



T.C.  
*İstanbul*  
YENİ YÜZYIL  
ÜNİVERSİTESİ

T.C.

**İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Time Lapse Görüntüleme ile Skorlanan Embriyoların  
Preimplantasyon Genetik Tarama Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Cihan Kaya**

**Klinik Embriyoloji**

**Tez Sorumlusu: Doç. Dr. Meriç Karacan**

**İstanbul, 2017**





T.C.  
*İstanbul*  
YENİ YÜZYIL  
ÜNİVERSİTESİ

T.C.

**İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Time Lapse Görüntüleme ile Skorlanan Embriyoların  
Preimplantasyon Genetik Tarama Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Cihan Kaya**

**Klinik Embriyoloji**

**Tez Sorumlusu: Doç. Dr. Meriç Karacan**

**İstanbul, 2017**

**TEZ ONAY SAYFASI**

**T.C.  
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANSI**

**Time Lapse Görüntüleme ile Skorlanan Embriyoların Preimplantasyon Genetik  
Tarama Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Cihan Kaya**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:13.12.2017**

**Tezin Savunulduğu Tarih:27.12.2017**

**Tez oy birliği ile kabul edilmiştir.**

**Tez Danışmanı**

**Doç Dr Meriç Karacan**

**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Tülay İrez  
Biruni Üniversitesi**

**Jüri Üyesi**

**Yrd. Doç. Dr. Gül İpek Gündoğan  
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**İSTANBUL 2017**



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin boyunca bilgilerinin, deneyimlerini ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen, başta değerli hocalarım Doç. Dr. Meriç Kayacan, Prof. Dr. Volkan Baltacı, ve Yrd. Doç. Dr. Evrim Ünsal olmak üzere tüm hocalarıma, yüksek lisans sürem boyunca beraber çalıştığım dönem arkadaşlarıma ve yaşamımın her aşamasında desteklerini hiç eksik etmeyen aileme ve eşime sonsuz teşekkür ederim.

**Dr. Cihan Kaya**

**İstanbul, 2017**



## ÖZET

**Amaç:** Time Lapse görüntüleme sistemi ile normal ya da anormal kromozom yapısına sahip embriyoların gelişimleri karşılaştırılması.

**Gereç ve yöntem:** Preimplantasyon genetik tarama yapılan 14 infertil hastadan elde edilen 57 embriyonun morfokinetik özellikleri Primovision Time Lapse sistem ile değerlendirilmiştir. Bölünme zamanları, polar cisim, eşit olamayan bölünme, ters klivaj, multinukleasyon, vakuolizasyon, fragmentasyon, pronükleus oluşumu ve sayısı kaydedilmiştir. Genetik materyal preimplantasyon genetik tanı (PGT) amacıyla alınarak Array Comparative Genomic Hybridisation (aCGH) işlemine tabi tutulmuştur. Time Lapse sistemi ile saptanan morfokinetik parametrelerin Society for Assisted Reproductive Technology (SART) ve British Fertility Society and Association of Clinical Embryologist (BFS/ACE) embriyo skorlamalarıyla ilişkileri değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** aCGH analiz sonuçlarında embriyolar normal ya da anormal kromozomal yapıda olmak üzere iki gruba ayrıldı. Vakuol oluşumu normal grupta ( $0,24\pm0,43$ ) anormal gruba ( $0,58\pm0,5$ ) göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p=0,02$ ). Eşit olmayan bölünme normal grupta ( $0,41\pm0,5$ ) anormal gruba ( $0,7\pm0,4$ ) göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p=0,04$ ). Ters bölünme normal grupta ( $0,18\pm0,3$ ) anormal gruba ( $0,53\pm0,5$ ) göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p=0,01$ ). Time Lapse parametrelerinden iki hücreye bölünme zamanı (T2) normal grupta ( $18,7\pm8,2$  saat) anormal gruptan ( $24,2\pm8,5$  saat) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ( $p=0,02$ ). 4 blastomerli evreye geçiş zamanı (T4) normal grupta ortalama ( $29\pm9$  saat) anormal gruba

(35,6±8,5 saat) göre daha kısaydı (p=0,02). Morula evresine geçiş zamanı (TM) normal grupta (69,4±18,1 saat) anormal gruba (83,2±16,1 saat) göre anlamlı derecede daha kısaydı (p=0,01).

**Sonuç:** Time Lapse yöntemi ile analizde, anormal kromozom taşıyan embriyolarda normal kromozom yapısındaki embriyolara göre vakuol oluşumu, eşit olmayan bölünme, ters bölünme ve T2, T4, TM zamanları daha yüksektir.

**Anahtar kelimeler:** embriyo, oosit, preimplantasyon genetik tanı, time-lapse görüntüleme



## **ABSTRACT**

**Aim:** To investigate the correlation between embryos with normal or abnormal chromosomal structures by evaluating preimplantation genetic screening results of the embryos scored with Time Lapse imaging systems.

**Material and methods:** Morphokinetic properties of 57 embryos derived from 14 infertile patients those had preimplantation genetic screening were evaluated by Primovision Time Lapse system. The parameters such as cleavage times, polar body, uneven cleavage, reverse cleavage, multinucleation, vacuolization, fragmentation, presence and number of pronucleus were recorded. Array Comparative Genomic Hybridisation (aCGH) procedure was performed by obtaining plenty of genetic material for Preoperative genetic diagnosis (PGD). The morphokinetic parameters obtained from Time Lapse system were evaluated considering Society for Assisted Reproductive Technology (SART) and British Fertility Society and Association of Clinical Embryologist (BFS/ACE) embryo grading scores.

**Results:** The embryos were divided into two groups as normal and abnormal chromosomal structured after aCGH analysis. Presence of vacuole was  $0,24\pm 0,43$  in normal group and while it was  $0,58\pm 0,5$  in abnormal group which was significantly higher ( $p=0,02$ ). Uneven cleavage was  $0,41\pm 0,5$  in normal group while it was  $0,7\pm 0,4$  in abnormal group which was significantly higher ( $p=0,04$ ). Reverse cleavage was  $0,18\pm 0,3$  and  $0,53\pm 0,5$  in abnormal group which was significantly higher ( $p=0,01$ ). As a Time Lapse parameter, cleavage time into two cells (T2) was  $0,18\pm 0,3$  in normal group and significantly lower comparing with abnormal group ( $p=0,02$ ). The time of 4 blastomer stage was  $29\pm 9$  hours in

normal group and was shorter than abnormal group (p 0,02). Time of morula stage was  $69,4 \pm 18,1$  and was shorter than abnormal group (p 0,01). There was good quality embryos with increased T2 time lower SART scores while increased BFS/ACE score. There was a significant correlation observed between abnormal chromosomal structure detected by aCGH analysis and T2, T4, TM and S2.

**Conclusion:** Increased number of of vacuole formation, uneven cleavage, reverse cleavage, T2 ,T4 , TM times, were seen in abnormal chromosomal structured embryos when compared to normal chromosomal structured embryos in Time Lapse analysis.

**Key words:** embryo, oocytes, preimplantation genetic diagnosis, time-lapse imaging

## İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	vi
İçindekiler .....	viii
Simgeler ve Kısaltmalar.....	ix
Tablolar .....	xi
Şekiller .....	xii
1. Giriş .....	1
2. Genel Kavramlar.....	2
2.1. İnfertilite Nedenleri.....	2
2.1.1. Tubal Faktör İnfertilitesi.....	2
2.1.2. Endometriyozis.....	3
2.1.3. Erkek Faktörü.....	3
2.1.4. Açıklanamayan İnfertilite.....	3
2.2. Yardımcı Üreme Teknikleri Terminolojisi.....	3
2.2.1. ICSI (Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu):.....	4
2.3. In vitro fertilizasyon Uygulamalarının Tarihçesi:.....	4
2.4. IVF’de Prognostik Faktörler.....	5
2.4.1. Maternal Yaş:.....	5
2.4.2. Over rezervi: .....	5
2.5. IVF Öncesi Değerlendirme.....	5
2.5.1. Erkek Faktörü:.....	6
2.5.2. Enfeksiyöz Hastalıkların Taraması: .....	6
2.5.3. Uterusun Değerlendirilmesi:.....	6
2.6. Ovulasyon İndüksiyonu ve Yumurta Toplama.....	6
2.6.1. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ovulasyon İndüksiyonu.....	7
2.6.1. GnRH agonisti veya antagonisti ile birlikte olan protokoller.....	7
2.6.2. Oosit toplama .....	12
2.7. Fertilizasyon.....	13
2.8. Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI ).....	13
2.9. Fertilizasyon ve Embriyo gelişimi.....	14
2.10. Embriyo Kültürü .....	16
2.11. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi. ....	16
2.12. IVF’te İmplantasyon Potansiyeli Yüksek Embriyonun Seçilmesi – Embriyonun Genetik Taraması:.....	20
2.13. Mevcut embriyo seçim teknikleri.....	21
2.14. Time Lapse Embriyo Değerlendirme Sistemleri.....	22
2.14.1. Primo Vision (Vitrolife, Sweden).....	23
2.14.2. Eeva (Auxogyn, United States).....	24
2.14.3. EmbryoScope (FertiliTech, Denmark).....	25
2.14.4. Miri (Esco, Denmark).....	27
2.15. Embriyo Transferi.....	29
3. Gereç ve yöntemler.....	30
4. Bulgular .....	31
5. Tartışma:.....	35
6. Referanslar.....	38
9. Ekler:.....	50

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

**ART:** Asiste reproduktif teknik

**ark:** Arkadaşları

**cm:** Santimetre

**dk:** Dakika

**IVF:** İn vitro fertilizasyon

**ICSI:** İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

**E2:** Östradiol

**IUI:** İntrauterin sperm enjeksiyonu

**ET:** Embriyo transferi

**hMG:** İnsan menapozal gonadotropin

**hCG:** İnsan koryonik gonadotropin

**FSH:** Folikül stimüle edici hormon

**GnRH:** Gonadotropin salan hormon

**IU:** İnternasyonal ünite

**HIV:** İnsan immune yetmezlik virüsü

**KOH:** Kontrollü ovaryan stimülasyon

**tPNf:** Pronukleus oluşumu

**t2:** 2 hücre zamanı

**t3:** 3 hücre zamanı

**t4:** 4 hücre zamanı

**t5:** 5 hücre zamanı

**tM:** morula zamanı

**tSB:** blastulasyon zamanı

**tB:** full blastosit zamanı

**cc:** blastomer hücre siklusu

**ECCs:** embryo hücre siklusu

**ECC2:** embriyonun 2 hücreden 4 hücreye geçişi

**ECC3:** embriyonun 4 hücreden 8 hücreye geçişi



## **TABLÖLAR**

**Tablo 1.** aCGH sonuçlarına göre normal ya da anormal kromozom yapısına sahip embriyoların morfolojik ve time-lapse verilerinin analizi.

**Tablo 2.** SART, BFS/ACE ve aCGH analizi sonuçları ile embriyoların morfolojik ve time-lapse verilerinin korelasyon analizi sonuçları.



## ŞEKİLLER

**Şekil 1.** Primo Vision (Vitrolife, Sweden), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı.

**Şekil 2.** Eeva (Auxogyn, United States), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı.

**Şekil 3.** EmbryoScope (FertiliTech, Denmark), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı.

**Şekil 4.** Miri (Esco, Denmark), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı.



## 1.GİRİŞ

İnfertilite, 1 yıllık korunmasız ilişkiye rağmen konsepsiyonun gerçekleşmemesi olarak tanımlanmaktadır. Yardımcı üreme teknolojilerin gelişmesiyle beraber infertilite tedavilerinde başarı oranları artmış ve daha çok infertil çiftin sağlıklı bebeklere sahip olması sağlanmıştır [1].

IVF'te temel yaklaşımlar, eşey hücrelerinden embriyo elde etmek ve bu elde edilen embriyoların kültüre edilip gelişimlerini takip edip uterusu transfer işlemlerini içermektedir. Yapılan çalışmalarda transfer edilen embriyoların %70'inin implante olamadığını ve sadece %14'ünün sağlıklı bebekler olarak dünyaya gelebildiğini göstermiştir [2]. IVF uygulamalarında sağlıklı bir gebeliği sağlayabilecek embriyonun seçimi son derece önem taşımaktadır. Güncel çalışmalar bu amaçla embriyonun kalitesini belirleyen biyomarker ya da morfokinetik parametrelerin bulunmasına yoğunlaşmıştır. Mevcut uygulamada yaygın olarak transfer edilecek embriyolar morfolojik durumuna ve bölünme hızına göre derecelendirilerek seçilmektedir. Bu yöntemler embriyonun canlılığı ve endometriyuma tutunabilme potansiyeli embriyo kalitesiyle bağlantılı değildir.

Günümüzde bu amaçla embriyo morfokinetik yapısını belirleyen, sürekli embriyo monitörizasyonu yaparak çeşitli zaman parametreleri elde edilmeye yarayan sistemler geliştirilmiştir. Time Lapse sistemleri adı verilen bu yöntemler sayesinde embriyo hareketlerine ait zaman parametreleri ile ve gebelik sonuçları arasında ilişki saptayan çalışmalar mevcuttur [3].

Çalışmamızda, Time Lapse görüntüleme sistemi ile skorlanan embriyoların preimplantasyon genetik tarama sonuçlarının değerlendirilerek normal ya da anormal kromozom yapısına sahip embriyolar arasında ilişki olup olmadığını saptanması amaçlanmıştır.

## **2. GENEL KAVRAMLAR**

İnfertilite, korunmasız olarak haftada en az 2-3 kez düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınmaması olarak tanımlanmaktadır. Sıklığı üreme çağındaki çiftlerde yaklaşık % 10-15 olarak bildirilmiştir [1]. Gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda evlilik yaşının ileri olması, çalışma koşulları ya da diğer sosyo-ekonomik nedenler ile gebeliğin ileri yaşlara ertelenmesi fertilitede azalmaya neden olan önemli faktörlerdir. İnfertilite sıklığı ve nedenleri toplumlar arasında farklılık göstermektedir. İnfertil çiftlerden % 30-40'ında erkek faktöre, % 40-50' sinde ise kadın faktöre bağlı infertilite görülebilirken, % 10- 15 çiftte ise mevcut standart tanısıl testler ile tanı konulamayan infertilite mevcuttur [4].

### **2.1. İnfertilite Nedenleri**

#### **2.1.1. Tubal Faktör İnfertilitesi**

Distal tubal hastalıkta hafif hasar veya minimal peritubal yapışıklık varlığında yaşı genç hastalarda cerrahi denense de ciddi hasar varlığında yardımcı üreme tekniği mutlaka uygulanması gerektiği bildirilmiştir [5]. Cerrahiye rağmen 1 yıl içerisinde gebe kalamayan olgularda, hastalığın ciddiyetinden bağımsız olarak yaşı ileri olan kadınlarda ve tekrarlayan distal tubal tıkanıklığı olan hastalarda yardımcı üreme tekniği tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Şiddetli distal tubal hastalığı olan kadınlarda IVF öncesi cerrahiden fayda görebileceği bildirilmiştir. Uterin kavite ile bağlantısı olan hidrosalpinks varlığında (proximal açık distal tıkalı) IVF ile elde edilen gebelik ve canlı doğum oranları neredeyse yarı yarıya azaldığı gösterilmiştir [6]. Hidrosalpinks sıvısı inflamatuvar karakterize olduğu, embriyo ve endometriyuma toksik etki gösterebileceği bildirilmiştir. IVF öncesi laparoskopik salpenjektomi yapılması IVF başarısını artırdığı görülmüştür [7].

### **2.1.2.Endometriyozis**

Minimal ve hafif endometriyozis varlığında tedavi seçenekleri olarak bekleme tedavisi, cerrahi tedavi, ovulasyon indüksiyonu + İntra Uterin İnseminasyon (IUI), IVF olabileceği bildirilmiştir. İleri evre endometriyoziste tedavi seçeneği cerrahi tedavi ve IVF'i içermektedir. İkisini karşılaştıran randomize klinik çalışma bulunmamaktadır. Şiddetli semptomları olan kişilerde cerrahinin en iyi başlangıç tedavisi olacağı belirtilmiştir. Cerrahi sonrası hastanın yaşı, cerrahi başarısı ve fertilitiyi etkileyen ek faktör olup olmamasına göre IVF-ICSI uygulanabileceği bildirilmiştir [8].

### **2.1.3.Erkek Faktörü**

Total motil sperm sayısı 5 milyonun altında ise IVF-ICSI uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Total motil sperm sayısı 3 milyonun altında ise, ciddi oligoastenospermi veya teratospermi mevcut ise ICSI uygulanması gerektiği belirtilmiştir. Azospermik hastalardan da testislerden sperm elde edilerek ICSI yapılabilmektedir. Total sperm sayısı 10 milyonun üstünde ise IUI'da iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Ortalama 3-4 siklus IUI uygulamasına rağmen gebelik elde edilmemiş veya ileri kadın yaşı varsa IVF-ICSI uygulanması gerektiği belirtilmiştir [9].

### **2.1.4.Açıklanamayan İnfertilite**

Açıklanamayan infertilite de IUI tedavisi 3-4 kez denenebilmektedir. Gebelik oluşmazsa IVF-ICSI yöntemine geçilmektedir. İleri kadın yaşında özellikle 38 yaş üzeri IUI uygulamaksızın direk IVF-ICSI yapılabileceği bildirilmiştir [10].

## **2.2.Yardımcı Üreme Teknikleri Terminolojisi**

Yardımla üreme teknolojisi (ART: Assisted Reproductive Technology), overden oositlerin elde edilmesini sağlayan tüm teknikleri içermektedir. İlk ve en yaygın yöntem in vitro fertilizasyondur, ancak gün geçtikçe teknolojik yöntemler de sayıca

artmaktadır. IVF-ET işlemi, eksojen gonadotropin ile yapılan kontrollü ovarian stimülasyonu, transvajinal ultrasonografi altında oosit toplama işlemini, laboratuarda fertilizasyonu ve embriyoların transservikal olarak transferini içermektedir [11] .

**2.2.1. ICSI (Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu):** Tek bir sperm için çok ince pipet yardımıyla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesidir.

### **2.3. In Vitro Fertilizasyon Uygulamalarının Tarihçesi:**

In vitro fertilizasyon ya da 'tüp bebek' yöntemi laboratuvar ortamında bir oositin spermatozoon ile fertilize edilmesi olarak tanımlanır. İlk IVF bebeğin 1978 yılında dünyaya gelmesinin ardından, yaklaşık 5 milyon bebek yardımcı üreme teknikleri kullanılarak dünyaya gelmiştir ve 2010 yılında Steptoe ve Edwards Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir [12, 13].

Yaklaşık 100 yıllık klinik çalışma ve keşifler sonucunda başarılı IVF gebelikleri için;

- 1) Matur oosit
- 2) Olgun sperm
- 3) Embriyo kültürü için uygun medium
- 4) Embriyonun uterusu güvenli biçimde transferi
- 5) Embriyo implantasyonu ve devamı için uygun destek tedaviler
- 6) Uygun embriyo kalitesinin belirlenmesi gerekmektedir.

SART çalışma verilerine göre tüm bu etkenlerin doğru yönetimi sonucunda Birleşik Devletler genelinde 2013 yılında 35 yaş altında %50'ye varan gebelik oranları bildirilmiştir. Günümüzde, embriyo morfolojisi ve bölünme oranları embriyo kalitesini belirlemede standart yöntemler olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında kromozomal analizler için biyopsi gibi invaziv girişimler de mevcuttur. Embriyo kalitesinin IVF başarısını etkileyen major etkenlerden biri olduğu düşünüldüğü zaman, embriyo değerlendirmesinde yeni tekniklerin araştırılması gerekliliği doğmuştur [14-16] .

## **2.4.IVF’de Prognostik Faktörler**

IVF ile ilgili başarı oranları çoğu bilinmeyen birçok faktöre bağlı olduğu bildirilmiştir. Bir IVF siklusuna başlamadan önce maternal yaş, over kapasitesi ve önceki üreme performansının değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir. Genç ve normal over kapasitesine sahip kadınlarda gebelik ihtimali, yaşlı ve kapasitesi daha düşük olanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sigara içen tüm kadınlarda sigara içiminin IVF öncesi kesilmesi gerektiği bildirilmiştir. Sigara içiminin başarı şansını yarı yarıya azalttığı tespit edilmiştir [17-19] .

**2.4.1. Maternal Yaş:** ART ile elde edilen başarı oranları, doğal fertilitede olduğu gibi, maternal yaş ilerledikçe azaldığı bildirilmiştir. Elde edilen oosit ve embriyo sayısının daha az embriyo fragmentasyonunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İmplantasyon ve canlı doğum oranları da genç kadınlara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. 2001 yılı için yapılmış ulusal özetinde embriyo transferi başına canlı doğum oranı 35 yaş altında % 41,1, 35-37 yaş arası % 35,1, 38-40 yaş arası % 25,4, 41-42 yaş arası % 14,5, 43 yaş için % 5,9, 44 yaş ve sonrası için % 2,9 olduğu bildirilmiştir [20-22] .

**2.4.2. Over rezervi:** Geriye kalan ovarian folikül havuzunun büyüklüğü ve kalitesi anlamındadır. Over rezervi ölçümü için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bir kadının sahip olduğu toplam oosit sayısı genetik olarak belirlenmiştir ve yaşam boyu giderek düştüğü bildirilmiştir. Doğumda 1-2 milyon iken, pubertede 300.000’e, 37-38 yaş arası (folliküler azalma arttığında) 25.000’e düştüğü tespit edilmiştir. Menopozda ise 1000’ den daha az olduğu bildirilmiştir [22- 24].

## **2.5.IVF Öncesi Değerlendirme**

IVF öncesi; over kapasitesi, erkek faktörü, enfeksiyöz hastalıkların taranması, transfer testi ve uterusun değerlendirilmesi gibi analizler yapılmaktadır.

**2.5.1. Erkek Faktörü:** IVF öncesi sperm tahlili tekrarlanmalıdır. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi aynı zamanda ICSI'nin önerilip önerilmeyeceğini belirlemektedir.

**2.5.2. İnfeksiyöz Hastalıkların Taraması:** IVF başarısını azaltabilecek ya da gebe kalınan siklusta spontan düşük riskini arttırabilecek fark edilmemiş Klamidya enfeksiyonunu saptamak için rutin tarama yapılması gerekmektedir. Her iki partnerin HIV, hepatit B, hepatit C enfeksiyonu açısından rutin tarama yapılması tıbbi ve laboratuvar ekibin korunması, IVF sonucu elde edilecek embriyonun korunması ve dondurulacak embriyolar arasında çapraz kontaminasyon olmaması açısından önerilmektedir [25, 26] .

**2.5.3. Uterusun Değerlendirilmesi:** Submüköz myomlar veya endometrial polipler implantasyonu etkileyebilmektedir ya da gebelik sonuçları üzerine olumsuz etkileri olabilmektedir. Bu nedenle uterin kavite çok iyi değerlendirilmelidir. Yaklaşık 6 aylık normal bir histerosalpingografi varsa yeterli olduğu bildirilmiştir [25, 26] . Uterin kaviteni hiç değerlendirilmemiş olması durumunda ya da ultrasonografide uterin patolojiden şüphelenildiği durumlarda sonohisterografi veya ofis histeroskopi endikasyonu bulunmaktadır.

## **2.6. Ovulasyon İndüksiyonu ve Yumurta Toplama**

IVF'te amaç; yumurtalıklardan olabildiğince çok sayıda ve iyi kalitede yumurta elde etmektir. Bunun için tedaviye alınan kadının yaş, kilo ve hormon seviyelerine bağlı olarak ovulasyon indüksiyonu protokolü düzenlenir. Kontrollü ovaryan hiperstimulasyon (KOH) denilen bu uygulama sırasında kullanılan ilaçların dozunun ayarlanması hem yeterli ve iyi kalitede yumurta elde etmek hem de kişiye sistemik bir zarar vermemek açısından çok önemlidir. Bu nedenle takip sırasında ultrason



sonuçları ve hormonların artış durumuna göre ilaçların dozu değiştirilip ayarlanmaktadır.

### **2.6.1.Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ovulasyon İndüksiyonu**

Yardımcı üreme tekniklerinde ovulasyon indüksiyonu amacıyla birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Bunlar,

- 1- Uyarım yapmadan spontan siklus takibi
- 2- Klomifen sitrat ile ovülasyon indüksiyonu
- 3- Gonadotropinlerle ovülasyon indüksiyonu
- 4- GnRH agonisti veya antagonisti ile birlikte olan protokollerdir.

#### **2.6.1.1) GnRH Agonisti Veya Antagonisti İle Birlikte Olan Protokoller**

##### **a)Uzun Etkili GnRH Agonistleri ile Yapılan Down Regülasyonun Sonrasında Ekzojen Gonadotropin Uyarımı Uzun (Long) Protokoller**

Uzun etkili GnRH agonistlerinin ortaya çıkması ile ART'de endojen hipofizer gonadotropin stimülasyonu baskılamak ve erken LH salınımını engellemek mümkün olmuştur. GnRH analogları hipofizden salınan FSH ve LH seviyelerini azaltmaktadır, folliküler gelişimi durdurmaktadır ve overin istirahatte olduğu dönemde ekzojen gonadotropinlere başlamaktadır. Erken lutealizasyonun IVF sikluslarının % 20 kadarında henüz oositler toplanamadan siklusların iptal edilmesine neden olduğu bildirilmiştir [27] .

GnRH agonisti altında vakaların ancak % 2 kadarı erken luteinizasyon ile komplike olduğundan dolayı foliküller yeterince gelişip olgunlaşmaya kadar induksiyona devam edilebileceği bildirilmiştir [28, 29]. GnRH agonist tedavisinin tek dezavantajı bulunmaktadır. Bir sonraki gonadotropin tedavisine karşı bir duyarsızlığa sebep olup

ihtiyaç duyulan gonadotropin dozunu arttırabildiği bildirilmiştir [28, 29].

GnRH agonistlerini içeren protokoller genel başlıklar halinde şu şekilde özetlenebilir:

1- Uzun Protokoller,

2-Oral kontraseptif ve uzun protokoller ,

3-Stop protokoller ,

4-Mikrodoz flare up ,

5-Kısa protokoller.

Uzun GnRHa siklusta, GnRH agonist tedavisi midluteal aşamada, ovulasyondan yaklaşık bir hafta sonra ya da adet 21. gününde başlanmaktadır. Bu dönemde endojen gonadotropin seviyelerinin düşük olduğu ve aynı zamanda agonistlerin sahip olduğu alev (flare) etkilerinin yeni bir folliküler gelişimi uyarmak anlamında en düşük seviyede olduğu bildirilmiştir [30].

Uzun GnRHa protokolde leuprolide başlayıncaya kadar veya gonadotropin enjeksiyonuna kadar 1,0 mg ile tedaviye başlanmaktadır. Sonrasında 0,5 mg'a düşülmektedir ve hCG enjeksiyonuna kadar devam edilmektedir. Naferelin için ise başlama dozu tipik olarak günde 2 kez 400 µg kadardır ve gonadotropin başladığında 200 µg'a düşmektedir. Tek sefer uygulanan uzun etkili GnRH agonisti tedavilerinin de (Goserelin, löprolid) uygun yaklaşım olduğu; ancak gonadotropin indüksiyonu için kullanılan doz ve süre günlük enjeksiyonlara göre daha fazla olduğu bildirilmiştir [31-33].

Hastaya GnRHa ile önerilen dozda medikasyon başladıktan sonra adet 2-4. gün arasında serum östradiol (E2) tayini ve transvajinal ultrasonografik muayenesi yapılmaktadır. Östradiol seviyesi <60 pg/ml'ye düşmesi ve yapılan transvajinal ultrasonografide 10-15 mm çapından daha büyük follikül saptanmaması ile yapılan hipofizer baskılanmanın yeterli olduğu tespit edilir. Serum E2 seviyesinin baskılanmaması veya >15 mm follikül saptanması durumunda mevcut siklus iptal edilmektedir. Hipofizer baskılanma saptanmış ise hastanın yaşı, vücut kitle indeksi, antral folikül seviyesi ve

önceki ovulasyon indüksiyonda verdiği optimum cevaba göre bireysel gonadotropin dozu ile uyarım yapılmaya başlanmaktadır. Genel olarak başlangıç dozu 150 ve 300 IU üriner FSH (uFSH), rekombinat FSH (rFSH) veya üriner menotropin (hMG) uygulanmaktadır. İndüksiyon şemasında step up ya da daha çok kullanılan step down yöntemi kullanılmaktadır. İlk indüksiyona başlandıktan 3-5 gün sonra yapılan serum E2 ve follikülometreden sonra hastanın verdiği cevaba göre 1-3 gün aralıklar ile monitarizasyona devam edilmektedir. Çoğu kadın 7-12 günlük bir uyarı dönemi gerekmektedir. Genelde hedef en az 2 tane 17-18 mm çapında follikül elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında olabilmektedir.

Tipik olarak, stimülasyon sırasında endometrial kalınlık izlenmektedir. Birçok çalışmada endometrial kalınlığın ART sikluslarında prognostik önemi tartışmalıdır. Bir çoğunda en iyi sonuç endometrial kalınlık 8-9 mm arasında iken veya trilaminar görünüm saptandığında alınmaktadır. Hedeflenen follikül sayısına ulaşıldıktan sonra son oosit maturasyonu için 5000-10000 IU hCG verilmektedir. Eş dozda rekominant hCG yaklaşık 250 µg'dır ve uygun bir alternatif yaklaşım olduğu belirtilmiştir. Küçük follikülerin daha da büyümesi için hCG enjeksiyonu geciktirilmesi kötü yanıtli hastalarda bir seçenek olsa da bu uygulama başarılı olmayıp tam tersi olumsuz etkilere sebep olabildiği bildirilmiştir [33].

#### **b)GnRH Agonisti ve Ekzojen Gonadotropinlerle Ardışık Olarak Yapılan Kısa Ya Da Flare Protokoller**

Kısa veya flare protokoller; Kısa protokolde gonadotropinlerin flare-up etkisinden yararlanılmaktadır. GnRH analoglarını ilk verilişini takiben dolaşımdaki LH seviyelerinde yaklaşık 400, FSH seviyelerinde ise yaklaşık 40 kat artış olduğu bildirilmiştir [34, 35]. Buna Flare- up etkisi denir. Hem uzun dönemli bir GnRH agonistinin ilk baştaki agonistik etkisini hem de

daha uzun tedavi döneminde uyarılan endojen gonadotropin salgısındaki baskılanmayı sağlaması açısından uygun alternatif yaklaşımlar olduğu bildirilmiştir. Özellikle kötü over kapasitesi olduğu düşünülen kişilere GnRH uygulama süresinin kısa veya dozunun azaltılması uygun stratejilerdendir. Kısa protokolda GnRHa adet 2-4 günü verilmektedir, daha sonra dozu azaltılmaktadır ve gonadotropin enjeksiyonu adet 3. günü başlanmaktadır. Kısa ve uzun protokolleri karşılaştıran yedi adet klinik çalışmayı içeren meta analizde her iki grupta benzer siklus iptali ve gebelik oranları saptanmıştır [34-36].

Ultra kısa GnRH agonist protokolü; flare etkiyi stimüle etmek için agonist tedavisi 3 gün boyunca verilerek daha sonra kesilir; tedaviye sadece gonadotropin ile devam edilmektedir [37].

Oral kontraseptif mikrodoz flare-up protokolü; kısa protokolün bir çeşitidir. Oral kontraseptif ile ovarian baskılanmayı takiben adet 3. gününden itibaren mikrodoz löprolid (günde 2 kez 40 mikrogram) tedavisi başlanmaktadır. Gonadotropin başlanması ve hCG zamanlaması diğer protokoller ile aynıdır. Oral kontraseptif – mikrodoz flare protokolü, serum FSH seviyeleri dramatik olarak yükselmiş ve daha önce kötü cevap verdiği bilinen kadınlarda, daha önce unilateral ooferektomize olmuş veya over cerrahisi geçirenlerde uygun tedavi yaklaşımı olduğu bildirilmiştir [38, 39]. Bu hasta grubunda daha düşük siklus iptal oranları, daha yüksek tepe estradiol düzeyleri, transfer oranları ve en önemlisi daha cesaretlendirici klinik ve devam eden gebelik oranları sağladığı belirtilmiştir [38, 39].

### **c) GnRH Antagonist Eklenecek Yapılan Eksojen Gonadotropin Protokoller**

İlk önce uyarıcı ve daha sonra inhibe eden uzun etkili agonistlerin tersine GnRH antagonistleri doz bağımlı şekilde GnRH reseptörlerini bloke ettikleri ve çabuk bir şekilde hipofizer inhibisyon ortaya çıkardıkları bildirilmiştir [40].

GnRH antagonistlerin agonistlere göre avantaj ve dezavantajları olduğu bildirilmiştir. Avantajları arasında; ovulasyon indüksiyon süresinin daha kısa olması, hipofizer supresyonun daha çabuk ortaya çıkması, folliküler evrenin geç aşamalarına kadar uygulanabilir olması, ortaya çıkabilecek östrojen eksikliği belirtilerinin daha hafif ve az olması, toplam kullanılan gonadotropin dozunun az olması, flare-up etkisinin olmaması nedeni ile asimetrik follikül gelişiminin daha az olması ve en önemlisi hiperstimülasyon riskinin daha az olabileceği sayılabilir [41].

GnRH antagonistlerinde dezavantajlar olabileceği de bildirilmiştir. Günlük düşük dozlarda uygulandığında tedaviye mutlak uyum gerekmektedir. Agonistler göre endojen gonadotropin salgısını daha kesin durdurabilmektedir. Ayrıca uzun agonist protokol kullananlara göre antagonist tedavisi alanlarda gebelik oranları hafif bir düşüklük gösterbileceği bildirilmiştir. Bunun nedeni GnRH antagonistlerin follikülogenez, blastomer oluşumu ve endometrial gelişmede önemli bir yere sahip mitotik programlamanın etkilenmesi olabileceği bildirilmiştir [42].

Kullanılan iki tip GnRH antagonisti mevcuttur. Bunlar, setrorelis ve ganirelis'tir. Her ikisi de erken LH artışını engellemek için cilt altına günlük 0,25 mg kadar uygulanmaktadır. Uygulanacak günlük enjeksiyonlar ise iki yöntemle uygulanabilmektedir. Birincisi, tedaviye gonadotropin tedavisi başladıktan 5-6 gün sonra başlanmasıdır ve fiks protokol adını almaktadır. Diğer yöntem ise verilen ovulasyon indüksiyon cevabına göre serum E2 seviyesi 400 pg/ml'yi geçtiği zaman ya da en büyük follikül 13-14 mm çapına ulaştığında antagonist başlanması şeklindedir ve fleksibil protokol adını almaktadır. Her iki yöntemde de hCG enjeksiyonuna kadar medikasyona devam edilmektedir. Araştırmalar sonucu fleksibil tedavi planında gerekli olan düşük doz tedavi ile daha iyi sonuç alınıyor gibi görünmektedir [43].

Günlük antagonist enjeksiyonuna alternatif olarak tek ve yüksek dozda setrorelax enjeksiyonu (3,0 mg) uygulanabilir bir alternatiftir. Böylece LH artışı 96 saat geciktirilebilmektedir. GnRH antagonist protokolleri özellikle normal kapasiteli kadınlar için uygun tedavilerdir. Özellikle agonistlere göre OHSS sıklığının daha az olması ve son oosit maturasyonu için hCG yerine GnRH agonisti kullanılması imkanını sağlaması bu ilaçların polikistik over sendromlu hastalardaki kullanımına çekmektedir.

### **2.6.2.Oosit Toplama**

Oosit toplanması genellikle hCG enjeksiyonundan 36 sonra gerçekleştirilmektedir. İntravenöz sedasyon altında transvajinal ultrasonografi eşliğinde oosit toplanmasının standart tedavi olduğu bildirilmiştir.

Profilaktik antibiyotik tedavisi (doksisisiklin 100 mg, sefoksitin 2 gr) toplamadan 30-60 dakika önce yapılması sıklıdır. Alternatif olarak oral antibiyotikler işlemden hemen sonra başlanabilmektedir.

Oosit toplanması sırasında ciddi komplikasyonlar sık görülmemektedir. Overden olan akut kanama veya uterin, ovaryan veya iliak damarlardan olan hematomlar nadir görülmektedir (0,04-0,07 oranında). Post operatif pelvik enfeksiyon riskinin düşük olduğu bildirilmiştir [44] .

Bu işlem için vajina arka duvarından ultrason eşliğinde yumurtalıkların içine doğru bir iğne sokularak foliküldeki sıvı, bir test tüpüne aspire edilmektedir. Stereo mikroskop altında yumurtalar folikül sıvılarından ayıklanarak toplanır ve uygun koşullarda (37°C, %5-6 CO<sub>2</sub>) iki saat süre ile inkübe edilmektedir [45] .

## **2.7.Fertilizasyon**

Fertilizasyon erkek faktörü ve düşük fertilizasyon ihtimali olduğu durumlarda konvansiyonel mikroinseminasyon ya da ICSI (İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) ile sağlanabilmektedir. Erkek faktörü infertilitesi olan IVF çiftlerinin yaklaşık % 80 kadarında ICSI yapılmıştır.

Oosit toplanmadan hemen önce ya da sonra masturbasyon ile semen örneği alınmaktadır. Sperm hazırlamak için de 2 yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler yüzme (swim-up) ve yoğunluk gradienti santrifugasyon (density gradient centrifugation) yöntemleridir. Her iki yöntem de inseminasyon için yüksek hızdaki hareketli spermleri saptayabilse de ikinci yöntem ayrıca şekil olarak da normal olanları ayırabilmektedir. Ayırılan spermler daha sonra kapasitasyon amacıyla yüksek oranda protein içeren mediumda 0.5-4 saat süreyle inkubasyona bırakılmaktadır [46]. Her oosit 50-100 bin hareketli sperm ile beraber 37<sup>0</sup> C, % 5'lik karbondioksitli ve % 98'lik nemli ortamda 12-128 saat kadar bekletilmektedir. Akrozom reaksiyonu zona pellusidayı geçmek için şarttır ve sperm ile zonanın teması ile ortaya çıkmaktadır. Sperm penetrasyonu ile kortikal reaksiyon ortaya çıkarak diğer spermlerin geçişine nisbeten daha dirençli bir yapı oluşturmaktadır. Konvansiyonel IVF tekniği ile % 50-70 arasında fertilizasyon sağlanmaktadır.

## **2.8. Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI )**

Mikroenjeksiyon ya da Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) ilk olarak 1992 yılında Belçika'da Brussel Free University'de Palermo ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. ICSI, tek bir sperm hücresinin bir mikropipet aracılığıyla oosit sitoplazması içerisine yerleştirilmesi işlemi olarak tanımlanmıştır.

ICSI uygulaması yapılacak oositin birinci polar cisimciğini atmış, yani metafaz 2 aşamasında olması gerektiği bildirilmiştir. ICSI yapılacak oositler bu işlemde önce hyaluronidaz enzimi aracılığıyla kümülüs hücrelerinden arındırılır. Bu yöntemle hem oositin manipulasyonu kolaylaştırılmakta hem de polar cisimciğin atılıp atılmadığı net bir şekilde gözlemlenmektedir [46].

ICSI Endikasyonları;

- 1- Şiddetli oligo-astheno-teratozoospermi
- 2- Geçirilmiş başarısız IVF öyküsü veya fertilizasyonun sağlanamaması
- 3- Cerrahi olarak sperm elde edilen durumlar (MESA ya da TESE ile elde edilmiş olması)
- 4- Preimplantasyon genetik araştırma planlanan durumlar
- 5- Antisperm antikorlarının varlığı
- 6- Spermin oosite bağlanma ve penetrasyondaki problemler sayılabilir.

## **2.9.Fertilizasyon Ve Embriyo Gelişimi**

Embriyo gelişimine ilk olarak over parankiminde tek sıralı granüloza hücreleri ile kaplı primer ya da primordial foliküllerdeki oogoniada başlamaktadır [47]. Bu safhada oogonia mayoz bölünme sürecine girerek kromozomal yeniden şekillenme ile haploid kromozomal yapıya ulaşmaktadır. Bu aşamadan sonra primordial folikül etrafındaki granüloza hücreleri çoğalmaya başlamakta ve oositin etrafında çok sıralı bir hücre katmanı oluşturarak sekonder folikül olarak adlandırılmaktadır [48]. Bu aşamaya kadar olan gelişimler hormonal uyarıdan bağımsız olup bundan sonraki folikül gelişimi hormon bağımlı olarak devam etmektedir. Hormon varlığında bazı hücrelerden salınan sıvı sayesinde antrum olarak adlandırılan içi sıvı ile dolu 2-5 mm boyutlarında tersiyer folikül gelişmektedir [49]. Hormon bağımlı gelişme sonucunda graff folikül olarak adlandırılan etrafı çok katlı granüloza hücresiyle çevrili folikül



gelişmekte ve ovulasyona hazır hale gelmektedir. Ovülasyon ile atılan oosit daha sonra tuba uterinanın infundibuler ucundan yakalanarak spermle karşılaşmak üzere beklemektedir. Oositin etrafında zona pellusida adı verilen bir zar bulunmaktadır. Bu zar polispermiyi önlemek amacıyla bir barier olarak bulunmaktadır [50].

Normal koşullarda sperm hücrelerinin baş kısmında bulunan akrozom bölgesinde zona pellusidayı geçmek için kullanılan litik enzimler bulunmaktadır [51].

Oosit ve sperm zarlarının birleşmesi ile sperm baş ve kuyruk kısımları oosit içerisine alınmakta ve sperme ait mitokondri dışarıda bırakılmaktadır [52]. Bu sayede oositin ikinci mayoz bölünmesi başlamakta ve ikinci polar cisimciği atılarak dışı pronükleusu oluşmaktadır. Sperme ait nukleus genişleyerek erkek pronükleusunu oluşturmaktadır. Bu iki pronükleusun oluşumu fertilizasyonun göstergesidir. Her iki eşey pronükleusu füzyon ile diploid kromozoma sahip zigotu oluşturmaktadır [52, 53]. Fertilizasyon sonucu oluşan zigot bölünme aşamasına girmektedir. Bölünme aşamasında zigot mitotik bölünme ile hücre sayısını arttırmaya başlamaktadır. Bu hücrelerin her biri blastomer olarak adlandırılmaktadır. İlk olarak 2 hücreli blastomer oluşur. Daha sonra 4,8,16 gibi ikiye katlanarak bölünme devam eder. Bu aşamadan sonra blastomerler birbirine sıkı bağlarla bağlanarak kompleks bir yapı olan morulayı oluşturmaktadır. Bu aşamadan sonra uterusu taşıyan hücrelerin içi uterusu gelen sıvı sekresyonları ile dolarak blastosel olarak adlandırılmaktadır. Embriyonun dış kısmına doğru itilen blastomerler içi sıvı dolu blastokist adını almaktadır. Bu aşamada bazı hücreler dış kısımda kalarak trofoektoderm adında daha sonra plasentanın gelişeceği epitelyal kısmı oluşturur. Bazı hücreler ise iç hücre kitlesini oluşturacak şekilde organize olarak embriyonun gelişeceği embriyoblastı oluşturur. Blastokistin gelişmesiyle zona pellusidaya olan baskı artar ve blastomerlerden salınan proteolitik enzimlerin etkisiyle

zona pellusida delinerek embriyonun salınması gerçekleşmektedir. Bu olaya 'hatching' denir. Bu aşamadan sonra trofoblastlar uterusla bir bağlantı oluşturarak implante olur ve embriyo gelişimi için gerekli besinler uterustan embriyoya transfer edilmeye başlar [54].

### **2.10.Embriyo Kültürü :**

Embriyo kültürünün ilk aşaması fertilizasyon kontrolü olup bu değerlendirme ICSI işleminden 12-18 saat sonrasında yapılır ve embriyo kültüründe 1. gün olarak adlandırılmaktadır. Bu evrede incelenen oositler ya normal olarak fertilize olmakta veya fertilizasyon yokluğu ya da anormal fertilizasyonu göstermektedirler. Kesin olarak ayrı iki pronükleusun varlığı normal fertilizasyonu göstermektedir. Embriyonun bölünmeye başladığı gün 2. gün olarak adlandırılır ve bu evrede embriyolar 2-4 blastomerli evrededir. Embriyo kültürünün 3. gününde 6-8 blastomerli olan embriyo 4. günde morula - kompaktlaşma evresinde olmaktadır. Kültürün 5. gününde blastokist evresindeki embriyolar gelişmektedir [54].

### **2.11.Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi:**

Gelişimsel olarak tüm embriyoların aynı kalitede olmadıkları bilinmektedir. Buna etki eden birden fazla faktör bildirilmiştir. Günümüzde embriyolar, bölünme kinetiklerine, blastomer sayısı ve boyutlarına, fragmantasyon oranına, blastomerlerin uzaysal oryantasyonlarına, nükleer durumlarına ve morula aşamasındaki bağlanma özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Bölünme kinetikleri embriyonu bölünme aşamasındaki hızını tariflemektedir. Güncel bilgiler ışığında beklenen zamanlarda bölünen embriyoların uterusu implantasyon oranlarının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Dahası beklenen zamandan erken ya da geç bölünen embriyoların öploidi/anöploidi durumunu göstermede bir belirteç olarak kullanılabilmesi de

bildirilmiştir. İnsanlarda ideal embriyo bölünme zamanları ilk gün-bir zigot evresi, ikinci gün 2-4 hücreli evre, üçüncü gün sekiz hücreli evre, dördüncü gün morula evresi ve beşinci gün blastokist evresi olarak bilinmektedir. Önceki çalışmalarda üçüncü günde transfer edilen 8 hücreli embriyoların yavaş bölünen ve beş ya da daha az sayıda blastomer içeren embriyolara göre daha az implantasyon başarısına sahip oldukları bildirilmiştir [55].

Mükemmel bölünmeden fragmantasyon olmadan eşit büyüklükte bölünen hücreler olduğu zaman bahsedilmektedir. Eşit olmayan bölünme fragmantasyonla birlikte düzensiz nükleer bölünmeye ve kromozomal anormalliklere neden olabilmektedir [56].

Fragmantasyon blastomerler arasında anükleer sitoplazmik yapılar olarak adlandırılmaktadır [57, 58]. Bu embriyolar düşük kalite embriyolar olarak nitelendirilip düşük implantasyon başarısıyla birlikte. Blastomerlerin uzaysal konumundaki oryantasyon embriyo kalitesini belirtmede kullanılan ayrı bir kriterdir. Embriyodaki ilk bölünme embriyonun aksına düz bir şekilde olmalıdır ve bunun sonucunda iki eşit hücre oluşmalıdır. İkinci hücre bölünmesi de aynı şekilde olmalı ve dört eşit hücre oluşumuyla sonlanmalıdır. Üçüncü bölünme ekvatoryal düzlemde olmalı ve tetrahedral görünümde bir embriyo ile sonuçlanmalıdır [59].

Embriyonun nükleer durumu daha önce belirtilen bölünme oranları ve uzaysal konumları kadar önemlidir. Blastomerlerin iki ya da daha fazla nükleus içermesi ya da multinükleasyon da embriyo kalitesini gösteren önemli bir belirteçdir [59]. Multinükleasyonun birden çok probleme neden olabileceği bildirilmiştir. Bunlar; sitokinez olmadan karyokinez, nükleusun parsiyel fragmantasyonu ya da kromozom ayrışmasında hata şeklinde olabilmektedir. Bunun sonucunda yüksek kromosomal

hatalarla birlikte düşük embriyo kalitesi oluşabilmektedir. Embriyo kalitesini gösteren bir diğer parametre ise embriyonun 16-32 hücreli evredeyken hücreler arası bağlantı durumudur. Sıkı bağlantılar hücrelerin bir arada durmasını sağlayarak embriyonun daha iyi bir iç hücre kütleşi yaratmasına ve sonraki gelişim basamaklarına ilerlemesine yardımcı olmaktadır. Bu bağlantıların tamamının olmaması ya da yarıdan fazlasının olmaması durumunda embriyonun gelişim basamakları gerçekleşmemekte yada azalabilmektedir [60] .

Yukarıda bahsedilen embriyo değerlendirme parametrelerinin embriyo implantasyon başarısında önemli olduğu kanıtlanmıştır. Ancak hangisinin yardımcı üreme tekniklerinde altın standart olarak tercih edilmesi gerektiği henüz bilinmemektedir.

İnsan fetusunun erken kaybı oldukça yaygın bir olaydır. Doğal tekiz fetusların yaklaşık %73'ü 6. haftaya ulaşmadan kayba uğramakta ve kalanların %90'ı doğumla sonuçlanmaktadır [61] .

İmlante olma olasılığı yüksek embriyoların seçimi üzerinde birçok araştırma mevcuttur. Öncelikle genetik sağlamlık implantasyonun gerçekleşmesi ve sağlıklı çocuk sahibi olmada kesin bir gerekliliktir. Ne yazık ki inkübatörlerde takip edilen embriyoların biyopsileri yapılarak incelenmeden genetik yapılarını bilebilmek mümkün değildir. Pek çok düşük kalite embriyo, normal ve sağlıklı fetuslar geliştirse de fragmentli ve arrest embriyolarda sayısal ve kromozomal anomalilerin daha sık olduğu görülmektedir [62] .

Diğer yandan 36 yaş üstü kadınlarda iyi morfolojili embriyolarda ölümcül genetik bozukluklar olduğu ortaya konmuştur [63]. Bu durum, morfolojik sınıflandırma sisteminin transfer için en iyi embriyoyu seçmede faydalı olduğunu ancak gelişimsel olarak normal olan embriyoların seçiminde sınırlamalar gösterdiğini ortaya

koymaktadır. Bu nedenle transfer edilecek embriyonun seçimi bazı küçük testlerle yapılmaya çalışılmaktadır.

Pek çok genetik bozukluğu olan embriyonun gelişimi erken dönemde durmaktadır. Pronükleer gelişimin ardından genetik bozukluğu olan embriyoların hızlı kaybı, sekiz hücre aşamasındaki embriyonun transfer için seçimini uygun kılmaktadır [64].

Değişik morfolojik kalitelardaki embriyolar sitogenetik açıdan incelendiğinde araştırmacılar, pronükleer aşamadaki anomali oranını %65, 2-4 hücre aşamasında %55 ve 5-8 hücre aşamasında ise %27 oranında tespit etmişlerdir. Kötü morfolojili embriyolar iyi olanlara göre neredeyse üç kat fazla genetik anomali göstermektedir. Embriyodaki genetik bozukluk oranını etkileyen diğer bir faktör de anne yaşındır. Anne yaşı ilerledikçe embriyolardaki anöploidi oranı artmaktadır.

IVF'teki son gelişmelere rağmen gebelik oranları önemli ölçüde arttırılamamış olup yüksek sayıdaki çoğul gebelik oranları hala önemli bir problem olmayı sürdürmektedir. Transfer edilecek embriyonun canlılığını ölçen kriterlerin kullanımı oldukça önemlidir. Yumurtanın gelişimi sırasında kaderini önceden belirleyebilmek transfer için en iyi embriyoların seçiminde yardımcı olabilir ancak ekstrasitoplazmik ve intrasitoplazmik morfolojilerine bakılarak yapılan bu non-invaziv seçimin belirleyiciliği çok zayıftır. Son dönemde foliküler vaskülarizasyonun oositin gelişimsel kaderini öngörmede belirleyici olduğu öne sürülmektedir [65].

Bu verilerden yola çıkılarak doğal seleksiyonun sekiz hücre aşamasının ötesinde erken fetal gelişim sırasında da sürdüğünü ön görebiliyoruz. Embriyonun kültür süresi uzatıldığında daha iyi embriyoların ayırt edilebileceği düşünülerek standart 2-3. gün transferi yerine 4. günde morula ya da 5. günde blastokist transferi yapılarak daha yüksek oranda implantasyon elde edilebilmekte, anöploidi riskini de azaltmaktadır

[66].

İmplantasyon şansını arttırmak amacıyla potansiyel embriyo seçimi için uygulanan başka bir yöntem ise erken klivaj kontrolüdür. ICSI sonrası 25-27. saatlerde yapılan ilk embriyo klivaj kontrolü ile klivaja giren embriyolar takip edilip transferi yapıldığında gebelik oranlarının arttığı bildirilmiştir [67] .

Pronükleer morfoloji değerlendirmesi de implantasyon potansiyeli yüksek olan embriyoların seçiminde kullanılacak diğer bir yöntemdir [68].

## **2.12.IVF'te İmplantasyon Potansiyeli Yüksek Embriyonun Seçilmesi – Embriyonun Genetik Taraması**

Genetik yapısının normal olmasının embriyoların implantasyon başarısı daha yüksektir. Bu nedenle preimplantasyon genetik tanı (PGT) yöntemiyle transfer öncesi embriyolar taranarak sağlıklı embriyoların transfer edilmesi hedeflenmektedir. İlk uygulama Handyside tarafından bildirilmiştir [69].

PGT'nin temel zorlukları arasında en önemlisi tek ya da az sayıda hücreden genetik test yapılma zorunluluğudur. Tek hücrenin alınması (embriyo biyopsisi) ve genetik test için hazırlanması, sonuca kısa süre içinde (transfer gününden önce) ulaşılma zorunluluğu, testlerin tekrar edilememesi, sonuçların değerlendirilmesindeki güçlükler (mozaiklik, kontaminasyon vb) testin diğer önemli sınırlamaları arasındadır.

IVF sonrasında elde edilen iyi kalite embriyolarda anöploidi en yaygın anormalliktir ve poliploidi ve mozaikliğin aksine anöploidi embriyonel kalitenin artması ile azalma göstermemektedir. Bu nedenle klivaj oranları ve morfolojik parametreler dikkate alınarak embriyo transferi yapıldığında poliploidi ve mozaikliğin eliminasyonu sağlanabilir ancak anöploidili embriyoların ekarte edilmesi sağlanamaz. İyi kalite

embriyonun transfer için seçilmesi kromozomal olarak anormal embriyo replasmanını azaltmaktadır [70].

### **2.13.Mevcut embriyo seçim teknikleri**

Günümüzde bir çok teknolojik araştırma IVF başarısında önemli yere sahip embriyo kalitesini değerlendirmek amacıyla dizayn edilmektedir. Özellikle tek embriyo transferinde en kaliteli embriyonun seçimi hedeftir, ancak henüz bu amaca uygun yeterli teknolojik gelişmeye ulaşamamıştır. Mevcut teknolojiler mikroskop altında embriyoların incelenmesine dayanmış olup inceleyicinin insiyatifne bağlı yöntemlerden oluşmaktadır [71].

Son yıllarda özellikle non invaziv daha objektif değerlendirme kriterlerine sahip teknikler geliştirilmiş; kumulus hücre gen ekspresyonları, Time Lapse sistemleriyle erken evre hücre bölünme oranları ve embriyonun metabolik profilinin spektroskopik yöntemlerle incelenmesi gibi yöntemler seçimde kullanılmaktadır [72, 73].

Günümüzde Time Lapse teknolojisi embriyo gelişimini değerlendirmede önemli bir rol oynamaktadır. EmbryoScope sistemi (Unisense A/S; Aarhus Denmark) ile embriyolar kontrollü bir sıcaklık ve gaz kontrolü olan inkübatörde saklanırken 24 saatlik düzenli bir kontrol imkanı sağlamaktadır [74].

Birleşik Krallık'ta, insan fertilizasyon ve embriyoloji otoriteleri iatrojenik çoğul gebelikleri önlemeyi amaçlamıştır. Bu amaçla tek embriyo transferinin en etkin yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut embriyo değerlendirme sistemleriyle kaliteli embriyonun değerlendirilmesinin yeterli olmayacağı bildirilmiştir. Bu değerlendirmenin laboratuvarlar arasında da farklılık gösterebileceği vurgulanmıştır. Sonuç olarak Klinik Embriyologlar Cemiyeti (ACE) ve İngiliz Fertilité Cemiyeti (BFS) tarafından embriyo değerlendirme rehberi yayınlanmıştır. Bölünme

aşamasındaki embriyoları için blastomer sayısı, blastomer boyutu ve fragmantasyon derecesi ile oluşan bir değerlendirme sistemi oluşturulmuştur [75] .

Amerika Birleşik Devletleri'nde Yardımcı üreme teknolojileri birliği (SART) tarafından standardize embriyo değerlendirme skorları geliştirilerek basit üniversal bir embriyo değerlendirme sistemi geliştirilmiştir [76]. Tüm embriyolara uygulanabilen basit bir derecelendirme sistemi (iyi, orta, kötü) geliştirilmiştir. Bölünme aşamasındaki embriyolarda framantasyon ve simetrisinin not edilmesi ve blastosist aşaması için iç hücre kitlesi ve trofoektoderm değerlendirmesi geliştirilmiştir. Vermon ve ark. 70000 transfer edilen embriyonun bu değerlendirme sistemine göre iyi olması sonucunda canlı doğum oranlarını önemli oranda tahmin ettiğini göstermiştir [77].

#### **2.14.Time Lapse Embriyo Değerlendirme Sistemleri**

Time Lapse sistemler 1990'ların başından beri embriyo seçiminde non invaziv yöntem arayışları sonucunda bulunmuş, embriyoların morfokinetik özelliklerine göre seçimi temeline dayanan görüntüleme ve takip sistemleridir.

İlk Time Lapse yöntemle değerlendirilen embriyo ile elde edilen bebek 2010'da Pribenszky ve ark tarafından bildirilmiştir [78].

Bu sistemler ile embriyo gelişim süreçlerindeki ana olaylar ve bölünme paternleri hakkında bilgi edinilebilmektedir. Embriyo gelişim aşamalarında kritik öneme sahip; polar cisim oluşumu, pronukleus (PN) formasyonu, vakuol formasyonu, fragmantasyon formasyonu, ters klivaj , klivaj zaman noktaları ve klivaj aralıkları gibi olaylar Time Lapse sistemleri ile belirli zaman aralıklarında kayıt altına alınarak sonradan incelenebilmektedir.



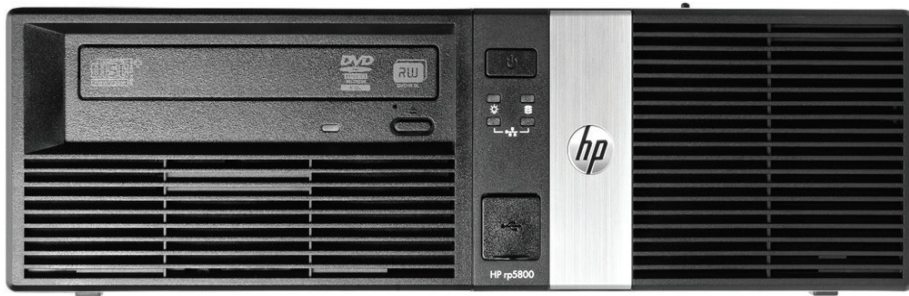
Meseguer ve ark., Time Lapse inkübatörde takip edilen embriyoların klasik inkübatörde takip edilen embriyolara göre daha başarılı klinik gebelik sonuçları olduğunu bildirmişlerdir [3]. Siristatidis ve ark. Time Lapse sisteminin klasik inkübatörlü embryo kültürüne göre implantasyon oranlarını, gebelik oranlarını arttırdığı, erken gebelik kayıplarını azalttığını bildirmişlerdir [79].

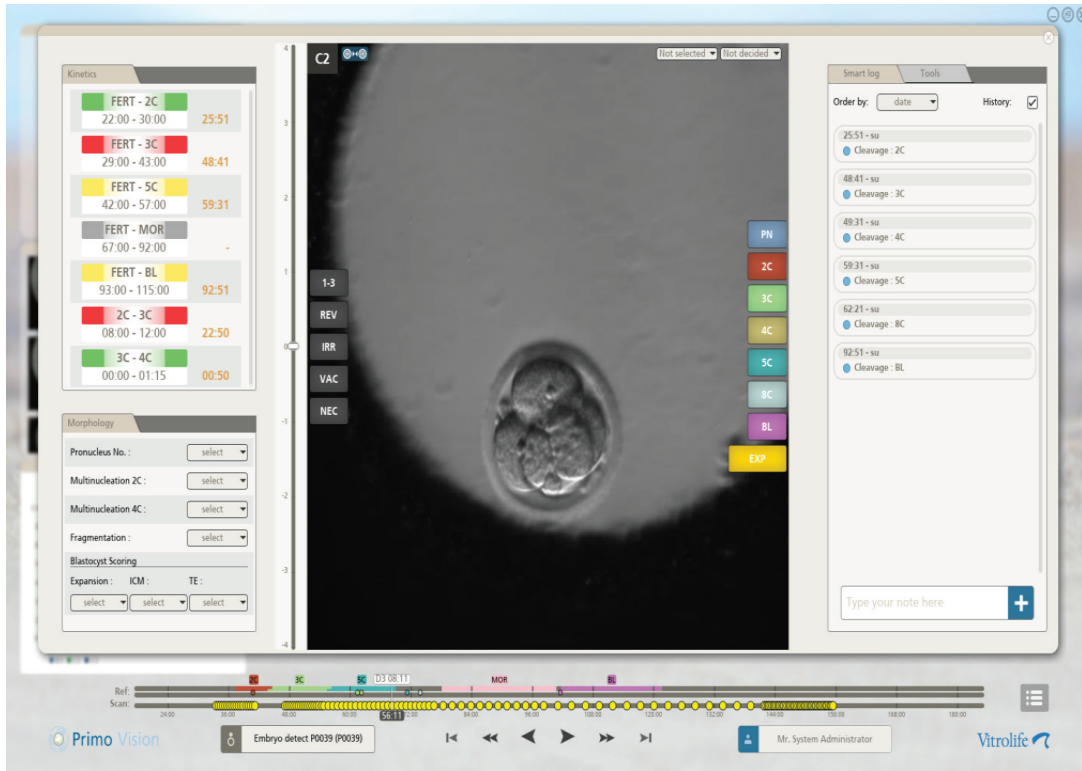
Time Lapse sistemler temelde; yüksek çözünürlüklü mikroskop, embriyonun konulduğu bir kültür kabı, inkübatör, görüntü kaydına olanak sağlayan bir sistem ile görüntülerin tekrardan izlenmesine ve değerlendirilmesine olanak sağlayan bilgisayar yazılımından oluşmaktadır.

Günümüzde sık kullanılan Time Lapse sistemler; i) Primo Vision (Vitrolife, Sweden), ii) Eeva (Auxogyn, United States), iii) EmbryoScope (FertiliTech, Denmark), iv) Miri (Esco, Denmark) sistemleridir (Şekil 1-4).

#### **2.14.1. Primo Vision (Vitrolife, Sweden)**

Klasik IVF laboratuvarında bulunan inkubatorlere adapte edilebilmektedir. Inkübatör dışında bir sistem kontrol ünitesinden oluşmaktadır. Her dişte en fazla 9-16 embriyo bulunabilmektedir. Sistem 6 farklı hastaya ait 96 embriyoyu incelemeye olanak sağlamaktadır. Bu sistemlerde 5 dakikada bir resim alma olanağı mevcuttur.



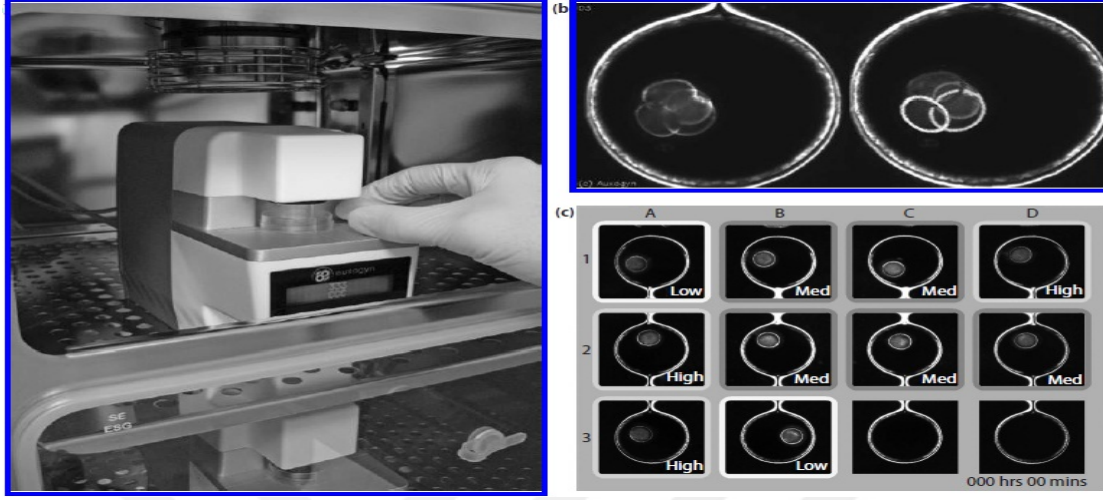


**Şekil 1.** Primo Vision (Vitrolife, Sweden), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı

### 2.14.2. Eeva (Auxogyn, United States)

Klasik IVF laboratuvarında bulunan inkubatorlara adapte edilebilmektedir. İnkübatör dışında bir sistem kontrol ünitesinden oluşmaktadır. Her dişte en fazla 12 embriyo bulunabilmektedir. Sistem toplamda 48 embriyoyu incelemeye olanak sağlamaktadır.

Bu sistemlerde 5 dakikada bir resim alma olanağı mevcuttur.



**Şekil 2.** Eeva (Auxogyn, United States), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı.

### 2.14.3. EmbryoScope (FertiliTech, Denmark)

Bu sistem klasik IVF inkübatörlerinin dışında kendine özgü bir inkübatör ve mikroskop ünitesi, HEPA filtresine bağlı UV hava sterilizasyonu sistemi ve bunun dışında embriyoların incelenmesine olanak tanıyan bir bilgisayar donanım ve yazılımından oluşmaktadır. Her dişte en fazla 12 embriyo bulunabilmektedir. Sistem toplamda 72 embriyoyu incelemeye olanak sağlamaktadır. Bu yazılım embriyoların incelenmesi dışında arzu edilmesi halinde ‘The Zoi server (FertiliTech, Denmark)’ isimli bir ağ sayesinde embriyo kültür ortamı ve laboratuvar ortamının değerlendirilmesini sağlayan merkezi bir teknik destek sağlamaktadır. Bu sistemlerde 10 dakikada bir resim alma olanağı mevcuttur.



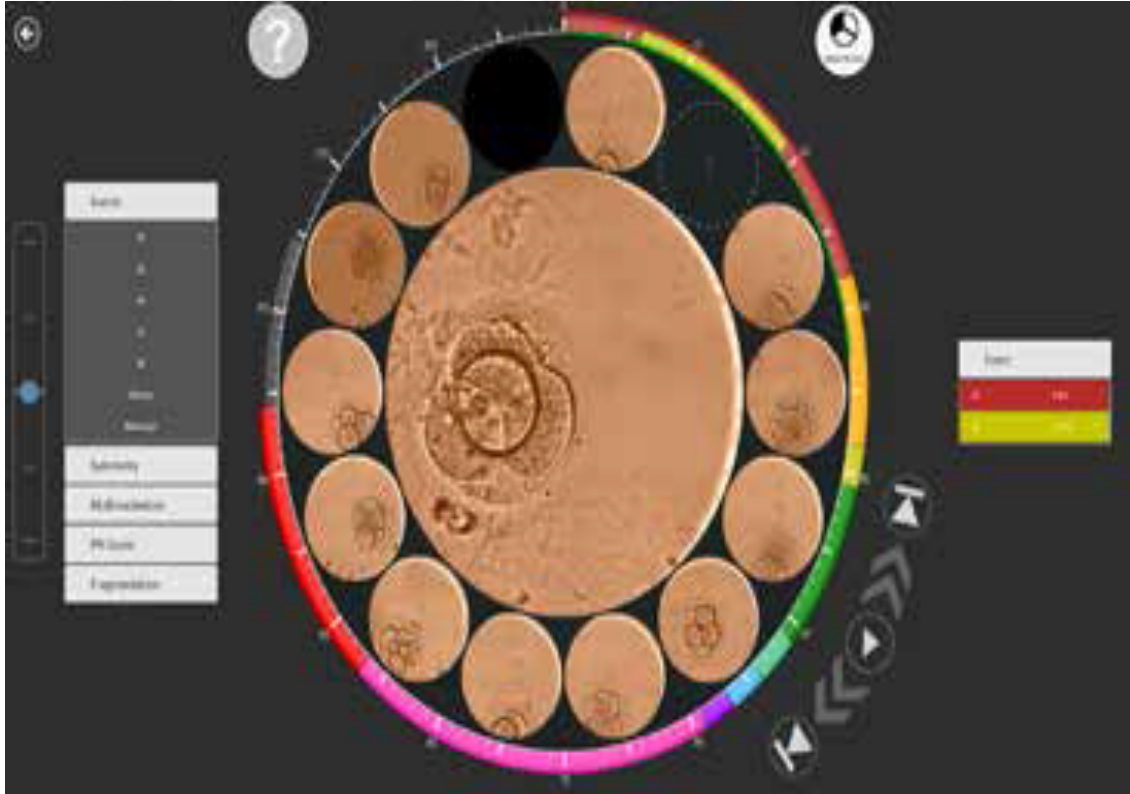




**Şekil 3.** EmbryoScope (FertiliTech, Denmark), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı.

#### **2.14.4.Miri (Esco, Denmark)**

Klasik IVF inkübatörlerinin dışında kendine özgü bir inkübatör ve mikroskop ünitesi bulundurmaktadır. Her biri 14 embriyo içeren 6 kültür kabı mevcuttur. Sistem toplamda 84 embriyoyu incelemeye olanak sağlamaktadır. Bu sistemlerde 5 dakikada bir resim alma olanağı mevcuttur.



**Şekil 4.** Miri (Esco, Denmark), embriyo saklama ünitesi ve Time Lapse yazılımı.

Bu sistemlerde dikkat edilmesi gereken terminoloji; İnseminasyon zamanı (t0), Pronukleus oluşumu (tPNf), 2 hücre zamanı (t2), 3 hücre (t3), 4 hücre (t4), 5 hücre (t5), morula (tM), blastulasyon (tSB), full blastosit (tB), blastomer hücre siklusu-cell

cycles (cc), embriyo hücre siklusu (ECCs) olarak kısaltılır. Bunun dışında blastomer hücre siklusu a, t3-t2 olarak hesaplanır ve cc2a olarak yazılır. Blastomer b t4-t2 olarak hesaplanır ve cc2b olarak yazılır. Embriyonun 2 hücreden 4 hücreye geçişi (ECC2) ya da t4-t2 olarak adlandırılmaktadır. 3. hücre siklusu, ECC3 ya da embriyonun 4 hücreden 8 hücreye geçişini ifade etmekte ve 4 blastomer/hücre siklusunu ifade etmektedir. Ayrıca cc3a t5-t4, cc3b t6-t4, cc3c t7-t4, ve cc3d is t8-t4 olarak kodlanmaktadır.

247 embriyoya ait implantasyon başarısı geriye dönük incelendiği bir çalışmada, implante olan ve olmayan embriyolar arasında 5 hücreye ulaşma zamanında (t5) ve 2. hücre siklusu zamanlarında anlamlı farklılık görülmüştür (cc2). Ayrıca; bir hücreden üç hücreye geçme, eşit olmayan bölünme ve 4 hücreli aşamada multinükleasyonun da implantasyon başarısında etkili olduğu bildirilmiştir [3].

### **2.15.Embriyo Transferi**

Embriyo transferi en sık fertilizasyondan sonraki 3. günde yapılmaktadır. İdeal 3. gün embriyo, eşit boyutlarda 6-8 hücreye sahip ve hiç sitoplazmik fragmentasyonu olmayan embriyodur. Embriyo transferinde en önemli faktör zamanlama ve teknik olarak bildirilmiştir. Zamanlama olarak 3. gün ve 5. gün (blastokist dönemi) karşılaştıran 10 tane çalışmayı toplayan bir meta analizde implantasyon, gebelik, canlı doğum, abortus, çoğul gebelik açısından fark bulunmamıştır. Ancak uzamış kültür sürelerinde artmış siklus iptalinin belirgin olduğu bildirilmiştir [80]. Bu çalışmalarda blastokistler için optimal medyumlar kullanılmamış ve daha az embriyo transferine rağmen implantasyon ve gebelik oranları benzer bulunmuştur.

Embriyo transferinde amaç; olabildiğince atravmatik ve çabuk bir şekilde embriyoları uterusu yerleştirmektir. Mümkün ise kan mukus ve uterin kontraksiyonlarından kaçınılmalıdır. Önceden deneme transferi yapılması tedaviden önce servikal

dilatasyondan fayda görebilecek kadınların seçilmesi için önemli olabilmektedir. Ultrasonografi eşliğinde düşük hacimlerde, yumuşak kateter ile yapılan transferler en iyi sonuçları vermektedir [80].

### **3.GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Çalışmaya İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Araştırmalar etik kurulunun 6 Temmuz 2017 tarihli etik kurul onayının alınmasından sonra 1 Temmuz 2016 ve 1 Temmuz 2017 tarihleri arasında Gen-Art Tüp Bebek merkezine başvuran 14 infertil hastadan elde edilen 57 embriyoya ait verilerle yapılmıştır. Açıklanamayan infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, iki ya da daha fazla açıklanamayan düşük öyküsü, önceki gebeliklerde anöploidili fetüs öyküsü nedeniyle preimplantasyon genetik tarama yapılacak olan hastalara ait embriyolar Primovision Time Lapse sistem ile değerlendirilmiştir. Ovülasyon indüksiyonu öncesi tüm hastalara ultrason muayenesi yapılarak, menstrual siklusun 3. Günü FSH, LH,E2 seviyeleri değerlendirilmiştir. Menstruel siklusun 3.günü hastalara 75 IU r-FSH (Gonal-F, Sereno) kullanılarak ovülasyon indüksiyonu yapılmış, ortalama 18-20 mm folikül eldesine kadar hastalar takip edilmiş, 250 µg recombinant hCG (Ovidrel, Sereno) uygulanarak 36 saat sonra anestezi altında oosit aspirasyonu yapılmıştır. ICSI uygulaması sonrasında embriyoların morfokinetik özellikleri Primovision sistem ile değerlendirilmiştir. Bölünme zamanları dışında; polar cisim, eşit olmayan bölünme, ters klivaj, multinukleasyon, vakuolizasyon, fragmantasyon, pronukleus oluşumu ve sayısı kaydedilmiştir. PGT amacıyla 3. gün blastomer ya da trofoektoderm biyopsisi ile yeterli genetik materyal alınarak Array CGH (aCGH) işlemine tabi tutulmuştur. Time Lapse sistemi ile elde edilen morfokinetik parametreler SART ve BFS/ACE embriyo değerlendirme skorlarına göre değerlendirilmiştir (Ek 1, 2). SART skorunda



iyi (1), orta (2), kötü (3) olmak üzere üç kriter kullanılırken BFS/ACE skorlamasında iyi (4), orta (3), kötü (2), çok kötü (1) şeklinde iyi embriyodan kötü embriyoya doğru azalan bir derecelendirme kullanılmıştır. Bu sonuçlardan elde edilen veriler ile aCGH yöntemiyle bakılan kromozom analizi sonuçları arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

### **İstatistiksel İncelemeler**

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında Student t Test, normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

### **4.BULGULAR**

aCGH analiz sonuçlarına göre embriyolar kromozomal yapılarına göre normal ya da anormal olmak üzere ikiye ayrıldı. Normal grupta ortalama yaş  $33,24 \pm 2,56$  ve anormal grupta ortalama yaş  $31,88 \pm 2,18$  olup gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Her iki grupta da polar cisimcik ve pronükleus oluşumu mevcuttu. Vakuol oluşumu normal grupta  $0,24 \pm 0,43$  iken anormal grupta  $0,58 \pm 0,5$  olup anormal grupta ( $p=0,02$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Her iki grupta fragmentasyon ve multinükleasyon oluşumları arasında anlamlı fark görülmedi. Eşit olmayan bölünme normal grupta  $0,41 \pm 0,5$  iken anormal grupta  $0,7 \pm 0,4$  olup anormal grupta ( $p=0,04$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Ters bölünme

normal grupta  $0,18\pm0,3$ , anormal grupta  $0,53\pm0,5$  olup anormal grupta ( $p=0,01$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu (EK 3-5). Time Lapse parametrelerinden ikiye bölünme zamanı (T2) normal grupta  $0,18\pm0,3$  saat olup anormal gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ( $p=0,02$ ). Her iki grupta 3,5 ve 8 blastomerli evrelere geçiş ve CC2,S3 zamanları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. 4 blastomerli evreye geçiş zamanı normal grupta ortalama  $29\pm9$  saat olup anormal gruba göre daha kısaydı ( $p=0,02$ ). Morula evresine geçiş zamanı normal grupta  $69,4\pm18,1$  olup anormal gruba göre anlamlı derecede daha kısaydı ( $p=0,01$ ) (Ek 6-8).

SART skorlamasına göre normal grupta ortalama skor  $1,47\pm0,6$  iken anormal grupta  $2,08\pm0,8$  olup gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttu ( $p=0,017$ ). BFS/ACE skorları açısından gruplar değerlendirildiği zaman normal grupta ortalama skor  $3,35\pm0,86$  iken anormal grupta ortalama skor  $2,68\pm1,07$  olup gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttu ( $p=0,02$ ). (Tablo 1)

SART, BFS/ACE skorlarıyla normal ya da anormal kromozomlu embriyo varlığı ile korelasyon analizinde; vakuol oluşumu, fragmantasyon, multinükleasyon, eşit olmayan bölünme ve ters bölünme arasında SART skorlarıyla pozitif yönde BFS/ACE skorlarıyla negatif yönde anlamlı korelasyon olduğu görüldü. Anormal kromozom varlığıyla vakuol oluşumu, eşit olmayan bölünme ve ters bölünme arasında anlamlı derecede korelasyon olduğu görüldü. T2 süresi ve SART skoru arasında pozitif yönde ilişki saptanırken BFS/ACE skoruyla negatif yönde ilişki saptandı. Diğer Time Lapse morfolojik bölünme zamanlarıyla (T3, T4, T5, T8

ve TM ) SART ve BFS/ACE skorlarıyla anlamlı korelasyon izlenmedi. Anormal kromozom yapısıyla T2, T4, TM ve S2 arasında anlamlı korelasyon olduğu görüldü. SART skorlarıyla anormal kromozom varlığı arasında pozitif ve BFS/ACE skorlarıyla negatif yönde anlamlı korelasyon saptandı. (Tablo 2)

**Tablo 1.** aCGH sonuçlarına göre normal ya da anormal kromozom yapısına sahip embriyoların morfolojik ve time-lapse verilerinin analizi.

	<b>Normal (n:17) ort±SD(aralık)</b>	<b>Anormal (n:40) ort±SD(aralık)</b>	<b>p değeri</b>
<b>Yaş</b>	33,24±2,56(28-37)	31,88±2,18(28-37)	0,06
<b>Vakuolizasyon</b>	0,24±0,43(0-1)	0,58±0,5(0-1)	<b>0,02</b>
<b>Fragmantasyon</b>	0,82±0,39(0-1)	0,75±0,43(0-1)	0,17
<b>Multinükleasyon</b>	0,65±0,49(0-1)	0,85±0,36(0-1)	0,08
<b>Eşit olmayan bölünme</b>	0,41±0,5(0-1)	0,7±0,4(0-1)	<b>0,04</b>
<b>Ters klivaj</b>	0,18±0,3(0-1)	0,53±0,5(0-1)	<b>0,01</b>
<b>T2(saatt)</b>	18,7±8,2(6-29)	24,2±8,5(6-42)	<b>0,02</b>
<b>T3(saatt)</b>	27,7±8,3(12-40)	32,4±7,7(18-60)	0,058
<b>T4(saatt)</b>	29±9(12-41)	35,6±8,5(19-62)	<b>0,02</b>
<b>T5(saatt)</b>	41,4±13,4(12-71)	45,4±12,1(24-85)	0,37
<b>T8(saatt)</b>	48,5±15,7(25-96)	54,9±16,1(30-100)	0,17
<b>TM(saatt)</b>	69,4±18,1(30-110)	83,2±16,1(51-115)	<b>0,01</b>
<b>TSB(saatt)</b>	82,4±32,3(0-113)	61,3±55,2(0-170)	0,74
<b>TFB(saatt)</b>	81,1±39,9(0-117)	49,4±56,2(0-140)	0,25
<b>TFH(saatt)</b>	75,8±(0-118)	29,8±49,6(0-141)	<b>0,01</b>
<b>TPn</b>	8,9±6,6(1-24)	11,6±5,7(1,2-27)	0,08
<b>CC2(saatt)</b>	10,2±4,6(1,7-1,5)	11,3±6,7(0,6-2,9)	0,40
<b>S2(saatt)</b>	1,2±2,6(0,1-1,1)	3,1±4,9(0,1-2,6)	<b>0,005</b>
<b>S3(saatt)</b>	7,1±6,9(0,2-2,5)	9,4±10,9(0,7-4,9)	0,69
<b>SART</b>	1,47±0,6(1-3)	2,08±0,8(1-3)	<b>0,017</b>
<b>BFS /ACE</b>	3,35±0,86(1-4)	2,68±1,07(1-4)	<b>0,02</b>

**Tablo 2.** SART, BFS/ACE ve aCGH analizi sonuçları ile embriyoların morfolojik ve time-lapse verilerinin korelasyon analizi sonuçları.

	SART		BFS/ACE		aCGH	
	r	p	r	p	R	p
<b>Yaş</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,009</b>	<b>0,36</b>	<b>0,005</b>	0,25	0,06
<b>Vakuol</b>	0,23	0,07	-0,24	0,06	<b>-0,31</b>	<b>0,01</b>
<b>Fragmantasyon</b>	<b>0,53</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>-0,52</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,08	0,55
<b>Multinükleasyon</b>	<b>0,44</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,04</b>	<b>0,001</b>	-0,22	0,08
<b>Eşit olmayan bölünme</b>	<b>0,80</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>-0,80</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>-0,27</b>	<b>0,04</b>
<b>Ters klivaj</b>	<b>0,64</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>-0,61</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,014</b>
<b>T2(saat)</b>	<b>0,36</b>	<b>0,005</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,004</b>	<b>-0,29</b>	<b>0,02</b>
<b>T3(saat)</b>	0,02	0,84	0,006	0,96	-0,25	0,058
<b>T4(saat)</b>	0,14	0,28	-0,10	0,42	<b>-0,29</b>	<b>0,02</b>
<b>T5(saat)</b>	0,06	0,61	-0,4	0,75	-0,11	0,37
<b>T8(saat)</b>	0,11	0,38	-0,13	0,30	-0,18	0,17
<b>TM(saat)</b>	0,26	0,051	-0,25	0,054	<b>-0,34</b>	<b>0,009</b>
<b>TSB(saat)</b>	-0,194	0,14	0,24	0,07	0,04	0,75
<b>TFB(saat)</b>	-0,24	0,063	0,25	0,053	0,15	0,26
<b>TFH(saat)</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,004</b>	<b>0,30</b>	<b>0,01</b>	<b>0,34</b>	<b>0,009</b>
<b>CC2(saat)</b>	<b>-0,28</b>	<b>0,03</b>	<b>0,29</b>	<b>0,02</b>	-0,11	0,4
<b>S2(saat)</b>	<b>0,24</b>	<b>0,06</b>	<b>-0,29</b>	<b>0,02</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,004</b>
<b>S3(saat)</b>	-0,03	0,81	-0,05	0,70	-0,05	0,69

## 5.TARTIŞMA

In vitro ortamda embriyo bazı morfolojik özellikler gözönüne alınarak değerlendirilmektedir. Bunun dışında embriyo genetik yapısının belirlenmesinde polar cisim, blastomer ya da trofoektoderm biyopsileri gibi invaziv yöntemler de kullanılmaktadır [81]. Son yıllarda yapılan çalışmalar morfolojik özelliklerin dışında embriyo morfokinetik özelliklerinin de embriyo seçiminde önemli yere sahip olduğu bildirilmiştir [82, 83]. Bu amaçla geliştirilmiş olan non invaziv tekniklerden embriyo monitörizasyonu morfokinetik özelliklerinin değerlendirilmesinde önem kazanmıştır. Wong ve ark. yaptığı bir çalışmada blastokist gelişiminde 1 hücreden 2 hücreye geçiş süresinin, 2 hücreden 3 hücreye geçiş süresinin ve 3 hücreden 4 hücreye geçiş süresinin embriyo kalitesinin belirlenmesinde önemli olabileceğini bildirmiştir [84].

Ancak, embriyoların Time Lapse sistemi ya da konvansiyonel embriyo inkübasyon sisteminde değerlendirildiği verileri içeren bir derlemede, iki grup arasında canlı doğum oranları, düşük oranları ve klinik gebelik oranları açısından herhangi anlamlı bir fark olmayabileceği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda klinik uygulamanın değiştirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır [85].

Meseguer ve ark. çalışmasında transfer edilen 247 embriyoya ait Time Lapse parametrelerini geriye doğru incelemişlerdir [86]. İmplante olan embriyolara ait ortalama zamanlar T2:25, 6h, T3:37, 4h, T4:38,2h, T5:52,3h, CC2:11,8h, S2:0,78h olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, 5 hücreye geçiş (T5; 48.8–56.6 h), üç hücreden 4 hücreye geçiş (S2;  $\leq 0.76$  h), iki hücreden üç hücreye geçiş evrelerine (CC2;  $\leq 11.9$  h) ait sürelerin implantasyon başarısıyla anlamlı olarak ilişkili

olabileceği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada 4 hücreli evredeki multinükleasyon varlığının ve iki hücreli evrede eşit olmayan bölünmenin implantasyon başarısızlığıyla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmadan farklı olarak, bizim çalışmamızda, T2, T3, T5 ve CC2 süreleri daha kısa görülürken T4 ve S2 süreleri daha uzun saptanmıştır. Bu sonuçlarımız farklı ovulasyon indüksiyonu ajanlarının, değişik kültür mediumlarının kullanılması ve farklı inkübasyon ortamlarının olmasına bağlanabilir. Meseguer ve ark. çalışmasıyla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da, eşit olmayan bölünme ve ters klivaj oranları anormal kromozom taşıyan embriyolarda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Desai ve ark. yaptığı bir çalışmada TPNf, T2, T4, T8, S2, S3 ve CC2 sürelerinin blastokist aşamasına gelebilen embriyolarda gelemeyenlere göre anlamlı derecede daha kısa sürede olabileceğini bildirmişlerdir [87]. Chawla ve ark. çalışmasında embriyolara ait morfokinetik parametreler ile kromozomal yapıyı değerlendirmişlerdir [88]. EmbryoScope kullanılarak izlenen 460 embriyoya ait veriler geriye dönük olarak incelenmiş; TPNf, T2, T5, CC2 ve CC3 zamanları normal ve anormal kromozomal yapıya sahip embriyolar arasında anlamlı derecede farklılık göstermiştir. Bu çalışmanın sonunda Time Lapse görüntüleme sistemlerinin anöploidiyi erken dönemde belirleyebileceği öne sürülmüştür.

Yang ve ark. bir çalışmasında 1163 metafaz II (MII) oositten elde edilmiş 138 PGS sonucunu değerlendirmiştir [89]. Embriyolar Time Lapse sistemde ve konvansiyonel inkübatörde kültüre edilmek üzere iki gruba ayrılarak izlenmiştir. Her iki gruba da 5. gün trofoektoderm biyopsisi sonrası tüm genomik amplifikasyon ve aCGH testi uygulanmıştır. Her iki grup için devam eden gebelik oranları ve implantasyon başarıları kıyaslanmıştır. Çalışma sonucunda Time

Lapse sisteminde değerlendirilen embriyolarda implantasyon ve devam eden gebelik oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda Time Lapse sistemleriyle aCGH tekniğinin birlikte uygulanmasının kompetan embriyo seçiminde etkili olabileceği bildirilmiştir [89].

Çalışmamızda, nceki çalışmalardan farklı olarak SART VE BFS/ACE morfolojik değerlendirme skorları ile anormal kromozom yapısındaki ilişki incelendi. Çalışma sonucunda, SART ve BFS/ACE skorlamasına göre normal morfolojik yapıdaki embriyoların normal kromozomal yapı ile uyumlu olabileceği görüldü [86-88]. Bunun dışında, SART ve BFS/ACE morfolojik skorlamalarına göre anormal yapıdaki embriyolar ile vakuol oluşumu, fragmantasyon, multinükleasyon, eşit olmayan bölünme ve ters klivaj arasında anlamlı korelasyon olabileceği görüldü.

Çalışmamızın limitasyonları olarak, çalışmaya dahil edilen embriyo sayısının azlığı, embriyo implantasyon ve devam eden gebelik oranlarına ait bilgilerin olmaması gösterilebilir.

Sonuç olarak; Time Lapse yöntemiyle izlendiğinde, anormal kromozom taşıyan embriyolarda normal kromozom yapısındaki embriyolara göre vakuol oluşumu, eşit olmayan bölünme, ters bölünme ve T2, T4, TM zamanları daha yüksektir.

## 6.REFERANSLAR

- 1- Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: Incidence and Trends. *Fertil Steril* 1991; 56:192
- 2-Noci I., Fuzzi B., Rizzo R., Melchiorri L., Criscuoli L., Dabizzi S., Biagiotti R., Pellegrini S.,Meniccuci A., Baricordi O.R. Embryonic Soluble HLA-G as a Marker of Developmental Potential Embryos. *Hum Reprod* 2004: 20, 138-146.
- 3- Meseguer M. Time-lapse: the remaining questions to be answered. *Fertil Steril*. 2016 Feb;105(2):295-6.
- 4- Speroff L, Fritz M. A. Infertilite. *Erk. A, Günalp. S. Eds. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite, 7. Baskı, Güneş Tıp Kitabevi, 2007;1013,1014 / 1215-1257)*
- 5- Donnez J, Casanas-Roux F. Prognostic factors of fimbrial microsurgery. *Fertil Steril* 1986;46:200-4
- 6- Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J. Hydrosalpinx and IVF outcome:cumulative results after sapingectomy in a randomized contralled trial. *Hum Reprod* 2001;16:2403-10
- 7- Johnson NP, Mak W, Sowter MC. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; 3:CD002125
- 8- Tao X, Chen L, Ge S, Cai L. Weigh the pros and cons to ovarian reserve before stripping ovarian endometriomas prior to IVF/ICSI: A meta-analysis. *PLoS One* 2017 2;12(6):e0177426.
- 9- La Marca A, Minasi MG, Sighinolfi G, Greco P, Argento C, Grisendi V, Fiorentino F, Greco E. Female age, serum antimüllerian hormone level, and number of oocytes



affect the rate and number of euploid blastocysts in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2017 ;4. pii: S0015-0282(17)31877-0.

10- Tıraş MB, Aybar F. İnvitro Fertilizasyon (IVF) – İnterasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) Endikasyonları. *Türkiye Klinikleri, J Surg Med Sci* 2006; 2(5):37-41

11- Steptoe PC, Edwards RG. After the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2:366.

12-Schenk SL 1880 Das Saugethierei kunstlich befruchtet ausserhalb des Mutterthieres. Mittheilungen aus dem Embryologischen Institut der Wien IX Band.

13-Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2:366.

14-Montag, Markus. Morphological Selection of Gametes and Embryos: Embryo. A Practical Guide to Selecting Gametes and Embryos 2014; 1: 115-130. Print.

15-Fenwick, J. Time from Insemination to First Cleavage Predicts Developmental Competence of Human Preimplantation Embryos in Vitro. *Human Reproduction* 2002;17.2: 407-12. Print.

16-Bos-Mikich, A., A.L.G Mattos, and A.N. Ferari. Early Cleavage of Human Embryos: An Effective Method for Predicting Successful IVF/ICSI Outcomes. *Human Reprod* 2001; 16: 658-661. Print.

17-Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on invitro fertilization. *Fertil Steril* 2002; 77:1148

18- Hughes EG, Brennan BG. Does cigarette smoking impair natural or as assisted

fecundity. *Fertil Steril* 1996; 66:679

19- Feichtinger W, Papalambrau K, Poehl M, Krischker U, Neumann K. Smoking and in vitro fertilization: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:596

20- Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. The age – related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 65:783

21- Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Lindenberg S, Petersen K, Andersen AN. Embryo quality and developmental potential is compromised by age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80:169

22- Gougeon A, Echiochard R, Thalabard JC. Age – related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early –growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994; 50:653.

23- Hoffmann GE, Danforth DR, Seifer DB. Inhibin B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 1998; 69:474

24- Welt-CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:105

25- Lunenfeld E, Shapiro BS, Sarow B, Sarow I, Insler V, Decherney AH. The association between chlamydial – specific Ig G and Ig A antibodies and pregnancy outcome in an in vitro fertilization program. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1989; 6:222

26- Licciardi F, Grifo JA, Rosenwaks Z, Witkin SS. Relation between antibodies to *Chlamydia trachomatis* and spontaneous miscarriage following in vitro fertilization. *J*

Assist Reprod Genet 1992; 9:207

27- Edwards RG, Lobo R, Bouchard P. Time to revolutionize ovarian stimulation.

Hum Reprod 1996; 11:917

28- Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA.

The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Fertil Steril 1992; 58:888

29- Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary

desensitization in in vitro and gamete intrafallopian transfer cycles. Cochrane Database Syst Rev. 2000; CD001299

30- Urbancsek J, Witthaus E. Midluteal buserelin is superior to early follicular phase

buserelin in combined gonadotropin-releasing hormone analog and gonadotropin stimulation in in vitro fertilization. Fertil Steril 1996; 65:966-71

31- Faber BM, Mayer J, Cox B, Jones D, Toner JP, Oehninger S, Muasher SJ.

Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders. Fertil Steril 1998; 69:826-30

32- Pinkas H, Orvieto R, Avrech OM, Rufas O, Ferber A, Ben-Rafael Z, Fisch B.

Gonadotropin stimulation following GnRH-a priming for poor responders in in vitro fertilization-embryo transfer programs. Gynecol Endocrinol 2000; 14:11-4

33- De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, Nieschlag E, Holzgreve W, Schneider

HP. Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1186 infertile women. Fertil Steril 2000; 73:106

34- Garcia JE, Padilla SL, Bayati J, Baramki TA. Follicular phase gonadotropin-

releasing hormone agonist and human gonadotropins: A better alternative for ovulation induction in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 53:302-5

35- Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta- analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 1992; 58:888

36- Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD001299

37- Tan SL, Maconochie N, Doyle P, Campbell S, Balen A, Bekir J, Brinsden P, Edwards RG, Jacobs HS. Cumulative conception and live-birth rates after in vitro fertilization with and without use of long, short, ultrashort regimen of the gonadotropin-releasing hormone agonist buserelin. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:513

38- Scott RT, Navot D. Enhancement of ovarian responsiveness with mikrodoses gonadotropin releasing hormone agonist during ovulation induction for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 65:796-9

39- Surrey ES, Bower J, Hill DM, Ramsey J, Surrey MW. Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998; 69:419-24

40- Matikainen T, Ding YQ, Vergara M, Huhtaniemi I, Couzinet B, Schaison G. Differing responses of plasma bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone to gonadotropin releasing hormone antagonist and agonist treatment in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 ;75:820-5

- 41- Felberbaum RE, Albano C, Ludwig M, Riethmüller -Winzen H, Grigat M, Devroey P, Diedrich K. Ovarian stimulation for assisted reproduction with HMG and concomitant midcycle administration of the GnRH antagonist cetrorelix according to multiple dose protocol: A prospective uncontrolled phase III study. *Hum Reprod* 2000; 15:1015-20
- 42- Hernandez ER. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: The Rubicon for GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2000; 15:1211-6
- 43- Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schrödör AK, Löning M, Weiss JM, Diedrich K. Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients needs in ovarian stimulation for IVF: Results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2002; 17:2842-5
- 44- Gün I, Özdamar Ö, Şahin S, Akpak YK, Sofuoğlu K. Is there any effect of oocyte count retrieved in the OPU procedure on pregnancy outcomes? *J Obstet Gynaecol* 2016;36(3):416-9.
- 45- Gardner, D.K., Weissman, A.C., Howles, M., Shoham, Z. (2004). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. Taylor and Francis. Preface xi. United Kingdom.
- 46- Van der Zwalm P, Bertin-Segal G, Geerts L, Debauche C, Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swip-up procedures. *Hum Reprod* 1991; 6:581
- 47- Byskov, A.G. *Germ cells and Fertilization* (2nd ed.) eds. C. R. Austin and R. V. Short. Cambridge University Press; 1982. Primordial germ cells and regulation of meiosis. *Reproduction in mammals*.
- 48- Bearden, H. Joe, John W. Fuquay, and Scott T. Willard. *Applied Animal Reproduction*. 6th ed. Vol. 1. New Jersey: Pearson Prentice Hall; 2004. 7-20, 96-107.

Print.

49-Baker, T.G. Reproduction in mammals. Germ cells and Fertilization. (2nd ed.) eds.

C. R. Austin and R. V. Short. Cambridge University Press;1982. Oogenesis and ovulation.

50-Moore, Keith L., and T. V. N. Persaud. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 1998. The First Week of Human Development.

51-Wasserman, P. M., L. Jovine, and E.S. Litscher. A profile of fertilization in mammals(review). Nature cell Biology 2001;3: E59.

52- Mohan, Arora. Embryology. 1st ed. Vol. 1. Himalaya House; 2009. Fertilization.

53- Mohan, Arora. Embryology. 1st ed. Vol. 1. Himalaya House; 2009. Cleavage.

54-Mohan, Arora. Embryology. 1st ed. Vol. 1. Himalaya House; 2009. Morula and Blastula.

55- Lemmen, Jg, I. Agerholm, and S. Ziebe. Kinetic Markers of Human Embryo Quality Using Time-lapse Recordings of IVF/ICSI-fertilized Oocytes. Reproductive BioMedicine Online 2008; 17.3: 385-91.

56- Hardarson T, Hanson C. Sjogren A, et al. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: Indications for aneuploidy and multinucleation. Hum reprod 2001; 29-34.

57-Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod. 2011; 26(6): 1270–1283.

- 58-Alkani, M.Sc, Mina, Jacques Cohen, Ph.D., Giles Tomkin,B.A., John Garrisi, Ph.D., Caryn Mack, M.S., and Richard T. Scott, M.D. "Human Embryo Fragmentation in Vitro and Its Implications for Pregnancy and Implantation." *Fertility and Sterility* 71.5 (1999): 836-42. Print.
- 59-Van Royen E, Manglschots K, Vercruyssen M, et al. Mutlinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 1062-1069.
- 60- Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, et al. Morphological evaluation of human embryos and derivation of embryo quality scoring system for day 3 embryos : A preliminary study. *Hum Reprod* 2000; 15: 2190-2196.
- 61-Boklage C.E. Survival Probability of Human Conceptions from Fertilization to Term.*Int. J Fertil* 1990: 35-75
- 62-Baltaci V, Şatıroğlu H, Kabukçu C, Ünsal E, Aydınuraz B, Üner Ö, Aktaş Y, Çetinkaya E, Turhan F, Aktan A. Relationship Between Embryo Quality and Aneuploidies. *RBM Online*; 1. Vol 12. No 1. 2006 77-82
- 63-Munne S, Alikani M, Tomkin G et al. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* 1995:64-382
- 64-Almeida P.A., Bolton V.N. The Relationship Between Chromosomal Abnormality In The Human Preimplantation Embryo and Development In Vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996: 8-235
- 65-Borini A., Lagalla C., Cattoli M., Sereni E., Sciajno R., Flamigni C., Coticchio G. Predictive Factors for Embryo Implantation Potential. *RBM Online*. Vol: 10 No: 5, 2005:653-668

66-Huisman G.J., Alberda A.T., Leerentveld R.A. et al., A Comparison of In Vitro Fertilization Results After Embryo Transfer After 2, 3 and 4 Days of Embryo Culture. *Fertil. Steril* 1994: 61-970.

67-Petersen C.G., Mauri A.L., Ferreira R., Baruffi R.L., Franco Junior J.G. Embryo Selection by The First Cleavage Parameter Between 25 and 27 Hours After ICSI. *J. Assit. reprod* 2001: 4. 209-12

68-Tesarik J., Junca A.M., Hazout A., Aubriot F.X., Nathan C., Cohen-Bacrie P. and Dumont- Hassan M. Embryos with High Implantation Potential After Intracytoplasmic Sperm Injection Can Be Recognized By A Simple, Non-Invasive Examination of Pronuclear Morphology. *Hum. Reprod.* Vol. 15, No. 6, 2000: 1396-1399.

69-Handyside A.A. Cleavage stage human embryo biopsy. *Human Reproduction; Update* 1995:1,3.

70- Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J,. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 1993; 2: 2185-91.

71-Montag, Markus. Morphological Selection of Gametes and Embryos: Embryo. A Practical Guide to Selecting Gametes and Embryos 2014; 1: 115-130.

72-Vergouw, C.g., L.l. Botros, P. Roos, J.w. Lens, R. Schats, P.g.a. Hompes, D.h. Burns, and C.b Lambalk. Metabolomic Profiling by Near-infrared Spectroscopy as a Tool to Assess Embryo Viability: A Novel, Non-invasive Method for Embryo Selection. *Human Reprod* 2008; 23.7: 499-504.



- 73-Mckenzie, L.j. "Human Cumulus Granulosa Cell Gene Expression: A Predictor of Fertilization and Embryo Selection in Women Undergoing IVF." *Human Reproduction* 19.12 2004: 2869-874.
- 74-Rubio, Irene, Arancha Galán, Zaloa Larreategui, Fernando Ayerdi, Jose Bellver, Javier Herrero, and Marcos Meseguer. "Clinical Validation of Embryo Culture and Selection by Morphokinetic Analysis: A Randomized, Controlled Trial of the EmbryoScope." *Fertil Steril* 102.5 2014: 1287-294.
- 75- Cutting R, Morroll D, Roberts SA, Pickering S, Rutherford A. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Hum Fertil* 2008; 11:131–146.
- 76- Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertil Steril* 2006;85:559–563.
- 77-Vernon MW, Stern JE, Ball GD, Wininger JD, Mayer JF, Racowsky C. Utility of the national embryo morphology data collected by SART: correlation between morphologic grade and live birth rate. *Fertil Steril* 2009;92(Suppl.):S164.
- 78- Pribenszky C, Mátyás S, Kovács P, Losonczy 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.
- 79- Siristatidis C, Komitopoulou MA, Makris A, Sialakouma A, Botzaki M, Mastorakos G, Salamalekis G, Bettocchi S, Palmer GA. Morphokinetic parameters of early embryo development via time lapse monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Apr;32(4):563-70.

- 80- Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2002: CD002118
- 81-Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol* 2004;4:5–22.
- 82- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008a;17:385–391.
- 83- Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:660.e1–660.e5
- 84- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1115-21.
- 85- Armstrong S, Arroll N, Cree LM, Jordan V, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Feb 27;(2):CD011320.
- 86- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J: The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011, 26:2658–2671
- 87-Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 20;12:54.
- 88- Chawla M, Fakih M, Shunnar A, Bayram A, Hellani A, Perumal V, Divakaran J,

Budak E. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(1):69-75.

89- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. 2012;5(1):24.



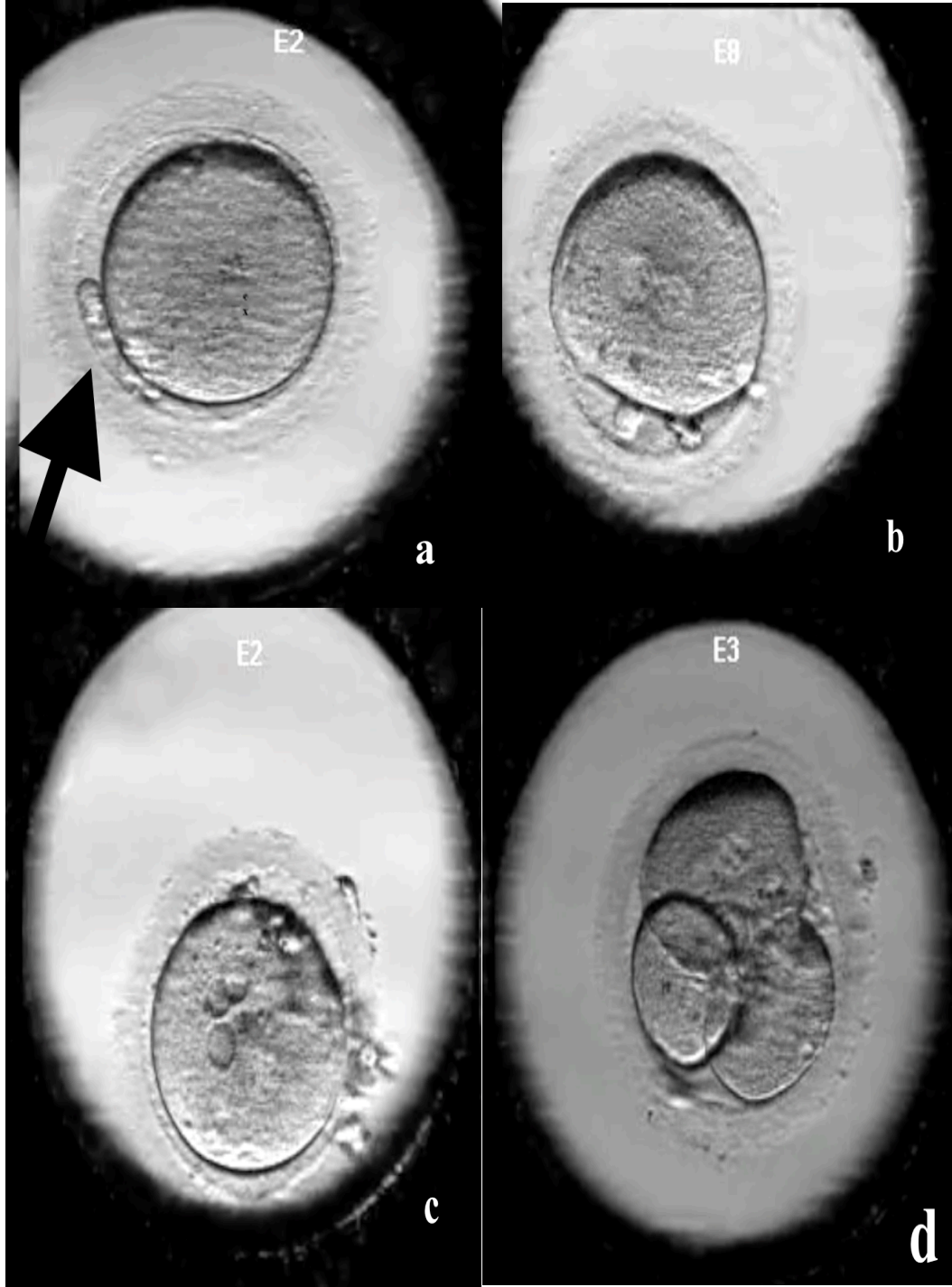
## 8. EKLER

### Ek 1. British Fertility Society and Association of Clinical Embryologist (BFS/ACE) klivaj aşaması embriyo skorlaması

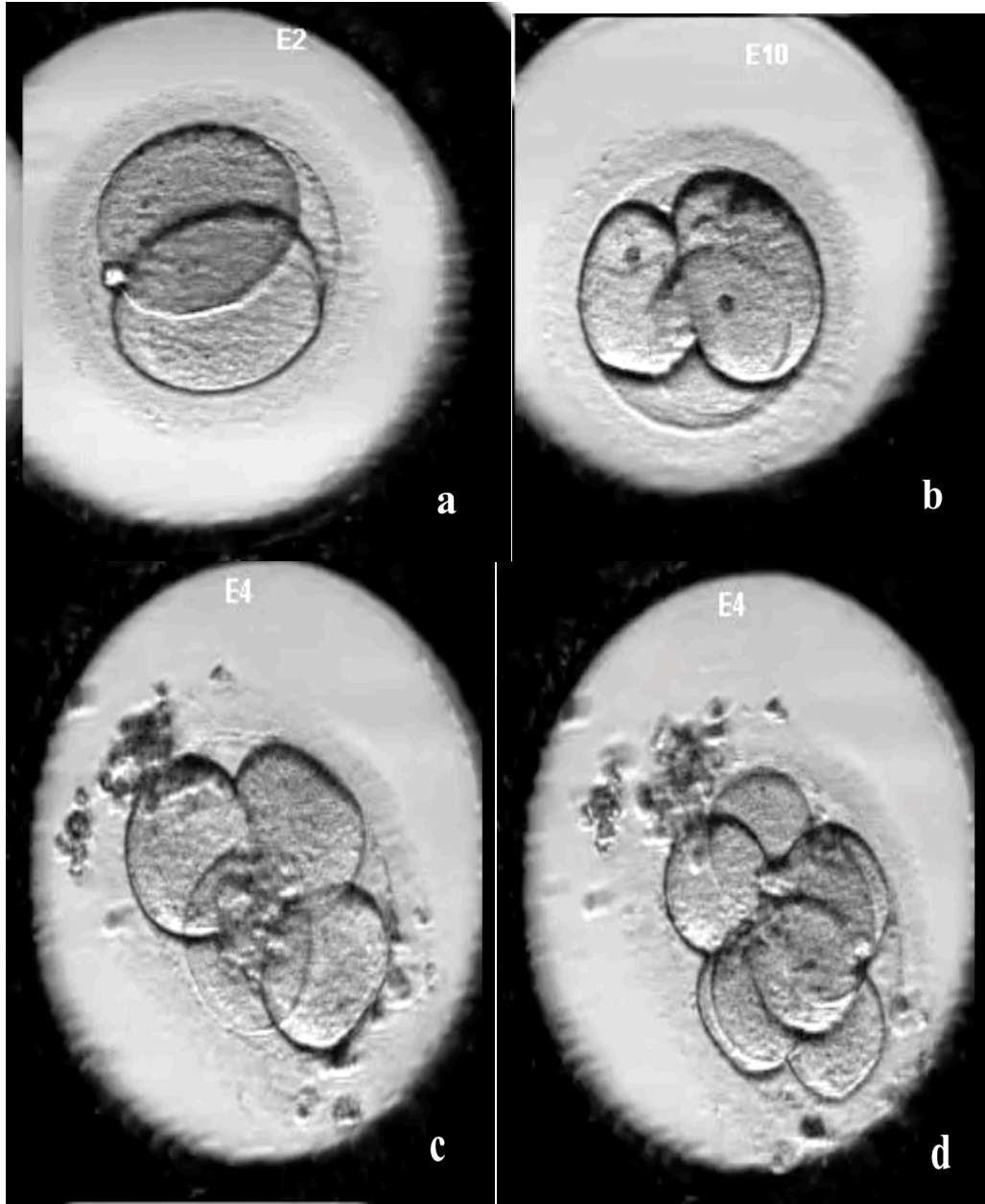
Grade	Blastomerlerin eşitliği	Fragmantasyon derecesi (embriyo hacmine yüzdesi)
4	Eşit simetrik blastomerler	<%10 nükleussuz fragmanlar
3	Hafif orantısız blastomerler (<%20 fark)	%10-20 nükleussuz fragmanlar
2	Orantısız blastomerler (%20-50 fark)	%20-50 nükleussuz fragmanlar
1	Büyük ölçüde orantısız (>%50 fark)	>%50 nükleussuz fragmanlar

**Ek 2. Society for Assisted Reproductive Technology (SART) embriyo değerlendirme kriterleri**

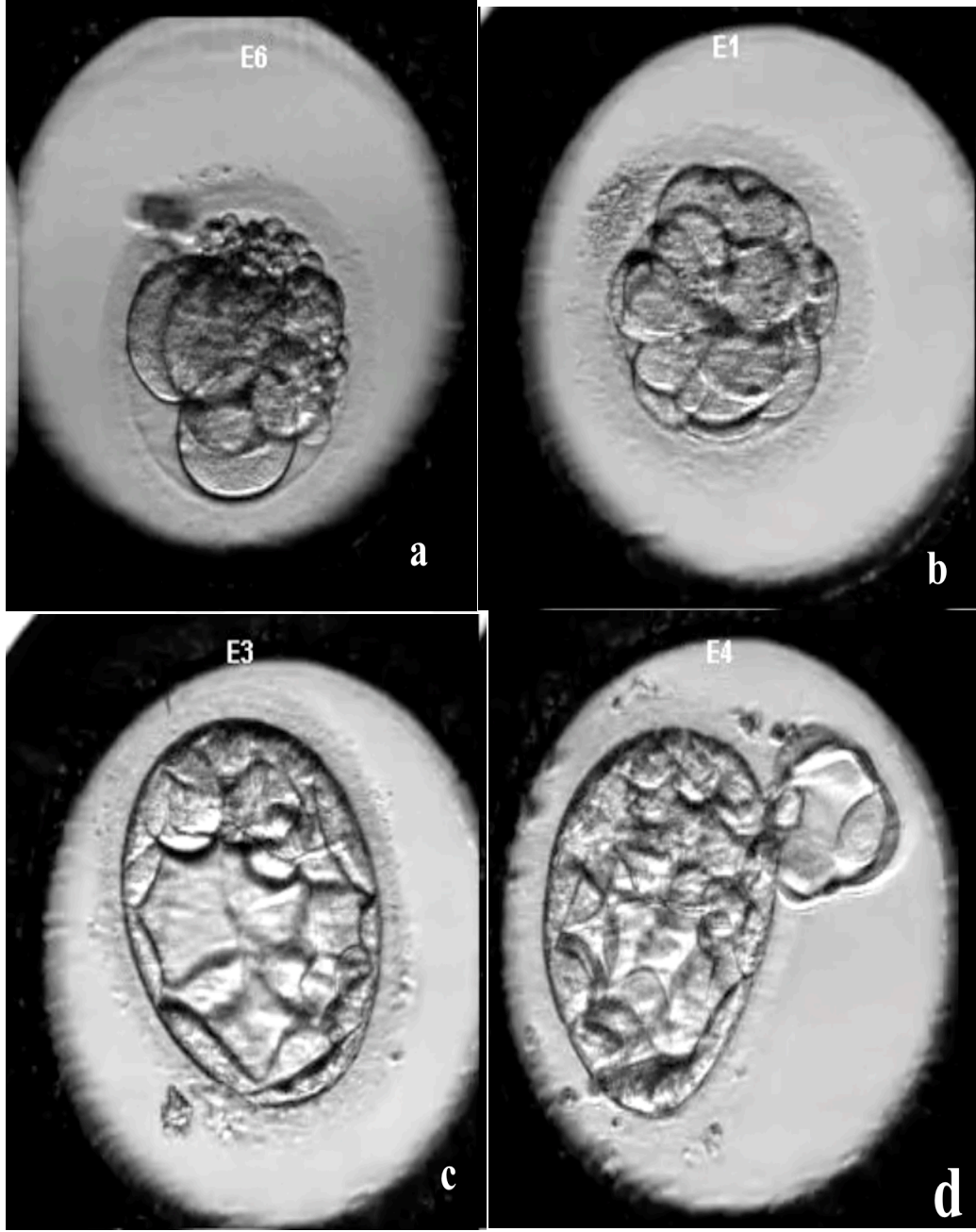
Grade	Klivanj evresi hücre sayısı (1-8)		Morula/Blastosist:erken/gelişmiş /hatch olan	
	Fragmantasyon (%)	Simetri	İç hücre kütlesi	Trofoektoderm
İyi (1)	0 %1-10	Mükemmel	İyi	İyi
Orta (2)	%11-25	Orta asimetri	Orta	Orta
Kötü (3)	>%25	Ciddi asimetri	Kötü	Kötü
Bilinmiyor (4)	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Girilmemiş (5)	Girilmemiş	Girilmemiş	Girilmemiş	Girilmemiş



**Ek 3.** a) Siyah ok polar cisimleri göstermekte. b)Pronükleus görüntüsü c)Vakuol görüntüsü d)Multinükleasyon görüntüsü

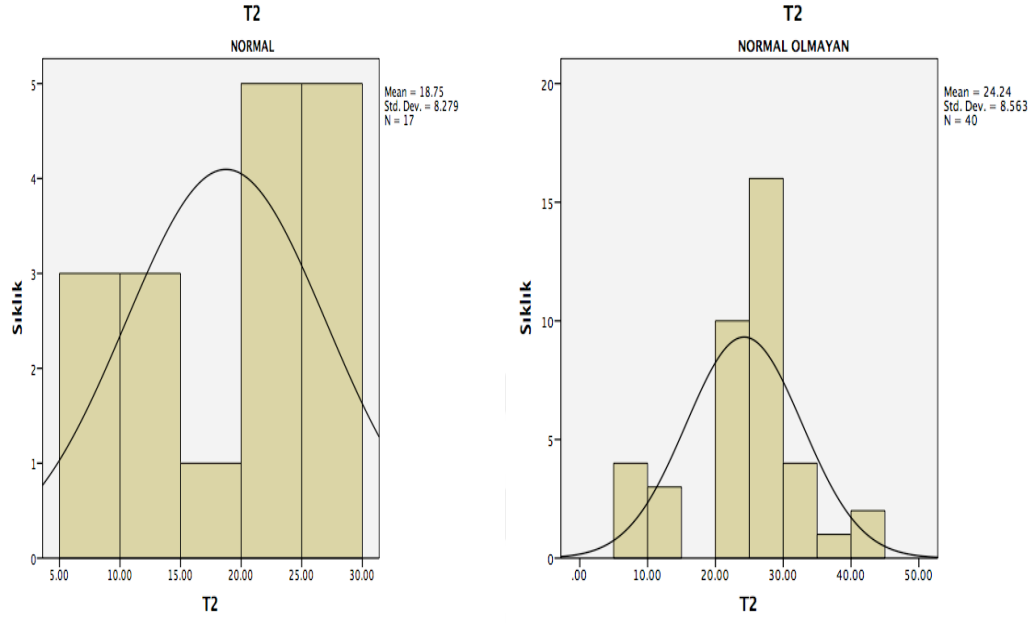


**Ek 4.** a) İki blastomerli evre (T2) b) Üç blastomerli evre (T3) c) Dört blastomerli evre (T4) d) Sekiz blastomerli evre (T8)

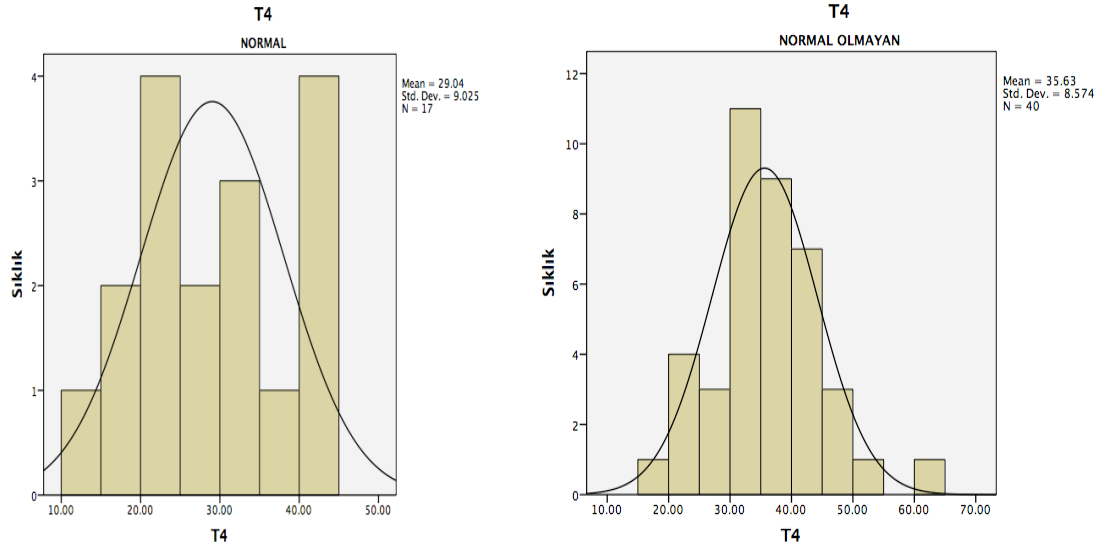


**Ek 5.** a)Fragmante olmuş hücre görüntüsü b)Morula evresi c)Tam blastokist görüntüsü d) Hatch olmuş blast görüntüsü

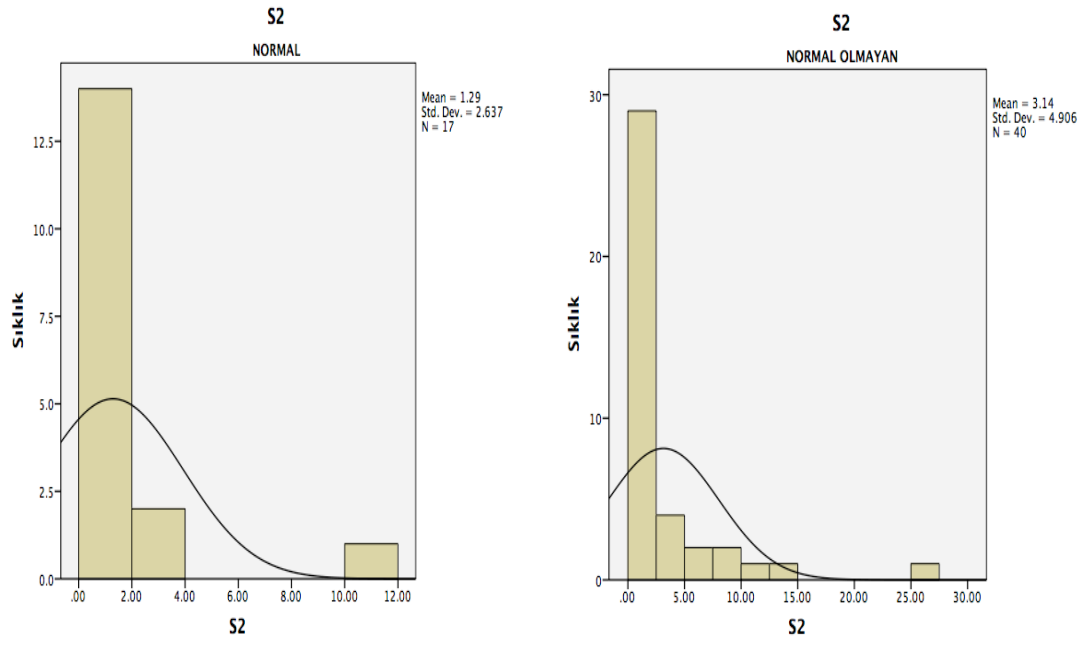




**Ek 6.** Normal ve anormal gruba ait T2 zamanlarının dağılımı. Normal grupta ortalama T2 süresi 18,75 saat iken anormal grupta ortalama T2 süresi 24,24 saattir.



**Ek 7.** Normal ve anormal gruba ait T4 zamanlarının dağılımı. Normal grupta ortalama T4 süresi 29,04 saat iken anormal grupta ortalama T4 süresi 35,63 saattir.



**Ek 8.** Normal ve anormal gruba ait S2 zamanlarının dağılımı. Normal grupta ortalama S2 süresi 1,29 saat iken anormal grupta ortalama S2 süresi 3,14 saattir.

