

Üremeye Yardımcı Tedavi Laboratuvarında PolScope Kullanılması: GATA Deneyimi

PolScope Usage in In Vitro Fertilization Laboratory: GATA Experience: Scientific Letter

Dr. Cem KORKMAZ^a

^aÜremeye Yardımcı Tedavi Laboratuvarı,
GATA, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 25.11.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 06.04.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Cem KORKMAZ
GATA, Üremeye Yardımcı
Tedavi Laboratuvarı, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
cem@gata.edu.tr

ÖZET Üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) uygulamaları sırasında oosit ve embriyo kalitesinin girişimsel olmayan teknikler yardımıyla ortaya konabilmesi, in-vitro fertilizasyon (IVF) geleceğinde çok önemli yer tutacaktır. İmplantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyonun seçiminde morfoloji değerlendirmesi günümüzde çok önemlidir ve incelemeler Hoffman modülasyonuna sahip standart ışık mikroskoplar ile yapılmaktadır. Bu mikroskoplara optik ve dijital sistem eklentileri yapılarak polarize mikroskop özellikleri kazandırılmaktadır (PolScope). Bu yöntemle oosite ve mayoz mekiğine zarar vermeden inceleme yapmak olasıdır. Oositteki mayoz mekik anomalileri fertilizasyon kusurlarına, anöploidilere ve implantasyon başarısızlıklarına neden olabilmektedir. Günümüzde ÜYTE laboratuvarlarında inseminasyon tekniği olarak kullanılan mikroenjeksiyon işlemi sırasında mayoz mekiğinin gözlenebilmesi, değerlendirilmesi ve mekiğe zarar verilmemesi çok önemlidir. Bu düşüncelerle, Gülhane Askeri Tıp Akademisi ÜYTE laboratuvarında 2007 Mart ayından beri 107S157 no'lu Tübitak projesi kapsamında alınmış olan PolScope (SpindleView; CRI, Woburn, MA, USA) cihazı 200'den fazla hastada kullanılmıştır. Bu çalışmada ise 190 hastadan elde edilen 1496 oositte ait inceleme sonuçları ve bu süreçte edinilen deneyim bildirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Embriyo araştırması; sperm enjeksiyonu, sitoplazma içine

ABSTRACT The observation of oocyte and embryo quality with non invasive techniques will take an important place in the future of in vitro fertilization (IVF). The morphological assessment of embryo which has the highest implantation potential is important today and the assessments were done with standart light microscopes with Hoffman modulation. These microscopes can be upgraded to polarization microscopes with application of digital and optical equipments (PolScope). Performing an intensive study without harming the oocyte and meiotic spindle is possible with this technique. The abnormalities of meiotic spindle may lead to aneuploidy, fertilization defects and failures in implantation. Microinjection method is mainly utilized as insemination technique in assisted reproductive technology laboratories at the present day. Therefore observation and evaluation of meiotic spindle as well as not harming the meiotic spindle are extremely important. For this reason, the PolScope (SpindleView; CRI, Woburn, MA, USA) which was obtained with Tübitak project number 107S157 has been utilized in more than 200 patients since the march 2007 at GATA IVF center. Current study reports the data and experience that obtained from 1496 oocytes of 190 patients.

Key Words: Embryo research; sperm injections, intracytoplasmic

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(4):1374-9

“PolScope= SPINDLEVIEW” SİSTEMİ NASIL ÇALIŞIR?

Doğadaki ve canlı yapısındaki bazı maddeler, üzerine gelen ışınların polarizasyon düzlemini değiştirirler; bu tür maddelere “anizotrop” veya “birefringent” maddeler denir. Bu maddelerin öylesine düzen-

li molekül dizilimleri vardır ki; yan yana iki sıra yapı birbirinden farklı ışık kırma katsayısına sahiptir. Dolayısıyla ışığın farklı kırılmasıyla birbirine dik iki ışın demeti oluşur.

“Merceklerde ışığın çift kırılması” şeklinde Türkçeleştirebileceğimiz “birefringence” özelliği sayesinde canlı hücre yapısındaki mikrotübüller, mikrofilamentler, hücre zarlarındaki makromoleküller ve diğer hücre iskeleti içerikleri polarize ışık altında uzun süreden beri gözlenebilmektedir. Inoué, polarize mikroskop kullanarak hayvan oositlerinde mayoz mekiğinin filamentöz yapısını inceleyen ilk araştırmacıdır.¹ Sato ve ark. ise mayoz mekiğinin birefringence özelliğinin temelinde mikrotübül yapısının olduğunu göstermişlerdir.²

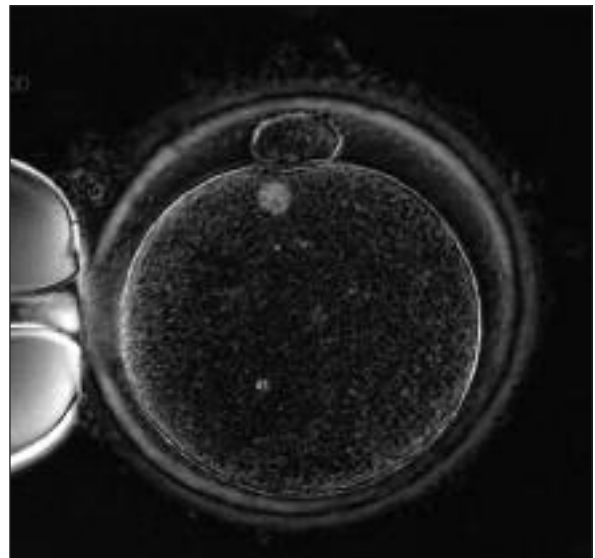
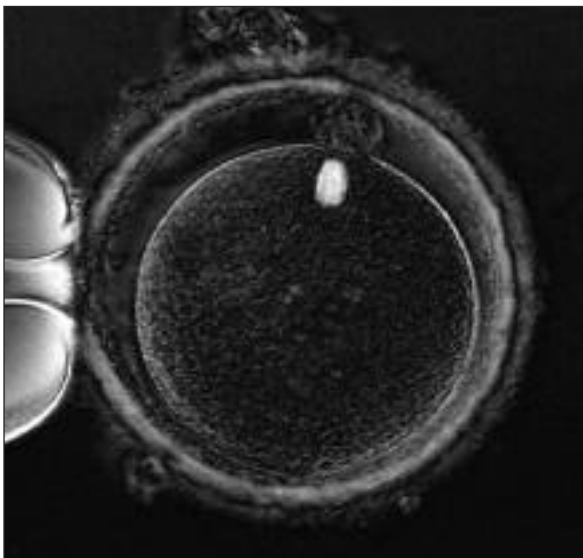
Konvansiyonel polarize ışık mikroskopisi yönelim (oryantasyon) bağımlıdır. Işık birefringent bir yapıdan geçerken vibrasyon düzlemleri birbirine dikey iki ışın dalgasında faz değişiklikleri olur. Polarizasyon mikroskopu ile örneğin içinden geçen iki polarize ışık fazında meydana gelen gecikmeler (retardance) ölçülür ve bilgisayar programları yardımıyla işlenerek görüntü oluşturulur. Bu “retardance” ölçüsü biyolojik materyaller için birkaç nanometre aralığındadır.³⁻⁶

PolScope ataçmanı üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) laboratuvarlarında kullanılan inverted mikroskoplara kolayca adapte edilebilen yeşil ışık filtresi (546 nm), polarizör ve analizör optik eklentileri, CCD kamera ve bilgisayar sisteminden oluşmaktadır. Mikroskopta polarize görüntü alınabilmesi için cam tabanlı Petri kapları ile çalışma zorunluluğu vardır.

MAYOZ MEKİĞİNİN YAPISI VE GÖRÜNÜRLÜĞÜ

Mayoz bölünmeler sırasında mikrotübüller yoğun biçimde düzenlenerek filamentleri ve mayoz mekiğini oluştururlar. Mayoz bölünme sürecinde mekik mikrotübülleri kromozomları ve sonra da kromatitleri ayırır. Mayoz mekiği çevresel koşullara (ısı, pH vb.) çok duyarlıdır. Bu koşullarda meydana gelecek değişiklikler mayoz mekik hasarlanmalarına ve anöploidilere neden olabilir.

PolScope görüntüsü ile mikrotübül yoğunluğu ve oryantasyonu (azimuth) değerlendirilebilir. Azimuth birefringent yapıların uzun akstaki düzenlenişi anlamında kullanılır (örn; mayoz mekiği). Kısaca; birefringence oranı mayoz mekiğinin yapısı hakkında fikir verir. Mikrotübüllerin dağınık olmaması, kromozomların orta hattaki dizilişi ve sentrozomların görünüşü bize oosit kalitesi hakkında değerli bilgiler vermektedir (Resim 1).



RESİM 1: Mayoz mekik birefringence oranı birbirinden oldukça farklı olan iki oositin PolScope görüntüsü.

MAYOZ MEKİĞİNİN VARLIĞI, YERİ VE OOSİT MATURASYONU KONUSUNDAKİ BELİRLEYİCİLİĞİ

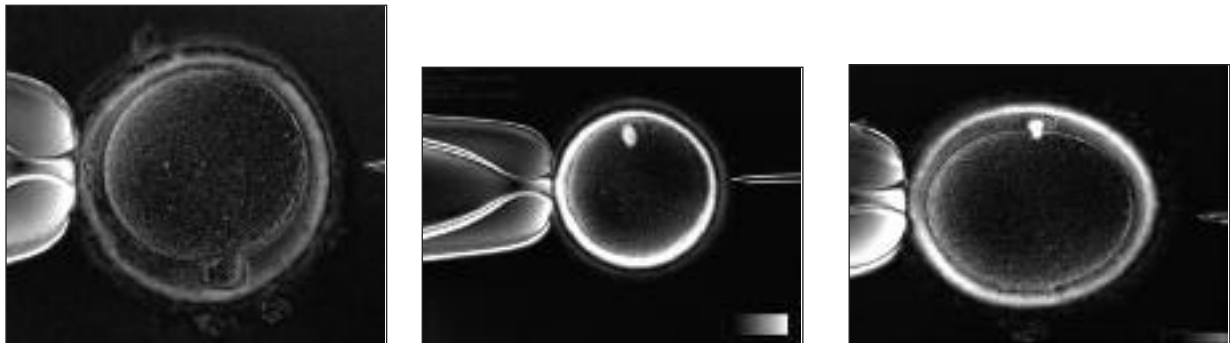
Metafaz II (MII) görünümündeki oositlerin PolScope incelemesinde yaklaşık %25 oranında mayoz mekiği izlenmez.⁷ Bu oositler halen mayoz bölünmenin profaz I evresinde olabilirler (Resim 2a). Oositlerin maturasyonunu tamamlayıp mayoz mekiğinin görünür olabilmesi için bir iki saat kadar beklenmelidir. Polar cisimciğin atılmış olması her zaman oosit maturasyonunun tamamlandığını göstermez. Oositlerin maturasyonu farklı sürelerde olaylanabilir. Bu nedenle PolScope kullanılmadan yapılan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemi sırasında polar cisimciğini atmış görünen oositlerin matür oosit tanımı alması her zaman doğru olmamaktadır.^{8,9}

PolScope ile Metafaz I oositlerin bir kısmında mayoz mekiği görülür. Oosit maturasyonu sürecinde mayoz mekiği Metafaz I (MI) oositlerin anafaz ve telofaz evrelerinde izlenebilir. Bu nedenle bu oositlerde ICSI zamanlaması için PolScope incelemesi yapılması önemlidir (Resim 2b). Polar cisimciğin atılmasına karşın mayoz mekiğinin ayrılmamış olması durumunda oositin henüz MI-anafaz evresinde olması söz konusudur (Resim 2c). Bu tip oositlere ICSI yapılması sonrasında fertilizasyon azlığı veya anöploidi olasılığı göz önünde bulunmalıdır. Bu nedenle mikroenjeksiyon yapmak için oositin mayoz mekiği izlenene kadar beklenmelidir.

Mayoz mekiği yerinin ICSI sonrasındaki embriyo kalitesine etkisine ilişkin çalışmalar yapılmıştır.¹⁰ Buna göre mayoz mekiği polar cisimden ayrılmamış olan oositlerde fertilizasyon problemleri yaşanırken, mayoz mekiğinin oosit içinde farklı lokalizasyonlarda bulunmasının embriyo gelişimine herhangi bir olumsuz etkisi saptanmamıştır.

YAŞA BAĞLI OLARAK GELİŞEN MAYOZ MEKİK ANOMALİLERİ VE ANÖPLOİDİ BAĞLANTISI

Mayoz sırasında oluşan kromozomal ayrılma hataları sonucunda fertilitede azalma ve anöploidiler (monozomi, trisomy, mozaikizm vb.) oluşmaktadır. İnsan oositlerinde özellikle kadın yaşının ileri olması durumunda kromozomal ayrılma hatalarının oranı artmaktadır.¹¹⁻¹⁶ Fare oositlerinde yapılmış olan çalışmalar kromozomal ayrılma hatalarının ve anöploidi riskinin mayoz mekiğinin oluşumu sırasında mikrotübüllerin polimerizasyon kinetiklerinde oluşan gecikmelere ve karışmalara bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Ancak insanlarda bu anomalilerin ileri yaşta artış göstermesinin nedeni belli değildir. Oogenezis sırasında kromozomal ayrılma hatalarının çoğunluğu I. Mayoz sırasında oluşmaktadır. Fare ve insanlarda yapılan çalışmalarda oosit yaşlanmasının anafaz II deki oositlerde mayoz bölünme hatalarını arttırdığına dikkat çekilmiştir.¹⁷⁻²⁵ Bu durum ileri yaşta gebelik oranlarında izlenen azalmayı açıklamaktadır. Ancak üremeye yardımcı tedaviler uygulanırken, oositlere mikroenjeksiyon yapılması sırasında mayoz



RESİM 2: a. Mayoz mekiğinin izlenmediği MII oosit görüntüsü.
b. MI oositte izlenen mayoz mekiği görüntüsü.
c. Polar cisimden ayrılmamış mayoz mekiği görüntüsü.

mekiği hasarlanmasının olup olmadığı ve bu hasarlanmanın embriyoda mozaisizm yaratıp yaratmadığı konusu araştırmaya açıktır.

MAYOZ MEKİĞİ YAPISININ EMBRİYO KALİTESİNE ETKİSİ VAR MI?

Mikroenjeksiyon sırasında incelenen mayoz mekiği yapısının oluşan embriyo kalitesine ne derecede etki ettiği araştırılmıştır. Wang ve ark.nın yaptığı bir çalışmada mayoz mekiği izlenen oositlerden elde edilen embriyoların fertilizasyon oranlarının ve gelişme potansiyellerinin daha iyi olduğu gösterilmiştir.²⁶ Mikroenjeksiyon öncesinde mayoz mekiği tespit edilen oositlerin takip edilmesi ve transfer edilecek embriyo seçiminde bu kriterin dikkate alınmasıyla, in vitro fertilizasyon sonrasında kromozomal aberasyonlara bağlı düşüklüklerin azaltılması mümkündür.^{27,28}

PolScope İLE ZONA PELLUSİDANIN İNCELENMESİ

Zona pellusidayı oluşturan üç glikoprotein tabakanın fertilizasyon ve embriyo kalitesi üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır.^{29,30} PolScope incelemelerinin girişimsel olmaması nedeniyle insan oosit ve embriyolarında da yapılabilen bu çalışmalarda, özellikle zona pellusida iç tabakasının yüksek "retardance" gösterdiği oositlerde gelişme potansiyelinin daha iyi olduğu bildirilmiştir.³¹

Dondurulup çözülmüş embriyolarda da transfer öncesi yapılacak PolScope incelemesiyle zona pellusida yapısında meydana gelebilecek hasarlanmaların tespiti olasıdır. Oosit dondurulması ve çözülmesi sonrasında yapılacak PolScope incelemesi ile dondurma-çözme işleminin başarısını ortaya koymak da mümkündür. Çözülmüş olan oositlerde mayoz mekiğinin tespit edilmesi oositin canlılığı hakkında belirleyicidir.

GATA SONUÇLARI

İnfertilite nedeniyle GATA ÜYTE merkezine başvuran 190 kadından kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası elde edilen toplam 1496 yumurta üzerinde PolScope incelemesi yapılmıştır. Kadınların 82'si (%43.2) 30 yaşından küçük, 70'i (%36.8) 31-35 yaş ve 38'i (%20.0) ise 36+ yaşındadırlar. Hastalardan alınan oositlerin yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

TABLO 1: Oositlerin hasta yaşına göre dağılımı.

	Kadın Sayısı n (%)	Oosit Sayısı	Oosit %
≤ 30 yaş	82 (43.2)	730	48.8
31 - 35 yaş	70 (36.8)	503	33.6
36 + yaş	38 (20.0)	263	17.6
Toplam	190 (100.0)	1496	100.0

Elde edilen 1496 oosit kimyasal (hyaluronidaz enzimi kullanılarak) ve mekanik yöntemlerle temizlenmiştir. Ardından bu oositlerde I. polar cisimciğin atılmasına göre maturasyon incelemeleri ve yaş gruplarına göre dağılımları yapılmıştır. Maturasyon incelemesi Delilbaşı ve ark.nın belirttiği kriterler doğrultusunda yapılmış ve oositler maturasyon durumlarına göre Germinal Vezikül (GV), Metafaz I (MI), Metafaz II (MII), dejenere, boş zona ve zona free oosit olarak ayrılmıştır.³² Buna göre toplamda 1183 matür (MII) oosit elde edilmiştir (Tablo 2).

MII oositlerdeki mayoz mekik inceleme sonuçları polar cisimciğin saat 12 pozisyonuna getirilmesinden sonra değerlendirilmiştir. Buna göre mekiklerin 30° açı bölgesi içinde olduğu, 30-90° açı aralığında bulunduğu, 90-180° açı bölgesinde olduğu, mekiğin oositin orta bölgesinde olduğu, mekiğin izlenemediği ve mekiğin polar cisimden ayrılmadığı gruplar ayrı ayrı kaydedilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 1183 oositte 230 tanesinde (%19.4) mayoz mekiği tespit edilememiştir. 82 oositin (%6.9) ise MII görünümünde olmasına karşın, mayoz mekiğinin I. Polar cisimden ayrılmadığı gözlenmiştir. Toplamda 871 oositte (%73.6) mayoz mekiği izlenmektedir. Mekik pozisyonunun yaş gruplarına göre incelenmesi sonucunda elde edilen oranlar Tablo 3'te sunulmuştur.

POLSCOPE UYGULAMALARI SIRASINDA YAŞANABİLECEK PROBLEMLER VE ÇÖZÜMLERİ

1. İyi bir PolScope görüntüsü alınabilmesi için mikroenjeksiyon işleminden önce mikroskop ayarlarının yapılması şarttır. En iyi görüntüyü alabilmek için normalden fazla ışık gereklidir. Bu nedenle kondansatörün yoğun ışık verecek şekilde odaklanması, ışık yolundaki filtrelerin kaldırılma-

TABLO 2: Oositlerin maturasyon profili ve yaş gruplarına göre dağılımı.

Maturasyon		Yaş (yıl)			Toplam
		≤ 30	30 - 35	36+	
GV	n	74	33	18	125
	%	59.2	26.4	14.4	100.0
MI	n	92	38	26	156
	%	59.0	24.4	16.7	100.0
MII	n	545	426	212	1183
	%	46.1	36.0	17.9	100.0
Dejenere	n	15	6	6	27
	%	55.6	22.2	22.2	100.0
Boş zona	n	3	0	1	4
	%	75.0	0.0	25.0	100.0
Zona free oosit	n	1	0	0	1
	%	100.0	0.0	0.0	100.0
Toplam	n	730	503	263	1496
	%	48.8	33.6	17.6	100.0

GV: Germinal vezikül; MI: Metafaz I; MII: Metafaz III.

TABLO 3: MII oositlerde polar cisimciğin saat 12'de olmasına göre mekik pozisyonunun yaş gruplarına dağılımı.

PC'nin saat 12'de olmasına göre mekik pozisyonu		Yaş			Toplam
		≤ 30	30 - 35	36+	
30 derece	n	297	252	110	659
	%	54.5	59.2	51.9	55.7
90 derece	n	62	56	34	152
	%	11.4	13.1	16.0	12.8
180 derece	n	10	19	8	37
	%	1.8	4.5	3.8	3.1
Ortada	n	12	8	3	23
	%	2.2	1.9	1.4	1.9
Mekik yok	n	126	66	38	230
	%	23.1	15.5	17.9	19.4
Polar cis. ayrılmamış	n	38	25	19	82
	%	7.0	5.9	9.0	6.9
Toplam	n	545	426	212	1183
	%	100.0%	100.0	100.0	100.0

sı ve arka plan (background) ayarının yapılması faydalı olacaktır.

2. Polarize ışık mikroskopunda görüntü alınabilmesi için cam tabanlı Petri kabı (Willco Wells, Amsterdam, Hollanda) kullanılması zorunluluğu vardır. ICSI kabı hazırlığı sırasında cam tabanlı Petri kabı üzerine konan medium damlacıkları (5-10 µl) zeminde hemen yayılmakta ve damlalar birbirine ka-

rışmaktadır. Bu problemin çözümü için ICSI kabına önce mineral yağı konmalı ve medium damlacıkları sonradan yağ altında oluşturulmalıdır. Bu yöntemle hem damlacıklar daha stabil kalmakta hem de işlem sırasında birbirine karışmamaktadır.

3. Mikroenjeksiyon işlemi için ICSI yapılacak olan oositler ve hazırlanmış olan sperm örneği üzerleri mineral yağla kaplanmış medium içine alı-

nırlar. Bu süreçte Petri kabının cam tabanı ısıyı plastik Petri kaplara oranla daha fazla iletmede ve spermiler daha kısa sürede hareketsizleşmektedir. Bu problemi aşabilmek için hazırlanmış semen örneğini ICSI işlemi yapılmadan hemen önce aktarmak faydalı olacaktır.

4. Mayoz mekiğinin görünürlüğü ısı değişimlerine çok duyarlıdır. Bu nedenle ortam ısısı çok düşük olmamalı, laminer air flow ve mikroskopun ısıtıcı yüzeyi aynı ısı derecesinde olmalıdır. Isı ölçü-

mü yüzeyden değil, Petri kabının içinden yapılmalı ve sıcaklık 37°C olmalıdır. ICSI kabına alınacak oosit sayısı en fazla beş olmalı ve mikroenjeksiyon işlemi olabildiğince çabuk yapılarak oositlerin ısı değişimlerinden etkilenmeleri engellenmelidir.

Teşekkür

GATA ÜYTE laboratuvarında kullanılmakta olan PolScope cihazı (SpindleView; CRI, Woburn, MA, USA) TÜ-BİTAK'ın 107S157 no'lu araştırma projemize verdiği katkıyla alınmıştır.

KAYNAKLAR

- Inoué S. Polarization optical studies of the mitotic spindle. I. The demonstration of spindle fibers in living cells. *Chromosoma* 1953;5(1): 487-500.
- Sato H, Ellis GW, Inoué S. Microtubular origin of mitotic spindle form birefringence. Demonstration of the applicability of Wiener's equation. *J Cell Biol* 1975;67(3):501-17.
- Tran PT, Inoué S, Salmon ED, Oldenbourg R. Muscle fine structure and microtubule birefringence measured with a new pol-scope. *Biol Bull* 1994;187(2):244-5.
- Oldenbourg R, Salmon ED, Tran PT. Birefringence of single and bundled microtubules. *Biophys J* 1998;74(1):645-54.
- Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril* 2004;81 Suppl 1:850-6.
- Shen Y, Staf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod* 2005;20 (6):1596-606.
- Konc J, Kanyó K, Cseh S. Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with polscope. *J Assist Reprod Genet* 2004;21(10):349-53.
- Delilbaşı L. [Gamete and embryo micromanipulations]. *Türkiye Klinikleri. J Surg Med Sci* 2006;2(5):58-64.
- Dadali M, Sivaslıoğlu B, Çınar Ö. [Intracytoplasmic sperm injection:ICSI]. *Türkiye Klinikleri. J.Urology-Special Topics* 2008;1(1):78-86.
- Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18(6):1289-93.
- Hook EB. Spontaneous deaths of fetuses with chromosomal abnormalities diagnosed prenatally. *N Engl J Med* 1978;299(19):1036-8.
- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;6(11):1055-62.
- Fritz B, Hallermann C, Oler J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 2001;9(7):539-47.
- Eichenlaub-Ritter U. Aneuploidy in aging oocytes and after oxidic insult. In: Trounson AO, Gosden RG, eds. *Biology and Pathology of the Oocyte*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2003. p. 220-57.
- Munné S, Bahçe M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Veilla E, et al. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 2004;8(1):81-90.
- Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendia P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005;11(4):497-506.
- Sugawara S, Mikamo K. An experimental approach to the analysis of mechanisms of meiotic nondisjunction and anaphase lagging in primary oocytes. *Cytogenet Cell Genet* 1980;28(4):251-64.
- Generoso WM, Katoh M, Cain KT, Hughes LA, Foxworth LB, Mitchell TJ, et al. Chromosome malsegregation and embryonic lethality induced by treatment of normally ovulated mouse oocytes with nocodazole. *Mutat Res* 1989;210(2):313-22.
- Mailhes JB, Yuan ZP. Differential sensitivity of mouse oocytes to colchicine-induced aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 1987;10(2): 183-8.
- Mailhes JB, Carabatsos MJ, Young D, London SN, Bell M, Albertini DF. Taxol-induced meiotic maturation delay, spindle defects, and aneuploidy in mouse oocytes and zygotes. *Mutat Res* 1999;423(1-2):79-90.
- Russo A, Pacchierotti F. Meiotic arrest and aneuploidy induced by vinblastine in mouse oocytes. *Mutat Res* 1988;202(1):215-21.
- Sun F, Betzendahl I, Pacchierotti F, Ranaldi R, Smitz J, Cortvrindt R, et al. Aneuploidy in mouse metaphase II oocytes exposed in vivo and in vitro in preantral follicle culture to nocodazole. *Mutagenesis* 2005;20(1):65-75.
- Shen Y, Betzendahl I, Sun F, Tinneberg HR, Eichenlaub-Ritter U. Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes. *Reprod Toxicol* 2005;19(4):459-71.
- Mailhes JB, Marchetti F. Mechanisms and chemical induction of aneuploidy in rodent germ cells. *Cytogenet Genome Res* 2005;111 (3-4):384-91.
- Pacchierotti F, Ranaldi R. Mechanisms and risk of chemically induced aneuploidy in mammalian germ cells. *Curr Pharm Des* 2006;12 (12):1489-504.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod* 2001;16(7):1464-8.
- Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18(4):817-20.
- Shen Y, Betzendahl I, Tinneberg HR, Eichenlaub-Ritter U. Enhanced polarizing microscopy as a new tool in aneuploidy research in oocytes. *Mutat Res* 2008;651(1-2):131-40.
- Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril* 2004;81 Suppl 1:850-6.
- Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, Lindenberg S. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 2000;17(6):323-8.
- Shen Y, Staf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod* 2005;20 (6):1596-606.
- Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (Sperm/Oosit). [Gamete, fertilization and embryo photographs]. *Serono Yayınları* 2000-01: 41-45, 2000. p.15-30.