

T.C
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ İLE ELDE EDİLMİŞ İNSAN
EMBRİYOLARINDA İMPLANTASYON ÖNCESİ MORFOKİNETİK
GELİŞİM PARAMETRELERİ İLE ANÖPLOİDİ İLİŞKİSİNİN TİME LAPSE
TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK İNCELENMESİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BİYOLOG BİLGEN TEKE

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Emir TAN

(İSTANBUL-2018)

TEZ ONAYI

T.C.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Savunma Tarihi: .../.../2018

Prof.Dr.EMİR TAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Engin ORAL

İstanbul Üniversitesi

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç.Dr.Meriç KARACAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Bilgen TEKE

TEŐEKKÜR

İŐe baŐladıđım günden bu yana derin bilgi ve tecrübelerini paylaŐan, yol gÖsteren, desteğini hiÇ bir zaman esirgemeyen değerli klinik baŐkanımız sayın **Prof. Dr. Mustafa BahÇeci**'ye ve **BahÇeci Sağlık Grubu** ŐalıŐanlarına,

Yüksek lisans eğitim sürecimde desteğini her zaman hissettiren ők değerli hocam, sayın **Prof. Dr. Engin Oral**'a, yüksek lisans Öğrenimime baŐladıđım günden itibaren, tez ŐalıŐmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüŐlerini paylaŐan sayın **DoÇ.Dr. Fazilet Kübra Boynukalın**'a ve laboratuvar direktÖrüm sayın **Dr. Necati Fındıklı**'ya, tez danıŐmanım sayın **Prof.Dr. Emir Tan**'a, tezimin yazımı için desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan, Őefim embriyolog **TURAN AKSOY**'a,

Hayatım boyunca destekleri ve sabrı için sevgili **AİLEM**'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	7
2.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri	7
2.2. Kullanılan cihazlar, solüsyonlar ve malzemeler	7
2.2.1. Kullanılan cihazlar	7
2.2.2. Kullanılan solüsyonlar	8
2.2.3. Kullanılan Malzemeler	9
2.3. Hazırlık işlemleri:	9
2.4. Protokoller	13
2.4.1. Ovülasyon indüksiyonu protokolleri ve yumurta toplama işlemi (OPU)	13
2.4.2. Sperm örneğinin hazırlanması	14
2.4.3. Hyaluronidaz işlemi uygulaması:	15
2.4.4. IMSI işlemi uygulaması:	15
2.4.5. Fertilizasyon, ileri embriyo kültürü ve Assisted Hatching(AHA) işlemi:	16
2.4.6. Trofektoderm biyopsi işlemi	16
2.5. İstatistiksel analiz yöntemleri:	17
3. BULGULAR	18
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	20
5. REFERANSLAR	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Statik ve dinamik embriyo kültür sistemleri	3
Şekil 2: Dinamik embriyo kültürü ile takip edilen insan embriyosu görüntüleri	5
Şekil 3: Dinamik embriyo kültürü amaçlı kullanılan Embriyoskop cihazı	8
Şekil 4: OPU kültür kabı hazırlığı.....	10
Şekil 5:Hyaluronidaz Kültür kabı	10
Şekil 6. Hyaluronidaz sonrası için 4 damlacıklı kültür kabı.....	11
Şekil 7: ICSI için kullanılan kültür kabı.....	12
Şekil 8: Embriyoskop kültür kabı	12
Şekil 9: Embriyo biyopsi kabı.....	13
Şekil 10: OPU işleminde kullanılan cihazlar	14

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1:Çalışmada kullanılan solüsyonlar	8
Tablo 2:Çalışmada kullanılan tek kullanımlık malzemeler	9
Tablo 3:Çalışmaya dahil edilen hasta/ siklus verileri	18
Tablo 4:Morfokinetik embriyo gelişim parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması	19
Tablo 5:Son 5 yılda konu ile ilgili ulaşılabilen çalışmalar	21

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

mL	mililitre
μ l	mikrolitre
cm ²	santimetrekare
⁰ C	santigrad derece
Rpm	Dakikada devir sayısı
CO ₂	Karbondioksit
O ₂	Oksijen
YÜT	Yardımla üreme teknikleri
DEK	Dinamik Embriyo Kültürü
KOH	Kontrollü ovaryen hiperstimülasyon
OPU	Oosit toplama işlemi
DG	Dansite Gradient
ZP	Zona Pelusida
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IMSI	İntrasitoplazmik Morfolojik olarak Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu
LAF	Laminar air flow
PGT-A	Anöploidi amaçlı Preimplantasyon Genetik Tanı
aCGH	Array Komperatif Genomik Hibridizasyon

mII	Metafaz II aşaması
KOK	KümüLüs Oosit Kompleksi
NGS	Next Generation Sequencing
IVF	In Vitro Fertilizasyon
tPB2	İkinci polar cisimciğın görölme zamanı
tPNa	İki pronukleusun belirme zamanı
tPNf	Pronukleusların silinme zamanı
t2	İki hücreye bölünme zamanı
t3	Üç hücreye bölünme zamanı
t4	Dört hücreye bölünme zamanı
t5	Beş hücreye bölünme zamanı
t6	Altı hücreye bölünme zamanı
t7	Yedi hücreye bölünme zamanı
t8	Sekiz hücreye bölünme zamanı
t9+	Dokuz ve üzeri hücreye bölünme zamanı
tM	Tüm hücrelerin kaynaştığı zaman
tSB	Embriyonun ilk ekspanse olduğı zaman
tB	İlk yarıklanma zamanı
tEB	Blast olma zamanı
tHB	hatcging başlangıç zamanı

ÖZET

Son yıllarda dinamik embriyo kültüründe gerçekleştirilen çalışmalar, embriyo morfokinetik parametrelerine göre yapılan embriyo seçimlerinin gerek laboratuvar gerekse klinik sonuçlar açısından faydalı olduğunu işaret etmektedir. Gebelik başarısı yüksek embriyo seçilebilmesi özelliğinin yanında morfokinetik değerlendirmenin embriyonun kromozom komplementini yansıtıp yansıtmadığı da son dönemde en sık tartışılan konulardan biridir. Bu yönde elde edilebilecek tekrarlanabilir ve güvenli bir bulgu halen girişimsel olarak gerçekleştirilen PGT-A uygulamalarına duyulan ihtiyacı da büyük oranda azaltabilecektir. Bununla birlikte güncel literatürde bu konuda az sayıda çalışmada çelişkili sonuçlar vermektedir.

Bu tez çalışmasına 2013-2015 yılları arasında Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezine başvuran ileri kadın yaşı, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan düşük kayıpları nedeni ile PGT-A yöntemi uygulanan 77 vaka ve bu vakaların uygulama sırasında dinamik embriyo kültürü kapsamında büyütülerek morfokinetik analizleri gerçekleştirilen ve embriyo biyopsisi sonrasında kapsamlı kromozom analizi gerçekleştirilen 136 blastosist dahil edildi. Çalışma kapsamında her bir embriyo için kaydedilmiş olan tPB2,tPNa,tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, tM, tSB, tB, tEB ve tHB morfokinetik parametreleri ile kromozomal yapıların ilişkisi öploid ve anöploid gruplar halinde retrospektif olarak karşılaştırıldı.

Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda kadın yaşı ortalaması $37,4\pm 4,6$, önceki deneme sayısı ortalaması $3,6\pm 2,1$ ve alınan ortalama oosit sayısı $9,7\pm 4,2$ idi. 43 öploid ve 93 anöploid embriyonun gruplanması sonrası incelenen morfokinetik parametrelere göre gruplar arasında gerek erken ve gerekse geç klivaj sürecindeki parametrelerin ortalamaları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Çalışmamıza ait sonuçlar mevcut klinik ve laboratuvar şartlarında literatürde yayınlanmış mevcut modellemelere göre öploid/anöploid ayrımının tatmin edici bir düzeyde yapılamayacağı yönünde bir veri sunmaktadır. Bununla birlikte mevcut çalışmaya benzer bir yaklaşımla izole PGT-A endikasyonları ile daha fazla sayıda hasta ve embriyo kullanılarak yapılacak yeni analizler bu konuda yeni ve faydalı bir modelleme yapılabilmesine imkân sağlayabilir.

ABSTRACT

Recent studies involving dynamic embryo culture indicate that embryo morphokinetic-based embryo selection can be beneficial not only for embryology laboratory outcomes but also clinical results. Besides its ability to select the embryo with the highest implantation potential, whether morphokinetic-based embryo selection can reflect the chromosomal complement of an embryo is nowadays one of the mostly debated topics. Any safe and reproducible results that can be obtained on this issue can considerably decrease the need to apply invasive procedures such as PGT-A. However, number of studies on this topic in contemporary literature is scarce and existing papers usually present conflicting results.

In this thesis work, a total of 77 case performed between 2013 - 2015 in Bahceci Fulya IVF Centre and their 136 blastocyst-stage embryos which had been cultured in dynamic embryo culture, scored by embryo morphokinetics, biopsied and analyzed by comprehensive chromosomal screening due to the indications of advanced maternal age, repeated implantation failure and recurrent pregnancy loss have been included. During the course of embryo development, each embryo was scored for tPB2,tPNatPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, tM, tSB, tB, tEB and tHB morphokinetic parameters and their relations with the embryo's chromosomal structure by euploidy and aneuploidy groups have been compared retrospectively.

In the study group, mean female age was 37.4 ± 4.6 , mean number of previous trials was 3.6 ± 2.1 and mean number of oocytes retrieved was 9.7 ± 4.2 . After grouping 43 embryos as euploid and 93 embryos as aneuploid, means of each morphokinetic parameters compared between groups did not show and statistically significant difference neither in early- nor in the late-cleavage divisions.

Our findings in this study indicate that, under the same laboratory and clinical conditions, a successful modelling based on euploidy/aneuploidy status of embryos cannot be satisfactorily done. However, in a similar experimental setting, a successful modelling may be achieved by utilizing isolated PGT-A groups together with a much higher number of patients/embryos.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün değerlendirmesi doğrultusunda, çocuk sahibi olma arzusunda olan ve bir yıl içerisinde korunmadan cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilemeyen çiftler kısır veya diğer adı ile "infertil" olarak değerlendirilir. Toplumlar arasında değişiklik gösteriyor olsa da her toplumda yaklaşık %8-15 arası bir oranda infertil çift bulunduğu kabul edilmektedir (1). İnfertilite olgularının yaklaşık %40-50'sinde kadın, %30-40'ında erkek, %10-15'inde açıklanamayan infertiliteden söz edilir. Kadın faktörü tek başına incelendiğinde olguların %40'ında ovulatuvar disfonksiyon, %40'ında tubal ve pelvik patolojiler, %15'inde ise nedeni açıklanamayan infertilite olduğu görülmektedir.

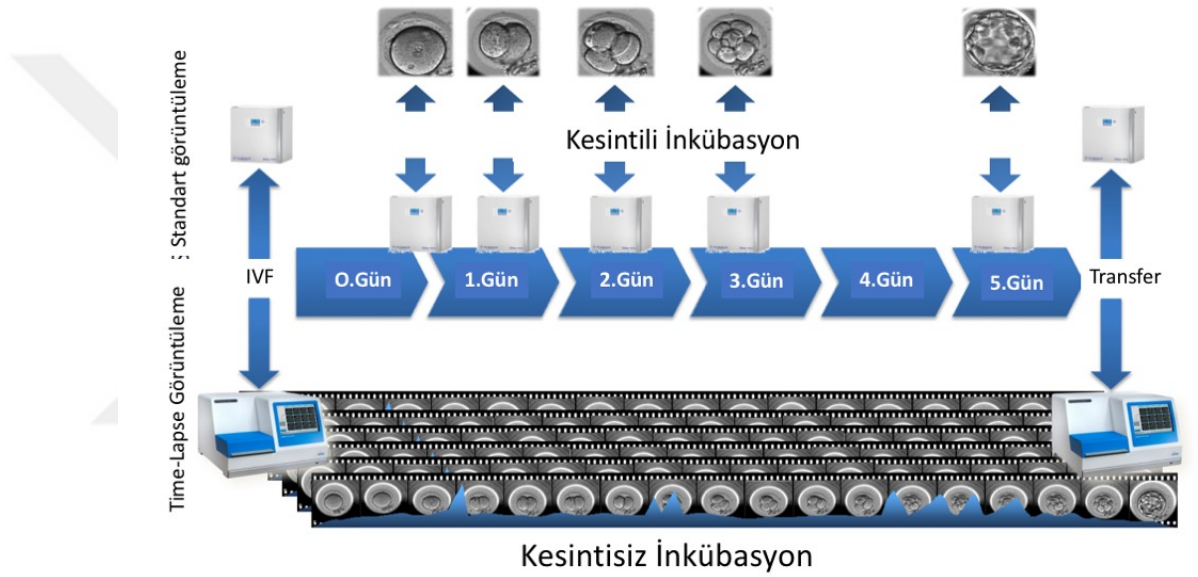
Günümüzde hayatlarının herhangi bir döneminde infertilite problemi ile karşı karşıya kalan çiftler son yıllarda oldukça hızlı gelişen yardımcı üreme teknikleri (YÜT) tanı ve tedavileri ile çocuk sahibi olabilmeye şansını artırabilmektedir. Dünyada YÜT sonrasında ilk gebelik ve doğum 1979 yılında İngiltere'de elde edilmiştir (2). İlk yıllarda tubal faktörü olan kadınlarda sperm ve yumurta hücrelerinin laboratuvarında aynı kap içerisinde bir arada tutulup döllenme sağlamaları (İn Vitro Fertilizasyon; IVF) şeklinde gerçekleştirilen uygulamalar günümüzde 1993 yılında keşfedilen sınırlı sayıda sperm gözlenen vakalarda seçilmiş spermlerin mikrokannüller aracılığı ile oosit içerisine enjekte edilmesi (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu; ICSI) ile de yaygın olarak gerçekleştirilmektedir (3). Günümüzde IVF ve ICSI teknikleri açıklanamayan infertilite, erkek infertilitesi, endometriozis, ovaryen yetmezlik gibi problemlerin çözümünde de yaygın kullanılır hale gelmiştir. Yapılan çalışmalar bu mikromanüplasyon tekniklerinin embriyo transferi sonrası prenatal veya postnatal dönemde spontan gebelik ve doğumlar ile kıyaslandığında belirgin bir konjenital anomali artışına sebep olmadığını göstermektedir (4,5).

YÜT tedavilerindeki esas amaç gelişen teknolojiyi ve kanıtlanmış tedavi yaklaşımlarını kullanarak mümkün olan en başarılı gebelik ve canlı doğum oranlarına ulaşabilmektir. Özellikle son yıllarda dünya genelinde her gün artan sayıda uygulanan tek embriyo transferi ile YÜT tedavilerinde çoğul gebeliklerin

engellenmesi hedeflenmektedir. Bunu başarabilmek için fertilizasyon, preimplantasyon gelişim ve implantasyon evrelerinin temel yollarını araştırmak büyük önem arz etmektedir ve günümüzde bu evreleri anlayabilmek için birçok çalışma yapılmaktadır. İmplantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyonun geliştirilmesi ve seçilmesini sağlayabilecek ortamlar ve parametreler geliştirilmesi adı geçen çalışmaların başında gelmektedir.

IVF ve ICSI sonrası embriyo gelişimi ve seçimi halen dünyada ve ülkemizde pek çok YÜT merkezinde konvansiyonel inkübatörler ve klasik morfolojik değerlendirme kullanılarak sağlanmaktadır (6). Bu amaçla üretilen embriyolar %6 CO₂ ve %5 O₂ içeren inkübatörlerde büyütülmekte ve belirli zamanlarda (fertilizasyon kontrolü, fertilizasyon sonrası 3. gün ve 5. gün vb.) statik olarak takip edilmektedir. Bu takipler laboratuvar ortamında çok kısa süre zarfında yapılsa da embriyoların dış ortamda geçirdikleri zaman zarfında gelişimlerine negatif etki olabilmektedir. Son yıllarda dünya genelinde sayıları günden güne artan kliniklerde kullanılan dinamik embriyo kültürü (DEK:kapalı sistem inkübasyon ve gerçek zamanlı embriyo değerlendirilmesi) ile embriyolar dış ortama hiç alınmadan gelişimleri takip edilebilmektedir. Dinamik embriyo kültürü insan embriyoları ile gerçekleştirilen YÜT tedavilerinde son yıllarda önem kazanmış olsa da bu teknolojinin memeli embriyolarında kullanımı daha öncesinde başlamış ve halen devam etmektedir. Doku ve organların sinematografik olarak incelenmesi ile 1900'lü yıllarda bu teknolojinin ilk kullanımları başlamıştır. Bu yıllarda embriyo kültür sistemleri henüz gelişmediğinden ötürü bu çalışmalar ancak 1960'lı yıllardan başlayarak kültür ortamlarının geliştirilmesi ile çalışmalar hızla artmıştır (7). Dinamik embriyo kültürünün konvansiyonel kültür sistemlerine göre en önemli avantajı, embriyo gelişim takibinde embriyoların kısa süreliğine dahi olsa dış ortama maruz kalmamasını sağlamasıdır (Şekil 1). Bunun yanı sıra, bu kültür sistemleri, tüm embriyoların gelişiminin takip ve analiz edildiği bir bilgi işlem ünitesi olarak görev yapmaktadır. Dinamik embriyo kültürü ile konvansiyonel mikroskop, inkübatör ve kayıt cihazları bir arada toplanmıştır. En yaygın olarak kullanılan gerçek zamanlı embriyo kültür sistemlerinde farklı odak katmanları bulunan mikroskop ünitesi bulunmakta ve belirli aralıklarla alınan dijital görüntü kayıtları birleştirilerek

embriyonun gelişimi kaydedilmektedir (8-10). Böylece, her embriyo tek tek kültür edilerek gelişiminin takip edildiği kompleks sistemler gelişmiştir (8,11). Bunun yanı sıra, morfokinetik değerlendirme implantasyon kapasitesi yüksek olan embriyoların seçilmesinde önem kazanmıştır. Morfokinetik değerlendirmeler ile farklı algoritmalar oluşturulabilmekte ve böylece implantasyon kapasitesi en yüksek olan embriyoları seçmek için evrensel bir sistem oluşturulması hedeflenmektedir.

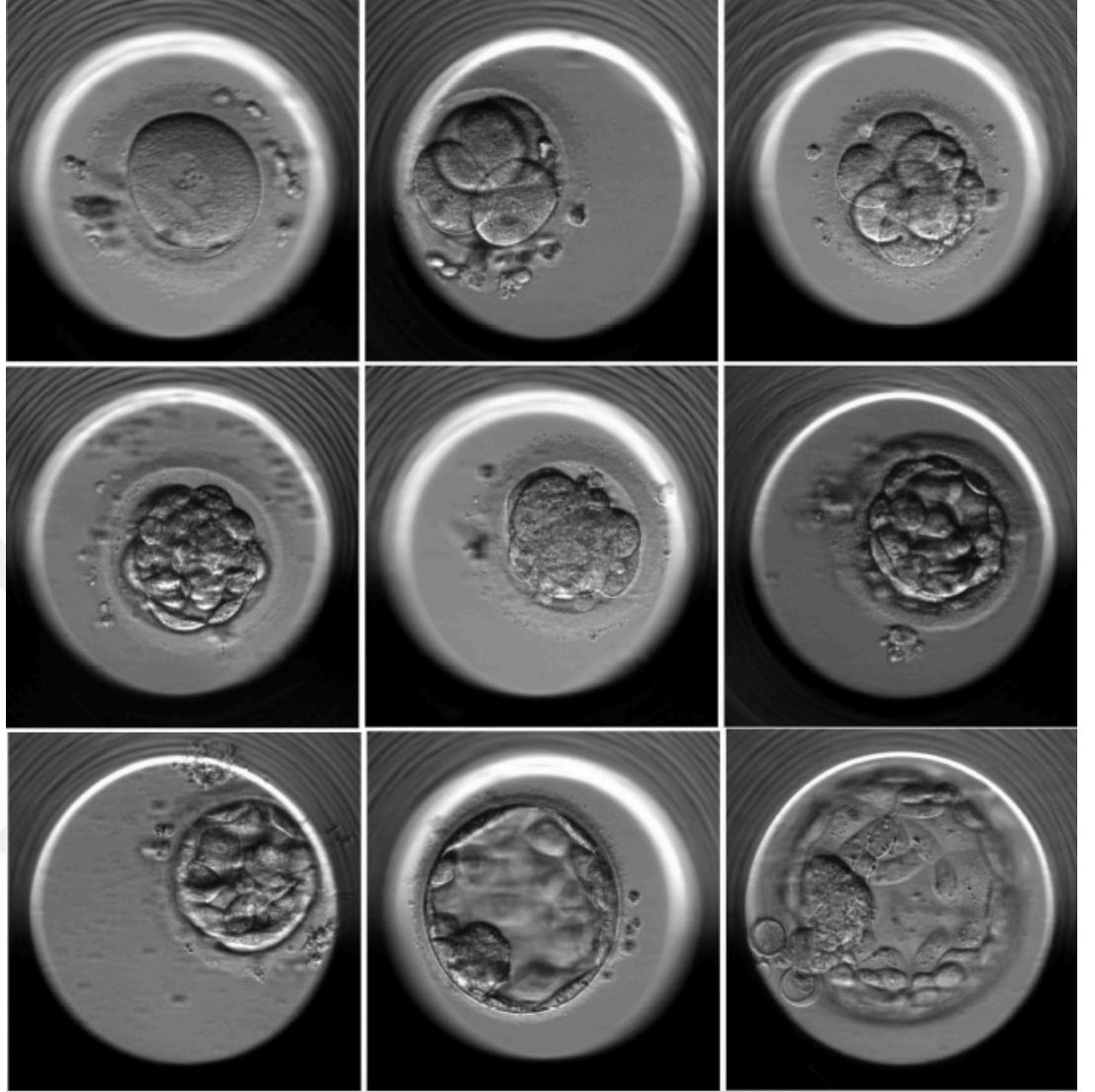


Şekil 1: Statik ve dinamik embriyo kültür sistemleri

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, morfokinetik değerlendirme ile birçok parametre incelenmiş olup bu parametreler blastosist gelişimi, implantasyon, öploid durumu ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle, blastomer eşitliği, fragmantasyon, multinükleasyon ve bölünme zamanları morfokinetik analizlerde önem taşımaktadır (12). Bunun yanı sıra, düzenli olmayan bölünme de (1 hücreden 3 hücreye veya 1 hücreden 5 hücreye direkt bölünme) morfokinetik analizlere dahil edilebilmektedir (11,13). Günümüze kadar yapılan morfokinetik çalışmalarda, embriyonun blastosist aşamasına ulaşma potansiyeli erken dönemdeki klivaj bölünmeleri (ilk üç mitoz bölünme) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (14-16). Bunun yanı sıra, birçok çalışma gebelik ile sonuçlanabilecek optimum embriyo seçiminde kullanılacak

morfokinetik parametreler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Özellikle infertilite nedeni (17), kadın yaşı (18), over rezervi ve stimülasyona cevabı (18-20), sperm morfolojisi (21), embriyo kültür medyumları (22-25) ve embriyo cinsiyeti (26) ile ilgili birçok morfokinetik değerlendirme yapılmıştır.

Son yıllarda dinamik hücre kültüründe gerçekleştirilen morfokinetik değerlendirmelere ait sonuçlar gebelik ve canlı doğum potansiyeli yüksek embriyo seçiminde morfokinetik parametrelere göre embriyo seçiminin önemini vurgulamaktadır. Dinamik hücre kültürü ve standart hücre kültürü ile gelişen embriyolarla gerçekleştirilen retrospektif bir incelemede, klinik gebelik oranının konvansiyonel hücre kültüründeki embriyolara göre %20,1 artış gösterdiği raporlanmıştır (23). Özellikle son beş yılda dinamik embriyo kültür sistemlerinin daha yaygın olarak kullanılmasıyla bilimsel literatürde raporlanmış morfokinetik değerlendirme sonuçlarının sayısı da artmıştır. Gelişen bu teknoloji ve morfokinetik değerlendirmelerle konvansiyonel kültür sistemlerinde analiz edilemeyecek parametreler de takip edilebilmektedir. Böylece insan embriyolarının gelişimi ve klinik sonuçlardaki etkisinin daha etkin ve tekrarlanabilir şekilde ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Preimplantasyon embriyo gelişimi esnasında morfokinetik parametrelerin daha iyi anlaşılması ve kullanışlı olanlarının belirlenmesi ile canlı doğum ile sonuçlanabilecek embriyo seçimine kullanılması hedeflenmiştir. Günümüze dek hayvan çalışmaları ve insan embriyolarında yapılan çalışmalar belirli morfokinetik parametreler ile implantasyon başarısı arasında korelasyon olduğunu göstermektedir (23,27).



Şekil 2: Dinamik embriyo kültürü ile takip edilen insan embriyosu görüntüleri

Bahsi geçen parametrelere ek olarak son yıllarda sıkça tartışılan bir diğer konuda morfokinetik değerlendirmenin embriyonun kromozom komplementini yansıtmayı yansıtmadığıdır. Bu konuda günümüze dek oldukça sınırlı sayıda çalışmada morfokinetik değerlendirmeler ile anöploidi ilişkilendirilmiştir (28-32).

Günümüzde gelişen preimplantasyon genetik tanı yöntemleri ve embriyo biyopsi teknikleri ile beraber PGT-A aday çiftlere ait embriyolarda oldukça yüksek güvenilirlikle öploidi veya anöploidi ayrımları yapılabilmektedir. Bununla birlikte her ne kadar güvenilirliği yüksek bir teknik olsa da PGT-A'nın invaziv bir yöntem

olması ve gider maliyetlerini yükseltmesi nedeniyle dünya genelinde son dönemde öploid/anöploid ayırımında invaziv olmayan yöntemler için yeni teknik ve araştırmalara yönelinmiştir. Embriyoların morfokinetik parametrelerinin değerlendirilerek klinik ve laboratuvar süreçlerinde öploid/anöploidi embriyo ayırımı yapılabilmesinde yol gösterici olabilecek anlamlı ve genellenebilir parametrelerin varlığı halen aktif olarak tartişılmakta olan bir konudur.

Çalışmamızda 2013-2015 yılları arasında Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezine başvuran ileri bayan yaşı, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan düşük kayıpları nedeni ile PGT-A yöntemi uygulanan vakalar ve bu vakaların uygulama sırasında dinamik embriyo kültürü kapsamında büyütülerek morfokinetik analizleri gerçekleştirilen embriyolarına ait bilgiler incelenmiş, embriyo morfokinetik parametreleri ile embriyoların sahip oldukları kromozomal yapıların ilişkisi (öploidi/anöploidi) araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezine Şubat 2013 ve Ağustos 2015 tarihleri arasında infertilite tanısı ile başvuran olgular içerisinde ileri bayan yaşı, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı ve tekrarlayan düşükler nedeniyle PGT-A endikasyonu konulan, mII (metafaz II) oosit sayısı en fazla 12 olan ve embriyolarda trofektoderm biyopsisi sonrası Array Komperatif Genomik Hibridizasyon (aCGH) yöntemi ile kapsamlı kromozomal tarama uygulanan olgular çalışmaya dahil edilmiştir.

2.2. Kullanılan cihazlar, solüsyonlar ve malzemeler

2.2.1. Kullanılan cihazlar

Çalışmada, IMSI (Intrasitoplazmik Morfolojik olarak seçilmiş sperm enjeksiyonu) sonrası dinamik embriyo kültürü ve takibi amaçlı Danimarka'da Unisense Fertilitech şirketi tarafından üretilmiş, optik gözlem ve kayıt sistemi olan, içerisine yerleştirilmiş embriyoların dış ortamdan izole olarak 37°C'de, %6 CO₂ ve %5 O₂ gaz karışımında gelişmesini sağlayan dinamik hücre kültürü inkübatörü (Embriyoskop; Şekil 3) kullanılmıştır.



Şekil 3: Dinamik embriyo kültürü amaçlı kullanılan Embriyoskop cihazı

2.2.2. Kullanılan solüsyonlar

Bu çalışmada Tablo 1’de üretici firma ve katalog numaraları verilen kimyasallar ve solüsyonlar kullanılmıştır.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan solüsyonlar

Solüsyon adı	Katalog no	Üretici firma
Modifiye HTF mediumu	90126	Irvine Scientific
Sperm yıkama mediumu	9983	Irvine Scientific
Puresperm-100	ET-HIS05-QI/04	Nidacon
Continuous single culture® complete	90165	Irvine Scientific
Serum substitute supplement(SSS™)	99193	Irvine Scientific
Hyaluronidase solution	90101	Irvine Scientific
PVP %10’luk	90123	Irvine Scientific
Embriyo kültür yağı	9305	Irvine Scientific
aCGH yıkama solüsyonu	LA00041	Igenomix

2.2.3. Kullanılan Malzemeler

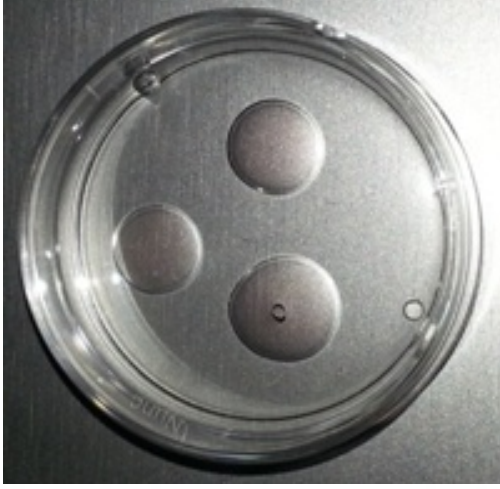
Bu çalışmada kullanılan tek kullanımlık malzemeler Tablo 2’de üretici firma ve katalog numaraları ile birlikte verilmiştir.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan tek kullanımlık malzemeler

Malzeme adı	Marka	Katalog no	Üretici firma
Oosit toplama seti	Smiths	ONS1833	Smiths Medical
Konik tüp (15 ml)	Falcon	352095	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı 5 ml'lik tüp	Falcon	352003	BD Sciences
25 cm ² 'lik flask	Falcon	353009	BD Sciences
60 cm kültür kabı	Falcon	353652	BD Sciences
60 cm kültür kabı	Nunc	150270	Thermo Scientific
Biyopsi pipeti	Sunlight	SBB-30Z-30	RMS UK
Holding pipeti	Humagen	MPH-SM-30	ORİGİO
ICSI pipeti	Sunlight	SIC-50H-30	RMS UK
PCR Tüpü	Axygen	PCR02G	Axygen
20 µl ep T.I.P.S	Physiocare	F29948O	Eppendorf
Embriyoskop kültür kabı	Vitrolife	FT-S-ES-D	Vitrolife

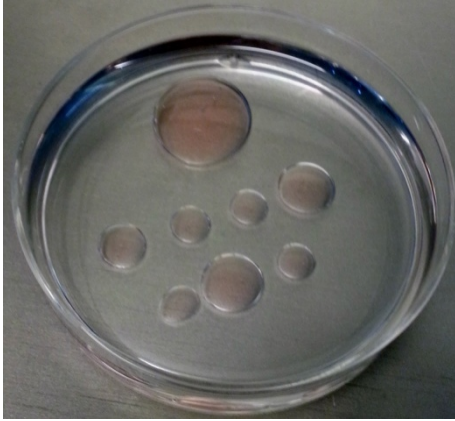
2.3. Hazırlık İşlemleri:

OPU kültür kabı hazırlığı: Her vaka için yumurta toplama işleminde ve işlem tamamlandıktan sonra aktarma için kullanılmak üzere 2 adet 60 cm’lik kültür kabı kullanıldı. Her birine 3 adet 300 mikro litrelik CSC medium damlacığı yapıldı ve üzeri embriyo kültür yağı ile kaplandı (Şekil 4).



Şekil 4: OPU kültür kabı hazırlığı

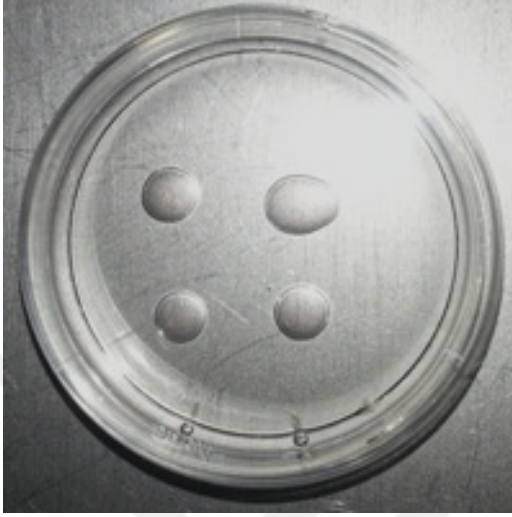
Hyaluronidaz Kültür kabı hazırlığı: Şekil 5’te gösterildiği gibi önce 1 ml’ lik steril pipet ile bir adet 375 μ l’lik damlacık (Hyaz damlacığı) ve pipetör yardımı ile ayıklama ve yıkama işlemi için kullanılacak 8-9 adet yaklaşık 40 -50 μ l’lik Heps’li medium damlacıkları hazırlandı. Hazırlanan 375 μ l’lik damlacık içerisine 125 μ l Hyaluronidaz solüsyonu ilave edildi ve damlacıkların üzeri tam olarak kapanacak şekilde embriyo kültür yağı ile kaplandı.



Şekil 5: Hyaluronidaz Kültür kabı

Hyaluronidaz (ayıklama) sonrası için kültür kabı hazırlığı

Her vaka için bir tane olmak üzere 60 cm'lik kültür kabına 4 adet 30 µl'lik CSC mediumu damlacığı yapıp üzeri embriyo kültür yağı ile kapatıldı (Şekil 6).



Şekil 6. Hyaluronidaz sonrası için 4 damlacıklı kültür kabı

Hepesli medium hazırlığı

Konik tüp içerisine 9 ml mHTF mediumu ve üzerine 1 ml SSS (Serum Substitute Supplement, Sentetik Serum Katkısı) ilave edilerek hazırlandı.

ICSI Kültür kabı hazırlığı

Altmış ml'lik Falcon 353652 kültür kabının kapağına saat 3, 6, 9 ve 12 hizasına mII oositler için 5 µl 'lik Hepesli medium damlacıkları hazırlandı. Saat 9 ve 12 hizasındaki damlacıkların arasına mII oositleri yıkama amaçlı 3 adet 10 µl 'lik Hepesli medium damlacıkları hazırlandı. Merkezde boş kalan alanın sol tarafına 10 µl 'lik sperm havuzu amaçlı 10 µl'lik Hepesli medium dikdörtgen şeklinde yayıldı. Sağ tarafa da 10 µl 'lik %10'luk PVP (Polyvinylpyrrolidone) damlacığı dikdörtgen şeklinde yayıldıktan sonra üzeri yeteri miktarda embriyo kültür yağı ile kaplandı. En az 30 dakika 37°C'de etüvde bekletildi (Şekil 7).



Şekil 7: ICSI için kullanılan kültür kabı

Embriyoskop kültür kabı (Embryoslide) hazırlığı:

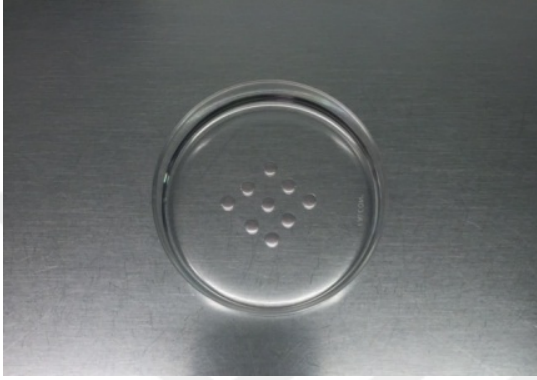
Şekil 8’da görülen kültür kabı içerisindeki 12 adet embriyo takip kuyucuğu ile sağda 2 solda 2 olmak üzere 4 adet embriyo yıkama kuyucuğuna 25 μ l CSC mediumu koyuldu. 20 μ l’lik steril pipet ucu ile stereo mikroskop altında hava kabarcıkları çıkarılarak üzeri 1,2 ml embriyo kültür yağı ile kaplandı.



Şekil 8: Embriyoskop kültür kabı

Biyopsi kültür kabı hazırlığı:

Biyopsi işlemi yapılacağı gün işlemden en az yarım saat önce her vaka için 1 tane biyopsi kültür kabı hazırlandı (Şekil 9).



Şekil 9: Embriyo biyopsi kabı

Yukarıda hazırlık aşamaları detaylı olarak belirtilen kültür kaplarından Hepseli medium içerenlerin dışındakiler vakada kullanılacakları günden bir gün önce hazırlandı. Kaplar kültür mediumunun gazlanması için kapakları yarı açık olarak %6 CO₂, %5 O₂, %95 nem ve 37°C sıcaklığa sabitlenmiş inkübatörlere yerleştirilerek gazlanmaları sağlandı. Hepseli medium içeren kaplar gerçekleştirilecek işlemde en az yarım saat önce hazırlanıp 37°C deki etüve kaldırılarak sıcaklık açısından dengelenmeleri sağlandı. Ayrıca yumurta toplama işlemi sırasında gerekli olan mHTF mediumu her vaka için bir tane olmak üzere 25 cm²'lik flasklara 25 ml olarak bölünüp bir gün öncesinden 37° C 'ye ayarlı etüve konuldu.

2.4. Protokoller

2.4.1. Ovülasyon indüksiyonu protokolleri ve yumurta toplama işlemi (OPU)

Tüm hastalar menstrüel siklusun 2. veya 3.günü merkeze gelerek kan ve transvajinal ultrasonografik değerlendirmeleri yapıldı. Kanda progesteron düzeyi 1.5 ng/ml'nin altında ve transvajinal ultrasonografide kistik oluşum gözlenmeyen hastalara

ovülasyon indüksiyon protokolü uygulanmaya başlandı. İndüksiyonun 6. günü antagonist (Cetrotide, Merck, İsveç) tedaviye eklendi ve hCG gününe kadar devam edildi. Hastalar belirlenen zamanlarda kan ve ultrasonografik olarak değerlendirildi ve 18mm ve üzeri 3 folikül görüldüğünde hCG (Ovitralle, Merck, İsveç) enjeksiyon saati verildi. Yumurta toplama işlemi (OPU) hCG enjeksiyonundan 35 saat sonra steril şartlarda, genel anestezi altında, transvajinal ultrason eşliğinde aspirasyon cihazı, oosit toplama seti, oosit toplama iğnesi kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 10).

Transvajinal ultrason eşliğinde aspire edilen folikül sıvıları 37 dereceye ayarlı ısıtıcı tablada muhafaza edilen 15 ml'lik tüplere bir gün önceden hazırlanmış mHTF solüsyonu kullanılarak toplandı ve en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

Laboratuvara ulaştırılan folikül sıvısı yumurta toplama kabına dökülüp laminar flow kabin içerisinde stereo mikroskop altında kümülüs oosit kompleksi (KOK) varlığı açısından kontrol edildi. Bulunan KOK yapıları steril pastör pipet yardımıyla bir gün önceden hazırlanıp gazlandırılmış kültür kabına aktarıldı.



Şekil 10: OPU işleminde kullanılan cihazlar

2.4.2. Sperm örneğinin hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen olgularda IMSI işlemi öncesinde sperm hazırlığı dansite gradient (DG) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. İşlem günü hastanın eşinden alınan sperm örneği, 30-40 dakikalık bir likefaksiyon süresi sonrasında makler kamerası ve mikroskop altında değerlendirildi ve sonuçlar kayıt edildi. Daha önceden

hazırlanmış olan gradient solüsyonları yardımı ile sperm yıkamada kullanılacak 3'lü gradient tabakası hazırlandı. Bu amaçla 15 ml'lik Falcon 2095 konik tüp içerisine önce sırasıyla her biri 0,5 ml olacak şekilde ve karışmamalarına dikkat edilerek %90, %70 ve %50'lik gradient medyumları nazikçe konularak 3'lü gradient hazırlandı. Ön incelemesi yapılmış olan sperm örneğinin 1-1,5 ml'lik kısmı, hazırlanmış olan bu üçlü gradient tabakası üzerine 45 derecelik açı ile steril pastör cam pipet ve pipetör vasıtasıyla konularak en üst kısımda yeni tabaka oluşturması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan tüm ve örnek, 500 G'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yıkanarak ayrışan ve tüpün tabanında toplanan sperm, steril cam pastör pipeti ile ve enjektör yardımıyla çekildi ve ardışık olarak 300 G'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Yıkama sonunda elde edilen sperm hücreleri makler kamarası ve mikroskop yardımıyla değerlendirilerek androloji kayıt defterine kaydedildi.

2.4.3. Hyaluronidaz işlemi uygulaması:

Hyaluronidaz işlemi OPU işleminden yaklaşık iki saat sonra ve en az yarım saat öncesinden hazırlanıp etüvde ısıtılmış hyaluronidaz kültür kabı kullanılarak gerçekleştirildi. Hyaluronidaz enzimi yardımıyla kümülüs hücrelerinden uzaklaştırılan oositler olgunluk seviyelerine (maturasyon) göre ayrıldı ve mII aşamasında olduğu tespit edilen oositler hyaluronidaz sonrası kültür kabına aktarılarak hastanın etiketi yapıştırıldı ve inkübatöre kaldırıldı.

2.4.4. IMSI İşlemi uygulaması:

IMSI uygulaması, mikromaniplator donanımına sahip invert mikroskobun ısıtılmış yüzeyinde, yaklaşık 6000 kat büyütme altında ve uçlarına açı verilmiş steril tek kullanımlık cam mikropipetler ile spermin oositin sitoplazmasına enjekte edilmesiyle gerçekleştirildi. Vakaya ait hazırlanmış sperm örneği ICSI kültür kabındaki sperm damlacığına ve PVP damlacığının alt bölgesine, mII oositler ise ICSI kültür kabındaki damlacıklara yerleştirildi. Enjeksiyon için seçilen sperm mekanik immobilizasyon sonrası kuyruk kısmından tutularak ICSI pipeti içine alınıp mII oosit damlacığına geçildi. Tutucu (Holding) pipet ile sabitlenen mII oosite uygun açı verilerek ICSI pipetine emme basıncı uygulandı ve oolemma kırılıp, sperm sitoplazma içerisine bırakıldı. Her mII oosit için aynı işlem tekrarlandı. Mikroenjeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra 1 gün önceden hazırlanmış ve

dengelenmiş olan embriyoskop kültür kaplarına, stereo mikroskop, pastör pipeti ve ağız pipeti yardımıyla her bir damlacık (drop) içerisinde 1 oosit olacak şekilde aktarıldı. Aktarım tamamlandıktan sonra kültür kabı Embriyoskop cihazına yerleştirildi.

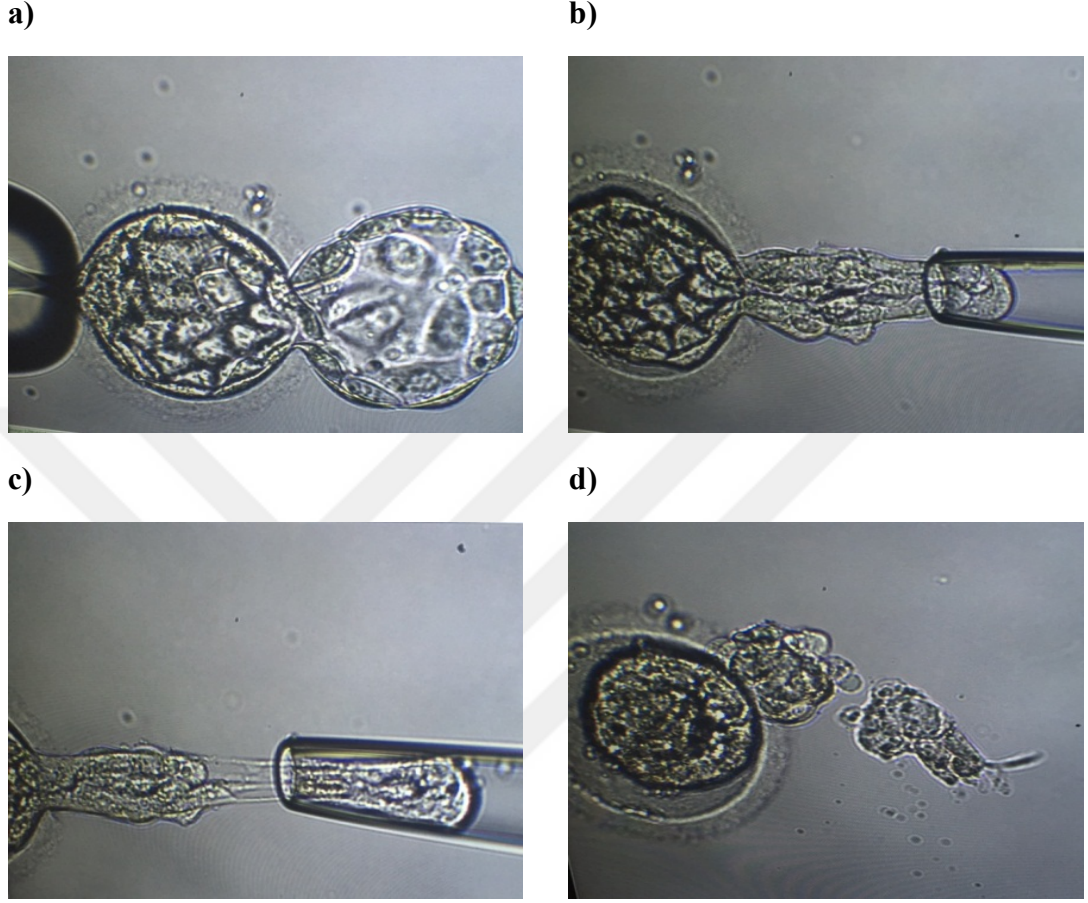
2.4.5. Fertilizasyon, ileri embriyo kültürü ve Assisted Hatching (AHA) İşlemi:

ICSI yapıldıktan sonra Embriyoskopa yerleştirilen oosit hücreleri DEK ile izlenmeye başlandı. Bu aşamada cihaz üzerinde gerekli zamansal bilgiler ve veri girişleri gerçekleştirilerek inkübasyon süreci başlatıldı. Her bir embriyonun dinamik kültürde büyütüldüğü süre boyunca gelişimleri 7 farklı fokal düzlemde ve 20 dakikalık aralıklar ile elektronik olarak kayıt altına alındı. Kayıtlar mevcut literatürde belirtildiği şekilde, tPB2, tPNa, tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, tM, tSB, tB, tEB ve tHB zamansal parametrelerine göre değerlendirilip skorlandı.

Embriyo gelişiminin 3.gününde kayıt duraklatıldı, embriyo gelişiminin beşinci yada altıncı gününde uygulanacak trofektoderm biyopsi işlemini kolaylaştırmak amacıyla lazer yöntemi ile zona pelusida (ZP) yapay olarak açıldı (assisted hatching, AHA). Embriyolar 1 gün önceden hazırlanmış olan yeni embryoslida içerisine aktarıldı. Kap cihaza yüklendikten sonra kayıt ve skorlama süreci kaldığı yerden devam ettirildi.

2.4.6. Trofektoderm biyopsi işlemi:

Blastosist evresine ulaşmış ve embriyo gelişiminin 3.gününde lazer ile AHA uygulanmış olan embriyolar biyopsi kabına aktarıldı. İnvirt mikroskobu altında dış hücre tabakasından (trofektoderm) iç hücre kitlesine (ICM) dokunulmadan yüksek büyütme altında biyopsi pipeti yardımıyla 4-6 hücre aspire edildi: Aspirasyon sırasında hücreleri trofektoderm 'den ayırmak için lazer kullanıldı (Şekil 11).



Şekil 11: Trofektoderm biyopsi işlemi aşamaları a. Biyopsi öncesi blastosist aşamasındaki embriyo tutucu pipet ile tutulur b. Dört ila altı trofektoderm hücresi biyopsi pipeti ile aspire edilir c. Lazer ışınları yardımı ile trofektoderm hücreleri blastosisten ayrıştırılır. d. Biyopsi ile alınan trofektoderm hücreleri ve blastosist

2.5. İstatistiksel analiz yöntemleri:

Çalışmaya dahil edilen sıkluslara ve embriyolara ait veriler ortalama ve standart sapma (Ort.±SS) olarak belirtilmiştir. Embriyoların her bir morfokinetik parametre yönünden gruplar arasındaki karşılaştırmaları t-testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiki anlamlılık derecesi olarak $P < 0,05$ alınmıştır. İstatistik yazılımı olarak GraphPad QuickCalc yazılımı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 77 vaka ve vakalara ait siklusların genel demografik özellikleri Tablo 3.' te verilmektedir.

Tablo 3:Çalışmaya dahil edilen hasta/ siklus verileri

	n, Ort.±SS
Toplam vaka/siklus sayısı	77
Kadın yaşı:	37,36±4,61
Önceki deneme sayısı	3,58±2,13
Alınan oosit sayısı	9,66±4,18
MII oosit sayısı	7,64±3,86
Normal fertilize zigot sayısı	5,62±2,96
Biyopsi yapılan blastosist sayısı	1,96±1,16

Olgularda tedavi sırasında kontrollü ovaryen stimülasyon kullanılarak elde edilen 581 matür (mII) oositin IMSI sonrası elde edilen 427 zigot dinamik embriyo kültür sistemi içerisinde büyütülerek embriyo morfokinetik değişimleri gözlenmiştir. Beşinci gün ve altıncı güne ulaşan toplam 136 blastosist aşaması embriyoya trofektoderm biyopsi işlemi uygulanmıştır. Alınan biyopsiler aCGH yöntemi kullanılarak kapsamlı kromozom analizi sonrası 43 embriyo öploid ve 93 embriyo anöploid olarak tespit edilip, sonuca göre normal ve anormal olarak iki farklı grup olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen embriyoların geçmişe dönük olarak morfokinetik gelişimi bölüm 2.4.5.'te belirtilen parametrelere göre kaydedilmiştir. Gruplar ve içerdikleri embriyolar her bir morfokinetik parametre için istatistiksel olarak incelenmiştir.

İncelenen morfokinetik parametrelere ait karşılaştırma Tablo 4'te görülmektedir. Normal ve anormal embriyoların morfokinetik değerlendirmeleri arasında herhangi bir fark saptanmamıştır.

Tablo 4: Morfokinetik embriyo gelişim parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması

	Normal (*)	Anormal (*)	p
tPB2	3,70±1,18 (35)	3,97±1,78 (70)	P=0,4189
tPNa	9,61±1,89 (36)	9,76±2,36 (69)	P=0,7421
tPNf	24,39±2,96 (37)	24,13±3,02 (70)	P=0,6706
t2	26,99±2,87 (43)	26,51±3,07 (93)	P=0,3885
t3	38,11±4,60 (43)	37,83±4,41(91)	P=0,7356
t4	39,54±3,57 (43)	39,60±4,61(91)	P=0,9401
t5	50,81±7,23 (43)	51,38±6,52(91)	P=0,6491
t6	54,44±6,34 (43)	54,41±6,43(91)	P=0,9798
t7	57,80±7,13 (43)	57,66±8,06(90)	P=0,9228
t8	60,93±7,74 (42)	61,40±9,35(91)	P=0,7770
t9+	71,48±10,03 (42)	70,26±11,79(92)	P=0,5621
tM	80,30±11,89 (42)	78,79±13,29(92)	P=0,5298
tSB	90,71±8,80 (42)	91,04±10,11(89)	P=0,8563
tB	98,33±7,68 (42)	100,35±9,36(89)	P=0,2255
tEB	106,39±7,49 (42)	108,63±9,66(84)	P=0,1903
tHB	111,23±9,56 (39)	113,56±9,40(79)	P=0,2104

*Parantez içerisindeki rakamlar parametre için değerlendirilen embriyo sayısını göstermektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde öploid/anöploid embriyo ayırımında dünya genelinde saygın merkezlerde uygulanan güncel yaklaşım embriyolardan blastosist aşamasında trofektoderm biyopsi işlemi ile trofoblast tabakasından 5-10 hücrenin örneklenmesi ve alınan hücrelerin aCGH veya yeni nesil dizileme (Next generation sequencing; NGS) tekniği ile mevcut kromozom yapılarının kapsamlı olarak değerlendirilmesidir. Ancak hücre örnekleme işleminin invaziv (girişimsel) olması, sonrasında kapsamlı kromozomal taraması için genellikle başarılı bir implantasyon süreci için kabul edilebilir sınırlardan daha fazla bir süreye ihtiyaç duyulması ve her iki yöntem için yüksek tecrübeye sahip uygulayıcı ihtiyacı gibi nedenler, merkezleri embriyoların kromozomal yapılarının tayininin girişimsel olmayan bir şekilde yapılabileceği, embriyo gelişimi ve canlılığı üzerinde risk yaratmayan yeni yöntemlerin araştırılmasına yönlendirmektedir. Bu kapsamda dinamik embriyo kültürü ile embriyoların morfokinetik değerlendirilmelerinin ve değerlendirilen embriyoların taşıyabildikleri kromozomal yapı farklılıklarının bazı morfokinetik parametreler bakımından ayrıştırıcı olabilecekleri yönünde bulgular içeren çalışmalar son yıllarda sayıları gittikçe artan araştırmacılar için ilgi konusu olmuştur.

Bu çalışmanın amacı, embriyoların taşıdıkları kromozomal yapı ile embriyo morfokinetik parametreleri arasındaki olası bir korelasyon varlığını, Şubat 2013 – Ağustos 2015 dönemi arasında farklı endikasyonlar nedeni ile PGT-A uygulanan, ICSI ile inseminasyon sonrası preimplantasyon embriyo gelişimleri Embriyoskop adı verilen time-lapse kültür sistemi kullanılarak takip edilen hastalara ait embriyolarda incelemektir.

Günümüzde embriyoların öploid/anöploid durumu öngörmede dinamik embriyo kültürü ile yapılan morfokinetik değerlendirmeleri analiz eden ve uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan toplam on bir çalışmaya (Tablo 5'te gösterilmektedir) ulaşılmıştır (29,30,33-41). Bu çalışmaların yedisinde öploid/anöploid embriyolarda morfokinetik parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gözlemlendiği bildirilmiştir

Tablo 5: Konu ile ilgili ulaşılabilen çalışmalar

alışmalar	alışma Dizaynı	Siklus Sayısı	Morfokinetik alışma Parametresi	Embriyo Sayısı	PGT-A tekniği	Değerlendirme Kriterleri
Chavez ve ark. (2012)	prospektif	45	2.gün	53	aCGH	t4
Chambell ve ark.(2013)	retrospektif	25	Blastosist	98	aCGH veya SNP array	tSB ve tB
Basile ve ark.(2014)	retrospektif	87	3.gün	504	aCGH	t2-t5
Kramer ve ark.(2014)	retrospektif/validasyon	25	Blastosist	149	aCGH	yok
Yang ve ark.(2014)	prospektif	yok	Blastosist	285	aCGH	yok
Chawla ve ark.(2015)	retrospektif	132	3.gün	460	aCGH	t2-t5
Rienzi ve ark.(2015)	retrospektif/validasyon	138	Blastosist	455	aCGH	yok
Minasi ve ark.(2016)	retrospektif	530	Blastosist	1730	aCGH	tSB,tB,tEB ,ve tHB
Balakier ve ark.(2016)	retrospektif	113	Blastosist	607	aCGH	yok
Patel ve ark.(2016)	retrospektif	26	3.gün	167	aCGH	t2-t5
Mumuşoğlu ve ark.(2017)	retrospektif/validasyon	103	Blastosist	415	aCGH	t9,tM,tSB,tB,tEB

(29,30,33–36,41). Dört çalışmada ise anlamlı farklılık saptanmamıştır (37–40). Bu konuda gerçekleştirilen öncü iki çalışmada öploidin morfokinetik inceleme ile öngörülmesinde yönelik modellemeler yapılmış (29,36) ancak bu modellemeler diğer çalışmalarda valide edilememiştir (39,40).

Çalışmamız sonuçları ve adı geçen çalışmalar detaylı olarak karşılaştırıldığında, öploid/aneuploid embriyo ayırımının morfokinetik parametrelerin incelenmesi ile yapılabilmesi inceleme sürecine dahil edilen olguların gerek ICSI endikasyonları gerekse PGT-A endikasyonlarının grup içinde farklılık arz ettiği görülmektedir. Çalışmamıza dahil edilen olgularda PGT-A uygulanma endikasyonları sırası ileri kadın yaşı, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı ve tekrarlayan düşüklerdir. Mevcut çalışmamızın dahilinde öploid/anöploid embriyolara ait incelenen morfokinetik parametrelerdeki benzerlikler ve mevcut literatürde bu yöndeki farklı tespitlerin başlıca nedenlerinden biri çalışmaya dahil edilen endikasyonların homojen oluşu olabilir. Ayrıca adı geçen çalışmalarda klinik olarak uygulanan tedavi yöntemlerinin detayları yer almamaktadır. Sadece Mumuşoğlu ve arkadaşlarının (41) gerçekleştirdiği çalışmada kullanılan modellemede kümeleme yöntemiyle KOH parametreleri de modelleme içerisinde yer almıştır. Bizim çalışmamızda ise uygulanan KOH protokollerinin aynı olması homojen hasta grubu elde etmemize olanak sağlamıştır. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın sonuçları uygulanan tedavi metotlarının homojenizasyonu ile daha gerçeğe yakın bir karşılaştırmaya izin vermesi açısından önemlidir.

Chavez ve arkadaşlarının (34) 2012 yılında yapmış oldukları morfokinetik analizde embriyoların erken bölünme aşamaları (4 hücreli evreye ulaşma süreleri) değerlendirilmiş, bu aşamaya kadar kaydedilen erken embriyonik bölünme zamanlarının öploid embriyolarda daha dakik ilerlediği, anöploid embriyoların ise sadece %30' unda bu yapının gözleendiği not edilmiştir. Campbell ve arkadaşları (30) 2013 yılında yapmış oldukları çalışmalarında blastosist aşamasına ulaşmış ve genetik inceleme sonucu belli olan 98 embriyo değerlendirilmiştir. Chavez ve arkadaşlarına kıyasla Campbell ve arkadaşları öploid/anöploid embriyolarda gerçekleştirilen karşılaştırmada geç embriyo gelişim döneminde (tSB ve tB zamanlarında) anöploid lehine anlamlı bir gecikme (gelişim ve klivajda yavaşlama) saptamışlardır (30,34). Mevcut çalışmamızda ise öploid/anöploid embriyo grupları

arasında erken ve geç klivaj sürecine ait incelenen tüm parametreler yönünden anlamlı bir fark gözlenmedi.

Chavez ve arkadaşlarının (34) sonuçlarına benzer şekilde Chawla ve arkadaşları (33) 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada erken klivaj dönemine ait parametrelerde (t2-t5) öploid ve anöploid embriyolarda farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte iki çalışma arasındaki temel fark çalışmalarda uygulanan embriyo biyopsi dönemleridir. Chawla ve arkadaşlarının çalışmasında embriyo biyopsi işlemi 3.gün blastomer biyopsisi şeklinde uygulanmış iken Chavez ve arkadaşlarına ait olan çalışmada kapsamlı kromozom inceleme trofoblast biyopsi işlemi sonrasında gerçekleştirilmiştir. Literatürde embriyolarda 3.gün gerçekleştirilen embriyo biyopsi işlemi ve sonrasındaki genetik ve klinik sonuçlar işlemin embriyo üzerindeki klivaj ve implantasyon performansını olumsuz yönde değiştirebildiğini, ayrıca 3.gün aşamasında gerçekleştirilen biyopsi işlemindeki embriyonik mozaikizm kaynaklı genetik sonuç farklılıkları oluşturduğu bildirilmektedir (42,43). Bu durum bahsi geçen iki çalışmanın uygun şekilde karşılaştırılmasını ve değerlendirilmesini sınırlamaktadır.

Minasi ve arkadaşlarının (36) 2016 yılında 1730 blastosist üzerinde yaptıkları çalışmada standart morfolojik değerlendirme ve morfokinetik parametrelerin aneuploidi ile korelasyonunu değerlendirmişler, tSB, tB, tEB ve tHB zamanlamasının anöploid embriyolarda farklılık gözlemlendiğini raporlamışlardır. Rienzi ve arkadaşları (38) ise 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada 455 blastosist aşaması embriyoyu analiz etmişler, analizleri sonucu incelenen morfokinetik parametrenin öploid/anöploid ayrımı yapabilme konusunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediklerini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmamızın sonuçları da istatistiksel olarak bir farklılık göstermemekte ve bu sonuç itibarıyla Rienzi ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Güncel literatürde öploid anöploid embriyo ayrımını yapabilmek amacıyla geliştirilmiş farklı modelleme sistemleri yayınlanmıştır (30,35,39,41). Her ne kadar iki modelleme sistemi yüksek güvenilirlikle öploid/anöploid ayrımını yapabildiğini öne sürse de, modellemeler istatistiksel analiz üzerinden geliştirilmiş hata payı olan sistemlerdir. Bu sebeple PGT-A gibi hata payı çok düşük olan bir sisteme alternatif olarak geliştirilen istatistiksel veriler üzerinden kurulmuş bir modelleme ile

embriyo seçimi yapmanın ne kadar doğru olacağı halen tartışmalıdır. Çalışmamıza ait sonuçlar mevcut klinik ve laboratuvar şartlarında benzer bir modelleme yapılabilmesinin bu açıdan tatmin edici bir aşamaya ulaşılmanın zor olacağı yönünde bir veri sunmaktadır. Bununla birlikte mevcut çalışmanın PGT-A endikasyonlarının 3 farklı grupta toplanması (ileri kadın yaşı, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan düşükler), hasta sayısının ve değerlendirilen embriyo sayısının az olması, bu sebeple çalışmada daha komplike analizlerin (kümeleme, modelleme vb.) yapılamaması gibi sebepler çalışmamızın zayıf yönleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Tez çalışması olarak başlayan bu çalışmanın devamında tek bir endikasyon ile (ileri kadın yaşı olan ve erkek faktörü olmayan olgular vb.) daha homojen grup hastalarda yapılacak değerlendirme ile çalışmanın devam ettirilmesi planlanmaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda 77 olguya ait toplam 136 blastosist aşaması embriyonun morfokinetik gelişim sonuçları ile trofektoderm biyopsi sonrası elde edilen kapsamlı kromozom tarama sonuçları öploidi/anöploidi bakımından gruplanarak karşılaştırılmış ve morfokinetik gelişim ile kromozomal yapı arasında herhangi bir yol gösterici benzerlik/farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Mevcut sonuçlar embriyonun kromozomal düzeydeki genetik sağlığı ile embriyo gelişim parametreleri arasında anlamlı bir korelasyon olmadığını işaret etmektedir.

5. REFERANSLAR

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S; International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod*. 2009 Nov;24(11):2683-7. doi: 10.1093/humrep/dep343
2. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. ESTABLISHING FULL-TERM HUMAN PREGNANCIES USING CLEAVING EMBRYOS GROWN IN VITRO. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1980;87(9):737-56.
3. Palermo GD, Neri Q V., Takeuchi T, Rosenwalks Z. ICSI: Where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med*. 2009;27(2):191-202.
4. Steel AJ, Sutcliffe A. Long-term health implications for children conceived by IVF/ICSI. *Hum Fertil*. 2009;12(1):21-7.
5. Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Westlander G, Wikland M, Wood M. Obstetric outcome of pregnancies following ICSI, classified according to sperm origin and quality. *Hum Reprod Oxford Engl [Internet]*. 2000;15(5):1189-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835216>
6. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000;73(6):1155-8.
7. Alexandre H. A history of mammalian embryological research. Vol. 45, *International Journal of Developmental Biology*. 2001; 45:457-67.
8. Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, De Los Santos MJ, Meseguer M. A time to look back: Analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertil Steril*. 2013;100(6).

9. Findikli N, Oral E. Time-lapse embryo imaging technology: does it improve the clinical results? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014 Jun;26(3):138-44. doi: 10.1097/GCO.0000000000000072
10. Aparicio B, Cruz M, Meseguer M. Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod Biomed Online*. 2013;27(6):654-63.
11. Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: A time-lapse study. *Fertil Steril*. 2012;98(6):1458-63.
12. Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod*. 2012;27(9):2649-57.
13. Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Clinical significance of intercellular contact at the four-cell stage of human embryos, and the use of abnormal cleavage patterns to identify embryos with low implantation potential: A time-lapse study. *Fertil Steril*. 2015;103(6):1485-1491.e1.
14. Hlinka D, Kalatova B, Uhrinova I, Dolinska S, Rutarova J, Rezacova J, Lazarovska S, Dudas M. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiol Res*. 2012;61(5):513-25
15. Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: A prospective cohort study. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2643-51.
16. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(4):371-81.
17. Wissing ML, Bjerger MR, Olesen AIG, Hoest T, Mikkelsen AL. Impact of PCOS on early embryo cleavage kinetics. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(4):508-14.
18. Gryshchenko MG, Pravdyuk AI, Parashchyuk VY. Analysis of factors influencing morphokinetic characteristics of embryos in ART cycles. *Gynecol Endocrinol*.

2014;30:6–8.

19. Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: A time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168(2):167–72.
20. Freour T, Masson D, Dessolle L, Allaoua D, Dejoie T, Mirallie S, et al. Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(4):1177–82.
21. Knez K, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Developmental dynamics of IMSI-derived embryos: A time-lapse prospective study. *Reprod Biomed Online.* 2013;27(2):161–71.
22. Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(9):891–900.
23. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertil Steril.* 2012;98(6).
24. Basile N, Morbeck D, García-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: A time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod.* 2013;28(3):634–41.
25. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril.* 2013;99(3).
26. Serdarogullari M, Findikli N, Goktas C, Sahin O, Ulug U, Yagmur E, et al. Comparison of gender-specific human embryo development characteristics by time-lapse technology. *Reprod Biomed Online.* 2014;29(2):193–9.
27. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remoh J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26(10):2658–71.

28. Montag M. Morphokinetics and embryo aneuploidy: Has time come or not yet , Reproductive BioMedicine Online. 2013;26:528-530
29. Campbell A, Fishel S, Laegdsmand M. Aneuploidy is a key causal factor of delays in blastulation: Author response to “A cautionary note against aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging.” Reproductive BioMedicine Online. 2014;28:279–83.
30. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. Reprod Biomed Online. 2013;26(5):477–85.
31. Del Carmen Nogales M, Bronet F, Basile N, Martínez EM, Liñán A, Rodrigo L, et al. Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. Fertil Steril. 2017;107(1):229–235.e2.
32. Swain JE. Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS? J Assist Reprod Genet. 2013;30(8):1081–90.
33. Chawla M, Fakhri M, Shunnar A, Bayram A, Hellani A, Perumal V, et al. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. J Assist Reprod Genet. 2014;32(1):69–75.
34. Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. Nat Commun. 2012;3:1251 doi: 10.1038/ncomms2249
35. Basile N, Nogales MDC, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. Fertil Steril. 2014;101(3):699-704 doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.005
36. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: A consecutive case series study. Hum Reprod. 2016;31(10):2245–54.
37. Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, et al. Selection of

competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: A prospective study with sibling oocytes. *BMC Med Genomics*. 2014;7: 38. doi: 10.1186/1755-8794-7-38.

38. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, et al. 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;30(1):57–66.
39. Kramer YG, Kofinas JD, Melzer K, Noyes N, McCaffrey C, Buldo-Licciardi J, et al. Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal? *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(9):1231–42.
40. Patel D, Shah P, Kotdawala A, Herrero J, Rubio I, Banker M. Morphokinetic behavior of euploid and aneuploid embryos analyzed by time-lapse in embryoscope. *J Hum Reprod Sci* [Internet]. 2016;9(2):112. Available from: <http://www.jhrsonline.org/text.asp?2016/9/2/112/183511>
41. Mumusoglu S, Yarali I, Bozdog G, Ozdemir P, Polat M, Sokmensuer LK, et al. Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient- and ovarian stimulation-related factors are taken into account with the use of clustered data analysis. *Fertil Steril*. 2017;107(2):413–421.e4.
42. Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, DeRycke M, DeVos A, et al. The why, the how and the when of PGS 2.0: Current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Mol Hum Reprod*. 2016;22(8):545–57.
43. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: A randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*. 2013;100(3):624–30.