoları (Şekil 7; c, d, e) kullanılabilir. Diğer seçenek ise; su banyosu kullanmamayı tercih ediyorsanız folyo torbalarınızı gaz veya nem içermeyen inkübatörün raflarına koyabilirsiniz (Şekil 8). Bu durumda ısının istenen şartlara dönmesi zaman alacak ve ısı stabilitesi su banyosu bazlı sisteme göre daha düşük olacaktır. Beklenen çıktılara bakıldığında yaygın inkübasyon yöntemlerine göre su banyosu temelli sistemlerin kullanılmasının daha iyi olduğu görülecektir.

SIS folyo torba sistemi kullanıldığında acil bir durumla karşılaştığınızda, embriyolarınızı sağlıklı ve mutlu tutmak isterseniz sadece sıcak- soğuk suya ve termometreye ihtiyacınız olduğunu not ediniz.

Bebeğimizi daha fazla övmek istemiyoruz. İkna olmak için ek söylemlere ihtiyacınız varsa bir önceki sayfayı tekrar okuyun ve ticari olarak dünyanın her yerde bulabileceğiniz inkübatörlerle SIS sisteminin yarar ve dezavantajlarını karşılaştırın.

Yükleme sırasında 2-3 dakikalık bir çalışma yapmanız gerekir. Bizce bir hasta için bu süre çok fazla değildir. Bu uygulamada embriyoya kısaca göz atmanın karışık bir durum olduğunu biliyoruz. Bizler bunu SIS uygulamasının BÜYÜK AVANTAJI olarak görüyoruz.

Son olarak, SIS'in profesyonel markaların ürünleri kadar süslü, gizemli ve profesyonel olmadığını da kabul ediyoruz. Ancak embriyolarınıza bir sorun; bu konuda ne düşünüyorlar?



a

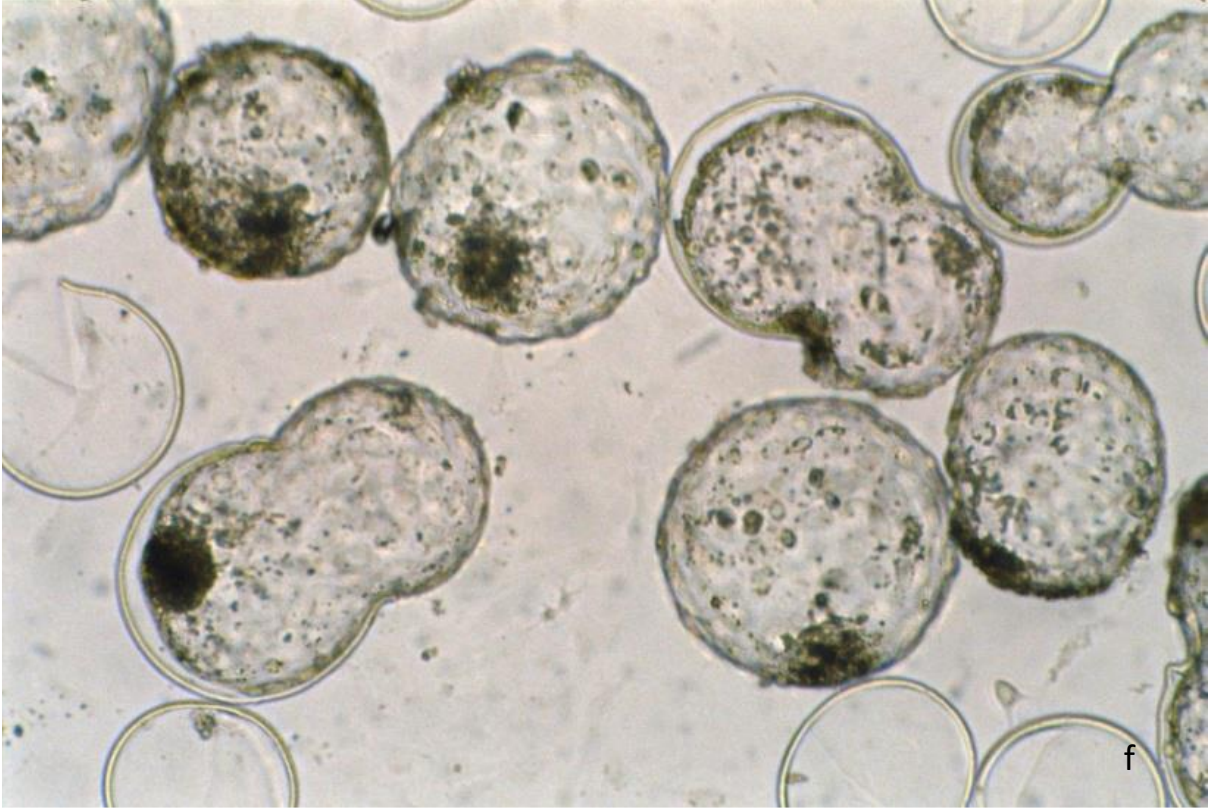


b



c





Şekil 7: Submarine Incubation System (SIS).

- a. Kültür petrisi yüklenmiş şeffaf olmayan bir lamine folyo torba taşıyan plastik t pl k. T pl ğ  suyun altında tutmak için üzerine su dolu bir şişe koyun.
- b. Her biri bir adet folyo torba alan (4 hastaya ait) dört adet t pl k yerleştirilmiş sirkülatörlü su banyosu.
- c. Taşınabilir su banyolarında kaymayı engellemek için üst kısıma sterilize edilmiş kumla doldurulmuş bir folyo torba konabilir.
- d. Folyo torba taşıyan t pl k bir başka t pl kle sabitlenebilir.
- e. Sığır ve domuz embriyolarını taşımak için kullandığımız taşınabilir su banyosu.
- f. 1-7.günler arasında SIS yöntemiyle kültüre edilen hatched ve hatching evrelerindeki in vitro sığır blastosistleri.

(İnsan embriyologları için not: sığır embriyoları insan embriyolarına göre çok daha fazla lipid içermektedir. Burada gösterilen yıkanmış sağlıklı blastosistler in vivo  retilenlerle aynı görünümdedir)



Şekil 8. Folyo torba sistemli geleneksel inkübasyonun hibrit uygulaması. Bu uyarılama, ısı stabilitesinin sağlanması ve istenen ısıya hızla dönüş dışında SIS'in tüm avantajlarına sahiptir. Bu parametreler geleneksel inkübatörlere göre daha iyidir. Lütfen not edin: Gaz ve nem ihtiyacı yoksa geleneksel dolap tipi inkübatörler sadece ısıyı sağlarlar.



Şekil. 9: Üstten basmalı demir ısıtıcılı kapayıcı. SIS folyolarını kapatmak için uygun bir cihazdır.

5.

OOSİT TOPLAMA

“Görünüşte etkili bir dizi adımın tekrarlayan etkisi nedeniyle genel verimlilik katlanarak azalmaktadır.”

First ve Parish, J. Reprod. Fertil. S34 151-165, 1987

.... ve bu olay embriyologlar açısından oosit toplama sırasında başlar.

El kitapları ve kılavuzlardaki çelişkili açıklamalardan kaynaklanan ikilemlerden kaçınmak istiyorsanız biz Krisher ve Schrenker'in (2019) hazırladığı güvenilir rehberi dikkate almanızı şiddetle tavsiye ediyoruz.

Bu rehberdeki tavsiyelerden sadece birisiyle – izolasyon ünitesi- ilgili endişelerimiz bulunmaktadır. Bize göre embriyo laboratuvarında çalışma yürüyorsa süreci yavaşlatacağı için buna çok da fazla gerek yoktur. Sıcaklık gibi, zaman da tüm oosit ve embriyo çalışmalarında çok önemli bir faktördür.

Bu tür benzetmelerden dolayı özür dileriz ama mezbahada kesilen ineklerden toplanan ovaryumlar 20°C'de laboratuvara getirilene kadar 6 saat veya daha fazla süre korunabilmektedir. Ancak, immatür oosit folikülden alındığı andan itibaren 39°C'de (sığırların beden ısısı) tutulmalı ve her bir oositin folikülden inkübatöre alınması 45 dakikayı geçmemelidir. Günde 400-800 oosit toplayan yoğun bir evcil hayvan laboratuvarı düşünüldüğünde bu ihtiyacı karşılayabilmek lojistik bir süreç haline gelir ancak burada başarıyı etkileyen en önemli faktör ortalama ve başarılı takımlar arasındaki farktır. İnsanlarda bu sayılarla çalışmadığımız için görev daha kolay görünmektedir. Yine de biz bu süreci olabildiğince kısaltmalı ve iş akışını bozan her türlü engelden kaçınmalıyız.

İnsanlarda fertilizasyon için hazır durumda oositler elde etmeyi beklediğimiz için bunların inkübatörde geçirecekleri süre birkaç saati geçmemektedir. Eğer in vitro maturasyon gerektiren durumlar varsa oositler sakın ve sessiz bir ortamda tutulmalıdır. Her hasta için ayrı bir inkübatör kullanamayabilirsiniz fakat ön kapısı bölmeler halinde olan ve kolay açılıp kapanabilen kapaklar bu konuda yardımcı olacaktır. Fertilizasyon veya ICSI için aspire edilmiş olan oositleri ikinci bir kontrol amacıyla inkübatörden kesinlikle çıkarmayınız.

Kumulus-oosit komplekslerinin ve denüde edilmiş oositlerin morfolojik sınıflandırması uzun yıllardır yapılan bir laboratuvar protokolüdür. Ancak ne yazık ki bazı özellikleri önceden tahmin etmek oldukça sınırlıdır.

Rienzi et al., (2010), dikkate alınan 10 özelliği inceleyen 50 makaleden elde ettiği sonuçları değerlendirmiştir. Bu özelliklerden hiçbirisi gelişimsel yeterliği belirlemek için kullanılan tahminlerden biri olmamıştır.

Bu nedenle; toplanan tüm oositleri işleme almanızı ve ilerleyen gelişim aşamalarda seçim yapmanızı öneririz.

6.

PARÇALARI BİR ARAYA GETİRME

“Seks hareket halindeki bir duygudur”
Mae West

(GV'den özür)

Filmlerin seks sahnelerinde gözlerimi kaçırmak gibi hiç sevmediğim bir alışkanlığım vardır. Bunun utanç, iffetlilik ve dini hiçbir bağlantısı yoktur. Ben sadece bu durumda çaresiz bir görgü tanığı veya röntgenci olmayı sevmiyorum. Laboratuvar da bile. Spermayı süratle ekler daha sonra gametleri inkübatörün karanlık bir noktasına yerleştiririm. Ben nasıl yapıldığıyla değil sonuçlarıyla ilgilenirim.

Benzer şekilde bu konuyu atlamayı tercih ediyorum. Eğer konu seksle yapıyor bunun hakkında konuşulmaz.

Peki, o zaman ICSI yapın diyebilirsiniz. Başka bir konu. Sığırlarda çok başarılı olmamakla birlikte pek de ihtiyaç yoktur. Biz milyarlarca sağlıklı, enerjik donmuş sperma payetine sahibiz. Basit bir kapasitasyonu takip eden işlemlerden sonra bölünme oranları %90'ın üzerinde çıkıyor. Domuzlarda IVF başarısız bir uygulama olmasına rağmen biz laboratuvarımızda bu uygulamaya ihtiyaç duymuyoruz. Projemiz somatik hücre nükleer transferi ile sınırlıydı. Sonuçta, insanlarla ilgili fazla bilgi toplamak için tembellik yaptım. Olay mikro-manipülasyon nedeniyle değildi çünkü ben yıllarca sığırlarda geleneksel klonlama yapmıştım. Sadece sınırlı fırsatlarım vardı ve çok fazla da ilgi duymadım. Her zaman bunu yapacak başka biri vardı.

O halde bu özel konuyu atlayalım ve araştırma makalelerinin, derlemelerin, kitap bölümlerinin ve el kitapçıklarının ağırlıklı olarak değindiği büyük bir konuya değinelim. Bu bölümde laboratuvarlarımızın çalıştığı genel konulardan olan özellikle oosit ve embriyoların pipetlenmesi ve fertilizasyon hakkında ağırlıklı vermemize izin verin.

Pipetleme

“Çoğu proje için 3 el gerekir”
Arthur Bloch: Murphy’s Law, Machinesmanship

Embriyo laboratuvarında stereo mikroskopta çalışırken geçen zamanımızın çoğunu bir elimizle petriyi tutmak, hareket ettirmek veya sabitlemek için geçiririz. Dominant olan diğer elimizle de pipeti tutar, hareket ettirir veya sabitleriz. Bu çalışma sırasında mikroskobik seviyedeki bir hassasiyetle pipet ucunu kontrol ederiz. Üçüncü bir el ise embriyoları içeri almak veya dışarı çıkarmak için pipet içindeki basıncı kontrol eder.

Ne yazık ki şanslı olanlar dışında çoğu embriyolog bu üçüncü ele sahip değildir.

Eğer basınç pipeti tutan el ile düzenleniyorsa pipet ucu hareket edecektir. Pipet ucunun bu istenmeyen hareketini ne sabit bir el ne de onlarca yıllık deneyim engelleyebilir. Ancak, pipet ucundaki bu küçük hareketler hassas ve kabul edilebilir niteliktedir. Kontrol edilemeyen bu hareketlerin strese neden olduğu Mortimer et al., (2018) tarafından tanımlansa da çok az kişi bunu önemsemektedir.

(Tabi ki birçoğunuz “Pireyi deve yapma, ben²’larla mükemmel çalışabilirim, bu sadece pratik meselesi” diyecektir. Tamam o zaman. Bir deneme önerebilir miyiz? Bir kalem alın ve pipeti tuttuğunuz gibi tutun –avuç içi yukarıda ve başparmak uzak uçta olacak şekilde- başparmağınızı aşağı yukarı hareket ettirirken yazmaya başlayın veya bir kalemi -tel zımba tutar gibi yazı yazma pozisyonunda tutun – ve işaret ve başparmağınızdaki basıncı sürekli olarak değiştirerek kaligrafik bir yazı yazmayı deneyin. Bu işlemlerin hala oosit ve embriyoların pipetlenmesinden daha az zahmetli olduğunu göreceksiniz. İyi şanslar.

İlginçtir ki bu her zaman bir problem olarak karşımıza çıkmamıştır. Bir 19.yy yaklaşımı olan ağız pipeti kullanımı neredeyse yüz yıldır çoğu embriyologun standart uygulaması olmuştur. Biraz rahatsız edici hatta iğrenç olan bu yöntem çok akıllıca bir yöntem olmasa da amacına uygun hizmet veriyordu. Ancak otoriteler, 21.yy’da “*kabul edilemez enfeksiyon riski*” nedeniyle bu uygulamayı görmek istemediler. Aslında enfeksiyon tehlikesi ağız pipetine yerleştirilen ve maliyeti 2-3 dolarlık küçük plastik bir filtre ile engellenebilmektedir.

Yine de bir takım nostaljik eski tarz embriyolog kapalı kapılar arkasındaki laboratuvarlarında ağız pipeti kullanarak oosit ve embriyolarda çalışmakta ve hatta vitrifikasyon sırasında bile ağız pipeti kullanmaktadırlar. Nadiren de olsa mikromanipülatörlerde holding pipet tutmak ve bazen

² Dilediğiniz cihazın ismini buraya yazabilirsiniz. Uluslararası büyük şirketlerin ilgisini çekmek istemeyiz.

de ICSI yapmak üzere de kullanıldıklarını biliyoruz. COVID'in gelmesiyle birlikte zorunlu yüz maskesi kullanımı söz konusu olunca bu uygulama da kullanılamaz hale geldi. Ağız pipeti bir ortaçağ âdeti olarak tarih oldu.

COVID'e bağlı oluşan bu geri dönülemez yasaktan hemen önce meslektaşım Peter Kragh ile bir alternatif bulmaya çalıştık. Somatik Hücre Nükleer Transferinin (SCNT) mikro manipülatör kullanılmadan yapılan versiyonu olan Handmade Cloning'de (HMC) ağız pipetinin etkinliği vazgeçilmezdi. Ancak klonlama sonrasında ağızımızda spazmlar oluştu ne yemek yiyebildik ne de daha kötüsü içebildik.

POP (Pedal Operated Pipette- Pedalla çalışan pipet)

Görünen o ki pipetleme konusunda bir diğer seçenek de diğer ekstremitelerin kullanımıdır ve bu konuda da seçenek sınırlıdır. Bu durumda pedalla çalışan pipet (POP) en mantıklı seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Yükselen protesto seslerini duyuyoruz.

“Hayır olamaz! Böyle hassas bir iş için ayak kullanımı mı? Çıldırдың mı siz?”

Ehliyetiniz var mı? ve eğer düzgün yapıyorsanız ağız pipeti nasıl çalışıyor biliyor musunuz?

Aslında ağızınızla ürettiğiniz basınç ve vakumun şiddeti kontrol edilemez ve bunu direkt olarak embriyolarda kullanmamalısınız. Pipet içinde bulunan solüsyonların direncini artırarak hareketin yavaş ve kontrol edilebilir hale gelmesini sağlayabilirsiniz. Bu aşağıdaki şekilde yapılabilir;

- Uzun ve dar kapillar kullanarak ve
- Bu kapillarları yağ, hava, medyum, yağ, hava, vd. gibi maddeleri küçük miktarlarda ve birbirine karışmayacak şekilde küçük kolonlar halinde doldurarak.

Pipete ne kadar çok kolon eklerseniz o kadar çok direnç üretirsiniz. En uygun miktara bu kolonları en az çaba ile kontrol edebildiğinizde ulaşırsınız ve ağız pipetiyle bağlantınız kesildiği anda pipet içerisindeki tüm hareket sonlanmış olur. Eğer solüsyon hareket etmeye devam ediyorsa daha fazla kolon eklemelisiniz. Eğer solüsyonlar hareket etmiyorsa veya hareket ettirmek çok zorsa pipet içindeki her şeyi boşaltın ve tekrar başlayın.

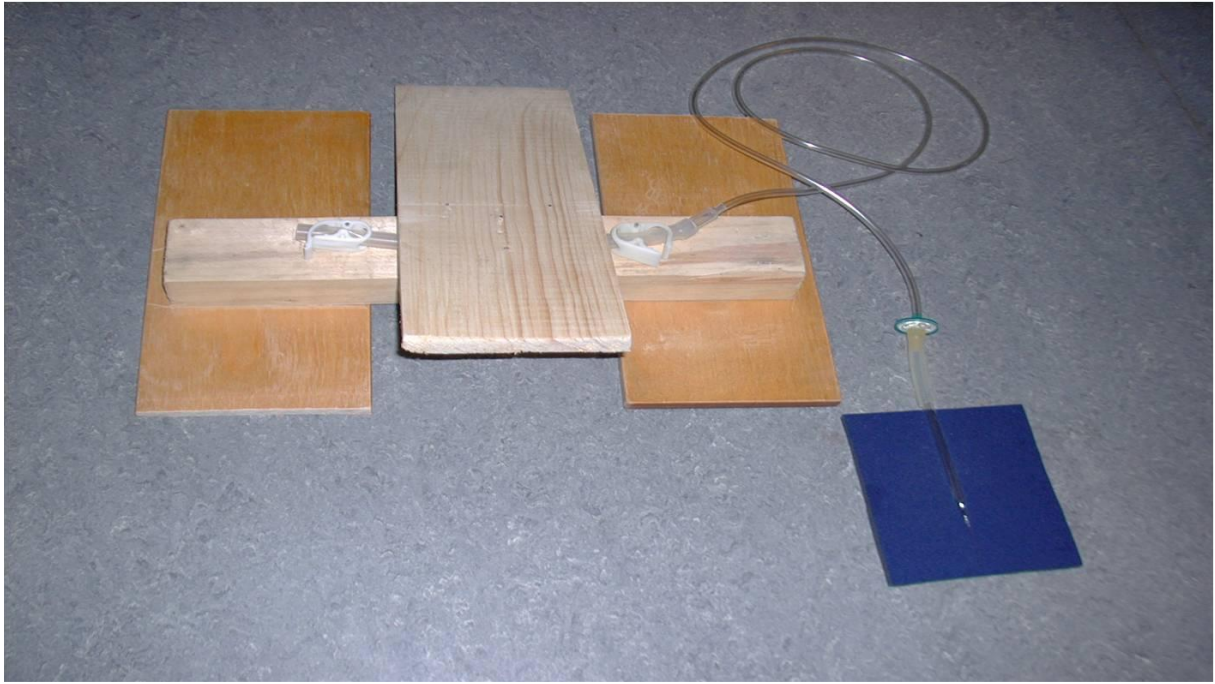
Çalışmaya her başladığınızda pipetinizde en uygun yüklemeyi yapmalısınız. Bu durum deneyimli bir embriyolog için otomatik bir rutindir ve sadece birkaç saniyesini alır ve

öğrenmesi çok kısa bir zaman alır. Çok büyük bir yatırım değildir. Pipetteki kapillar uygun bir şekilde dolduğunda kaynağı ne olursa olsun (ağzınızla, el, ayak her ne ise) bir basınç uygulayın.

Bizim ilk POP modelimiz çok da gelişmiş değildi. Ahşaptan yapmıştık. Bir ucu kapalı kalın ve esnek bir hortum ve diğeri de pipetle bağlantılı olan uzun ince bir hortumdan ve tabana bir menteşe ile bağlanmış tahta pedaldan oluşuyordu. Kalın hortum pedal ile taban arasına sabitlenmişti (Şekil 10). Bu cihazı yapmak kötü bir atölyede bile 30 dakika sürmektedir.

Sonuç şaşırtıcıydı. Pedal beklenenden daha iyi çalışıyordu. Tek problem solüsyonu çektikten sonra pedaldan ayağımızı kaldıramıyorduk. Dengeli bir menteşe kullanımıyla bu sorunu da çözdük. Dinlenmeye ihtiyacımız olduğunda pipeti tüpten ayırıyorduk.

Yarım saat süren bir çabayla pedalın kullanımı öğrenilebiliyordu ve sonunda Handmade Clonning' de (HMC) yapılan manipülasyonları ağız pipetiyle aynı etkinlikte kullanabilir hale geldik.



Şekil 10. Dünyadaki ilk POP. Bu ilkel cihaz Foulum, Aarhus Üniversitesi, Danimarka'da domuzlarda yapılan ve yıllarca süren Handmade Clonning (HMC) programında başarıyla kullanılmıştır.

Not: Domuzlardaki HMC çalışması Mikromanipülasyon yapılmadan gerçekleştirilen en dikkat çekici çalışmalardan biridir.

“Peki, elektriğin ve pompanın da dâhil olduğu daha profesyonel bir cihaz olamaz mıydı” diye sorabilirsiniz.

Tabi ki olabilir. Size teknik düzenleme ve analog teknik çözüm ile ilgili detayları veriyorum. Laboratuvarınızda birden fazla eski model yardımcı pipet varsa mükemmel olacaktır.

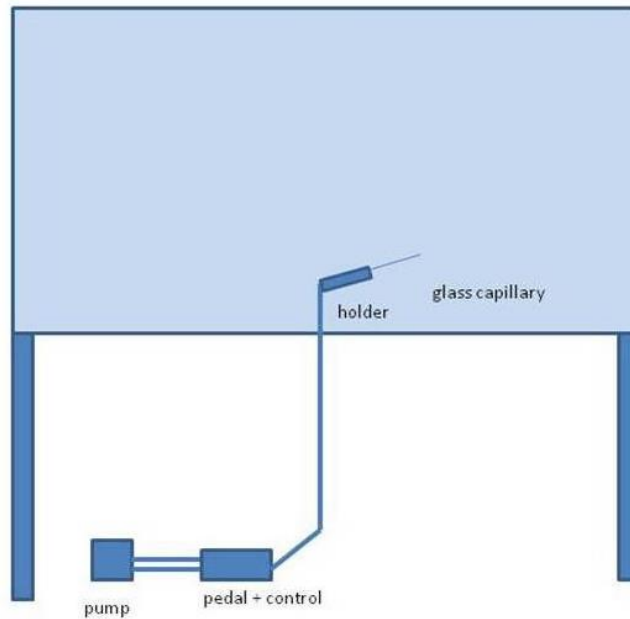
- Bir düğmeye basıldığında: pipettekileri dışarı çıkarmak için basınç ayarlı hız devreye girer.
- Bir düğmeye basıldığında: emme için basınç ayarlı hız devreye girer.
- Her iki butona basıldığında her şey durur.

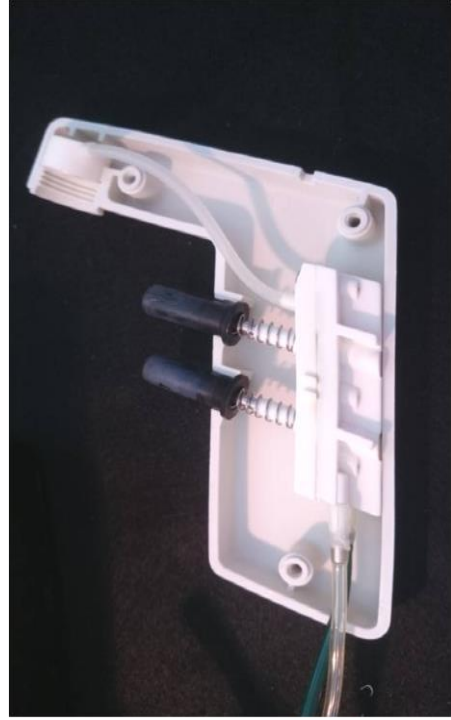
Daha iyi olmadı. Sizin ihtiyacınız olan daha iyi bir pedal yaratmak ve bunu regülatör ve pompa ile birleştirmek. Belki biraz da makyajlayabilirsiniz.

“Bu kadar basitse neden henüz üretilmedi” neden her laboratuvarın çalışma alanlarında veya laminar flow kabinlerinde bundan yok?

Belki biraz daha iyi yönetim ve pazarlama becerileriyle bu icat sayesinde milyoner olabilirdik. Biz en iyisini yaptık. 15 yıl önce başladık ve tekrar tekrar yeniden başladık. Daha az başarılı olamazdı. Tüm firmalar başka şeylerle uğraşıyordu ve verdikleri yanıtlar sanki fotokopi makinesinden çıkmış gibiydi. Ortak olan ve tekrarlayan kelime “*Maalesef...*”ti.

Evet, bayanlar ve baylar oyun başlasın! İlk gelen ilk alır. Gelmene bile gerek kalmayabilir. Asıl ödülümüzü buluşumuzu mezara götürmemekle aldık.





Şekil 11. Solaklar için POP'un ilk düzenlemiş görünümü. Ayrı bir pompaya bağlı eski model bir pipet ucu ve regülatörün yapısı. POP için potansiyel bir analog.

7.

KÜLTÜR YÖNTEMİMİZ

*“Elinizden gelenin en iyisini yapmak artık yeterli değil.
Artık imkânsız gibi görüneni yapmak zorundayız”*
Greta Thunberg

Çok kısa bir zaman önce, yeni nesil dünyaca ünlü bir uzman embriyo kültüründe yenilikçi yaklaşımlar hakkında bir web semineri verdi. Bu seminer tek bir konu üzerinde yoğunlaşmamıştı, konu hakkında tartışmadık ve verilen bilgiler 10-12 yıl önceki derlemelerden alınmış bilgiler içeriyordu. Öne çıkan en önemli nokta evaporasyondur. Ancak bu problemin varlığını biz yıllar önce ortaya atmıştık.

Tek bir olaydan genel sonuca ulaşamazsınız. Öyleyse embriyo kültürü konusunda yayınlanan makaleler üzerinde yapılmış bir pilot çalışmayı (Vajta et al., 2021) sizlere özetlememe izin verin. 2019 yılında insan reproduksiyonu konusunda öne çıkmış 5 dergide yayınlanan 983 araştırma makalesinin sadece 12’si (%1,2) embriyo kültür koşulları ve 4’ü de (%0,4) çevre koşullarından bahsetmiştir.

Daha fazla bilgiye konferans ve webinarlardan ulaşılabilir. Elde edilecek sonuçlar bu üzücü durumu belgeleyeceklerdir. Geçtiğimiz on yıllık süreçte insan ART’sinde yapılan araştırmaların ilgi odağı embriyo kültürünün teknik detaylarından uzaklaşmıştır. Biz muhtemelen bu konudaki tüm yolları kullanarak ilgili faktörleri araştırdık ve çoğu ayrıntıyı standart hale getirdik. Geriye sadece ince ayarlama kaldı. Enerjimizi daha önemli konulara yoğunlaştırmalıyız. Görev tamamlanmıştır.

Öyle mi? Bir düşünün: insanlarda yapılan yardımcı üreme tekniklerinde embriyo kültürü her zaman önemli bir role sahip olmuştur. Yaklaşık 10 yıl önce çoğu önde gelen laboratuvarda blastosist kültürünün standardize edilmesiyle bunun önemi daha da artmıştır. Bu süreçte maalesef ki konuya ilişkin araştırmaların sayısında da keskin bir düşüş yaşanmaya başlamıştır.

Medyum hakkında

Hadi detaya inelim. Yirmi hatta 30 yıl önce bizler evcil hayvan laboratuvarımızda her şeyi kendimiz yapardık. Suyu saflaştırdıktan sonra kullanım amacına uygun bir şekilde diğer kimyasallarla birleştirdik. Pratikte her bir yeni medyum hazırlama yeni bir deneyin başlangıcıydı. Her bir girişimin %99’unda hiçbir gelişme yaşanmazken kalan %1’i denemeye değerci.

Sadece kod isimleri verilen, içeriği belirtilmeyen ve ticari olarak kullanıma hazır farklı iki medyumun karşılaştırıldığı poster sunumları ve araştırma makalelerini görmek bizim için sadece utanç verici değil aynı zamanda gülünçtü. Bu adamlar ciddi miydi? Bunu bilim olarak görüyorlar mıydı?

10 yıl içinde bu tipteki “araştırmalar” standart hale geldi ve izleyen on yıl içinde ise moda olmaktan çıktı. Hem yasal hem de pratik nedenler laboratuvarları – benzer şekilde evcil hayvan laboratuvarlarında da -medyumlar üzerinde araştırma yapmaktan vazgeçmeye zorladı ve oldukça uygun ve güvenli bir yolda ilerleyebilmek için uluslararası üne sahip bir şirket ve temsilcileri tarafından üretilip piyasaya sürülen en ucuz medyum kullanılmaya başlandı. Biz onların “profesyonel standartlarının önüne geçemeyiz” şeklindeki olağan açıklama artık araştırma makaleleri ve el kitapları tarafından da belirtilmektedir.

Bu eğilimi geri döndürmek oldukça zordur ve yapılan açıklama az veya çok mantıklı gelmektedir. Üstelik herkes bundan hoşlandı. Yetkililer için, standartları belirlemek ve kaliteyi kontrol etmek için belirgin bir fayda olarak görülmekte, embriyologlar için daha az çalışma ve daha az endişe, şirketler için ise bingo anlamına gelmekte, hastalar için ise güven hissi yaratmaktadır. Hatta gelecekle için (sadece medyum için değil) para ödemek zorundalarsa hastalar harcadıkları paranın alabileceği en iyisini alacakları için rahatlatmaktadır.

Gerçekten doğru mu? Bu medyumlar, şirketlerin web sayfalarında tanıtıldığı ya da ilgili ortamlarda muhteşemmiş gibi sunulduğu şekilde gerçekten “son nokta” ya da “en uygunu” mu?

Yirmi yıldan uzun bir süredir insan IVF’inde embriyo transferinin 3.günde mi yoksa 5.günde mi yapılması gerektiği ile ilgili şiddetli tartışmalar yaşanmıştır. Beşinci günde transferi savunan grupta, medyum değişikliği yapılması gerekliliği nedeniyle görüş ayrılıkları olmuştur. Buna rağmen, uygulamada aynı veya farklı medyumlar kullanılarak yapılan ikinci medyum değişikliğine ilişkin ilgi daha da artmıştır. On yıl önce, görünen o ki iki evreli medyum kullanmayı savunanlar büyük bir başarı elde ettiler. İnsan IVF’i konusundaki el kitapları,

derlemeler, sunumlar ve uygulayıcılar gibi tüm alanlarda baskın hale geldiler. Tek medyumunu savunanlar ise özellikle evcil hayvanlar alanında kalelerini sağlam tutabildiler.

Daha sonra, yukarıda da bahsedildiği gibi çok kısa bir zaman önce, ani gelişen teknik bir sorun, istemeden de olsa Kulturkampf³’da³ oyunun kuralını değiştirdi. Eskiden kalma çok büyük time-lapse mikroskoplarda yapılan modifikasyonlar çığ oluşturdu. Yeni modellerin süratle uygulamaya konmasıyla (Primo Vision, Embryoscope) rutin insan IVF’inde 3.günde inkübasyonun bölünerek yapıldığı görsel kontrole gerek kalmadı. Son kullanıcılar faydaları tartışmalı olan 3.gündeki medyum değişikliğinin çok da gerekli olmadığına inandı. Bunun üzerine single-medyum üreten firmalar üretim kapasitelerini artırırken diğer üreticiler de bu alana geri dönerek üretime başladı. İki aşamalı kültür medyumunu üreten firmaların acı yenilgisi en önde gelen üretici firmanın teslim olmak zorunda kaldığını zaman yaşandı. Yenilen firmalar azalan hisselerini artırmak için time-lapse cihazlara uygun şekilde hazırladıkları single-medyumları üretmeye başladılar.

Bilimin, karar alma sürecindeki rolü ancak bu kadar belirgin olabilir.

Olumlu bir gelişmeyle “*tek ve kesintisiz medyumla yapılan kültür sistemine*” dönüş memnuniyetle karşılanmış olmasına rağmen, biz sığır ve domuz embriyolarında bu sistemi 20 yıl boyunca başarılı sonuçlar elde ederek kullanıyorduk. Üzerinde çok tartışma yaşanan “doğaya dönüş”, “basit optimizasyon”, “birinci, ikinci, üçüncü jenerasyon” gibi konularda bir yakınlaşma yaşanmakta ve bu terminolojiler arasındaki farklılıklar giderek kaybolmaktadır. Ayrıca ticari olarak temin edilebilen medyumların içerik ve konsantrasyonları hakkında sınırlı seviyede bilgi sahibi olduğumuz için konuşamıyoruz. Her iki durumda da son on yılda ticari medyumlarla ilgili herhangi bir skandal yaşanmadı.

Yine de rahatlamak ve bu alandaki araştırmalardan vazgeçmek için bir neden yoktur. Ticari olarak piyasaya sunulan tüm medyumlarda tam olarak aynı konsantrasyonda kullanılan tek bir kimyasal veya biyolojik içerik yoktur (Vajta et al., 2010; Pool et al., 2012). Yapılan son çalışmalarda medyumun optimal pH’sı, inkübasyon sıcaklığı, kesintisiz tek veya iki aşamalı medyum sistemleri ve protein ilavesi gibi temel konularda fikir birliği olmadığı tespit edilmiştir Reed et al., 2009; Swain 2015; Sfontouris et al., 2016; Mortimer et al., 2018; Baak et al., 2019; Krisher ve Schlenker, 2019; Gatimel et al., 2010). Embriyo kültürünün diğer yönlerini ele alan

³ İngilizce ‘ye sonradan dâhil edilmiş Almanca bir sözcük. Anlamı: Kültürler arası mücadele. Örn; Reichskanzler Otto von Bismarck’ın Katolik Kiliselere veya 3.Reich’in Propoganda Bakanı Dr.Joseph Goebbels’in tüm Kiliselere karşı mücadeleleri.

çoğu araştırma makalesinde de geniş farklılıklar bulunmakta ve sistemik bir soruyu yanıtlamaya yönelik yapılan araştırmalarda da sorular genellikle yanıtızsız kalmaktadır.

Ne yazık ki, kültür medyumunun kompozisyonunun değiştirilmesi mevcut yasalar çerçevesinde yasa dışı olabilir. Öyleyse, kanun koyucuların hayal gücünün yaratıcı faaliyetlerimizi kısıtlamakta yetersiz kaldığı embriyo kültürünün diğer yönlerine bakalım.

Düz yüzeydeki droplar⁴

Yağla kaplamak. Memeli oositleri için embriyologların kullandığı kültür sistemidir standart bir parçasıdır. Basit ve zarif. Eğer birinci sınıf öğrencilerini cep telefonlarından 2 dakikalığına uzaklaştırabilerseniz kolaylıkla öğrenilebilecek bir uygulamadır.

Aslında petrilerin hazırlanması en çok farklılığın, tutarsızlığın ve sorunun ortaya çıktığı adımdır. Neredeyse tüm laboratuvarların kendine özgü drop hazırlama yöntemleri bulunmaktadır. Birbirinin aynı prosedürü bulmak neredeyse imkânsızdır. Bazıları drobun tamamını petriye aktardıktan sonra üzerini yağla kaplarken, diğerleri gerekli miktarın yarısını petriye aktardıktan sonra üzerini yağla kaplayıp sonra geri kalan kısmı ilave etmektedir. Bir kısım uygulayıcı ise drobu hazırlayıp yağla kapladıktan sonra drobu çıkarmakta ve sonra da tekrar yeni bir drobu buraya koymaktadır. Açıkçası bu manipölasyonlar yağ eklenmeden önce dropların farklı büyüklük, yükseklik ve muhtemelen de ozmoloritede olmasına ve yağ eklendikten sonra da drobun üzerinde farklı kalınlıkta koruyucu tabaka oluşmasına neden olmaktadır.



Şekil 12. Mikrodrop hazırlanması. Genellikle göz ardı edilen önemli bir adımdır.

⁴ Daha fazla detay ve kapsamlı alıntılar için bakınız Vajta et al., 2021.

Drop hazırlamada kullanılan yüzeyler farklılık gösterir. Görünüşte birbirinin aynısı olanlar arasında da önemli farklılıklar bulunmaktadır. Üretici firmalar herhangi bir uyarıda bulunmadan yüzey kaplamasını⁵ değiştirebilirler, bu da aynı şekilde üretilen dropların farklı şekiller almasına neden olabilir. Laboratuvar ortamının, çalışma masasının, petri tabanının (petrinin tabanı ısıtmalı yüzeye direkt temas halinde olsun veya olmasın), hava akışlı ortamın sıcaklıkları ve hatta hava değişim hızı bile evaporasyonu etkileyebilir.

Swain (2019), günümüzde kullanılan kültür sistemlerinin osmolaritelerinin incelendiği bir araştırma makalesi yayınlamıştır. Araştırmacı, 1) yaygın bilinenin aksine kullanılan yağın medyumun evaporasyonunu engellemediğini, 2) evaporasyon seviyesinin kullanılan yağın kalınlığıyla ve drobun büyüklük ve şekliyle ilgili olduğunu, 3) evaporasyonun medyumun ozmolarite ve pH değerini artırarak zararlı bileşenlerin konsantrasyonunu artırdığını ve 4) kuru inkübatörlerin kullanıldığı (yaygın olarak kullanılmaktadır) ve özellikle kesintisiz blastosist kültüründe evaporasyonun ciddi seviyelere ulaştığını vurgulamıştır.

Kullanılan medyum bileşimindeki küçük farklılıklarla ve embriyologların kullandığı tıraş losyonları da dâhil olmak üzere laboratuvardaki hemen her şeyin olası toksik etkisiyle çok fazla uğraşırken, bazı ayrıntıları unuttuğumuzu ve kültür sistemlerimizi kullanmaya başlamadan hemen önce sorunlu hale getirdiğimizi anlamamız gerekmektedir.

İşleri daha da karmaşık hale getirmek için ilave bir faktörü daha dikkate almamız gerekiyor.

İn vitro ortamda kültüre edilen embriyolar sosyal varlıklardır ve bir arada olmayı tercih ederler. Bu durum insan dâhil birçok memelide toplu şekilde yapılan kültürün blastosist ve *in vivo* gelişim oranları ile kanıtlanmıştır. Grup halinde yapılan kültürde gelişimi desteklediği varsayılan mekanizmalar arasında koruma, barınma ve iletişim yer almaktadır.

Embriyo kültürü sırasında gelişimi durduran veya geciktiren birçok zararlı faktöre karşı *korumaya* ihtiyaç vardır. Toplu halde yapılan kültürde embriyolar birbirlerine yardım ederek bu faktörlerin nötralize veya minimize edilmesini sağlarlar. Bir arada yapılan kültürde embriyolar belirleyici bir farka neden olsa da embriyoların bir arada bulunarak birbirlerini nasıl korudukları açıklığa kavuşmamıştır.

⁵ Aslında embriyo gelişiminde yüzey kaplamasının destekleyici rolü hakkında birçok soru işareti bulunmaktadır. Herhangi bir yüzey kaplaması kullanılmayan petriler kalitesiz değildir. Yüzey kaplaması kullanılan diğer petrilerde ise manuel WOW hazırlanırken (bu bölümün sonunda yer verilmiştir) yüzeyde ciddi bir hasar meydana gelse de bu hasar zona-free embriyoların bile gelişiminde olumsuz bir etki yaratmamıştır.

Barınma ise kısmen anlaşılmış bir başka olgudur. Gelişmekte olan embriyoyu çepeçevre saran solüsyonun pH, oksijen konsantrasyonu ve besin içeriği gibi önemli fiziksel ve kimyasal parametreleri solüsyonun geri kalan kısmından farklılık göstermektedir. Bahsedilen bu mikro ortamı oluşturmak oldukça zor olsa da, medyumun değiştirilmesi veya petrilerin hareket ettirilmesi sırasında bozmak çok kolaydır. Mikro ortamın oluşturulmasında grup halinde yapılan embriyo kültürü daha başarılı olmaktadır.

Embriyoların biyoaktif bağlantıları aracılığı ile *iletişimleri* hakkında diğerlerine göre daha fazla kanıta sahibiz. Bireysel embriyo kültürüne eklenen büyüme faktörleri bunların belirgin şekilde gelişmesini sağlamıştır. *In vitro* gelişen embriyolar ise ovidukt içinde bulunan otokrin, parakrin ve endokrin faktörlerin çoklu etkisine maruz kalmamaktadır. Bu farklılık grup halinde kültürle veya medyuma hormon ve büyüme faktörlerinin eklenmesiyle kısmen çözülebilmektedir.

Grup halinde yapılan kültürün etkisi tür, embriyo sayısı, düzenlemeler vb. gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte blastosist oranı ve embriyo kalitesi %20-30 oranında artmaktadır.

Ancak biz *embriyolarımızın in vitro ortamda yalnız başına yaşamalarını istiyoruz*. Geçtiğimiz 10 yıl içinde giderek artan sayıdaki insan IVF laboratuvarı aşağıdaki nedenlerle bireysel embriyo kültürünü tercih etmişlerdir:

- Hasta yaşının artması ve orta şiddette yapılan stimülasyonlara karşı alınan yanıtın azalması sonucunda elde edilen zigot sayısındaki düşüş, kullanılan yöntemlerde embriyoların bireysel olarak takip edilmesini gerektirmiştir.
- Bazı bilim insanları ortamda bulunan dejenere veya ölü embriyoların sağlıklı olanların gelişimi üzerinde olumsuz etki yaptığını savunmaktadır.

Başlangıçta, koşulları bireysel kültüre göre ayarlamanın en mantıklı yolu *dropların miktarını azaltmaktır*. Bu uygulama, uygun miktarda ligandın oluşmasını sağlamakta, potansiyel zararlı maddelerin oluşumunu engellemekte ve tek bir embriyonun kendisi için uygun bir mikro çevre oluşturmasını sağlamaktadır. Tüm kültür süresince bir embriyonun ihtiyacı olan minimum miktar konusunda çelişkiler olsa da çoğu yayın bunu 6-12 µl olarak önermektedir. Ancak bizim tecrübelerimize göre, kesintisiz kültür kullanılarak yapılan statik Cam Ovidukt (GO) mikrokapillar sisteminde bir sığır embriyosunun blastosist evresine ulaşması için gereken miktarın 1 µl'den az olduğu tespit edilmiştir (Thouas et al., 2003; Vajta et al., 2001). Yarı kapalı GO sistemi evaporasyona karşı daha az duyarlı olduğu için drop için daha fazla solüsyona ihtiyaç duyulması, besin maddesi yetersizliği veya toksik metabolitlerin birikmesinden daha çok ozmotik hasarla açıklanabilir.

Daha önce de bahsedildiği gibi büyüklük sonucu etkilemektedir. Drobu küçültmek buharlaşma oranını artırmakta, içerikteki maddelerin konsantrasyonunu artırmakta (tehlikeli seviyeye çıkabilirler) ve ozmotik travmaya neden olmaktadır. Basit bir teknik detay dikkate alınmalıdır. Yağ kullanmadan bireysel kültür için 6-12 adet drop hazırlamak grup kültürü için gereken 2-3 büyük drop hazırlamaktan daha fazla zaman alır. Ayrıca, daha fazla evaporasyon nedeniyle bireysel embriyolar kültürün yapılacağı petriye ulaştıkları andan itibaren sorunlu bir ortamla karşılaşabilir.

Droplar için gereken 7-10 µl'lik miktar in vivo ortamda embriyoyu çevreleyen miktardan daha fazla olmakla birlikte hem zararlı bileşikleri içerebilmekte hem de uygun mikro çevreyi oluşturacak faktörleri dilüe edebilmektedir. Bu da gelişim bozukluklarını ve bu sistemde gelişen embriyoların kalitelerinin düşük olmasını açıklamaktadır.

Üçüncü boyut

Çevremizdeki her şey 3 boyutlu olmasına rağmen biz insanlar dünyayı 2 boyutta tekrar yaratmayı tercih ediyoruz. Bu, ilk mağara resimleriyle başlamış, Mısır papirüsleriyle gelişmiş ve daha sonra freskler, mozaikler ve Orta Çağ'da el yazmalarıyla devam etmiştir. Fotoğraf, sinema, televizyon, bilgisayar, cep telefonu ekranlarıyla sanal dünyamız iki boyutlu hale geldi ve bugüne kadar da öyle devam etti. Heykeller ve mimari yapılar istisna olabilir ancak kültür, eğitim ve bilim neredeyse tamamen düz yüzeylere dayanmaktadır. Üçüncü boyuttaki sporadik girişimler –en azından eğlence amaçlı- tekrar tekrar başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Teknik olarak mümkün olsa da insanlar buna pek ilgi duymuyorlar.

Aynı yaklaşım bizim laboratuvarımızda da hâkimdir. Oositleri ve embriyoları "stereo" mikroskoplarımızda bile iki boyutlu olarak görüyor; iki boyutlu olarak düşünüyor ve onlara iki boyutlu bir ortam sağlıyoruz. Yazılımlar ve grafikler üç boyutlu görünüm ve analizler sağlasa da bunlar çoğunlukla resimler veya yapay zekâ temelli analizlerde kullanılmaktadır. Kendi zekâmız bunun için pek de yeterli görünmüyor.

İki boyut çoğu amaç için yeterlidir. Ancak, embriyo kültüründen bahsettiğimizde diğer seçeneği de düşünmeliyiz. Embriyologlar için iyi olan bir şeyin embriyolar için iyi olmayabileceğini lütfen unutmayın. Embriyolar bizim laboratuvarımızdaki en önemli canlılardır.

Kanallar ve tüpler

Yirmi yıl önce mikroakışkan-mikrokanallar embriyolojinin geleceği için çok büyük umut vaat ediyordu. Geçen yıllarla birlikte bu konu son derece umut verici olmaya devam etti. Bu konuya ilişkin insan IVF laboratuvarındaki rutin günlük çalışmalar için herhangi bir pratik veri veya çıktı olmasa da öyle kalacağı⁶ düşünülmektedir. Teknik, finansal ve idari sorunlar ve farklı kurumlar arasındaki işbirliği eksiklikleri bu konunun gelişmemesinde belirleyici rol oynamıştır. Konu hakkındaki diğer problem de solüsyon ve örneklerin mikrokanallar içerisindeki hareketinin pratik değeri olmuştur. Bu durum çoğu embriyolojik işlemde önemli bir yer tutsa da, dinamik kültürler sonuçta başarısız olmuş ve bu nedenle gerekli olmadığı ve hatta embriyo kültürü söz konusu olduğunda zararlı olabileceği düşünülmüştür.

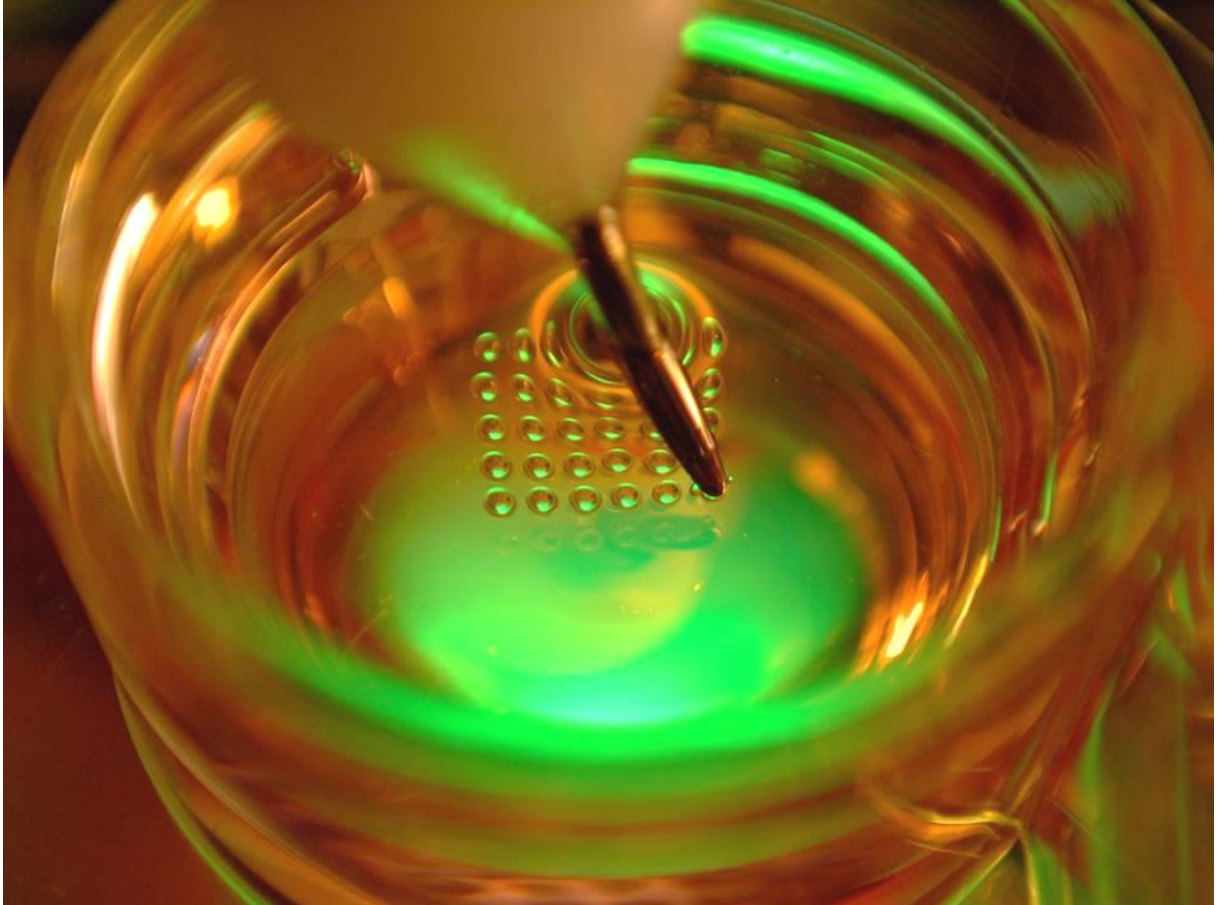
Diğer yandan, mikrokanalların statik ve ilkel formu olan GO sistemi kullanıldığında bu küçük ve dar tüplerin embriyo gelişimi için uygun ortam yarattığı kanıtlanmıştır (Thouas et al., 2003). Kapillar etki sayesinde tek hücreli embriyolar dar cam mikrotüpler içine yüklenebilmektedir. Üstü yağla kaplı embriyo içeren medyuma manuel bir şekilde tüpü daldırdığınızda tüpe ilk olarak bir miktar yağ, daha sonra <1 µl medyumla birlikte tek hücreli embriyo ve çıkarırken de tekrar bir miktar yağ dolacaktır. Her iki uçtaki yağ tabakası medyumunu inkübatörün dış atmosferinden etkili bir şekilde ayıracak ve embriyo gelişimi kesintisiz bir şekilde yedi gün süresince devam edecektir. Sığır embriyoları söz konusu olduğunda blastosist oranı toplu kültürle aynı bulunmuştur. Embriyoları bu tüplerden herhangi bir kayıp olmadan dışarı almak oldukça kolay olmuştur. Bireysel embriyo kültüründe kullanıma sunulan “kanıta dayalı” bu model, destekleyici bazı cihazların olmaması, finansal yetersizlik ve genelde ilgisizlik nedeniyle ne yazık ki kullanılmadan bırakılmıştır.

WOW: Buluşu ve başarıları

Çok uzun zamandır embriyologlar petrinin tabanında oluşturulacak kuyucuklarda bireysel embriyo kültürü yapmayı düşünüyorlardı. Bu konudaki benzer bir sistem, prekompaksiyon aşamasındaki zonasız embriyoları kimera üretmek için mikro kuyucuklar içinde embriyonik kök hücrelerle kültüre eden Wood et al., (1993) tarafından da bildirilmiştir. Zona içermeyen embriyolarda nükleer transfer tekniğinin ortaya çıkmasında bu girişimin test edilmesinin tek amacı pre-kompaksiyon evresindeki sığır embriyosu blastomerlerinin bir arada tutulmasını test

⁶ Bir analog “Brezilya geleceğin ülkesidir.... ve her zaman öyle olacaktır” Charles de Gaulle.

etmekti (Vajta et al., 2000; Peura and Vajta, 2003). Mikrokuyucuklar ilk başta 4-kuyucuklu (4-well dish) petri tabanına piyasadan temin edilen metal çubuklarla basınç uygulayarak yapıldı ve adı Well of the Well veya kısaca WOW oldu. WOW'lar hem zonasız embriyoların gelişimini hem de grup halinde yapılan kültürün etkisini, pre-kompaktlaşma döneminde parçalanmayı engelleyerek hem *in vitro* hem de *in vivo* gelişimlerde olduğu gibi başarılı bir şekilde telafi etmiştir.



Şekil 13. Metal bir çubukla manuel WOW hazırlanması.

Ayrıca bu oldukça ilkel ve hasar verici hazırlık sürecine rağmen WOW sistemi, çeşitli memeli türlerinin⁷ zonası sağlam embriyolarının kültürü de dâhil olmak üzere başka amaçlar için de benzersiz bir şekilde başarılı bulunmuştur. Genelde WOW sistemi toplu kültür sisteminin eksikliğini ve hatta büyük bir drop veya kuyucukta yapılan tek embriyo etkisini bile başarıyla telafi etmiştir. WOW'da kültüre edilen sığır embriyolarındaki gen ekspresyonları da *in-vivo* elde edilip düz yüzeyde kültüre edilen embriyolardan çok farklı bulunmamıştır. WOW, yarı

⁷ İlgili tüm referansları Vajta et al., (2021)'de bulabilirsiniz.

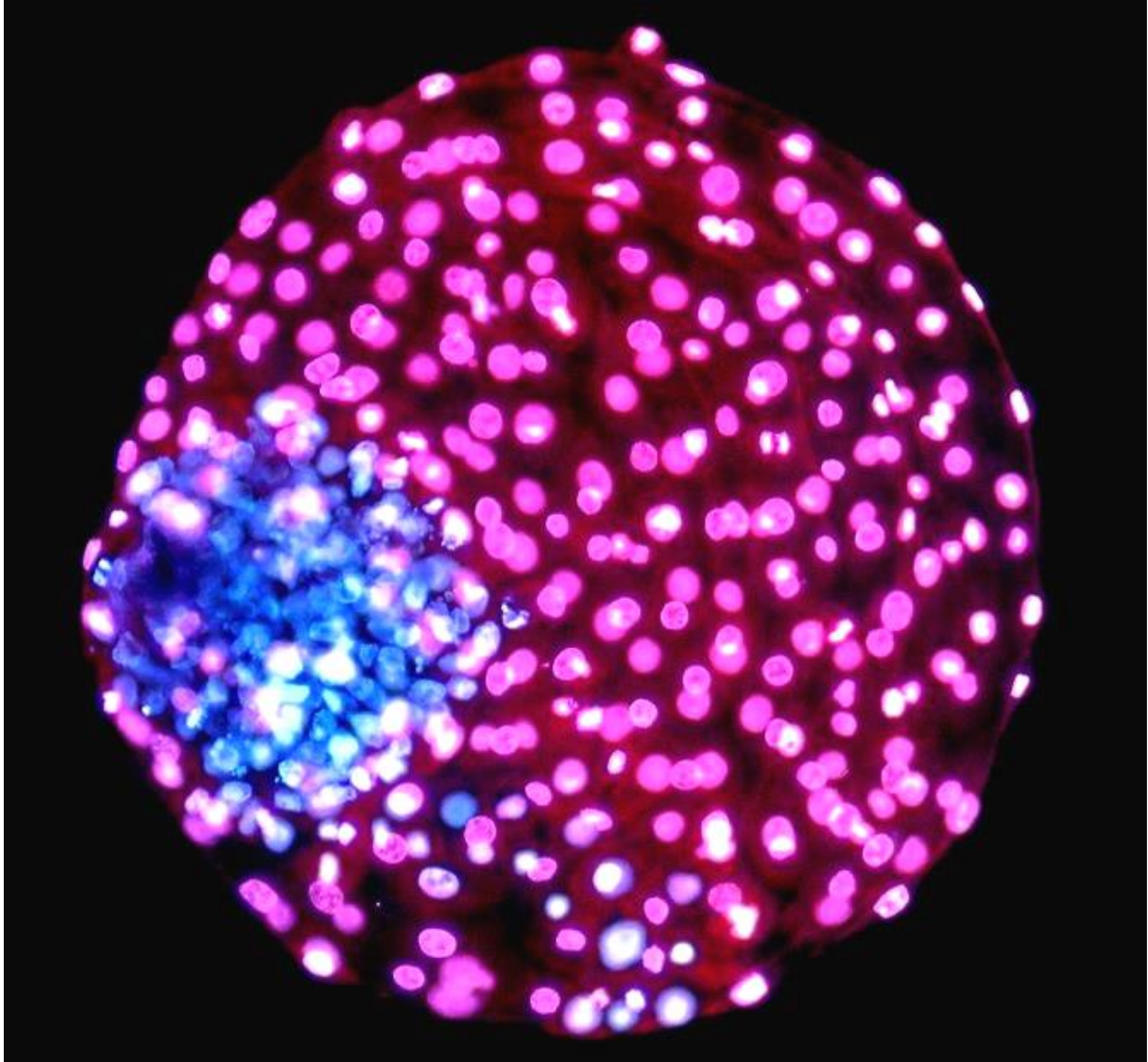
tanımlı medyumlarda *in vitro* ortamda üretilen domuz embriyolarının ve morula evresine kadar takip edilen rat embriyolarının gelişiminde drop yöntemine göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Mikrokuyucuklar bireysel fare embriyo gelişimini de toplu halde yapılan embriyo kültüründe olduğu gibi desteklemiştir.

Kardeş insan embriyolarında yapılan karşılaştırmalı bir araştırmada WOW %55 blastosist oranına ulaşırken geleneksel drop kültüründe ise bu oran %37 bulunmuştur. Benzer bir kültür sistemi insanlarda hem *in vitro* hem de *in vivo* sonuçları artırmıştır. Mikrokuyucuk sisteminde komşu kuyucuklarda bulunan dejenere veya ölü embriyolar sağlıklı insan embriyoların gelişimine olumsuz etkide bulunmamıştır.

Manuel olarak hazırladığımız WOW'larda yaptığımız çalışmalarda farklı miktarlarda medyumla kaplanmış (tek ve kesintisiz blastosist kültüründe WOW/embriyo başına 8-400 µl) az veya çok sayıdaki (1-50) kuyucukta gelişen embriyolarda olumlu veya olumsuz herhangi bir etkiyle karşılaşılmamıştır. Kuyucuklar arasındaki mesafe hazırlık, yükleme, değerlendirme ve embriyoların rahatça tekrar çıkarılması için ampirik olarak belirlenmiş ve bu mesafe farkı gelişim oranlarını etkilememiştir.



Şekil 14. El yapımı klonlama tekniği ile üretilmiş expanded blastosist evresine kadar kültüre edilmiş 7.gündeki sığır embriyosu. Manuel olarak hazırlanmış WOW içinde blastosist görülmektedir. Saat 12 yönündeki koyu renkli ölü blastomerlere zonasız kültürde çok sık rastlandığını hatırlatmak isterim. Zonası bulunan embriyoların gelişimi sırasında bazı hücreler perivitellin boşluğa atılır, sıkıştırılır, lize edilir ve gelişen trofoektoderm hücreleri tarafından sindirilir. Zona içermeyen embriyoların bu temizlik için enerji harcamalarına gerek yoktur.



Şekil 15. Diferansiyel boyama yöntemiyle boyanmış blastosist. Trofoektoderm hücrelerindeki mitotik aktivite belirgin bir şekilde görülebilmektedir. Thouas et al.'ın (2001) basitleştirilmiş çift boyama yönteminde: immunoliz yöntemi yerine trofoektodermal hücrelerin hücre zarlarına giriş için deterjan kullanılmıştır.

Yüksek hızlı vitrifikasyon tekniklerinde olduğu gibi, WOW sisteminin icadı embriyologları mikrokuyucuk fikri için alternatif yöntemler bulmaya yönlendirmiştir. On yıldan fazla bir süre boyunca endüstrinin desteği olmaması orijinal WOW sisteminden daha avantajlı olmayan farklı el yapımı ürünlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Sonuçta, büyük ölçekli ticari uygulamalar için metal çubuklarla mekanik olarak WOW hazırlanması gerekiyordu ve bu da polystyren petrilere kalıplarla hazırlanmasıyla çözüldü. Bu uygulama başlangıçta hassas cihazlar ve önemli ticari yatırımlar gerektirdiğinden beklendiğinden daha zorlu geçti.

Time-lapse cihazlar için mikrokuyucuklar

İnsan IVF laboratuvarlarında rutin uygulamalarda kullanılmak üzere yeni nesil time-lapse cihazlarının geliştirilmesi bireysel embriyo gelişiminin takibi üzerine olan talebi artırmıştır. WOW sisteminin analogları olan petrilere Primo Vision (Cryo-Innovation Ltd., Macaristan; daha sonra Vitrolife, İsveç) ve önemli derecede modifiye edilmiş Embryoscope petrilere (Unisense, Danimarka; daha sonra Vitrolife, İsveç) geliştirildi ve ticari olarak üretildi. Bunun hemen ardından dünyanın her yerinde benzer time-lapse cihazları üretilmeye başlandı.

Bu mikrokuyucukların ortak özelliği, optik görünürlüğü ve pratik kullanımı en uygun hale getirmek için üretilmiş olmaları ve asıl amaç olan embriyo gelişimi için en uygun olan ortamı sağlama hedefinden uzaklaşmış olmalarıdır. Ürünlerin tabanı düz ve hacimleri daha fazladır (Vajta et al., 2021; Şekil 1). Bu petrilere embriyo gelişim oranları drop kültürüne göre benzer veya daha iyi olsa da, veriler (otantik) WOW sisteminin yapabileceklerini ve sınırlarını tam olarak yansıtmadığı için dikkatle yorumlanmalıdır.

Büyüklik önemlidir

Embriyo bakış açısına göre küçük olanlar daha iyi görünmektedir. Kuyucuk çapının zona pellucida çapından bir miktar daha geniş olması tek embriyo kültürü için yeterlidir. Embriyoyu çevreleyen solüsyon miktarını en aza indirmek için tabanın şekli yuvarlak olmalıdır. Buna göre yukarıya doğru hafifçe genişleyen ve düz duvarlara sahip bir yarı küre – şeker konisi - en uygun şekil olabilir. Gerçek parametreler hangi türün embriyosu kullanılacaksa ona göre ayarlanmalıdır. İnsan, sığır, koyun ve domuz embriyolarında bu ölçüler neredeyse aynı oldukları halde farelerde daha küçüktür.

Matsuura 'nın (2014) yaptığı bir çalışmadaki verilere göre, WOW içindeki küçük moleküller ve makro moleküllerin konsantrasyonunda yaklaşık olarak 2-3 kat fark vardır. Bahsi geçen fark, embriyo çevresindeki atık maddelerin ve otokrin faktörlerin konsantrasyonunun dilüe edilmesine yarar. Hesaplanan bu fark dar kuyucuklarda daha fazladır ve bu kuyucuklarda daha iyi embriyo gelişimini açıklamaktadır. Ancak, pratik nedenlerden dolayı WOW kuyucuklarının çapının daraltılması için sınır vardır.

Non-invaziv embriyo değerlendirilmesinde WOW

Embriyoların WOW içinde kültüre edilmesiyle, farklı birçok medyumun genetik, metabolik ve sekretorik yönden non-invaziv preimplantasyon değerlendirmesi yapılabilmektedir. Time-lapse uygulamadan farklı olarak orijinal WOW'larda biçim ve büyüklükte değişiklik yapmaya gerek yoktur. Bunlar embriyo gelişimini destekledikleri için medyum çalışmaları da yapılabilmektedir. Moleküller yüksek konsantrasyonda belirlendiği için sonuçlar hakkında karar vermek ve analizler yapmak daha kolay ve doğru olmaktadır.

WOW'lar ile laboratuvar çalışmaları

Günlük drop kültürlerinde gereken çaba ve zaman kaybı kullanıma hazır WOW petrilerinde bulunmaz. Bununla birlikte pratik yaparak ve bazı tavsiyelere uyarak bu süreç daha kolay ve verimli hale gelebilir.

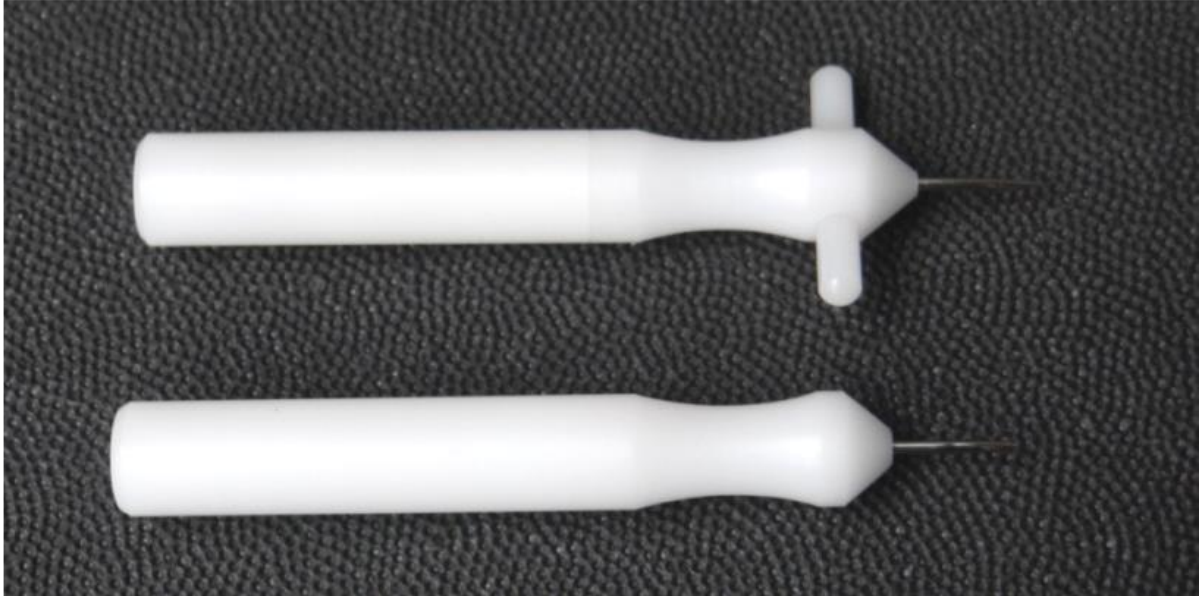


Şekil 16. VitaVitro WOW petrisi. Merkezdeki grup: time-lapse uygulamalarında kullanılan düz tabanlı geniş mikrokuyucuklar içerir. Sol üst grup: Embriyo kültürü için yuvarlak tabanlı orijinal küçük WOW'lar. Sağ üst grup: düztabanlı küçük kuyucuklar –geliştirilmiş kültür ortamında time-lapse uygulamaları için kullanılabilir. Altteki kuyular: Embriyo yıkamak ve değerlendirmede kullanılacak droplar içindir.

Özellikle golfte deneyimli olanlar için her bir embriyonun mikrokuyucuklara yüklenmesi sorun oluşturmamalıdır. Drop kültüründen farklı olarak; uygun kuyucuklar, medyum ve bunu kaplayan yağ kullanıldığında petriyi inkübatöre taşımak veya inkübatörden çıkarmak o kadar da dikkat gerektirmeyecektir. Her ne kadar zona pellucida herhangi bir hasara karşı embriyoları korusa da, embriyoları WOW'lardan çıkarırken dikkatli olunmalıdır. Embriyoların kuyucuklardan direkt olarak aspire edilmemesi, bunun yerine pipet ucunu kuyucuğun kenarına doğru yönlendirdikten sonra medyumun pipete doğru akması sağlanmalıdır.

Embriyologlar kültür WOW petrilerini hazırlanırken pipetlemeyi engelleyen, kapları karıştıran, mikrokanalları bozan ve günlük uygulamaları yapılamaz hale getiren hava kabarcıkları gibi ezeli bir düşmanla karşılaşabilirler. Bu tipteki kullanıma hazır ürünleri yapan üreticiler, hazırlık aşamasında hem medyumun hem de petrilerin önceden ısıtılması, medyuma vakum uygulanması, petriye küçük fiskelerle hava kabarcıklarının yok edilmesi, cam bir baget yardımıyla hava kabarcıklarının patlatılması veya ince bir cam pipetle aspirasyonu gibi çözüm yöntemleriyle sorunun giderilmesini önermektedirler. Bu zm yöntemlerinin hiç biri güvenli olmamakla birlikte daha sonra hava kabarcığı oluşumunu da engellemezler.

Tecrübelerimize göre, bu problemten kurtulmak için en etkili yol non-toksik bir kaplama ile yüzeyi kaplanmış ve *nceden ısıtılmış* VitaVitro WOW petrilere *nceden ısıtılmış* medyum ilave etmektir.





Şekil 17. Elde WOW hazırlamak için amaca uygun olarak hazırlanmış metal çubuklar. Dar tipte hazırlananlar düşük görünürlük ancak yüksek gelişim sağlarlar. Bu resimler için *yazarlar hiçbir ticari bir beklentide olmadıklarını beyan ederler.*

8.

HARİKA!

Hay aksi, eğer'den daha iyidir
Beau Taplin

Kişisel tercihler nedeniyle bu bölümde sadece dişi gametler ve (karışık cinsiyetli) embriyolar ile vitrifikasyondan bahsedilecektir.

Vitrifikasyon nedir ve onu neden seviyoruz?

Vitrifikasyon embriyolojide en çok kullanılan ve en yanlış yorumlanan kelimelerden biridir. Bunu kanıtlamak için dünya çapında saygınlığı olan bazı IVF kliniklerinin sayfalarından aldığım bazı cümleleri aktarayım:

“Vitrifikasyon oosit ve embriyonun oldukça süratli bir şekilde dondurulması işlemidir” Yanlış.

“ ‘Yavaş dondurma’ yöntemine göre daha komplike bir uygulamadır” Yanlış.

“Vitrifikasyonda kriyoprezervasyon yapılmış örnekler kristalleşmiş bir şekilde tutulur” Ne? Ne??

“Kristal yapıya sahip bir maddenin pürüzsüz bir nesneye dönüşümünü sağlar” Gerçekten mi?

“Bu işlem onları cam gibi neredeyse katı bir hale dönüştürür” Cam neredeyse katı bir madde midir? Neredeyse mi?

“Vitrifikasyon, dondurmada çok küçük miktarlar kullanılarak uygulanan yeni ve hızlı bir yöntemdir” Tüm söyleyebileceğin bu kadar mı?

Tüm bunlar en çok ilgi gören ve web sayfaları en sık ziyaret edilen kliniklere aittir. Geri kalanına ne demeli?

Bu nedenlerle bilimsel olarak sağlam temellere dayalı basit ve temel konulara geri dönelim. Yaklaşık 10 yaşlarımızda okulda katı, sıvı, gaz ve plazma halindeki maddenin dört temel yapısını öğrendik. İnsanlar yaşamlarını bahsedilen ilk üç evrede geçirirler ve plazma evresini

yıldırım çarpması veya nükleer bomba patlamasında deneyimlerler. Bu evreler arasındaki geçiş ağırlıklı olarak sıcaklık ve aynı zamanda basınç, kimyasal ve yapısal içerik vd. gibi birçok faktöre bağlıdır.

Memeli reproduktif biyolojisinde kriyoprezervasyon, ana bileşeni su olan yapılarda gerçekleştirilir. Burada amaç, ısıyı biyolojik aktivitenin (yıkımlayıcı aktivite de dâhil olmak üzere) durduğu seviyeye (-150°C ve daha düşük) indirmektir. Bu soğutma işleminde sıvı fazdan katı faza geçiş gerçekleşmekte ve su yapısal olarak (donma, örn; buz kristali oluşumu) yeniden düzenlenmektedir. Ancak, buz kristalleri zarlara hasar verdiği, organelleri yok ettiği ve hücreleri, organları ve organizmaları öldürdüğü için biyolojik yapılar için oldukça zararlıdır. Her ne kadar bazı bitki ve hayvanlar buz kristali oluşumuna karşı antifreeze proteinleri geliştirse de bu proteinlerin etkisi oldukça sınırlıdır ve ultra düşük ısılarda kullanılamazlar.

Neyse ki, suyu ve ilgili biyolojik yapıları düşük ısılarda katı forma dönüştürmenin başka bir yolu bulunmaktadır. Bu süreç vitrifikasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu isim cam anlamındadır (Latince “*vitreum*”). Bu fenomen silikon dioksitten cam ya da kumdan kristal oluşumuyla aynıdır. Yani kullandığımız tüm cam malzemeler, şişeler, pencereler ve bardaklar vitrifikasyonun bir sonucudur. Bir başka örnek ise bir zamanlar oldukça popüler olan sert yapıdaki akide şekerinin aksine pamuk şekerdir (vitrifiye şeker). Kumaşın ütülenmesi sırasında bile lifler bir tür cama dönüşür. Kaolinin 1200°C 'ye ısıtılması ve ardından soğutulması sonucu ortaya çıkan Çin porseleni vitrifikasyon sonucu oluşur.

Camlaşma için materyale bağlı olarak genelde birçok şart gerekir. Bilim insanları hala bunun nasıl olduğunu anlayamamış ancak çoğu bu durumun gerçek bir faz/aşama değişimi olmadığı yönünde fikir birliği yapmışlardır. Bu daha çok solüsyonun viskozitesindeki aşırı artışı yansıtmaktadır. Sıvının içindeki tüm moleküllerin yeniden yapılanmadan oldukları yerde hareketini durduğunu düşünün. Ayrıca vitrifiye olmuş su, donmuş su değildir ve çözündürülemez. Embriyolojideki vitrifikasyona gelince her ne kadar bugünlerde kurallar profesyoneller tarafından kullanılmıyor olsa da gerçek terimler soğutma ve ısıtma olmalı ve ayrıca vitrifiye edilmiş embriolarda kriyoprezerve edilmiş (dondurulmuş yerine) embriyo transferi terimi kullanılmalıdır (Shaw ve Jones, 2002).

Çözdürme de dâhil olmak üzere tüm kriyoprezervasyon süreci içerisinde, suyun vitrifiye olmasını başlatmak ve devamlılığını sağlamak için birçok koşulun bulunması gerekir. Bunlar;

- *Çok yüksek soğutma ve çözündürme oranları.* Buz kristal oluşumuna izin vermemek en sık kullanılan açıklamadır. Bu cümlemin tamamen doğru olduğuna emin değiliz fakat bir reproduktif biyolog olarak “neden” sorusu “nasıl” (daha sonra tartışılacaktır) sorusundan daha az önem arz etmektedir. Neyse ki sıradan bir embriyo laboratuvarında bile hem soğutma ve hem de çözündürme için kullanılan 15,000-20,000°C’lere ulaşmak nispeten oldukça basittir. Ancak bu, saf suyun vitrifikasyonu için yeterli değildir. Bunun için ilave başka numaralara ihtiyacımız var. (Bunu parantez içinde yazmamız gerekiyor. Bazı bilim insanları ve üretici firmalar soğutma oranının çözündürme oranından daha az önemli olduğunu vurgulamaktadır. Ancak, bunu tam olarak kanıtlayamadıkları ve genel görüş bu teoriyi desteklemediği için biz de hem soğutma ve hem de çözündürme hızının oldukça önemli olduğunu söylemeyi tercih ediyoruz).
- Vitrifikasyonu kolaylaştırmanın bir başka yolu da *basıncı artırmaktır* ancak örneklerle çalışılırken ihtiyaç duyulan basınç seviyelerine ulaşmak mümkün değildir. Yani bu seçenek burada sonlanmış oldu.
- *Kriyoprotektan madde eklenmesi* gerekmektedir. Bu kimyasallar ve/veya organik maddeler buz kristali oluşumunu (donma) engellemekte ve aynı zamanda hücreleri iki farklı şekilde korumaktadır. 1) ozmotik etki yoluyla; bunlar intrasellüler suyu uzaklaştırarak organik moleküllerin konsantrasyonunu artırmakta ve buz oluşumu engellenmektedir. 2) Hücre içerisine girerek veya plazma membranı ile temas ederek buz hasarına karşı hücre yapılarını korumaktadır. Mekanizması tam olarak anlaşılmassa da çalıştığını kabul etmek gerekir.
- Yüksek miktardaki solüsyonlar kullanıldığında dondurma sırasında karşılaşılan buz çekirdeklenmesi (ice nucleation) oluşuyorsa *kullanılan solüsyon miktarının azaltılması* gerekmektedir. Neyse ki düşük miktarlarda yüksek soğutma ve çözündürme oranlarına ulaşmak oldukça kolay olmaktadır. Bir parça şansla⁸.
- Yukarıda belirtilen gereklilikleri karşılamak için son derece standardize edilmiş etkili bir teknik kullanmamız gerekmektedir. Öğrenmesi ve tekrarlaması kolay olan bu süreç sonunda tutarlı ve başarılı sonuçlar alınır.

⁸ Şansımız burada bitmiyor. Vitrifikasyon için uygun koşulları ayarlayarak geleneksel yavaş dondurma yönteminde sıkça karşılaşılan iki önemli problemten de kaçınabiliriz. Kırılma hasarı ve buzlanma-donma hasarı. Daha sonra tartışılacaktır.

(Gabor Vajta 'dan kişisel bir değerlendirme)

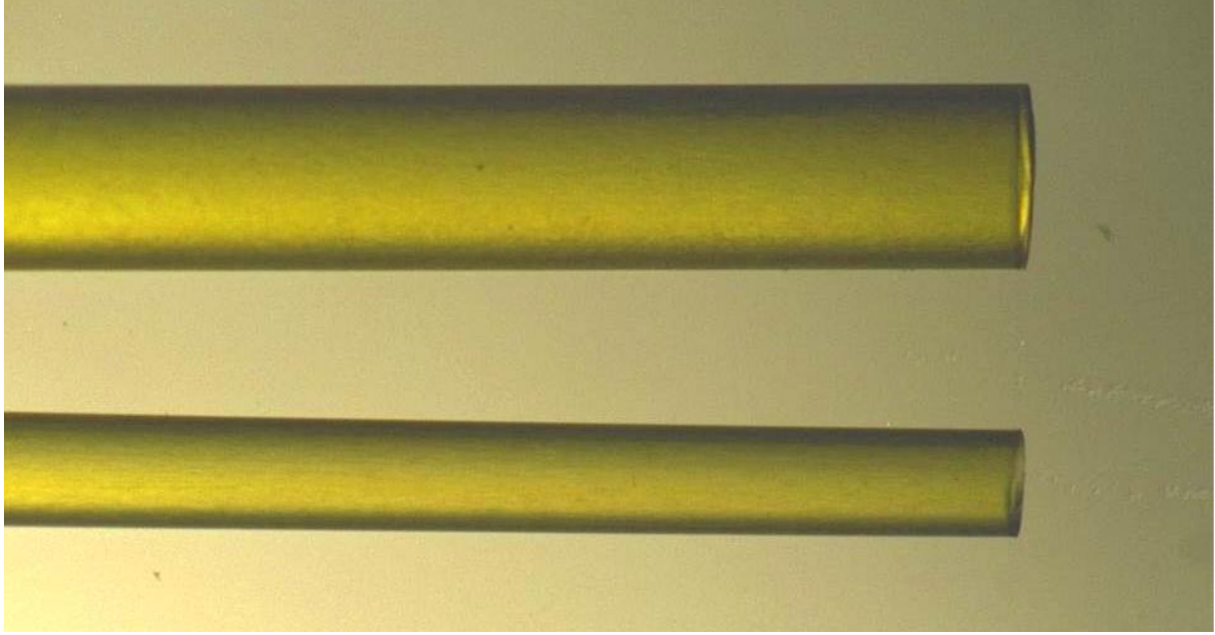
Otuz yıl önce embriyoloji konusunda çalışmaya başladığımda vitrifikasyon hala gelişmekte olan yeni bir teknolojiydi. Daha ziyade bir meraklı. Ne yazık ki (ya da neyse ki) sığır IVF blastosistleri geleneksel yavaş dondurmadan sonra yaşamıyordu. Çaresizlik içinde Japonya, Hokkaido'daki arkadaşım Karuhiro Saeki'nin o gün için güncel olan vitrifikasyon yöntemiyle çalışmalara başladık. Yaklaşık %60 oranında daha fazla kriyoprotektan madde kullanarak 0,25 ml'lik standart tohumlama payetlerinde nispeten daha düşük soğutma oranlarıyla (kapatılmış payetlerin kırılmasını önlemek için buhar fazında kademeli soğutma gerekliydi –stepwise-çözdürme sırasında da patlamayı önlemek için suya daldırmadan önce havada birkaç saniye tutmamız gerekiyordu) çalıştık. Yine de çok da kötü olmayan yaşam oranları hatta gebelikler elde ettik. Bu güzeldi ama yine de optimal değildi.

Daha sonra 1997'de, muhteşem bir Akdeniz havası, denizi ve etkileyici bir şehir olan Nice, Fransa'da bir konferansta katıldık. Ne yazık ki bir akşam, konusu vitrifikasyon olan bir workshopta kalabalık bir grup içinde sıkıştım. Yaşlı bir adam yetersizliklerimizin, sonu gelmeyen çıkmazlarımızın ve fiyaskolarımızın nedenini analiz ediyordu. Sıkılmıştım, kaçmak istiyor plaja gitmek, bira içmek istiyordum. Ancak kapıya bile ulaşamadım. Kızgınlığımı dizginleyip elime küçük bir kâğıt parçası alarak büyük bilim insanlarının açıklık getiremediği bu probleme bir çözüm getirmek için çalışmaya başladım.

Soğuk ve rüzgârlı bir akşamda Danimarka'ya ulaştım. Hemen boş laboratuvara giderek bu kâğıda çizdiğim modeli yapmaya koyuldum. Ertesi gün sığır embriyolarında bazı ön çalışmalar yaptım. Çok iyi çalışmıştı. Birkaç saat içinde bu yeni uygulamanın payete yükleme, çözdürme ve payetten alma gibi son derece kolay özelliklerini keşfetmiştim. Bir hafta içinde yöntemi geliştirdim, parametreleri düzenledim ve Japon arkadaşımdan soğutma oranlarını ölçmesini istedim. O da tebrikleriyle birlikte sonuçları gönderdi: veriler beklenenden daha iyiydi: 16,000-25,000°C/dakika. 3 ay içindeyse şimdiye kadar 1200 defa referans gösterilen bir makaleye yetecek kadar yeterli veri elde etmiştim. Bu makale memeli embriyo kriyoprezervasyonunda en çok referans gösterilen makale oldu (Vajta et al., 1998).

Bu, yüksek hızlı vitrifikasyon için amaca yönelik ilk cihazın –Open Pulled Straw (OPS)- oluşma hikâyesidir. Bunu neden sevdiğimi anlayabilirsiniz. İzleyen 3-4 yılda, evcil hayvan embriyolojisine uygun olan her şeyi çoğunlukla başarılı bir şekilde vitrifiye ettim. Bunun yanında OPS, insan oosit ve zigotlarının vitrifikasyonundan elde edilmiş ilk bebeğin doğmasına

ve insan embriyonik kök hücrelerinin kriyoprezervasyonuna büyük oranda yardımcı oldu (Kuleshova et al., 1999; Selman and El-Danasouri, 2002; Reubinoff et al., 2001).



Şekil 18. Standart 0.25 ml plastik tohumlama payeti ve OPS arasındaki fark. Çapı yarıya indirmek soğutma ve çözündürme oranlarını 10 kat artırdı ve 1200'den fazla referans gösterildi.

Orijinal soruya dönecek olursak: Neden vitrifikasyonu seviyoruz?

Çünkü bu bir mucizedir. Bu durdurulup tekrar başlatılmayan insan hayatını tekrar başlattığı için imkânsız mümkün hale getirmiştir⁹. Çünkü bu, 21.yüzyıl başarılarını elde etmek için atalarımızın 100-150 yıllık tekniklerini andıran arkaik bir manuel yöntemeye dayanan fantastik, benzersiz bir karışımdır. Vitrifikasyon ile çalışarak, Kaliforniya vadilerinde bir öncü veya Avustralya'nın zengin altın madenlerindeki Çinli bir madenci gibi olurken aynı zamanda yüzyılımızın en heyecan verici projelerinden birinde kilit bir oyuncu olursunuz.

Cihazlar ve soğutma-ısıtma oranları

Daha önce bahsedildiği gibi, ilk vitrifikasyon çalışmalarında geleneksel dondurma işlemlerinde kullanılan 0,25 ml'lik plastik tohumlama payetleri veya kriyoviyaller kullanılmıştır. Bu cihazlar geniş çapları, güvenli bir yükleme için (payetler için 5-7 µl, kriyoviyaller için 10+ µl) daha fazla solüsyona ihtiyaç duymaları gibi nedenlerle vitrifikasyon için uygun değildirler. Bu

⁹ Politik olarak hassas okuyucular için "insan gelişimini" okumalarını tavsiye ediyoruz.

amaçla tasarlanmamışlardır. Aynı zamanda duvarlarının kalın olması da istenen soğutma ve çözündürme oranlarına (payetler için yaklaşık 2000°C, kriyoviyaller için biraz daha az-kriyoviyaller daha sonra unutulmaya yüz tutmuştur) ulaşmayı sınırlamaktadır. Payetlerin patlamasını önlemek için iki aşamalı soğutma ve aynı zamanda çözündürme işlemi uygulacak da bu manipülasyonlar yönteme daha fazla tutarsızlık eklemiştir.

Dahası, bahsedilen bu yüksek miktardaki sıvının ciddi basınç değişikliği karşısında eşit derecede olmayan katılaşması vitrifiye olan medyumun çatlamasına ve içerisinde bulunan örneğin kırılmasına neden olmuştur. Geleneksel dondurma yöntemlerinin verimsizliğini çözmeye çalışırken çoğu sorun korunup üstüne daha fazlası eklenmişti. Açıkçası yeni cihazlara ihtiyaç vardı.

On yıldan fazla bir süre hiçbir şey yapmayan inanılmaz yaratıcı memeli embriyologlarına teşekkür ederim. Neredeyse tüm "uzmanlar" bu sınır ve sorunları kabul ederek çalıştılar¹⁰.

Tabi ki bu süreç içinde örneğin; *embriyonun sıvı azota direkt olarak daldırılması (herhangi bir taşıyıcı cihaz olmadan)* gibi bazı ön girişimler oldu (Landa and Tepla, 1990). Çok büyük bir düşünce ancak işe yaramadı –ilk denemeler işe yarayacağını kanıtlamalıydı. Konsantre vitrifikasyon solüsyonuyla drop oluşturmak için minimum 5 µl solüsyona ihtiyaç duyulur ki bu da uygun soğutma oranına ulaşmak için mümkün değildir. Dahası, drop sıvı azot yüzeyine ulaştığında birkaç saniye hatta daha fazla süreyle yüzmeye ve yüzeyde tuhaf bir şekilde dolaşmaya başlar. Bunun nedeni oldukça basittir sıvı azotun kaynama noktası -196°C'dir. Bu dereceden daha düşük sıcaklıklar (içinde örneğin olduğu drop gibi) şiddetli evaporasyona neden olur ve meydana gelen bu buhar katmanı mükemmel bir ısı yalıtım katmanı olarak işlev görür ve örneğin batmasını engeller¹¹. Sonuç, şu anki berbat soğutma hızı doğru bir şekilde ölçülemez.

Bu üç engelli sisteme dayalı makaleler on uzun yıl boyunca tekrar tekrar yayınlandı.

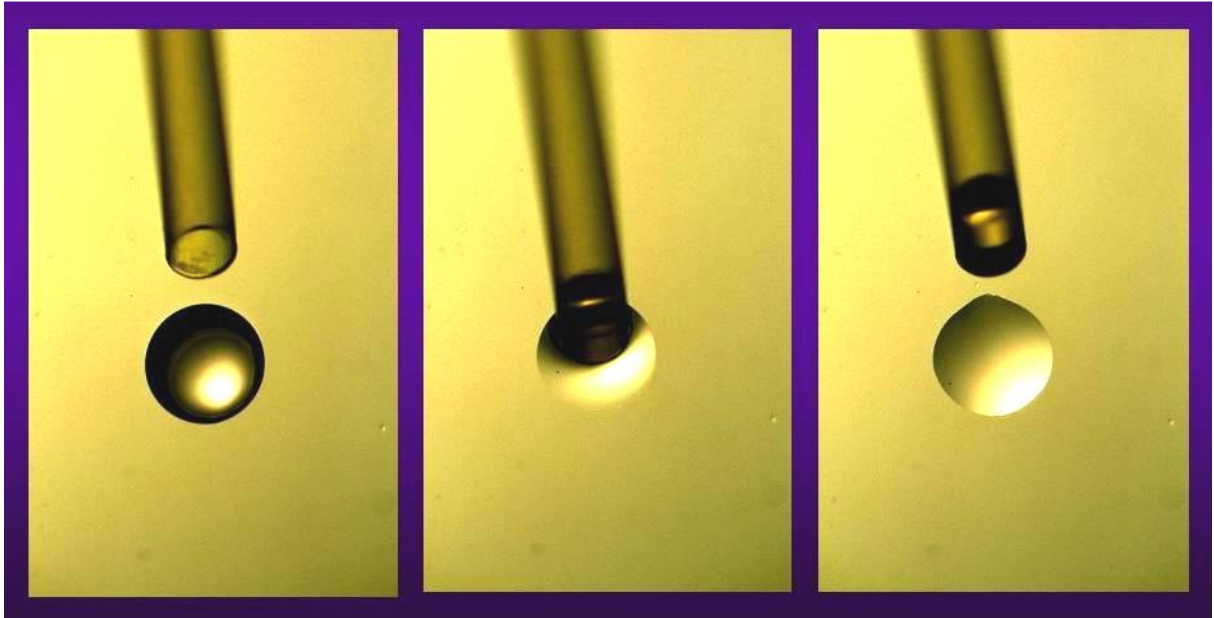
Bir başka yaklaşım ise *minimum drop büyüklüğü metodudur* (Arav, 1992). Bu düşünce gelecek için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Ancak, burada günlük uygulamalarda kullanılamayacak pahalı kriyo-mikroskoplara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonunda, küçük örnek kullanarak direkt temas yaklaşımının ilk örneği *bakır elektron mikroskop gridlerinin* taşıyıcı olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Steponkus et al., 1990,

¹⁰ Kabul etmeliyim ki verimsiz geçen bu sürecin yedi yılında önemli bir rol oynadım (Gabor Vajta'nın açıklaması).

¹¹ Leidenfrot etkisinin bir çeşidi (Deepa Sekhar'ın değerli notu).

Drosophila melanogaster'de; Martino et al., 1996, sıgırlarda). Aslında bu en iyi çözümdü çünkü standardizasyon ve devamlılık bir sorun olsa da kullanılan solüsyonun miktarı azdı, termokonduktif metal soğutma ve çözündürme oranlarını artırıyordu ve hızla katılaşan solüsyon bir film tabakasıyla yüzeydeki örneği koruyordu. Çözündürme sonrası örneği almak kolay ve güvenliydi. Kullanılan metal grid tüm oyunu değiştirdi. Bu cihaz, kullanılan kriyoprotektan miktarının azaltmanın ve kriyoprotektanlardan yararlanmanın ve dolayısıyla küçük hacimli doğrudan temas yaklaşımının yolunu açtı. Ancak taşıyıcının küçük olması, doğru tanımlamanın ve pratik bir şekilde depolamanın yapılamaması gibi nedenlerle uygulama deneysel laboratuvarlarda sınırlı uygulama alanı buldu.



Şekil 19. OPS'nin kapillar etki kullanılarak yüklenmesi. Drop büyüklüğü: 1 µl.

Embriyologların payetlerle çalışmayı tercih ettiğini anlamalıyız. Laboratuvardaki erken dönem embriyolar, blastosistler, sperma, eski yöntemlere göre dondurulan ancak bunlardan yalnızca bir avuç kadarı yaşayabilen oositler gibi her şey ya da neredeyse her şey payetler içerisinde dondurularak saklanmış durumdadır. Kullanılan tüm malzeme (tanklar, kanisterler) payet dondurma için tasarlanmıştır. Uygulayıcılar yeni bir meydan okuma gibi görünen bu uygulama için kullandıkları altyapıyı bir kenara atamadılar.

Eğer payet istiyorlarsa onlara bazı modifikasyonlar yapılmış yeni payetler (OPS) verdik.

Faydaları çok açıktır. Kalem gibi kolayca kullanılabilir. Daha önceden belirlenmiş drop büyüklüğüyle kapıllar etki kullanarak yükleme işlemi de çok kolaydır. Örnek, her zaman çözelti solüsyonunda yüzdüğü için yüzeylere yapışma veya bozulma olmaz. Yükleme işleminden sonra dehidrasyon veya ozmotik şok tehlikesi yoktur. Solüsyon sütunu ve tüp bunu engeller. Düşük kriyoprotektan konsantrasyonları nedeniyle soğutma ve çözündürme oranları ve insanlar da dâhil tüm memeli oosit ve embriyolarının yaşama oranları mükemmeldir. Ticari tanklar ve kanisterlerde saklamak kolaydır. Payet içinde ısınan/genişleyen hava solüsyonu dışarı ittiği için payeti boşaltmak kolaydır.

Bağımsız görüşlere göre, yeni başlayan embriyologlar için OPS'nin kullanımında öğrenim ve süreklilik, son 22 yılda tasarlanıp ticari hale gelen diğer tüm yüksek hızlı vitrifikasyon yöntemlerine göre daha kolaydır. Bunlardan daha önemlisi, OPS'den sonra kullanıma sunulan hiçbir teknikte yaşam oranları daha iyi olmamış ve OPS'deki gibi daha tutarlı sonuç veren veya daha geniş uygulanabilirlik sunan başka bir teknik geliştirilmemiştir. Orijinali hala en iyisidir.

Bu sadece şans olabilir ama yine de bir gerçektir.

Tabi ki düşündüğünüzden daha fazla alternatif bulunmaktadır. Tahminlerimize göre yüksek hızlı vitrifikasyonda kullanılan en az 100 farklı yöntem bulunmaktadır. Vitrifikasyonla ilgilenen neredeyse herkesin kendi vitrifikasyon cihazını ve yöntemini oluşturduğu yıllar vardı (burada yayınlanmamış sayısız kişisel varyasyondan bahsetmiyoruz). Üretmek ya da yaratmak problemin sadece bir parçasıydı. İkincisi belki de en zorlayıcı kısmı buna isim vermekti. “Cryo” ve “Vitri”, leaves, tops, locks, tips, safes, ingas vb. gibi birçok ek olarak istismar edildi. Daha sonra cam mikro pipetler (bazı ülkelerde kriyoprezervasyonda cam kullanmanın yasa dışı olduğunu unutmayın) kullanan gel loading tips, closed-pulled straw, sterile stripper tips, pipetting tips gibi isimlerle ortaya komik modifiye OPS'ler de çıktı.

Kazanan hangisi?

Miktar açısından düşünersek kazananlar en güçlü finansal destek alarak en fazla miktara sahip olanlardır. Onlar parayı patent, akreditasyon, reklam, pazarlama ve bazen de şüpheli iddialara karşı yasal savunmalar için kullandılar.

Bilimsel olarak kabul görmeyi göz önünde bulundurursak, resim burada değişmektedir. OPS, evcil hayvan embriyolojisinde ve deneysel çalışmalarda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Vitrifikasyon ile embriyo kriyoprezervasyonu yapıldıktan sonra doğan neredeyse tüm klon hayvanlar OPS yöntemiyle dondurulmuşlardır (lütfen dikkat: klon

embriyolar inanılmaz derecede fragil ve her türlü müdahaleye karşı duyarlıdır). Daha önce de bahsedildiği gibi oositlerin OPS kullanılarak yüksek hızlı vitrifikasyonla dondurulmasından sonra ilk üretilen insan bebek (bu yöntem insanlardaki yardımcı üreme tekniklerini dünya çapında tamamen değiştirmiştir) sayesinde bu metot insan embriyonik kök hücre vitrifikasyonundaki en etkili metot olmuştur.

OPS'nin ticarileşmesi gecikmiştir.

Ben (GV) bir ticaret adamı değilim ve çok kısa bir zaman önceye kadar buluşlarımı destekleyecek hiçbir firma bulamadım. En sonunda ve bir anda oldukça şanslı bir hale geldim. VitaVitro takımı bana ihtiyaç duyulan tüm teknik desteği sağladı. Güven, idari ve mali destek, dünyadaki en yüksek standartları kullanarak yaratıcılık ve üretim, büyük bir pazarlama ağı ve arkadaşça ve iyimser bir yaklaşım sundular.

OPS, şu anda FDA ve CE sertifikalarıyla birlikte VitaVitro tarafından üretilmektedir. Bu ürün aynı zamanda oldukça katı standartları olan Çin FDA'sından da yerel ve dünya çapındaki satış için sertifika almıştır.

Vitrifikasyon için solüsyonlar

Hangisi önce gelir? Tavuk mu, yumurta mı? Bu antik soruya yanıt veremesek de ilk başarılı vitrifikasyonun tavuklarda yapıldığını biliyoruz. Yumurtada değil, spermada. Bu, istisnai olmaktan çok üreme biyolojisindeki tipik bir hikâyedir.

İkinci Dünya Savaşından sonra, genç bir İngiliz bilim adamı olan Christopher Polge, Londra'da tavuk spermasının kriyoprezervasyonu üzerine çalışmalara başlamıştır. Önceki bazı çalışmalara dayanarak ortama farklı konsantrasyonlarda fruktoz eklemiştir. Morfolojik yaşam kalitesini artırsa da yaşayan sperm yumurtaya girememiş ve fertilizasyon gerçekleşmemiştir. Sonra Christopher tatile çıkmıştır.

Döndüğünde, çalışma alanında bulunan aynı eski şişeyle tekrar çalışmaya başlamış, bir deneme daha yapmış ve her şey mükemmel bir şekilde yolunda gittiğinde çok heyecanlanıp merak etmiştir. Neden? Fark neydi? Çevresindeki herkese sordu, şişedeki fruktoz solüsyonunun içeriğini karşılaştırdı. Sonuçta şişedeki çözeltinin kıvamı, çözünürlüğü her şeyi farklıydı.

Sonunda gerçek ortaya çıktı. Christopher tatildayken çalışma arkadaşlarından biri onun çalışma masasında spermanın mikroskopik değerlendirmesi üzerine tamamen farklı bir çalışma

yapmıştı. Eski şişe, lamlarda spermanın fizyasyonu için kullanılan solüsyonun hazırlanmasında kullanılmıştı. Şişede fruktoz solüsyonu yoktu. Yumurta akı, organik bir solvent ve bir çeşit alkol (tamamen kimyasal bir terimdir, içmeyiniz!) olan gliserol vardı.

Bu mükemmel bir kriyoprotektandı ve Profesör Polge sonunda horoz spermasını, sonra da boğa spermasını dondurarak bu türlerden yavru alınmasını sağladı. Bu buluştan sonra suni tohumlama (AI) endüstrisi ortaya çıktı ve donmuş sperma sayesinde milyarlarca buzağı doğdu. Hücre ve doku kültüründe, bakteriyolojide, mikolojide en çok kullanılan kriyoprotektan madde gliseroldür. Onlarca yıl sonra bile gliserol, evcil hayvan ve hatta insan embriyolarının geleneksel dondurma yöntemlerinde kullanılan ana bileşik olmaya devam etmiştir.

Tüm bunlar aptalca yapılan bir hata yüzünden oldu.

(GV'den not): Sizlere elektrik kesintisi, makinanın arızalanması, kötü zamanlama, laboratuvardaki gece işleri için geri dönmenin getirdiği tembellik, yanlış hesaplama gibi sorunlarla çözdüğüm bir problemi anlatamam. Anlatamam çünkü bu o kadar çok başıma geldi ki. Anlatamam çünkü siz bana bilimin Mr.Bean'i sıfatını yakıştırabilirsiniz.

Profesör Polge olayındaki çıktı, önemli bir parçaydı, hikâye değildi. Bu nedenle hatalarınızın farkında olun. Hatalarınız sonucunda oosit ve embriyolarınıza ne olduğunu lütfen kontrol edin. Daha iyi sonuçlar elde edebilir hatta yeni bir çıkış açabilirsiniz. Belki de berbat bir deney tüm geleceğinizi belirleyecektir!

Solüsyonlarla ilgili olarak, kriyoprezervasyonda kullanılan medyumlar aşağıda belirtilen temel bileşenlere sahiptir;

1. Fizyolojik tuz solüsyonu ve doku kültürü ve embriyo çalışmalarında ihtiyaç duyulan ve içerisinde enerji kaynakları, vitaminler gibi az (5-7) veya çok (20-40) miktarda madde bulunan *Holding medyum*;
2. pH seviyesinin hava koşullarına rağmen dengede kalmasını sağlayan *Buffer*;
3. Tanımlı, yarı-tanımlı veya tanımlanmamış içeriklerde bulunan organik veya non-organik haldeki *makromoleküller*.
4. *Kriyoprotektanlar*.

1. Farklı *holding medyumlarının* vitrifikasyona etkisini araştıran çok az sayıda araştırma yayınlanmıştır. Çoğu bilim insanı bunları tıpkı bir filmdeki figüranlar ya da bir yarış arabasının lastiği gibi yöntemin pasif içeriği olarak görür. Bazı durumlarda jantlar veya lastikler oldukça

önemli bir rol üstlendiklerine göre, bu durumda holding medyumun rolünü de göz ardı etmemek gerekir.

Deneyimlerimize göre sığırlarda başarılı bir vitrifikasyon Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) ile yapılabilir. Ancak, çoğu firma vitrifikasyon kitlerinin içinde daha komplike holding medyumları sunmaktadır. Bu medyumlar genellikle kendi kültür medyumlarının bir analogudur; tampon rolü gören bikarbonat yerine karbondioksitsiz ortamda çalışan başka bir tampon çözelti eklenmektedir (daha sonra açıklanacaktır).

Özellikle 80’li yılların başlarında embriyo kültürü amacıyla kullanılan ve günümüze kadar da somatik hücre ve doku kültürü çalışmalarında kullanılan ilk nesil medyumlarla karşılaştırıldığında 90’lı yılların sonu ve 2000’li yılların başlarında üretilen embriyo kültür medyumları basitleştirilmiş, bunların holding medyumları da komplike olmaktan kurtulmuştur. Embriyolar genellikle karmaşık solüsyonlara ihtiyaç duymaz. İmplantasyondan önce embriyolar ovidukt ve uterus kavitesinde embriyoyu çevreleyen dokulardan salınan sekresyonlarla yaşamlarını sürdürürler. Bu da “tanım gereği” dış dünya ile bağlantılı açık bir kanalda olduğu için tam olarak insan vücudunun içinde gerçekleşmez. Görünen o ki embriyo kültürü için ne uygunsa vitrifikasyon için de o uygundur.

Gerçekten öyle mi? Bizim “mantıksal” teorilerimiz her zaman biyolojik süreçler için geçerli değildir.

Evcil hayvan embriyologları deneyler konusunda çok daha fazla özgürlüğe sahiptir. Ayrıca, insanlardaki vitrifikasyonun öncülerinden alınan değerli temel bilgiler de günümüzde unutulmuş görünmektedir.

“Eski okul” bilgilerimize dayanarak holding medyumuyla ilgili ilk deneylere Doku Kültürü Medyumu 199 (TCM199) gibi aşırı derecede komplike medyumla başladık. Daha sonra bunu daha basit içeriği olan yeni nesil holding medyumuyla karşılaştırdık. Bu ikisi arasında belirgin bir fark olmadığı için biz de dünyaya uyararak yeni ve daha basit holding medyumunu kullanmaya başladık. Bu medyumları bir ay, iki ay... süreyle kullanım kılavuzunda yazdığı gibi 4°C’de sakladık ve yaşam oranlarının kullanım süresi bitmeye yakın bir zaman diliminde veya bittiğinde düşmeye başladığını gördük. Böyle bir olayı TCM-199’da hiçbir zaman yaşamamıştık.

Bu bulguları hiç yayınlamadık ancak konferans yemeklerinde dile getirdik. Aynı sonuçlar ABD, Avustralya ve Avrupa’da rastlanınca yavaşça TCM-199 kullanmaya geri döndük.

2. Yukarıdaki durumun benzeri eski güzel HEPES *buffer* için de söz konusu oldu. Birçok firma, en ünlüsü MOPS olan birçok alternatif sundu. Ancak, HEPES tamponlu TCM-199 dışındaki herhangi bir kompozisyon aylar süren uzun süreli saklamalarda bazı olumsuz etkilere sahip olabilmektedir. Muhtemelen kullanım tarihi geçtiğinde veya hemen sonrasında olabilir. Bunun aksine; HEPES tamponlu TCM-199 ise rahatlıkla uzun süreli saklanabilmekte, etkisini uzun bir süre güvenilir bir şekilde korumaktadır.

“*Her çingene kendi atını över*” benim eski vatanım olan Macaristan’dan bir atasözüdür.

Evet, VitaVitro’nun holding medyum ve *buffer*’ı sırasıyla TCM-199 ve HEPES’tir. Buna ek olarak, VitaVitro medyumuna özel bir şekilde, bu zorlu süreçte TCM-199 medyumuna oosit ve embriyoların yaşamlarını daha iyi hale getirebilecek ekstra bileşikler de ekledik.

3. *Makromoleküller*, kriyoprezervasyonda kullanılan solüsyonların temel parçası değildir fakat kullanılması şiddetle tavsiye edilmektedir. Etkilerini özelleştirmek zor olsa da onlar örnekleri korumakta ve yaşam ve ileri dönemde gelişim oranlarını artırmaktadır. Bunların etkisinin bir kısmı düşük konsantrasyonlarda non-permeabl ve permeabl kriyoprotektanların (aşağıda açıklanmıştır) kullanımına olanak sağladığı ve bu sayede ozmotik basınca yaptıkları katkıdan kaynaklanabilir. Bir diğer katkısı da solüsyonun viskozitesini artırmaları ve bu sayede işlem sırasında mekanik stresi azaltmalarıdır. Makromoleküller oosit ve embriyoların plastik ve metal yüzeylere yapışmasını önler ve hücre zarını basitçe sararak veya özel bağlantılar kurarak koruyabilir.

Elli yıllık embriyoloji “geleneği” devamlılığı artırmak ve kontaminasyon riskini azaltmak için medyumlarda kimyasal olarak tanımlı (defined) maddeleri kullanmaya çalışır. Bugüne kadar yapılan tekrarlanan girişimlere rağmen çoğu çaba başarısızlıkla sonuçlandı. Diğerlerinin aksine polietilen glikol (PEG), polivinil prolidon (PVP) ve Ficoll ile yapılan girişimlerde başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak, bağımsız karşılaştırma çalışmalarında bu maddeler proteinlerden daha az etkili bulunmuştur.

Son zamanlarda hidroksipropil-metilsellüloz’un (HPMC) ticari medyumlarda kullanımı tanıtılarak piyasaya sürüldü. Bu madde sellülozun oldukça ciddi bir kimyasal modifikasyonu sonucu üretilmektedir. Medikal amaçlı olarak topikal göz kremlerinde ve ilaçların yüzey kaplamasında kullanılırken glütensiz ekmeklerde gluten replasmanı olarak kullanılmaktadır. Sindirim kanalından absorbe edilmediği için yetkililer tarafından toksik olmadığı kabul edilmiştir.

Ancak bu madde göz tedavisi amacıyla kullanıldığında alerjik reaksiyonları indükleyebilmekte ve gastrointestinal problemler oluşturabilmektedir. Bu durum tam olarak glutene duyarlı kişilerde elimine etmek istediğimiz bulgularla aynıdır. Kullanımını destekleyen birkaç yayın dışında HPMC kullanımında dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Çünkü 1. Vitrifikasyon medyumunda görece yüksek konsantrasyonda bulunur; 2. Özellikle vitrifiye örneklerin çözündürülmesi sonrasında koruma mekanizması devreye girmez ve 3. *İn vitro* ortamda oosit ve embriyolar için herhangi bir bariyer (barsak duvarında olduğu gibi) bulunmaz.

İnsan IVF medyumlarında en sık kullanılan makromoleküller insan serum veya plazmasından elde edilen proteinlerdir. Bu amaçla Human Serum Albumin (HSA), globulin ve lipoprotein eklenmiş Serum Substitute Supplement (SSS) gibi birçok çeşidi bulmak mümkündür. Benzer katkı maddeleri dünya çapında farklı birçok üretici tarafından üretilmektedir. İlk dönemlerde insan serumu listenin bir parçasıyken daha sonra bu sıklıkla toksisite göstermesi ve potansiyel kontaminasyon riskinden dolayı listeden çıkarıldı. Çoğu ülkede hükümet düzenlemeleri ile bu gibi katkı maddelerinin üretilme kullanımı kısıtlanmıştır. Sığır embriyolarının aksine, insanlarda vitrifikasyon işlemlerinde serum albümininin kullanımı sınırlandırılmamıştır.

Antifriz proteinlerini kategorize etmek oldukça zordur. Bunlar hem makromolekül hem de kriyoprotektandır. Daha önce de bahsedildiği gibi, bunlar sıfırın altındaki ısı derecelerinde oldukça zorlu koşullarda genellikle inaktif hale geçerek uzun süre yaşayan organizmalardan elde edilirler. Bu proteinler belirli bir seviyeye kadar buz kristali oluşumunu engellemektedir. Şanslı olgularda donma noktasındaki birkaç derecelik fark, yaşam kabiliyeti için yeterli olmaktadır.

Bizi kategorize etme görevinden kurtarmak için, bu proteinlere ihtiyaç olmadığı için bunun gerekli olmadığını söyleyebiliriz. Geçtiğimiz 30 yıl boyunca bu antifriz proteinleri tekrar tekrar gündeme gelip birkaç yayından sonra tekrar kayboldu. Bunlar, muhtemelen bizim ilgilendiğimiz türlerde yaşadığımız süre boyunca kullanılmayacak ancak bazı vertebralıların ileri dönemlerdeki kriyoprezervasyonlarında sınırlı bir role sahip olacaklardır.

4. *Kriyoprotektanlar* vitrifikasyon medyumlarının neredeyse vazgeçilmez bileşenlerindendir. Erkek gametler son derece kompakt yapısı ve daha az su içeriği nedeniyle kriyoprotektan madde içermeyen solüsyonlarda da dondurulabileceği için “neredeyse” kelimesinin eklenmesi gerekiyordu.

Ancak, geniş oositler ve zigottan hatched blastosiste kadar olan tüm embriyolarda kriyoprotektanlara ihtiyaç vardır. Bu kimyasallar permeabl ya da non-permeabl olabilirler. Bu sadece “akademik” bir söylem değildir. Farklı bir görev anlamına da gelmektedir.

Non-permeabl kriyoprotektanların görevi, hücrelere girecek zamanı olmayan çok yüksek konsantrasyondaki permeabl kriyoprotektanların (aşağıda açıklanmıştır) yardımıyla, soğutmadan hemen önce hücredeki suyun hızlı ve agresif bir şekilde dışarı doğru atılmasını sağlamaktır. Non-permeabl kriyoprotektanların bir diğer görevi ise vitrifiye edilip çözdürülen hücrelerin, onları çevreleyen solüsyonlarında olmayıp içlerinde bulunan permeabl kriyoprotektanlar nedeniyle patlamasını engellemektir. Bir başka deyişle, non-permeabl olanların hücreleri sıkıştırmak ve bu halde tutmak dışında görevleri yoktur. İhtiyaç duyulan tek gereklilik toksik olmamalarıdır. Bu açıdan bakıldığında, kahve, çay veya diyet olmayan kolalarımıza eklenen basit bir şeker olan sukroz, en mantıklı seçim olacaktır.

(GV'den bir başka kişisel hikâye. Hayatımın en parlak anlarından biri uzak bir ülkeden gelen bir çağrıydı (aksi takdirde çok sıkıcı olacaktı). Embriyolog bir arkadaşımın sıvı azotta oositleri, operasyon salonunda bir doktoru, traşlı hastaları gibi her şeyi vardı. Ancak distribütörden sukroz henüz gelmemişti. Tek sorum alt katta kafe var mı oldu? Sonra aşağıya indik, biraz küp şeker alıp tattık, çözdürdük, filtrasyona tabi tuttuk ve bir ay sonra haber geldi. Gebelik elde edilmişti).

Bu tabi ki doğru değildi !!! (Yoksa doğru muydu?)

Bu bildiğimiz sukrozdu, başka bir şey değildi. Sukrozun daha züppe bir versiyonu olan bir başka şeker ise trehalozdur. İlave bir başka yararı yoktur. Sadece fiyatı belirgin bir şekilde fazladır. Her neyse, bazıları Aston Martin tercih eder¹².

Konumuza geri dönecek olursak; bir diğer grup olan permeabl kriyoprotektanlar arabalarla ilişkilidir. Organik çözücü maddeler mükemmel kriyoprotektan özelliktedir (efsanevi gliserol de buna dâhildir). İçlerinde ticari etanolün de bulunduğu diğerleri bu amaç için başarıyla kullanılabilir. Dünyaca ünlü birkaç laboratuvar yüzey dekontaminasyonu için bile etanol sprey kullanımı konusunda paronayak yaklaşımlar göstermektedir. Bu laboratuvarlar, muhtemelen embriyoların %10'luk alkolün bu yüksek konsantrasyonunu dakikalarca tolere edebileceğini ve hatta gelişimlerini stimüle edeceğini bilmiyorlar. Değil bir insan, bir Avustralyalı bile kanlarında bu oranın onda biri konsantrasyonunda bile yaşayamaz...

¹² Ben 20 yaşında bir Toyota Cruiser kullanıyorum (GV).

Ancak –arabalardan bahsetmişken- vitrifikasyon için en etkili ve vitrifikasyonda en güvenilir kriyoprotektan madde olan etilen glikol (EG) oldukça toksik olmasının yanında arabaların en önemli soğutucularından biridir.

Etki mekanizması aynıdır. Buz kristali oluşumunu engeller. Oldukça şanslıydık çünkü bu kimyasal garajımızda bulunuyordu.

Ne yazık ki EG’ü tek başına kullanmak en iyi strateji değildir. Tüm permeabl kriyoprotektanlar toksik etkilidir fakat bu etki kriyoprotektanlar arasında farklılık gösterir. Eğer ikili kombinasyon kullanılırsa kriyoprotektif etkisi aynen devam eder ve hatta artarken spesifik toksisite yarıya düşer.

Evet, burada hangi ikinci permeabl kriyoprotektanı kullanmalıyız? Burada laboratuvarlar ve üreticiler arasında tartışma sertleşiyor; kana kan bir mücadele sergileniyor. Birçok aday olmakla birlikte propilen glikol ve dimetil sülfoksit (DMSO) aralarındaki en güçlü adaylardır.

Aslında DMSO burada şanssız olanıdır. Benzerlerine göre toksisitesi düşük olan oldukça iyi bir kriyoprotektandır ve aynı zamanda iyi bir solventtir. DMSO, iyi solvent özelliği nedeniyle hayvan deneylerinde şüpheli kanserojen maddelerin çözündürülmesi için kullanılırdı. Test edilen çözündürülmüş materyalin karsinogenik özelliğini azaltma konusunda iyi hatta çok iyi çalıştı. Bu yüzden de kullanmayı bıraktılar.

Birçok bilim insanı bu hikâyenin sadece bir bölümünü duydu ve DMSO ile karsinogenezis arasında ilişki kurdu. Bu durum bir kişinin “*soygun olayına karıştığı*” ithamıyla çok benzerlik göstermektedir. Evet, aslında öyle, ancak adam soyulmuştu...

Her şeye rağmen, birçok grup ve üretici hala DMSO’ya güvenmekte ve bazı üreticilerin bunun alternatifi olan propilen glikol ‘ün “toksik olmadığı” şeklindeki reklamlarına direnmektedir. Aslında propilen glikol ’ün toksisitesi DMSO’dan çok daha fazladır ve daha da önemlisi etkisi daha azdır.

Ben (GV) Danimarka’da sığırlarda embriyoloji çalışırken on binlerce oosit ve embriyonun vitrifiye edilmesi ayrıcalığına sahip oldum ve bu ayrıcalıkla adı geçen kriyoprotektanların %25-75, %33-67 vb. gibi birçok kombinasyonunu karşılaştırdım. Sonunda en uygun EG ve DMSO oranının dilüe ve konsantre solüsyonlarda %50-50 olduğunu tam olarak da bizim başladığımız oranlarda olduğunu belirledim.

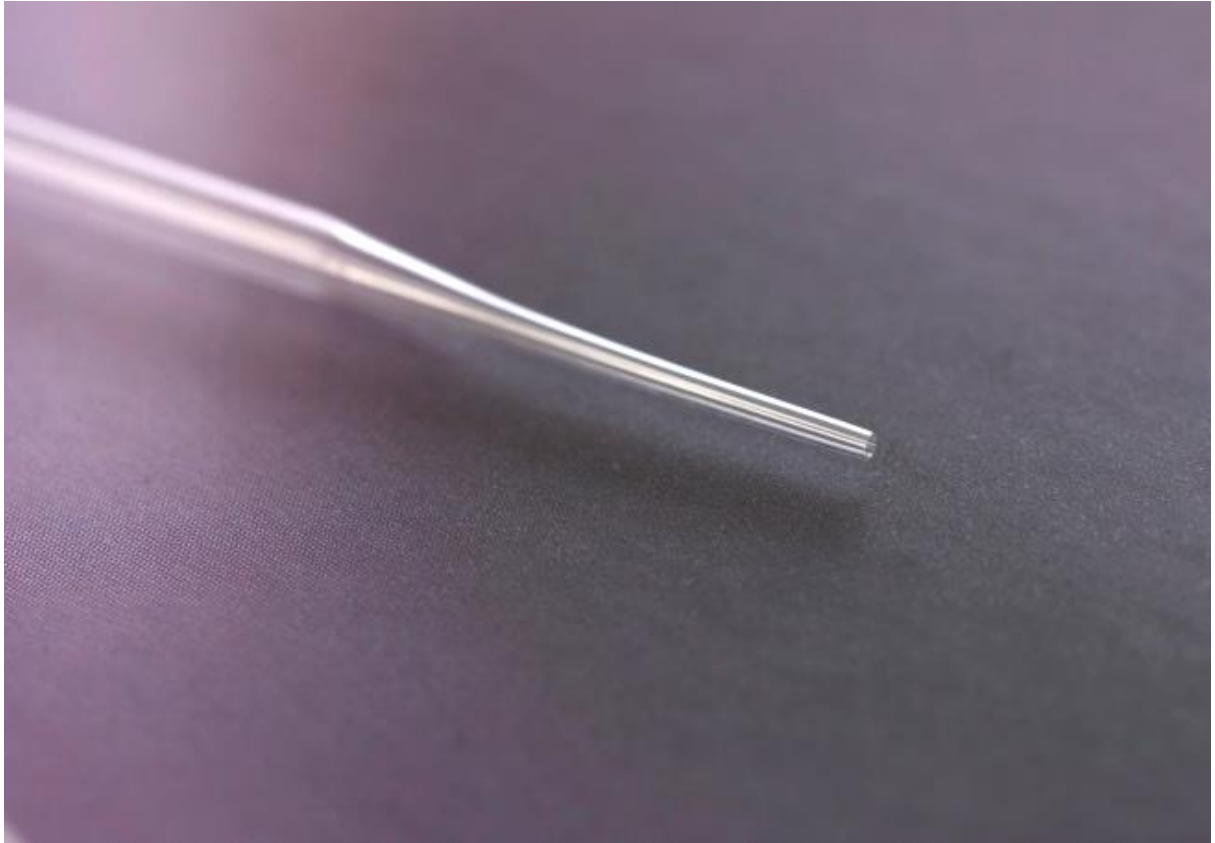
Yani, ekibimiz var. Hepes-buffered-TCM, human serum albumin, sukroz, etilen glikol, DMSO ve tabi ki OPS. Oyun başlasın!



VitaVitro

Vitavitro Straw Set





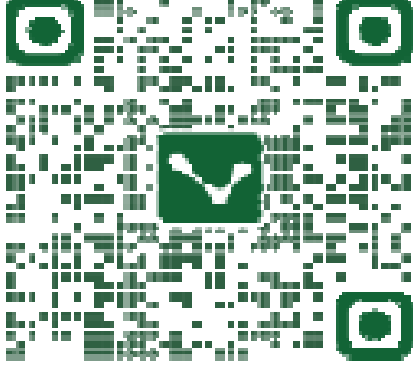


Şekil 20. Ticari olarak kullanıma hazır OPS kiti (VitaVitro Biotech Co., Ltd., Shenzen, China).

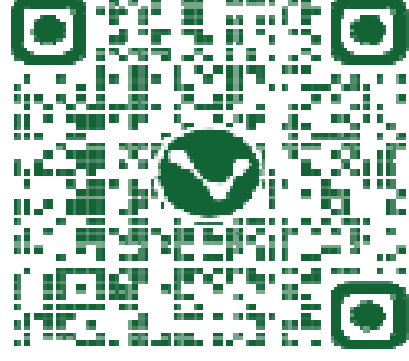
... fakat nasıl?

Gereksiz olmak istemiyoruz. Üreticinin ana sayfasında (www.vitavitro.com) OPS vitrifikasyonu için gerekli olan tüm geleneksel öğretim materyalini, açıklamaları, manuel ve videoyu bulabilirsiniz. Bunun yanında araştırma makaleleri, derlemeler veya kitap bölümleri gibi detaylı açıklamalar bulunan dört düzine yayını da okuyabilirsiniz.

Ayrıca size yeni ve asil bir rota sunalım. Bir akıllı saat hayal edin ve size *1. Ne yapacağınızı, 2. Ne zaman yapacağınızı, 3. Nasıl yapacağınızı ve 4. Neden yapacağınızı* yazıyla, çizimlerle, resim ve videolarla o anda söylesin. Ayrıca, iki çalışma arasında beklerken bilimsel arka plan ve ilgili diğer konular hakkında geniş bilgi sağlasın. Yapacağınız şey sadece mikroskopunuzun başına geçmek, uygulamayı açmak ve belirtildiği şekilde sanal koçunuzla birlikte çalışmaktır.



Android



iOS

OPSapp ile ilgili daha fazla ayrıntıyı Bölüm 12’de bulabilirsiniz.

İyi şanslar!

9.

EKLER

Bir çıkmaz sokak ne kadar uzunsa o oranda cadde gibi görünür

Mikhail Turovsky

İçeriğin planlanmasının en başından itibaren bu konular hakkında yazmak bizi çok endişelendirdi. Bu kitapta birçok şüphemizi, endişelerimizi ve eleştirilerimizi dile getirdik. Yine de sağlıklı bir denge elde etmeye çalıştık. Ancak, tek bir iyimser cümle kuramadığımız ilk bölüm bu oldu. Bu yoğun karamsarlık sizler için fazla gelebilir bu yüzden hızlıca geçelim. Neyse ki, geçtiğimiz birkaç yıl boyunca görüşümüzü mükemmel bir şekilde tutarlı ifadelerle destekleyen bir dizi makale yayınlandı. Bu nedenle “IVF add-ons” ayrıntılarıyla ilgilenenler için bir PubMed taraması yapmalarını öneriyoruz. Rehberliğimizi istiyorsanız o zamanki yazıda kullanılan isimler şunlardı; Datta et al., 2015; Harper et al., 2017; Kamath et al., 2019; Wilkinson et al., 2019; Macklon et al., 2019; van de Wiel et al., 2020; Lensen et al., 2020.

Embriyo gelişiminin *Time-lapse* ile gözlenmesi. Bu eski fikrin yenilikçi tasarımlarını mutlulukla karşılayanların coşkusu son birkaç yıl içinde giderek şüphecilığe dönmüştür. İlginç olan ise bu kitabı yazanlardan birinin her iki akımın başlatılmasında rol almasıdır (Pribenszky et al., 2010’da ve Rienzi et al., 2015’te GV’nin yardımcı yazarlıkları).

İlk dönemde her laboratuvar tahmin edilebileceği üzere *in vivo gelişim yetkinliğini belirlemek* üzere oldukça önemli değeri olan (ilk bölünmeden blastulasyon başlangıcına kadar olan sürede) birçok ölçülebilir parametreye sahip time-lapse cihazı aldı. Ancak, beklenenin aksine, her yayında ve hatta her laboratuvarında “*kaderi* belirleyen parametre” farklıydı. Kafa karışıklığını ortadan kaldırmak için veya bir başka açıdan bakıldığında bu şüpheli çıktılarının nedenini ortaya çıkarmak için birçok girişim oldu. Kullanılan medyumlar, ortam atmosferi vb. gibi laboratuvar rutinlerindeki birçok faktör suçlandı, çok mütevazı bir başarısı olan yapay zekâ içeren yazılımlar geliştirildi. Sonunda, yakın zamanda yapılan bir Cochrane sistematik incelemesinde (Armstrong et al., 2019) time-lapse kullanılmasının doğum oranlarını artırdığına yönelik bir bulgu elde edilemediği bildirildi. Time-lapse’ın başarısız olan tek yaklaşım olmadığını;

embriyoların geleneksel olarak morfolojik değerlendirmesinin gelişim kabiliyetinin belirlenmesinde sınırlı bir değere sahip olduğunu da eklemek gerekir.

Yazarların son derece ön yargılı ve subjektif görüşlerine baktığımda; şu anda, time-lapse uygulamasının kanıtlanmış tek olumlu etkisinin 3.gün olan embriyo transfer gününde gelişim sürecini rahatsız etmeden karar verebilmektir. Bunun yanında harika bir pazarlama aracıdır ve ebeveynler için bebeklerinin gelişimlerinin en başından itibaren özel bir hatıra oluşturur. Çoğu hasta time-lapse kullanımını ve bu hizmetin mümkün olduğu klinikleri tercih eder. Bu tercihin en büyük nedeni de bir filme sahip olmaktır. Bu amaçla üretilmiş ilk ve en basit Primo Vision time-lapse cihazı fazlasıyla yeterlidir. İlave olarak, Primo Vision cihazında, son derece gelişmiş modern versiyonların aksine evaporasyona bağlı problemler yoktur ve maksimum nem ortamında gerçekten güzel çalışır. Bu cihaz ne yazık ki artık üretilmiyor. Tüm gereksiz özelliklere sahip olan son derece pahalı Embriyoskop üreticilerin gözdesi haline geldi.

Assisted hatching. Başlangıçta bu yaklaşım, farklı teknikler içermesi, ilave cihazlarla donatılmış gelişmiş mikroskoplara ve mükemmel bir el becerisine ihtiyaç duyulması nedeniyle bir süperstar havasındaydı. Ne yazık ki bu duruma yaklaşım son on yılda azaldı. Tekrarlanan sistematik incelemelerde canlı doğum oranlarında bir fark olmadığı belirlenmiştir. Yöntemin prognozu kötü olan hastalarda hala biraz avantajı olsa da tüm embriyolarda rutin olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir. Hatta bazı makaleler bu yöntemin monozigotik ikiz gebelik oluşumunun artmasına neden olduğunu belirtmektedir.

EmbryoGlue (hyaluronik asit). Mükemmel isim seçimi, piyasada süratle başarı elde edilmesini garanti ediyordu. Eğer embriyonun uterus duvarına implantasyonu kritik bir ansa – ki öyledir – o zaman uygun bir yapıştırıcının iş görmemesi mümkün değildir. Belki de uygun bir yapıştırıcı gerçekten yardımcı olabilir ancak, mevcut formülasyonların bu durumu artırdığına ilişkin yeterli kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca, bunun uygulanması çoklu gebelikleri de indükleyebilir.

Sperm DNA testi. Her ne kadar 10 yıl önce umut vaat eden bir yaklaşım olsa da yapılan incelemelerde gerçekçi sonuçların alındığına ilişkin bir veri elde edilememiştir.

Kalsiyum ionofor ile oosit aktivasyonu. Bu yöntemin etkinliği ve güvenli olup olmadığı tartışmalıdır ve rutin klinik uygulamalar için önerilmemektedir.

Gelişmiş sperm seçimi (PICSI) (IMSI). Bu yöntemlerin etkinlik ve güvenli olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. İncelenen parametreler tam olarak gerçeği yansıtmamakta ve bazı seçim parametreleri kaliteyi etkileyebilmektedir.

PGS = PGT-A. Yine, mantıksal sonucun (“*sadece euploid embriyoları transfer ederek gebelik oranları ve genel verimlilik artacaktır*”) hayal kırıklığı yaratan gerçeklerle çürütüldüğü bir durumdur. Bunun nedenleri arasında mozaisizmin yanlış yorumlanması (Capalbo et al., 2021) nedeniyle doğru teşhisin konamaması, uygulama sırası ve sonrasında teknik hatalardan kaynaklanan kayıplar ve IVF ve vitrifikasyon gibi arka planda bulunan sistemlerin iyi olmaması nedeniyle kötü kaliteli embriyoların üretilmesi yer almaktadır. Buna göre en iyi teknikleri kullanan laboratuvarlarda elde edilen sonuçlar iyileşebilirken, sorunlu sistemleri kullanan diğer gruplarda ise sonuçlar PGT-A’ dan sonra daha da düşecektir. Genelde bu yöntem, görünüşte aneuploid olan tüm embriyoları atmak yerine embriyoların hangi sırayla transfer edilebileceğine karar vermek için kullanılabilir.

***Status praesens*¹³ (Mevcut durum)**

Hayal kırıklığı yaratan bulgulara rağmen bu ilaveler ABD’deki kliniklerin %30-66’sında sunulmaktadır. Ancak, bu kliniklerin %10’undan daha azında, sunulan yöntemlerin etkinliğinin tam olarak açıklığa kavuşmadığı belirtilmektedir. Diğer yandan bazıları ise PGT-A ve time-lapse yöntemlerinin doğum oranlarını artırdığı konusunda hemfikirdir (van de Wiel et al., 2020). Biz, Jan Wilkinson et al.’ın (2019), “*Tedavilerin savunmasız insanlara spekülatif bir temelde satıldığı ‘bir deneme hakkı’ yaklaşımının, satışı yapanlar dışındaki herkese fayda sağlayıp sağlamadığı konusu hiç de açık değildir*” şeklindeki ifadesinin arkasındayız.

Daha geniş anlamda “*primum nil nocere*” (öncelikle, zarar verme); çoğu hastada yanlış ve desteklenemeyecek beklentiler yaratılması ve paralarının karşılığını alamamaları düşüncesi gibi zararlar oluşturduğu için bu yaklaşımı yasaklamaktadır. Ne yazık ki, dünyanın birçok yerinde “*caveat emptor*” (sorumluluğun alıcıya ait olması) alıcının dikkat etmesi ahlaki açıdan kabul edilebilir bir zihniyete kavuşmaktadır (Zemyarska, 2019).



¹³ Geçmiş yüzyıllarda hastanın gerçek durumunu tanımlamak için yaygın olarak kullanılan tıbbi bir terimdir.

10.

KEŞİF ve YENİLİKLER

Sindirim sürecini tam anlamadığım için akşam yemeğimi reddetmeli miyim?

Oliver Heaviside

Eğer iş tanımınızda araştırma da yer alıyorsa siz de üreme biyologlarının şanslı azınlığındasınızdır. Ancak, içinde bulunduğumuz koşullar tüm yaratıcı faaliyetleri engelliyor gibi görünse de, bu bölüm oosit ve embriyolarda çalışan tüm bilim insanları için bazı pratik değerler katabilir. Her IVF programı, hastalar, tedaviler, gamet morfolojisi, laboratuvarında kullanılan yöntemler, embriyo gelişimi vb. gibi nedenlerle birbirinden farklıdır. Şimdi size bizim yanlışlarımızdan bahsedelim. Yakın zamanda karşılaştığımız, Oxford'un COVID Aşısında¹⁴ gözlemlenen olaylar “*Felix culpa*” olarak adlandırılmaktadır. Bu terim, gözle görülür bir hatanın nadiren de olsa başarılı sonuçlar vermesi durumudur. Bu nedenle erken pes etmeyin. Tam bir fiyaskodan da dikkate değer sonuçlar çıkabilir. Diğer yandan, uygulama sorunları ve hatalar sizin düşünmenizi sağlayacaktır. Asla “*bu iş bu kadar kolay olsaydı başkaları uzun zaman önce keşfederdi*” demeyin. Çünkü keşfedilmemiş olabilir, benzer bir yaklaşım onları engellemiş olabilir.

Araştırma türleri ve araştırmacılar

Geleneksel olarak geliştirme de dâhil olmak üzere akademik araştırma ve inovasyonu kapsayan temel ve uygulamalı bilimden bahsediyoruz. Bu iki bilim alanının amaçları örtüşmekle birlikte aslında birbirinden farklıdır. Temel bilimde amaç bir şeyi anlamak, uygulamalı bilimde ise pratik bir sorunu çözmek amaçlanmaktadır¹⁵.

¹⁴ Uygulanması gereken doz hesaplanmış ve bu dozdan %62'lik bir etkinlik sağlanmıştır. Ancak hastalara bir yanlılık sonucu yarısı miktarındaki ilk doz uygulandığında ise etkinlik oranı %90'a ulaşmıştır.

¹⁵ Özgeçmişimiz için hazırladığımız tez yazmak veya bir yayın hazırlamak gibi en sık hedeflediğimiz amacı iyi bir neden için bir kenara koyalım.

Bu iki araştırma türü farklı iki karakter gerektirmektedir. Akademik araştırmacılar sistematik, sabırlı, çalışkan ve titiz insanlardır. Onlar için bilim, bilinmeyen dünyanın gittikçe daha büyük parçalarını içine alan devasa ve sürekli büyüyen bir amip gibidir. Harika takım çalışanları olmakla birlikte iyi de öğretmendirler. Var olan yapıyı hem omuzlarlar hem de temsil ederler. Onlar, savaşçıdır, öğrencidir, stratejisttir ve kazanan ordunun generalleridir.

Bir icat için farklı bir mentaliteye sahip olmak gerekir. Sezgileri kuvvetli, saplantılı, başıboş, “Tanrı yok, Usta yok” tipinde, sağlam iradeli ve coşkusu fanatiklik seviyesinde olmalıdır. Verilen görevler için vazgeçilmez olsalar da uzun süreli çalışmalarda dayanılmaz olabilirler. Öncü ve cesurdurlar. Bunlar bilimi herkesin her yerde ve her zaman hamle yapabileceği üç boyutlu bir satranç masası gibi görürler. Yüzlerce çılgın fikirleri vardır ancak düzinelercesi unutulmuştur ve şanslı durumda bunlardan biri oyunu değiştirecektir.

Bilim, orduda olduğu gibi her ikisine de ihtiyaç duyar. Yedi yıl savaşları sırasında İmparatoriçe Maria Theresia’ya bağlı bir avuç Macar süvarisi büyük Prusya ordusunun gerisinde Berlin’i ele geçirdi ve hazineyle birlikte geri döndü. Ancak savaş Avusturya ordusunun yetersizliği nedeniyle kaybedilmişti¹⁶.

Günümüz embriyolojisinde ise tam tersi sorunlarla karşı karşıyayız. Bazıları oldukça yetenekli ve hırslı olan birçok askerimiz olsa da hem beynimizde hem de laboratuvarında biraz da serseriye ihtiyacımız var. Maceradan aldığımız tadı sadece bilgisayar oyunları ile ve laboratuvarındaki günlük rutinlerle sınırlamamalıyız. Şunu anlamamızı istiyoruz, eğer biz embriyologlar pasif kalmaya devam edersek hiç kimse bizim modası geçmiş teknolojilerimizi değiştirmeyecek ve tehlikeye atılmış sonuçlarımızı iyileştiremeyecektir. Kapasite ve kaynak açısından çok uluslu şirketlerle rekabet edemezsiniz, ancak sizler ön saflarda olduğunuz için problemleri net bir şekilde görüp –umarım- düşünme ve ilerleme özgürlüğüne sahipsiniz.

Problem çözme

Eğer bu söylemler yeterince ikna edici değilse, konuya farklı bir açıdan bakalım. Bilimde bir sorun ortaya çıktığında profesyonel yaklaşım; Neden? Bu nasıl oldu? Nedeni, kaynağı neydi,

¹⁶ Mareşal Kont András Hadik’in atlı heykeli Budapeşte Kalesi’nin en çok ilgi çeken bölümlerinden biridir. Bu ilgi sadece onun benzersiz kahramanlıklarından ileri gelmez aynı zamanda öğrenciler yıllık mezuniyet seremonilerinin bir parçası olarak bu bronz heykeldeki atın testislerini de parlatırlar.

hangi faktörler buna neden oldu, gerçek mekanizma nedir? gibi soruları sormayı gerektirir. Daha sonra bilim insanları ilgili her şeyi morfolojik, histolojik, kimyasal, immünolojik, moleküler biyolojik, endokrinolojik, time-lapse, istatistiksel, yapay zekâ, makine öğrenmesi... gibi mümkün olan tüm metotlarla ve tüm alanlarda araştırmaya başlar ve sonunda sonuçlarını gerekliyse yayınlar, yayınlar ve yayınlar. Ancak bu sırada asıl hedefi unutmuş görünürler.

Eğer en başında *Nasıl?* Nasıl çözebiliriz? sorularını sorarsak ve eğer hala ihtiyaç duyuluyorsa çözüm bulunduktan sonra da ilgilenmeye devam edebiliriz.

Bu çok da profesyonelce bir yaklaşım olmasa da bilim tarihinde bu stratejiyle başarıya ulaşmış birçok örnekle karşılaşabiliriz. Jenner, Fleming ve Semmelweis'i düşünün. İsminizi ölümsüzleştirmek için engin keşiflere ihtiyacınız yoktur. Nobel ödülü kazanmış yüzlerce kişi unutulurken doğa bilimleriyle en ufak ilişkisi olan herkes Petri, Bunzen ve Erlenmeyer'i bilir. Bilimsel keşifler çılgır açmayabilir fakat bunların getirdiği yenilikler yüzyıllarca hayatta kalır.

Deneysel model

Bir sonraki aşamaya geçelim. Sizin tarafınızdan tasarlanmış bir cihaz veya eklenmiş bir kimyasal, verilen yöntemi iyileştiriyorsa, bunu test etmek için deneysel bir modele ihtiyacınız olacaktır.

Son hedef insan reproduksiyonu ise, deneylerinizde kullanmak üzere evcil hayvan oosit ve embriyolarını kullanmanızı öneririz. Yaygın olarak kabul edilen hayvan modeli rat olsa da bunun 2 dezavantajı bulunmaktadır. Bunların oosit ve embriyoları daha küçük olduğu için manipülasyonu için farklı malzemelere ve kültür için de farklı oranlara ihtiyaç duyulur. Aşması daha güç olan diğer problem ise bunların biyolojik karakteristiklerinin farklı olmasıdır. Genelde fare oosit ve embriyoları *in vitro* deneylere daha dirençlidir ve ısı değişiklikleri ve diğer stres yaratan işlemlere daha az duyarlıdır. Dolayısı ile bu direnç embriyologları yanıltarak insan oosit ve embriyoları için uygun olmayan parametrelerin ortaya çıkmasına neden olabilir¹⁷.

Diğer yandan, büyüklük ve biyolojik karakteristikleri yönünden sığır embriyoları insaninkine oldukça yakındır. Sitoplazmik yağ damlacıkları nedeniyle oluşan koyu görünüm ilk bakışta endişe verici olsa da çalışma sonunda önemli farklılıklar ortaya çıkarmaz. Uygun teknoloji

¹⁷ Fareleri geçici veya kalıcı olarak laboratuvarınızda tutmanız sonucu oluşacak ek işler ve daha da önemlisi oluşacak pis koku gibi diğer bazı pratik konulardan bahsetmiyorum.

kullanıldığında IVF ve IVC çıktıları insana benzemektedir. Bunun yanında insandan farklı olarak in vitro maturasyon da oldukça etkilidir. Mezbahadan toplanan ovaryumlar sınırsız bir kaynak sağlamaktadır. İnsanlarda kullanılan embriyo vitrifikasyon metotları sığırlarda da iyi çalışmakta ancak oosit vitrifikasyonu çok etkili olmamaktadır.

Bu amaçla kullanılabilecek diğer aday da domuzdur. Manipölasyonlar, oosit/embriyoların daha koyu renkte olması ve daha hafif olup petrinin tabanına çökmemesi nedeniyle biraz daha fazla zorlayıcı olabilir. Bahsedilen durumlar sitoplazmada çok fazla miktarda bulunan ve fonksiyonu tam olarak bilinmeyen lipit nedeniyle oluşmaktadır. İnsan ve murin embriyoları koyu renkli lipit damlacıkları olmadan da yaşayabilmektedir. Bu lipit damlacıklarını domuz embriyolarından çıkarırsanız (yüksek hızlı santrifüj kullanıldığında görece kolay bir işlemdir) yaşayabilir ve gelişebilirlerse de donma hasarına karşı hassas duruma gelirler. Fakat orijinal, “doğal” embriyolar (çok da iyi bir açıklama olmasa da) kimyasalların, sistemlerin ve manipölasyonların denenmesinde oldukça iyidir. Yüksek duyarlık aynı zamanda bir fayda da sağlamaktadır çünkü domuz embriyoları neyi tolere ediyorsa insan embriyoları da benzer bir şekilde tolere etmektedir.

Çoğu insan IVF laboratuvarı oosit toplama için ayrı bir oda ve yalnızca evcil hayvan embriyolojisi için basit ancak eksiksiz bir oda tesis edemez. Bu durumda hayvan üreme istasyonlarıyla yapılacak karşılıklı işbirlikleri kurmak imkânsız değildir. Yüzlerce oosit ve binlerce donmuş sperm örneğine erişime sahip yüksek standarttaki bir insan embriyoloji laboratuvarında in vitro çalışmalar için sınırsız bir özgürlük de bulunuyorsa, gerçek araştırmalar için kazan-kazan durumu söz konusu olmakta ve bu durum uzun vadede insan kaynakları da dâhil her iki taraf için de önemli bir fayda sağlamaktadır.

Arka plan sistemi

Her değerli araştırmanın vazgeçilmez koşulu yüksek standartlı ve optimize bir sistem kullanmak, dünya çapında değer gören yayınlarla karşılaştırılabilir tutarlı derecede nitel ve nicel sonuçlar elde etmekle olur. Sorunlu bir sistemde yapılan iş yararsızdır ve bu gibi geri plan olanaklarıyla yapılan yayınlar arkasında birçok soru işareti bırakır.

Verim sorunlarıyla ilgili konularla uğraşıyorsanız embriyologların klasik bahanesinden uzak durun. *Oositleri suçlamayın!* Bu çok eski bir numaradır. Sonu gelmeyen şikâyetleriniz ve tutarsız sonuçlarınızla birkaç yıl daha dayanabilirsiniz ancak sonuçta kaybeden sizin CV’niz ve

geleceğiniz olur. Her yerde ve her zaman dış etkenler vardır. Bunlara uyum sağlayın, değiştirin veya daha iyi koşulları olan yeni bir yer bulun.

Öte yandan en üst seviyedeki sistemler yıllarca hatta onlarca yıl boyunca gelecek için yatırımlarını artırırlar. Eğer böyle bir sisteme sahipseniz örneğin embriyo kültürü konusunda değiştirdiğiniz veya geliştirdiğiniz bir modelle büyük bir değer kazanıp, yılda 1-2 makale yazabilirsiniz. Bu seviyede başka bir sisteminiz varsa, örneğin vitrifikasyon konusunda çok da çaba sarf etmeden ve yenilikçi beceriler elde etmeden her yıl iyi kalitede 3-4 makale yayınlatabilirsiniz. Laboratuvarınızda çalışan üçüncü bir sisteminiz varsa ya da embriyoloji konularıyla ilgilenen genomik düzeneği olan birinci sınıf bir laboratuvarla iş birliği içindeyseniz dünyanın en şanslı insanısınız. Bu şekilde 3-5 yıl boyunca yılda 10'un üzerinde makale yayınlatabilirsiniz. Radikal bir gençleştirme veya ciddi bir profil değişikliği için tam zamanıdır.

Konu başlıklarının seçimi

Konu başlıklarının seçiminde her şey subjektif ve isteğe bağlıdır ve bu görev sizin görevinizdir. Biz burada sadece birkaç konu üzerinde duracağız. Kabul edip etmemek size bağlıdır.

Hedef iddialı olmalıdır: belirli bir ilerleme kaydetmek için farklılıklar mikroskop altında kolayca belirlenebilmeli veya yapay zekâ, makine öğrenimi ya da gelişmiş istatistik hesaplamalar kullanmadan ilk bakışta sonuç raporunda kolaylıkla görülebilmelidir. Küçük farkların birleşerek büyük bir fayda sağlayacağını söyleyebilirsiniz. Bu tabi ki olabilir ancak oldukça nadirdir. Makalelerin büyük çoğunluğunda belirlenmesi oldukça zor olan ancak belirgin bir etkisi olan konular ele alınır ve böylece en fazla 10 atıf alarak iz veya bir etki bırakmadan ortadan kaybolur.

İşinizi kolaylaştırmak için, küçük bir çabayla önemli bir gelişim sağlayacağınız *zincirin en zayıf halkasını bulmaya çalışın*¹⁸. Çok mantıklı gibi görünse de uygulaması oldukça zordur. Ancak, bir kere doğru noktaya temas ederseniz çözümün yarısına ulaşmış olursunuz.

¹⁸ Bu deyim V.I.Lenin tarafından 1917'deki Rusya için kullanılmıştır. Karl Marx'ın orijinal planının aksine Lenin, emperyalist zinciri en zayıf yerinden yani anavatanından kırmayı önerdi. Bu ifadeyi burada kullansak da herhangi bir embriyologun IVF laboratuvarında Bolşevik devrimi gerçekleştirmesine izin vermeyeceğiz.



Şekil 21. Zincirin en zayıf halkası.

Gündemde olan ya da moda olan konulardan bunları yapmak için çok iyi bir nedeniniz yoksa uzak durun. Çabanızın değer bulacağı unutulmuş ya da gizlenmiş alanları bulmaya çalışın. Eğer en popüler konular üzerinde çalışmak istiyorsanız, diğer çalışanlardan belirgin bir şekilde ayrı olan bir yaklaşım belirleyin.

Milenyumun ilk 10 yılında, embriyonik kök hücre araştırmaları büyük umut uyandırmıştı. On binlerce kişi laboratuvarlara koştu, inanılmaz hedefleri olan görkemli projelerini toplantılarda açıkladılar. Konu hakkındaki gelişmeleri küçümsemek istemiyoruz ama verilen vaatlerle karşılaştırıldığında dağ fare doğurdu.

İçinde bulunduğumuz yıllarda ise herkes embriyo seçimi üzerine odaklanmış durumdadır. Potansiyel değerinin çok yüksek olduğunu bizim bu konudaki ilerlememizle karşılaştırınca anlıyoruz. Bu konuda en az yarın düzine temel yaklaşım ve sayısız varyasyonun olduğunu görüyoruz. Bunların tamamı, ortaya koyanların ellerinde üstün sonuçların alınmasına neden olmuş ve bu sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da desteklendikten sonra yavaşça unutulmuş ya da daha önce de bahsettiğimiz gibi bir eklenti olarak kalmıştır. Şimdinin gözdesi yapay zekâ ve makine öğrenimidir.

Cyborg'lara saygım sonsuz ama bu sorun insanlar tarafından çözülmelidir. Grup içinden en iyi embriyoları seçmek yeterli değildir. Asıl görev, daha iyi bir grup oluşturmaktır. Günümüzde sıklıkla unutulan embriyolojinin eski kanunlarına göre; elinizdeki sistem %50, bir başka sistem

de %30 oranında blastosist üretiyorsa, bu ikinci sistemde %20 daha az kaliteli embriyoya sahip olacağınız anlamına gelmez. Bu *hiçbir şeye* sahip olamayacağınız anlamına gelir.

Bu arada, ESHRE'nin ilk çevrimiçi konferansında yaşanan en parlak anlarından birinde Amir Araw yakışksız bir soruya şu yanıtı vermiştir: *“Bu kadar gelişmekte olan akıllı teknolojileri giderek daha az akıllı olan insanlara veremeyiz”*. Alınmayın arkadaşlar.

Nasıl ilerlemeli

“Kolay. Araştırılacak bir problem bulduğunuzda her şeyi detaylı bir şekilde tasarlayın. Deney gruplarına, her gruptaki örnek sayısına, tekrar sayısına, kontrol noktalarına ve ana sonuca karar verin. Patronunuzdan ve yetkililerden izin alın, her şeyi hazır edin ve çalışmaya başlayın. 3-5 tekrardan sonra sonuçları toplayın, istatistiksel anlamlılığı değerlendirin ve gelişmeleri bildirin.”

Her araştırmanın farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyduğunu ve her araştırmacının da kendine özgü bir yolu olduğunu biliyoruz. Ancak deneyimlerimize göre, yukarıda anlattığımız süreç sadece *gelişmeleri göstermek için ortaya konan bir vitrin sunumudur*. Bahsedilen zaman akışının takip edilerek başarının elde edildiği tek bir vaka bile hatırlamıyoruz.

Laboratuvarda yapılan embriyoloji çalışmalarının bazı benzersiz özellikleri vardır. In vitro çalışma sonuçları diğer alanlarla¹⁹ karşılaştırıldığında oldukça avantajlıdır çünkü sonuçlar birinci haftanın sonunda elde edilebilmektedir. Diğer yandan, evcil hayvanlar da dâhil olmak üzere hipotezimiz doğruluğunu veya sistemimizin tamamen yanlış olduğunu kanıtlamak için binlerce embriyoyu boşa harcamak istemiyoruz.

Fikirler ve özellikle de sıra dışı olanlar, fazla ilgi çekmeden, tercihen yalnızken, akşam geç saatlerde ve yarı karanlık laboratuvarda test edilmelidir. Elinizde yüz örnek varsa da bunları dört gruba ayırmak yeterli olacaktır. İlk deneme için üç oosit/embriyoyla çalışın. İlk denemede gözle görülür ilk hatanızı yaptıktan sonra bunları hemen atın ve yeniden çalışmaya başlayın. Beşinci raunttan sonra metot konusunda deneyim sahibi olacağınız için bundan sonra belki de hala korkunç sayılabilecek gerçek sonuçları elde etmeye başlarsınız. Artık, parametreleri, solüsyonları her şeyi değiştirebilirsiniz. Çok şanslıysanız birkaç gün sonra (her biri için 20-30 denemenin neredeyse tümü tam bir fiyaskoyla sonuçlanan) bazı sonuçlar almaya başlarsınız.

¹⁹ Karsinogenezis çalışmalarını örnek verirsek, tek bir deneyin sonucu yıllarca sürebilir.

Bir hafta sonra gelişimlerini izlemek için inkübatöre koyacağınız bazı örnekleriniz olabilir. Ancak çoğu durumda çok daha fazla sabırlı olmanız gerekebilir.²⁰

Bizler raporlarımızda yalan söylemeyiz. Yayınladığımız araştırma makaleleri tanım ve ihtiyaçlara göre açıklanarak tamamlanır. İstatistik hesaplamalar yapılır, hepsi kusursuz, gerçek ve güzel bir şekilde sonuçlar çıkarılır. Hiç de heyecan verici olmayan son deney genellikle sıkıcı bir görevden başka bir şey değildir. Çok büyük ve aptalca bir hata yapmazsak sonucun ne olacağını biliriz.

²⁰ Sığır oositlerinin vitrifikasyonunda az-çok başarılı olmak için 50.000 örneğe ve bir yıldan fazla bir süre akşamları yapılan yarı gizli çalışmalara gerek oldu.

11.

YAYINLAMA

Çoğu doktor küçük bir böbrek taşı olgusunu yayın haline getirmeyi düşünmez.

Anonim, JAMA, 174:292, 1960

Hollywood gerilim filmlerinden farklı olarak, çoğu embriyolog nadiren gizli devlet kurumları veya esrarlı güçler adına çalışır. Tam tersine, çalışmalarımızın sonuçları sınıflandırılmaz. Eğer varsa yasal korumanın ardından yapmış olduğumuz keşifleri paylaşmak temel çıkarımızdan daha çok ahlaki bir görev ve iş sorumluluğudur. Bunları yaymanın yolları da ulusal veya tercihen uluslararası bilimsel toplantılarda sunmak veya hakemli dergilerde yayınlamaktır. Sanal veya görsel posterler –eğer hala varsa- son on yılda önemini kaybetti. Eğer kongre özeti şeklinde basılacaksa en önemli kısım özet bölümüdür. Büyük sükse yapan basın toplantıları son zamanlarda oldukça ünlendi. Ancak buralarda sağlam bir bilimsel altyapı ve bir haftada çıkan kusursuz bir yayın için yapılan şovlar ters etki yaparak araştırmancının değerinin kaybolmasına ve araştırmacının itibarının azalmasına neden olmaktadır.

Başarılı bir yayın için anahtar;

- Doğru mesajı bulabilmek (bilimsel markette yer alan ürününüz),
- Hedef topluluğa ulaştığından emin olmak (hastalar) ve
- İstenen etkiyi elde etmektir (birçok kişi sizin ürününüzü alır).

Yine finans dünyasından başka bir örnek verecek olursak; bir yayın çıkarmak borsaya girmek gibidir. Ürününüzün gerçek, doğru ve kanıtlanmış olup olmadığını anlamak için sıkı şekilde düzenlenmiş ön incelemeler gereklidir. Ürün aynı zamanda uygun bir şekilde düzenlenmiş ve paketlenmiş olmalıdır. Son olarak, bunun size ait olduğunu kanıtlamanız gerekir. Saygın borsaların sıkı kuralları olsa da araştırma yapmak için fazla zaman ve enerjileri yoktur.

Öte yandan –şimdi bilime dönelim- özgün, yenilikçi ve yeni bilgilerle ihtiyaçları karşılamaya çalışalım.

Makalenin hazırlanması

“Verba volant, scripta manent”²¹. Hakemli dergiler bilimsel çalışmaları sunmanın az çok dayanıklı, özgün ve saygın yollarıdır. Bunlar bilim insanlarını ve bilimsel gelişmeleri vurgulamak, değerlendirmek ve sıralamak için de en iyi seçeneklerdir. Yayınlanmayan sonuç pratikte yoktur. Makalenin kabul tarihi, yayın tarihi de önceliği hakkında bilgi vermektedir.

Ancak, bilim insanları arasında bir makale yazmak, göndermek ve inceleme sürecini yönetmek çok da eğlenceli bir öncelik değildir. Başlamayı, sürecin devamını ve detayları belirlemeyi ertelemek için her zaman bir bahaneleri bulunur. Sınırlı, kontrol edilebilir, az veya çok kompakt olan heyecan verici araştırmalarının aksine makale yazmak nedense sıkıcı bir eylemdir. Buna pasiflik demek daha doğru olur ve maalesef yapılacaklar listesinin en sonunda yer alır. Başarılmaktan çok iptal edilir.

Bu bölümü yazarken bile benzer sorunlarla biz de mücadele ediyoruz. O zaman sizlere geçtiğimiz on yıllar boyunca bu konuda bize yardımcı olan bir çözümü nerelim. Eğer bu kitap bittiyse, basıldıysa ve elinize geçtiyse bizim önerimizi takip etmeniz için güçlü bir kanıt oluşturmuştur.

Bazı antik yayınlara göre; Tanrı yedi günde evreni yarattığına göre sizin de bir araştırma makalesini yazmak için daha fazla zamana ihtiyacınız yoktur. Bu süreçte makale, evrimii sohbetler, TV dizileri ve Avustralya Açık Turnuvası gibi konuların üzerinde, öncelikler listenizin en üstünde olmalıdır. Zorlu ama mümkündür. İşin püf noktası, bu büyük görevi yönetilebilir küçük parçalara ayırmaktır. Üç saatlik yoğun bir çalışmadan sonra günün geri kalanında arka planda düşünün.

1.Gün. Bugün makalenizin kaderini belirleyecek iki önemli karar vermelisiniz. İki verilecek mesajdır. Umarım ki yeni, ilginç, heyecan verici hatta daha iyisi kışkırtıcı bir ifade belirlemeli ve bunu kanıtlamalısınız. İfadeniz çok güçlüyse iyi bir yayın için bir tanesi yeterlidir. İki ifade yazmak isteyebilirsiniz ancak daha fazlasını yazmayın. Üç farklı yayın yazman okuyucunun odak noktasını bölmekten daha iyidir. Bilim insanları, Çinli bir aşının aksine aynı zamanda üç farklı konuyu idare edemezler.

²¹ Söz uçar, yazı kalır. (evirmenden not: Yazar burada İngilizce evirisi için özür dilemektedir. Ancak, Latince olarak verilen bu cümlenin karşılığı dilimizde bir Atasözü olarak yer almaktadır).

Açıkçası vereceğiniz mesajın ham hali konu hakkındaki çalışmalarınızın ilk zamanlarından beri aklınızda; şimdiki göreviniz ise bir elması kesiciyle derinlerde yatan özü ortaya çıkarmak. Bunu da en fazla bir hatta iki cümleyle ifade edebilirsiniz.

Diğer önemli bir konu ise doğru dergiyi seçmektir. Siz zaten birkaç aday belirlediğinize göre kolay görülmektedir, ancak son kararın dikkatle yeniden gözden geçirilmesi gerekir. İnsanlarda yardımcı üreme yöntemlerinin laboratuvar kısmını kabul edecek olan maalesef ki sınırlı sayıda 10-15 adet, sınırdaki önemli konuları²² da eklersek biraz daha fazla uluslararası tanınmış dergi bulunmaktadır. Aşağıda değinilen konular göz önünde bulundurulmalıdır:

- Spesifik alan: kriyobiyoloji, laboratuvar tekniği, *in vitro* ve *in vivo* tekniklerin kombinasyonu vb.;
- Büyüklük: tam metin araştırma makalesi veya kısa/teknik yayın (bu formatta birkaç dergi yayın kabul etmektedir);
- Bazı durumlarda, coğrafi konum: örneğin ESHRE ve ASRM dergileri yayının yapıldığı bölgeyi görmek isterler;
- Format gereklilikleri ve koşulları: yönergelere uymamış makaleler yayınlanmış olsa da, sizin yayınızdaki en küçük hata reddedilmesine neden olabilir;
- Stil konusundaki subjektif tercihleriniz ve o dergide yayınlanan benzer makalelerin tercihleri.

En kritik noktalardan biri de *derginin seviyesi*, impakt faktörü (IF) ile belirlenen kalitesidir. Çalışmanızı ucuza satmayın. Makaleniz çok kısa bir sürede kabul edilmişse muhtemelen yayınınızın değerini küçümsemişsinizdir. Önce makalenizi yayınlanabilir kategorideki dergilerin iki ya da üç kategori üstündeki dergilere daha sonra da bir kategori altındaki (Şekil 22) dergilere göndermeniz en iyisi olacaktır. Tekrarlanan defalar reddedilmeler ve hatta hakem önerileri bile ulaşılabilecek en yüksek impakt faktörlü dergiyi bulmanıza yardımcı olacaktır.

²² Eğer inanılmaz bir keşif yaptıysanız Nature, Science, JAMA gibi en üstte yer alan dergileri hedeflemelisiniz fakat bu durumda bizim tavsiyemize ihtiyacınız olmayacak, sizinle birlikte ortak yazarlık yapmak isteyecek birçok gönüllü bulacaksınız.



Şekil 22. Makaleniz için doğru dergiyi bulmanın şematik süreci.

Makale kalitesine göre daha alt kategoride yer alan bir dergiye başvurduğunuzda çabuk kabul alabilirsiniz. Bu durumda makalenizin impakt faktörü de düşecektir. En üst seviyedeki bir dergiye başvurduğunuzda ise herhangi bir yorum olmadan reddedilebilirsiniz. İkinci defa başvurduğunuzda bu sefer hakemlerin yıkıcı ve moral bozucu yorumlarıyla reddedilirsiniz. Bazı noktalarda hakem eleştirilerinin makalenizi düzeltmede faydası olacaktır. Düzeltmeleri yaptıktan sonra makalenizi başka bir dergiye gönderin. Bu gönderimden sonra majör düzeltme önerilecektir. Her bir düzeltmeden sonra çalışmanızın değeri tekrar tekrar artacaktır. Sonunda makaleniz önemli bir impakt faktörlü dergide yayınlanabilir. Ancak işler şekilde görüldüğü kadar basit ve sorunsuz değildir. Oldukça travmatik ve sinir bozucu olan süreç bu bölümün ilerleyen kısımlarında tartışılacaktır.

Çok yüksek impakt faktörü olan bazı dergiler *başvuru öncesi sorgulamalarda* bulunur. Bu cömert teklif yazarları gereksiz formatlama işlerinden, gecikmelerden ve hayal kırıklıklarından korur. Ancak asıl amaç farklıdır: VIP'ler ve kurumların değerlendirme süreci devam ederken acımasız bir budama, potansiyel yazarlar arasında ayıklama yapılmaktadır. Eğer siz bu son bahsedilenlerden değilseniz davet edilme şansınız minimumdur (size Sayın VIP meslektaşım şeklinde bir yazı gelmeyecektir). VIP iseniz böyle bir şeye ihtiyacınız olmayacaktır. Özetle bu adımı atlayın, tam metinle başvurunuzu yapın, reddedilse bile kapsamlı inceleme şansınızı koruyun.

2.Gün. Bu gün gerçek yazım işinin başladığı gündür. “Yazarlar için talimatlar” bölümünü dikkatle okuyun. Göndereceğiniz dergide sizin önereceğiniz makaleye benzer bir makale bulun. *Başlık sayfasını*, hem talimatı hem de örnek aldığınız makaleyi kullanarak, istenen karakterde, boşluk vererek, isimleri istendiği gibi yazarak, eklemeleri ve sorumlu yazar bilgilerini de yazarak son (!) haline getirin. Açık isim, adres, kurum bilgileri gibi bazı bilgileri yazamazsanız burayı işaretleyin ve devam edin. 30 dakika içerisinde bitirirsiniz.

İki buçuk saatiniz kaldı. Özet için 150 dakika. Her kelime için²³ neredeyse bir dakika ve her satır için 10 dakika. Bu yeterli olmalıdır! Sadece devam edin. Yapılan bir özet, bir anket gibidir. Soruları talimatlara ve örnek makaleye göre yanıtlayın. Geleneksel özetler bir paragrafa sığan mini makalelerdir: kısa bir girişi takip eden soru (2-3 cümle, 4-6 satır) ve ardından metodun kısa bir özeti, en önemli bulguların bir listesi ve mantıklı bir sonucu içerir. Araştırma makaleniz için birinci günde oluşturduğunuz mesaja dayanarak bir sayfalık özet hazırlamak sorun oluşturmamalıdır.

Yazarların listesini kısaca ele alalım. Çalışmanıza *belirgin şekilde katkı yapan* tüm araştırmacıları davet etmelisiniz. Bu oldukça önemlidir. Son zamanlarda uygulanan ve övgüye değer bir eğilim listeyi kısa tutmaktır. Seçim yaparken ve diğer tüm durumlarda hoşgörölü ve diplomatik olun. Ortak yazarlar arasında herhangi bir anlaşmazlık varsa anlaşmalarını sağlayın. Tarafsız kalmaya çalışın. Eğer anlaşamazlarsa veya buna siz de dâhilseniz danışmanınıza başvurun. Herhangi bir anlaşmazlık durumunda jüri olmayın, bu sizin göreviniz değildir. Diğer yandan, danışmanınıza bu durumu çözmek ve yazar listesine dâhil olmasını haklı çıkaracak önemli bir rol²⁴ verebilirsiniz.

Anahtar kelimeler arama programları içindir. Bu programlar aynı zamanda başlıkları da tarar ve siz makalenizin konusunu özgün bir şekilde tanımlayan beş kelime bulamayabilirsiniz. Aynı konu için farklı bir kelime kullanmak (örneğin, “bovine” kelimesi yerine “cattle” yazabilirsiniz), bu çok da zeki olmayan bilgisayar programlarının çalışmanızın uygunluğunu belirlemesine yardımcı olabilir.

3.gün. Şu andan itibaren her gün, dikkatli bir şekilde tekrar okumalara başlayın, önceki günlerde neler yapıldığına dikkat edin ve devam etmeden önce gerekli düzeltmeleri yapın.

Giriş bölümü için bir koca gününüz var. Bize bunu yapamayacağınızı söylemeyin. Bir gün önce sorulduğunda arkadaşınıza (kesinlikle eşinize değil) ne söylediğinizi hatırlayın.

²³ Ortalama bir özet uzunluğu için.

²⁴ Belki de sadece bir kişi.

Arkadaşlarınızla birlikteyken içtiğiniz şarabın aynısından aldığınız bir kadeh, hafızanızı yenilemenize ve elinizdeki krampların geçmesine yardımcı olacaktır. Rahat, basit ve anlaşılır olun.

Referanslarla çok fazla uğraşmayın; ya isimlerini yazın ya da parantez içinde kısa notlar ekleyin. Kısaltmalar konusundaki edebi kuralı hatırlayın. İlk yazıldığında uzun haliyle yazdıktan sonra yanına kısaltmasını parantez içinde ekleyin. Bu aşamadan sonra sadece kısaltma halinde kullanabilirsiniz.

Çok uzun olmasın. Konu hakkında genel durumu anlatan bir paragraf, ele almak istediğiniz sorunu da içeren özel alanla ilgili bir paragraf ve sonunda bir veya iki cümleyle sorunuz ve yaklaşımınız hakkındaki son paragrafı yazın. Bazı yeni eğilimlerin aksine, bir gerilim filminde katili en baştan açıklamak gibi, biz de makalenizde sonuçlarınızı ilk sayfada vermenizi önermiyoruz.

4.gün. Bugün *Materyal ve Metot* bölümünü yazarken fazla heyecanlanmanıza gerek yok. Çalışmanıza bağlı olarak tek bir yöntem olacağı gibi, doğrusal olarak düzenlenmiş yöntemler zinciri veya ağ şeklinde planlanmış yöntemler olabilir. Her şekilde, takip edilen yollar daha önce başka yazarlar veya sizin tarafınızdan yayınlanmıştır. Bu evreler için çok fazla kelime harcamayın; bunları “daha önce tarafından tanımlandığı gibi (...)” veya “kısaca...” şeklinde kısaca açıklayın. Ancak her bir yeni adım, detaylı bir şekilde açıklanmalıdır. Bu bölümün amacı, herhangi birinin kullandığınız bu tekniği açıkladığınız şekilde²⁵ tekrar edebilmesini sağlamaktır.

Kullandığınız kimyasalların kaynağı ve cihazlar, katalog numarası, firma, şehir, ülke bilgileri gibi detaylı bir şekilde ve sadece bir defa belirtilmelidir. Aynı firmanın bir sonraki ürününe sıra geldiğinde katalog numarası ve firma ismini yazmak yeterli olacaktır. Hasta hakkında bilgi verecekseniz bir klinik uzmanını davet etmelisiniz. Doktor değilseniz, konu hakkındaki izin ve kabul yazıları ile ilgili bu hassas konu hakkında sorumluluk almamalısınız.

İki veya üç anlaşılmaz cümleden oluşan bir paragraf halinde verilen *İstatistik*, materyal ve metot bölümünün ayrılmaz bir parçasıdır.

²⁵ Endişelenmeyin. Elinizden gelenin en iyisini yapsanız bile, kişisel iletişim kurmadan tekniğinizi tekrar etmek isteyenlerin %99'u başarısız olacaktır.

5.gün. Sonuç bölümünü açıklamak için odaklanmak gerekir. Bu bölümü kısa tutmak en iyisidir. Çalışmanızın değerini kanıtlamak için uzun bir bölüm hazırlamanız embriyolojide hoş karşılanmaz.

Bahane üretmeden şu ana kadar yazdığınız her şeyi tekrar okuyun, derin bir nefes aldıktan sonra metot bölümünde belirttiğiniz sırayı takip ederek yazmaya başlayın. Sonuçlar sizin ellerinizde. Bu bölümde, yorum, açıklama ve tartışma yapmadan sadece sonuçlarınızı açıklayın. İhtiyacınız olan şey tarafsız ve objektif açıklamalar olmalıdır.

Sınırlı sayıda resim ve bunlara ait alt bilgi kullanın. Unutmayın ki okuyucuların neredeyse yarısı tabloları, grafikleri ve akış şemalarını okur ve bunların da çok azı karmaşık ayrıntıları anlamak için zaman/enerji harcar. En önemli işlemler ve bulgular için şekiller kullanın ve detayları yazının içerisinde verin. Buna karşın, kapsamlı bilgiler için tablolar kullanın ve metin içinde en önemli olanına atıfta bulunun. Ancak, bu aşamada el yapımı eskizler ve tablolar yeterli olabilir.

Bu bölüm sizin için olduğu kadar okuyucular için de zordur. Kısa ve net cümleler kullanın. Her şeyi olabildiğince basit yapmaya çalışın. Bitirdiğinizde, bu bölümü birkaç kez tekrar okuyun. Paragrafın yapısı okuyucuya çalışmaların çerçevesi hakkında net bir yol göstermelidir.

6.gün. *Tartışma* için. Bugün başarınızı büyük resmin içine yerleştirmek için bilim insanı niteliklerinize ihtiyaç duyulan gündür. Bunun için farklı birçok yol takip edebilseniz de sadece mümkün olanı seçmenizi öneririz. Biz başka bir giriş yazmayı tercih etmiyoruz. Asıl hedefinizi ya da amacınızı açıklayan kısa bir cümle ile başlayın, daha sonra elde ettiğiniz bulguları adım adım bilimsel literatürde yer alan diğer eserlerle karşılaştırın. Bu çalışmanın sorun hakkındaki bilgilerimizi daha geniş bir bağlamda nasıl değiştirebileceğini açıklamaya çalışın. Eski ve yeni hipotezleri doğrulayabilir ya da çürütebilirsiniz ancak ifadelerinizde dikkatli ve mütevazı olun. Son olarak 2-3 cümlelik kısa bir *Sonuç* paragrafı hazırlayın.

Her zaman olduğu gibi çok konuşmamaya çalışın. Yüzlerce yıl önce, makalenin uzunluğu yazarın alacağı ücreti belirlerdi. Bu nedenle de bilim insanları 40-60 sayfalık yayınlar hazırlarlardı. Şimdi ise, uzun makaleler²⁶ yayınlamak istiyorsanız ödeme yapmak zorunda olan sizsiniz. Desteklenmeyen hipotezlere yer vermeyin ve -kesinlikle gerekli olmadıkça- henüz yayınlanmamış verileri kullanmayın. Daha da önemlisi, başarılarınızı abartmayın, mütevazı ve tarafsız olun ve heyecan duymayı okuyuculara bırakın.

²⁶ Birçok dergi ücret karşılığında açık erişimli yayınları kabul etmekte ve bu yayınlar inceleme/hakem sürecinden daha rahat geçmektedir.

7.gün. Tanrılar için bile geleneksel dinlenme günü olmasına rağmen işinizi bitirmek isteyebilirsiniz. Bu durumda yazdıklarınızı tekrar okuyun, özellikle tartışma bölümü olmak üzere tüm bölümleri düzeltin, henüz son halini almasa da şekilleri daha düzgün bir hale getirin ve derginin gerekliliğine göre birkaç önemli referans eklemeye başlayın. Ortak yazarlara dağıtmak üzere hazır olduğundan emin olun.

Herkese aynı zamanda gönderin ve bir hafta gibi kısa bir zamanda incelemelerini isteyin. Deneyimlerimize göre bu şekilde göndermek bireysel teslimlerden daha iyi olmaktadır. Bu durumda onlar, birbirlerini ileri geri düzelteceklerdir. Tüm önerileri ilk versiyon üzerinden aldıysanız çalışmanızı tek aşamada düzeltip her konu için en iyi opsiyonları seçme şansına sahip olursunuz.

Ortak yazarlar verilen bir haftalık süreçte makaleyi okurken siz de tüm referansları ekler ve görselleri düzenleyebilirsiniz.

Herşey hazır olduğunda, metni son defa kontrol etmek üzere baskın ortak yazara (başlık sayfasındaki son kişi olması gerekmez) gönderebilirsiniz. Daha sonra geriye gecikmeden başvuruyu yapmak kalır.

Başvuru ve inceleme

Bu süreç tüm aşamaların en zorlu kısmı haline gelebilir. İlk olarak, hayatımızı ilginç ve zorlu bir hale getirmek için Yazarlara Talimatlar bölümü giderek daha karmaşık bir hale getiriliyor. Daha sonra da, çevirim içi gönderimde süreci tamamlayabilmek amacıyla²⁷ tekrarlanan sinir bozucu denemeler için yarım güne ihtiyaç duyuyorsunuz. Bu sistemler, çalışmanızın bilimsel değeri ile ilgisi olmayan engeller koymakta, özgür zihni “herkese uyan bir okul üniformasına” sokmakta ve gerçek bir yapay zekâsızlık kadar kullanışsız ve aptalca olabilmektedir. İstatistikler saplantılı bir hale getirilmiştir, ancak kaynak materyalin farklı seviyede oluşu ve özellikleri nedeniyle hesaplamalar pratikte her şeyi kanıtlayabilmektedir. Kaynak gösterme formatı pastanın üzerindeki kremadan yapılmış süs kadar değerlidir, ancak binlerce yıldır uzaklık, hacim ve sıcaklık birimleri açısından tek tip bir ölçekte anlaşılamayan bir dünyadan ne bekleyebilirsiniz ki?

²⁷ Bilgisayarlı dünyanın bilgisayarsız dünyadan çok daha iyi olmadığını kabul etmeliyiz. Bu durum ne daha hızlı ne de daha gerçekçi. Sadece dikkatimizi dağıtmak için pek çok fırsat sunduğu, orantısız bir şekilde çalıştığı ve gerçek yaşam aktivitelerimizden daha fazla zaman çaldığı için farklıdır.

O halde inceleme sürecinin kendisinden bahsetmeliyiz ki bu da olması gerekenden yani objektif bir kalite kontrolünden çok uzaktır. Asırlık yaklaşım ve yapı üzerinde muazzam bir şekilde artan bu görevi artık yerine getirememekte ve bu görev için katkıda bulunanlar ellerinden gelenin en iyisini yapma konusunda gerçekten motive olamamaktadır.

Söz konusu alanda sadece bir avuç gerçek uzman vardır ve bunların bazıları editörün makaleyi inceleme davetine bile yanıt vermezler. Hakemin çalışmasının karşılığının verilmediğini, ödüllendirilmediğini veya bu konuda ödeme yapılmadığını²⁸ unutmayın. Bu çalışmanın tek faydası en son gelişmelerden erken bilgi sahibi olmaktır ancak bu sadece teoride kalır, veriler yayınlanmadan önce²⁹ kullanılamaz veya paylaşılamaz. Bir defa hakemlik yapma kabul edildiğinde kısa bir zaman içinde bunun ardı arkası kesilmeyecek ve bu yüzden gelen makaleler için kapsamlı bir değerlendirme yapılamayacaktır. Ardından hakemler bu makalelere yüzeysel değerlendirmeler içeren kısa ve alaycı eleştiriler yapacaktır. Diğer hakemler ise bol zamanı olan ve itibarı zamanla azalan emekli profesörlerdir. Gelen daveti kendilerini göstermek için nadir bir fırsat olarak görüp, önemli olmayan detaylarla ve dil hatalarıyla uğraşırlar. Üçüncü grup ise tek amacı sizi durdurmak olan sizin rakibinizdir ancak dikkate alınması gereken bazı değerli eleştiriler yapabilirler.

Tarafsız ve doğru bir inceleme tavuk dişi kadar nadirdir ve gerçek amacı skandalları engellemek olan editör tarafından ciddiye alınmayabilir. Bunların genellikle bol miktarda iyi düzenlenmiş, derli toplu ancak hiçbir bilimsel değeri olmayan ve aynı zamanda ileride impaktı da az olacak birçok makaleden oluşan stokları vardır. Sadece cesur ve saygın ve benzersiz bir otoriteye sahip editörler gerçek cevherleri arayıp bazen hakemin görüşüne karşı gelerek değer buldukları makaleleri yayınlarlar. Bu saygın gruba dâhil olan az sayıdaki kişiler arasından iki kişiden örnek verecek olursak biri Sir Robert Edwards diğeri de Sir Ian Wilmut'tur.

Yanıt günler içinde gelebilir. Bu durumda, sonuç neredeyse her zaman negatiftir: *reddedildi*. Bu mektuplar genellikle kısa ve üzücü kısmı dışında değerli herhangi bir bilgi içermeyen bildirimlerdir. Bunlarla çok uğraşmayın ve hayal kırıklığına uğramayın. Bu bir bilim insanının hayatının bir parçasıdır. Karar ne olursa olsun her zaman aydınlık tarafa bakın. Mektubu okurken bir sonraki adımı (düzeltme, başvuru ve diğer başvuru) düşünün. Bu noktadan itibaren yalnız hareket edin. Haberi kimseyle paylaşmayın. İlerlemek için plan yapın. Şimdi PATRON

²⁸ Dergilerin son sayfalarında bildirilen yıllık hakem listesi hiçbir şey ifade etmemektedir.

²⁹ Eğer yayınınız çok değerli bilgiler içeriyorsa bunun hakem tarafından vicdansızca ve süratle kullanılacağından veya paylaşılacağından emin olabilirsiniz.

SİZ OLUN! Bir başka dergi bulun, formatını ona göre düzenleyin ve olabildiğince kısa sürede başvurunuzu yapın.

Eğer başvurunuzdan haftalar sonra ret cevabı alırsanız bu durumda hakemlerin önerilerini göz önünde bulundurmanız yararlı olacaktır. Önerileri dikkate alın ancak köklü değişikliklerden de kaçının. Düzenlemeleri yapıp, istenen formatta değişiklikleri yaptıktan sonra makalenizi bir hafta içinde yeni bir dergiye gönderin.

(Deneyimlerimize göre iyi makalelerin en az %70'i en az bir defa reddedilmekte ve düzeltilmiş makalelerin %90'ı sonunda yayınlanmaktadır).

Yeni değerlendirme sürecinde aldığınız *Major revision* yanıtı çok fazla işiniz olduğunu gösterir ama yine de eğer o dergiyle çalışmaya devam etmek istiyorsanız –ki bu size bağlıdır, kabul edilebilmesi için hala %70-80 şansınız olabilir. Çoğu insan bunu yapar. Bu durumda eleştirilerin %80'ine olumlu tepki vermeye çalışın ve önerilenle tam olarak aynı olmasa da makaledeki ilgili bölümü değiştirin. Tamamen kabul etmeyeceğiniz kalan %20'lik kısım için ise diplomatik ve hoşgörülü olun. Açık yüzleşmeden kaçınmaya çalışın, tarafsız kalın, kibirli eleştirilere siz de bu şekilde yanıt vermeyin. Editörler sizin esnekliğinizi ve hazır olduğunuzu ödüllendireceklerdir. Tüm değişiklikleri belirtirken ve bunlara ayrı ayrı yanıt verirken tepkilerinizde dikkatli olun.

Yeniden gönderim için bir süre (3-4 hafta) bekleyin aksi takdirde yüzeysel olmakla suçlanabilirsiniz.

Minör revision ise laboratuvarınızın soğuk odasına bir şişe kaliteli şampanya³⁰ çıkarmanızı ancak henüz açmamanızı ifade eder. Sürecin geri kalanında talimat ve önerilere ihtiyaç yoktur. Sadece içgüdülerinize göre hareket edin.

Özetle, bu paragrafların araştırma ve yayın konusundaki sorunlarınızı çözmede çok fazla yardımcı olmadığını biliyoruz. Yine de mücadelenizde yalnız olmadığınızı bilmek bir rahatlık sağlayabilir. Kuralları ve koşulları değiştirme şansımız yok ancak hayatta kalmanın yolları var. Size bol sabır ve ısrar diliyoruz. Buna çok ihtiyacınız var.

³⁰ Bir Taittinger sizi asla hayal kırıklığına uğratmaz (ticari çıkar bulunmamaktadır).

Sunum

Dersler hakkında gerçekten konuşmaya ihtiyacımız var mı? Genel görüşe göre bunlar sadece sözlü³¹ olarak sunulan makalelerdir.

Bu yaklaşım, bilimsel konferansların oturumlarını yarı boş sıralarla ve dikkati dağılmış izleyicilerle birlikte sıkıcı hale getiriyor. Diğer yandan bu durum, dersinize özel ilgi gösterilmesi nedeniyle size ve katılımcılara canlandırıcı bir fırsat sunmakta, ayrıca çalışma ve deneyimlerinizin tanınması için de bir olanak sağlamaktadır.

Bu alt bölüm, kitabın organik bir parçası olmayabilir. Özellikle embriyoloji çalışmalarıyla ilgilenmiyor veya şu anda yaptığınız çalışmalardan memnunsanız bu bölümü atlayabilirsiniz. Görevi zor bulan veya kendini geliştirmek isteyenler için aşağıda sunulanlar onlara yardımcı olacaktır.

İlk önce makaleler ve derslerin çoğu yönden tıpkı romanlar ve dizilerde olduğu gibi birbirinden belirgin şekilde farklı olduğuna açıklık getirmemiz gerekiyor.

Tablo 1’de önem verdiğimiz konuları özetledik³².

	Makale (Roman)	Ders (Drama)
Temas	Dolaylı, kişisel olmayan	Doğrudan, kişisel
Medya	Yazılı	Multimedya (görüntü, ses çok önemli)
Bilgi Akışı	Tek yönlü	Çift yönlü (sözlü + sözsüz)
Görüş	Tipik olarak tarafsız	Önyargılı, ikna edici
Ortam	Doğal	Duygusal, biraz yüzeysel
Çerçeveler	Tanımlı	Esnek
Etkinlik	Alakasız	Eşsiz

Tablo 1. Makale ve ders arasındaki farklar.

Bilimsel bir dersin yazarının, tasarımcısının, yönetmeninin ve başrol oyuncusunun aynı kişi olduğu tek kişilik bir şov olduğunu da eklemememiz gerekiyor. Buradaki tek yardımcınız iyi seçilmiş bir sunum programıdır³³.

³¹ Alternatif kelime bazı uygunsuz kuruluşlarca kullanıldığı için bizim favori kelimemiz değildir.

³² Birçok istisna bulunduğunu biliyoruz. Burada tipik özelliklerden bahsedilmiştir.

³³ PPT hiç de bariz bir seçim değildir, bazıları PREZI’yi tercih etmektedir.

Çalışma slayt gösterisini *tasarlamakla* başlar. Bir mesaj tanımlayın ve ardından onu önerilen duruma ve beklenen kitleye göre ayarlayın. Her zaman olduğu gibi, yapılması gereken ve yapmamanız gerekenleri öneriyoruz.

Yapın;

- Konulara ve mesajlara göre alt bölümler yapın,
- Takip edilmesi kolay bir yapı oluşturun,
- Slaytınızı ilk bakışta kolayca görülebilecek şekilde hazırlayın,
- Sunumunuz açık ve mantıklı olmalıdır.

Unutmayın ki dinleyiciler bir önceki sayfaya geri dönemez!

Yapmayın;

- Kaybolmayın, izleyici sizin sunun süresince nerede olduğunuzu bilsin,
- Çok gerek olmadıkça detaylara girmeyin,
- İzleyiciyi abartmayın veya küçümsemeyin,
- Verilen zamanı aşmayın (basitçe; her slayt için bir dakika)
- “sizin için ayrılan zamanın kısa olması nedeniyle” şikâyet etmeyin, özür dileyin. Bu sizin sorunuzdur. Çözün.

Slaytlarınızı basitleştirin; kompakt ve şeffaf olsun. Her slaytın tasarımı, arka planı, karakteri ve görselleri benzer özellikte olmalıdır. Arkalarda oturan izleyicileri düşünerek küçük karakter kullanmayın. Aşırı kalabalık görsellerden kaçının. Google’ı düşünün. Başarılarının arkasında son derece basit ve anlaşılır düzenlemeler yatmaktadır.

Diğer yandan slaytlarınızı ilginç hale getirin. Statik prezentasyonları unutun, animasyonlar kullanın. 21.yüzyıldayız. Dikkatinizi gerçekten ilgilendiğiniz cümlelere ve konulara odaklayın. Heyecan verici ve alışılmadık bir şeyler eklemeye çalışın, ancak mütevazı ve dikkatli olun, sağlıklı bir denge kurun.

Hazırlık aşaması slaytlar bittiğinde son bulmaz (bu çok önemlidir ancak çoğu zaman göz ardı edilen bir gerçektir). Çoğu deneyimli konuşmacı yeni sunumu için ilave eğitimler alırlar. Aktörlere gelince, öğrenme ve prova yapmak için birçok yol vardır. Burada sadece bir yaklaşımdan bahsedeceğiz.

Slaytları hazırlamayı -8.günde yani toplantı ve yolculuğunuzdan 8 gün önce tamamlayın. Bir zamanlayıcı ve dizüstü bilgisayarınızla birlikte boş bir odaya geçin (evde?), hayali dinleyiciyle

yüksek sesle konuşmaya başlayın. En zoru ilk beş dakikalık sürecidir. Akıcı hale gelene kadar tekrar tekrar başa dönün ve sonuna kadar devam edin. En iyi ifadenizi bulmaya çalışın ve bunu unutmayın. Uzun cümleler kurmayın, her şeyi duyulabilir ve açık halde sunmaya çalışın. Akıcı bir sunum için gerekirse slaytlarda değişiklikler yapın (genellikle çoğunda gereklidir).

Bunu her gün en az 1 saat yapın. -6.gün hata yapsanız bile sadece kendinizi düzelterek durmadan sonuna kadar devam etmeye çalışın.

-4.günden itibaren ekrana bakmadan, “birine” (oyuncak, resim) bakarak konuşmaya çalışın. Oturmayın, ayakta durun. Sözlerinizi desteklemek için abartmadan ellerinizi kullanın. İşaretleyici kullanırken mütevazı olun, zaten hazırladığınız animasyonlar onun rolünü üstlenecektir. İşaretleyiciyi kısa süreliğine ve amacına uygun olarak kullanın. Sonsuza kadar sunumunuzun üzerinde duracak olan kırmızı nokta tüm performansınızı mahvedebilir.

Bu noktadan itibaren retorik hileler kullanın. Asıl amaç dinleyicinin uyumasını önlemektir. *Amacınızın bilgi aktarmak değil, dinleyiciyi ikna etmek olduğunu* unutmayın. Sunumunuzu bir görev olarak değil, bir zevk, güzel bir an ve fırsat olarak görün. Olumlu, tutkulu, hevesli ve biraz da benzersiz olun. Tüm vücudunuzla dinleyiciye doğru dönün. Onları motive edin, kışkırtın ve gülümsetin³⁴.

Unutulmaması gereken en önemli nokta *dinleyicilerin sizin gergin olduğunuzu anlamasına asla izin vermeyin*. İzleyici gergin konuşmacıyı sevmez. Videonun çalışmaması vb. gibi teknik sorunlar olduğunda sakin olun, tutumunuzu değiştirmeden bekleyin. Bu sizin sorunuz değildir. Moderatörünüzün önerilerini takip edin. (Burada sahne davranışınız üzerinde konuşuyoruz. Sahne arkasında sizin için ayrılan yerde buna hazırlanmanız gerekir.)

-2.günde, küçük bir gruba, çalışma arkadaşlarınıza canlı bir pratik için konuşabilirsiniz. Bunu yapmak özellikle “hayatta bir defa” alınacak bir davet için önemlidir. Başarılı olursanız birçok kişi tarafından takip edileceksiniz. Bu pratiği bilgisayar karşısında yapmayın; projektör, ekran, koltuklar ve konuşmacı ekranı gibi ihtiyacınız olan her şeyi gerçek bir konferansta olduğu gibi hazırlayın. Soruları dinleyin, bunların yanıtları için alıştırma yapın ve tüm önerileri ciddiye alın.

Şimdi *konferanstayız*. Özellikle sunumunuzdan önce bunun turistik bir gezi olmadığını unutmayın. Kaydınızı yaptırdıktan sonra oturumunuzla ilgili tüm bilgileri ve sizin konunuzla

³⁴ İlk sesli gülme başarınızın işaretidir. Ancak bunu bazı ülkelerde başarmak oldukça zordur.

ilgili olan tüm özetleri okuyun. Eğer gerekirse sunumunuzda veya konuşmanızda son dakika ayarlamaları yapın.

Oturumunuzdan hemen önce, sunumunuzu gerçekleştireceğiniz alanı ziyaret edin. Bilgisayarlar, ekranlar, mikrofonlar ve işaretleyiciler gibi her şeyi kontrol edin. Benzer oturumları izleyin, yerel düzenlemelere, kıyafet seçimlerine, soru ve yanıtlara dikkat edin. Sunum dosyalarınızın güvenli bir şekilde sisteme yüklenmesi için ilgili teknik personelle görüşün. Herhangi bir endişeniz varsa tüm dosyayı onların sistemlerinde görmek isteyin.

Oturumunuzdan 15 dakika önce sunum alanında olun. Bu, son dakika gelişmeleri ya da sorunları öğrenmeniz için gerekli olabilir. Potansiyel bir kibarlık göstergesi olarak kendinizi oturum başkanınıza tanıtın.

Son olarak, *kürsüye çıktığınızda* rahatlayın. Her şeyi önerildiği şekilde yaptıysanız sizin için harika bir zaman olacaktır. Gülümseyin ve kendiniz olun.

Sunumdan sonra, soruları dikkatle dinleyin ve maksimum 1 dakikada ve yaklaşık beş cümleyle yeterli ve kısa yanıtlar verin. Bir başka sunuma doğru gitmeyin. Diplomatik, kibar ve aynı zamanda da gerekirse sert olun. Çok önemli bir tavsiye: Yanıtınıza asla “*Bu iyi bir soru...*” gibi aptalca bir cümleyle başlamayın. Gerek yok, hatta rencide edici bile olabilir. Meslektaşlarınız neden kötü sorsunlar ki? Bu şekildeki yaklaşımlar genellikle yanıt bilmediğiniz anlamına gelir.

Sunumunuzla oluşturduğunuz profesyonel imajı yok etmemek için, rahatlama, yorgunluk, mutluluk veya hayal kırıklığı belirtileri göstermeden kürsüyü doğal ve organize bir şekilde terk edin. Son uyarı: mikrofon ve işaretleyiciyi alıp götürmeyin.

Oturumdan sonra, size ulaşan herkesle nazikçe konuşun. İletişim bilgilerini sorun; devam edecek olan görüşmeler şaşırtıcı sonuçlar doğurabilir. Diğer yandan, kışkırtıcı hiçbir soruya yanıt vermeyin. *Oyun bitti!*

12.

DÜZELTME VE ÖNLEME

*Dünyada yaklaşık dört milyon farklı türde hayvan ve bitki bulunmaktadır.
Hayatta kalmaları için de dört milyon farklı çözüm bulunmaktadır.*

David Attenborough

Problemlerin çözümü için “deneme-yanılma” yaklaşımını zaten önermiştik, şimdi ise en büyük öğretmenlerimizden ve idollerimizden biri, takip edilecek bir örnek olarak evrimi işaret ediyor. Tek sorun şu ki laboratuvardaki sorunu çözmemiz için 3,5 milyon yılımız yok. Yine de sabırlı, ısrarcı ve dikkatli olmamız gerekiyor. Oldukça karmaşık bir biyolojik sistemle çalışıyoruz ve dünyadaki en önemli şeyden sorumluyuz. Bu fiyaskoyu göze alamaz ve riske atamayız.

Sabır, ısrar ve dikkat. Bu kelimeler 10.Bölümde üstünde durduğumuz Şövalye ruhuyla belirgin bir şekilde çalışmaktadır. Evet katılıyoruz. Bu durumun tamamen farkındayız. İçinde bulunduğumuz durum için uygun davranışı belirlemek bizim hayatımızın bir parçası. Neyse ki, günümüz embriyologları işlerine asla sıfır bir geçmiş ve destekle başlamıyorlar. Rutin çalışmalarımızda izlenecek yol bellidir. Ancak, zorlu mücadeleler iki özel durumda ortaya çıkar: eski yöntemler çalışmadığında veya yeni bir yöntem devreye girdiğinde.

Problem süreci

Bu, tüm embriyologlar için bir kâbustur. Çalışan bir teknik veya çalışma aşaması çöktüğünde, beklenmeyen sonuçlar ortaya çıkar ve ne yaparsanız yapın bu şekilde kalır. Bu süreçler beklenenden daha fazla karşımıza çıkar. Ciddiye alınmış ve iyi çalışan bir kalite kontrol mekanizması bunların çoğunu önleyebilir ancak tümünü ortadan kaldıramaz.

Çoğu laboratuvar da kalite kontrol kuralları yetkililer tarafından imzalanmış kullanım kılavuzlarında belirtilmiştir. Embriyolojideki el kitaplarında detaylı talimat ve öneriler bulunmaktadır. Ekleme istediğimiz tek nokta, bu protokollerin ve idari görevlerin temel amacının yasal sorumluluklardan kaçmak için değil, embriyo üretimini verimli ve sorunsuz bir şekilde sürdürmemize yardımcı olması için gerektiğidir.

Bunu yapma özgürlüğüne sahip olduğunuz yerde herhangi bir *hata yapmayı engelleyecek yeni bir durumu geliştirmeye çalışın*. Her şeyi mantık çerçevesinde, basit ve kolay bir şekilde yapın; gereksiz şeylerden kaçının. Çalışma alanlarını, tezgâhları, çekmeceleri rafları, depolama alanını titiz bir düzen içinde koruyun, kimyasalların kaydı ve uygun bir şekilde saklanması için son derece dikkatli olun, tüm bakım tarihleri ve zamanı gelen işleri kayıt altına alın. Ayrıca, dikkate değer eski bir kuraldan bahsedelim; *bir cihazın kontrolünü bu cihaza bırakmamak daha iyidir* – mümkünse bağımsız cihazlar kullanın. Ancak, kontrol prosedürlerinin normal iş akışınızı ve oosit ve embriyolar için oluşturduğunuz en uygun ortamı engellemesine izin vermeyin.

Çözümlerinizi güvenli ancak keşfedilmemiş bir şekilde kontrol etmenin bir yolu da kutu tipinde orta boy -80-86°C'lik dondurucu almaktır. Saygıdeğer meslektaşımız Daniela Branda 'nın Danimarka'da yaptığı çalışmalara ve dünya çapında birçok laboratuvarın da birçok defa doğruladığı gibi, kullanıma hazır IVF medyumlarından, en basit PBS'ten en karmaşık albumin veya serum ilaveli TCM-199'a, hormon veya diğer katkı maddelerine kadar tüm bu kimyasallar yukarıda bahsedilen sıcaklıklarda süresiz olarak saklanabilmektedir. Tek yapmanız gereken, çalıştığı kanıtlanmış tüm medyumlarınızı alikotlar halinde küçük miktarlarda dondurmanız ve ihtiyaç duyduğunuzda kontrol olarak çalışmanızdır. Bu yaklaşımdan bahseden makale önde gelen dergiler tarafından defalarca reddedildiği için, dondurduğunuz medyumları günlük çalışmalarda kullanmanızı öneremeyiz fakat düşük kaliteli bir sevkiyat veya bileşimden kaynaklanan herhangi bir sorunun nedenini ve yerini belirlemek ve ortadan aldırma için bu kontroller son derece önemli bir yere sahip olabilirler. Söz konusu yeni medyumunuz, dondurulmuş kontrole karşılaştırıldığında daha düşük embriyo gelişimi sağlıyorsa sorun medyumdadır.

Bölüm 10'da bahsedildiği gibi; erişilebilir, iyi tasarlanmış ve güvenilir hayvan modeli çok değerli olabilir. Ancak farklı konular için farklı hayvan türlerinin seçilmesi gerekir. Embriyo kültürü için sığır muhtemelen en güzel modeldir. İnsanlarda kullanılan çoğu başarılı medyum sığırlardaki analoglarına benzemektedir. Öte yandan, popüler murin modeli ise önemli hataların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Murin embriyoları insan ya da sığır embriyolarına göre daha toleranslıdır. İnsanlar için iyi olan ne ise fareler için de iyidir ancak fareler için iyi olan insanlar için iyi olmayabilir.

Benzer biçimde, bu durum embriyo kültürü için de geçerlidir. Vitrifikasyonda ise durum daha karmaşıktır.

Son pratik öneri olarak- *sessiz katillere dikkat ediniz*. Deneyimlerimize göre en önemli iki şüpheli, yağ ve DMSO'dur. Kültürünüzde düzensiz şekil bozukluklarını izleyen dejenerasyonlar ve ölüm görürseniz, yeni bir seriye veya başka bir firmaya ait yağ kullanmaya başlayın. İnsan laboratuvarlarında muhtemelen DMSO sayesinde son kullanım tarihine kadar kaliteyi sabit tutan kullanıma hazır vitrifikasyon solüsyonu kullanıyorsunuz. Ancak, kendi medyumunuzu hazırlamak istiyorsanız yavaş bozulmayı ve oksijenle temas nedeniyle formaldehit oluşumunu engellemek için mutlaka o anda açılmış DMSO ampulleri kullanın.

En yüksek uyarı ve dikkate rağmen sorunlar meydana gelebilir. Bir noktada, bizim sığır embriyosu üretim sistemimiz “iş atımız” olan Hereaus marka karbondioksitli inkübatörümüzdeki (*in vitro maturasyon* ve medyum ekilibrasyonu için kullanılıyordu) fan arızası nedeniyle çöktü. Her şeyi değiştirmemize rağmen sorunun ne olduğunu haftalar sonra kapak açıldığında ortaya çıkan kokudan belirledik.

Doğru kayıt tutmak, kimyasalları kontrol etmek cihazları düzenli bakıma almak arıza sayısını en aza indirmeye yardımcı olur. Mantıklı bir sorun giderme yaklaşımı ile sorunları belirleme/ortadan kaldırma süreci kısalm. Laboratuvarlarda sorun yaşadığınız süreçte evinizde kaderinizi değiştirebilecek hatalar yapmaktan kaçının.

Teknoloji transferi

Buluşla karşılaştırıldığında, başkaları tarafından oturtulmuş tekniklerin kazanılması daha kolay görülebilir. Ne yazık ki öyle değildir. Aksine, günümüz klinik embriyolojisinde farklı laboratuvarlar arasında kabul edilemez farklılıklara neden olan ve laboratuvarların genel verimliliğini tehlikeye atan teknoloji transferinin yetersizliği oldukça önemli bir konudur. Alıcı ve vericilerin olduğu her iki taraf da etkilenir. Ancak asıl sorun sürecin kendisindedir.

Görünüşte basit ve oldukça ilkel bir yöntem olan vitrifikasyonu ele alalım. Herkes birkaç saatte, en fazla gün içerisinde bunu öğrenip uygulayabilir. O zaman dünya çapında yerleşik bir teknoloji yerine neden orijinalinden ciddi bir şekilde ödün veren düzinelerce yeni sürümler görüyoruz? Kabul edilebilir bir etkinliğe ulaşmak için neden aylarca süreye ihtiyaç var? Ve neden laboratuvarlar arasında yıllar süren sürekli uygulamalardan sonra bile belirgin farklılıklar var?

İlk olarak, vitrifikasyon görüldüğü kadar basit değildir. Tıpkı manuel vitesli bir araba kullanmak gibi, öğrenmek için dikkat edilmesi gereken birçok sorun, tuzak, hile bulunmakta ve bunların üstesinden gelmek için çok fazla pratik yapmak gerekmektedir.

İkincisi, lisanslı sürücü okullarımız ve katı şartları olan resmi sınavlarımız yok. Farklı şekilde araba kullanan ve uygunsuz hareketleri para cezasıyla cezalandıran, diskalifiye eden veya hapis cezası veren bir polisimiz yok. Araba kullanmak tehlikeli ve insan hayatı risk altındadır diyebilirsiniz. Peki ya vitrifikasyon?

Her IVF laboratuvarına silahlı polis memurları göndermek istemiyoruz, fakat deneyimlerimize göre alıcı laboratuvarların hazırlıkları yeterli seviyeden daha düşüktür. Bunların sabır, devamlılık ve özen de dâhil olmak üzere tutumlarıyla ilgili ciddi sorunları bulunmaktadır.

Prosedürün başışçıları farklı bir sorun anlamına geliyor- IVF'in ticarileşmesiyle birlikte aradaki fark kapandığı için potansiyel rakiplere yardım etmek, kliniğin çıkarlarına ve politikalarına aykırı olabilir. Böyle bir kısıtlama olmasa bile, bunların katı programları ve sınırlı altyapıya sahip olmaları konuyu diğerlerine öğretmeyi sınırlamaktadır.

Günümüzde teknoloji transferi aşağıdakilerle sınırlıdır;

- Çok ender örnekleri olsa da, konu hakkında çok yüzeysel eğitim almış ve size fazla zaman ayıramayacak olan distribütörler,
- Herkesin kahve, yiyecek ve promosyonlara odaklandığı toplantılar,
- Asıl amacı konuya ilgi çekmek olan ancak öğretici olmayan konferans sunumları,
- Çoğunlukla sosyal etkinliklerle süslenmiş kısa ve çok kalabalık atölye çalışmaları,
- Önemli detaylara odaklanmayı engelleyen çok kısa veya çok uzun kılavuzlar,
- Hiçbir geri bildirim şansınızın olmadığı Youtube videoları çok yüzeysel ve düzdür.

Teknolojinin en üst seviyede kullanıldığı bir laboratuvarı birkaç haftalığına ziyaret etmek yukarıda belirtilen koşullar nedeniyle birkaç şanslı insanın sahip olabileceği nadir bir ayrıcalıktır. Profesyonel danışmanların az ya da çok fayda sağlamaktadır ancak bunun için ilgili bölümde en az bir haftaya ve ilerleyen dönemlerde çevrimiçi eğitimlere ihtiyaç vardır. Çoğu klinik bu zaman ve masrafı karşılayamaz. Diğer yandan teknoloji transferinin en yaygın yolu, konu hakkında orta derecede bilgisi olan kişiler arasında yapılan zincir eğitimidir. Burada teknik her adımda biraz daha aşındığı için sınırlı bir değere sahiptir.

Durumu basitleştirirsek: medyum, petri, yağ, pipet vb. gibi ürünleri firmalar sağlar ve sonrasında embriyologlar onlarla istediklerini yaparlar. Biraz abartılı olabilir ama beş kıtada edindiğimiz tecrübeye göre gerçek bundan çok da uzak değildir.

Bir seçenek

Çoğu kıdemli embriyolog, işletim sisteminden, marka ve modelden bağımsız olarak mobil telefonların (cep telefonu) yüksek oranda embriyotoksik olduğu konusunda hemfikirdir. Bazı klinikler, bunların kullanımını hatta fiziksel olarak bulundurulmasını yasaklamıştır. Bu konuda daha fazla hemfikir olamayız. Ancak size özel bir muafiyet önerelim.

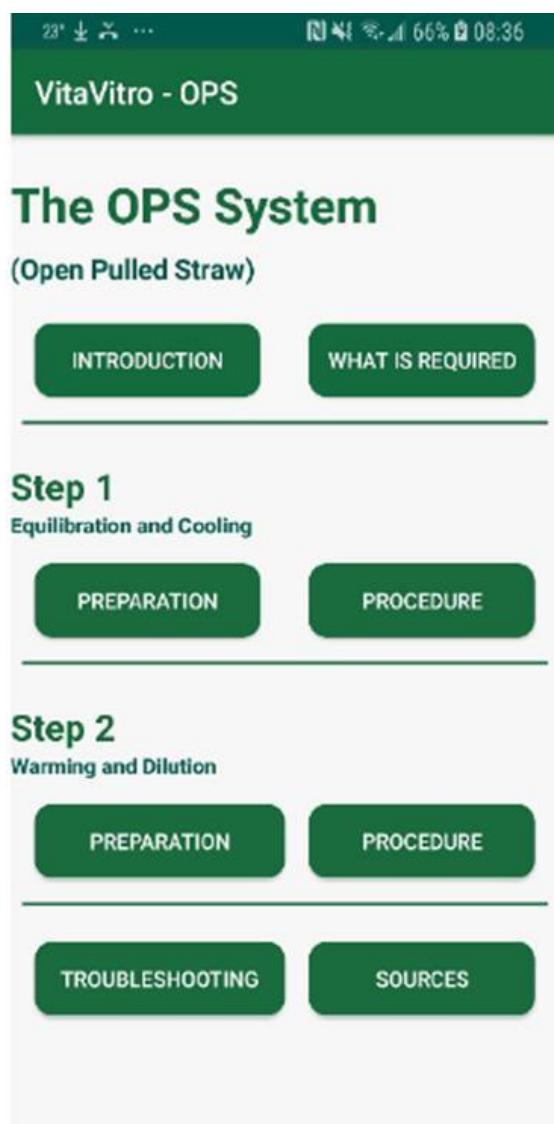
Bir konuda uzman veya danışman olan kişiler tüm laboratuvarları ziyaret edemez ve orada siz yeni metodu öğrenmeye çalışırken haftalarca eğitmenlik veya koçluk yapamazlar. Ancak bu durum için size masrafsız ve uzmanların fiziksel varlığını gerektirmeyecek kestirme bir yol önerebiliriz.

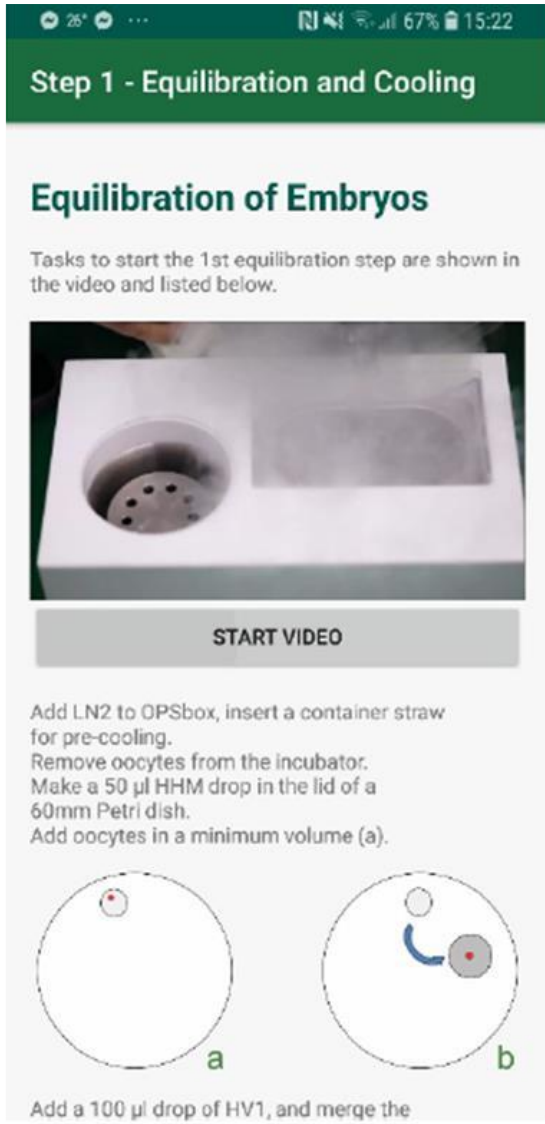
Bölüm 8’de açıklandığı gibi, OPS vitrifikasyonu gerçekleştirmek için bir zamanlayıcı tarafından düzenlenen akış çizelgesine göre, gereken her şeyi size söyleyen mobil bir uygulama geliştirdik. Uygulama metin, çizim, resim ve videolar kullanarak zamanında size bol miktarda bilgi sağlar. Ekilibrasyon ve çözdürme gibi çalışmanın bekleme süreçlerinde yöntemin bilimsel arka planı hakkında ilgili açıklamaları sağlar.

Buna göre yapmanız gereken tek şey mikroskobun başına geçmek ve koçunuzun verdiği talimatlara göre çalışmaktır. Burada koçunuz mobil bir uygulamadır. Bu uygulama bir kitapçık, video veya rehber değildir. Uygulama size;

- Tüm vitrifikasyon-çözdürme sürecinde *adım adım ve anlık talimatlar* verir,
- En uygun yolu seçmek için *kişiselleştirilmiş ve interaktif bilgi* sunar.
- *Konuya ilişkin daha geniş bilgi*, görüş ve önerilere ulaşma olanağı sağlar,
- *Ürünü yapan ve üretenlerle doğrudan temas* sağlar.

Bu uygulamanın son çare olduğunu kesinlikle söyleyemeyiz ancak bir adım önde olmasını umuyoruz. Sizlerden gelecek öneri ve görüşlerinizi bekliyoruz. Bu sayede, teknoloji transferiyle daha etkili sistemler ve gelişmiş laboratuvar çalışmaları için daha iyi yaklaşımlar bulabiliriz.





Şekil 23. Sırasıyla Android ve iOS için QR kodlarının olduğu OPSapp uygulamasından görüntüler.

13.

GÖREVİMİZ

Yüksek teknoloji mi? Unut gitsin. IVF düşük bir teknolojidir.
Rodney Wade

Sanıldığı kadar iyi mi?

2018 yılında Louise Brown'ın doğum gününü ve bilimimizin konusu olan insanlarda yardımcı üremeyi kutladık. Kısa bir süre önce bu nedenle konusunda önde gelen dergilerde özel makaleler yayınlandı. Fertility and Sterility dergisi, kendi özel alanlarını inceleyerek “en önemli ilerleme”, “önemli ölçüde gelişme sağladı”, “en kapsamlı gelişme”, “muazzam derecede” ve “temelde” vb. gibi cümleler kullanarak 140 sayfalık bir yazı yazan 66 bilim insanını davet etti (Niederberger et al., 2018). Burada yer alan tüm yazılar parlak geleceğin altını çizirken geçmişte yapılan uygulamalar konusunda iyimser ve mutluydu.

Çizilen bu resim halk arasında iyi satıyordu. Memeli embriyolojisi, meslekten olmayanlar tarafından genellikle son derece karmaşık araçlara, mükemmel şekilde standartlaştırılmış yöntemlere ve yenilikçi becerilerle birlikte büyük bilgi birikimine sahip üst düzey profesyonellerin yaptığı bilimin en uç noktası olarak kabul edilir. Elde edilen başarılar, muhteşem olarak tanımlanmakta ve bilgi teknolojileri, uzay araştırmaları veya teorik fizik alanındaki tüm disiplinlerin başarılarıyla eşit veya daha üst seviyede değerlendirilmektedir. Bu konuda dünya dışından bir eleştiri alırsak bu bizi çok hızlı ilerlemeler yaşandığı için, çok iddialı hedefler belirlendiği için ve tehlikeli başarılar elde edildiği için suçluyor olacaktır. Gelişimdeki gecikmeler, düşük yaratıcılık, zamanı geçen metotlar ve primitif yaklaşımlar hiçbir zaman tartışılmamakta ve bilim alanımızın problemleri çözme konusundaki düşük etkisinden kimse bahsetmemektedir.

Önemli Amerikan dergilerindeki yayınları sorgulamak gibi bir niyetim yok. Sadece alıntı yapılan 643 referansın bir tanesini kaçırdık. O da Gleicher'in bir önceki yıl aynı dergide yayınlanan makalesiydi. Bahsettiği konular iki yıl sonra açık erişimli bir makalede daha

açıklanmıştır (Gleicher et al., 2019). Bu konu ABD’de 1995-2016 yılları arasında taze ve otolog IVF sikluslarının durumunu yansıtıyordu. Makale, bu sürecin erken dönemlerde çok belirgin bir yükselişi, daha sonra bir süre en yüksek seviyede seyredişini ve 2013’ten sonra keskin bir şekilde azaldığını vurguluyordu.

İngiltere’de bir başka sorundan bahsedelim. Ocak 2020’de popüler bir gazete olan Daily Mail, İngiltere’de bireysel IVF kliniklerinin en kötü ve en iyi başarı oranlarını yayınladı. Canlı doğum/başlayan siklus oranı arasındaki fark 3,6 kat farklıydı (sırasıyla %12 ve %43). Bu iki klinik arasındaki mesafe arabayla 50 dakika sürmektedir. İnsan Fertilizasyon ve Embriyoloji otoritelerinin istatistiklerine göre, bu sonuçların hiç birinin geri kalanlardan farklı olmadığı ve incelenen diğer 77 kliniğin verimlilik eğrilerinin eşit dağıldığı belirtilmiştir.

Verilen bu örnekler gerçekten “son aşamada” ya da en azından mümkün olduğunca iyi olduğumuz konusunda bazı şüpheler oluşturmaktadır.

Görünen o ki ART, infertilite ve bununla ilgili durumları tamamen çözemeyecektir. Herkesin ihtiyacı olduğu bu karmaşık teknolojileri olumsuz yönde etkileyen ciddi birçok eksternal faktör bulunmaktadır (Ombelet, 2014)(Parikh, 2013). Yardımcı üreme teknikleri sonucu meydana gelen doğumların yıllık oranları giderek azalmaktadır. Bazı gelişmiş (!) ülkelerde, sayılar durgunlaşmıştır. Mevcut kapasite ve etkinlikte sadece 20 infertil çiftten birine yardım edebildiğimiz farkında mısınız? Ayrıca, yıllık %10’luk bir artışla bile (ki bu mevcut gerçeklerin çok üzerindedir) ihtiyacı olanların %30’una yardım edebilmek 20 yıl sürmektedir.

Asıl soruya verilecek samimi yanıt şudur, etkileyici gelişmeler olmasına rağmen insan ART’si amacına ulaşamadı ve mevcut eğilimle bu durum öngörülebilir gelecekte bir sonraki nesil için değişmeyecektir.

Laboratuvar embriyolojisi

Bu problemlere ilişkin sorumluluklarımızı reddetmiyoruz.

İyimserler, ART için parlak bir geleceği garanti eden belirgin bir ilerleme, parlak yeni fikirler, laboratuvarlarının etkinliğini artıracak yeni teknolojiler beklerler. Ancak bu şekildeki bir bakış, memeli embriyolojisindeki çığır açan yeniliklerin 1990’lı yılların başında sona ermesi nedeniyle artık desteklenmemektedir. Geride kalan 20 yıl boyunca, ince ayarlar yapan uygulamalar yaptık, parametreleri düzenleyerek ve cihazları iyileştirerek geçmişteki kaynakları

başarılı bir şekilde kullandık ancak, IVF, SUZI, ICSI, embriyo biyopsisi, Assisted hatching, vitrifikasyon ve hatta time-lapse uygulamalarına bile herhangi bir yenilikçi yaklaşım getirilmedi.

Seksenli yılların sonlarında dünya standartlarında bir moleküler genetik laboratuvarında birkaç santrifüj, su banyoları, yatay ve dikey jel elektroforez kutuları, PCR cihazı ve UV görüntüleyicileri bulunuyordu. Hatta Southern blot'lar bile tuvaletten alınan kâğıt havlularla yapılıyordu. Bu laboratuvardaki bir araştırmacıyı 25 yıl komada kaldıktan sonra, modern genomik analizlerin yapıldığı tesisin içinde, hermetik özellikli tam otomatik cihazların ve gizemli bir şekilde yanıp sönen bilgisayar ekranlarının arasında çaresizce dolaşırken hayal edin.

Şimdi de aynı durumu bir embriyolog için düşünün. Sizce ne bulacaklardır? İnkübatörler, laminar akış kabinleri, stereo mikroskoplar ve mikromanipülatörler. Kullanıma hazır mikro pipetler, içeriği kısmen bilinen veya bilinmeyen kültür medyumları ve sakıncaları nedeniyle yasaklanan ağız pipeti kullanımı dışında küçük eklentilerle birlikte neredeyse 25 yıl öncesiyle aynı. Böylece, zamanda yolculuk eden bilim insanı beş dakika içinde çalışma alanına geçip 25 yıl öncesindeki gibi çalışmaya başlayabilir. Sadece sıvı azot tanklarında değil tüm laboratuvar da zaman durdu.

Neden?

Daha önce de bahsedildiği gibi, var olan yasal çerçeveler, düzenlemeler, yönergeler ve laboratuvar el kitapları 30-40 yıl önceki gibi araştırma özgürlüğümüzü elimizden aldı. Hayvan deneyleri ve insan embriyosu çalışmaları ciddi bir şekilde kısıtlanmış durumda. Tanımlanmış yaklaşımlar uzun süredir “deneysel” etiketini taşımakta ve birçok ülkede bunların klinik uygulamaları için özel izinler gerektirmektedir. “Deneysel” ekinin kalkması için, çalışmanın yararı ve zararsız olduğu kısa ve uzun dönemde yapılacak olan tercihen büyük ölçekli çok merkezli prospektif ve takip gerektiren çalışmalarla kanıtlanmak zorundadır (Harper et al., 2012) (Brison et al., 2013) (Legro and Wu, 2014) (Provoost et al., 2014).

Gerçek şu ki, bu koşulları yerine getirmek oldukça zor. Yakın zamanda insan IVF laboratuvarlarında oldukça kabul gören yöntemler bu kısıtlamalardan geçmemiş, kısıtlamalardan kaçmıştır. PGD ve PGS (PGT-A) işin embriyoloji kısmının değil, tanı yöntemlerinin süratle gelişmesi nedeniyle esas olarak önemli başarılar elde etmiştir. Time-lapse uygulaması ilk ortaya çıktığında “inkübatör içinde fotoğraf çekmek” özel izin gerektirmediği

için dünya çapında süratle kabul gördü. Son on yılın en etkileyici değişimi ise, birkaç kliniğin özel bir cesaret ve/veya özel bir durumu sayesinde vitrifikasyonun geniş ölçekte kullanım alanı bulmasıydı. Bu yeni yaklaşım dünyanın yarısında günlük rutin uygulamalarda kullanılırken bazı ülkede yıllardır sessizce yayılmakta, bazılarında ise ancak son birkaç senede rutin bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

Klinik araştırmalar; tercih edilen prospektif randomize çok merkezli çalışmaların sıkı kriterleri nedeniyle verimsiz, maliyetleri çalışmaları engelleyecek kadar pahalı ve mevcut kaynak dağılımını adil olmayan bir şekilde seçicidir.

Akademik alanda insan embriyoloji çalışmaları olmazsa, bağımsız kurumlar için devlet desteği ve endüstrinin IVF kliniklerine yapacağı araştırma ve geliştirme desteği de olmaz. Ne yazık ki bunların büyüklükleri ve mali geçmişleri bu hedefleri yerine getirmelerine izin vermemektedir. Pek çok yayın “*bazı ilginç sonuçlar bulduk, bakalım yayınlayabilirsek ne olacak?*” yaklaşımıyla ortaya atılmakta, bir kısmı da deneysel olarak kötü tasarlanmış, temel sistemleri sorunlu veya iddia ettikleri hedefe ulaşmalarının zor olduğu ancak potansiyel olarak heyecan verici çalışmaları yansıtmaktadır. Vitrifikasyona karşılık yavaş dondurma veya düşük/yüksek oksijen konsantrasyonunun incelendiği en yaygın ve çok basit soruları ele alan sistematik bir araştırmanın metot bölümünde çalışmanın ses getirmeyeceği açık bir şekilde görülebilir. Yapacağınız otomatik bir arama ile konu hakkında binlerce sonuca ulaşır daha sonra manuel incelemelerde bu sonuçları ilgili birkaç düzine yayına indirgeyebilirsiniz. Bunlardan ancak sadece birkaçı verilen soruyu doğru cevaplamak için verilen katı seçim kriterini karşılamaktadır (Cohen and Alikani, 2013) (Evers, 2013) (Simn and Bellver, 2014). Sonuç olarak, çoğu sistematik yayın istenen bilgiyi verememekte, çoğunda daha fazla araştırma yapılması gerektiği bildirilmektedir. Bu araştırmaların uygun bir şekilde yapılması muhtemelen hiçbir zaman mümkün olmayacak ve bilim alanımız asfaltsız yolda ilerlemeye devam edecektir.

İçinde bulunduğumuz durum

Daha önce sizlere eksternal-yapısal, finansal ve yasal unsurlardan bahsetmiştik. Ayrıca embriyologların tercih ettiği türler ve yaklaşımlar hakkında da bilgi verdik. şimdi daha kışkırtıcı ve önyargılı bir bakış açısıyla hala gerçeklikten çok da uzak olmayan ikinci konuya dönelim.

Prestijin ve kamuoyu ilgisinin embriyoloji araştırmaları için uygun bir ortam yaratabileceği düşünölebilir. Ancak ne yazık ki bunun tam tersi doğrudur. İtibar, tartışmalı bir konudur ve aksi yönde karar alınmasıyla sonuçlanabilir. Yetenekli fakat çekingen araştırıcılar çalışmalarını takiben oluşacak ilgiden korkarlar. Kendilerini tanıtmaktan hoşlananlar ise bunu daha az karmaşık bir alanda gerçekleştirmeyi tercih ederler.

Diğer yandan, bir embriyo laboratuvarında çalışmak için sıkı ve zorlu bir program, yüksek düzeyde hassasiyet ve el becerisi ve en önemlisi de aidiyet gerekmektedir. Her ne kadar meslek dışındakiler için bile tüm laboratuvar araştırmalarında bu koşullar geçerliyse de bazı adayların bu koşullar karşısında cesaretleri kırılmakta ve kendileri için daha uygun yol arayışına girmektedir.

Günümüz koşullarında insan IVF laboratuvarları yaratıcı bilim insanlarını barındırmaz ve hatta eğitim dönemi, bağımsız düşünme ve alternatif çözüm bulma yeteneklerini de ortadan kaldırmayı amaçlar. “Önce neler olup bittiğini öğren, daha sonra geliştirirsin” ilkesi kulağa mantıklı geliyor fakat bu cümlenin ikinci yarısı daha sonra unutulmaktadır. Mali ve hukuki kurallarla yönetilen büyük makine bireyleri ezer ve itaatkâr çalışanlar yaratır. Bu durum şimdiki zamanın çıkarlarına hizmet ederken geleceğe açılan yolları kapatır.

Elbette istisnalar vardır. Zaman zaman parlak bir fikir için güvenli geleceğini riske atabilen açık fikirli liderler ve buna uygun personeller bulunabilir fakat bunların sayısı hayal kırıklığı yaratacak kadar az olabilir. Bir avuç büyük klinik, her ne kadar insan embriyolojisinin gelişimi üzerinde oldukça az katkı sağlasa da, az ya da çok bağımsız araştırmaları için araştırma grupları oluşturarak bunları sürdürmektedir.

Bizim sorumluluğumuz

Görünen birçok faktörü sıralamaktansa, kendi sorumluluklarımızın farkına varıp bu tartışmalı durumu tolere etmek zorundayız. Çoğu IVF ünitesinde her ne kadar embriyologlar üstü kapalı bir şekilde bilim insanı olarak adlandırılrsa da onların gerçek rolü bir teknisyene daha yakındır. Hatta daha da üzücü olanı bunu kabullenmiş gibi görünmemizdir. Daha önceden kısıtlayıcı olarak gördüğümüz şeyler diğer seçenekler nedeniyle bugün mide bulandırıyor veya sıradan kabul ediliyor. Yaratıcı düşünceyi engellemek, inovasyon ve hatta rutin uygulamalar için ciddi sonuçlar doğurur. Tasarım hataları olan cihazları ve içinde ne olduğunu bilmediğimiz medyumları satın almaya ve kullanmaya devam ediyoruz. Neye ve buna neden ihtiyaç duyulduğunu anlamak için mütevazı şekilde düşünmek lazım; en önemli ilke, belirlenmiş olan

yöntemi uygulamaktır. Sonuç olarak, sorunları giderme yeteneği kısıtlanmış ve pratik düşünce veya bilimsel kaynaklar aracılığı ile çözülebilecek sorunlar için bile dışarıdan yardım talep etme eğilimi artmıştır.

Çözüm

Öncelikle geçen on yıllar boyunca verimlilik artışlarının etkileyici olduğunu kabul etmemiz gerekiyor. Çığır açan yeniliklerin eksikliği, döngüsel devrimlerin ve aynı zamanda evrimleşmenin doğal sonucu olarak yorumlanabilir ve normal olarak değerlendirilir. Otomobillerin son 80 yıldır neredeyse aynı olması örneğine başvurulabilir. Dört teker, direksiyon, fren, debriyaj, bujiler vb. verilebilir. Sonra birden radikal bir değişimle kendi kendine yol alan elektrikli araçlar ortaya çıktı.

Moleküler biyoloji ve genetik gibi ilgili bilim alanlarında yapılan ince ayarlar ve optimizasyon çalışmaları gelecekte verimliliği artırmamıza yardımcı olacak potansiyele sahiptir. Ancak dışarıdan yardım bekleyemeyiz. Bizler laboratuvar çalışmalarımızda köklü değişiklikler yapmak zorundayız. Gelecek hakkındaki düşüncelerimizi değiştirmemiz gerekiyor.

Her hafta, embriyologların ICSI yeterliliğini titizlikle ölçmek yerine, uygulayıcının mental ve duygusal durumundan etkilenmeden kesin olarak tanımlanmış parametrelerle çalışan ayarlanabilir tam otomatik ICSI cihazı yapmak zorundayız. Sizce bu son derece zorlu teknolojik bir görev mi? Olabilir. Masraflı mı? Olabilir. Ancak, sadece 20 yıl önce insan genomu çalışmalarında tonlarca plastik pipet ucu ve 3 milyon Amerikan Doları harcanmıştı. Her sene yeni nesil cihazların geliştirilmesiyle sekanslama artık otomatik hale geldi ve 2014 yılında maliyet 3,000,000 Amerikan Dolarından 1,000 Amerikan Dolarına geriledi. 2019 yılında 200 Doların altına bir düşüş daha gerçekleşti <https://www.wired.com/story/whole-genome-sequencing-cost-200-dollars/>.

Çok yakında, Çin’de yer alan BGI Shenzen’in tahminleri gerçekleşecek ve tüm genom diziliminin maliyeti numunenin posta maliyetinden daha ucuz olacak.

Yatırım yapmaya değer mi? En azından, 2001 yılından günümüze ortalama bir IVF siklusunun maliyetinde, uygulamanın doğruluğu ve etkinliği radikal bir şekilde artarken herhangi bir düşüş sağlayabildik mi?

Yaklaşımlarımızla ilgili en büyük problemlerden biri de el pipetleri, petri kapları, laminar kabinler, stereomikroskoplar, mikromanipülatörler ve gazlı inkübatörlerden kaçamamamızdır. Gelecekte yeni nesil IVF, mikro kamera ve sensörlerle, mikro kanallı ağlar tarafından kontrol edilen dizüstü bilgisayar boyutundaki cihazlarla yapılabilecektir. Burada embriyologların rolü; tıpkı havacılık, otomotiv, daha yakın bir örnek verecek olursak genomik veya bizim laboratuvar analiz cihazlarında olduğu gibi, toplanan folikül sıvısı ve sperma girdilerini işlemek, onaylamak ve düzenlemek veya otomatize sistemin birçok kontrol noktasını kontrol etmek ve embriyoları operasyon salonuna götürmek olacaktır. Bu durumda küçük pazar, yüksek maliyet ve teknik zorluklardan endişe duyulabilir. Ancak dünya çapında bulunan 3000 kliniğe her yıl yenileri eklenmektedir. Bunların çoğunda birden fazla cihaza ihtiyaç duyulduğu göz önünde bulundurulunca bu klinikler birbirleri arasında kaynak sağlayabilirler. Time lapse cihazlarının süratle yayılması bu kliniklerin satın alma kapasitelerini ortaya koymuştur. Mikrokanallar (eğer çözüm buysa) açıkça daha zorlu ve karmaşık yapıdadır fakat bu konuda son 15 yılda hızlı bir ilerleme sağlanamaması hayal kırıklığı yaratmaktadır.

IVF ve hatta somatik hücre nükleer transferi için ihtiyaç duyulan her şeye (neredeyse) sahipken “Hava kabarcıklarından kurtulamıyoruz” vb. şeklindeki problemler uygulamaları engellemekte ve gelecek vaat eden projeleri durdurmaktadır (Vajta et al., 2005)(Krisher and Wheeler, 2010)(Smith and Takayama, 2017)(Ma et al., 2011)(Matsuura et al.,2013).

Birilerine yani yetkin bir takıma, hatırı sayılır miktarda paraya ve parçaları doğru bir şekilde birleştirecek kararlı bir endüstriye ihtiyacımız var. Belki de daha fazlası, birbirlerine bilimsel, teknik ve duygusal olarak destek sağlayacak rakip embriyolog topluluklarına ihtiyacımız var.

Bir başka endişe de makinelerin potansiyel insanların kaderini belirlemesine izin vermektir. Bu haklı bir endişe olsa da, bizler bu cihazların metro vagonlarını, uçakları, tanı ve tedavi cihazlarını ve çok yakın bir zamanda da kendi kendine giden arabalara göz göre göre izin vermiyor muyuz? Titreyen ellerimiz ve çoğunlukla bölünen dikkatimizin her zaman bu bilimsel amaçla üretilmiş robotlardan daha iyi çalışacağına emin miyiz?

Tabi ki, her zaman kontrole ihtiyaç vardır. Bu aynı zamanda embriyologların gelecekteki rolü için de bir yanıttır. Embriyologların rolü de evrim geçirmelidir. Böylece bir Dreamliner’ın otomatik inişini kontrol eden pilota verilene benzer şekilde daha farklı profesyonel fırsat ve sorumluluk seviyesi oluşturacaktır.

Gelişime ne kadar fazla katkıda bulunursak, sonuçlardan o oranda tatmin oluruz.

SON SÖZ

Muhtemelen fark ettiğiniz gibi bu kitap farklıdır. İçinde çok fazla görüş ve öneri bulunmakta bazıları da güncel eğilimlerden ayrılmaktadır. Farklı birçok konuda *pratik* veya *mental* açıdan alternatif sunmak kesinlikle bizim amacımızdı. İlkinden bahsedecek olursak önerimiz oldukça basit. Deepa Sekhar'ın belirttiği gibi “bu günlerde hastaları cezbetmek için gösterişli cihazların kullanımı ve bunların tanıtımını yapmak yeni moda”. Biz bu eğilime karşı çıkmaya çalıştık. Bizim ilkel teknik çözümlerimiz dünyanın her yerinde en iyilerle karşılaştırılabilecek sonuçlara ulaşmanıza yardımcı olabilir.

Mental olana gelince; olağan liste (“kurallara uy; görevi öngörüldüğü şekilde yap; tüm resmi gereklilikleri karşıla; hata yapma”) şefkatli ebeveynlerin küçük, çaresiz bebeklerine gösterdikleri yaklaşımın aynısı mı? Embriyologlardan beklenen tek şey kusursuz raporlar ve istatistikler hazırlamalarıdır. Bizim temel önerimiz; sorumluluklarının sağlıklı ve mutlu embriyoların yaratılmasına yardımcı olmayı da içermesidir.

Ancak şunu bir kez daha vurgulamamız gerekiyor: burada tavsiye ettiğimiz şeyler sadece bir teklif, bir olasılıktır. Farklı noktalarınız, niyetiniz, çerçevelerinizi veya sınırlarınız olabilir. Bizim tavsiyelerimizi kabul veya reddetmek size kalmıştır.

Burada Avustralya Ulusal Parklarında yer alan standart bir nota atıfta (*küçük bir ekleme ile*) bulunuyoruz:

“Güvenliğiniz (ve geleceğiniz) bizi ilgilendirir, ancak sizin sorumluluğunuzdadır”.

KAYNAKLAR

Arav A. Vitriification of oocytes and embryos.

In: Lauria A, Gandolfi F (eds) Portand Press, Cambridge, 1992, pp. 255–64.

Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Timelapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 May 29;5(5):CD011320. doi: 10.1002/ 14651858.CD011320.pub4.

Avery B, Greve T. Impact of incubator type on the yield of in vitro produced bovine blastocysts. *Acta Vet Scand*. 1992;33(4):341-8. PMID: 1488949.

Baak NA, Cantineau AE, Farquhar C, Brison DR. Temperature of embryo culture for assisted reproduction.

Cochrane Database Syst Rev. 2019 Sep 17;9(9):CD012192. doi: 10.1002/14651858.CD012192.pub2.

Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts.

Hum Reprod Update. 1995 Mar;1(2):91-148. doi: 10.1093/humupd/1.2.91.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow.

Biol. Reprod. 1982 Aug;27(1):147-58. doi: 10.1095/biolreprod27.1.147.

Brison DR, Roberts SA, Kimber SJ. How should we assess the safety of IVF technologies?

Reprod Biomed Online. 2013 Dec;27(6):710-21. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.09.006.

Capalbo A, Poli M, Rienzi L, Girardi L, Patassini C, Fabiani M, Cimadomo D, Benini F, Farcomeni A, Cuzzi J, Rubio C, Albani E, Sacchi L, Vaiarelli A, Figliuzzi M, Findikli N, Coban O, Boynukalin FK, Vogel I, Hoffmann E, Livi C, Levi-Setti PE, Ubaldi FM, Simón C. Mosaic human preimplantation embryos and their developmental potential in a prospective, non-selection clinical trial.

Am J Hum Genet. 2021 Nov 11:S0002-9297(21)00412-2. doi: 10.1016/j.ajhg. 2021.11.002. Online ahead of print.

Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro.

Nature. 1959 Aug 8;184(Suppl 7):466-7. doi: 10.1038/184466a0.

Cheng WTK, Moor RM, Polge C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro.

Theriogenology. 1986 Jan;25:146 (abstract).

Cohen J, Alikani M. The time has come to radically rethink Assisted reproduction.

Reprod Biomed Online. 2013 Oct;27(4):323-4. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.001.

Datta AK, Campbell S, Deval B, Nargund G. Add-ons in IVF programme - Hype or Hope?

Facts Views Vis Obgyn. 2015 Dec 28;7(4):241-250.

Evers JL. The wobbly evidence base of reproductive medicine.

Reprod Biomed Online. 2013 Dec;27(6):742-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.001.

Fauser BC. Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes.

Reprod Biomed Online. 2019 Feb;38(2):133-137. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.12.001.

Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Need for choosing the ideal pH value for IVF culture media.

J Assist Reprod Genet. 2020 May;37(5):1019-1028. doi: 10.1007/s10815-020-01726-5.

Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes.

Hum Reprod Open. 2019 Aug 8;2019(3):hoz017. doi: 10.1093/hropen/hoz017.

Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro.

Biol Reprod. 1988 Sep;39(2):355-72. doi: 10.1095/biolreprod39.2.355.

Harper J, Magli MC, Lundin K, Barratt CL, Brison D. When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory?

Hum Reprod. 2012 Feb;27(2):303-13. doi: 10.1093/humrep/der414.

Harper J, Jackson E, Sermon K, Aitken RJ, Harbottle S, Mocanu E, Hardarson T, Mathur R, Viville S, Vail A, Lundin K. Adjuncts in the IVF laboratory: where is the evidence for 'add-on' interventions?

Hum Reprod. 2017 Mar 1;32(3):485-491. doi: 10.1093/humrep/dex004.

Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century.

Hum Reprod Update. Jul-Aug 2015;21(4):411-26. doi: 10.1093/humupd/dmv016.

Jarvis GE. Early embryo mortality in natural human reproduction: What the data say. F1000Res. 2016 Nov 25;5:2765. doi: 10.12688/f1000research.8937.2.

Kamath MS, Mascarenhas M, Franik S, Liu E, Sunkara SK. Clinical adjuncts in in vitro fertilization: a growing list.

Fertil Steril. 2019 Dec;112(6):978-986. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.019.

Krisher RL, Wheeler MB. Towards the use of microfluidics for individual embryo culture.

Reprod Fertil Dev. 2010;22(1):32-9. doi: 10.1071/RD09219.

Krisher RL, Schlenker T. Culture of Human Preimplantation Embryos in a Clinical ART Setting.

Methods Mol Biol. 2019;2006:355-371. doi: 10.1007/978-1-4939-9566-0_24.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report.

Hum Reprod. 1999 Dec;14(12):3077-9. doi: 10.1093/humrep/14.12.3077.

Landa V, Teplá O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops.

Folia Biol (Praha). 1990;36(3-4):153-8. PMID: 2257934.

Legro RS, Wu X. Introduction: choosing the main outcome of an infertility trial is harder than you think.

Fertil Steril. 2014 May;101(5):1201-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.051.

Lensen S, Shreeve N, Barnhart KT, Gibreel A, Ng EHY, Moffett A. In vitro fertilization add-ons for the endometrium: it doesn't add-up.

Fertil Steril. 2019 Dec;112(6):987-993. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.10.011.

Ma R, Xie L, Han C, Su K, Qiu T, Wang L, Huang G, Xing W, Qiao J, Wang J, Cheng J. In vitro fertilization on a single-oocyte positioning system integrated with motile sperm selection and early embryo development.

Anal Chem. 2011 Apr 15;83(8):2964-70. doi: 10.1021/ac103063g.

Macklon NS, Ahuja KK, Fauser B. Building an evidence base for IVF 'add-ons'.

Reprod Biomed Online. 2019 Jun;38(6):853-856. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.04.005.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling.

Biol Reprod. 1996 May;54(5):1059-69. doi: 10.1095/biolreprod54.5.1059.

Matsuura K, Uozumi T, Furuichi T, Sugimoto I, Kodama M, Funahashi H. A microfluidic device to reduce treatment time of intracytoplasmic sperm injection.

Fertil Steril. 2013 Feb;99(2):400-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.10.022.

Matsuura K. Numerical calculations for diffusion effects in the well-of-the-well culture system for mammalian embryos.

Reprod Fertil Dev. 2014 Jun;26(5):742- 51. doi: 10.1071/RD13025.

Mori C, Kuwayama M, Okimura T, Aono F, Takehara Y, Kato O. Development of mouse and human embryos in a low-humidity incubator.

Fertil Steril. 2011;96(3):S2499-50 (abstract).

Mortimer D, Cohen J, Mortimer ST, Fawzy M, McCulloh DH, Morbeck DE, Pollet-Villard X, Mansour RT, Brison DR, Doshi A, Harper JC, Swain JE, Gilligan AV. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting.

Reprod Biomed Online. 2018 Jun;36(6):658-674. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.02.005.

Nagashima JB, Sylvester SR, Nelson JL, Cheong SH, Mukai C, Lambo C, Flanders JA, Meyers-Wallen VN, Songsasen N, Travis AJ. Live Births from Domestic Dog (*Canis familiaris*) Embryos Produced by In Vitro Fertilization.

PLoS One. 2015 Dec 9;10(12):e0143930. doi: 10.1371/journal.pone.0143930.

Niederberger C, Pellicer A, Cohen J, Gardner DK, Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, Rosenwaks Z, Cobo A, Swain JE, Schoolcraft WB, Frydman R, Bishop LA, Aharon D, Gordon C, New E, Decherney A, Tan SL, Paulson RJ, Goldfarb JM, Brännström M, Donnez J, Silber S, Dolmans MM, Simpson JL, Handyside AH, Munné S, Eguizabal C, Montserrat N, Izpisua Belmonte JC, Trounson A, Simon C, Tulandi T, Giudice LC, Norman RJ, Hsueh AJ, Sun Y, Laufer N, Kochman R, Eldar-Geva T, Lunenfeld B, Ezcurra D, D'Hooghe T, Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Meldrum DR, Casper RF, Fatemi HM, Devroey P, Galliano D, Wikland M, Sigman M, Schoor RA, Goldstein M, Lipshultz LI, Schlegel PN, Hussein A, Oates RD,

Brannigan RE, Ross HE, Pennings G, Klock SC, Brown S, Van Steirteghem A, Rebar RW, LaBarbera AR. Forty years of IVF.

Fertil Steril. 2018 Jul 15;110(2):185-324.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.005.

Ombelet W. Is global access to infertility care realistic? The Walking Egg Project.

Reprod Biomed Online. 2014 Mar;28(3):267-72. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.11.013.

Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study.

J Reprod Fertil Suppl. 1991;44:375-84. PMID: 1795281.

Parikh FR. Affordable in vitro fertilization.

Fertil Steril. 2013 Aug;100(2):328-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.049.

Peura TT, Vajta G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer.

Cloning Stem Cells. 2003;5(4):257-77. doi: 10.1089/153623003772032772.

Pool TB, Schoolfield J, Han D. Human embryo culture media comparisons.

Methods Mol Biol. 2012;912:367-86. doi: 10.1007/978-1-61779-971-6_21.

Pribenszky C, Mátyás S, Kovács P, Losonczi E, Zádori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring.

Reprod Biomed Online. 2010 Oct;21(4):533-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.015.

Provoost V, Tilleman K, D'Angelo A, De Sutter P, de Wert G, Nelen W, Pennings G, Shenfield F, Dondorp W. Beyond the dichotomy: a tool for distinguishing between experimental, innovative and established treatment.

Hum Reprod. 2014 Mar;29(3):413-7. doi: 10.1093/humrep/det463.

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 Nov;92(5):1783-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.008.

Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method.

Hum Reprod. 2001 Oct;16(10):2187-94. doi: 10.1093/humrep/16.10.2187.

Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature.

Hum Reprod Update. 2011 Jan-Feb;17(1):34-45. doi: 10.1093/humupd/dmq029.

Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, Scarica C, Farcomeni A, Vajta G, Ubaldi FM. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. Reprod Biomed Online. 2015 Jan;30(1):57-66. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.09.012.

Selman HA, El-Danasouri I. Pregnancies derived from vitrified human zygotes.

Fertil Steril. 2002 Feb;77(2):422-3. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02991-0.

Sfontouris IA, Martins WP, Nastri CO, Viana IG, Navarro PA, Raine-Fenning N, van der Poel S, Rienzi L, Racowsky C. Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.

J Assist Reprod Genet. 2016 Oct;33(10):1261-1272. doi: 10.1007/s10815-016-0774- 5.

Simón C, Bellver J. Scratching beneath 'The Scratching Case': systematic reviews and meta-analyses, the back door for evidence-based medicine.

Hum Reprod. 2014 Aug;29(8):1618-21. doi: 10.1093/humrep/deu126.

Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction.

Mol Hum Reprod. 2017 Apr 1;23(4):257-268. doi: 10.1093/molehr/gaw076.

Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT, MacIntyre RJ. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos.

Nature. 1990 May 10;345(6271):170-2. doi: 10.1038/345170a0.

Stepoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo.

Lancet. 1978 Aug 12;2(8085):366. doi: 10.1016/s0140-6736(78)92957-4.

Swain JE. Optimal human embryo culture.

Semin Reprod Med. 2015 Mar;33(2):103-17. doi: 10.1055/s-0035-1546423.

Swain JE. Controversies in ART: considerations and risks for uninterrupted embryo culture.

Reprod Biomed Online. 2019 Jul;39(1):19-26. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.02.009.

Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed Online*. 2001;3(1):25-29. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61960-8.

Thouas GA, Jones GM, Trounson AO. The 'GO' system--a novel method of microculture for in vitro development of mouse zygotes to the blastocyst stage. *Reproduction*. 2003 Aug;126(2):161-9. doi: 10.1530/rep.0.1260161.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture: a technique report. *Theriogenology*. 1997; 48(8):1379-85.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998 Sep;51(1):53-8. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V.

Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev*. 2000 Mar;55(3):256-64. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7.

Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 2001;3(2):89-95. doi: 10.1089/15204550152475590.

Vajta G, Kragh PM, Mtango NR, Callesen H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod Fertil Dev*. 2005;17(1-2):97-112. doi: 10.1071/rd04116.

Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online*. 2010 Apr;20(4):453-69. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.12.018.

Vajta G, Parmegiani L, Machaty Z, Chen WB, Yakovenko SA. Back to the future: optimised micro-well culture of individual human preimplantation stage embryos. *J Assist Reprod Genet*. 38(10):2563-2574, doi: 10.1007/s10815-021-02167-4.

van de Wiel L, Wilkinson J, Athanasiou P, Harper J. The prevalence, promotion and pricing of three IVF add-ons on fertility clinic websites.

Reprod Biomed Online. 2020 Nov;41(5):801-806. doi: 10.1016/j.rbmo. 2020.07.021.

Whittingham DG. Fertilization of mouse eggs in vitro.

Nature. 1968 Nov 9;220(5167):592-3. doi: 10.1038/220592a0.

Wilkinson J, Malpas P, Hammarberg K, Mahoney Tsigdinos P, Lensen S, Jackson E, Harper J, Mol BW. Do à la carte menus serve infertility patients? The ethics and regulation of in vitro fertility add-ons.

Fertil Steril. 2019 Dec;112(6):973-977. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.028.

Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A. Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras.

Nature. 1993 Sep 2;365(6441):87-9. doi: 10.1038/365087a0.

Zemyarska MS. Is it ethical to provide IVF add-ons when there is no evidenc of a benefit if the patient request it?

J Med Ethics 2019 May;45(5):346-50. doi: 10.1136/medethics-2018-104983.

TEŞEKKÜR

Yazarlar herkese, - aile üyeleri, arkadaşlar, çalışma arkadaşları, ressam, editörler, matbaacılar ve dağıtımıcılar - hem kişisel hem de profesyonel olarak verdikleri nazik destek için teşekkür eder. Özellikle İspanyolca, Arapça, Çince ve Rusça baskıların ortak yazarları olan sırasıyla Anabella Marconetto, Sarah Madani, Da Li ve Sergey Yakovenko'ya İngilizce versiyonda da ekleme, öneri ve düzeltmeler gibi önemli katkılarda bulundukları için minnettarız.

Bize verdiği ilham, sürekli destek ve cesaretlendirme için VitaVitro BioTech Co., Ltd. (Shenzen, Çin) CEO'su Sayın Jenny Lin ve tüm şirkete özel teşekkür borçluyuz. Bu kitap geçmişteki yedi yıllık işbirliğimizin meyvelerinden biridir. Gelecekte birçok ortak başarı ile uzun yıllar devam etmek dileği ile.

YAZARLAR

Gábor Vajta

Çok uzun yaşamı boyunca Gábor Vajta iki vatandaşlık ve iki kalıcı oturma izniyle birlikte, Tıp Doktorluğu, PhD ve DSc ihtisası yapmış ve üç kıtada dört profesörlük görevi yapmıştır. Ancak bunlara rağmen tek bir bilimsel ödül kazanmamış ve herhangi bir bilimsel toplulukta görev almamıştır. Yazar ve yardımcı yazar olarak 16,000 atıf alan 152 yayın, altı kitap ve on kitap bölümü yazarlığı yapmıştır. Open Pulled Straw



(OPS) vitrification, Handmade Cloning (HMC) ve Well of the Well (WOW) gibi yeni tekniklerin mucididir. Bu buluşları için altı verimsiz patent başvurusunda bulunmuştur. Avrupa, Amerika, Asya ve Avustralya'da 34 yıl süreyle büyük kurumlarda çalışmıştır. 2008 yılından bu yana dünyanın her yerinde bağımsız olarak danışmanlık yapmaktadır. Çin Shenzhen'de bulunan VitaVitro Biotech Co., Ltd., şirketinin kurucu ortağı ve CSO'sudur. Gábor Vajta, Cairns, Queensland Avustralya'da yaşamakta ancak (COVID'den önce ve sonra) yılın yarısını yurtdışındaki hayvan ve insan embriyoloji laboratuvarlarında geçirmektedir.

Detaylı bilgi için:

<https://gaborvajta.wixsite.com/gaborvajta> veya

Kişisel iletişim için: gabor.vajta@hotmail.com



Mustafa Kaymaz

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1989 yılında mezun olmuş, 1995 yılında aynı üniversitenin Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda doktorasını tamamlamış ve 2004 yılında Profesör unvanını almıştır. Yardımcı Üreme Tekniklerine olan ilgisi 2007 yılında aldığı JICA (Japan International Cooperation Agency) bursu ile daha da artmıştır. TÜRKHAYGEN-1 (Türkiye yerli evcil hayvan genetik kaynaklarından bazılarının in vitro korunması ve ön moleküler tanımlanması) isimli projede alt grup proje yöneticisi olarak çalıştı. Konuyla ilgili birçok laboratuvarın oluşturulmasına katkı sağladı.



Akademik çalışmalarının yanı sıra yardımcı üreme teknikleri ile ilgili birçok ulusal ve uluslararası projede görev almaktadır. Çalışmaları embriyolarda genomik seleksiyon üzerine yoğunlaşmıştır.

Kişisel iletişim için: kaymaz67@hotmail.com