

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

**VAKUOLİZASYON ORANI YÜKSEK  
İNSAN SPERMATOZOA HÜCRELERİNİN  
EMBRİYONİK HÜCRE DÖNGÜLERİNE VE İMPLANTASYONA ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tuğba Şenel**

Tez Danışmanı  
**Prof. Dr. Tülay İrez**

İSTANBUL  
Ocak 2015

**T.C.  
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

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

**Tez Savunma Tarihi: 12/01/2015**

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

**Prof. Dr. İmer Okar  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**Prof. Dr. Asiye Nurten  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

*Her zaman yanımda olan Aileme ithaf ediyorum*

## İÇİNDEKİLER

Tez Onayı .....	ii
İçindekiler.....	İV
Şekiller Listesi.....	Vii
Tablolar Listesi.....	Viii
Semboller / Kısaltmalar Listesi.....	İViii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
2.1. Yumurta Toplama İşlemi .....	5
2.2. Mikroenjeksiyon Öncesi Yumurtaların Hazırlanması.....	5
2.3. In Vitro Fertilizasyon (IVF).....	6
2.4. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI).....	6
2.5. Morfolojik Seçilmiş Spermin IntraSitoplazmik Enjeksiyonu (IMSI).....	8
2.6. Erken ve İleri Dönem Embriyo Gelişimi.....	9
2.6.1. Pronükleus Değerlendirilmesi .....	9
2.6.2. Bölünme Evresi Sınıflaması .....	10
2.6.3. İleri Dönem Embriyo Gelişimi.....	11
2.6.4. Blastosist Dönemi Sınıflaması .....	13
2.7. Embriyo Transferi.....	15
2.8. Sürekli Embriyo İzleme Sistemi'nin (SEİS) YÜT'teki Önemi.....	16
2.9. SEİS'lerde Modelleme .....	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	20
3.1. Retrospektif Kohort Çalışmasının Temelleri.....	20
3.2. Çalışmaya Dahil Olan Olguların Özellikleri .....	22
3.3. Ovaryum Stimülasyonu ve Siklus Takibi .....	23

3.4. Hareketli Sperm Organel Morfolojisi Değerlendirilmesi (Motile Sperm Organelle Morphology Examination: MSOME .....	25
3.5. Folikül Aspirasyonu, Denüstasyon ve ICSI .....	27
3.6. Embriyo Kültürü ve İnkübasyonu .....	27
3.7. SEİS'te Değerlendirme ve Embriyo Sınıflandırması.....	29
3.8. Embriyo Transferi.....	29
3.9. İstatistiksel Analiz.....	29
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>31</b>
4.1. IMSI'de Sperm Değerlendirilmesine Göre Hasta Özellikleri .....	31
4.2. IMSI'de Sperm Değerlendirilmesine Göre Embriyo Kinetiği .....	32
4.3. İkinci Embriyonik Hücre Döngüsünün İmplantasyona Yönelik Değerlendirilmesi .....	33
4.4. Üçüncü Embriyonik Hücre Döngüsünün İmplantasyona Yönelik Değerlendirilmesi .....	34
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>37</b>
<b>6. SONUÇ</b> .....	<b>41</b>
<b>7. ÖZET</b> .....	<b>42</b>
<b>8. SUMMARY</b> .....	<b>43</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b> .....	<b>44</b>
<b>10. TEŞEKKÜR</b> .....	<b>50</b>
<b>11. ETİK KURUL KARARI</b> .....	<b>51</b>
<b>12. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>52</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: OPU işleminde folikülden aspire edilen kümülüs-oosit kompleksi ...5	5
Şekil 2-2: Denüstasyon sonrası oositler.....6	6
Şekil 2-3: İki pronükleus gözlenen normal döllenmiş zigot.....9	9
Şekil 2-4: Bölünme evresinde birinci kalite embriyolar ..... 10	10
Şekil 2-5: Dördüncü günde embriyolar ..... 12	12
Şekil 2-6: Beşinci günde blastosistler..... 14	14
Şekil 2-7: Kesintili ve kesintisiz inkübasyon: şematik görünüm ..... 17	17
Şekil 3-1: Bir sürekli embriyo izleme sisteminin görüntüsü .....20	20
Şekil 3-2: EmbryoScope® inkübatörünün iç görüntüsü.....21	21
Şekil 3-3: EmbryoScope® inkübatörüne bağlı ekran (EmbryoViewer®) .....22	22
Şekil 3-4: <i>Known implantation data (KID)</i> kavramının şematik anlatımı .....24	24
Şekil 3-5: Enjekte edilecek spermlerin MSOME değerlendirilmesi (x8050)...26	26
Şekil 3-6: Oniki embriyonun konulabildiği EmbryoSlide® kabının görüntüsü .27	27
Şekil 3-7: EmbryoSlide® kabının beş numaralı kuyusu ve kuyucuğu .....28	28

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bölünme evresinde embriyo sınıflaması .....	11
Tablo 2-2: Embriyo gelişiminin dördüncü gününde sınıflama.....	13
Tablo 2-3: Blastosist gelişim seviyesi skorlaması .....	14
Tablo 2-4: İç hücre kitlesi skorlaması .....	15
Tablo 2-5: Dış hücre kitlesi (trofektoderm) skorlaması.....	15
Tablo 4-1: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre hasta özellikleri .....	31
Tablo 4-2: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre embriyo kinetiği.....	32
Tablo 4-3: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre ikinci embriyonik hücre döngüsünün ( $cc2=t3-t2$ ) değerlendirilmesi .....	33
Tablo 4-4: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre ikinci embriyonik hücre döngüsünün ( $cc2= (t3-t2) > 11.2s$ ) değerlendirilmesi.....	34
Tablo 4-5: Üçüncü embriyonik hücre döngüsünün ( $cc3=t5-t3$ ) değerlendirilmesi.....	35
Tablo 4-6: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre üçüncü embriyonik hücre döngüsünün ( $cc3=t5-t3$ ) 13 saat ve altı için değerlendirilmesi .....	35
Tablo 4-7: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre üçüncü embriyonik hücre döngüsünün ( $cc3=t5-t3$ ) 13 saat üstü için değerlendirilmesi .....	36
Tablo 4-8: IMSI'de grade III + IV sperm için üçüncü embriyonik hücre döngüsünün ( $cc3=t5-t3$ ) 13 saat altı ve üstü için değerlendirilmesi.....	36

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH: *array Comparative Genomic Hybridization*, array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

AUC: *Area Under Curve*, Eğri Altında Kalan Alan

BMI: *Body Mass Index*, Vücut Kitle İndeksi

CI: *Confidence Interval*, Güven Aralığı

Cc2: *Cell Cycle 2*, ikinci hücre döngüsü

Cc3: *Cell Cycle 3*, üçüncü hücre döngüsü

GnRH: *Gonadotropin Releasing Hormone*, Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

hCG: *human Chorionic Gonadotropin*, insan Korionik Gonadotropin

HTF: *Human Tubal Fluid*, İnsan Tuba Sıvısı

ICSI: *IntraCytoplasmic Sperm Injection*, IntraSitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IMSI: *Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection*, Morfolojik Seçilmiş Spermin IntraSitoplazmik Enjeksiyonu

IVF: In Vitro Fertilizasyon

KID: *Known Implantation Data*, Bilinen implantasyon veri oranı

MSOME: *Motile Sperm Organelle Morphology Examination*, Hareketli Sperm Organel Morfolojisi Değerlendirilmesi

OPU: *Oocyte Pick-Up*, Yumurta toplama

PGT: Preimplantasyon Genetik Tanı

PN: Pronukleus

rFSH: rekombinant Folikül Stimülan Hormon

ROC: *Receiver Operating Characteristic*, Alıcı İşletim Karakteristiği

SD: *Standard Deviation*, Standart Sapma



SEİS: Sürekli Embriyo İzleme Sistemi

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*, Tek Nükleotid Polimorfizmi

t2: İki hücreye bölünme zamanı

t3: Üç hücreye bölünme zamanı

t4: Dört hücreye bölünme zamanı

t5: Beş hücreye bölünme zamanı

t6: Altı hücreye bölünme zamanı

t7: Yedi hücreye bölünme zamanı

t8: Sekiz hücreye bölünme zamanı

t9+: Dokuz hücreye ulaşma zamanı

tM: Morula evresine ulaşma zamanı

tSB: Blastülasyonun başlangıcı

tB: Blastosist evresine ulaşma zamanı

tEB: Blastosistin genişleme zamanı

YÜT: Yardımla Üreme Teknikleri

ZP: Zona Pelusida

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğal siklusta ovülasyon sonrası yumurtanın sperm tarafından döllenmesi ve embriyoya dönüşmesi tüba uterinada gerçekleşmektedir. Embriyo, döllenme sonrası rahim duvarına tutunmasına kadar geçen süre zarfında tüba uterina ve rahim tarafından kendisine sağlanan en uygun besin, sabit pH ve sıcaklık ortamında gelişimini sürdürmektedir. Tüp bebek teknikleri, en yüksek gebelik şansını sağlayabilmek için, yumurta toplanmasından embriyonun rahim içine transferine kadar geçen sürede, embriyonun gelişimi için gereken en uygun koşulları laboratuvarında sağlamayı amaçlamaktadır. Embriyonun gelişimi için ihtiyaç duyduğu ısı, embriyoyu dış etkenlerden koruyan inkübatörler aracılığı ile sağlanmaktadır. Embriyonun ihtiyaçları, içine yerleştirildiği kültür ortamı ile karşılanmaktadır. En uygun pH değerleri ise, gerek inkübatör içerisinde belirli bir düzeyde tutulan karbondioksit gazı ile, gerekse kültür ortamındaki katkı maddeleri ile sabitlenmektedir.

Laboratuvar ortamında döllenmenin ve gelişimin değerlendirilebilmesi ve rahim duvarına tutunma olasılığı en yüksek olan embriyonun belirlenebilmesi için belirli aralıklarla (1., 3., 4. ve 5. günlerde) inkübatörden kısa süreliğine (maksimum 1-2 dakika) çıkarılıp mikroskop altında incelenmesi gerekmektedir. Sıcaklık, pH değişimlerine ve dış etkenlere son derece hassas olan embriyonun inkübatör dışında kaldığı süreyi en aza indirmek için uzun zamandır devam eden çalışmaların sonucunda, sürekli embriyo izleme sistemi (EmbryoScope™) geliştirilmiştir. Sürekli Embriyo İzleme Sistemi'nin (SEİS) ana amacı, her bir embriyonun gelişiminin inkübatör içerisinde, bu cihaz için özel olarak geliştirilen bir kamera sistemi ile devamlı olarak kayıt altına alınmasıdır. SEİS ile kısa zaman dilimlerinde (her 20 dakikada bir) gelişmekte olan embriyoya ait görüntüler alınmaktadır. Bu işlem sırasında, kültür ortamının sıcaklık ve pH

değerlerinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır. Böylece, embriyo inkübatör ortamında güvenli bir şekilde gelişimine devam ederken, aynı zamanda inkübatörden çıkarılmadan izlenebilmektedir. SEİS'te her bir hastanın maksimum 12 embriyosunun aynı anda gerçek zamanlı ve geriye dönük karşılaştırmalı olarak izlenmesi mümkündür. Bu şekilde, transfer öncesi son değerlendirmede rahimde tutunma olasılığı en yüksek olan embriyo en güvenilir şekilde seçilebilmektedir.

Ayrıca, embriyo gelişimindeki ana olayların ve bunların uygun zamanda değerlendirilmesi ve kayıt altına alınması, son yıllarda önem kazanmıştır. Yumurta ve spermin birleşmesinden sonra, dölleme, ilk ve sonraki hücre bölünmelerinin dölleme sonrası hangi saatlerde görüldüğü, hücre büyüklüklerinin karşılaştırılması, hücre içi organel dağılımları, morula ve blastosist oluşum zamanlamaları klasik in vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar uygulamalarında kesin bir şekilde tanımlanamazken, SEİS'ler embriyo gelişim hızının (kinetik) belirlenmesini mümkün kılmıştır.

IVF laboratuvarında yaklaşık beş gün süren bir embriyo gelişim takip süreci söz konusudur. Bu sürede amaç, embriyoların morfolojik değerlendirilmesiyle transfer edilecek en iyi embriyoyu seçmek ve gebelik şansını arttırmaktır. En iyi kaliteye sahip blastosist transferi diğer günlere kıyasla hem daha yüksek implantasyon, hem de azalan abortus (düşük) oranlarına ulaşılmasını sağlamaktadır <sup>(1-2)</sup>. Ancak, transfer edilecek embriyonun seçimi için kullanılan morfolojik değerlendirme gözleme dayalı olduğundan kişiler arası farklılıklar gösterebilmektedir. Bunun yanında, embriyoların döllemeden blastosist evresine kadar sürekli izlendikleri SEİS'lerin geliştirilmesi, embriyo içerisindeki her bir hücrenin kesin bölünme zamanlarının da objektif olarak tespit edilebilmesini sağlamıştır <sup>(3-4)</sup>. Bu sistem, gebelik oluşturabilecek embriyonun seçilmesinde günüyle uyumlu bölünmeleri ve kalitelerinin (morfoloji) yanı sıra tüm gelişim süreçlerinin ve

hızlarının da (kinetik) bir seçim kriteri olarak değerlendirilmesini sağlamış ve “morfokinetik” olarak adlandırılan yeni bir alanın gelişmesine öncülük etmiştir.

Bunun yanında, SEİS’lerin güvenilirliği bir çok çalışmada gösterilmiştir <sup>(5-6)</sup>. Üçüncü gün transfer edilen 247 embriyoda yapılan retrospektif bir çalışmada oluşturulan implantasyon prediksyon modelinde, beş hücreye ulaşma zamanı, üç hücreden dört hücreye geçiş zamanı ve iki hücreden üç hücreye geçiş zamanı, en önemli üç parametre olarak belirlenmiştir <sup>(7)</sup>. Bu model blastosist oluşumu ve kalitesi ile de ilişkilendirilmiştir <sup>(8)</sup>. Ancak, hem ovülasyon indüksiyonunda kullanılan protokoller, hem embriyo kültür sıvıları, hem de embriyo inkübasyonu için oluşturulan gaz ortamının düşük ya da yüksek oksijen içermesinin, embriyonik bölünme zamanlarını etkilediği gösterilmiştir <sup>(9-10-11)</sup>.

Ayrıca, Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) alanındaki en son gelişmelerden biri olan IMSI (*Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection*; Morfolojik Seçilmiş Spermin IntraSitoplazmik Enjeksiyonu) uygulaması, günümüzde enjekte edilecek spermin seçiminde embriyoloji laboratuvarında önemli rol oynamaktadır. Zira, klasik mikroenjeksiyon işlemi (ICSI - *IntraCytoplasmic Sperm Injection*), 200-400 kat mikroskopik büyütme altında, hareketli spermler arasından, şekil olarak en düzgün olanların seçilmesine imkan vermektedir. Ancak bu durum spermin dölllenme, embriyo gelişimi ve gebelik için çok önemli olan bozuklukların tanımlanmasına imkân vermemektedir. Androloji laboratuvarında, özel boyama teknikleri ile bu bozukluklar tanımlanabilmekte, fakat bu spermler boyama sonrası canlı kalamadıklarından mikroenjeksiyon için kullanılamamaktadırlar. IMSI işleminde kullanılan yüksek büyütmeli objektifler ve özel optik sistemler aracılığı ile mikroenjeksiyon için hazırlanan spermleri 8050 kata kadar büyütme ve spermin başı içerisindeki bozuk yapıları ayırt ederek seçim yapmak mümkün olmaktadır <sup>(12-13-14)</sup>.

Özellikle, 2005 yılından bu yana yoğun olarak yapılan çalışmalarda, sperm başının içerisindeki genetik materyali içeren çekirdek kısmında bulunan vakuollerin (sıvı dolu kesecikler), DNA yapısında hasar bulunabileceği konusunda ipucu verdikleri gösterilmiştir. Sperm, DNA yapısındaki hasarlar, dölllenme başarısızlığı, embriyo gelişiminin durması, kötü ve/ veya yavaş embriyo gelişimi gibi problemlere sebep olabilmekte ve dolayısıyla gebelik şansını olumsuz etkilemektedir.

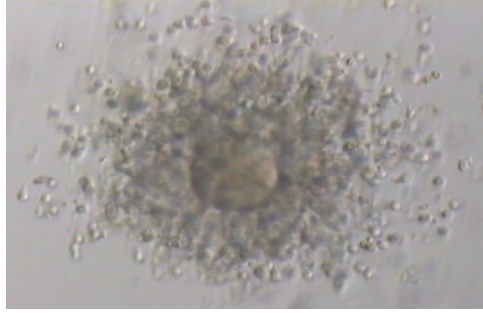
Şiddetli erkek faktörü olan vakalarda, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığında ve nedeni izah edilemeyen kısırlık durumlarında, spermin rolünü anlamaya ve uygun yapıdaki spermlerin seçilmesine olanak veren IMSI sistemi; blastosist evresine ulaşabilecek iyi embriyoların gelişimine de olanak vermesi yönünden, bu alandaki yeni ve önemli gelişmelerden birisidir.

Ancak, spermatozoa hücreindeki vakuol sayısı ve oranının embriyo gelişimi ve implantasyon üzerine etkisini geniş bir popülasyonda gerçekleştirmiş araştırma bulunmamaktadır. Dolayısıyla, çalışmamızın amacı, morfokinetik parametreler kullanarak retrospektif olarak vakuolizasyon oranı yüksek insan spermatozoa hücrelerinin embriyonik hücre döngülerine ve implantasyona etkisini incelemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yumurta Toplama İşlemi (Oocyte Pick-Up, OPU)

Yumurtalıklardaki olgun olmayan yumurtalar, farklı ovülasyon indüksiyonu protokollerine göre hormonlar ile uyarılarak istenilen büyüklüğe ulaştırılırlar. İnsan korionik gonadotropin (hCG) enjeksiyonu uygulandıktan 35-36 saat sonra ise doktor tarafından ultrasonografi probuna ilave edilmiş bir OPU iğnesi eşliğinde yumurtalar steril bir tüp içerisine aspire edilirler ve embriyolog tarafından, mikroskop altında, folikül sıvısı içinden steril tek kullanımlık cam pipet yardımıyla alınıp gelişimlerini devam ettirebilecekleri bir kültür sıvısı içerisine aktarılırlar (Şekil 2-1).



**Şekil 2-1: OPU işleminde folikülden aspire edilen kümülüs-oosit kompleksi (Fotoğraf Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).**

### 2.2. Mikroenjeksiyon Öncesi Yumurtaların Hazırlanması (Denüstasyon İşlemi)

Foliküllerden aspire edilen oositler, etraflarındaki kümülüs hücre kümesi ile birlikte alınırlar (Şekil 2-1). Kümülüs hücreleri oositlerin olgunluğunu tamamlayabilmesini sağladıkları için yaklaşık üç saat oositin etrafından uzaklaştırılmazlar. Bu bekleme süresinin sonunda, hyaluronidaz adı verilen enzim ve steril cam pipetler yardımı ile oositin çevresindeki

kümüls hücreleri enzimatik ve mekanik yöntem ile oositten uzaklaştırılırlar ve böylece oositler olgunluk açısından değerlendirilebilecek duruma gelirler (Şekil 2-2). Denüstasyon işleminden yaklaşık 30 dakika sonra, olgunluğunu tamamlamış oositlere mikroenjeksiyon işlemi uygulanır.



**Şekil 2-2: Denüstasyon sonrası oositler. Sırasıyla; a. olgun olmayan (Profaz I) b. olgun olmayan (Metafaz I) ve c. olgun oosit (Metafaz II) gösterilmektedir (Fotoğraflar Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).**

### **2.3. In Vitro Fertilizasyon (IVF)**

IVF, ilk olarak 1978 yılında İngiltere'de uygulanmaya başlanmıştır. Bu yolla doğan ilk bebek olan Louise Brown birçok çift için umut kaynağı olmuştur <sup>(15)</sup>. IVF tekniği, mikroenjeksiyondan farklı olarak yumurtaların toplanmasından sonra yumurtalara denüstasyon işlemi uygulanmadan gerçekleştirilir. IVF işleminde, hastanın eşinden alınan ve uygun yıkama yöntemleriyle en iyi spermilerin elde edildiği sperm örneği ve oositler aynı ortamda bir araya getirilirler.

### **2.4. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)**

ICSI uygulaması, mikromaniplatör donanımına sahip özel mikroskobun ısıtılmış yüzeyinde, 200-400 kat büyütme altında ve uçlarına açılı verilmiş steril tek kullanımlık cam mikropipetler ile sperm oositin

sitoplazmasına enjekte edilmesiyle gerçekleştirilir <sup>(16)</sup>. Mikroenjeksiyon işlemi yapılacak olan steril, toksik olmayan plastik kaptaki, önce erkeğe ait spermilerin konulacağı özel kültür sıvısı içeren bir havuz oluşturulur. Daha sonra olgun yumurtaların konulacağı özel besi sıvısı içeren mikro damlacıklar hazırlanır. Sperm ve yumurta kendilerine ait yerlere konulduktan sonra mikroskop altında şekil olarak normal görünümlü ve varsa hareketli sperm seçilerek mikroenjeksiyon pipeti ile kuyruğun orta bölümüne bastırılarak hareketsizleştirilir. Kuyruk kısmından yakalanan sperm, pipet içine alınarak yumurtanın içinde olduğu damlaya gidilir. Özel tutma pipeti ile sabitlenen yumurtanın içine, hareketsizleştirilen sperm enjekte edilir. Bu işlem, tüm yumurtalara aynı sıra ile uygulanır. İşlem bittikten sonra, yumurtalar özel besi ortamlarına alınarak işlemden yaklaşık 20 saat sonra döllenme kontrolü yapılır.



## 2.5. Morfolojik Seçilmiş Spermin IntraSitoplazmik Enjeksiyonu (IMSI)

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) alanındaki en son gelişmelerden biri olan IMSI (*Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection*; Morfolojik Seçilmiş Spermin IntraSitoplazmik Enjeksiyonu) uygulaması, günümüzde enjekte edilecek spermin seçiminde embriyoloji laboratuvarında önemli rol oynamaktadır. Zira, klasik mikroenjeksiyon işlemi (ICSI - *IntraCytoplasmic Sperm Injection*), 200-400 kat mikroskopik büyütme altında, hareketli spermler arasından, şekil olarak en düzgün olanların seçilmesine olanak vermektedir. Ancak, bu durum, spermin dölllenme, embriyo gelişimi ve gebelik için çok önemli olan bozuklukların tanımlanmasına olanak vermemektedir. Androloji laboratuvarında, özel boyama teknikleri ile bu bozukluklar tanımlanabilmekte, fakat bu spermler boyama sonrası canlı kalamadıklarından mikroenjeksiyon için kullanılamamaktadırlar. IMSI işleminde kullanılan yüksek büyütme objektifleri ve özel optik sistemler aracılığı ile mikroenjeksiyon için hazırlanan spermleri 8050 kata kadar büyütme ve spermin başı içerisindeki bozuk yapıları ayırt ederek seçim yapmak mümkün olmaktadır (12-13-14).

Özellikle, 2005 yılından bu yana, yoğun olarak yapılan çalışmalarda, sperm başının içerisindeki genetik materyali içeren çekirdek kısmında bulunan vakuollerin (sıvı dolu kesecikler), DNA yapısında hasar bulunabileceği konusunda ipucu verdikleri gösterilmiştir. Sperm, DNA yapısındaki hasarlar, dölllenme başarısızlığı, embriyo gelişiminin durması, kötü ve/ veya yavaş embriyo gelişimi gibi problemlere sebep olabilmekte ve dolayısıyla gebelik şansını olumsuz etkilemektedir.

Şiddetli erkek faktörü olan vakalarda, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığında ve nedeni izah edilemeyen kısırlık durumlarında, spermin rolünü anlamaya ve uygun yapıdaki spermlerin seçilmesine olanak veren

IMSI sistemi; blastosist evresine ulaşabilecek iyi embriyoların gelişimine de olanak vermesi yönünden, bu alandaki yeni ve önemli gelişmelerden birisidir.

## 2.6. Erken ve İleri Dönem Embriyo Gelişimi

Döllenme sağlandıktan sonra, embriyo gelişimi takip edilerek uygun olan günde transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer günü, merkezlerin stratejilerine, çiftin elde edilen yumurta sayısına ve gelişmekte olan embriyo kalitesine göre değişim göstermektedir.

### 2.6.1. Pronukleus Değerlendirilmesi

Döllenme kontrolü, IVF veya mikroenjeksiyon işleminden yaklaşık 20 saat sonra yapılır. Döllenme, kısaca tek bir sperm çekirdeğinin oositten gelen çekirdek ile aktive olmuş oosit sitoplazması içerisinde birleşmesi olarak özetlenebilir (Şekil 2-3). Normal fertilizasyonda iki pronükleus ve birinci ve ikinci kutup cisimcikleri gözlenir. Bu evrede değerlendirme; pronukleusların (PN) pozisyonu ve boyutu, çekirdekçik öncül cisimciklerinin sayısı, büyüklükleri ve dağılımları, kutup cisimciklerinin yerleşimi ve sitoplazmik halonunu varlığı dikkate alınarak yapılır.



**Şekil 2-3: İki pronukleus gözlenen normal döllenmiş zigot (Fotoğraf Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).**

## 2.6.2. Bölünme Evresi Sınıflaması

Döllenen bir yumurta yaklaşık 25-30 saat sonra ilk mitotik bölünmeye başlayarak iki hücreli bir embriyo oluşturmaktadır. Bu dönemden itibaren embriyoların değerlendirilmesi; blastomerlerin şekli ve boyutu, blastomerler arası fragmantasyon derecesi, blastomerlerdeki nukleus sayısı (mültinükleasyon), sitoplazmik görünüm ve erken birleşme gibi parametreler dikkate alınarak yapılır <sup>(17)</sup>.

Bölünme hızına göre, embriyonun sahip olduğu blastomer sayısı şayet günün beklenen sınırları arasında ise normal gelişen bir embriyo, eğer bu sayı düşükse, yavaş gelişen bir embriyo olarak değerlendirilir. Normal bölünme hızına sahip bir embriyo, 25-30. saatte iki hücre, ikinci günde (38-40. saat) üç-dört hücre, üçüncü günde (54-60. saat) altı-sekiz hücre ve dördüncü günde birleşme işaretlerine bağlı olarak on ve üzerinde hücreye sahip olan embriyodur. Kalite değerlendirilmesine göre, eşit büyüklükte blastomer yapısına sahip olan, % 0-5 arasında fragmantasyon içeren ve sitoplazmasında belirgin granüler yapı gözlenmeyen embriyolar, birinci kalite olarak değerlendirilirler (Şekil 2-4). Bu değerlendirmeye göre, kalite sıralaması aşağıdaki gibi olmaktadır (Tablo 2-1).



**Şekil 2-4: Bölünme evresinde birinci kalite embriyolar; a. 44. saatte dört hücreli embriyo b. 72. saatte sekiz hücreli embriyo c. 72. saatte sekiz hücreli ve birleşme başlangıcı olan embriyo. (Fotoğraflar Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).**

**Tablo 2-1: Bölünme evresinde embriyo sınıflaması <sup>(17)</sup>**

---

<b>1. kalite</b>	Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, %0-5 oranında fragmantasyon içeren ve granülasyon işaretleri göstermeyen embriyo.
<b>2. kalite</b>	Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, %5-10 oranında fragmantasyon içeren veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
<b>3. kalite</b>	Blastomerler birbirinden hafifçe farklı, %10 üzerinde fragmantasyona sahip veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
<b>4. kalite</b>	Blastomer sayısı net sayılamayan, %30'dan fazla fragmantasyona sahip, blastomerler birbirinden belirgin derecede farklı veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo.

---

### 2.6.3. İleri Dönem Embriyo Gelişimi

Fertilizasyondan sonraki dördüncü günde gelişen embriyodaki hücre sayısı, inseminasyonu takiben yaklaşık 96 saat sonra 16–20 hücre arasındadır. Kompaktlaşma, hücrelerin daha yakın bir şekilde yapışmasına neden olan bir seri hücreler arası sıkı bağlantıların (desmozom, gap junction) oluşması sonucu meydana gelir. Embriyo, kompaktlaşmaya başladığı zaman morula adını alır. Moruladan sonra kavitasyon dönemi başlar (Şekil 2-5). Kavitasyonun oluşması ile kaviteden salgılanan sıvı, blastosöl oluşumunu tetikler. Kavitasyon ilerledikçe, kompaktlaşma sırasında hücrelerin (blastomerlerin) kutuplaşmasıyla iki farklı hücre grubu (trofektoderm, dış hücre kütlesi ve inner cell mass, iç hücre kütlesi) oluşacaktır. Dördüncü gün

embriyolarının kalite değerlendirilmesi aşağıdaki gibi yapılmaktadır (Tablo 2-2) <sup>(17)</sup>.



**Şekil 2-5: Dördüncü günde embriyolar; a. 10 hücreli birleşme başlangıcı gözlenen üçüncü kalite embriyolar b. 96. saatte morula aŐamasındaki ikinci kalite embriyo c. 96. saatte kavitasyon izlenen birinci kalite embriyo. (Fotoğraflar Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).**

**Tablo 2-2: Embriyo gelişiminin dördüncü gününde sınıflama <sup>(17)</sup>**

---

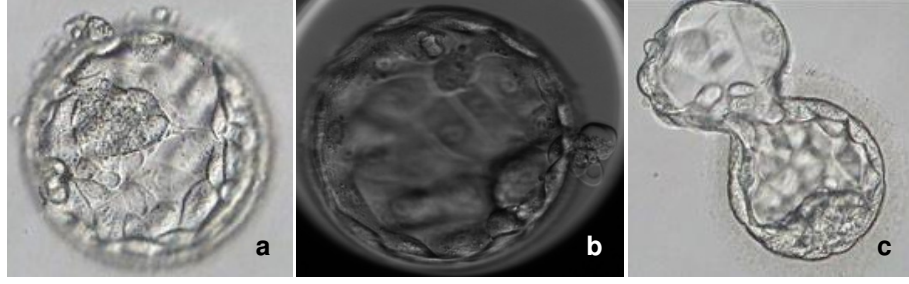
<b>1. kalite</b>	Erken blastosist, kavitasyon gözlenen ya da morula olmuş ve fragmantasyon, vakuolizasyon gibi anomali içermeyen embriyo.
<b>2. kalite</b>	Morula veya birleşmiş embriyo morfolojisine sahip en az bir anomalinin eşlik ettiği embriyo.
<b>3. kalite</b>	Morula veya birleşmiş embriyo morfolojisine sahip iki-üç anomalinin eşlik ettiği veya on hücre ve üzeri blastomer sayısına sahip birleşmeye başlamış embriyo.
<b>4. kalite</b>	Blastomer sayısı on veya daha az sayıda olan herhangi bir birleşme bulgusu gözlenmeyen embriyo.

---

#### 2.6.4. Blastosist Dönemi Sınıflaması

Blastosist oluşumu, inseminasyondan sonra beşinci ve altıncı günlerde gerçekleşir (Şekil 2-6). Blastosist aşamasında, farklılaşmış iki hücre grubu söz konusudur; iç hücre kitlesi olarak tanımlanan ve gebelik esnasında embriyoyu oluşturmakla görevli olan hücre kitlesi ve trofektoderm olarak tanımlanan ve gebelik esnasında, gebelik kesesi ve bebeğin beslenmesi için gerekli kısımları oluşturan hücre kitlesinden oluşmaktadır.

Blastosist, skrolama sisteminde, her bir embriyoya aşağıdaki ölçütlere göre üç ayrı skor verilir; blastosist gelişim düzeyi (kavitasyonun başlangıcından tomurcuklanmaya kadar), iç hücre kitlesi kalitesi ve dış hücre kitlesi kalitesi (Tablo 2-3, Tablo 2-4, Tablo 2-5) <sup>(1)</sup>.



**Şekil 2-6: Beşinci günde blastosistler; a. 4AA blastosist b. 5AA blastosist c. 6AA blastosist (Fotoğraflar Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).**

**Tablo 2-3: Blastosist gelişim seviyesi skorlaması <sup>(1)</sup>**

---

1	Kavitasyonun başlaması, blastosöl hacminin embriyo hacminin yarısından az olması
2	Blastosöl hacminin embriyo hacminin yarısından fazla olması
3	Blastosöl hacminin embriyo hacminin tamamını kaplaması
4	Blastosöl hacminin, embriyo hacminden büyük olması, dış çeperin incelmesi
5	Dış çeperin kırılarak tomurcuklanmanın başlaması
6	Embriyonun dış çeperden tamamen ayrılması, tomurcuklanmanın tamamlanması

---

**Tablo 2-4: İ hücre kitlesi skortlaması <sup>(1)</sup>**

- 
- |   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| A | Sıkı paket halinde çok hücre içermesi |
| B | Gevşek ama birçok hücre içermesi      |
| C | ok az sayıda hücre içermesi          |
- 

**Tablo 2-5: Dış hücre kitlesi (trofektoderm) skortlaması <sup>(1)</sup>**

- 
- |   |   |
|---|---|
| A | Birbirine sıkıca bağlı birçok hücreden oluşan epitel yapı |
| B | Daha gevşek bağlı ve birkaç hücreden oluşan epitel yapı   |
| C | ok az ve büyük hücrelerden oluşan epitel yapı            |
- 

## **2.7. Embriyo Transferi**

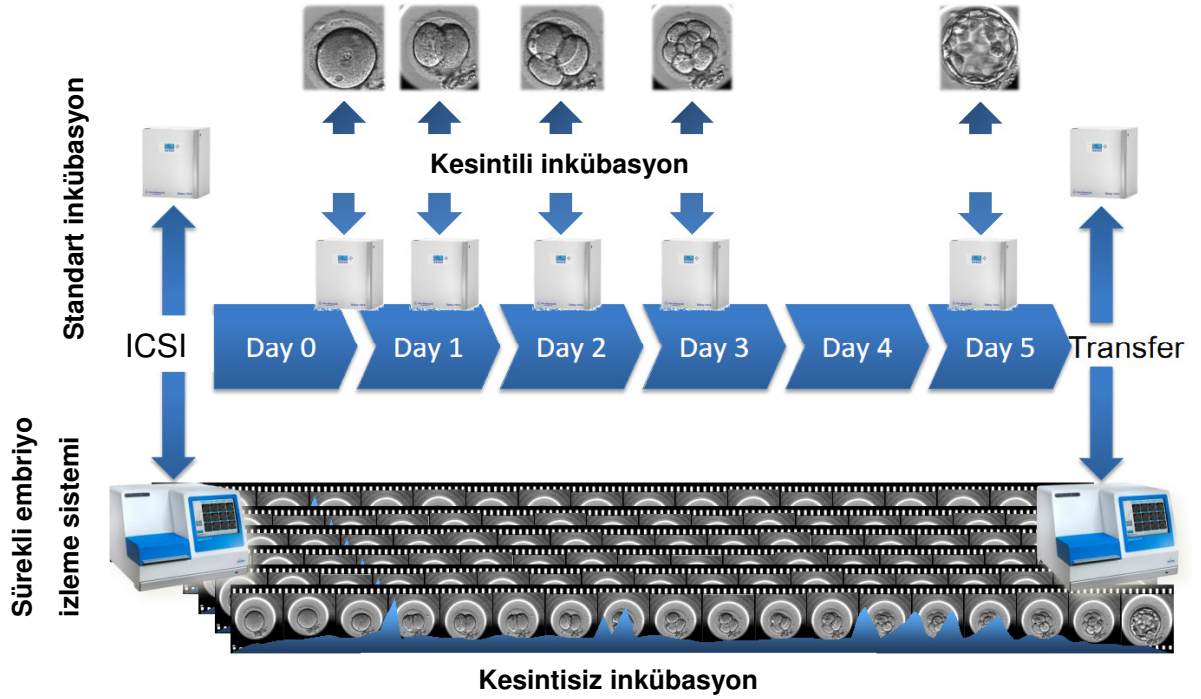
Embriyoların, rahim içinde verileceği en uygun yerin tespit edilmesi ve rahim içi zarına dokunulmaması açısından, embriyo transfer işleminin dolu mesane ile ve ultrasonografi eşliğinde yapılması tercih edilmektedir. Bu şekilde, rahim ağzı ve rahim arasındaki açı tespit edilerek, transfer kateterinin izleyeceği yol belirlenmekte ve işlemin az travmatik olması sağlanmaktadır. Transfer işlemi sırasında, rahim ağzında bulunan mukus steril bir çubuk ile temizlenir, ince ve yumuşak bir kateter yardımı ile embriyolar rahim içerisine bırakılır. Transferde, yumuşak kateter tercih edilmesi, rahim ağzında kanama riskini de azaltmaktadır. Kateter içerisine yüklenen embriyoların transferi nazik bir şekilde yapıldıktan sonra kateter yavaşça çıkarılır ve kateter mikroskop altında kontrol edilerek embriyoların transfer edildiği kontrol edilir.



## 2.8. Sürekli Embriyo İzleme Sistemi'nin (SEİS) YÜT'teki Önemi

Embriyoların beşinci güne kadar, laboratuvar ortamında kültüre edilip, gelişimlerinin izlenmesi ve en iyi morfolojiye sahip blastosistin taze ya da dondurulmuş siklusta transfer edilmesi hem yüksek implantasyon, hem de azalan abort (düşük) oranları sağlamaktadır (1-2-18-19). Dolayısıyla, embriyoların değerlendirilmesi IVF laboratuvarlarının temelidir, ancak, hem kişiler arası hem de aynı kişinin farklı zamanlarda yapabileceği yorum değişkenliğine de açıktır. Ortak görüş, 2011 yılında ALPHA-ESHRE çalışma grubunun İstanbul'da gerçekleştirmiş olduğu toplantıda belirtilmiştir ve objektif ölçütler ortaya konmaya çalışılmıştır (20-21).

Embriyoların döllenmeden blastosist oluşumuna kadar geçen sürede sürekli takip edildikleri sistemlerin geliştirilmesi embriyoyu oluşturan her bir blastomer hücresinin ne zaman bölündüğünün tespit edilmesini de sağlamıştır (3-4-22-23). Klasik morfolojik değerlendirmede, embriyoların bir kaç dakikalığına buldukları inkübatörlerden çıkarılıp, mikroskop altında anlık değerlendirmeleri yapılmaktadır. SEİS'lerde ise embriyolar rahatsız edilmeden ve dış ortam koşullarına alınmadan sürekli takip edilebilmektedirler (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Kesintili ve kesintisiz inkübasyon: şematik görünüm.

Bu sistemler ile hücre bölünmelerinin kesin zamanlamaları, kompaksiyon ve blastosist oluşum zamanları, fragman oluşumu ve emilimi ve multinükleasyon belirmesi de gözlemlenebilmektedir. Dolayısıyla, blastosist değerlendirilmesi konvansiyonel (geleneksel) inkübatör sistemlerinde sadece anlık değerlendirmeye kısıtlanmışken SEİS'lerde morfolojiye zaman boyutu da eklenerek kinetik değerlendirme de yapılabilmektedir (1-3-7).

SEİS'lerin güvenilirliği konvansiyonel inkübatörlerle karşılaştırılmalı olarak hem vericilerden, hem de infertil hastalardan toplanan taze oositlerde gösterilmiştir (5-6).

## 2.9. SEİS'lerde Modelleme

SEİS'te inkübe edilen ve embriyo gelişiminin üçüncü gününde transfer edilen 247 embriyonun morfokinetik verilerinin retrospektif değerlendirilmesi sonucunda, implantasyon ile ilişkilendirilen hiyerarşik bir model oluşturulması sağlanmıştır <sup>(7)</sup>. Bu çalışmada, sırasıyla embriyonun beş hücreye ulaşma zamanı (t5), üç hücreden dört hücreye ulaşma zamanı (s2) ve iki hücreden üç hücreye ulaşma zamanı (cc2) embriyonun implantasyon potansiyeli ile bağlantılı bulunmuştur. Takip eden bir başka çalışmada ise, oluşturulan hiyerarşik model, blastosist oluşturma potansiyeli ve kalitesi ile de ilişkilendirilmiştir <sup>(8)</sup>. Araştırmacılar retrospektif çok merkezli kohort çalışmasında embriyoların SEİS'te gelişmesi ve seçilmesi halinde klinik gebelik oranındaki artışın %9 olacağını göstermişlerdir <sup>(24)</sup>.

Dal Canto ve arkadaşları <sup>(25)</sup> morfokinetik verileri, blastosist geliştirme potansiyeli ve implantasyon yönünden incelemiş ve yedi ve sekiz hücre evrelerinin bölünme (klivaj) zamanlamaları, dört hücreden sekiz hücreye geçiş zamanı ve beş hücreden sekiz hücreye geçiş zamanı açısından sekiz hücre evresi sonrası gelişimini durduran embriyolar ve blastosist evresine ulaşan embriyolar arasında anlamlı fark bulmuştur. Blastosistlerin ekspansiyon potansiyeli ise üç hücre evresinden sonraki tüm klivaj zamanlamaları ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, bu araştırmada implante olmuş embriyolar, sekiz hücre evresine implante olmayanlara göre daha erken ulaşmışlardır. Dolayısıyla, bu çalışma iki hücreden sekiz hücreye ulaşma zamanlarının, blastosiste ulaşabilme, ekspansiyon olma ve implantasyon potansiyeli olan embriyolar için daha kısa olduğunu göstermiştir <sup>(25)</sup>. Bu gözlemler aynı zamanda farklı bir IVF laboratuvarında blastosist oluşturma ve implantasyon tahmini açısından beş hücreden sekiz hücreye geçişte gecikmelerin artması ve belirginleşmesi nedeniyle beş hücreye ulaşma zamanının yeterli olamayabileceğini de göstermiştir.

SEİS'ler hücre döngülerinin detaylı incelenmesini ve kesin zamanlamalarının belirlenmesini sağladığı için direkt klivaj gibi bölünme anomalilerinin de gözlemlenebilmesini sağlamıştır. İki hücreden üç hücreye beş saatten kısa bir sürede bölünmüş olan embriyoların implantasyon oranlarının normal klivajlara sahip embriyolara kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu çok merkezli bir çalışmada gösterilmiştir (%1.2'ye %20.2). Dolayısıyla, direkt klivaj bulgusu olan embriyoların transferi, ancak, seçme olanağı yoksa düşünülmalıdır <sup>(26)</sup>.

Ayrıca, SEİS'ler PN morfolojilerinin değişkenliğini de göstermiş ve PN değerlendirilmesine göre yapılan embriyo seçiminin yanıltıcı olabileceğine dikkat çekmiştir <sup>(27)</sup>. Ancak PN'lerin silinme zamanının implantasyona yönelik önemli bir bulgu olduğu bir çalışmada gösterilmiş ve 20.45 saatin altında canlı doğum olmadığı bildirilmiştir <sup>(28)</sup>.

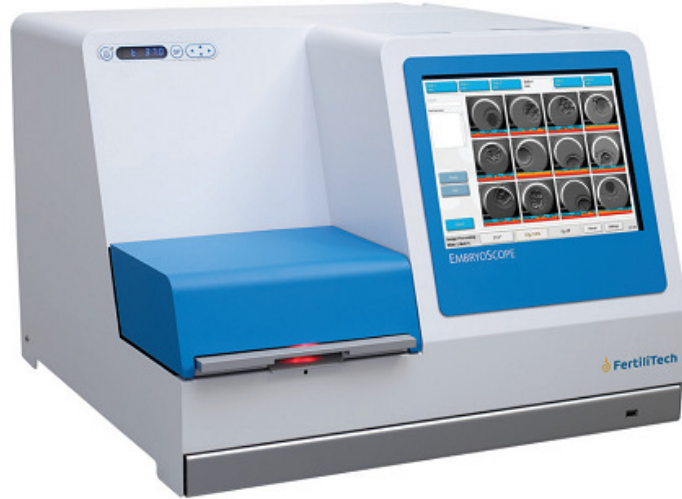
Embriyonun ploidi yönünden tanımlanması son yıllarda yaşanan teknolojik gelişmeler ile kolaylaşmış ve "*array Comparative Genomic Hybridization*" (aCGH), "*Single Nucleotide Polymorphism*" (SNP) microarray gibi platformlar morfokinetik ve genetik verilerin birleştirilmesinin önünü açarak YÜT'de yeni bir alan yaratmışlardır. Yeni bir çalışma, embriyo ploidisini blastülasyon ve tam blastosist olma zamanları ile ilişkilendirmiş ve anöploidiye yönelik bir risk modeli oluşturmuştur <sup>(29)</sup>. Buna göre anöploidi riski düşük (%36), orta (%69) ve yüksek (%100) olarak tanımlanmıştır. Blastülasyon ve tam blastosist oluşturma zamanları kullanılarak oluşturulan bu anöploidi risk modeli, biyopsi uygulanmamış embriyoları içeren retrospektif bir çalışmada da hem implantasyon hem de fetal kalp atımı varlığı yönünden anlamlı bulunmuştur <sup>(30)</sup>.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Retrospektif Kohort Çalışmasının Temelleri

Bu çalışma için İstanbul Acıbadem Üniversitesi'nin Tıbbi Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu'nun etik kurul onayı alındıktan sonra yapılmıştır (ATADEK 2014-729).

Klasik morfolojik değerlendirmede embriyolar, günde bir defa kültüre edildikleri inkübatörlerden çıkarılıp mikroskop altında çok kısa bir süre içerisinde takip edilmektedirler. Sürekli embriyo izleme sistemlerinde (SEİS) ise cihazın içerisinde bulunan bir kamera sayesinde embriyolar devamlı takip edilebilmekte ve çekirdeklerin oluşup silinmesinden blastosist gelişimine kadar tüm embriyo bölünme süreçleri dinamik olarak görüntülenebilmektedir (Şekil 3-1 ve Şekil 3-2).



**Şekil 3-1: Bir sürekli embriyo izleme sistemi olan EmbryoScope® inkübatörünün görüntüsü.**



**Şekil 3-2: EmbryoScope® inkübatörünün iç görüntüsü; arka planda fotoğraf çekme özelliğine sahip lens ve kırmızı ışığı, ön planda embriyoların yerleştirildiği özel slayt ve yuvaları.**

Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı bünyesinde üç adet SEİS (EmbryoScope®) bulunmaktadır. Bu sistemde kültüre edilen embriyoları IVF Klinik Doktorları ya da Embriyologlar infertil çiftin özelliklerine göre değerlendirip seçmektedirler ya da merkezimize başvuran hastaların bu doğrultuda bir talebi olabilmektedir. Cihazların rutin kullanıma geçtiği Ekim 2011'den günümüze, EmbryoScope'ta kültüre edilip morfolojik yönden değerlendirilerek transfere seçilen ve seçilmeyen tüm embriyoların morfokinetik kayıtları cihazların bağlı olduğu bilgisayarda bulunmakta ve sıklıkla yedeklenmektedir (EmbryoViewer®) (Şekil 3-3).

Ayrıca, Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) alanındaki en son gelişmelerden birisi olan IMSI uygulaması, gerekli teknik altyapının tamamlanmasının ardından Mayıs 2008'den itibaren merkezimizde uygulanmaya başlanmıştır. Şiddetli erkek faktörü olan vakalarda, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığında ve nedeni izah edilemeyen kısırlık durumlarında, uygun yapıdaki spermilerin seçilmesine olanak veren IMSI sistemini kullandığımız ve embriyolarını EmbryoScope'ta takip ettiğimiz embriyoları çalışmamız kapsamında geriye yönelik inceleyerek bölünme zamanları değerlendirildi.



**Şekil 3-3: EmbryoScope® inkübatörüne bağlı ekran (EmbryoViewer®).**

Bu çalışmada dolayısıyla, hiç bir hastanın tedavi süreci etkilenmedi, embriyolarına her hangi invazif bir işlem uygulanmadı, sadece veritabanımızdaki embriyo kayıtları istatistiksel yöntemlerle incelenerek spermdeki vakuolizasyon açısından değerlendirildi.

Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) yaptıran hastalar, embriyolarının kültürü sırasında bir hücrenin alınması ile müdahaleye maruz kaldıkları için bu araştırmaya dahil edilmemişleridir. Araştırmaya dahil olan hastaların IVF uygulamalarını Şişli Memorial Hastanesinde yaptırmış, IMSI uygulanmış ve embriyolarının ise SEİS'te (EmbryoScope®) takip edilmiş olması şartları aranmıştır.

### **3.2. Çalışmaya Dahil Olan Olguların Özellikleri**

Bu çalışma Şişli Memorial Hastane'si Tüp Bebek Laboratuvarı'nda Ekim 2011-Nisan 2013 dönemine ait morfokinetik verilerin retrospektif incelemesini içermektedir. Araştırma 30 Eylül 2014 tarihli ÜYTE yönetmeliğine uygun olarak, Şişli Memorial Hastanesi'ni yönetiminin de onayını alarak gerçekleştirildi.

Sunulan retrospektif gözlemsel kohort çalışması IMSI uygulanmış ve çeşitli infertilite sebeplerinden dolayı merkezimize müracaat etmiş toplam 858 hastanın verisini içermektedir. PGT yapılmış vakalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Vakaların tüm oositleri ICSI yöntemiyle döllenenmiş olup, bunlardan gelişen embriyolar bir SEİS olan EmbryoScope® inkübatöründe (Unisense Fertilitatech, Aarhus, Danimarka) takip edilip standart YÜT uygulamasına tabii tutulmuşlardır.

### **3.3. Ovaryum Stimülasyonu ve Siklus Takibi**

Ovaryum stimülasyonu için rekombinant Folikül Stimüle edici Hormon (rFSH; Gonal-F®; Merck Serono, Türkiye) mensin ikinci gününden itibaren başlanarak kadının yaşına ve kilosuna göre 150-225 IU dozunda verildi. Önde giden folikül 12-13 mm çapına ulaştığında, günlük 0.25 mg gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) antagonisti (Cetrotide®; Merck Serono, Türkiye) uygulamasına başlandı. İki ya da daha fazla folikül minimum 18 mm çapına ulaştığında, foliküler matürasyon 250 µg rekombinant insan korionik gonadotropin (r-hCG; Ovitrelle®; Merck Serono, İsviçre) uygulaması ile sağlandı. Transvajinal ultrason eşliğinde yapılan OPU işlemi bu enjeksiyondan 36 saat sonrasına planlandı.

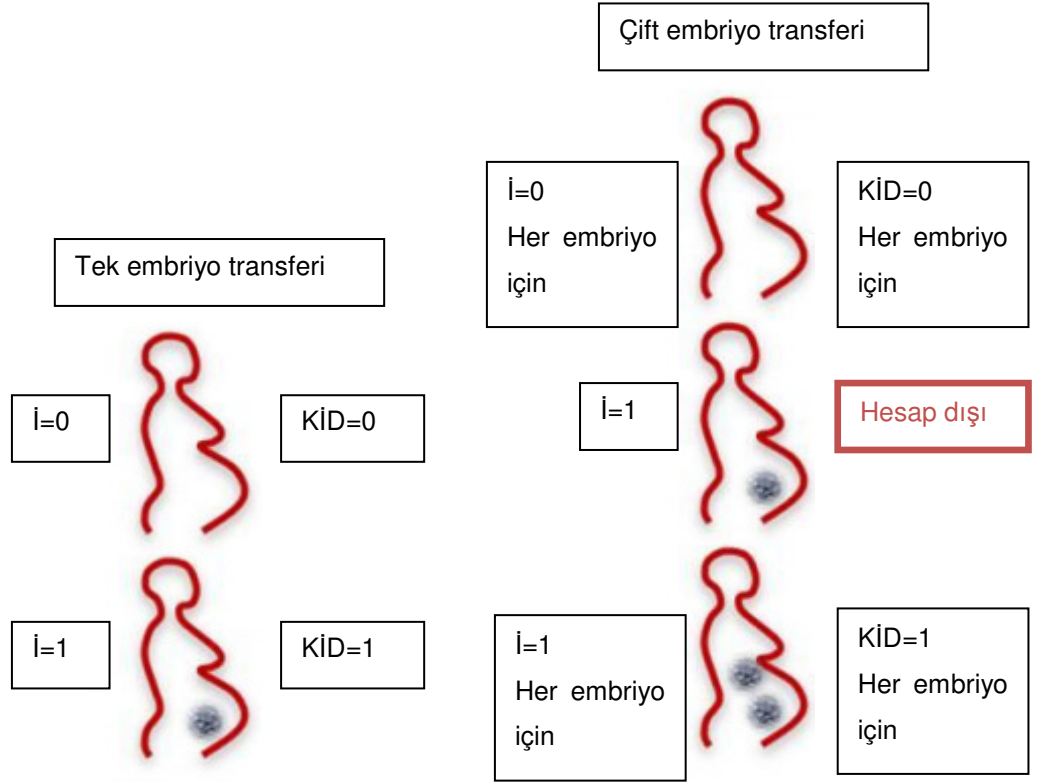
Embriyo transferinden sonra luteal fazı desteklemek için hastalara 12 gün boyunca intramuskuler 100 mg progesteron uygulandı (Progynex™; Farmako-Koçak, Türkiye). Bu süre sonunda, implantasyonun gerçekleşmesi halinde intravajinal progesteron jel uygulamasına geçildi (Crinone® %8; Merck Serono, İsviçre).

OPU işleminden, 14 ve 16 gün sonra serumda β-hCG bakıldı. Yedinci haftada transvajinal ultrason yöntemi ile erken gebelik monitorize edildi. Klinik gebelik transvajinal ultrasonda görülen fetal kalp atımı ile



tanımlandı. Progesteron tedavisine gebeliğin onuncu haftasına kadar devam edildi.

İmplantasyon, ultrasonda görülen kesenin varlığı olarak tanımlandı. Bilinen implantasyon veri oranı, “*Known Implantation Data*” (KID) oranı ise ultrasonda görülen kese sayısının transfer edilen embriyo sayısıyla bire bir örtüştüğü vakaları (KID=1) ve biyokimyasal gebeliğin oluşmadığı vakaları (KID=0) ifade etmektedir (Şekil 3-4).



**Şekil 3-4: Bilinen implantasyon veri oranı (*Known Implantation Data*; *KID*) kavramının şematik anlatımı.**

### **3.4. Hareketli Sperm Organel Morfolojisi Değerlendirilmesi (Motile Sperm Organelle Morphology Examination: MSOME)**

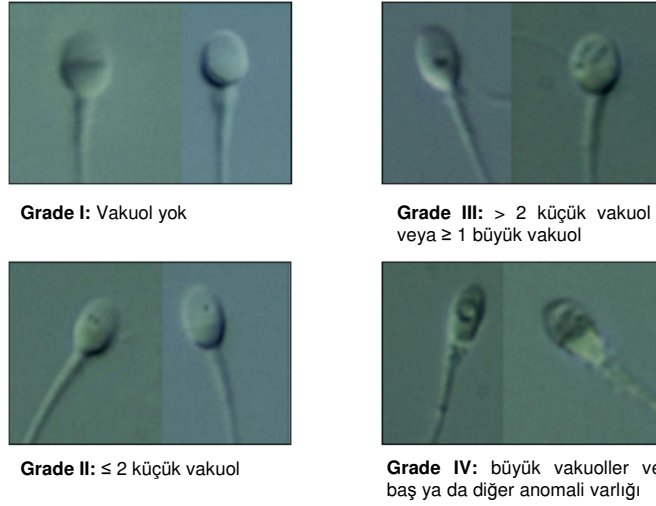
MSOME (*Motile Sperm Organelle Morphology Examination*) tekniği, hareketli spermlerin 6000-8050 kat büyütüldüğü ve donanımlı mikroskoplar ile yapılan sperm morfoloji analizidir <sup>(12-13)</sup>. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi erkek üreme potansiyelinin ve tedavi stratejisinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Bugüne kadar yapılan birçok bilimsel çalışmalar ile sperm morfolojisinin döllenme, embriyo gelişimi ve gebelik sonuçları üzerinde önemli etkisinin olduğu gösterilmiştir. Erkek infertilitesinin teşhisindeki ilk aşama semen parametrelerinin (spermiogram) değerlendirilmesidir. Spermiogram sonucuna göre normal sperm oranı düşük olan vakalarda, şiddetli erkek faktörü nedeniyle infertilite durumlarında spermler MSOME tekniği ile değerlendirilir. Aynı zamanda tekrarlayan tüp bebek başarısızlığında ve açıklanamayan infertilitede spermiograma ek olarak erkek spermi MSOME tekniğiyle incelenir.

Sperm majör anomalilerinin yanında spermin başı içerisindeki anomalili yapıları ve vakuolleri (sıvı dolu kesecikler), MSOME tekniği ile ayırt etmek mümkündür. Sperm başı içerisindeki genetik materyali içeren çekirdek kısmında bulunan vakuoller DNA yapısında hasar bulunabileceği konusunda ipucu vermektedir. Yapılan araştırmalarda vakuol içeren spermlerde vakuol içermeyenlere nazaran DNA hasarı oranının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Sperm DNA yapısındaki hasarlar, döllenme başarısızlığı, embriyo gelişiminin durması, kötü ve/ veya yavaş embriyo gelişimine sebep olabilmekte ve dolayısıyla gebelik şansını olumsuz etkilemektedir <sup>(31-32-33-34-35-36-37-38-39)</sup>.

MSOME tekniği ile klasik sperm morfoloji değerlendirilmesi arasındaki en önemli fark değerlendirilen spermlerin hazırlık yöntemidir. Klasik morfoloji değerlendirilmesi için spermlerin tamamı mikroskop lamı

üzerinde sabitlenir ve özel boyalarla boyanır. Bu nedenle, değerlendirme yapılırken hareketli ve hareketsiz sperm birliktedir değerlendirilir. MSOME tekniğinde ise sperm hazırlık yöntemleri sonrasında elde edilen hareketli sperm değerlendirilir. Böylece mikroenjeksiyon için seçilmesi muhtemel sperm kaliteleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.

MSOME tekniği ile sperm morfolojisi değerlendirilirken aynı zamanda boyun ve kuyruk yapıları normal olan sperm içerisinde baş yapısı, baş içerisinde vakuol varlığı ve vakuollerin boyutlarına göre 4 aşamalı bir kalite değerlendirilmesi yapılır. Bu değerlendirmeye göre normal morfolojiye sahip ve baş içerisinde vakuol bulunmayan sperm 1. kalite olarak tanımlanırken, vakuol sayısı ve boyutunun artışına bağlı olarak sperm kalitesi düşmektedir. Baş yapısı normal olmayan ve vakuol içeren sperm ise 4. kalite olarak tanımlanmaktadır <sup>(14)</sup>.



**Şekil 3-5: Enjekte edilecek sperm kalitelerinin MSOME değerlendirilmesi (x8050) (Fotoğraflar Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).**

### 3.5. Folikül Aspirasyonu, Denüstasyon ve ICSI

Aspire edilen foliküllerden elde edilen kümülüs oosit kompleksleri insan tuba sıvısında (HTF; Life Global®, Seattle, ABD) yıkanıp 3.5 saat %6 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde bekletildiler. Bu sürenin sonunda, denüstasyon işlemi, HTF içerisine 40 IU/ ml yoğunluğunda hazırlanan hiyaluronidaz enzim (Life Global®, Seattle, ABD) solüsyonu ile mekanik pipetleme ile gerçekleştirildi.

Bu işlem sonrasında, oositlere 30 dakikalık bir dinlenme süresi tanındı. OPU işleminden dört saat sonra mikroenjeksiyon işlemi, x400 büyütmede Olympus IX70, Olympus IX71 inverted mikroskoplar kullanılarak HEPES (Life Global®, Seattle, ABD) içeren HTF mediumu içerisinde yapıldı. Enjeksiyonu tamamlanmış oositler minimum dört saat evvelinden %6 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve 37°C'de önceden inkübe edilmiş özel kaplara (EmbryoSlide®, Unisense Fertilitatech, Aarhus, Danimarka) alındılar (Şekil 3-5).



Şekil 3-6: Oniki embriyonun konulabildiği EmbryoSlide® kabının görüntüsü.

### 3.6. Embriyo Kültürü ve İnkübasyonu

EmbryoSlide™ kabının her bir kuyusu 25 µl hacminde ve %10 oranında plasmanat (Life Global®, Seattle, ABD) protein takviyesi içeren tek

adımlı embriyo kültür sıvısıyla (Life Global®, Seattle, ABD) dolduruldu ve 12 kuyucuğun üzeri 1.5 ml parafin yağı ile (LifeGlobal®, Seattle, ABD) örtüldü.

ICSI sonrasında, enjekte edilmiş oositler her kuyunun içerisindeki kuyucuğa bırakılıp SEİS'e yüklendi (EmbryoScope™, Unisense Fertilitech, Aarhus, Danimarka) (Şekil 3-6).



**Şekil 3-7: EmbryoSlide® kabının beş numaralı kuyusu ve kuyucuğu.**

EmbryoScope® inkübatörünün ortamı %6 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve 37°C'ye ayarlıdır. Embriyolar bu ortamda transfere kadar beş gün kültüre edildiler. Kültür sıvısı ve yağı embriyo gelişiminin üçüncü gününde, öğleden sonra, yukarıda hazırlığı anlatılmış ve önceden inkübe edilmiş yeni bir EmbryoSlide®'a yüklenerek değiştirildi.

Embriyolardan elde edilen fotoğraflar otomatik olarak EmbryoScope® cihazı tarafından yedi farklı fokal düzlemde her 20 dakikada bir çekildi. Bu veriler sürekli eksternal bir bilgisayara EmbryoViewer® (Unisense Fertilitech, Aarhus, Danimarka) aktarıldı. Embriyo gelişimi bu özellikten faydalanılarak görüntüleri ileri ve geri sararak detaylı olarak not edildi.

### 3.7. SEİS'te Değerlendirme ve Embriyo Sınıflandırması

Tüm embriyo gelişim zamanları (döllenme, klivajlar, morula ve blastosist oluşumu) günlük olarak takip edildi ve ilk klivaj yani iki blastomere bölünme zamanı t2, üç blastomere bölünme zamanı t3 olarak, ve sırasıyla t4, t5, t6, t7, t8, t9+ zamanları EmbryoViewer®'a kaydedildi. Morula ve blastosist oluşumu da sırasıyla tM ve tB şeklinde not edildi. Tüm mitotik bölünme zamanları ICSI sonrası saat birimiyle verildi. Blastosistler Gardner'a göre ICSI sonrası 114-120. saatte değerlendirildi.

### 3.8. Embriyo Transferi

Transfere, kadın yaşına ve deneme sayısına göre 6 Mart 2010 tarihli ÜYTE yönetmeliğine uygun olarak bir ya da iki blastosist seçildi. Otuz beş yaş altı kadınlara bir ya da hiç denemesi olamaması durumunda tek embriyo transferi, 35 yaş üstü ve en az iki denemesi olan 35 yaş altı kadınlara çift embriyo transferi uygulandı. Blastosistlerin transfere seçimi son morfolojilerine, iki ve dört hücreli evrelerde multinükleasyon ve direkt klivaj bulgusu olmamasına göre gerçekleştirildi.

### 3.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler öncelikle EmbryoViewer® bilgisayarına otomatik olarak kaydedildi ve buradan analiz için Microsoft Excel'e aktarıldı.

İstatistiksel incelemede değişkenlerin kategorilerini oluşturmak amacıyla ortanca değer eşik olarak kabul edildi. Bu yöntemle elde edilen kategorik veriler *Fisher's Exact test* ile değerlendirildi. Sürekli değişkenlerdeki istatistiksel anlamlı farklılık, uygun oldukları durumlarda *Student's T* ve *Mann-Whitney U* testi kullanılarak incelendi. İstatistiksel anlamlılık eşiği olarak p

değeri 0.05'ten küçük kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler için *SPSS 15* (*SPSS Inc., Chicago, IL*) ve *Excel 2007* (*Microsoft Inc., California, SA*) programları kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. IMSI'de Sperm Değerlendirilmesine Göre Hasta Özellikleri

Tez çalışmamız toplam 858 infertil çiftten oluşmaktadır. Bunların, 658'inin grade I ve/veya II, 200'ünün ise grade III ve/ veya IV spermi bulunmaktadır (Tablo 4-1). Değerlendirilen bir çok klinik parametre göz önünde bulundurulduğunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 4-1).

**Tablo 4-1: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre hasta özellikleri**

n=858	Grade I + II (n=658)		Grade III + IV (n=200)		p
	Ortalama	SD	Ortalama	SD	
<b>Kadın yaşı</b>	33.685	5.2299	33.030	5.4237	0.13
<b>Kadın BMI</b>	24.419	6.6056	23.807	6.7164	0.40
<b>Önceki deneme sayısı (n)</b>	1.354	1.3461	1.465	1.3371	0.15
<b>Erkek yaşı</b>	37.248	9.0882	36.700	5.9521	0.62
<b>Oosit (n)</b>	9.567	6.1577	9.285	5.2259	0.92
<b>Metafaz II (n)</b>	7.377	4.5548	7.440	4.3533	0.60

\*İstatistiksel analizler Mann Whitney U ve Student's t-testi kullanılarak yapılmıştır.



## 4.2. IMSI'de Sperm Değerlendirilmesine Göre Embriyo Kinetiği

Aynı gruplar embriyo gelişimi açısından değerlendirildiğinde, grade I+II kolunda 4032, grade III+IV kolunda ise 1267 embriyo çalışmaya dahil edildi (Tablo 4-2).

**Tablo 4-2: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre embriyo kinetiği**

Zaman (saat)	Grade I + II (n=4032)		Grade III + IV (n=1267)		p
	Ortalama	Ortanca	Ortalama	Ortanca	
t2	28.45±5.94	27.33	29.17±7.06	27.50	<b>0.043</b>
t3	38.00±6.51	37.62	38.36±7.02	37.81	0.404
t4	40.31±6.97	39.33	40.70±6.98	39.54	0.099
t5	50.21±9.02	49.92	50.38±8.74	50.37	0.210
t8	60.41±10.29	58.69	60.63±10.35	58.86	0.671
t9	70.92±10.31	70.26	71.19±9.99	70.05	0.482
tM	86.54±10.74	86.43	87.68±10.02	87.52	<b>0.025</b>
tSB	96.79±8.59	96.78	97.42±8.77	96.31	0.533
tB	104.84±6.52	104.77	105.66±8.02	105.81	0.088
tEB	110.85±7.11	110.66	111.84±6.84	112.11	<b>0.009</b>
cc2 = t3 - t2	<b>9.69±</b>	<b>11.25</b>	<b>9.34±</b>	<b>11.01</b>	<b>0.103</b>
cc3 = t5 - t3	<b>12.46±</b>	<b>13.00</b>	<b>12.37±</b>	<b>13.03</b>	<b>0.629</b>

\*İstatistiksel analizler Mann Whitney U ve Student's t-testi kullanılarak yapılmıştır.

Embriyo gelişim zamanları (kinetiği), iki hücreye ulaşma zamanı (t2), morulaya ulaşma zamanı (tM) ve blastosistin genişleme zamanı (tEB) için grade I+II ve grade III+IV spermi olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi (Tablo 4-2).

### 4.3. İkinci Embriyonik Hücre Döngüsünün İmplantasyona Yönelik Değerlendirilmesi

Ön analiz sonucunda implantasyona yönelik bir değerlendirme yapıldı. İki hücreye bölünme zamanı (t2) olan ve grade I ve/ veya II spermilerden gelişmiş toplam 4032 embriyonun 687 KID embriyosu oluşturduğu tespit edildi. Aynı şekilde, grade III ve/ veya IV spermilerden gelişen ve t2 zamanı olan toplam 1267 embriyonun 246 KID embriyosu oluşturduğu görüldü.

**Tablo 4-3: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre ikinci embriyonik hücre döngüsünün (cc2=t3-t2) değerlendirilmesi**

$5 \leq (t3 - t2) \leq 11.2s$			
	KID=0	KID=1	KID % (p= 0.035)
Grade I + II	164	68	29.31
Grade III + IV	44	33	42.86

\*İstatistiksel analizler Fisher's Exact test kullanılarak yapılmıştır.

Öncelikle ikinci embriyonik hücre döngüsü zamanı ( $cc2=t3-t2$ ) 5-11.2 saat aralığı olarak alındı ve grade I+II sperm grubundan gelişen embriyoların %29.31'inin klinik gebelik oluşturduğu görüldü (KID). Ancak, grade III+IV sperm grubuna bakıldığında, bu zaman aralığındaki %42.86 embriyonun klinik gebelik oluşturduğu bulundu (Tablo 4-3) (KID).

İkinci embriyonik hücre döngüsü zamanı ( $cc2=t3-t2$ ) 11.2 saat üzeri aralığında alındığında, grade I+II ve grade III+IV sperm gruplarından gelişen embriyoların bilinen klinik gebeliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 4-4).

**Tablo 4-4: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre ikinci embriyonik hücre döngüsünün ( $cc2 = (t3-t2) > 11.2s$ ) değerlendirilmesi**

$(t3 - t2) > 11.2s$			
	KID=0	KID=1	KID % (p= 0.42)
Grade I + II	289	90	23.75
Grade III + IV	104	39	27.27

\*İstatistiksel analizler Fisher's Exact test kullanılarak yapılmıştır.

#### **4.4. Üçüncü Embriyonik Hücre Döngüsünün İmplantasyona Yönelik Değerlendirilmesi**

Tüm sperm grupları alındığında, üçüncü embriyonik hücre döngüsünün 13 saat ve altı ya da üstü için anlamlı bir fark göstermediği görüldü (Tablo 4-5).

**Tablo 4-5: Üçüncü embriyonik hücre döngüsünün (cc3=t5-t3) değerlendirilmesi**

<b>Tüm sperm grupları</b>			
<b>(t5 – t3)</b>	<b>KID=0</b>	<b>KID=1</b>	<b>KID % (p= 0.3618)</b>
<b>≤ 13s</b>	328	100	<b>23.36</b>
<b>&gt; 13s</b>	373	132	<b>26.14</b>

\*İstatistiksel analizler Fisher's Exact test kullanılarak yapılmıştır.

Sperm IMSI gruplarına göre ayrıldığında (Grade I+II ve Grade III+IV), üçüncü embriyonik hücre döngüsünün 13 saat ve altı için anlamlı bir fark göstermediği görüldü (Tablo 4-6).

**Tablo 4-6: IMSI'de sperm değerlendirilmesine göre üçüncü embriyonik hücre döngüsünün (cc3=t5-t3) 13 saat ve altı için değerlendirilmesi**

<b>(t5 – t3) ≤ 13s</b>			
	<b>KID=0</b>	<b>KID=1</b>	<b>KID % (p= 0.5913)</b>
<b>Grade I + II</b>	250	79	<b>24.01</b>
<b>Grade III + IV</b>	78	21	<b>21.21</b>

\*İstatistiksel analizler Fisher's Exact test kullanılarak yapılmıştır.

Sperm IMSI gruplarına göre ayrıldığında (Grade I+II ve Grade III+IV), üçüncü embriyonik hücre döngüsünün 13 saat üstü için anlamlı bir fark gösterdiği görüldü (Tablo 4-7).

**Tablo 4-7: IMSI’de sperm değerlendirilmesine göre üçüncü embriyonik hücre döngüsünün (cc3=t5-t3) 13 saat üstü için değerlendirilmesi**

<b>(t5 – t3) &gt; 13s</b>			
	KID=0	KID=1	<b>KID % (p= 0.0072)</b>
<b>Grade I + II</b>	277	81	<b>22.63</b>
<b>Grade III + IV</b>	96	51	<b>34.69</b>

\*İstatistiksel analizler Fisher’s Exact test kullanılarak yapılmıştır.

Sadece grade III ve IV spermler değerlendirildiğinde ise, üçüncü embriyonik hücre döngüsünün 13 saat altı ve üstü için anlamlı bir fark oluşturduğu bulundu (Tablo 4-8). Üçüncü embriyonik hücre döngüsü 13 saat üzerinde olan embriyoların bilinen klinik gebelik oranı %34.69 iken, 13 saat ve altı için bu oran %21.21’de kaldı (Tablo 4-8).

**Tablo 4-8: IMSI’de grade III + IV sperm için üçüncü embriyonik hücre döngüsünün (cc3=t5-t3) 13 saat altı ve üstü için değerlendirilmesi**

<b>Grade III + IV</b>			
	KID=0	KID=1	<b>KID % (p= 0.032)</b>
<b>(t5 – t3) ≤ 13s</b>	78	21	<b>21.21</b>
<b>(t5 – t3) &gt; 13s</b>	96	51	<b>34.69</b>

\*İstatistiksel analizler Fisher’s Exact test kullanılarak yapılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Yakın zamana kadar insan embriyoları klinik ortamda sadece morfolojik olarak değerlendirilebilmekteydi. Ancak, bu değerlendirme gözleme dayalı olduğu için hem kişiler arası, hem de aynı kişinin farklı zamanlarda yapacağı gözlemler arası değişkenliklere açıktır. İnsan embriyolarının metabolizmalarına göre, glukoz ya da oksijen kullanım hızlarına göre değerlendirilebilmeleri gelecek için büyük umut vaat etmesine rağmen, günümüzde henüz klinik kullanıma uygun değildir (40-41).

Dolayısıyla, sürekli embriyo izleme sistemleri (SEİS) rutin bir tüp bebek laboratuvarında kullanılabilecek ve rahatça uygulanabilecek yeni bir embriyo değerlendirme sistemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Döllenen blastosist oluşum zamanına kadar yüksek çözünürlükte elde edilen görüntüler insan embriyosunun ilk mitoz bölünmeleriyle alakalı pek çok değerli bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Ayrıca, transfer gününe kadar geçen zaman zarfında gelişmekte olan embriyoları bölünürken seyredilebilir ve onların her bir mitoz zamanını kaydetmek hiç şüphe yok ki transfer için embriyo seçim kriterlerini de değiştirmiştir.

SEİS'ler kullanılarak oluşturulan algoritmalar tüp bebek ve embriyoloji camiasında hem heyecanla karşılanmış, hem de klinikteki uygulanabilirliği de göstermiştir. Bu çalışmalar aynı zamanda insan embriyosunda mitoz bölünme zamanlarının implantasyon açısından da çok büyük önem arz ettiğini kanıtlamıştır (3-7). Bunun yanında, Meseguer tarafından 2011 yılında gerçekleştirilen çalışma, her hastanın her embriyosu için tüm bölünme zamanlarının işaretlenmesiyle elde edilen karmaşık ve uzun verinin çeyrek dilimler kullanılarak çalışılıp değerlendirilebileceğini de göstermesi açısından çok kıymetli olmuştur. Bu araştırma, insan embriyolarının implantasyon şansını var ya da yok olarak değerlendirmek

yerine, mitoz bölünme zamanlarının dört çeyrek grup olarak incelenmesi halinde, ilk ve son çeyrek aralığında kademeli bir artışın var olduğunu göstermiştir <sup>(7)</sup>.

Ayrıca, insan embriyosunun mitoz bölünme zamanları kontrollü ovaryen stimülasyon protokollerinden, embriyo kültür sıvılarından (tek ya da çift adımlı) ve embriyo kültür koşullarından (düşük, %5 ya da yüksek, %20 oranında oksijen kullanımı) etkilendiği çeşitli yayınlarda gösterilmiştir <sup>(9-10-11)</sup>. Dolayısıyla, bu model tüp bebek laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılamamış ve SEİS'leri kullanan ve kendi klinik ortamlarında blastosist ve/ veya implantasyon tahmini yapmak isteyen her embriyoloji birimi için bir başlangıç noktası olmuştur <sup>(42)</sup>.

Tüp bebek merkezlerinin farklı yaş gruplarından çok farklı infertilite nedenleriyle müracaat eden çiftleri kabul ettikleri düşünüldüğünde uygulanabilirliği yüksek bir model oluşturma amacını karşılamak için merkezimize başvurmuş, IMSI uygulanmış ve tedavilerinde embriyoları SEİS'te takip edilmiş tüm infertil olgular çalışma döneminizde retrospektif olarak değerlendirilmiş, hasta seçimi yapılmamıştır. Sadece preimplantasyon genetik tanı (PGT) yaptıran hastalar, embriyolarının kültürü esnasında bir hücrenin alınması ile müdahaleye maruz kaldıkları için bu araştırmaya dahil edilmemişlerdir (Tablo 4-1).

Sperm başı içerisindeki genetik materyali içeren çekirdek kısmında bulunan vakuoller (sıvı dolu kesecikler), DNA yapısında hasar bulunabileceği konusunda ipucu vermektedir. Sperm DNA yapısındaki hasarlar, dölleme başarısızlığı, embriyo gelişiminin durması, kötü ve/ veya yavaş embriyo gelişimi gibi problemlere sebep olabilmekte ve dolayısıyla gebelik şansını olumsuz etkilemektedir. Ayrıca, spermatozoa hücresindeki vakuol sayısı ve oranının embriyo gelişimi ve implantasyon üzerine etkisini geniş bir popülasyonda gerçekleştirmiş araştırma bulunmamaktadır.

Teratozoospermi sebebiyle IMSI uygulanmış, SEİS'te inkübe edilmiş ve sadece 10 infertil çiftin dahil edildiği prospektif bir çalışma 2012 yılında yayınlanmıştır <sup>(43)</sup>. Bu araştırmada grade I spermi olan olguların embriyoları dört hücreli aşamaya grade IV spermelerden gelişmiş embriyolara nazaran daha erken ulaştığı görülmüştür. Ayrıca, tüm blastosist evreleri için zamanlamalar grade I spermden gelişen embriyolar için grade IV'ten oluşana kıyasla daha erken gerçekleştiği bulunmuştur. Toplam 858 hasta ve 5299 embriyo içeren tez çalışmamız kapsamında da iki hücreye ulaşma zamanının iki grup arasında farklı ve vakuol içermeyen spermelerde daha erken olduğu görüldü (Tablo 4-2). Araştırmamızda ek olarak morula ve blastosistin genişleme evrelerinin de vakuol içermeyen spermelerden gelişen embriyolarda daha erken olduğu tespit edildi (Tablo 4-2). Ancak, bu gibi kesin zamanların embriyo seçimi açısından yukarıda bahsedilen laboratuvarlar arası varyasyonlardan dolayı rutinde uygulanabilirliği olmamaktadır.

Dolayısıyla, çalışmamızın amacı, morfokinetik parametreler kullanarak retrospektif olarak vakuolizasyon oranı yüksek insan spermatozoa hücrelerinin embriyonik hücre döngülerine ve implantasyona etkisi olarak belirlendi. Bu bağlamda, tez çalışmamız kapsamında, ikinci ve üçüncü embriyonik hücre döngüleri (sırasıyla,  $cc2=t3-t2$  ve  $cc3=t5-t3$ ) sperm vakuolizasyon derecesi göz önünde bulundurularak değerlendirildi ve ilişkili bulundu.

İkinci embriyonik hücre döngüsünün ortanca değeri, IMSI grade I-II ve grade III-IV spermeler karşılaştırıldığında 11.2 saat olarak bulundu (Tablo 4-2). Bu eşik değerden yola çıkarak bir alt analiz yapıldı ve  $t3-t2$  zaman aralığı 5 ila 11.2 saat olan ve IMSI grade I-II ya da grade III-IV spermelerden oluşan embriyoların bilinen implantasyon oranının (KID %) 1.46 kat fazla olduğu görüldü (sırasıyla, %29.31 ve %42.86;  $p=0.035$ ) (Tablo 4-3). Ayrıca, ikinci embriyonik hücre döngüsünün kısa olduğu (5-11.2 saat) grade III-IV spermi olan vakalarda KID oranının uzun  $cc2$ 'si olanlara kıyasla ( $>11.2$



saat) 1.57 kat arttığı gözlemlendi (sırasıyla, %42.86 ve %27.27; p=0.023) (Tablo 4-4).

Ayrıca, üçüncü embriyonik hücre döngüsünü tarif eden t5-t3 zaman aralığı, dört hücre aşamasından sekiz hücre aşamasına geçişte kullanılacak olan DNA'nın kopyalama zamanına eş değerdir. Bu replikasyon zamanı grade III-IV spermilerden oluşmuş ve implante olmuş embriyolarda istatistiksel anlamlı olarak daha uzun bulundu ve 1.63 katlık bir fark hesaplandı; (t5 – t3) ≤ 13s KID: %21.2; (t5 – t3) > 13s KID: %34.69 (Tablo 4-8). Bu bulgu muhtemelen fragmente olmuş ya da hasar görmüş sperm DNA'sının tamirinin bir göstergesidir. Dolayısıyla, cc3 > 13s IMSI'de grade III-IV spermi olan hastaların embriyo seçiminde implantasyon olasılığı daha yüksek embriyoyu seçmek amacıyla kullanılabilir.

## 6. SONUÇ

Toplam 858 hasta ve 5299 embriyo içeren tez çalışmamız kapsamında iki hücreye ulaşma zamanının iki grup arasında farklı ve vakuol içermeyen spermelerde daha erken olduğu görüldü. Araştırmamızda ek olarak morula ve blastosistin genişleme evrelerinin de vakuol içermeyen spermelerden gelişen embriyolarda daha erken olduğu tespit edildi. Ayrıca, ikinci ve üçüncü embriyonik hücre döngüleri (sırasıyla, cc2=t3-t2 ve cc3=t5-t3) sperm vakuolizasyon derecesi göz önünde bulundurularak değerlendirildi ve ilişkili bulundu. Cc2=t3-t2 zaman aralığı 5 ila 11.2 saat olan ve IMSI grade I-II ya da grade III-IV spermelerden oluşan embriyoların bilinen implantasyon oranının (KID %) 1.46 kat fazla olduğu görüldü (sırasıyla, %29.31 ve %42.86; p=0.035). Ayrıca, ikinci embriyonik hücre döngüsünün kısa olduğu (5-11.2 saat) grade III-IV spermi olan vakalarda KID oranının uzun cc2'si olanlara kıyasla (>11.2 saat) 1.57 kat arttığı gözlemlendi (sırasıyla, %42.86 ve %27.27; p=0.023). Üçüncü embriyonik hücre döngüsünü tarif eden t5-t3 zaman aralığı, dört hücre aşamasından sekiz hücre aşamasına geçişte kullanılacak olan DNA'nın kopyalama zamanına eş değerdir. Bu replikasyon zamanı grade III-IV spermelerden oluşmuş ve implante olmuş embriyolarda istatistiksel anlamlı olarak daha uzun bulundu ve 1.63 katlık bir fark hesaplandı; (t5 – t3) ≤ 13s KID: %21.2; (t5 – t3) > 13s KID: %34.69. Bu bulgu muhtemelen fragmente olmuş ya da hasar görmüş sperm DNA'sının tamirinin bir göstergesidir. Dolayısıyla, cc3 > 13s IMSI'de grade III-IV spermi olan hastaların embriyo seçiminde implantasyon olasılığı daha yüksek embriyoyu seçmek amacıyla kullanılabilir. Sonuç olarak, seçilmiş klivaj döngülerinin zamansal değerleri, bu tez araştırmamızda sonuçlarını aktardığımız retrospektif kohort çalışmamızda IMSI'de kullanılacak bir modelinin temellerini atmıştır. Tez kapsamında oluşturduğumuz model gelecekte IVF laboratuvarlarında uygulanarak embriyo seçimine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

## 7. ÖZET

### **Vakuolizasyon oranı yüksek insan spermatozoa hücrelerinin embriyonik hücre döngülerine ve implantasyona etkisi**

Tüp bebek yönteminde yumurta ve spermin bir araya getirilmesinden itibaren, döllenme ve embriyo transferi aşamasına kadar yaklaşık beş gün süren bir embriyo gelişim takip süreci söz konusudur. Bu sürede amaç, embriyoların morfolojik değerlendirilmesiyle transfer edilecek en iyi embriyoyu seçmek ve gebelik şansını arttırmaktır. Sürekli embriyo izleme sistemlerinin laboratuvarlarda kullanılması “morfokinetik” adında yeni bir alan doğurmuştur. Ayrıca, spermatozoa nukleusundaki vakuol sayısı ve oranının DNA yapısı ve olası hasarıyla ilişkisi bulunmuştur. Dolayısıyla, çalışmamızın amacı, morfokinetik parametreler kullanarak retrospektif olarak vakuolizasyon oranı yüksek insan spermatozoa hücrelerinin embriyonik hücre döngülerine ve implantasyona etkisi olarak belirlendi. Çalışmamıza toplam 858 hastanın t2 zamanı olan 5299 embriyosu dahil edildi. Grade I-II ya da grade III-IV spermlerden gelişen embriyoların cc3 için ortalama değeri 13 saat olarak belirlendi. Vakuolizasyon oranı yüksek spermlerden gelişen embriyoların ortalama değerinin altında ve üstünde implantasyon oranları değerlendirildiğinde 0s-13s ve 13s-28s aralıkları için KID oranı sırasıyla %21.21 ve %34.69 olarak bulundu. Hasta özellikleri iki grup arasında istatistiksel bir fark oluşturmadı. Üçüncü embriyonik hücre döngüsünü tarif eden t5-t3 zaman aralığı, dört hücre aşamasından sekiz hücre aşamasına geçişte kullanılacak olan DNA'nın kopyalama zamanına eş değerdir. Bu replikasyon zamanı grade III-IV spermlerden oluşmuş ve implante olmuş embriyolarda istatistiksel anlamlı olarak daha uzun bulundu. Bu bulgu muhtemelen fragmente olmuş ya da hasar görmüş sperm DNA'sının tamirinin bir göstergesidir. Dolayısıyla, cc3 > 13s IMSI'de grade III-IV spermi olan hastaların embriyo seçiminde implantasyon olasılığı daha yüksek embriyoyu seçmek amacıyla kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Sürekli izleme sistemi, morfokinetik, IMSI, cc2, cc3.

## 8. SUMMARY

### **Evaluation of human sperm cells with high degree of vacuolization regarding embryonic cell cycles and implantation**

Assisted reproductive technologies (ART) intend to fertilize two gametes and to culture the derived embryos approximately five days until transfer. During this period, the ultimate aim is to assess embryos morphologically to select the one with the highest implantation potential. The introduction of time-lapse incubators in ART laboratories has led to many publications and has inspired a new field named “morphokinetics” which enabled a new way of evaluating and selecting embryos. Moreover, presence of large vacuoles in the sperm nuclei was found to indicate possible damage to the nuclear DNA content and organization. The objective of the study was to find morphokinetic parameters affecting implantation of embryos derived from sperm with multiple vacuoles. The study included a total of 5299 embryos having a (t2) from 858 infertile patients. The median value for cc3 was determined as being 13.0h for embryos derived from either grade I-II or grade III-IV sperm. However, when implantation rates of embryos derived from grade III-IV sperm were compared for cc3 values below and above the median, a rate of 21.21% and 34.69% was found for 0h-13h and 13h-28h, respectively. Demographics were not significantly different between both groups. The time between division to 3 cells and division to 5 cells (t5-t3) corresponds to third cell cycle, thus to DNA replication to divide from a 4-cell to an 8-cell embryo. This replication is significantly longer in implanted embryos deriving from grade III-IV sperm, probably indicating correction of fragmented or damaged DNA. Thus, cc3 can be used in those patients to help the selection of the embryo with highest implantation potential.

**Keywords:** Time-lapse imaging, morphokinetics, IMSI, cc2, cc3.

## 9. KAYNAKLAR

1. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84–88.
2. Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 2000; 73: 126–129.
3. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1115–1121.
4. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012; 27: 1277-1285.
5. Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 569–573.
6. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 565–572.
7. 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.
8. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 371-381.

9. Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 891-900.
10. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril* 2013; 99: 738-744.
11. Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer, M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 168: 167-72.
12. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod.* 1994; 9(11): 2069-75.
13. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, Cassuto G, Zech NH. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17(5): 617-27.
14. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod.* 2005; 20(1):185-90.
15. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2(8085):366.
16. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340(8810):17-8.
17. Veeck L, Zaninovic N. *An Atlas of Human Blastocysts.* Taylor & Francis; 2003.

- 18.** Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 608–614.
- 19.** Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 Suppl 4: 105-114.
- 20.** Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; 26: 1270–1283.
- 21.** Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod BioMed Online*, 2011; 22: 632–646.
- 22.** Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 385-391.
- 23.** Pribensky C, Matyas S, Kovacs P, Losomczi E, Zadori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online* 2010; 21: 533–536.
- 24.** Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012; 98: 1481–1489.
- 25.** Dal Canto M, Coticchio G, Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 474–480.
- 26.** Rubio IR, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012; 98: 1458–1463.

- 27.** Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development. *Placenta* 2011; 32: 252-256.
- 28.** Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen A.L. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012; 27: 2649-2657.
- 29.** Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013; 26: 477-485.
- 30.** Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online* 2013; doi: pii: S1472-6483(13)00238-1. 10.1016/j.rbmo.2013.04.013.
- 31.** Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(5):610-6.
- 32.** Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(1):42-5.
- 33.** Franco JG Jr, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RL, Oliveira JB, Vagnini LD. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2012; 35(1):46-51.
- 34.** Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M, Selva J. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod.* 2011; 26(7):1650-8.



- 35.** Braga DP, Halpern G, Figueira Rde C, Setti AS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril.* 2012; 97(1):53-9.
- 36.** Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod.* 2011; 26(1):47-58.
- 37.** Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28(3):253-62.
- 38.** Cassuto NG, Hazout A, Hammoud I, Balet R, Bouret D, Barak Y, Jellad S, Plouchart JM, Selva J, Yazbeck C. Correlation between DNA defect and sperm-head morphology. *Reprod Biomed Online* 2012; 24(2):211-8.
- 39.** Hammoud I, Boitrelle F, Ferfourri F, Vialard F, Bergere M, Wainer B, Bailly M, Albert M, Selva J. Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. *Andrologia* 2013; 45(3):163-70.
- 40.** Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod* 2012; 26: 1981-1986.
- 41.** Tejera A, Herrero J, Vilorio T, Romero JL, Gamiz P, Meseguer M. Time-dependent O<sub>2</sub> consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil Steril* 2012; 98: 849-857.
- 42.** Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2013; doi: 10.1093/humrep/det300.

**43.** Knez K, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Developmental dynamics of IMSI-derived embryos: a time-lapse prospective study. *Reprod Biomed Online*. 2013; 27(2):161-71.

## 10. TEŞEKKÜR

Türkiye’de ilk Klinik Embriyoloji Programını kuran ve beni kabul ederek, yüksek lisansa başlamamı sağlayan Bölüm Başkanımız ve Tez Danışmanım Prof. Dr. Tülay İrez’e minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tezimin oluşturulmasındaki yardımlarından ve çalışmamın tüm aşamalarında destek, bilgi ve ilgisini benden asla esirgemeyen Şişli Memorial Hastanesi Tüp Bebek ve Üreme Genetiği Merkezi Başkanı Prof. Dr. Semra Kahraman’a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmam sırasında, kullandığım farklı tekniklerin uygulanmasında yardım almadan eminim ki çok zorlanırdım. Destekleri nedeniyle Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvar Çalışanlarına ve özellikle Hakan Yelke, Yeşim Kumtepe Çolakoğlu, Zafer Atayurt ve Semra Mılık Yıldız’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince, fikir ve önerileri ile her zaman yanımda olan ve bu zorlu dönemin her aşamasında gösterdiği ilgi, sabır ve yardımlarından dolayı Caroline Pirkevi’ye ve Dr. Murat Çetinkaya’ya teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren aileme bu süreçteki destek ve sabırları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

## 11. ETİK KURUL KARARI



SAYI :2014-66

29 Kasım 2014

Sayın Tuğba Şenel;

Yürütücü olduğunuz "**Vakuolizasyon oranı yüksek insan spermatozoa hücrelerinin embriyonik hücre döngülerine ve implantasyona etkisi**" başlıklı ve 2014-729 numaralı proje ATADEK'in 18 Kasım 2014 tarihli toplantısında görüşülmüş olup etik yönden uygun bulunmuştur.

ATADEK 2014-729 numaralı karar ekte sunulmaktadır.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "I. ULUS".

Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS  
ATADEK Başkanı

## 12. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Tuğba	<b>Soyadı</b>	Şenel
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	27.07.1986
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	42361270982
<b>Email</b>	seneltugba@gmail.com	<b>Tel</b>	0533 476 47 25

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mez. Yılı</b>
<b>Yük.Lis.</b>	Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü	2011
<b>Lisans</b>	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2008
<b>Lise</b>	Bahçelievler Süper Lisesi	2004

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>
1. Embriyolog	Şişli Memorial Hastanesi	2011 - halen

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>	<b>KPDS Puanı</b>	<b>(Diğer)</b>
<b>İngilizce</b>	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office programları	Çok iyi