

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

**İNSAN EMBRİYOSUNDA BLASTOSİST OLUŞUMU VE KALİTESİNİN
BÖLÜNME SENKRONİTESİ İLE ÖNGÖRÜLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Caroline Selma Pirkevi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tülay İrez

İSTANBUL
Şubat 2014

**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: 20/02/2014

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

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

**Prof. Dr. Özen Banu Özdaş
İstanbul Üniversitesi**

Her zaman yanımda olan Aileme ve Murat'a ithaf ediyorum

İÇİNDEKİLER

Tez Onayı	ii
İçindekiler.....	iv
Şekiller Listesi.....	viii
Tablolar Listesi.....	vi
Semboller / Kısaltmalar Listesi.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yumurta Toplama İşlemi	4
2.2. Mikroenjeksiyon Öncesi Yumurtaların Hazırlanması.....	4
2.3. In Vitro Fertilizasyon (IVF).....	5
2.4. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI).....	5
2.5. Erken ve İleri Dönem Embriyo Gelişimi.....	6
2.5.1. Pronukleus Değerlendirmesi.....	6
2.5.2. Bölünme Evresi Sınıflaması	7
2.5.3. İleri Dönem Embriyo Gelişimi.....	9
2.5.4. Blastosist Dönemi Sınıflaması	10
2.6. Embriyo Transferi.....	12
2.7. Sürekli Embriyo İzleme Sistemi'nin (SEİS) YÜT'teki Önemi.....	13
2.8. SEİS'lerde Modelleme	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Retrospektif Kohort Çalışmasının Temelleri.....	17
3.2. Çalışmaya Dahil Olan Olguların Özellikleri	19
3.3. Ovaryum Stimülasyonu ve Siklus Takibi	21
3.4. Folikül Aspirasyonu, Denüdasyon ve ICSI	23
3.5. Embriyo Kültürü ve İnkübasyonu	23

3.6. SEİS'te Değerlendirme ve Embriyo Sınıflandırması.....	25
3.7. Embriyo Transferi.....	25
3.8. İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR	31
4.1. İki Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi: KS2-8 = $((t3-t2) + (t5-t4)) / (t8-t2)$	31
4.2. Dört Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi: KS4-8 = $(t8-t5) / (t8-t4)$	32
4.3. DNA Kopyalama Sürelerinin Oranı: DK = $(t3-t2) / (t5-t3)$	32
4.4. Morfolojik Değerlendirme Dışı Bırakma Kriterleri	33
4.4.1. İki ve Dört Hücre Evrelerinde Eşit Olmayan Blastomer Varlığı.....	33
4.4.2. Direkt Klivaj Bulgusu	34
4.5. Puanlama Sistemi	34
4.6. Morfolojinin Toplam Puan ile Karşılaştırılması	36
4.7. Blastosist Oluşum ve Kalite Prediksiyon Modelinin Ön Çalışma Grubunda (%68.16) Çalışılması.....	38
4.8. Blastosist Oluşum ve Kalite Prediksiyon Modelinin Doğrulama Grubunda (%31.84) Çalışılması.....	39
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ	46
7. ÖZET	47
8. SUMMARY	48
9. KAYNAKLAR	49
10. TEŞEKKÜR	49
11. ETİK KURUL KARARI	54
12. ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: OPU işleminde folikülden aspire edilen kümülüs-oosit kompleksi ...4	4
Şekil 2-2: Denüstasyon sonrası oositler.....5	5
Şekil 2-3: İki pronukleus gözlenen normal döllenmiş zigot.....7	7
Şekil 2-4: Bölünme evresinde birinci kalite embriyolar8	8
Şekil 2-5: Dördüncü günde embriyolar9	9
Şekil 2-6: Beşinci günde blastosistler..... 11	11
Şekil 2-7: Kesintili ve kesintisiz inkübasyon: şematik görünüm 14	14
Şekil 3-1: Bir sürekli embriyo izleme sisteminin görüntüsü 17	17
Şekil 3-2: EmbryoScope® inkübatörünün iç görüntüsü..... 18	18
Şekil 3-3: EmbryoScope® inkübatörüne bağlı ekran (EmbryoViewer®) 19	19
Şekil 3-4: <i>Known implantation data (KID)</i> kavramının şematik anlatımı22	22
Şekil 3-5: Oniki embriyonun konulabildiği EmbryoSlide® kabının görüntüsü .23	23
Şekil 3-6: EmbryoSlide® kabının beş numaralı kuyusu ve kuyucuğu24	24
Şekil 3-7: Birinci denklemin şematik görüntüsü.....26	26
Şekil 3-8: Çalışma planı30	30
Şekil 4-1: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun birinci denklemden aldıkları puanlara göre %10'luk grup dağılımları31	31
Şekil 4-2: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun ikinci denklemden aldıkları puanlara göre %10'luk grup dağılımları32	32
Şekil 4-3: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun üçüncü denklemden aldıkları puanlara göre %10'luk grup dağılımları33	33
Şekil 4-4: Birinci denklem sonucunda embriyoların %10'luk grup dağılımlarına göre puanlanması.....35	35

Şekil 4-5: Embriyo gelişiminin üçüncü gününde modelden elde edilen toplam puanın beşinci gün blastosist kalitesiyle karşılaştırılması	37
Şekil 4-6: Embriyonun beşinci gündeki kalitesiyle üçüncü günde modelden elde edilen toplam puanın karşılaştırılması	38
Şekil 4-7: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun beş denklemin sonucunda aldıkları toplam puanlara göre %10'luk grup dağılımları	39
Şekil 4-8: Doğrulama çalışmasına dahil olan 368 embriyonun beş denklemin sonucunda aldıkları toplam puanlara göre %20'lik grup dağılımları	40

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bölünme evresinde embriyo sınıflaması	8
Tablo 2-2: Embriyo gelişiminin dördüncü gününde sınıflama.....	10
Tablo 2-3: Blastosist gelişim seviyesi skorlaması	11
Tablo 2-4: İç hücre kitesi skorlaması.....	12
Tablo 2-5: Dış hücre kitesi (trofektoderm) skorlaması.....	12
Tablo 3-1: Çalışmaya dahil olan 190 hastanın özellikleri	21
Tablo 4-1: Blastosist kalitesinin iki ve dört hücre evrelerindeki eşit ya da eşit olmayan blastomer boyutlarına göre karşılaştırması.....	34

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH: *array Comparative Genomic Hybridization*

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

CI: *Confidence Interval*, Güven Aralığı

DK: DNA kopyalama sürelerinin oranı

EİB: En iyi kalite blastosist

GDE: Gelişimini durdurmuş embriyo

GnRH: *Gonadotropin Releasing Hormone*, Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

hCG: *human Chorionic Gonadotropin*, insan Korionik Gonadotropin

HTF: *Human Tubal Fluid*, İnsan Tuba Sıvısı

İB: İyi kalite blastosist

ICSI: *IntraCytoplasmic Sperm Injection*, IntraSitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IVF: In Vitro Fertilizasyon

KB: Kötü kalite blastosist

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

KS2-8: İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi

KS4-8: Dört hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi

OPU: *Oocyte Pick-Up*, Yumurta toplama

PGT: Preimplantasyon Genetik Tanı

PN: Pronukleus

rFSH: rekombinant Folikül Stimüle edici Hormon

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

SEİS: Sürekli Embriyo İzleme Sistemi

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

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

YÜT: Yardımla Üreme Teknikleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğal siklusta ovülasyon sonrası yumurtanın sperm tarafından döllenmesi ve embriyoya dönüşmesi tuba uterinada gerçekleşmektedir. Embriyo, döllenme sonrası rahim duvarına tutunmasına kadar geçen süre zarfında tuba 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 abort (düşük) oranlarına ulaşılmasını sağlamaktadır ⁽¹⁻²⁾. 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 ⁽³⁻⁴⁾. 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 ön ayak olmuştur.

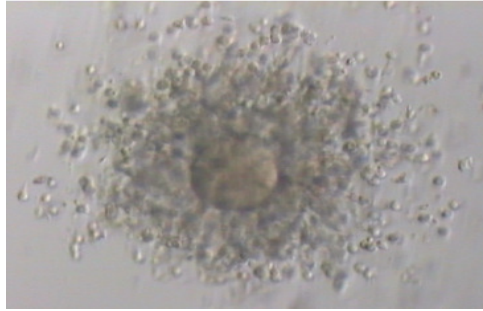
Bunun yanında, SEİS’lerin güvenilirliği bir çok çalışmada gösterilmiştir ⁽⁵⁻⁶⁾. Üçüncü gün transfer edilen 247 embriyoda yapılan retrospektif bir çalışmada oluşturulan implantasyon predikasyon modelinde beş hücreye ulaşma zamanı, üç hücreden dört hücreye geçiş zamanı ve iki hücreden üç hücreye geçiş zamanı en önemli üç parametre olarak belirlenmiştir ⁽⁷⁾. Bu model blastosist oluşumu ve kalitesi ile de ilişkilendirilmiştir ⁽⁸⁾. 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 ⁽⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁾.

Dolayısıyla, bu tez çalışmamızın amacı, kendi IVF laboratuvarımızın koşullarına uygun ve embriyo gelişiminin üçüncü gününe kadar toplanan morfokinetik verilerin retrospektif değerlendirilmesiyle blastosist oluşum ve kalite predikasyon modeli oluşturmaktır.

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 (Denüdasyon 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 ⁽¹²⁾. 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 (13). 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 görümlü 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. 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.

2.5.1. Pronukleus Değerlendirmesi

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 pronukleus 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).

2.5.2. Bölünme Evresi Sınıflaması

Dölenen bir yumurta yaklaşık 25-30 saat sonra ilk mitotik bölünmeye başlayarak iki hücreli bir embriyo oluşturmaktadır. Bu dönemden itibaren embriyoların değerlendirmesi; blastomerlerin şekli ve boyutu, blastomerler arası fragmentasyon derecesi, blastomerlerdeki nukleus sayısı (mültinükleasyon), sitoplazmik görünüm ve erken birleşme gibi parametreler dikkate alınarak yapılır ⁽¹⁴⁾.

Bölünme hızına göre embriyonun sahip olduğu blastomer sayısı şayet günün beklenen limitleri 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 değerlendirmesine göre eşit büyüklükte blastomer yapısına sahip olan, % 0-5 arasında fragmentasyon 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 ⁽¹⁴⁾

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

2.5.3. 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 grubunu (trofektoderm, dış hücre kütlesi ve inner cell mass, iç hücre kütlesi) oluşturacaktır. Dördüncü gün embriyolarının kalite değerlendirmesi aşağıdaki gibi yapılmaktadır (Tablo 2-2) ⁽¹⁴⁾.



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

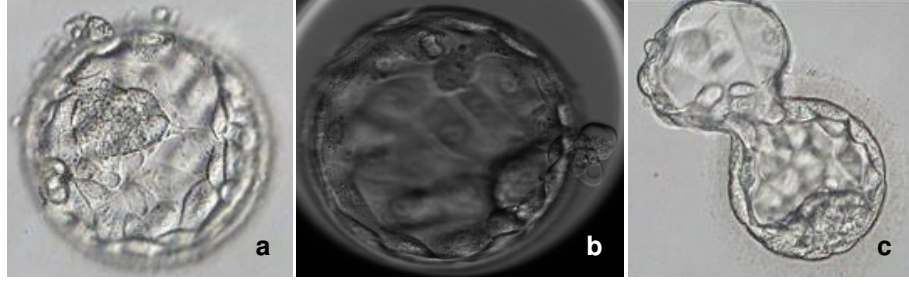
Tablo 2-2: Embriyo gelişiminin dördüncü gününde sınıflama ⁽¹⁴⁾

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

2.5.4. 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 skora sisteminde her bir embriyoya aşağıdaki kriterlere göre üç ayrı skor verilir; blastosist gelişim seviyesi (kavitasyonun başlangıcından tomurcuklanmaya kadar), iç hücre kitlesi kalitesi ve dış hücre kitlesi kalitesi (Tablo 2-3, Tablo 2-4, Tablo 2-5) ⁽¹⁾.



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 ⁽¹⁾

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 ⁽¹⁾

-
- | | |
|---|---------------------------------------|
| 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 ⁽¹⁾

-
- | | |
|---|---|
| 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 |
-

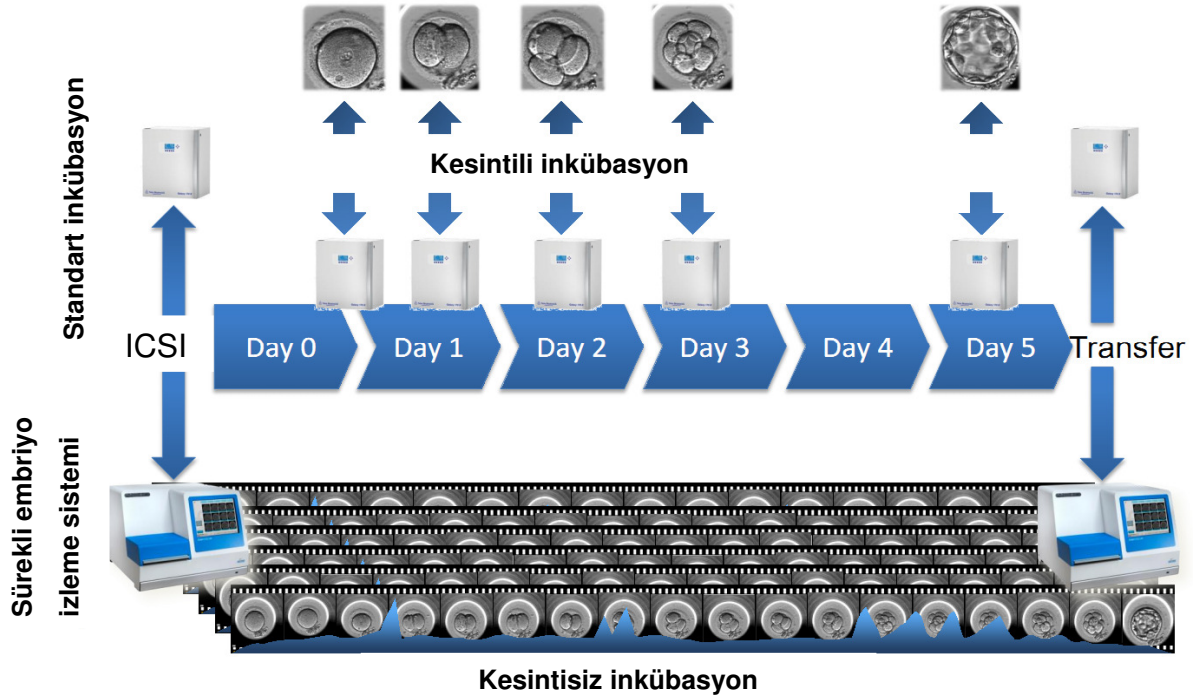
2.6. Embriyo Transferi

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.

2.7. 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 tranfer edilmesi hem yüksek implantasyon, hem de azalan abort (düşük) oranları sağlamaktadır ⁽¹⁻²⁻¹⁵⁻¹⁶⁾. 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 kriterler ortaya konmaya çalışılmıştır ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

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 ⁽³⁻⁴⁻¹⁹⁻²⁰⁾. 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 değerlendirmesi 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⁾.

2.8. SEİS'lerde Modelleme

SEİS'te inkübe edilen ve embriyo gelişiminin üçüncü gününde transfer edilen 247 embriyonun morfokinetik verilerinin retrospektif değerlendirmesi sonucunda implantasyon ile ilişkilendirilen hiyerarşik bir model oluşturulması sağlanmıştır ⁽⁷⁾. 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 ⁽⁸⁾. Araştırmacılar retrospektif çok merkezli kohort çalışmasında embriyoların SEİS'te gelişmesi ve seçilmesi halinde klinik gebelik oranındaki artışın %9 olacağını göstermişlerdir ⁽²¹⁾.

Dal Canto ve arkadaşları ⁽²²⁾ 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 ⁽²²⁾. 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 incelemesini 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 ⁽²³⁾.

Ayrıca, SEİS'ler PN morfolojilerinin değişkenliğini de göstermiş ve PN değerlendirmesine göre yapılan embriyo seçiminin yanıltıcı olabileceğine dikkat çekmiştir ⁽²⁴⁾. Ancak PN'lerin silinme zamanının implantasyona yönelik önemli bir bulgu olduğu bir çalışmada gösterilmiş ve 20.45 saatin altında canlı doğum olmadığı bildirilmiştir ⁽²⁵⁾.

Embriyonun ploidi yönünden tanımlanması son yıllarda yaşanan teknolojik gelişmeler ile kolaylaşmış ve "*array Comparative Genomic Hybridization*" (aCGH), "*Single Nucleotide Polymorphism*" (SNP) microarray gibi platformlar morfolojik 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 ⁽²⁶⁾. 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 ⁽²⁷⁾.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Retrospektif Kohort Çalışmasının Temelleri

Çalışmamız için İstanbul Acıbadem Üniversitesi'nin Tıbbi Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu'ndan gerekli etik kurul onayı alındı (Konu: ATADEK 2013-518, Sayı: B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/1955).

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 iki adet SEİS (EmbryoScope®) bulunmaktadır. Bu sistemde kültüre edilen embriyoları IVF Klinik Doktorları ya da Embriyologlar infertil çiftin özelliklerine göre değerlendirip seçmektedirler ve bu işlem için ek ücret alınmamaktadır. 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).



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

Çalışmamız kapsamında geriye yönelik bu verileri inceleyerek bölünme zamanları ve bunlar arasındaki oransal ilişkiyi blastosist oluşum ve kalitesi tahmini için kullandık. Dolayısıyla hiç bir hastanın tedavi süreci etkilenmedi, embriyolarına herhangi invazif bir işlem uygulanmadı ve sadece veritabanımızdaki embriyo kayıtları istatistiksel yöntemlerle incelenerek laboratuvarımıza özgü bir model oluşturuldu. Araştırmaya dahil olan hastalarda aranan tek şart IVF uygulamalarını Şişli Memorial Hastanesi'nde yaptırmış olmaları, embriyolarının SEİS'te (EmbryoScope®) takip edilmiş ve embriyo gelişiminin beşinci gününde transfer uygulanmış olmasıdır. Sadece preimplantasyon genetik tanı (PGT) yaptıran hastalar, embriyolarının kültürü esnasında bir hücrenin alınması ile müdahaleye maruz kaldıkları için bu araştırmaya dahil edilmemişlerdir.

3.2. Çalışmaya Dahil Olan Olguların Özellikleri

Bu çalışma Şişli Memorial Hastane'si Tüp Bebek Laboratuvarı'nda Ekim 2011-Ocak 2013 dönemine ait morfokinetik verilerin retrospektif incelemesini içermektedir. Araştırma 6 Mart 2010 tarihli ÜYTE

yönetmeliğine uygun olarak, Şişli Memorial Hastanesi'nin etik kurul onayını da alarak gerçekleştirildi.

Sunulan retrospektif gözlemsel kohort çalışması blastosist transferi uygulanmış ve çeşitli infertilite sebeplerinden dolayı merkezimize müracaat etmiş toplam 190 hastanın 192 siklus verisini içermektedir (Tablo 3-1). Daha detaylı bakacak olursak, çalışma 1777 metafaz II oosit ve 1546 döllenmiş zigot içermektedir. PGT yapılmış vakalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Vakaların tüm oositleri ICSI yöntemiyle döllenmiş olup, bunlardan gelişen embriyolar bir SEİS olan EmbryoScope™ inkübatöründe (Unisense Fertilitech, Aarhus, Danimarka) takip edilip standart YÜT uygulamasına tabii tutulmuşlardır.

Tablo 3-1: Çalışmaya dahil olan 190 hastanın özellikleri. Sayılar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Kadın yaşı	31.72 \pm 4.48
Vücut kitle indeksi (kg/m²)	24.48 \pm 6.23
Önceki deneme sayısı	1.67 \pm 1.84
Toplanan oosit sayısı	11.42 \pm 4.30
Metafaz II oosit sayısı	9.25 \pm 3.44

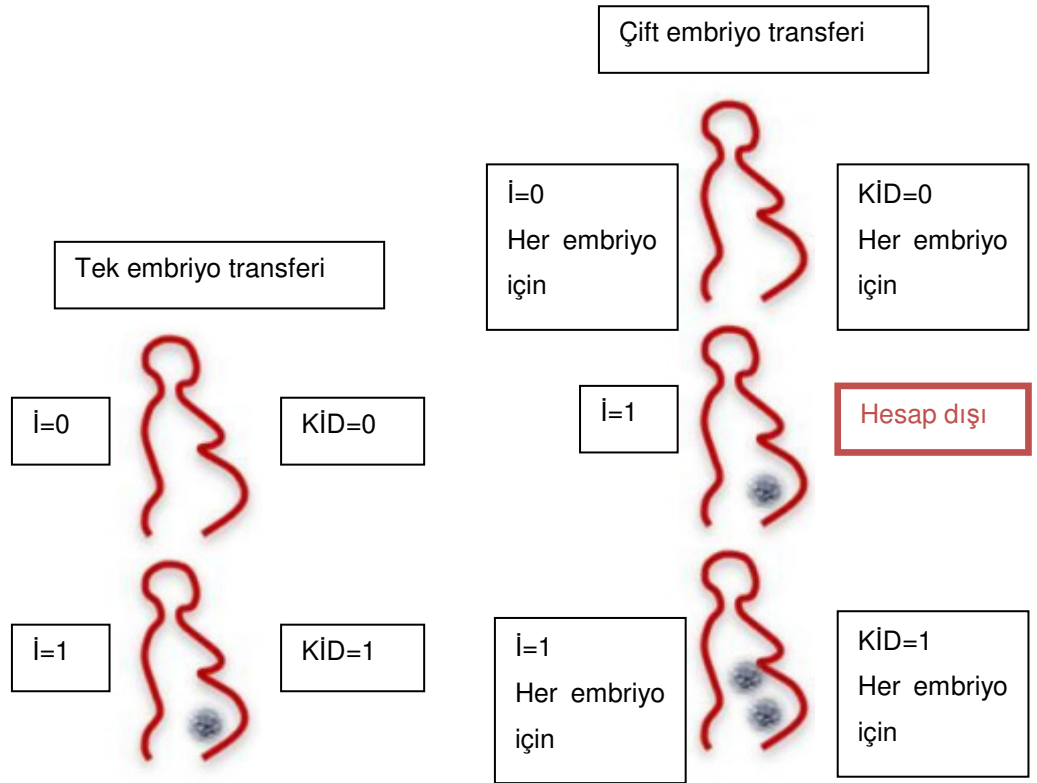
3.3. Ovaryum Stimülasyonu ve Siklus Takibi

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) antagonist (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) 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 tatbik edildi (Progynex™; Farmako-Koçak, Türkiye). Bu süre sonunda implantasyonun gerçekleşmesi halinde intravajinal progesteron gel 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. 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 CO₂, %5 O₂ 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 CO₂, %5 O₂ ve 37°C'de önceden inkübe edilmiş özel kaplara (EmbryoSlide[®], Unisense Fertilitech, Aarhus, Danimarka) alındılar (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: Oniki embriyonun konulabildiği EmbryoSlide[®] kabının görüntüsü.

3.5. 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 3-6: EmbryoSlide[®] kabının beş numaralı kuyusu ve kuyucuğu.

EmbryoScope[®] inkübatörünün ortamı %6 CO₂, %5 O₂ 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.

3.6. 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 değerlendirilip üç alt gruba sınıflandırıldılar: en iyi kalite blastosist (EİB), iyi kalite blastosist (İB) ve kötü kalite blastosist (KB). EİB'ler 3AA, 4AA ve 5AA blastosistleri, İB'ler 3/ 4/ 5BB, AB ya da BA ve 2AA blastosistleri içermektedir (1). Sekiz hücre evresinden sonra gelişimini durdurmuş embriyolar ise GDE olarak kaydedildiler.

3.7. 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.

3.8. İstatistiksel Analiz

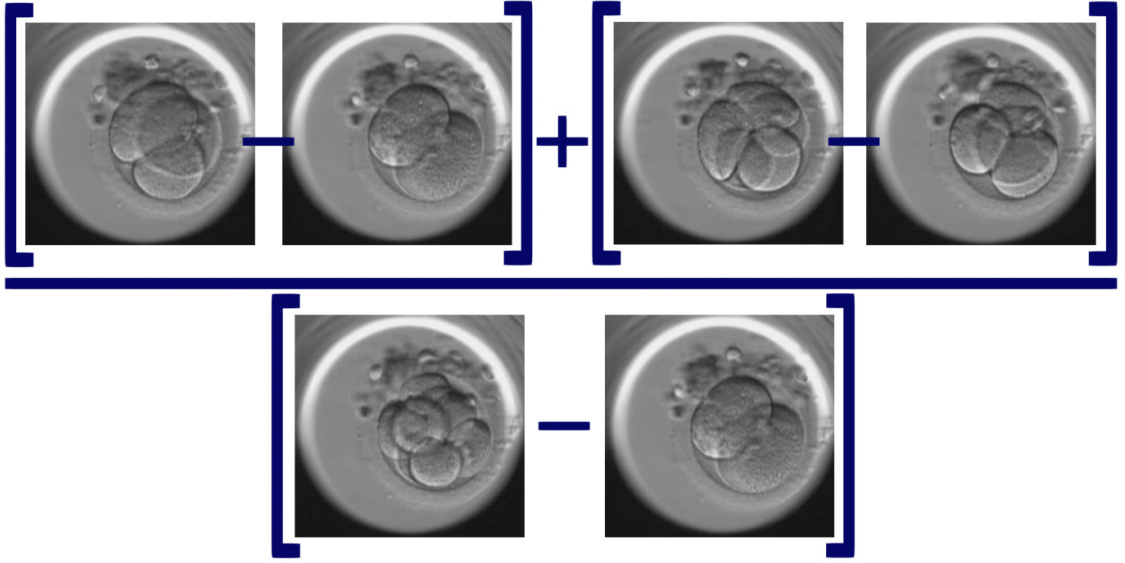
Elde edilen veriler öncelikle EmbryoViewer® bilgisayarına otomatik olarak kaydedildi ve buradan analiz için Microsoft Excel'e aktarıldı. Bölünmelerin sayısal zamanlamalarından yola çıkarak, aşağıda belirtilen formüllerin tek tek ve beraber puanlaması için excel tabanlı hesaplamalar

kullanıldı. Blastosist oluşum ve kalite prediksyon modelinde üç kinetik denklem ve iki morfolojik değerlendirme dışı bırakma kriteri kullanıldı:

- **1.denklem:** İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi:

$$KS2-8 = ((t3-t2) + (t5-t4)) / (t8-t2)$$

Bu denklem embriyonun iki ve dört hücrede geçirdiği zamanın oransal olarak sekiz hücreye ulaşma zamanının ne kadarını oluşturduğunu ifade etmektedir (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin senkronitesini tanımlayan birinci denklemin şematik görüntüsü (Fotoğraflar Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

Her ne kadar her blastomer teorik olarak birbirinden bağımsız olarak mitoz bölünmeye girse de, embriyonun kendi içindeki senkronitenin varlığı, SEİS ile takip edilebilen beş günlük preimplantasyon döneminde tek hücre evrelerinin toplam süresini bir insan embriyosu için kısa bir döneme denk geldiğini göstermektedir. Dolayısıyla, bu denklemden, bir embriyonun

alabileceği ideal oran bir değerine yakınken en kötü durumda bu değer sıfıra yakın olacaktır.

- **2.denklem:** dört hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi:

$$KS4-8 = (t8-t5) / (t8-t4)$$

Bu denklem bir embriyonun beş hücreden sekiz hücreye geçiş zamanı ile dört hücreden sekiz hücreye geçiş zamanını kıyaslamaktadır. Dolayısıyla, bir embriyonun üçüncü klivaj döngüsüne kıyasla beş, altı ve yedi hücre evrelerinde geçirdiği zamanı göstermektedir.

- **3. denklem:** DNA kopyalama sürelerinin oranı:

$$DK = (t3-t2) / (t5-t3)$$

İki hücreden üç hücreye geçişte embriyo dört hücre evresine kadar kullanacağı genomik materyali çoğaltmaktadır. İkinci replikasyon ise, üç hücreden beş hücre evresine geçişte gerçekleşmekte ve sekiz hücre evresine kadar gerekli olan DNA miktarının eldesini sağlamaktadır. Bu sebepten her iki replikasyon süresi arasında bir ilişki mevcuttur.

- **Morfolojik değerlendirme dışı bırakma kriteri 1:**

iki ve dört hücre evrelerinde eşit olmayan blastomer varlığı

En büyük ve en küçük blastomerler arası boyut eşitsizliği %25 ve üzeri bir fark olarak tanımlanmıştır.

- **Morfolojik değerlendirme dışı bırakma kriteri 2:**
direkt klivaj bulgusu

Bir blastomerden üç blastomere doğrudan geçiş olarak tanımlanmıştır.

Sürekli değişkenlerdeki istatistiksel anlamlı farklılık, uygun oldukları durumlarda *Student's T* ve *Mann-Whitney U* testi kullanılarak incelendi. Kategorik veriler, direkt klivaj ve iki ve dört hücre aşamalarında blastomer boyutları, *Chi-Square* testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık eşiği olarak p değeri 0.05'ten küçük kabul edildi. Blastosist tahmin modelini oluşturmak üzere üç formül ve iki morfolojik gözlem seçildi. Her bir formül ve toplam puan için *Receiver Operating Characteristic* (ROC) eğrileri oluşturularak eğri altında kalan alan (AUC; *Area Under Curve*), prediktif değerler, sensitivite ve spesifite hesaplandı.

Sekiz hücre aşamasından önce gelişimini durdurmuş olan (n=347) ve formüllerde matematiksel sifıra bölünme hatası veren (n=43) embriyolar çalışmadan hariç bırakıldı. Sonuç olarak çalışmada t8 değerlendirmesi olan 1156 blastosist incelendi (Şekil 3-8):

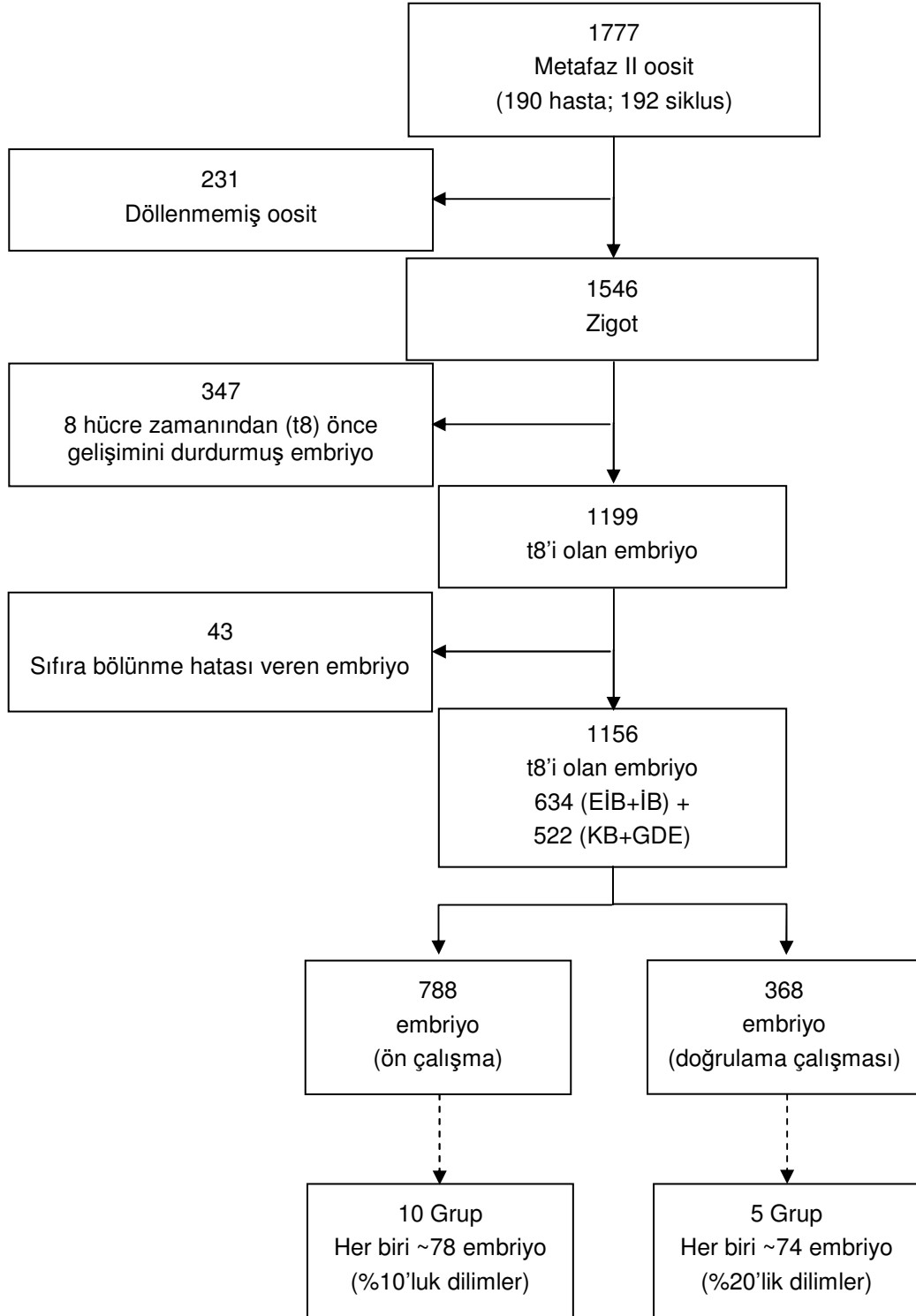
- 634 en iyi kalite (EİB) ve iyi kalite blastosist (İB) (toplam kohortun %54.84'ü), ve
- 522 (toplam kohortun %45.16'sı) kötü kalite embriyo:
 - kötü kalite blastosist (KB): 295
 - beşinci gün gelişimini durdurmuş olan embriyolar (GDE): 174
 - dördüncü gün gelişimini durdurmuş olan embriyolar (GDE): 53

İlk çalışma grubu, algoritmayı oluşturmak amacıyla, genel çalışma grubundan rastgele belirlenen 788 embriyo (%68.16) ile oluşturuldu. Doğrulama çalışması ise geri kalan 368 embriyo (%31.84) ile gerçekleştirildi.

İlk çalışma grubundaki embriyolar daha önceki analizler ile seçilen her bir formül için aldıkları sonuca göre sıralanarak ortalama 78 embriyo içeren 10 dilime ayrıldı (%10'luk yaklaşım). Bu 10 grubun her birindeki en iyi ve iyi kalite blastosist (EİB+İB) oranının %54'lük ilk çalışma grubu ortalaması ile farkı ayrı ayrı hesaplanarak ilgili grubun formül puanı olarak atandı. Morfolojik gözlemlerin puanlanmasında benzer bir yöntem takip edildi. Her bir morfolojik kriterin gözlenmesi durumunda kötü kalite blastosist ve gelişimini durdurmuş embriyo (KB+GDE) oranındaki genel gruba göre artış negatif puan olarak atandı. Tüm bu basamaklardan sonra her bir embriyonun üç kinetik formül ve iki morfolojik gözlemden aldığı puanlar toplanarak toplam puan hesaplandı.

Doğrulama çalışmasının yapılacağı grupta yer alan embriyo sayısı ilk çalışma grubuna göre daha az olduğu için bu basamakta %20'lik yaklaşım tercih edilerek her birinde ortalama 74 embriyo yer alan beş dilim oluşturuldu. Bu gruplar oluşturulurken ilk çalışma grubundan elde edilen eşik değerler kullanıldı.

Tüm istatistiksel analizler, formül puanı ve toplam puan hesaplamaları için *SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL)* ve *Excel 2007 (Microsoft Inc., California, SA)* programları kullanıldı.



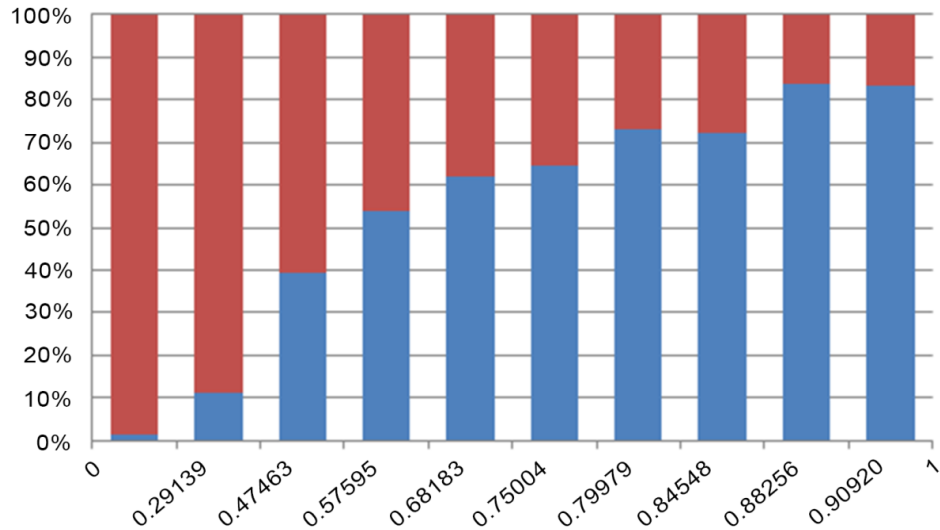
Şekil 3-8: Çalışma planı

4. BULGULAR

4.1. İki Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi:

$$KS2-8 = ((t3-t2) + (t5-t4)) / (t8-t2)$$

Bu matematiksel formül tüm çalışma grubunun %68.16'sını oluşturan ve 788 embriyo içeren ön çalışma grubuna uygulanıp %10'luk dilimler halinde incelendiğinde, ilk %20'yi içeren grubun kötü kalite blastosist (KB) ve gelişimini durdurmuş embriyo (GDE) oranının %90-98 olarak görüldüğü, son %20'yi içeren grubun en iyi kalite blastosist (EİB) ve iyi kalite blastosist (İB) oranının ise %84'e ulaştığı saptanmıştır. EİB+İB'ler son %60'luk dilime yoğunlaşmış ve çalışma grubunun ortalama EİB+İB oranı olan %54'ü aştığı görülmüştür (Şekil 4-1). Dolayısıyla, bu formülün daha iyi blastosist gelişen embriyoların seçimine yardımcı olduğu söylenebilir. AUC değeri KS2-8 formülü için 0.794 olarak hesaplanmıştır (%95 CI: 0.768-0.825; sensitivite: 95.1; spesifite: 51.5).

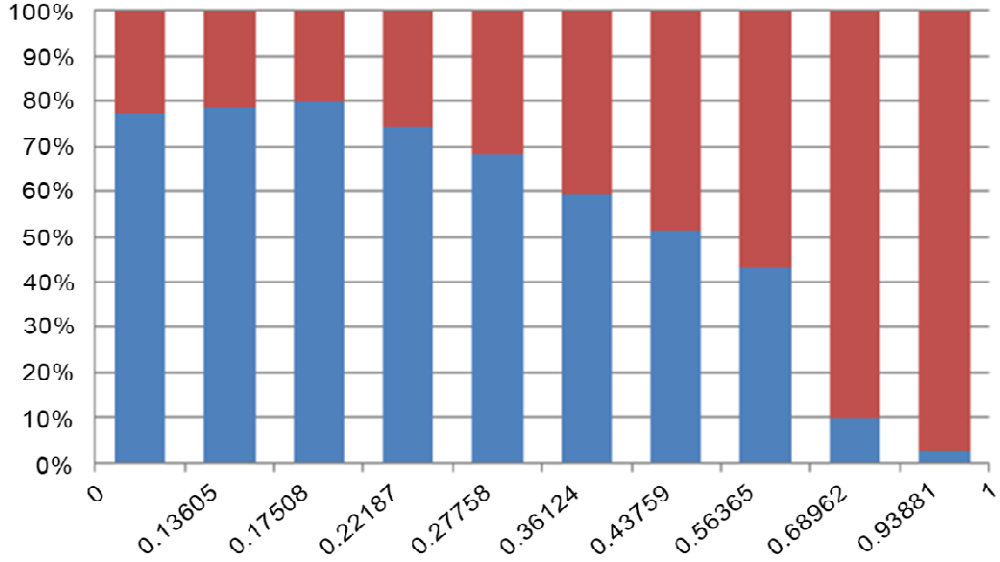


Şekil 4-1: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun birinci denklemden aldıkları puanlara göre %10'luk grup dağılımları. En iyi ve iyi kalite embriyolar maviyle, kötü ve gelişimini durdurmuş embriyolar kırmızıyla gösterilmiştir.

4.2. Dört Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi:

$$KS4-8 = (t8-t5) / (t8-t4)$$

Bu formülün değeri bire yaklaştığında KB+GDE oranı %89-98'e ulaşırken, değer sifıra yakın bulunduğunda (beş hücreden sekiz hücreye hızlı bölünme işareti) EİB+İB oranı %80'e ulaşmaktadır (Şekil 4-2). AUC değeri KS4-8 formülü için 0.789 olarak hesaplanmıştır (%95 CI: 0.759-0.817; sensitivite: 95.3; spesifisite: 50.1).



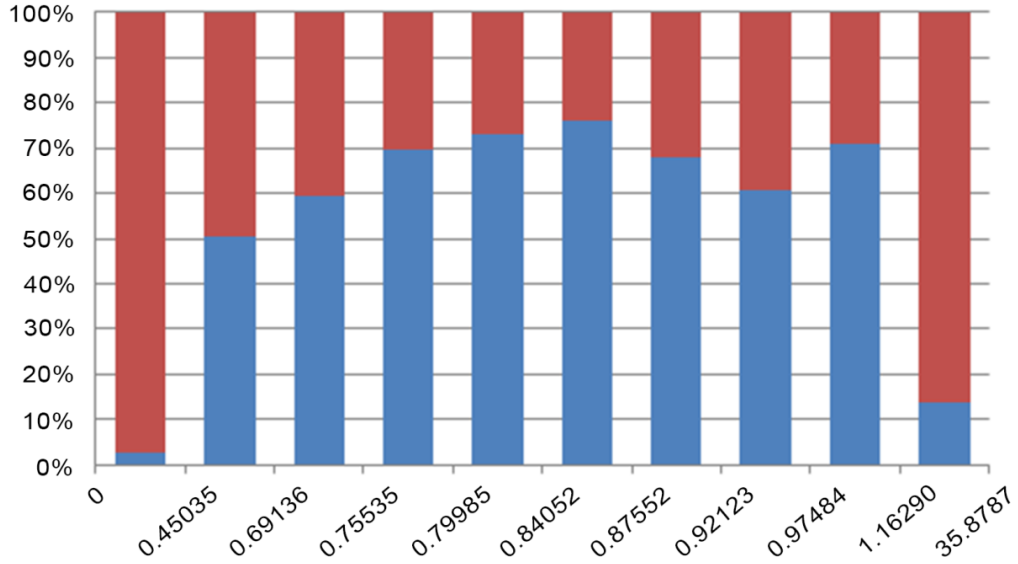
Şekil 4-2: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun ikinci denklemden aldıkları puanlara göre %10'luk grup dağılımları. En iyi ve iyi kalite embriyolar maviyle, kötü ve gelişimini durdurmuş embriyolar kırmızıyla gösterilmiştir.

4.3. DNA Kopyalama Sürelerinin Oranı:

$$DK = (t3-t2) / (t5-t3)$$

DNA kopyalama oranı ikinci hücre döngü süresinin (t3-t2) üçüncü hücre döngü süresine (t5-t3) bölünerek hesaplanmıştır ve bu oran için iki eşik değeri bulunmuştur. İlk ve son %10'luk gruplarda KB+GDE oranı %86-98'e yükselmiştir. En yüksek EİB+İB oranı ise 0.75-0.87 değerleri için %70-

77 olarak saptanmıştır (Şekil 4-3). AUC değeri DK formülü için 0.551 olarak bulunmuştur (%95 CI: 0.515-0.586; sensitivite: 98.4; spesifisite: 25.9). Bu formül ilk ve son %10'luk dilimlerde bulunan embriyoları değerlendirme dışı bırakmak için kullanılmıştır.



Şekil 4-3: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun üçüncü denklemden aldıkları puanlara göre %10'luk grup dağılımları. En iyi ve iyi kalite embriyolar maviyle, kötü ve gelişimini durdurmuş embriyolar kırmızıyla gösterilmiştir.

4.4. Morfolojik Değerlendirme Dışı Bırakma Kriterleri

4.4.1. İki ve Dört Hücre Evrelerinde Eşit Olmayan Blastomer Varlığı

Sonuçlarımıza göre iki hücreli evrede eşit olmayan blastomerlere sahip embriyoların %63.75'i KB'lere dönüşmüştür. Benzer olarak dört hücreli evrede eşit olmayan blastomerlere sahip embriyoların %61.32'si KB'lere dönüşmüştür. Ancak, iki hücreli evrede eşit olmayan blastomerlere sahip embriyoların çoğu dört hücreli aşamada da eşit blastomerlere sahip olmadıkları için bu embriyoların KB oranı artmamaktadır ve %64.62 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Blatosist kalitesinin iki ve dört hücre evrelerindeki eşit ya da eşit olmayan blastomer boyutlarına göre karşılaştırması.

Blastomer Boyutu	EİB + İB %	KB + GDE %
Eşit 2 hücre	57.16	42.84
Eşit olmayan 2 hücre	36.75	63.75
Eşit 4 hücre	58.32	41.68
Eşit olmayan 4 hücre	38.68	61.32
Eşit 2 ve 4 hücre	60.27	39.73
Eşit olmayan 2 ve 4	35.38	64.62

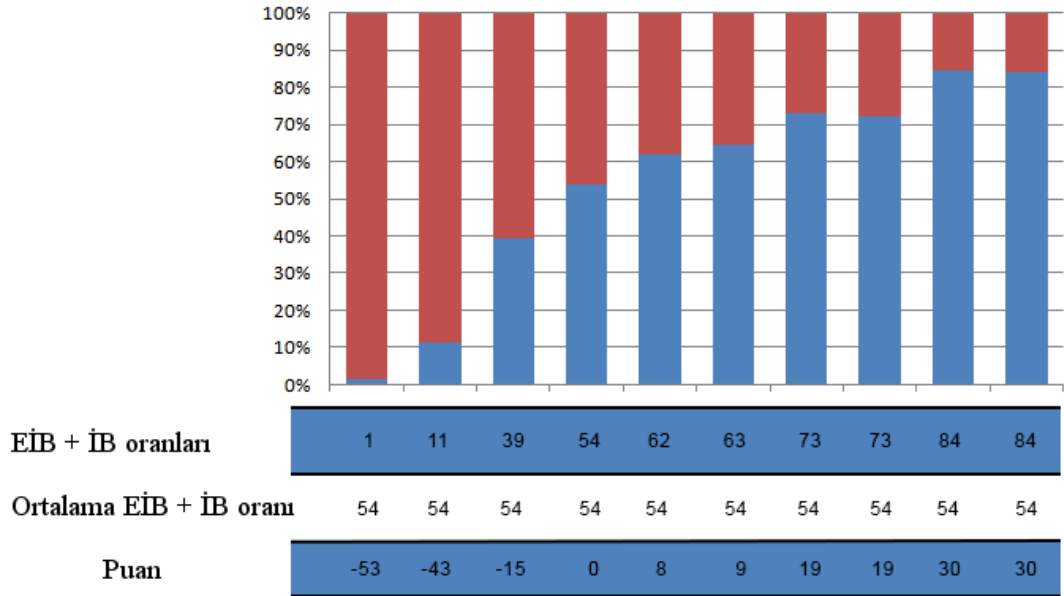
4.4.2. Direkt Klivaj Bulgusu

Direkt klivaj ya da bir hücreden doğrudan üç hücreye bölünme bulgusu ön çalışma grubunu oluşturan 788 embriyonun 91'inde görülmüş (%11.54) ve bunların %87.9'unun KB+GDE'lere dönüştüğü gözlemlenmiştir. KB+GDE oranı ön çalışma grubunda ortalama %45.55 olarak hesaplandığı için direkt klivaj bulgusu embriyonun beşinci gün kalitesini etkileyen önemli bir parametre olarak tespit edilmiş ve buna sahip embriyolara negatif puan verilmiştir.

4.5. Puanlama Sistemi

Her üç denklem için %10'luk gruplar ayrı ayrı puanlandırılmıştır. Dolayısıyla, her embriyo bulunduğu %10'luk dilime göre her formül için bir puan almıştır. Morfolojik değerlendirme dışı bırakma kriterlerinin varlığında (iki ve dört hücre evrelerinde eşit olmayan blastomer varlığı ve direkt klivaj bulgusu) negatif puanlama uygulanmıştır.

Örneğin, iki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesinin hesaplanmasını sağlayan ilk formül için ilk %10'luk grubun EİB+İB oranı %1 olarak bulunmuştur. Ön çalışma grubunun EİB+İB oranı %54 olarak hesaplandığı için bu dilimde yer alan bir embriyo ortalamaya kıyasla EİB+İB olma olasılığı %53 daha düşük olduğundan embriyonun bu denklem için puanı -53 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-4). Benzer şekilde son %10'luk dilimde yer alan bir embriyonun EİB+İB olma olasılığı %84 olarak belirlenmiştir; ve bu da ortalamadan %30 fazladır. Dolayısıyla, son dilimde yer alan bir embriyonun bu denklem için puanı +30'dur (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Birinci denklem sonucunda embriyoların %10'luk grup dağılımlarına göre puanlanması. İlk satırda her %10'luk dilimin EİB + İB oranı, ikinci satırda çalışma grubunun ortalama EİB + İB oranı ve üçüncü satırda ise birinci satırın ikinci satırdan çıkarılma sonucu gösterilmiştir. En iyi ve iyi kalite embriyolar maviyle, kötü ve gelişimini durdurmuş embriyolar kırmızıyla gösterilmiştir.

Morfolojik değerlendirme dışı bırakma kriterlerinin varlığında (iki ve dört hücre evrelerinde eşit olmayan blastomer varlığı ve direkt klivaj bulgusu) negatif puanlama uygulanmıştır. Örneğin, direkt klivajlı olan bir embriyo için beşinci günde KB+GDE olma olasılığı %87.91 olarak

bulunmuştur; bu da ön çalışma grubunun ortalaması olan %45.55'ten 42.36 puan fazladır. Dolayısıyla, bu bulguya sahip bir embriyoya -42 puan verilmiştir.

İki hücre evresinde eşit olmayan blastomerlere sahip embriyoların negatif skoru aynı şekilde -21 olarak hesaplanmıştır (42.84-63.75= %-20.91). Dört hücre evresinde eşit olmayan blastomerlere sahip embriyoların negatif skoru ise -20 olarak bulunmuştur (41.68-61.32= %-19.64). Son olarak, hem iki hücre evresinde hem de dört hücre evresinde eşit olmayan blastomerlere sahip embriyoların puanı -25'tir (39.73-64.62= %-24.89) (Tablo 4-1).

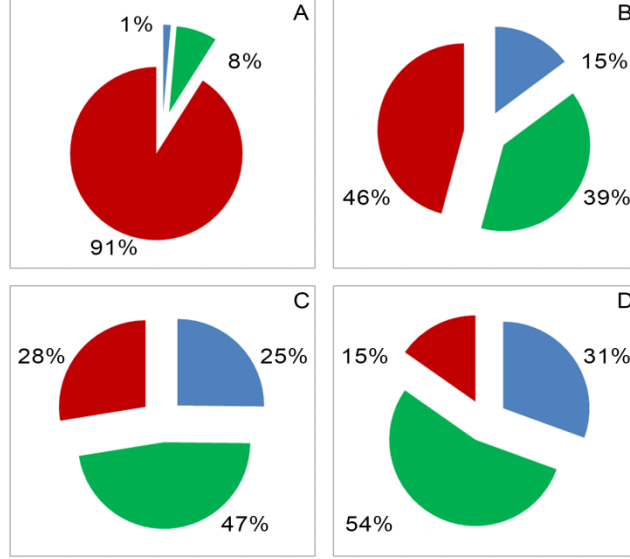
Yukarıda detaylı anlatılan her üç kinetik formül ve iki morfolojik bulgu için tek tek puan verilmiş ve daha sonra bu beş puan toplanarak toplam puan elde edilmiştir. Bu toplam puan da blastosist oluşum ve kalite predikasyonu için kullanılmıştır. Bu çalışmada hesaplanan toplam puanın değerleri -222 ve +79 arasında yer almaktadır.

4.6. Morfolojinin Toplam Puan ile Karşılaştırılması

Embriyo gelişiminin üçüncü gününde sekiz hücre bölünme zamanına kadar toplanmış kinetik veriler ile çalışmamızda oluşturulan model kullanılarak blastosist oluşumu ve kalitesi yönünden predikasyon yapılmıştır. Daha detaylı bir analiz yapılabilmesi açısından toplam puanlar çeyrek dilimlerde incelenmiş ve beşinci günde o embriyoların gerçek kaliteleri ile karşılaştırılmıştır.

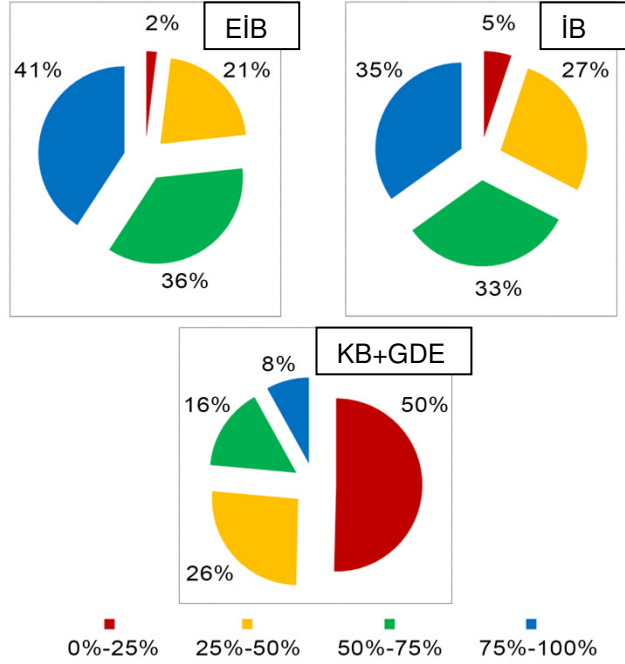
En iyi ve iyi gruplarda elde edilen EİB ve İB oranları sırasıyla %85 ve %72 olarak bulunmuştur. Bir başka deyişle aynı oranda EİB+İB doğru olarak tahmin edilmiştir. Zayıf grup için, KB+GDE oranı %91'e

yükselmiştir. Gerçek morfolojinin blastosist oluşum ve kalite prediksyon modeli ile korelasyonu anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: Embriyo gelişiminin üçüncü gününde modelden elde edilen toplam puanın beşinci gün blastosist kalitesiyle karşılaştırılması. A. Zayıf grup (%0-25) KB'lerin %91'ini içermekte. B. Orta grup (%25-50) KB'lerin %46'sını İB'lerin ise %39'unu kapsamakta. C. İyi grup (%50-75) İB'lerin %47'sini EİB'lerin ise %25'ini içermekte. D. En iyi grup (%75-100) İB'lerin %54'ünü ve EİB'lerin %31'ini kapsamakta. EİB, İB, KB+GDE'ler ise sırasıyla mavi, yeşil ve kırmızı ile gösterilmiştir.

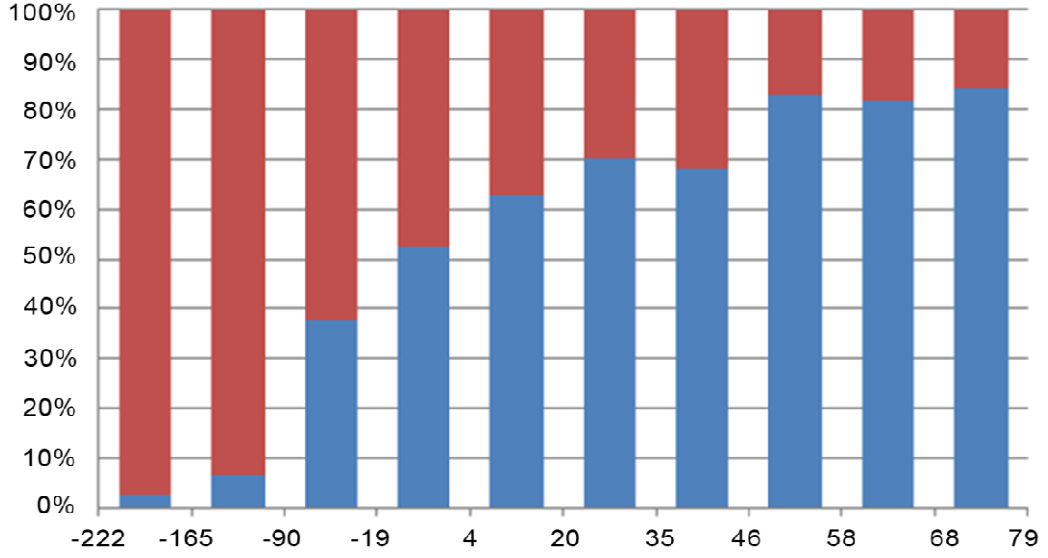
Aynı şekilde tüm blastosist grubu ($n=1156$) retrospektif olarak üç morfoloji alt grubunda incelendiğinde (EİB, İB ve KB+GDE) EİB olarak predikte edilmiş %77 embriyonun EİB ya da İB'ye dönüştüğü görülmektedir. Bu oran İB'ler için %68 olurken orta ve zayıf grup KB'lerin %76'sını içermektedir ($p<0.0001$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Embriyonun beşinci gündeki kalitesiyle üçüncü günde modelden elde edilen toplam puanın karşılaştırılması. Zayıf grup kırmızıyla, orta grup sarıyla, iyi grup yeşille ve en iyi grup maviyle gösterilmiştir.

4.7. Blastosist Oluşum ve Kalite Prediksiyon Modelinin Ön Çalışma Grubunda (%68.16) Çalışılması

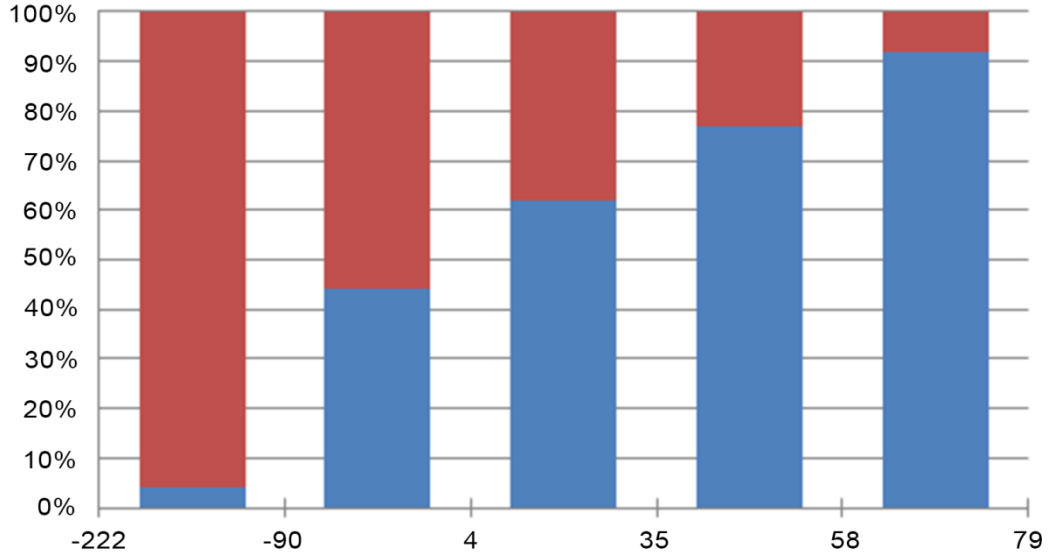
Toplam puan grafiği EİB ve İB oranları yönünden her %10'luk dilim için artış göstermektedir ve son %10'luk dilimde bu oran %84'e ulaşmaktadır. İlk dört %10'luk dilimlerde EİB+İB oranı ön çalışma grubunun ortalaması olan %54.44'ten düşük olmuştur (Şekil 4-7). Toplam puan için hesaplanan AUC 0.815'tir (%95 CI: 0.786-0.841; sensitivite: 77.86; spesifisite: 71.87).



Şekil 4-7: Ön çalışmaya dahil olan 788 embriyonun beş denklemin sonucunda aldıkları toplam puanlara göre %10'luk grup dağılımları. En iyi ve iyi kalite embriyolar maviyle, kötü ve gelişimini durdurmuş embriyolar kırmızıyla gösterilmiştir.

4.8. Blastosist Oluşum ve Kalite Prediksiyon Modelinin Doğrulama Grubunda (%31.84) Çalışılması

Ön çalışma grubu modelin oluşturulmasını sağlamış olduğundan, modelin doğrulanması toplam blastosist grubunun %31.84'lük kısmını oluşturan bir doğrulama grubunda gerçekleştirilmiştir. Ön çalışma grubunun yarısı kadar embriyo içerdiğinden doğrulama grubu %20'lik dilimlerde incelenmiştir. Oluşturulan grafik ön çalışma grubuna benzer bir dağılım göstermiş ve ilk %20'lik dilimde EİB+İB %4 olurken son dilimde bu oran %92'ye yükselmiştir (AUC: 0.843; %95 CI: 0.802-0.879; sensitivite: 91.2; spesifisite: 60.7) (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Doğrulama çalışmasına dahil olan 368 embriyonun beş denklemin sonucunda aldıkları toplam puanlara göre %20'lik grup dağılımları. En iyi ve iyi kalite embriyolar maviyle, kötü ve gelişimini durdurmuş embriyolar kırmızıyla gösterilmiştir.

Ön çalışma ve doğrulama gruplarında bulunan 1156 embriyonun blastosist oluşum ve kalite prediksyon modelinden aldıkları toplam puanlar için AUC değeri 0.823 olarak hesaplanmıştır (%95 CI: 0.800-0.845; sensitivite: 85.6; spesifisite: 63.9).

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 klinik kullanıma uygun değildir ⁽²⁸⁻²⁹⁾.

Dolayısıyla, sürekli embriyo izleme sistemleri (SEİS) rutin bir tüp bebek laboratuvarında kullanılacak 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 seyredebilmek 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 ⁽⁷⁾.

Ancak, 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 ⁽³⁰⁾.

İnsan 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 ⁽⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁾. Dolayısıyla, yaygın kullanım için oluşturulacak bir blastosist oluşum ve implantasyon prediksyon algoritmasında bölünme zamanlarının tam değerleri kullanılmamalıdır. Ayrıca, katı ve belirli aralıklar dahilinde embriyoları çeyrek dilimlere gruplandırmak da hem yeterli olmayabilir, hem de yine yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı embriyoların esnekliğini doğru yansıtmayabilir.

Ancak, bu tez kapsamında oluşturulan ve beş formül içeren algoritma, %10'luk değişken gruplar kullandığından her tüp bebek laboratuvarına kendi kinetik verisini esnek olarak inceleme olanağı tanımakta ve embriyo gelişiminin dinamiğini daha iyi tercüme edebilmektedir. Çalışmamızda, preimplantasyon dönemi embriyo gelişiminin ritmini ve üçüncü güne kadar SEİS'te gözlenen embriyonun klivaj senkronitesini yansıtmak için üç kinetik formül oluşturduk.

Birinci formül; iki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi, (KS2-8) genel olarak insan embriyosunun mitoz bölünmelerinin hızını ya da bir başka deyişle, klivajlarının senkronitesini tercüme etmektedir.

Temel olarak, KS2-8 denklemi insan embriyosunun senkron bir şekilde iki hücreye bölünüp, üç hücre evresinde kısa bir bekleyişten sonra tekrar bölünerek daha uzun kaldığı dört hücre evresine ulaştığı gözlemine dayanmaktadır. Ek olarak, beş, altı ve yedi hücre evreleri toplamda bakıldığında dört hücre evresinden daha kısa sürmektedir. Dolayısıyla, $KS2-8 = ((t3-t2) + (t5-t4)) / (t8-t2)$ denklemi embriyonun sekiz hücre aşamasına kadar zamansal olarak hangi oranda çift hücre evrelerinde kaldığını göstermektedir.

Benzer olarak, ikinci formül, dört hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi (KS4-8), dört hücreden sekiz hücre evresine geçerken embriyonun zamansal olarak beş, altı ve yedi hücre evrelerinde ne kadar kaldığını göstermektedir. Son olarak, DNA kopyalama sürelerinin oranı (DK), iki ve dört hücre evrelerinin DNA kopyalama zamanlarının oranını temsil etmektedir. Ayrıca, iki morfolojik değerlendirme dışı bırakma kriteri tanımlanmıştır: iki ve dört hücre evrelerinde eşit olmayan blastomer varlığı ve direkt klivaj bulgusu.

Bu üç kinetik denklem ve iki morfolojik değerlendirme dışı bırakma kriteri blastosist oluşum ve kalite prediksyon modeli oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu beş formülden elde edilen puanlar aritmetik olarak toplanıp oluşturulan algoritmanın toplam puanı elde edilmiştir. Beş puanın toplanmasındaki amaç, hiyerarşik modelin tersine, bir formülden kötü puan alan bir embriyoyu doğrudan kötü olarak kabul etmeyerek ona diğer formüllerden değerlendirme imkanı vermek ve hangi %10'luk dilimde yer aldığını tespit etmektir.

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 ve tedavilerinde embriyoları SEİS'te takip edilmiş

tüm infertil olgular çalışma dönemimizde retropektif 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. Dolayısıyla, bu tez çalışmamıza beşinci günde transfer uygulanmış hastalar dahil edilerek, embriyo gelişiminin üçüncü gününe kadar toplanan morfolojik verilerin retrospektif değerlendirmesiyle blastosist oluşum ve kalite prediksyon modeli oluşturulmuştur. Araştırmamız kapsamında heterojen infertilite sebepleri bulunan bir hasta grubunun dahil edilmesine rağmen, bu model kullanıldığında blastosist oluşum ve kalite tahmininin AUC değeri yüksek bulunmuştur (0.823).

Embriyoya dayalı modeller, embriyoların kalitesi ve dolaylı yoldan her iki gametin kalitesiyle ilgili güvenilir bilgi vermelerine rağmen, implantasyon açısından değerlendirildiklerinde transfer günü endometriumun reseptivitesiyle ilgili hiç bir bilgi verememektedirler. Dolayısıyla, implantasyonun direkt olarak embriyo gelişimiyle bağlantılı hale getirilerek bir model oluşturulması çok kolay gözükmemektedir. Ancak, tahmin değeri yüksek bir algoritma oluşturabilmek için hem endometrial reseptivite testlerinden faydalanılmalı, hem de kadın yaşı ve transfer gününe göre alt gruplar oluşturularak değerlendirilmelidir ⁽³¹⁻³²⁾. Ne var ki oluşturulan modelin klinikte kullanımı embriyo gelişiminin üçüncü gününde kötü kalite blastosist oluşturacak embriyoları ya da blastosiste dönüşemeyecek embriyoları transfer etmeme yönünden doğrudan implantasyon açısından önemli olacaktır. Zira bu embriyoların klinik gebelik oluşturma ihtimali çok düşüktür.

Tez çalışmamız kapsamında oluşturulan model ayrıca klinikte çok yüksek olasılıkla en iyi kalite ya da iyi kalite blastosist (EİB+İB) oluşturabilecek embriyoları, onları laboratuvar ortamı koşullarına iki gün daha maruz bırakmadan, gelişimlerinin üçüncü gününde seçmek açısından da çok önemli olacaktır. Literatürde, blastosist kültürünün preterm doğumlar,

postnatal etkiler ve epigenetik modifikasyonlar gibi uzun süreli riskleri ile ilgili tartışmalı yayınlar bulunmasına rağmen, embriyo kültürünün laboratuvar ortamında iki gün uzatılması üçüncü günde morfolojik açıdan birbirine çok benzer embriyolar arasından seçim yapma imkanı tanımaktadır ⁽³³⁻³⁴⁾. Üçüncü gün embriyolarının kinetik seçimi, klivaj dönemi embriyolarının günümüzde blastosist transferine göre daha düşük olan implantasyon başarısını da arttıracaktır ⁽³⁵⁾.

Ayrıca, günümüzde, klinik uygulamada blastosist vitrifikasyonu, çoğunlukla blastosel kavitesindeki sıvıdan kurtulamak için, lazer ışını ya da ICSI pipeti kullanılarak suni kolaps yöntemiyle uygulanmaktadır ve kinetik açıdan seçilmiş klivaj dönemi embriyolarının vitrifikasyonu da embriyo manipülasyonunu azaltarak onlara verilen olası zararı minimuma indirecektir.

Diğer taraftan, tez çalışmamız kapsamında oluşturulan model, embriyologları transfer iptali endişesi olmadan, embriyo kültürünü beşinci güne uzatıp uzatmama konusunda rahatlatacak, blastosist transferi kararında emin olmalarını sağlayacaktır. Burada önerilen algoritma, beşinci günde beklenen ve trofektoderm biyopsisi uygulanabilecek EİB+İB'leri predikte ederek PGT vakaları için biyopsi stratejilerinin oluşturulmasına da yardımcı olacaktır. Bu algoritma aynı zamanda yakın dönemde önerilen risk modeliyle birlikte kullanılarak tek embriyo transferi için implantasyon olasılığı en yüksek embriyoyu transfere seçmek için de kullanılacaktır ^(26, 27).

6. SONUÇ

Tez çalışmamız kapsamında oluşturduğumuz model Gardner'in blastosist için tasarladığı morfolojik kriterlerle de pozitif olarak ilişkilendirilmiştir ($p < 0.0001$). Bu da modelin yüksek prediksyon gücünü göstermektedir. Dolayısıyla, model aynı zamanda benzer kalitede olan blastosistler arasında morfolojik seçimin ötesine geçerek kinetik bir ayırım yapmak için de kullanılabilir. Nitekim, morfolojik değerlendirmeler her zaman kişiler arası ve kişinin farklı zamanlarda yapacağı değerlendirme farklılıklarına açıktır. Bu, özellikle embriyo gelişiminin dördüncü ve beşinci günleri için geçerlidir, zira klivaj dönemi embriyolarının değerlendirilmesi daha çok hücre sayımına, hücrelerin eşit olup olmadığına ve fragmentasyon tayinine bağlı olduğundan daha kolaydır. SEİS'lerde ise embriyonun klivaj zamanlarının belirlenmesi ve kaydedilmesi cihaz tarafından oluşturulmuş videoların geriye alınıp tekrar izlenebilme özelliği sayesinde kullanıcıya kolaylık sağlamış, subjektiviteyi azaltmış ve daha temiz veri elde edilmesini sağlamıştır. Bu özellikler prospektif olarak kullanılacak modellerin oluşturulmasına da yardımcı olmuştur.

Sonuç olarak, insan embriyosunun klivaj zamanları farklı etyolojilere sahip infertil çiftlerin embriyoları için aynı olmayabilir ve bu belirli mitoz bölünme zamanları laboratuvar koşulları ile de değişkenlik gösterdiğinden bir genellemeye uygun değildir. Ancak, seçilmiş klivaj döngülerinin zamansal oranları ya da klivaj senkronitesi, bu tez araştırmamızda sonuçlarını aktardığımız retrospektif kohort çalışmamızda bireysel analiz sağlamış ve yüksek prediksyon değeri olan bir blastosist oluşum ve kalite modelinin temellerini atmıştır. Önerilen model ileride hem implantasyon açısından geliştirilmeli, hem de etkisinin değerlendirilebilmesi için randomize prospektif olarak test edilmelidir. Tez kapsamında oluşturduğumuz model gelecekte IVF laboratuvarlarında uygulanarak embriyo seçimine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

7. ÖZET

İnsan Embriyosunda Blastosist Oluşumu ve Kalitesinin Bölünme Senkronitesi ile Öngörülmesi

Tüp bebek yönteminde yumurta ve spermin bir araya getirilmesinden itibaren, dölleme 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. Ancak, halen tek embriyo transferiyle 35 yaş altında olan kadınlarda elde edilen implantasyon oranları yaklaşık olarak %35'dir. Dolayısıyla, morfoloji yönünden seçilen ve transfer edilen bir çok embriyo gebelik oluşturamamaktadır. Sürekli embriyo izleme sistemlerinin laboratuvarlarda kullanılması bir çok yayını da beraberinde getirmiş ve "morfokinetik" adında yeni bir alan doğurmuştur. Çalışmamızın amacı, morfokinetik parametreler kullanarak retrospektif olarak embriyoların iyi kalite beşinci gün embriyosu (blastosist) oluşturma potansiyelini incelemektir. Çalışmaya, sekiz hücre aşamasına kadar ulaşmış 190 infertil çiftte ait ve beşinci günde transfer edilmiş 1156 embriyo dahil edilmiştir. Bu morfokinetik analiz kapsamında, bölünme (klivaj) senkronitesinin belirlenmesi için üç kinetik formül ve iki morfolojik seçim kriteri oluşturulmuştur: (F1): $((t3-t2)+(t5-t4))/(t8-t2)$; (F2): $(t3-t2)/(t5-t3)$; (F3): $(t8-t5)/(t8-t4)$; (F4): İki ve dört hücre evresinde blastomer büyüklüğü; (F5): Direkt klivaj varlığı. Bu beş formülden elde edilen puanlar toplanarak blastosist oluşumu ve kalitesi tahmini sağlanmıştır. İstatistiksel analiz eğri altında kalan alan (AUC) değerini 0.823 (95% CI: 0.800-0.845) gibi yüksek bir değer olarak bulmuştur. Dolayısıyla, bu tez çerçevesinde belirlenen bazı hücre evrelerine ulaşma zamanlarının oranlaması ve klivaj senkronitesinin kullanılması, çalışılan retrospektif grupta blastosist oluşumu ve kalitesi ile ilgili yüksek tahmin olanağı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Sürekli izleme sistemi, morfokinetik, senkronite, klivaj, blastosist.

8. SUMMARY

Prediction of blastocyst formation and quality using morphokinetics in human embryos

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. However, the implantation rate obtained after single embryo transfers in women below 35 years of age is still approximately 35%. Thus, many morphologically selected embryos do not develop into a pregnancy. 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. The aim of the study is to build a model using morphokinetics to predict retrospectively blastocyst formation and quality. The study included 1156 embryos from 190 infertile patients which have achieved the eight-cell stage and were transferred on day five. Three kinetic equations and two morphologic features, were used to identify cleavage synchronicity: (F1): $((t3-t2)+(t5-t4))/(t8-t2)$; (F2): $(t3-t2)/(t5-t3)$; (F3): $(t8-t5)/(t8-t4)$; (F4): Blastomeres' size at two and four-cell stages; (F5): Presence of direct cleavage. Scores obtained from these five criteria were added for the prediction of blastocyst formation and quality giving an area under curve (AUC) as high as 0.823 (95% CI: 0.800-0.845). Therefore, ratios based on selected cleavage cycles defining synchronicity, allowed in this retrospective cohort study a high predictivity of blastocyst formation and quality.

Keywords: Time-lapse imaging, morphokinetics, synchronicity, cleavage, blastocyst.

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. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2(8085):366.
13. 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.
14. Veeck L, Zaninovic N. *An Atlas of Human Blastocysts*. Taylor & Francis; 2003.
15. 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.
16. Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 Suppl 4: 105-114.
17. 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.
18. 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.

19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development. *Placenta* 2011; 32: 252-256.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

- 28.** 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.
- 29.** Tejera A, Herrero J, Vilorio T, Romero JL, Gamiz P, Meseguer M. Time-dependent O₂ consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil Steril* 2012; 98: 849-857.
- 30.** 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.
- 31.** Salamonsen LA, Edgell T, Rombauts LJ, Stephens AN, Robertson DM, Rainczuk A, et al. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertil Steril* 2013; 99: 1086-1092.
- 32.** Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril* 2013; 99: 1078-1085.
- 33.** Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3769-3778.
- 34.** Kalra SK, Ratcliffe SJ, Barnhart KT, Coutifaris C. Extended embryo culture and an increased risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2012; 120: 69-75.
- 35.** Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst.Rev*, 2012; 11: CD002118. doi: 10.1002/14651858.CD002118.pub4.

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 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

T.C.

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

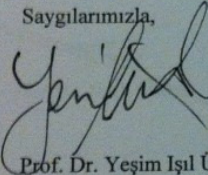
TIBBİ ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

SAYI:B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/1955
KONU: ATADEK 2013-518

Sayın Dr.Caroline PİRKEVİ,

ATADEK 2013-518 kodlu, Dr.Caroline Pirkevi ve Dr.Murat Çetinkaya tarafından yürütülecek olan **"İnsan embriyosunda blastosist oluşumu ve kalitesinin klivaj senkronitesi ile öngörülmesi"** başlıklı projesi, Acıbadem Üniversitesi Etik Kurulu'nun 20 Ağustos 2013 tarihli 83. toplantısında incelenmiş; etik açıdan uygun bulunmuştur. **(Karar No:2013-518)**

Saygılarımızla,



Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman
Başkan Yardımcısı

Gülsuyu Mah. Fevzi Çakmak Cad. Divan Sok. No: 1 34848 Maltepe/İstanbul
Tel: 216 458 08 08 Faks: 216 589 84 85
www.acibadem.edu.tr



T.C.

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus (Başkan)

Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman (Başkan Yardımcısı)

Prof. Dr. Güldal Süyen

Prof. Dr. Fevzi Toraman

Prof. Dr. Murat Saruç

Prof. Dr. Mert Ülgen

Prof. Dr. Nadi Bakırcı

Doç. Dr. Yasemin Alanay

Doç. Dr. Ükke Karabacak

Yrd. Doç. Dr. Emre Dorman

Dr. Sertaç Uzel

Dr. Nalan Karadağ

Av. Ferda Kaya Öztürk

Gülsuyu Mah. Fevzi Çakmak Cad. Divan Sok. No: 1 34848 Maltepe/İstanbul
Tel: 216 458 08 08 Faks: 216 589 84 85
www.acibadem.edu.tr

12. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Caroline Selma	Soyadı	Pirkevi
Doğ.Yeri	Fransa	Doğ.Tar.	05.11.1978
Uyruğu	TC/ FR	TC Kim No	18302276986
Email	carolinepirkevi@yahoo.com	Tel	0532 575 28 14

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik	2009
Yük.Lis.	Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik	2005
Lisans	Nice Sophia Antipolis Üniversitesi, Fransa	2001
Lise	Fransız Pierre Loti Lisesi	1997

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
1. IVF Lab. Kalite Sorumlusu	Şişli Memorial Hastanesi	2010 - halen
2. Doktora Sonrası Araştırmacı	Boğaziçi Üniversitesi	2009 - 2010
3. Araştırma Görevlisi	Boğaziçi Üniversitesi	2006 - 2009
4. Biyoloji Öğretmeni	Fransız Pierre Loti Lisesi	2002 - 2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma	KPDS Puanı	(Diğer)
Fransızca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	96	Anadil
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	90	

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	65,12535	65,09480	62,33585

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office programları	Çok iyi

Yayınlar / Tebliğler

Uluslararası yayınlar:

- Çetinkaya M., Pirkevi C., Yelke H., Kumtepe Y., Atayurt Z., Kahraman S., An Additive Model using Morphokinetics to Predict Blastocyst Formation, Quality and Implantation potential, *incelemede*.
- Kahraman S., Çetinkaya M., Pirkevi C., Yelke H., Kumtepe Y., Comparison of Blastocyst Development and Cycle Outcomes of Patients with eSET Using either Conventional or Time Lapse Incubators; a Prospective Study of Good Prognosis Patients. *J.Reprod.StemCellBiotechnol*, 2013; 3: 55-61.
- Zeyneloğlu H., Kahraman S., Pirkevi C., Co-culture Techniques in Assisted Reproduction: History, Advances and the Future. *J.Reprod.StemCellBiotechnol*, 2011; 2: 29-40.
- Lesage S., Patin E., Condroyer C., Leutenegger A.L., Lohmann E., Giladi N., Bar-Shira A., Belarbi S., Hecham N., Pollak P., Ouvrard-Hernandez A.M., Bardien S., Carr J., Benhassine T., Tomiyama H., Pirkevi C., Hamadouche T., Cazeneuve C., Başak A.N., Hattori N., Dürr A., Tazir M., Orr-Urtreger A., Quintana-Murci L., Brice A., Parkinson's Disease-related LRRK2 G2019S Mutation Results from Independent Mutational Events in Humans. *HumanMolecularGenetics*, 2010; 19: 1998-2004.

- Pirkevi C., Lesage S., Condroyer C., Tomiyama H., Hattori N., Ertan S., Brice A., Başak A.N., A LRRK2 G2019S Mutation Carrier from Turkey Shares the Japanese Haplotype. *Neurogenetics*, 2009; 10: 271-273.
- Pirkevi C., Lesage S., Brice A., Başak A.N., From Genes To Proteins in Mendelian Parkinson's Disease: An Overview. *TheAnatomicalRecord*, 2009; 292: 1893-1901.

Ulusal yayınlar:

- Pirkevi C., Başak A.N., Ribonükleik Asit İnterferansı ve Huntington Hastalığının Moleküler Tedavisi. *ParkinsonHastalığıveHareketBozuklukları Dergisi*, 2010; 13: 1-10.
- Pirkevi C., Başak A.N., Friedreich Ataksi'sinin Moleküler Temeli: Türk Hastalarda DNA Analizi ve Tanı. *TurkishJournalofNeurology*, 2005; Aralık.
- Ersoy N., Pirkevi C., Saner N., Başak A.N., Trinucleotide Repeat Disorders and the Molecular Basis of Neurodegeneration. *JournalofParkinson'sDiseaseandMovementDisorders*, 2004; Nisan.

Oral sunumlar:

- "Sperm Cells with High Degree of Vacuolization Affects the Duration of the Third Embryonic Cell Cycle and Implantation" ASRM, Boston, USA, 2013.
- "Establishing and Implementing a New Model in the Clinic Workflow" Embryoscope Advanced User Workshop, Billund, Danimarka, 2013.
- "Blastocyst Culture Using Time-Lapse in Good Prognosis IVF Patients and Elective SET: a Randomized Pilot Study" ESHRE, Londra, İngiltere, 2013.

- “Synchronicity of Cleavage Cycles Predicts Blastocyst Formation and Quality” Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, Precongress workshop, İstanbul, 2013.
- “Embriyonik Kök Hücreler”, Marmara Üniversitesi, 2. Kök Hücre Sempozyumu, İstanbul, 2011.

Poster sunumları:

- “Synchronicity of cleavage cycles predicts blastocyst formation and quality” ASRM, Boston, USA, 2013.
- “An additive model using morphokinetics to predict embryos of highest implantation potential” ESHRE, Londra, İngiltere, 2013.
- “Synchronicity of cleavage cycles predicts blastocyst formation and quality” ESHRE, Londra, İngiltere, 2013.
- “Quality control is definitely the key for success in IVF laboratories”, ESHRE, İstanbul, 2012.
- “Comparison of sperm immobilization in Spermslow vs. PVP in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection”, ESHRE, İstanbul, 2012.
- “Does poor ovarian response affect the early pregnancy loss rate in couples with severe male infertility?”, ASRM, Orlando, 2011.
- “Parkinson Hastalığının Genetik Tanısında MLPA Analizi” (P383), 44. Ulusal Nöroloji Kongresi, 11–16 Kasım, 2008, Antalya.
- “Türk Parkinson Hastalarında LRRK2 G2019S Mutasyon Tanımlanması ve Haplotip Analizi” (P382), 44. Ulusal Nöroloji Kongresi, 11–16 Kasım, 2008, Antalya.
- “Friedreich Ataksi’sinin DNA Analiz Yöntemleriyle Moleküler Tanısı” (P384), 44. Ulusal Nöroloji Kongresi, 11–16 Kasım, 2008, Antalya.

- “Parkinson’s disease in Turkish Patients: Molecular Defects in Familial and Isolated Cases - an Overview of Dominant Cases”, COST B30: Neural Regeneration and Plasticity Meeting, 4-7 Ekim, 2007, Istanbul.
- “Molecular Analysis of the LRRK2 Gene in Familial and Isolated Turkish Parkinson's Disease Patients” (abstract number: 1062), European Conference of Human Genetics, 16-19 Haziran, 2007, Nice, Fransa.
- “Parkinson’s Disease in Turkish Patients: Molecular Analyses of Parkin and LRRK2 Genes in Familial and Isolated Cases” (abstract number: 436), Movement Disorder Society 11th International Congress of Parkinson’s Disease and Movement Disorders, 3-7 Haziran, 2007, Istanbul.