

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ICSI VE IVF İŞLEMİ UYGULANMIŞ KARDEŞ OOSİTLERDE EMBRİYO
GELİŞİMİNİN DİNAMİK EMBRİYO GÖRÜNTÜLEME SİSTEMİ İLE
MORFOKİNETİK ÖZELLİKLER YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMASI

Turan AKSOY

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Engin Oral

İSTANBUL
2015

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans
Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/10/2015

Prof. Dr. Tülay İrez
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Engin ORAL
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
üye

Prof. Dr. Emir TAN
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
üye

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 haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

TURAN AKSOY

İTHAF

Sevgili eşim Yonca AKSOY'a ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini paylaşan, değerli danışmanım sayın **Prof. Dr.ENGİN ORAL**'a;

Yüksek lisans eğitimimde, işe başladığım günden beri bana yardımcı olan, derin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli klinik başkanımız **Prof. Dr. MUSTAFA BAHÇECİ** 'ye;

Tezimin yazımı için desteklerini esirgemeyen sayın **Uzm.Dr. FAZİLET KÜBRA BOYNUKALIN**'a ve değerli hocam **Uzm.Dr. GÖÇHAN GÜVENÇ KARLIKAYA**'ya, yüksek lisans tezimi yazarken bana destek olan değerli direktörümüz **Dr. NECATİ FINDIKLI**'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince, bıkmadan gösterdiği bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Klinik Embriyoloji Bölüm Başkanı Sayın **Prof. Dr. TÜLAY İREZ**'e;

Tez yazımdaki istatistik değerlendirmelerinde bana yardımcı olan **Doç.Dr.CEM ÇELİK**'e, **Emb.BİLGEN TEKE** ye, Eğitimime başladığım ilk günden beri bana her konuda yardımcı olan ve manevi gücü bana hissettiren çok kıymetli annem **FATMA AKSOY**'a, rahmetli babam **ALİ AKSOY**'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde ve tez yazım aşamamda yardımlarını esirgemeyen arkadaşım **Emb.CİHAN GÖKTAŞ**'a ve manevi desteklerini hissettiren arkadaşlarım, **Emb.ORÇUN OLCAY**'a, **Emb.HAKAN YÜCETAŞ**'a ,**Emb. ASUMAN İŞLER**'e, **Emb.SERKAN KARKİLİ**'ye ve tıbbi sekreter **ASUMAN ARSLAN**'a çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana maddi-manevi destek olan ablalarım **ELİFE AKSOY**'a ve **AYŞE YILDIZ**'a, sabrı ve bana olan güveni için sevgili eşim **YONCA AKSOY**'a sonsuz kez teşekkür ederim.

Bu çalışma **BAHÇECİ SAĞLIK GRUBU** tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
2. GENEL BİLGİLER	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Çalışmaya Dahil edilme Kriterleri.....	21
3.2. Ovulasyon İndüksiyon Protokolleri ve Yumurta Toplama İşlemi	21
3.3. Kullanılan Cihaz, Solüsyon ve Malzemeler	22
3.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	22
3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar	23
3.3.2. Kullanılan Malzemeler	23
3.4. IVF ve ICSI teknikleri ile inseminasyon uygulanması.....	24
3.4.1. Hazırlık işlemleri.....	24
3.4.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU)	27
3.4.3. Inseminasyon için sperm örneğinin hazırlanması	29
3.4.4. Inseminasyon öncesi Hayluronidaz enzim uygulaması.....	31
3.4.5. ICSI uygulaması	31
3.4.6. IVF uygulaması	32
3.4.7. Fertilizasyon kontrolü ve ileri embriyo kültürü	32
3.5. İstatistik	33
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
6. KAYNAKLAR	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Gelişmekte olan bir insan embriyosuna ait Embryoscope görüntüleri	19
Şekil 2. Embryoscope (R) time-lapse cihazı.....	22
Şekil 3. OPU uygulaması için hazırlanan 3 damlacıklı kültür kabı.....	24
Şekil 4. Hyaluronidaz uygulaması için hazırlanan 4 damlacıklı kültür kabı	25
Şekil 5. IVF uygulaması için hazırlanan 4-kuyucuklu kültür kabı.....	25
Şekil 6. Embryoslide.....	26
Şekil 7. ICSI sonrası oositlerin büyütüldüğü standart kültür kabı.....	26
Şekil 8. ICSI için kullanılan kültür kabının hazırlanması.....	27
Şekil 9. OPU işleminde kullanılan cihazlar	28
Şekil 10. OPU işlemi sırasında elde edilen KOK görüntüleri (10X).....	29
Şekil 11. Hyaluronidaz uygulaması için kullanılan kültür kabı.....	31

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan solüsyonlar	23
Tablo 2. Çalışmada kullanılan atılabilir malzemeler	23
Tablo 3. Sperm hazırlığı amaçlı gradyen solüsyonların hazırlanışı.....	29
Tablo 4. Çalışmaya ait genel tanımlayıcı istatistikler	34
Tablo 5. Morfokinetik zamansal skortlama tablosu (t_0 = inseminasyon)	36
Tablo 6. Morfokinetik zamansal skortlama tablosu (t_0 = tPNf).....	37

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagles mediumu
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPBS	Dulbecco'nun fosfat tamponlu salin solüsyonu
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EG	Etilen glikol
g	Gravite (Santrifüj dönüş hızı)
ICSI	Instrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	In vitro fertilizasyon
KOK	Kümüls oosit kompleksleri
LAF	Laminar Air Flow
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mol/l	Mol/litre
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
OPU	Oosit (yumurta) toplama işlemi
PVP	Polivinilpirolidon
YÜT	Yardımla üreme teknikleri
α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre

ÖZET

İlk uygulanmaya başladığı dönemde özellikle şiddetli erkek infertilitesi vakalarının tedavisi amacıyla gerçekleştirilen intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tekniği, artık erkek infertilitesi dışında da uygulanabilen standart bir fertilizasyon metodu olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, uygulamanın invaziv olması ve uygulama esnasında pek çok doğal aşamayı atlatması nedeni ile tedavi ve sonrasındaki sonuçları halen araştırılan ve tartışılan bir yöntemdir.

Günümüze kadar gerçekleştirilen ve ICSI tekniğinin in vitro fertilizasyon (IVF) tekniğine kıyasla embriyo gelişimi üzerindeki olası farklı etkilerinin incelendiği çalışma sayısı kısıtlıdır. Sonuçları büyük oranda etkileme özelliğine sahip gamet kaynaklı değişkenlerden mümkün olduğu kadar bağımsız olarak ve sadece tekniğin uygulanma şekli ile ilgili olası sonuçlarının ölçülebildiği vakalar ile kurgulanan (Erkek faktörü olmayan ve kardeş oositlerin kullanıldığı) ve gerçekleştirilen az sayıdaki çalışma da olası farklılıkları statik embriyo kültür şartlarında ve farklı sperm özelliklerindeki vakalarda değerlendirmiş olup, olası morfokinetik farklılıkların detaylı olarak incelenebileceği bir deneysel altyapıya sahip değildir.

Bu çalışmada, şiddetli erkek faktörü olmayan 30 vakada, IVF ve ICSI yöntemleri ile insemine edilen 723 kardeş oositin fertilizasyon sonrası oluşturduğu 344 zigot (IVF ile fertilize olmuş 165 zigot ve ICSI ile fertilize olmuş 179 zigot) dinamik embriyo kültür sistemleri ile büyütülerek erken ve geç dönem embriyo morfokinetik değişimleri gözlenmiş, karşılaştırılmış ve özellikle kullanılan fertilizasyon yöntemine bağlı olası morfokinetik değişiklikler mümkün olan gelişim dönemleri içerisinde analiz edilmiştir.

Bulgular, gruplar arasındaki olası morfokinetik farklılıkların karşılaştırılması için zamansal başlangıç noktasının inseminasyon saati olarak alındığı incelemede, her iki grup arasında embriyo takibinin yapıldığı en son aşama olan hatching blastosist aşamasına (tHB) kadar gözlenen farklı parametreler arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığını ($p < 0,05$), buna karşın aynı verilerin zamansal başlangıç noktasının pronükleusların silinmesinin gözlenmeye başladığı saat olarak alındığı şekli ile incelenmesi sonrasında IVF grubundaki zigotların ICSI grubundaki zigotlara kıyasla

anlamli bir oranda ($p=0,02$) erken saatte ekspanse blastosist aşamasına ulaştıklarını göstermiştir.

Elde edilen bulgular ayrıca erkek faktörü olmayan olgularda ICSI yöntemi ile fertilize olan embriyoların IVF yöntemi ile fertilize olan embriyolara kıyasla son derece benzer bir embriyo morfokinetik gelişim sürecine sahip olduğunu göstermektedir. Morfokinetik karşılaştırmanın tPNf zamansal değişkenine göre yapıldığı ve IVF grubunda anlamlı oranda ekspanse blastosist elde edildiğini gösterir bulguların daha fazla sayıda vaka ve embriyo üzerinde doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

Although at the very beginning, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was especially described for the treatment of severe male infertility in IVF, it is now well recognized as a standard fertilization method which is applied in the absence of a male factor. However, the invasiveness of the procedure itself and because it skips many natural steps of the fertilization process, ICSI outcomes during and after the IVF treatment are still under investigation, and the method is still discussed.

Number of studies investigating the possible effects of the ICSI technique compared to classical IVF regarding embryo development are limited. Analyses planned in order to totally or partially eliminate gametes-related variables (e.g. no male factor, and including sibling oocytes) to obtain results of the sole technique and its application, were realized in static or standard embryo culture conditions and were evaluated in cases with different sperm characteristics, thus were not examined in a detailed morphokinetic experimental environment.

This study included 723 sibling oocytes belonging to 30 couples without severe male infertility and inseminated either with IVF or ICSI. After fertilization, 344 zygotes were obtained (n=165 from IVF and n=179 from ICSI) and were cultured in a dynamic embryo culture system in order to observe and to compare early and late morphokinetic parameters to outline probable differences in developmental stages regarding the fertilization method employed.

When morphokinetic parameters were compared using the insemination time as the starting point, no significant statistical differences were observed for all developmental parameters annotated until the hatching blastocyst stage (tHB) ($p < 0.05$). However, when the pronuclei fading time was taken as t_0 , zygotes obtained from IVF were found to develop into expanded blastocysts earlier than those derived from ICSI ($p = 0.02$).

The findings also show that in couples without male infertility, embryos fertilized with ICSI had an extremely similar morphokinetic developmental pattern when compared to their siblings fertilized by IVF. In conclusion, results obtained by using the pronuclei fading time (tPNf) as the starting point of the morphokinetic analyses have to be confirmed in a larger set of patients and sibling embryos.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada yardımla üreme teknikleri uygulamasından sonra doğan ilk bebeğin üzerinden 30 yıldan uzun zaman geçmiş olmasına karşın, insan embriyolarında implantasyon öncesi dönem embriyo gelişimi hakkında, özellikle embriyoların rahme tutunma potansiyellerini belirleyen temel yollar hakkında bilgi düzeyimiz halen oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, halen dünyada pek çok ülkede olası çoğul gebelik ve ilgili risklere rağmen yardımcı üreme teknikleri (YÜT) tedavilerindeki başarı şansını arttırabilmek amacı ile birden fazla embriyo transferi yapılmaktadır [1]. Birden fazla embriyo transferi ile ilişkili oluşan riskleri ortadan kaldırabilmek ve aynı zamanda yüksek gebelik oranlarını koruyabilmek için halen dünya genelinde pek çok araştırmacı gebelik oluşturma potansiyeli en yüksek olan embriyonun seçilmesini sağlayabilecek yeni metodlar/kriterler üzerinde ciddi çalışmalar yapmaktadır.

YÜT tedavilerinde günümüzde en iyi embriyonun seçilmesi amacıyla en yaygın kullanılan yaklaşım/yöntem gelişmekte olan implantasyon öncesi insan embriyolarının gelişim parametreleri ve morfolojileri üzerinde yapılan değerlendirmedir [2], [3]. Gelişen embriyoların hücre sayıları ve kaliteleri konusunda yapılan değerlendirmeler ve seçim sonrası gerçekleştirilen embriyo transferleri ile YÜT başarı oranları ciddi olarak arttırılabiliyor olsa da, halen mevcut başarı oranları beklenen seviyelerin çok altındadır [4], [5].

Başarılı bir implantasyon ve gebelik eldesinin, doğru embriyo seçimi yanında üreme biyolojisi ile ilgili pek çok faktöre de bağlı olduğu bilinen bir gerçektir. Bununla birlikte, son yıllarda YÜT tedavilerinde kullanılmaya başlayan yeni nesil cihazlar/ekimanlar ve bu sistemler ile gerçekleştirilen çalışmalar, laboratuarda günlük olarak çok kısa süre içerisinde genel laboratuvar ortamında gerçekleştirilen embriyo morfolojisine dayalı değerlendirme ve seçim sistemleri (statik kültür) yanında, mikroskop ve inkübatörün bir arada bulunduğu ve embriyoların sürekli (gerçek zamanlı) ve morfokinetik olarak kaydedilerek değerlendirilebildiği sistemlerin de (dinamik kültür) tedavide başarılı olacak embriyonun seçiminde anlamlı bir fark yaratabildiğini göstermektedir [6].

Dinamik kültür sistemlerinin YÜT tedavileri üzerindeki beklenen ilk ve en önemli etkisi, implantasyon öncesi dönem embriyo morfokinetik özelliklerinin daha iyi anlaşılması ve bu sayede gebelik oluşturma başarısı en yüksek embriyonun seçilebilmesine olanak sağlamalarıdır. Yakın bir süre öncesine kadar dünya genelinde bu amaçla gerek deney ve çiftlik hayvanlarında gerekse insan embriyoları üzerinde pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir [7]. Çalışmalarda elde edilen bulgular, gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilen embriyo morfokinetik gözlemleri ile gebelik oluşturma potansiyeli yüksek embriyolar arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir [6], [8], [9]. Bununla birlikte, çalışmalarda kullanılan dinamik embriyo kültür ve gözlem sistemlerinin sadece araştırma amaçlı olarak tasarlanmış olmaları, maliyetlerinin çok yüksek oluşu vb. gibi nedenler ile 2010 yılı öncesine kadar yaygın olarak klinik kullanım imkanı bulamamışlardır. Geçtiğimiz 5 yıl içerisinde bu alanda gerçekleştirilen atılım ve ilerlemeler ile üretilen ticari cihaz/ekipmanlar sayesinde dünya genelinde her gün artan sayıda klinikte dinamik embriyo kültür sistemleri kullanılmaya başlanmaktadır [10].

Dinamik kültür sistemlerinin bilimsel araştırmalar dışında da yaygınlaşması ile özellikle implantasyon öncesi dönem embriyo morfokinetiği üzerindeki klinik çalışma sayılarında da belirgin bir artış gözlenmektedir. Sahip olunan teknoloji ve bilgi birikimi sayesinde, geçmiş dönemlerde statik embriyo kültür şartları ve gözlemsel sınırlar nedeni ile gerçekleştirilmesi/görülmesi mümkün olmayan değişiklikler gözlenebilmekte ve bu değişikliklerin insan embriyolojisi ve klinik uygulamalar üzerindeki etkileri çok daha yakından takip edilebilmektedir. Bu değişikliklerin en başında, uzun yıllardır fertilizasyon amaçlı uygulanan in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gelmektedir. Klasik IVF ve ICSI tekniklerindeki farklı karakteristiklere bağlı olarak zigot oluşumu ve sonrasındaki implantasyon öncesi embriyo gelişimi statik kültürlerde benzer görünmesine rağmen morfokinetik açıdan farklılıklar gösterebilmektedir. Bununla beraber, IVF ve ICSI uygulamalarının embriyo kalitesine ve gelişim dinamikleri üzerine etkileri konusunda sınırlı bilgi mevcuttur [11], [12]. Örneğin, klasik IVF yöntemi ile elde edilen fertilizasyon doğal bir üreme siklusunda elde edilen fertilizasyonla son derece benzer bir biçimde oluşmakta iken, ICSI yönteminde ve sonrasında elde edilen fertilizasyonda spermatazoa ve oosit arasında doğal süreçte belirli bir yolak dahilinde oluşması gereken pek çok basamak atlanmaktadır [13], [14].

Fertilizasyon sonrası ilk hücre bölünme zamanlamasının fertilizasyon metoduna göre değişiklik gösterebildiği bilinmektedir. Bu farklılık, IVF yöntemi ile fertilizasyonun sağlandığı tedavilerde spermin zona pellusida ve oolemmaya penetre olurken oluşmakta, dolayısıyla ICSI metoduyla fertilize olan oositler 2 ile 4 saat daha erken pronükleer silinme ve ilk klivaj bölünmesini gerçekleştirmektedir [15], [16]. Aynı şekilde, ICSI olgularında, 2-hücreli dönemden 4-hücreli embriyo dönemine geçişin de IVF olgularına göre yaklaşık 2,5 saat daha kısa olduğu gözlemlenmiştir [17]. Dolayısıyla, YÜT uygulamalarında farklı fertilizasyon metodları kullanılan tedavi sikluslarında embriyo gelişiminin, kalitesinin ve zamanlamasının değerlendirilmesinde bu ve bunun gibi faktörün kontrol edilmesinin önemi büyüktür.

Bununla birlikte, günümüzde IVF ve ICSI sonrası elde edilen fertilizasyon ve sonrasında gözlenen embriyo gelişiminin gerçek zamanlı olarak değerlendirildiği çalışmalar son derece sınırlıdır. Çok yakın bir süre önce gerçekleştirilen, çalışma içerisine alınan farklı hastaların tedavileri sırasında IVF ve ICSI olarak gruplandırıldığı ve elde edilen zigot ve embriyoların dinamik embriyo kültür sistemleri ile büyütülerek karşılaştırıldığı iki farklı çalışmada, her iki grupta gelişen embriyolar arasında anlamlı bir morfokinetik farklılığın bulunmadığı belirtilmiştir [18], [19].

Bu çalışmamızda amaç, IVF ve ICSI yöntemleri ile kardeş oositler üzerinde elde edilen zigot, erken ve geç dönem embriyo morfokinetik değişimleri incelemek, karşılaştırmak ve özellikle kullanılan fertilizasyon yöntemine bağlı olası değişiklikleri analiz etmektir. Çalışmamızın bahsi geçen diğer çalışmalardan en önemli farklı, iki farklı fertilizasyon grubu arasındaki bu karşılaştırmanın aynı hasta ve siklusuna ait kardeş oositler üzerinde yapıyor olması, dolayısı ile hasta ve siklus kaynaklı yanlılıkları ve olası hataları da en aza indiriyor olmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

YÜT tedavilerinin uygulanması sırasında, doğal üreme süreç ve mekanizmalarında doğal süreçte mevcut olmayan şekilde birden çok aşamada manipülasyon yapılmaktadır. Son yıllarda bu manipülasyonların farklı YÜT tedavileri sırasında embriyolarda, tedavi sonrasında prenatal dönemde ve sonrasında doğan çocukların sağlıkları üzerine herhangi bir etkisi olup olmadığı, genetik geçişli problemlerin YÜT sonrası doğan çocuklardaki olası görülme sıklıkları ve farklar vb. gibi konular ile ilgili pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir ve gerçekleştirilmeye devam etmektedir [20], [21]. Bu çalışmalardan bazılarında incelenen parametreler arasında anlamlı farklılıklar gözlenirse de, mevcut çalışmaların çoğu, çalışma tasarımları, çalışmaya dahil edilen örnek sayısındaki kısıtlılık veya kullanılan değerlendirme kriterlerinin uygunsuzluğu vb. gibi nedenlere bağlı olarak net bir sonuç ortaya koyamamaktadır. Bu nedenle, fertilizasyon için kullanılan tekniklerin arasında yardımcı üreme teknikleri ile doğan bebeklerde son derece düşük oranda da olsa karşımıza çıkan bazı sıkıntıların uygulanan tekniğe mi yoksa fertiliteyi etkileyen gamet kalitesindeki olumsuz durumdan mı kaynaklandığı sorusuna net bir cevap verememektedir. Klinik sonuçlardaki bu belirsizliğe rağmen, gamet ve erken embriyo gelişimi üzerinde uzun yıllardır gerçekleştirilen çalışmalar, özellikle implantasyon öncesi dönemde embriyo kültüründe oluşabilen çok küçük farklılıkların dahi prenatal ve doğum sonrası bireylerde ciddi riskler oluşturabileceğini ortaya koymaktadır [22], [23].

YÜT tedavilerinde ICSI yönteminin kullanımı, yakın bir süre öncesine kadar sadece şiddetli erkek infertilitesi vakalarında ve geçmişte fertilizasyon başarısızlığı gözlenen vakalarda tercih edilmekte iken, gün geçtikçe pek çok klinikte ve ülkede belirtilen vakaların dışında da popülerlik kazanmaktadır. Özellikle erkek infertilitesi dışındaki endikasyonlarda ICSI kullanımı sonrası elde edilen embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları da bu yaygın kullanımı doğrular niteliktedir [11], [24], [25], [26]. Bununla birlikte, günümüze kadar bu tekniğin IVF metoduna kıyasla embriyo gelişimi üzerindeki olası farklı etkilerinin kardeş oositlerde kıyaslandığı çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır [12], [25], [27], [28] [29]. Bu alanda gerçekleştirilen az sayıdaki çalışma da olası farklılıkları statik embriyo kültür şartlarında ve farklı sperm özelliklerindeki

vakalarda değerlendirmiş olup, olası morfokinetik farklılıkların detaylı olarak incelenebileceği bir deneysel altyapıya sahip değillerdir.

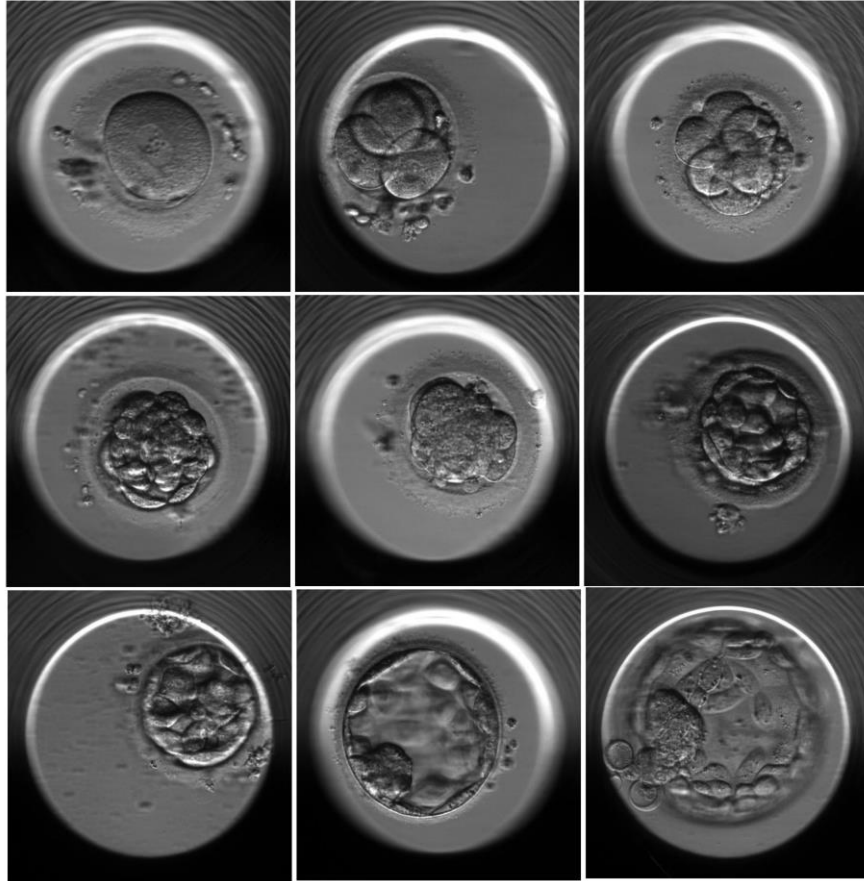
Dinamik embriyo kùltürü veya diğer tarifi ile embriyoların gerçek zamanlı morfokinetik analizi YÜT uygulamalarında özellikle son 5 yılda popülerlik kazanan bir kavram olsa da aslında memeli embriyo araştırmalarında uzun süredir var olan bir yaklaşımdır. İlk olarak 1900'lü yıllarda doku ve organların cinematografik gözlemlenmesi ve fonksiyonlarının incelenmesi amacı ile geliştirmeye çalışılan teknoloji daha sonraki dönemlerde canlı hücreler üzerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Memeli embriyoları üzerinde ilk dinamik embriyo kùltürü, Lewis ve Gregory tarafından 1929 yılında tavşan embriyoları üzerinde gerçekleştirilmiştir [30]. Bu dönemde ne yazık ki embriyoların laboratuvar ortamında büyütülmesine yönelik uygun bir kùltür sistemi mevcut olmadığından, benzer çalışmaların yaygınlaşması ancak 1960'larda John D. Biggers, Ralph Brinster, Anne McLaren ve W. Whitten gibi bilim insanlarının uygun kùltür sıvılarını geliştirmesi ile olmuştur [31].

Tavşan embriyoları üzerinde gerçekleştirilen ilk çalışma sonrasında benzer çalışmalar fare [32], [33], [34], [35], [36], hamster [37], [38], sığır [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47], at [48], keşeliler [49], domuz [50] ve insan [51], [52], [53], [54] embriyolarında gerçekleştirilmiştir. Bu ve benzer çalışmalar memeli embriyolarında kutuplaşma ve klivaj aksının oluşumu, metilasyon farklılıkları, her bir hücrenin ilk bölünme aşamalarındaki konumu ve durumu ile ileri günlerde trofektoderm ve iç hücre kütlesi oluşumu ve hatching mekanizmaları gibi bilgileri ve bugün kullanmakta olduğumuz statik ve dinamik embriyo değerlendirme sistemlerinin temellerini oluşturan çalışmalardır [55], [56], [57],[58], [59], [60], [61], [62], [63].

Embriyoların gerçek zamanlı morfokinetik incelemesi tanım itibariyle laboratuvarda büyütölen implantasyon öncesi embriyoların sürekli ve gerçek zamanlı olarak gözlenmesi, kaydedilmesi ve standart bir gelişim şablonuna göre karşılaştırılması anlamında kullanılmaktadır. Dolayısı ile adı geçen uygulamanın gerçekleştirilebilmesi için mikroskop, inkübatör ve kayıt cihazlarından oluşan kompleks bir sisteme ihtiyaç vardır. Teknolojik gelişmeler, yıllar içerisinde bu alanda da farklı sistemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Yakın bir süre öncesine kadar gerçek zamanlı morfokinetik analizler sadece mikroskopların çevrelerinde oluşturulan inkübatör benzeri kapalı alanlar içerisinde ve sadece tek bir kùltür kabının incelenmesine olanak veren sistemler

iken, günümüzde bu cihazlar artık çok daha sofistike kontrol ve kayıt sistemlerine sahip, aynı anda birden fazla kültür kabının incelenebildiği ve gerçek zamanlı olarak değerlendirilebildiği entegre sistemler olarak kullanıma sunulmaktadır [64], [65].

Günümüzde en sık kullanılan gerçek zamanlı morfokinetik analiz sistemleri içindeki mikroskop ünitesi, farklı odak katmanlarında belirli aralıklar ile dijital görüntü kaydı oluşturmakta ve sonrasında bu görüntüleri birleştirerek embriyonun değişen yapısının gözlenebildiği dijital bir filme dönüştürmektedir. [64], [66], [67]. Şekil 1'de aynı embriyoya ait farklı gelişim zamanlarında yakalanan dijital görüntüler görülmektedir. Dahası sistem içerisindeki mevcut yazılım sayesinde her bir kullanıcı istediğinde farklı algoritmalar oluşturabilmekte ve böylece kişiye/kliniğe özel embriyo seçim kriterleri ve şablonu oluşturulması mümkün olabilmektedir.



Şekil 1. Gelişmekte olan bir insan embriyosuna ait Embryoscope görüntüleri

Günümüze kadar insan embriyoları üzerinde gerçekleştirilen morfokinetik analizlerde, en başarılı embriyo seçim kriterlerinin belirlenmesinden ziyade gebelik oluşturma başarısı düşük embriyoların seçimi için blastomer büyüklüklerinin eşit olmaması, fragmentasyon ve multimükleasyon gibi statik kriterlerin yanında pronükleusların silinmesi [68], düzenli olmayan bölünmeler ($1 \rightarrow 3$ hücre veya $1 \rightarrow 5$ hücre doğrudan bölünme) [67], [69] gibi yeni morfokinetik kriterler de anlamlı olarak kullanılmaktadır. [8]. Diğer taraftan erken klivaj dönemindeki 1., 2. ve 3. mitoz bölünmenin zamansal değerleri blastosist oluşturma potansiyelinin önceden belirlenebilmesi amacı ile kullanılan en önemli kriterler olarak karşımıza çıkmaktadır. [70], [71], [72]. Halen dünya genelinde pek çok çalışma embriyo gelişimi ve seçimi konularına odaklandığından [72], [73] gerçek zamanlı embriyo morfokinetik analizi kullanımının klinik gebelik ve doğum sonuçları üzerine etkisini araştıran çalışma sayısı son derece sınırlıdır [68].

Gerçek zamanlı embriyo morfokinetik analiz yaklaşımlarının daha iyi embriyo seçimi ve klinik açıdan başarı oranlarının artırılabilmesi üzerine olası olumlu etkilerinin yanında, dünya genelinde pek çok grup bu teknolojiyi üreme biyolojisi ve genetiği bünyesinde kadın ve erkek yaşı [74], infertilite nedeni [75], vücut kitle indeksi [76], over rezervi ve ovarlerin stimülasyona yanıtı [74], [77], [78], sperm özellikleri [79], inseminasyon teknikleri [18], [19], [80], embriyo kültür koşulları ve kültür mediumları [81], [82], [83], [84], gamet/embriyo uygulamaları [85], embriyo cinsiyeti [86], [87], kromozomal yapı [88], [89], [90], [91], [92] ve sigara kullanımı [93] gibi farklı parametre/değişkenlerin embriyo morfokinetiği üzerindeki olası etkilerini inceleme amacıyla da yaygın olarak kullanmaya başlamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Dahil edilme Kriterleri

Bu çalışma Nisan 2014 -Aralık 2014 tarihleri arasında Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezinde prospektif olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya kadın yaşının 18-37 arasında olduğu çiftler alınmıştır. Tüm hastalar infertilite açısından detaylı olarak değerlendirilmiştir ve kadın hastalara tubal patolojinin ekarte edilmesi amacıyla HSG çekilmiştir. Çalışmaya ovulatuar olan kadın hastalar alınmıştır. Erkek hastaların hepsi semen analizi ile değerlendirilmiş. sperm sayısı ($>20 \times 10^6/\text{ml}$) ve motilite yüzdesi ($>50\%$) ve morfolojisi ($>4\%$) normal olan hastalar çalışma kapsamına alınmıştır.

- Over kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla antral folikül sayımı yapılmış ve her iki overde toplam 8 adet antral folikül sayısının altında olan hastalar,
- Yapılan transvajinal ultrasonografide endometrioma saptanan olgular ya da cerrahi olarak endometriozis belirlenmiş olgular,
- Hidrosalpenks saptanan ya da tüplerde geçiş görülmeyen olgular,
- Kadın hastaların vücut kitle indeksi $19 \text{ kg}/\text{m}^2$ altında olanlar ve $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ üzerinde olanl hastalar,

çalışma dışı bırakılmıştır.

3.2. Ovulasyon İndüksiyon Protokolleri ve Yumurta Toplama İşlemi

Tüm hastalara tedavi protokolü olarak gonadotropin kullanılarak ovulasyon indüksiyonu yapılmış pitüiter desensitizasyon amacı ile GnRH Antagonisti kullanılmıştır. Hastalar menstrüel siklusun 2 ya da 3. günü merkeze gelerek kan ve ultrasonografik değerlendirmeye tabi tutulmuşlardır. Kanda progesteron düzeyi $1.5 \text{ ng}/\text{ml}$ 'nin altında olan olgular ve transvajinal ultrasonografide kistik oluşum saptanmayan olgularda ovulasyon indüksiyon protokolü uygulanmaya başlanmıştır. Hastalara günlük 225 IU rekombinant FSH (Gonal- F, Merck Serono, Sweden) verilmiş indüksiyonun 6. günü antagonist (Cetrotide, Merck Serono)tedavi başlanmış ve hCG gününe kadar devam edilmiştir. Hasta belirli aralıklarla kan ve ultrasonografi ile monitorize edilmiş ve 18 mm ve üzerinde 3 folikül belirlendiğinde hCG enjeksiyonu

(Ovitrelle, Merck Serono) yapılmıştır. Yumurta toplama işlemi enjeksiyondan 35 saat sonra transvajinal ultrasonografi eşliğinde 17 G tek lümen iğne ile yapılmıştır.

3.3. Kullanılan Cihaz, Solüsyon ve Malzemeler

3.3.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada, fertilizasyon sonrası dinamik embriyo kültürü ve takibi amaçlı olarak Unisense Fertilitech tarafından üretilmiş olan kendi içerisinde optik bir gözlem ve kayıt sistemi olan ve iç haznesine yerleştirilen embriyoların %6 CO₂ ve %5 O₂ gaz karışımında ve 37°C’de dış ortamdan izole bir şekilde geliştirilmesine olanak veren Embryoscope ® marka time-lapse cihazı kullanılmıştır (Şekil 2.).



Şekil 2. Embryoscope (R) time-lapse cihazı

3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar

Çalışmada Tablo 1’de detaylı üretici ve katalog numaraları verilen kimyasal ve solüsyonlar kullanılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

Solüsyon adı	Katalog no:	Üretici Firma
Modifiye HTF medium	90126	Irvine Scientific
Sperm yıkama medium	9983	Irvine Scientific
PureSperm-100	ET-HIS05-QI/04	Nidacon
Single Step mediumu (SSM TM)	90161	Irvine Scientific
Serum Substitute Supplement (SSS TM)	99193	Irvine Scientific
Hyaluronidase Solüsyonu	90101	Irvine Scientific
%10’luk PVP	90123	Irvine Scientific
Embriyo kültür yağı	9305	Irvine Scientific

3.3.2. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada Tablo 1’de detaylı üretici ve katalog numaraları verilen atılabilir malzemeler kullanılmıştır.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan atılabilir malzemeler

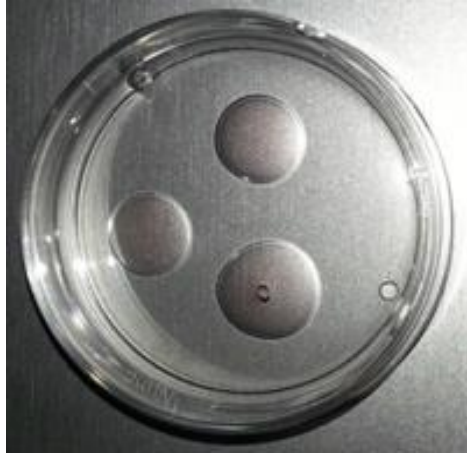
Malzeme adı	Marka	Katalog no:	Üretici Firma
Konik tüp (15 ml)	Falcon	352095	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı (15 ml) tüp	Falcon	352001	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı (5 ml) tüp	Falcon	352003	BD Sciences
25 cm ² ‘lik flask	Falcon	353009	BD Sciences
60 cm kültür kabı	NUNC	150270	Thermo Scientific
60 cm kültür kabı	Falcon	353652	BD Sciences
Oosit toplama seti	Smiths	ONS1833	Smiths Medical

3.4. IVF ve ICSI teknikleri ile inseminasyon uygulanması

3.4.1. Hazırlık işlemleri

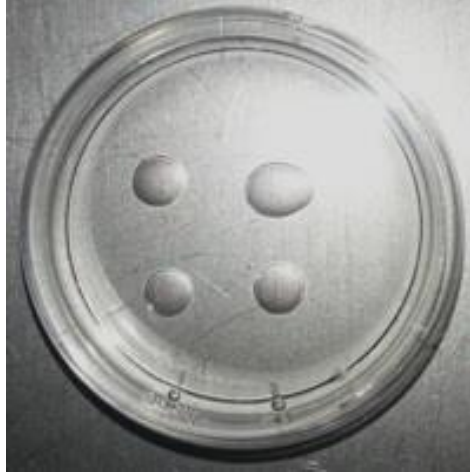
Komplet medium hazırlığı: 15 ml yuvarlak tabanlı Falcon tüp içerisine 9 ml Single Step Medium (SSM™) ve 1 ml Serum Substitute Supplement™ (SSS™) ilave edilmesi ile hazırlandı.

OPU kültür kabı hazırlığı: Her bir 60 cm'lik kültür kabında üç adet 300 ul'lik komplet medium damlacığı olacak şekilde, iki adet 60 cm'lik kültür kabı olarak hazırlandı ve damlacıkların üzeri embriyo kültür yağı ile kaplandı(Şekil 3).



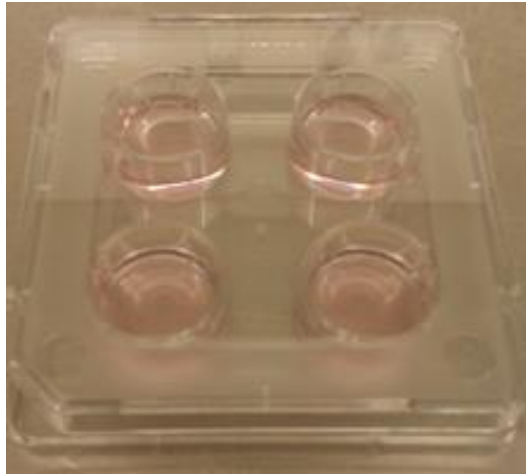
Şekil 3. OPU uygulaması için hazırlanan 3 damlacıklı kültür kabı

Hyaluronidaz kültür kabı hazırlığı: Her bir 60 cm'lik kültür kabında dört adet 300 ul'lik komplet medium damlacığı olacak şekilde iki adet 60 cm'lik kültür kabı olarak hazırlandı ve damlacıkların üzeri embriyo kültür yağı ile kaplandı (Şekil 4).



Şekil 4. Hyaluronidaz uygulaması için hazırlanan 4 damlacıklı kültür kabı

IVF kültür kabı hazırlığı: Her bir tüp içerisine 2 ml komplet medium olacak şekilde iki adet 5 ml'lik tüp olarak hazırlandı. Her bir kuyucuğunda 0,7 ml komplet medium olacak şekilde bir adet 4-kuyucuklu NUNC kültür kabı hazırlandı. Her bir kuyucuğun üzeri 0,3 ml embriyo kültür yağı ile kaplandı (Şekil 5).



Şekil 5. IVF uygulaması için hazırlanan 4-kuyucuklu kültür kabı

Embryoslidde kültür kabı hazırlığı: Toplamda 12 adet kuyucuğu bulunan embryoslidde kültür kabı içerisine %10 luk protein içeren 25 ul komplet kültür mediumu konuldu ve sonrasında kuyucukların üzeri 1.2 ml kültür yağı ile kaplandı. (Şekil 6).



Şekil 6. Embryoslide

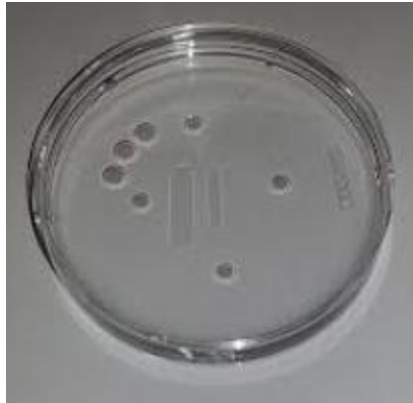
Standart kültür kabı hazırlığı: ICSI sonrası oositlerin fertilizasyon kontrol zamanına kadar büyümelerini sağlamak amacıyla 60 cm'lik kültür kabı içerisine Şekil 7'da görüldüğü gibi 18 adet her biri yaklaşık 20 ul'lik komplet kültür mediumu damlacığı hazırlandı ve damlacıkların buharlaşmasına izin vermeden üzerleri kültür yağı ile kaplandı.



Şekil 7. ICSI sonrası oositlerin büyütüldüğü standart kültür kabı

Yukarıda anlatıldığı şekilde bir gün önceden hazırlanan kültür kapları ve tüpler, içerdikleri kültür mediumlarının uygun gazlanması sağlayabilmek için kapakları yarı açık şekilde %5 O₂ %6 CO₂ içeren ve 37°C ve %95 nem kontrolünde olan inkübatörlerde gece boyunca gazlanmaya bırakıldı.

ICSI kültür kabı hazırlığı: ICSI için kullanılacak kültür kaplarının hazırlığı için mHTF mediumu kullanıldı. 60 cm'lik Falcon 353652 kültür kabının kapak kısmı ters çevrilerek orta bölgeye 10 mikrolitrelik üç adet yıkama drobu ve 5 mikrolitrelik 4 adet oositleri içine alıp ICSI yapılacak droplar, bunların arasına dikörtgen 10 mikrolitrelik sperm havuzu damlacığı ve onun yanına da 7 mikrolitrelik dikdörtgen şeklinde %10'luk Polyvinylpyrrolidone (PVP) damlacığı hazırlandı (Şekil 8). Yoğun ve visköz yapısından dolayı PVP, ICSI öncesi sperm hareketini yavaşlatarak daha sağlıklı morfolojik değerlendirme ve manipulasyon yapabilme amacı ile kullanıldı. Tüm diğer kültür kapları gibi bu kabın üzeri de adı geçen damlacıkların hazırlığı tamamlanır tamamlanmaz uygun bir volümde embriyo kültür yağı ile kaplandı ve en az 30 dakikalık bir süre için ısınması için 37°C etüve kaldırıldı.



Şekil 8. ICSI için kullanılan kültür kabının hazırlanması

Ayrıca Oosit toplama işlemi için gerekli olan Modifiye HTF mediumu, 25 cm²'lik flasklara bölündü, her bir OPU işlemi için bir flask olacak şekilde ısınması için 37°C 'ye ayarlanmış olan etüve konuldu.

3.4.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU)

Oosit toplama işlemi steril koşullarda ve bu işlem için özenle seçilmiş bir ultrason ünitesi ve aspirasyon cihazı (Şekil 9) kullanılarak, kısa süreli anestezi altında,

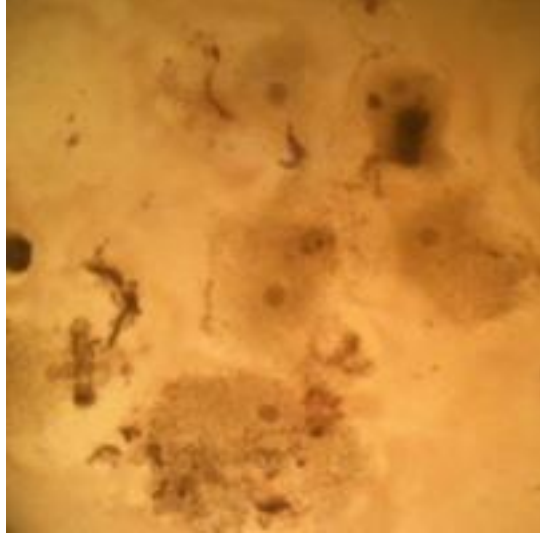
ultrasonografi eşliğinde ve işlem için özel olarak tasarlanmış steril oosit toplama seti ve iğnesi (18G) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 9. OPU işleminde kullanılan cihazlar

İğne yardımı ile her bir overden aspire edilen folikül sıvıları ve içerdikleri kümülüs-oosit kompleksleri (KOK), bir gün önceden hazırlanıp uygun şekilde gazlanmış modifiye HTF mediumu içeren 15 ml'lik yuvarlak tabanlı tüp içerisine toplandı ve mümkün olan en hızlı şekilde laboratuara ulaştırıldı.

Tüp içerisinde laboratuara ulaştırılan bu KOK yapıları embriyolog tarafından önce steril pastör pipeti kullanılarak ve LAF kabin içerisinde konumlandırılan bir stereo mikroskop altında gerçekleştirildi (Şekil 10). KOK yapıları sonrasında bir gün önceden hazırlanan ve gazlanarak pH değerinin 7,25-7.35 aralığında sabitlendiği kültür mediumunda toplandı.



Şekil 10. OPU işlemi sırasında elde edilen KOK görüntüleri (10X)

3.4.3. İnseminasyon için sperm örneğinin hazırlanması

Oositleri toplanan hastanın eşi işlem gününde üzerinde adı soyadı eş-adı yazılı hasta protokolü ve barkodu olan steril sperm toplama kabı hastayada okutularak ve kimlik kontrolü yapıldıktan sonra gerekli hasta bilgilendirmesi yapılarak örnek alımı için özel olarak tasarlanmış odaya alındı. Sperm örneği mastürbasyon yöntemiyle steril sperm kabının içerisine toplandı ve sperm verme odasını laboratuvar kısmına bağlayan ara bölme yardımı ile laboratuvara ulaştırıldı.

İşlemin yapılacağı sabah 2-8 derecede bulunan sperm yıkama medumu ve PureSperm®-100 solüsyonları buzdolabından çıkartılarak oda ısısına gelmeleri sağlandı. Bu ürünler kullanılarak sırası ile %50, %70 ve %90'lık gradyenler şeklinde, Tablo 3'te belirtildiği şekilde karıştırılarak hazırlandı.

Tablo 3. Sperm hazırlığı amaçlı gradyen solüsyonların hazırlanışı

	%50	%70	%90
Sperm yıkama medumu	5 ml	3 ml	1 ml
PureSperm-100	5 ml	7 ml	9 ml

İşlem günü hastanın eşinden yukarıda bahsedildiği şekilde elde edilen sperm örneği, aşağıdaki aşamalar takip edilerek inseminasyon için hazırlandı:

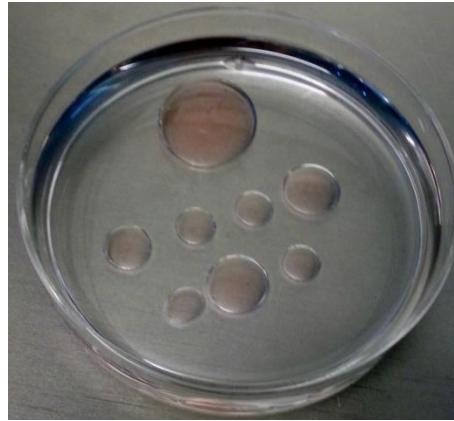
- Sperm örneği, 30-40 dakikalık bir likefaksiyon süresi sonrasında iyice akışkanlık kazandığı gözlemlenerek makler kamerası ve mikroskop altında sperm sayma işlemi yapılır ve androloji kayıt defterine sperm sayısı, hareketliliği, morfoljik değerlendirmesi not edildi.
- Daha önceden hazırlanmış olan gradyen solüsyonları yardımı ile sperm yıkamada kullanılacak 3'lü gradyen tabakası hazırlandı. Bu amaçla;
- 15 ml'lik falcon 2095 konik tüp içerisine önce %90 lık olan mediumundan 0,5 ml tübün dibine konuldu,
- Bu tabakanın üzerine, 0,5 ml %70 lik gradyen mediumu cam pastör pipet ve enjektör yardımıyla çok yavaş bir şekilde bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirildi,
- Daha sonra %50 lik olan mediumdan 0,5 ml'lik bir kısım yine pastör pipet yardımıyla tüpün dibine yavaş bir şekilde konuldu ve böylece üçlü bir gradiyent hazırlandı.
- Ön incelemesi yapılmış olan sperm örneğinin 1 -1,5 ml'lik kısmı, hazırlanmış olan bu üçlü gradiyent tabakası üzerine 45 dercelik açı ile steril pastör cam pipet ve pipetör vasıtasıyla konularak en üst kısımda yeni tabaka oluşturması sağlandı.
- Bu şekilde hazırlanan tüm ve örnek, 1800 rpm de 20 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası yıkanarak ayrışan ve tübün tabanında toplanan spermler, steril cam pastör pipeti ile ve enjektör yardımıyla çekildi ve ardışık olarak 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı.
- Sperm yıkama amacıyla, bir gün önce hazırlanmış olan %10 SSS™ katılmış ve gazlanmış SSM mediumu kullanıldı.
- Yıkama sonunda elde edilen sperm hücreleri makler kamarası ve mikroskop yardımıyla değerlendirilerek androloji kayıt defterine kaydedildi.
- Hazırlanan sperm örneği, IVF işleminde kullanılmak amacıyla, her bir KOK başına 100.000 sperm olacak şekilde hesaplama yapıldı, ve IVF

amaçlı inseminasyonun gerçekleştirileceği 4-kuyucuklu kültür kabı içerisine kaç mikrolitre sperm konulacağı hesaplandı.

3.4.4. Inseminasyon öncesi Hyaluronidaz enzim uygulaması

Hyaluronidaz uygulaması için kullanılan kültür kabı Şekil 11'de görülmektedir. Uygulama yapılması planlanan zamandan en az 4 saat önce 15 ml'lik mavi kapaklı konik falcon tüp içerisine 9 ml mHTF ve 1 ml SSS™ ilave edilerek 37°C etüv içerisine konulup ısınması beklendi.

Bu şekilde hazırlanıp uygun sıcaklığa ulaşan medium ile hem ayıklama işlemi hemde mikroenjeksiyon (ICSI) işlemi için kullanılacak kültür kapları hazırlandı. Ayıklama için kullanılacak kültür kapları içerisine öncelikle enzim uygulamasında kullanılmak üzere 375 ul mHTF + 125 ul Hyaluronidase solüsyonu karıştırılarak enzim damlacığı hazırlandı. Bu damlacığın yanına/etrafına mHTF mediumu kullanılarak 20 ul'lik 6-7 adet küçük damlacıklar (enzim uygulaması sonrası elde edilen oositlerin yıkanması ve enzimin uzaklaştırılması amacıyla) hazırlandı. Tüm damlacıklar hazırlandığında üzerleri embriyo kültür yağı ile kaplandı ve etüve konarak en az 30 dakika uygun sıcaklığa gelmesi ve dengelenmesi sağlandı.



Şekil 11. Hyaluronidaz uygulaması için kullanılan kültür kabı

3.4.5. ICSI uygulaması

ICSI işlemi öncesinde mikromaniplatöre oositi sabit tutma işinde kullanılan holding (Humagen MPH-SM-30) ve ICSI (Sunlight Medical SIC-50H-30) iğneleri takılarak işlem öncesi hazırlık yapıldı.

Inseminasyon öncesi uygun şekilde hazırlanmış olan sperm örneği, bölüm 3.4.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan ICSI kültür kabı içerisinde yer alan PVP damlacığı içerisine pastör pipeti yardımıyla konuldu ve böylece ICSI sırasında oosit içerisine enjekte edilecek spermier seçilmek üzere hazırlandı. Uygun şartlarda ve sürede spermierin seçilmesini ve immobilizasyon sonrası hazırlıklarını müteakip, oositler spermierin bulunduğu kap içerisine hazırlanmış olan droplara konuldu ve embriyolog tarafından her bir oosite 1 spermier enjekte edilecek şekilde mikroenjeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem bittikten sonra oositler vakit kaybetmeden 1 gün önceden hazırlanmış ve dengelenmiş olan standart embriyo kültür kaplarına, stereo mikroskop, pastör pipeti ve ağız pipeti yardımıyla her bir damlacık (drop) içerisinde 1 oosit olacak şekilde ve aktarıldı. Bu şekilde aktarımı yapılan kültür kabı inkübatör ortamına kaldırıldı.

3.4.6. IVF uygulaması

IVF ve ICSI kombinasyonu şeklinde inseminasyon planlanan hastalarda, uygun aday olarak belirlenen hastanın OPU işleminden 2-2.5 saat sonra alınan KOK'lerinin yarısı ICSI amaçlı olarak hyaluronidaz enzim uygulamasına tabii tutuldu ve olgun olan (m2) oosit sayısına bakılarak kalan oositler IVF işleminde kullanılmak üzere inkübatöre kaldırıldı.

İnseminasyonda kullanılacak sperm örneği her bir KOK için 100.000 progresif motil sperm olacak şekilde hazırlandı. Bölüm 3.4.1.'de detaylı olarak anlatıldığı şekilde inseminasyon için hazırlanmış 4-kuyucuklu NUNC kültür kaplarının her bir kuyucuğuna, 125 mikrolitrelik pipetör ve ucuna takılı steril endorf 100 mikrolitrelik pipet ucu yardımı ile daha önceden enzim uygulaması öncesinde inkübatöre kaldırılmış olan 2 adet KOKsi transfer edildi ve daha önceden yıkanarak hazırlanmış sperm örneğinden her bir kuyucuk içerisinde 100.000 hareketli sperm olacak şekilde konularak inseminasyon amaçlı gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.4.7. Fertilizasyon kontrolü ve ileri embriyo kültürü

İnseminasyon işlemlerinin yapıldığı günden bir gün sonra sabah saatlerinde (Inseminasyon sonrası 16-20. Saatler) ICSI ile inseminasyon yapılan oositlerde inverted

mikroskop kullanılarak fertilizasyon kontrolü gerçekleştirildi. Normal fertilizasyon gözlenen (döllenen) oositler yeni medium'a aktarılmak üzere ayrıldı.

IVF uygulanan oositler fertilizasyon kontrolü öncesinde etrafındaki kümülüs hücrelerinden ayıklama pipeti (Gynetics Medical Strip-ID 150-10) yardımı ile manuel olarak ayıklandı ve fertilizasyon kontrolü yapıldı. Bu kontroller yapıldıktan sonra her iki gruba ait döllenmiş oositler (zigotlar) öncelikle kültür kabının ilk altı kuyucuğuna ICSI ile döllenmiş olan oositler, daha sonra yedinci kuyucuktan itibaren IVF ile döllenmiş olan oositler gelecek şekilde embryoslide içerisine aktarıldı ve embryoslide time-lapse inkübatörü içerisine (EmbryoScope; Unisense Fertilitatech, Denmark) yerleştirildi. 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 tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, tM, tSB, tB, tEB ve tHB zamansal parametrelerine göre değerlendirilip skorlandı.

Embriyoların blastosist aşamasına kadar büyütülmesi planlanan olgularda embriyo gelişiminin 3.gününde kayıt duraklatıldı, gelişmekte olan tüm embriyolar yeni embryoslide kültür kabına aktarıldı, embryoslide cihaza yüklendi ve kayıt ve skorlama süreci kadığı yerden devam ettirildi.

3.5. İstatistik

Veriler, ortalamalar ve %95 güvenlik aralıkları (CI) olarak belirtilmiştir. Ortalamaların karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. İstatistiki anlamlılık derecesi olarak $P < 0,05$ alınmıştır. İstatistik yazılımı olarak GraphPad QuickCalc kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bölüm 3.1’de belirtilen tarih aralığında Fulya bahçeci Tüpbebek Merkezi’nde tedavi gören uygun kriterlerdeki 30 çift araştırmaya dahil edilmiştir. Adı geçen çiftlerin bazı genel tanımlayıcı özellikleri Tablo 4’te gösterilmiştir. Çiftlerin ortalama kadın yaşı $29,7\pm 4,8$, ortalama sperm konsantrasyonu $69,4\pm 29,5$ ve motilitesi $52,4\pm 5,6$, siklus başına elde edilen ortalama oosit sayısı $24,1\pm 7,0$ dir. Kardeş oositler ile gerçekleştirilen inseminasyon/mikroenjeksiyon sonrası ICSI grubunda IVF grubuna göre daha yüksek bir fertilizasyon oranı elde edilmiş olmasına karşın bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmamıştır. Her iki grupta da 3.gün grade 1 embriyo gelişim oranı ve 5.gün blastosist gelişim oranı benzer olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4. Çalışmaya ait genel tanımlayıcı istatistikler

	IVF	ICSI
Ortalama Kadın yaşı	29,7±4,8	
Ortalama sperm konsantrasyonu (x10 ⁶ /ml)	69,4±29,5	
Ortalama total motilite (%)	52,4±5,6	
İnsemine edilen mII oosit sayısı	282	339
Normal fertilize oosit sayısı	220	278
Fertilizasyon oranı (%)	78,0	82,0
3.Gün Grade 1 embriyo gelişim oranı (%)	83,2	83,8
5.Gün blastosist gelişim oranı (%)	63,0	61,6
6.Gün geç blastosist gelişim oranı (%)	13,6	19,2

Çalışma dahilinde gerçekleştirilen 30 siklusta toplam 723 oosit elde edilmiş, elde edilen oositler çalışma planına göre rastlantısal olarak iki farklı gruba (IVF ve ICSI) ayrılarak her bir oosite ayrıldıkları gruba göre inseminasyon veya mikroenjeksiyon uygulanmıştır.

İnseminasyon/mikroenjeksiyon işlemlerini takip eden 18-20. saatler arasında fertilizasyon kontrolü sonrasında normal fertilize olmuş olarak tespit edilen IVF grubu

içerisindeki 165 zigot ve ICSI grubundaki 179 zigot dinamik embriyo kültür sistemi içerisine alınarak embriyo transfer veya embriyo kriyoprezervasyon saatine kadar bu sistem içerisinde büyütülmüşlerdir.

Dinamik embriyo kültür sistemi içinde büyütülen her bir zigot için morfokinetik değişimler, mevcut literatürde belirtilmiş olan farklı tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, tM, tSB, tB, tEB ve tHB zamansal parametrelerine göre tespit edilerek not edilmiştir. Her bir zamansal parametre, literatürde belirtilen farklı zamansal başlangıç noktalarına göre (t_0 = inseminasyon saati ve t_0 = tPNf) incelenerek Tablo 5 ve Tablo 6'da sırası ile listelenmiştir.

Gruplar arasındaki olası morfokinetik farklılıkların karşılaştırılması için zamansal başlangıç noktasının inseminasyon saati olarak alındığı incelemede, her iki grup arasında embriyo takibinin yapıldığı en son aşama olan hatching blastosist aşamasına (tHB) kadar gözlenen farklı parametreler arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0,05$).

Aynı verilerin zamansal başlangıç noktasının pronükleusların silinmesinin gözlenmeye başladığı saat olarak alındığı şekli ile incelenmesi sonrasında IVF grubundaki zigotların ICSI grubundaki zigotlara kıyasla anlamlı bir oranda ($p=0,02$) erken saatte ekspanse blastosist aşamasına ulaştıkları tespit edilmiştir.

Tablo 5. Morfokinetik zamansal skorklama tablosu (t₀= inseminasyon)

Morfokinetik parametreler	IVF		ICSI		p
	n	Ort. (%95 CI)	n	Ort. (%95 CI)	
tPNf	165	25,7 (25,2 - 26,2)	179	25,5 (24,8 - 26,2)	0,65
t2	165	28,7 (28,1 - 29,3)	179	28,2 (27,5 - 29,0)	0,32
t3	165	38,2 (37,3 - 39,0)	178	37,8 (36,9 - 38,7)	0,55
t4	164	40,5 (39,5 - 41,5)	178	40,2 (39,2 - 41,1)	0,65
t5	163	50,5 (49,1 - 51,9)	176	49,6 (48,2 - 51,0)	0,37
t6	155	54,8 (53,3 - 56,4)	168	53,1 (51,9 - 54,4)	0,09
t7	148	57,5 (56,1 - 58,9)	162	57,4 (56,0 - 58,9)	0,92
t8	141	60,2 (58,6 - 61,8)	146	59,2 (57,8 - 60,7)	0,36
t9+	115	69,2 (67,2 - 71,3)	129	66,8 (65,1 - 68,5)	0,07
tM	97	80,7 (78,1 - 83,4)	111	78,2 (75,8 - 80,7)	0,17
tSB	86	87,3 (85,0 - 89,7)	95	85,8 (83,3 - 88,3)	0,39
tB	70	102,2 (100,2 - 104,1)	72	102,5 (100,3 - 104,7)	0,84
tEB	52	108,8 (106,7 - 111,0)	60	110,8 (108,8 - 112,8)	0,18
tHB	15	120,5 (115,9 - 125,0)	15	118,8 (114,5 - 123,1)	0,59

Tablo 6. Morfokinetik zamansal skorlama tablosu (t₀= tPNf)

Morfokinetik parametreler	IVF		ICSI		p
	n	Ort. (%95 CI)	n	Ort. (%95 CI)	
t2	165	3,0 (2,7 - 3,3)	179	2,7 (2,5 - 2,9)	0,07
t3	165	12,5 (11,8 - 13,1)	178	12,2 (11,6 - 12,9)	0,52
t4	165	14,8 (14,0 - 15,6)	178	14,7 (14,1 - 15,3)	0,84
t5	164	24,8 (23,5 - 26,1)	176	24,1 (22,8 - 25,5)	0,46
t6	163	29,1 (27,8 - 30,5)	168	27,7 (26,5 - 28,8)	0,11
t7	155	32,0 (30,8 - 33,3)	162	32,3 (31,0 - 33,6)	0,74
t8	148	34,7 (33,3 - 36,2)	146	34,4 (33,1 - 35,7)	0,76
t9+	141	43,9 (42,0 - 45,8)	129	42,0 (40,3 - 43,6)	0,13
tM	115	55,2 (52,6 - 57,8)	111	53,6 (51,2 - 55,9)	0,37
tSB	97	61,8 (59,4 - 64,2)	95	61,3 (58,8 - 63,8)	0,77
tB	86	76,7 (74,7 - 78,7)	72	78,4 (76,2 - 80,5)	0,25
tEB	70	83,3 (81,1 - 85,6)	60	86,7 (84,7 - 88,7)	0,02
tHB	52	95,1 (90,3 - 100,0)	15	95,3 (91,2 - 99,3)	0,95

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

1993 yılından günümüze kadar geçen sürede, ilk zamanlarda daha çok şiddetli erkek infertilitesi vakalarının tedavisi amacıyla gerçekleştirilen ICSI tekniği artık pek çok klinikte ve ülkede erkek infertilitesi dışında da uygulanabilen standart bir fertilizasyon metodu olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte doğada örneği olmayan invaziv uygulama şekli ve uygulama esnasında pek çok doğal aşamayı atlatması nedeni ile günümüze kadar pek çok araştırmacı metodun preimplantasyon, prenatal ve postnatal dönemdeki olası etkilerini/risklerini araştırmak için çalışmalar yürütmektedir [94]. Bu çalışmalardan bazılarında spontan gebelik veya IVF tekniği ile elde edilen gebelik sonrası doğum vakaları ile kıyaslandığında, ICSI ile elde edilen gebelik ve doğumlarda küçüğe olsa artmış anomali riskleri ve komplikasyon oranları bildirmiş olsa da diğerlerinde böyle bir farklılık bulunmamıştır [95], [96], [97].

Bununla birlikte, uygulama şekli itibariyle farklı özelliklere sahip erkek infertilitesi vakalarına uygulandıktan ve tedavi sırasında elde edilen embriyoların in vitro embriyo gelişim dönemi boyunca doğal hayatlarında varolmayan pek çok farklı etkene maruz kaldıklarından, literatürde belirtilen IVF veya ICSI sonrası embriyolojik ve klinik farklılıkların ve potansiyel anomali risklerinin uygulanan teknik ile mi yoksa tekniğin uygulandığı hasta grubuna/çevresel şartlara mı ait olduğu halen tartışmalıdır.

IVF ve ICSI tekniklerinin embriyo gelişimi üzerindeki olası etkilerinin, 2010 yılı öncesi statik embriyo kültürü kullanılarak kardeş oositler üzerinde değerlendirildiği çalışmalar, sperm faktörüne bağlı ve ICSI lehinde bir fertilizasyon artışı ve IVF lehinde olan bir embriyo kalite artışını işaret ederken, erkek faktörü olmayan olgularda bu durumun fertilizasyon metodundan ziyade bireysel gamet kalitesine bağlı olduğunu göstermektedir [11], [12], [25], [26], [28]. Çalışmaların ortak zayıf noktası, statik embriyo kültürüne bağlı olarak embriyo gelişiminin sadece kısıtlı bir aşamasında embriyo değerlendirme imkanlarının bulunması ve farklı fertilizasyon metodları arasında morfokinetik olarak ortaya çıkabilen farklılıkları gözlemleyemiyor ve ölçemiyor oluşlarıdır. Aynı zaman diliminde inseminasyon yapıldığında, IVF grubunda fertilizasyon sürecinin ICSI grubuna göre daha geciktiği artık bilinen bir gerçek olmasına rağmen, ileri embriyo gelişim aşamalarında karşılaşılabilecek diğer farklılık ve benzerliklerin sadece statik gözlem ve ölçümler ile anlaşılabilmesi mümkün

olmadığından, yakın bir süre önce klinik kullanıma sunulan dinamik embriyo kültür sistemlerinin bu açıdan önemli bilgiler sağlamaları beklenmektedir.

Yakın bir süre önce, adı geçen sistemlerin kullanıldığı fakat kardeş oositler yerine vakaların gruplanarak embriyo gelişimlerinin incelendiği iki farklı çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan ilki, Cruz ve arkadaşları tarafından 2013 yılında Embryoscope® sistemi kullanarak donasyon tedavisi gören hastalar ve oosit/embriyoları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, statik embriyo kültüründe gerçekleştirilen geçmiş çalışmalar ile paralel olarak, zamansal olarak karşılaştırmanın inseminasyon yapılan saat olarak alındığında IVF tekniği ile döllen embriyolarda erken klivaj döneminde ICSI ile fertilize olan embriyolara kıyasla daha yavaş bir embriyonik gelişim gözlemlenmiştir. Bu yavaş gelişim, embriyoların kültürde kalma süreleri arttıkça istatistiksel olarak anlamını yitirmiştir ve blastosist aşamasında IVF metodu lehine bir farklılık oluşmuştur [18].

Bodri ve arkadaşları benzer şekilde bir çalışmayı kısırlık tedavisi gören, doğal veya düşük doz ovulasyon indüksiyonu kullanılan farklı kadın yaşı olan vakalarda gerçekleştirmişlerdir. Farklı tedavi şekli kullanılmış olmasına rağmen, elde ettikleri sonuçlar Cruz ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlara genel olarak benzer bulunmuştur [19].

Her iki çalışmada da ilgili gruplara ayrılan vakalarda kullanılan sperm değerleri seçimin doğası gereği (iyi kalitedeki spermlerin IVF grubuna atanması gibi) farklılık göstermektedir. Bu durum da beraberinde blastosist aşamasına doğru gidildikçe ICSI ile elde edilmiş embriyolarda sperm örneği ve kalitesine bağlı olarak embriyo morfolojik değerleri ve kaliteleri ile ilgili bazı farklılıklar doğurabilmektedir.

Çalışmamızda, sonuçların yorumlanması aşamasında adı geçen farklılıkların önüne geçebilmek amacı ile kardeş oositlerde aynı özellikte ve aynı şartlarda hazırlanmış sperm örneği ve özellikleri kullanılmıştır. Böylece elde edilen sonuçlar üzerinde baba adayı kaynaklı kişisel farklılıkların gözlenme olasılığını en aza indirilmiştir.

Literatürdeki mevcut çalışmaların oosit gelişimde kullanılan ovaryen stimülasyon protokolleri yönünden de farklılık gösterdiği görülmektedir. Cruz ve arkadaşları oosit donasyonu modelinde elde edilen oositleri standart ovulasyon indüksiyonu ile elde ediyor iken Bodri ve arkadaşları infertili bir hasta popülasyonunda

doğal siklus veya minimal ovülasyon indüksiyonu kullanmışlardır. Günümüze kadar gerçekleştirilen ovülasyon indüksiyonu ve olası klinik sonuçlarını analiz eden güncel çalışmalar, tedavide veya çalışmalarda kullanılabilen farklı ovülasyon indüksiyonu protokollerinin de oosit kalitesini ve maturitesini büyük ölçüde değiştirebildiğini, bu durum da beraberinde erken embriyonik gelişim esnasında önceden tahmin edilemeyen morfokinetik farklılıklar oluşturabileceğini vurgulamaktadır [74]. Bu konuda halen iyi tasarlanmış ve mevcut farklılıkları ölçebilen yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışmamızda, özellikle adı geçen şartların sonuçlar üzerindeki etkilerini en aza indirebilmek amacı ile IVF ve ICSI teknikleri şiddetli erkek infertilitesi olmayan vakalarda kardeş oositler üzerinde ve dinamik embriyo kültür sistemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Böylece:

- Ciddi erkek infertilitesi problemi taşımayan vakalar çalışmaya dahil edilerek şiddetli erkek infertilitesi olgularında hastaya özgü ve temel sperm testlerinde gözlenemeyen vaka kaynaklı olumsuzlukları ve yanlı sonuç elde etme riski en aza indirilmiştir.
- Kardeş oositler kullanılarak gruplar arasındaki vaka bazlı olası farklılıkların sonuçlara yanlı etkisi ortadan kaldırılmıştır.
- Fertilizasyon sonrası embriyo gelişimi takibi dinamik embriyo kültür sistemleri ile gerçekleştirilerek, statik embriyo kültüründe gözlenmesi teknik olarak mümkün olmayan pek çok morfokinetik parametrenin iki farklı fertilizasyon tekniği açısından eş zamanlı karşılaştırılabilmesi sağlanmıştır.

Önceki çalışmalarda inseminasyon zamanına göre yapılan çalışmalarda IVF ile edilmiş embriyolarda erken klivaj döneminde anlamlı bir yavaş gelişim görülmesine rağmen blastosist aşamasına doğru gidildikçe bu farkın ortadan kalktığı, hatta blastosist aşamasında IVF yöntemi ile fertilize olmuş blastosistler arasında anlamlı olarak daha yüksek kalite embriyo elde edildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda, önceki çalışmalarda bahsi geçen ve IVF ile elde edilen embriyolarda ilk klivaj safhalarında görülen yavaş gelişimin, kardeş oositlerin eş zamanlı olarak IVF veya ICSI ile insemine edildiği ortamda istatistiksel olarak anlamlı bir aşamaya ulaşmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, pronükleer silinme zamanına göre normalize edilen embriyo morfokinetik

verileri ekspansiyeli blastosist aşamasında IVF ile insemine edilen grupta anlamlı olarak daha hızlı bir embriyonik gelişim gözlemlendiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamız, bildiğimiz kadarıyla yukarıda bahsedildiği şekilde, gerek içerdiği hasta grubunun homojenliği gerekse kardeş oosit kullanımına olanak sağlaması bakımından da literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar mevcut hasta ve embriyo sayıları kıyaslandığında gruplar arası farklılıkların ciddi ve anlamlı bir embriyo gelişim farklılığına işaret etmediği sonucunu veriyor olsa da, çalışmacı ve ekibi tarafından mevcut verilerin daha yüksek sayıda vaka ve embriyo ile ve daha güçlü bir istatistik verisi ile önümüzdeki aylarda tekrar değerlendirilmesi planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Kalra, S.K. ve Barnhart, K.T., (2011). "In vitro fertilization and adverse childhood outcomes: what we know, where we are going, and how we will get there. A glimpse into what lies behind and beckons ahead", *Fertil Steril*, 95: 1887-1889.
- [2] Scott, L. Alvero, R. Leondires, M. ve Miller, B., (2000). "The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation", *Hum Reprod*, 15: 2394-2403.
- [3] Machtinger, R. ve Racowsky, C., (2013). "Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence", *Reprod Biomed Online*, 26: 210-221.
- [4] Gleicher, N. Kushnir, V.A. ve Barad, D.H., (2015). "Is it time for a paradigm shift in understanding embryo selection?", *Reprod Biol Endocrinol*, 13: 3.
- [5] Cohen, J. Alikani, M. ve Bisignano, A., (2012). "Past performance of assisted reproduction technologies as a model to predict future progress: a proposed addendum to Moore's law", *Reprod Biomed Online*, 25: 585-590.
- [6] Rubio, I. Galan, A. Larreategui, Z. Ayerdi, F. Bellver, J. Herrero, J. ve Meseguer, M., (2014). "Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope", *Fertil Steril*, 102: 1287-1294 e1285.
- [7] Wong, C. Chen, A.A. Behr, B. ve Shen, S., (2013). "Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research", *Reprod Biomed Online*, 26: 120-129.
- [8] Basile, N. Caiazzo, M. ve Meseguer, M., (2015). "What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes?", *Curr Opin Obstet Gynecol*, 27: 193-200.
- [9] Basile, N. Vime, P. Florensa, M. Aparicio Ruiz, B. Garcia Velasco, J.A. Remohi, J. ve Meseguer, M., (2015). "The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection", *Hum Reprod*, 30: 276-283.
- [10] Basile, N. Barriere, P. Meseguer, M. ve Freour, T., (2015). "Time-lapse in the IVF lab: how should we assess potential benefit?", *Hum Reprod*, 30: 1276.
- [11] Ruiz, A. Remohi, J. Minguez, Y. Guanes, P.P. Simon, C. ve Pellicer, A., (1997). "The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination", *Fertil Steril*, 68: 171-173.
- [12] Yoeli, R. Orvieto, R. Ashkenazi, J. Shelef, M. Ben-Rafael, Z. ve Bar-Hava, I., (2008). "Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes", *J Assist Reprod Genet*, 25: 23-28.
- [13] Fancsovits, P. Tothne, Z.G. Murber, A. Takacs, F.Z. Papp, Z. ve Urbancsek, J., (2006). "Correlation between first polar body morphology and further embryo development", *Acta Biol Hung*, 57: 331-338.

- [14] Tesarik, J. Mendoza, C. ve Greco, E., (1999). "In vitro culture facilitates the selection of healthy spermatids for assisted reproduction", *Fertil Steril*, 72: 809-813.
- [15] Plachot, M., (2000). "Fertilization", *Hum Reprod*, 15 Suppl 4: 19-30.
- [16] Plachot, M. Belaisch-Allart, J. Mayenga, J.M. Chouraqi, A. Serkine, A.M. ve Tesquier, L., (2000). "Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer", *Hum Reprod*, 15 Suppl 6: 24-30.
- [17] Lemmen, J.G. Agerholm, I. ve Ziebe, S., (2008). "Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes", *Reprod Biomed Online*, 17: 385-391.
- [18] Cruz, M. Garrido, N. Gadea, B. Munoz, M. Perez-Cano, I. ve Meseguer, M., (2013). "Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model", *Reprod Biomed Online*, 27: 367-375.
- [19] Bodri, D. Sugimoto, T. Serna, J.Y. Kondo, M. Kato, R. Kawachiya, S. ve Matsumoto, T., (2015). "Influence of different oocyte insemination techniques on early and late morphokinetic parameters: retrospective analysis of 500 time-lapse monitored blastocysts", *Fertil Steril*.
- [20] Fauser, B.C. Devroey, P. Diedrich, K. Balaban, B. Bonduelle, M. Delemarre-van de Waal, H.A. Estella, C. Ezcurra, D. Geraedts, J.P. Howles, C.M. Lerner-Geva, L. Serna, J. Wells, D. ve Evian Annual Reproduction Workshop, G., (2014). "Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature", *Reprod Biomed Online*, 28: 162-182.
- [21] Bonduelle, M. Liebaers, I. Deketelaere, V. Derde, M.P. Camus, M. Devroey, P. ve Van Steirteghem, A., (2002). "Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999)", *Hum Reprod*, 17: 671-694.
- [22] Lazaraviciute, G. Kauser, M. Bhattacharya, S. Haggarty, P. ve Bhattacharya, S., (2014). "A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously", *Hum Reprod Update*, 20: 840-852.
- [23] El Hajj, N. ve Haaf, T., (2013). "Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction", *Fertil Steril*, 99: 632-641.
- [24] Fishel, S. Aslam, I. Lisi, F. Rinaldi, L. Timson, J. Jacobson, M. Gobetz, L. Green, S. Campbell, A. ve Lisi, R., (2000). "Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception?", *Hum Reprod*, 15: 1278-1283.
- [25] Yang, D. Shahata, M.A. al-Bader, M. al-Natsha, S.D. al-Flamerzia, M. ve al-Shawaf, T., (1996). "Intracytoplasmic sperm injection improving embryo quality: comparison of the sibling oocytes of non-male-factor couples", *J Assist Reprod Genet*, 13: 351-355.
- [26] Khamsi, F. Yavas, Y. Roberge, S. Wong, J.C. Lacanna, I.C. ve Endman, M., (2001). "Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-

quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study", *Fertil Steril*, 75: 342-347.

- [27] Mauri, A.L. Petersen, C.G. Oliveira, J.B. Massaro, F.C. Baruffi, R.L. ve Franco, J.G., Jr., (2010). "Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes", *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 150: 42-46.
- [28] Pisarska, M.D. Casson, P.R. Cisneros, P.L. Lamb, D.J. Lipshultz, L.I. Buster, J.E. ve Carson, S.A., (1999). "Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes", *Fertil Steril*, 71: 627-632.
- [29] Aboulghar, M.A. Mansour, R.T. Serour, G.I. Sattar, M.A. ve Amin, Y.M., (1996). "Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and borderline semen", *J Assist Reprod Genet*, 13: 38-42.
- [30] Lewis, W.H. ve Gregory, P.W., (1929). "Cinematographs of Living Developing Rabbit-Eggs", *Science*, 69: 226-229.
- [31] Alexandre, H., (2001). "A history of mammalian embryological research", *Int J Dev Biol*, 45: 457-467.
- [32] Cole, R.J., (1967). "Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst", *J Embryol Exp Morphol*, 17: 481-490.
- [33] Wale, P.L. ve Gardner, D.K., (2010). "Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients", *Reprod Biomed Online*, 21: 402-410.
- [34] Arav, A. Aroyo, A. Yavin, S. ve Roth, Z., (2008). "Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis", *Reprod Biomed Online*, 17: 669-675.
- [35] Pribenszky, C. Matyas, S. Kovacs, P. Losonczi, E. Zadori, J. ve Vajta, G., (2010). "Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring", *Reprod Biomed Online*, 21: 533-536.
- [36] Pribenszky, C. Losonczi, E. Molnar, M. Lang, Z. Matyas, S. Rajczy, K. Molnar, K. Kovacs, P. Nagy, P. Conceicao, J. ve Vajta, G., (2010). "Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment", *Reprod Biomed Online*, 20: 371-379.
- [37] Gonzales, D.S. Pinheiro, J.C. ve Bavister, B.D., (1995). "Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle", *J Reprod Fertil*, 105: 1-8.
- [38] Gonzales, D.S. ve Bavister, B.D., (1995). "Zona pellucida escape by hamster blastocysts in vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in vivo", *Biol Reprod*, 52: 470-480.
- [39] Massip, A. van der Zwalm, P. Mulnard, J. ve Zwijsen, W., (1983). "Atypical hatching of a cow blastocyst leading to separation of complete twin half blastocysts", *Vet Rec*, 112: 301.

- [40] Massip, A. Mulnard, J. Vanderzwalmen, P. Hanzen, C. ve Ectors, F., (1982). "The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis", *J Anat*, 134: 399-405.
- [41] Holm, P. Booth, P.J. ve Callesen, H., (2002). "Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media", *Reproduction*, 123: 553-565.
- [42] Peippo, J. Kurkilahti, M. ve Bredbacka, P., (2001). "Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment", *Zygote*, 9: 105-113.
- [43] Holm, P. Shukri, N.N. Vajta, G. Booth, P. Bendixen, C. ve Callesen, H., (1998). "Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex", *Theriogenology*, 50: 1285-1299.
- [44] Lequarre, A.S. Marchandise, J. Moreau, B. Massip, A. ve Donnay, I., (2003). "Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition", *Biol Reprod*, 69: 1707-1713.
- [45] Lopes, A.S. Lane, M. ve Thompson, J.G., (2010). "Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes", *Hum Reprod*, 25: 2762-2773.
- [46] Gendelman, M. Aroyo, A. Yavin, S. ve Roth, Z., (2010). "Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos", *Reproduction*, 140: 73-82.
- [47] Grisart, B. Massip, A. ve Dessy, F., (1994). "Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium", *J Reprod Fertil*, 101: 257-264.
- [48] Gonzales, D.S. Boatman, D.E. ve Bavister, B.D., (1996). "Kinematics of trophectoderm projections and locomotion in the peri-implantation hamster blastocyst", *Dev Dyn*, 205: 435-444.
- [49] Selwood, L. ve Smith, D., (1990). "Time-lapse analysis and normal stages of development of cleavage and blastocyst formation in the marsupials the brown antechinus and the stripe-faced dunnart", *Mol Reprod Dev*, 26: 53-62.
- [50] Mateusen, B. Van Soom, A. Maes, D.G. Donnay, I. Duchateau, L. ve Lequarre, A.S., (2005). "Porcine embryo development and fragmentation and their relation to apoptotic markers: a cinematographic and confocal laser scanning microscopic study", *Reproduction*, 129: 443-452.
- [51] Cohen, J. Wiemer, K.E. ve Wright, G., (1988). "Prognostic value of morphologic characteristics of cryopreserved embryos: a study using videocinematography", *Fertil Steril*, 49: 827-834.
- [52] Payne, D. Flaherty, S.P. Barry, M.F. ve Matthews, C.D., (1997). "Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography", *Hum Reprod*, 12: 532-541.

- [53] Van Blerkom, J. Davis, P. ve Alexander, S., (2001). "A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos", *Hum Reprod*, 16: 719-729.
- [54] Mio, Y. ve Maeda, K., (2008). "Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos", *Am J Obstet Gynecol*, 199: 660 e661-665.
- [55] Hiiragi, T. Louvet-Vallee, S. Solter, D. ve Maro, B., (2006). "Embryology: does pre patterning occur in the mouse egg?", *Nature*, 442: E3-4; discussion E4.
- [56] Motosugi, N. Bauer, T. Polanski, Z. Solter, D. ve Hiiragi, T., (2005). "Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not pre patterned", *Genes Dev*, 19: 1081-1092.
- [57] Kurotaki, Y. Hatta, K. Nakao, K. Nabeshima, Y. ve Fujimori, T., (2007). "Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape", *Science*, 316: 719-723.
- [58] Yamagata, K. Yamazaki, T. Yamashita, M. Hara, Y. Ogonuki, N. ve Ogura, A., (2005). "Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote", *Genesis*, 43: 71-79.
- [59] Yamagata, K. Suetsugu, R. ve Wakayama, T., (2009). "Long-term, six-dimensional live-cell imaging for the mouse preimplantation embryo that does not affect full-term development", *J Reprod Dev*, 55: 343-350.
- [60] Watanabe, T. Biggins, J.S. Tannan, N.B. ve Srinivas, S., (2014). "Limited predictive value of blastomere angle of division in trophectoderm and inner cell mass specification", *Development*, 141: 2279-2288.
- [61] Bischoff, M. Parfitt, D.E. ve Zernicka-Goetz, M., (2008). "Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions", *Development*, 135: 953-962.
- [62] Niimura, S. Ogata, T. Okimura, A. Sato, T. Uchiyama, Y. Seta, T. Nakagawa, H. Nakagawa, K. ve Tamura, Y., (2010). "Time-lapse videomicrographic observations of blastocyst hatching in cattle", *J Reprod Dev*, 56: 649-654.
- [63] Majerus, V. Lequarre, A.S. Ferguson, E.M. Kaidi, S. Massip, A. Dessy, F. ve Donnay, I., (2000). "Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism", *Mol Reprod Dev*, 57: 346-352.
- [64] Aparicio, B. Cruz, M. ve Meseguer, M., (2013). "Is morphokinetic analysis the answer?", *Reprod Biomed Online*, 27: 654-663.
- [65] Findikli, N. ve Oral, E., (2014). "Time-lapse embryo imaging technology: does it improve the clinical results?", *Curr Opin Obstet Gynecol*, 26: 138-144.
- [66] Herrero, J. Tejera, A. Albert, C. Vidal, C. de los Santos, M.J. ve Meseguer, M., (2013). "A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development", *Fertil Steril*, 100: 1602-1609 e1601-1604.

- [67] Rubio, I. Kuhlmann, R. Agerholm, I. Kirk, J. Herrero, J. Escriba, M.J. Bellver, J. ve Meseguer, M., (2012). "Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study", *Fertil Steril*, 98: 1458-1463.
- [68] Azzarello, A. Hoest, T. ve Mikkelsen, A.L., (2012). "The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture", *Hum Reprod*, 27: 2649-2657.
- [69] Liu, Y. Chapple, V. Feenan, K. Roberts, P. ve Matson, P., (2015). "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*, 103: 1485-1491 e1481.
- [70] Hlinka, D. Kalatova, B. Uhrinova, I. Dolinska, S. Rutarova, J. Rezacova, J. Lazarovska, S. ve Dudas, M., (2012). "Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability", *Physiol Res*, 61: 513-525.
- [71] Kirkegaard, K. Kesmodel, U.S. Hindkjaer, J.J. ve Ingerslev, H.J., (2013). "Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study", *Hum Reprod*, 28: 2643-2651.
- [72] Cruz, M. Garrido, N. Herrero, J. Perez-Cano, I. Munoz, M. ve Meseguer, M., (2012). "Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality", *Reprod Biomed Online*, 25: 371-381.
- [73] Dal Canto, M. Coticchio, G. Mignini Renzini, M. De Ponti, E. Novara, P.V. Brambillasca, F. Comi, R. ve Fadini, R., (2012). "Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation", *Reprod Biomed Online*, 25: 474-480.
- [74] Gryshchenko, M.G. Pravdyuk, A.I. ve Parashchyuk, V.Y., (2014). "Analysis of factors influencing morphokinetic characteristics of embryos in ART cycles", *Gynecol Endocrinol*, 30 Suppl 1: 6-8.
- [75] Wissing, M.L. Bjerger, M.R. Olesen, A.I. Hoest, T. ve Mikkelsen, A.L., (2014). "Impact of PCOS on early embryo cleavage kinetics", *Reprod Biomed Online*, 28: 508-514.
- [76] Bellver, J. Mifsud, A. Grau, N. Privitera, L. ve Meseguer, M., (2013). "Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study", *Hum Reprod*, 28: 794-800.
- [77] Munoz, M. Cruz, M. Humaidan, P. Garrido, N. Perez-Cano, I. ve Meseguer, M., (2013). "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*, 168: 167-172.
- [78] Freour, T. Masson, D. Dessolle, L. Allaoua, D. Dejoie, T. Mirallie, S. Jean, M. ve Barriere, P., (2012). "Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen", *Arch Gynecol Obstet*, 285: 1177-1182.
- [79] Knez, K. Tomazevic, T. Vrtacnik-Bokal, E. ve Virant-Klun, I., (2013). "Developmental dynamics of IMSI-derived embryos: a time-lapse prospective study", *Reprod Biomed Online*, 27: 161-171.

- [80] Liu, Y. Chapple, V. Feenan, K. Roberts, P. ve Matson, P., (2015). "Time-lapse videography of human embryos: Using pronuclear fading rather than insemination in IVF and ICSI cycles removes inconsistencies in time to reach early cleavage milestones", *Reprod Biol*, 15: 122-125.
- [81] Ciray, H.N. Aksoy, T. Goktas, C. Ozturk, B. ve Bahceci, M., (2012). "Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study", *J Assist Reprod Genet*, 29: 891-900.
- [82] Meseguer, M. Rubio, I. Cruz, M. Basile, N. Marcos, J. ve Requena, A., (2012). "Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study", *Fertil Steril*, 98: 1481-1489 e1410.
- [83] Basile, N. Morbeck, D. Garcia-Velasco, J. Bronet, F. ve Meseguer, M., (2013). "Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes", *Hum Reprod*, 28: 634-641.
- [84] Kirkegaard, K. Hindkjaer, J.J. ve Ingerslev, H.J., (2013). "Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring", *Fertil Steril*, 99: 738-744 e734.
- [85] Kirkegaard, K. Hindkjaer, J.J. ve Ingerslev, H.J., (2012). "Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis", *Hum Reprod*, 27: 97-105.
- [86] Bronet, F. Nogales, M.C. Martinez, E. Ariza, M. Rubio, C. Garcia-Velasco, J.A. ve Meseguer, M., (2015). "Is there a relationship between time-lapse parameters and embryo sex?", *Fertil Steril*, 103: 396-401 e392.
- [87] Serdarogullari, M. Findikli, N. Goktas, C. Sahin, O. Ulug, U. Yagmur, E. ve Bahceci, M., (2014). "Comparison of gender-specific human embryo development characteristics by time-lapse technology", *Reprod Biomed Online*, 29: 193-199.
- [88] Campbell, A. Fishel, S. Bowman, N. Duffy, S. Sedler, M. ve Thornton, S., (2013). "Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS", *Reprod Biomed Online*, 27: 140-146.
- [89] Campbell, A. Fishel, S. Bowman, N. Duffy, S. Sedler, M. ve Hickman, C.F., (2013). "Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics", *Reprod Biomed Online*, 26: 477-485.
- [90] Basile, N. Nogales Mdel, C. Bronet, F. Florensa, M. Riqueiros, M. Rodrigo, L. Garcia-Velasco, J. ve Meseguer, M., (2014). "Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis", *Fertil Steril*, 101: 699-704.
- [91] Rienzi, L. Capalbo, A. Stoppa, M. Romano, S. Maggiulli, R. Albricci, L. Scarica, C. Farcomeni, A. Vajta, G. ve Ubaldi, F.M., (2015). "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*, 30: 57-66.

- [92] Vera-Rodriguez, M. Chavez, S.L. Rubio, C. Pera, R.A. ve Simon, C., (2015). "Prediction model for aneuploidy in early human embryo development revealed by single-cell analysis", *Nat Commun*, 6: 7601.
- [93] Freour, T. Dessolle, L. Lammers, J. Lattes, S. ve Barriere, P., (2013). "Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women", *Fertil Steril*, 99: 1944-1950.
- [94] Davies, M.J. Moore, V.M. Willson, K.J. Van Essen, P. Priest, K. Scott, H. Haan, E.A. ve Chan, A., (2012). "Reproductive technologies and the risk of birth defects", *N Engl J Med*, 366: 1803-1813.
- [95] Bonduelle, M. Wilikens, A. Buysse, A. Van Assche, E. Devroey, P. Van Steirteghem, A.C. ve Liebaers, I., (1998). "A follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI", *Hum Reprod*, 13 Suppl 1: 196-207.
- [96] Tarlatzis, B.C., (1996). "Report on the activities of the ESHRE Task Force on intracytoplasmic sperm injection. European Society of Human Reproduction and Embryology", *Hum Reprod*, 11 Suppl 4: 160-185; discussion 186.
- [97] Wennerholm, U.B. Bergh, C. Hamberger, L. Lundin, K. Nilsson, L. Wikland, M. ve Kallen, B., (2000). "Incidence of congenital malformations in children born after ICSI", *Hum Reprod*, 15: 944-948.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİK KURULU

Sayı: BAEK 2014/2/4

03.04.2014

İlgi: a) 10 Şubat 2014 tarihli dilekçeniz
b) 02 Nisan 2014 tarihli raportör yazısı

Sayın Turan Aksoy,

“Aynı hastaya ait oositlere ICSI ve IVF işlemi uygulayarak embriyo gelişiminin time lapste morfolojik olarak karşılaştırılması” konulu çalışmanız, 10.02.2014 tarihli başvurunuz kapsamında, Kurulumuzca incelenmiş olup etik açıdan onaylanmıştır.

Araştırmanız süresince çalışmanızda özellikle gereç ve yöntemler konusu ile ilgili olarak değişiklikler söz konusu olursa tekrar değerlendirilmesi önerilir.

NOT: İşbu belge Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurul Yönergesi temelinde kaleme alınmıştır



Prof. Dr. Ersi Abacı Kalfoglu

Başkan

ÖSYM



2013-ALES İlkbahar Dönemi Sonuçları

Sonuç Açıklama Tarihi / Result Announcement Date: 23.05.2013



T.C. Kimlik Numarası T.C. Identity Number	34828853708
Adı ve Soyadı Name and Surname	TURAN AKSOY
Sınav Tarihi Examination Date	12.05.2013

	TESTLERDEKİ DOĞRU VE YANLIŞ SAYILARI THE NUMBER OF CORRECTS AND INCORRECTS			
	Sayısal-1 Testi Quantitative-1 Test	Sayısal-2 Testi Quantitative-2 Test	Sözel-1 Testi Verbal-1 Test	Sözel-2 Testi Verbal-2 Test
Doğru Sayısı Number of Corrects	15	4	15	5
Yanlış Sayısı Number of Incorrects	3	0	7	3

	Puanı Score	Başarı Sırası Score Rank	Aday Sayısı Number of Applicants
ALES - SAY ALES - Quantitative	55,02142	242956	269859
ALES - SÖZ ALES - Verbal	52,65683	236274	269859
ALES - EA ALES - Equally Weighted	52,01812	251615	269859

(Bu belgenin aslına ilişkin sorgulama <https://sonuc.osym.gov.tr/BelgeKontrol.aspx> Internet adresinden yapılabilir.)
Sonuç Belgesi Kontrol Kodu: F9C8866J