

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

**TİME-LAPSE GÖRÜNTÜLEME TEKNİĞİ İLE ÖPLOİD VE ANÖPLOİD
İNSAN EMBRİYOLARININ KARŞILAŞTIRMALI KİNETİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yeşim Kumtepe Çolakoğlu

Tez Danışmanı
Prof. Dr. İmer Okar

İSTANBUL
17 ARALIK 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: 17/12/2014

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İmer Okar
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Tülay İrez

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Klin.Emb.Yüksek Lisans program
sorumlusu

Prof.Dr.Gül Baktır

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fak.
Eczacılık Faktültesi

İÇİNDEKİLER

Tez Onayı	ii
İçindekiler	iv
Şekiller Listesi.....	vii
Tablolar Listesi	ix
Semboller / Kısaltmalar Listesi.....	x
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Yumurta Toplama İşlemi (Oocyte Pick-Up, OPU).....	4
2.2. Mikroenjeksiyon Öncesi Yumurtaların Hazırlanması (Denüstasyon İşlemi).....	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. Assisted Hatching İşlemi (AHA)	12
2.7. Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) Uygulamasında Trofektoderm Biyopsi Yöntemi	13
2.8. Embriyo Transferi	16
2.9. Sürekli Embriyo İzleme Sistemi'nin (SEİS) YÜT'teki Önemi	16
2.10. SEİS'lerde Modelleme	18
3. Gereç ve Yöntem.....	20
3.1. Retrospektif Kohort Çalışmasının Temelleri	20
3.2. Çalışmaya Dahil Olan Olguların Özellikleri.....	23

3.3. Ovaryum Stimülasyonu ve Siklus Takibi	24
3.4. Folikül Aspirasyonu, Denüasyon ve ICSI	26
3.5. Embriyo Kültürü ve İnkübasyonu	26
3.6. Trofektoderm Biyopsi İşlemleri.....	28
3.7. SEİS'te Değerlendirme ve Embriyo Sınıflandırması	28
3.8. Embriyo Transferi	28
3.9. İstatistiksel Analiz	29
4. Bulgular	32
4.1. Mitoz Bölünmelerin Sayısal Zamanlamalarının ve Kinetik Denklemlerin Karşılaştırması.....	32
4.2. İki Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi: $KS2-8 = ((t3-t2) + (t5-t4)) / (t8-t2)$	38
4.3. Dört Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi: $KS4-8 = (t8-t5) / (t8-t4)$	39
4.4. Beş Hücreden Sekiz Hücreye Ulaşma Zamanı ($t8-t5$):	40
4.5. Morfolojik Değerlendirme Kriterleri	41
4.5.1. İki Hücre Evresinde Eşit Olmayan Blastomer Varlığı	41
4.5.2. Dört Hücre Evresinde Eşit Olmayan Blastomer Varlığı.....	41
4.5.3. Direkt Klivaj Bulgusu	42
4.5.4. Multinükleasyon Bulgusu	42
4.6. İki Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi (KS2-8) ve Blastosistin Genişleme Zamanının (tEB) Beraber Değerlendirilmesi	43
5. Tartışma	45
6. Sonuç	49
7. Özet.....	51
8. Summary	53
9. Kaynaklar.....	54
10. Teşekkür.....	58

11. Etik Kurul Kararı.....	59
12. Özgeçmiş.....	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: OPU işleminde folikülden aspire edilen kümülüs-oosit kompleksi...	4
Şekil 2-2: Denüstasyon sonrası oositler.....	5
Şekil 2-3: İki pronukleus gözlenen normal döllenmiş zigot	7
Şekil 2-4: Bölünme evresinde birinci kalite embriyolar	8
Şekil 2-5: Dördüncü günde embriyolar	9
Şekil 2-6: Beşinci günde blastosistler.....	11
Şekil 2-7: Lazer ışını ile 3. gün embriyosunun zarında oluşturulmuş açıklık. 13	
Şekil 2-8: PGT uygulamasında trofektoderm biyopsi yöntemi	15
Şekil 2-9: Kesintili ve kesintisiz inkübasyon: şematik görünüm	17
Şekil 3-1: Bir sürekli embriyo izleme sisteminin görüntüsü	20
Şekil 3-2: EmbryoScope® inkübatörünün iç görüntüsü	21
Şekil 3-3: EmbryoScope® inkübatörüne bağlı ekran.....	22
Şekil 3-4: <i>Known implantation data (KID)</i> kavramının şematik anlatımı.....	25
Şekil 3-5: Oniki embriyonun konulabildiği EmbryoSlide® kabının görüntüsü. 26	
Şekil 3-6: EmbryoSlide® kabının beş numaralı kuyusu ve kuyucuğu	27
Şekil 3-7: Birinci denklemin şematik görüntüsü	30
Şekil 4-1: Beş hücreye bölünme zamanının (t5) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması	33
Şekil 4-2: Sekiz hücreye bölünme zamanının (t8) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması	34
Şekil 4-3: Blastülasyon zamanının (tSB) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması	35

Şekil 4-4: Blastosist evresine ulaşma zamanının (tB) anöplid ve öplid embriyolar arası karşılaştırması	36
Şekil 4-5: Blastosistin genişleyip Gardner'a göre 3-4 evresine ulaşma zamanının (tEB) anöplid ve öplid embriyolar arası karşılaştırması	37
Şekil 4-6: İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesinin (KS2-8) anöplid ve öplid embriyolar arası karşılaştırması	38
Şekil 4-7: Dört hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesinin (KS4-8) anöplid ve öplid embriyolar arası karşılaştırması	39
Şekil 4-8: Beş hücreden sekiz hücreye ulaşma zamanının (t8-t5) anöplid ve öplid embriyolar arası karşılaştırması.....	40
Şekil 4-9: İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesinin (KS2-8) blastosistin genişleme zamanı (tEB) ile değerlendirilmesi ve anöplid, öplid embriyolar arası karşılaştırması	43

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 skoruması.....	11
Tablo 2-4: İç hücre kitlesi skoruması	12
Tablo 2-5: Dış hücre kitlesi (trofektoderm) skoruması	12
Tablo 3-1: Çalışmaya dahil olan 88 hastanın özellikleri.....	24
Tablo 4-1: Bölünmelerin sayısal zamanlamalarının ve üç kinetik denklemin anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması	32
Tablo 4-2: Öploid oranlarının iki hücre evresinde eşit ya da eşit olmayan blastomer boyutlarına göre karşılaştırması	41
Tablo 4-3: Öploid oranlarının dört hücre evresinde eşit ya da eşit olmayan blastomer boyutlarına göre karşılaştırması	41
Tablo 4-4: Öploid oranlarının embriyoda direkt klivaj (DK) varlığına göre karşılaştırması	42
Tablo 4-5: Öploid oranlarının embriyoda multinükleasyon (MN) varlığına göre karşılaştırması	42
Tablo 4-6: Öploid oranlarının iki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi (KS2-8) ve blastosistin genişleme zamanı (tEB) ile değerlendirilmesi	44

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH: *array Comparative Genomic Hybridization*

AHA: *Assisted Hatching*, zona pelusidanın traşlanması

CI: *Confidence Interval*, Güven Aralığı

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

IVF: In Vitro Fertilizasyon

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

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
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 sıklusta (adet döngüsü) ovülasyon sonrası yumurtanın sperm tarafından döllenişmesi ve embriyoya dönüşmesi tuba uterinada gerçekleşmektedir. Embriyo, döllenişme 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 laboratuvar ortamında 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 döllenişmenin 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 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⁾.

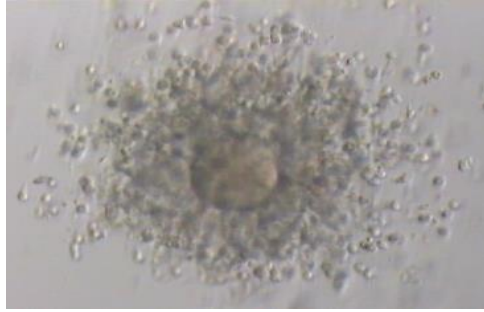
Embriyonun kromozom sayısının belirlenmesinde kullanılan tekniklerdeki gelişmeler (örn. array Komparatif Genomik Hibridizasyon (aCGH)), morfokinetik verilerin genetik tanı ile birleştirilerek kıyaslanmasını sağlamış ve tüp bebek alanında yeni bir alan yaratmıştır. Yeni bir çalışma, embriyonun normal (öploid) ya da artmış/ azalmış (anöploid) kromozom sayısını, blastülasyon başlangıç zamanı ve blastosist oluşum zamanı ile karşılaştırmış ve bir anöploidi riski sınıflandırma modeli oluşturmuştur. Bu modele göre, düşük, orta ve yüksek anöploidi riski olan üç grup tanımlanmıştır. Bunların anöploidi oranları sırasıyla %36, %69 ve %100 olarak belirlenmiştir ⁽⁹⁾. Bu anöploidi risk modeli daha sonra preimplantasyon genetik tanı (PGT) endikasyonu olmayan infertil hasta grubunda da retrospektif olarak test edilmiş ve hem implantasyon hem de klinik gebelik ile ilişkilendirilmiştir ⁽¹⁰⁾.

Dolayısıyla, bu tez çalışmamızın amacı, kendi IVF laboratuvarımızın koşullarına uygun, 5. günde biyopsi uygulanmış embriyoların morfokinetik verilerini retrospektif olarak değerlendirerek öploid blastosist oluşum 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 ⁽¹¹⁾. 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 ⁽¹²⁾. Mikroenjeksiyon işlemi yapılacak olan steril, toksik olmayan plastik kaptaki, önce erkeğe ait sperm 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. 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.

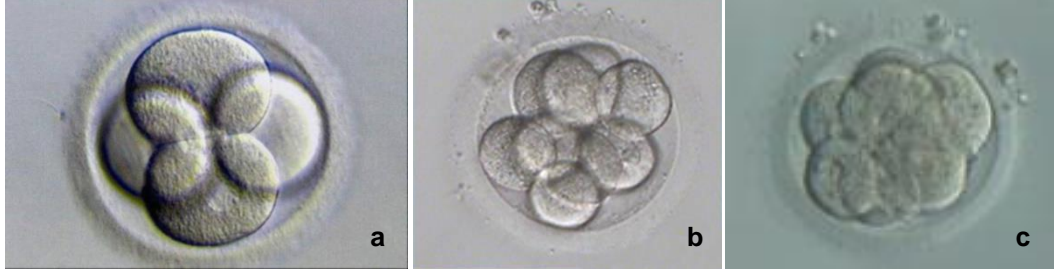


Şekil 2-3: İki pronukleus gözlenen normal döllenmiş zigot (Fotoğraf Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

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 ⁽¹³⁾.

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 ⁽¹³⁾

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) ⁽¹³⁾.



Şekil 2-5: Dördüncü günde embriyolar; a. On 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).

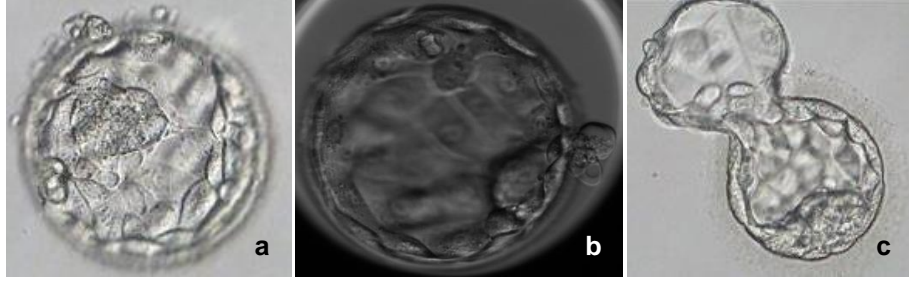
Tablo 2-2: Embriyo gelişiminin dördüncü gününde sınıflama ⁽¹³⁾

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 skorumda 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: İç hücre kitlesi skoruması (1)

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

Tablo 2-5: Dış hücre kitlesi (trofektoderm) skoruması (1)

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

2.6. Assisted Hatching İşlemi (AHA)

Embriyonun rahime tutunması, embriyoyu çevreleyen glikoprotein yapısındaki zardan (*zona pellucida*, ZP) embriyonun dışarı tomurcuklanmasıyla (*hatching*) başlar. Tomurcuklanma, embriyo gelişiminin beşinci veya altıncı günü blastosist aşamasına ulaştıktan sonra gerçekleşir ve embriyonun rahim içinde tutunabilmesi tamamıyla zardan çıktığında mümkün olur. Doğal olarak gerçekleşen bu tomurcuklanmanın yanında YÜT'te embriyo gelişiminin beşinci gününde uygulanacak trofektoderm biyopsi işlemi öncesi de yapay olarak ZP açılır (*assisted hatching*, AHA). Zira, embriyodan hücre almak için ZP'nin açılması gerekmektedir. Dolayısıyla, biyopsi işlemi öncesi, embriyo gelişiminin üçüncü gününde embriyoyu çevreleyen ZP'nin açılması (AHA) lazer ışını ile sağlanmaktadır (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Lazer ışını ile üçüncü gün embriyosunun zarında oluşturulmuş açıklık görülmektedir. Lazer ışını ile *assisted hatching*, embriyonun bulunduğu kültür ortamında, herhangi bir kimyasal kullanılmadan uygulanır. Ayrıca, lazer ile yapılan açıklık bilgisayar kontrollü ve mikrosaniye süreli olduğundan son derece güvenlidir (Fotoğraf Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

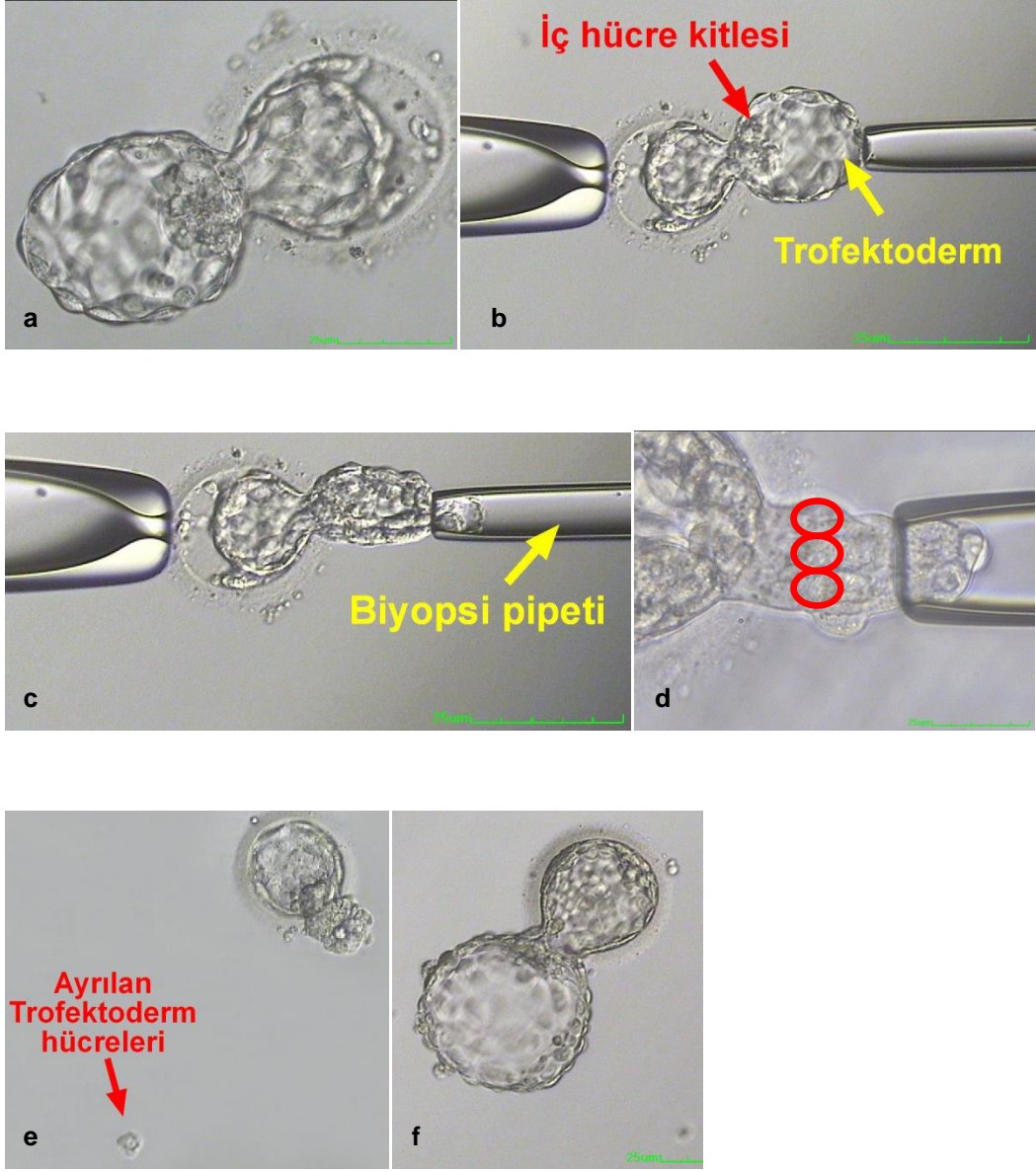
2.7. Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) Uygulamasında Trofektoderm Biyopsi Yöntemi

YÜT tedavisiyle oluşturulan embriyolar, anne rahmine yerleştirilmeden önce genetik açıdan incelenebilir. Böylece sağlıklı embriyonun seçimi gerçekleştirilebilir. Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT), embriyoların anne rahmine yerleştirilmeden önce genetik ve kromozomal yönden incelenmesi işlemidir. Çeşitli endikasyonlar sebebiyle (tekrarlayan gebelik kayıpları, translokasyon ya da inversiyon taşıyıcılığı, anomalili fetüs öyküsü, ileri anne yaşı) IVF'e başvuran infertil çiftlere, genetik danışmanlık hizmeti verilmekte ve onamları alınarak PGT planlanmaktadır.

Blastosist aşamasında embriyonun toplam hücre sayısı yaklaşık 40-150'dir. Blastosist biyopsisinde yalnızca trofektoderm hücrelerinden dört ila altı hücre alınarak iç hücre kitlesine dokunulmaz. Biyopsi ile alınan hücre sayısı arttığı için genetik incelemede tanı koyma

başarısı yükselir. Bunun yapılabilmesi için beşinci güne ulaşmış blastosist evresindeki embriyonun dış hücre tabakasından (trofektoderm) yüksek büyütme altında mikropipet yardımıyla dört ila altı hücre alınıp analiz için genetik laboratuvarına teslim edilmektedir (Şekil 2-8). Bu örnekler 12-24 saatte array komparatif genomik hibridizasyon (aCGH) ile incelenerek genetik tanı konulmaktadır. Buna göre embriyoların kromozom sayılarında azalma ya da artış (anöploidi) tespit edilebilmekte ve normal sayıda kromozom içeren embriyoların (öploidi) transferi yapılmaktadır.

PGT ile kromozomal anormalilerin saptanmasının avantajları; embriyonun rahim içine tutunması ve gebelik şansının artması, düşük riskinin azalması, kromozomal açıdan normal bir bebek sahibi olma şansının artmasıdır. Diğer yandan ağır erkek kısırlığı ile başvuran çiftlerde altta yatan sebebin yüksek oranda genetik kaynaklı olduğu gözlenmektedir. Bu çiftlerde de öncelikle erkeğin spermlerinde genetik analiz yapılarak durumun saptanması, ardından embriyolarda genetik tanı yapılması ve sağlıklı embriyoların transferi gebelik şansını önemli oranda arttırmaktadır.



Şekil 2-8: Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) uygulamasında trofektoderm biyopsi yöntemi a. Biyopsi öncesi blastosist aşamasındaki embriyo b. Embriyo holding pipet ile tutulur c. Dört ila altı trofektoderm hücresi biyopsi pipeti ile aspire edilir d. Lazer ışınları yardımı ile trofektoderm hücreleri blastosisten ayrıştırılır e. Biyopsi ile alınan trofektoderm hücreleri f. Biyopsi sonrası normal gelişimine devam eden blastosist (Fotoğraflar Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

2.8. Embriyo Transferi

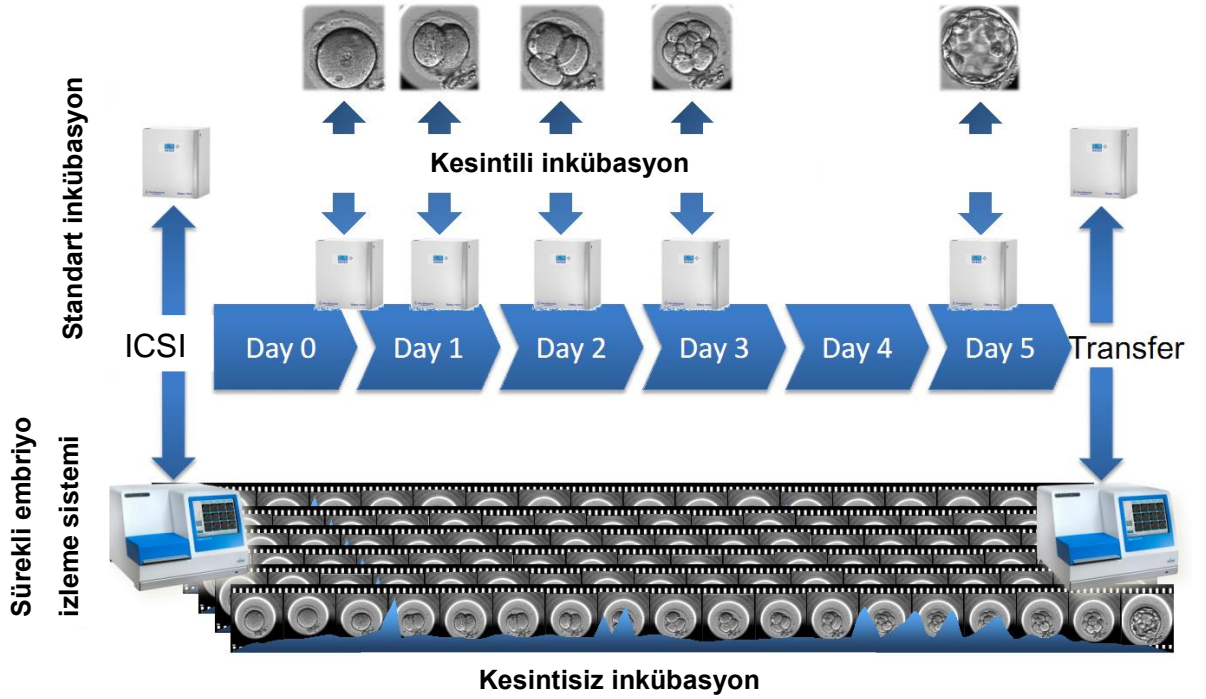
Embriyoların rahim içinde verileceği en uygun yerin tespit edilmesi ve rahim içi zarına dokunulmaması açısından, embriyo transfer işleminin dolu mesane ile ve ultrasonografi eşliğinde yapılması tercih edilmektedir. Bu şekilde rahim ağzı ve rahim arasındaki açığı tespit edilerek, transfer kateterinin 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.

2.9. 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 ⁽¹⁻²⁻¹⁴⁻¹⁵⁾. 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 ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.

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 ⁽³⁻⁴⁻¹⁸⁻¹⁹⁾. 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 2-9).



Şekil 2-9: 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 değerlendirmeyle kısıtlanmışken SEİS'lerde morfolojiye zaman boyutu da eklenerek kinetik değerlendirme de yapılabilmektedir ⁽¹⁻³⁻⁷⁾.

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

2.10. 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 ⁽²⁰⁾.

Dal Canto ve arkadaşları ⁽²¹⁾ 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 düşünölmelidir ⁽²²⁾.

Ayrıca, SEİS'ler PN morfolojilerinin değışkenliğini de göstermiş ve PN değerdirmesine göre yapılan embriyo seçiminin yanıltıcı olabileceğine dikkat çekmiştir ⁽²³⁾. Ancak PN'lerin silinme zamanının implantasyona yönelik önemli bir bulgu olduğu bir çalışmada gösterilmiş ve 20.45 saatin altında canlı doğum olmadığı bildirilmiştir ⁽²⁴⁾.

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 blastölasyon ve tam blastosist olma zamanları ile ilişkilendirmiş ve anöploidiye yönelik bir risk modeli oluşturmuştur ⁽⁹⁾. Buna göre anöploidi riski düşük (%36), orta (%69) ve yüksek (%100) olarak tanımlanmıştır. Blastölasyon 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 ⁽¹⁰⁾.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

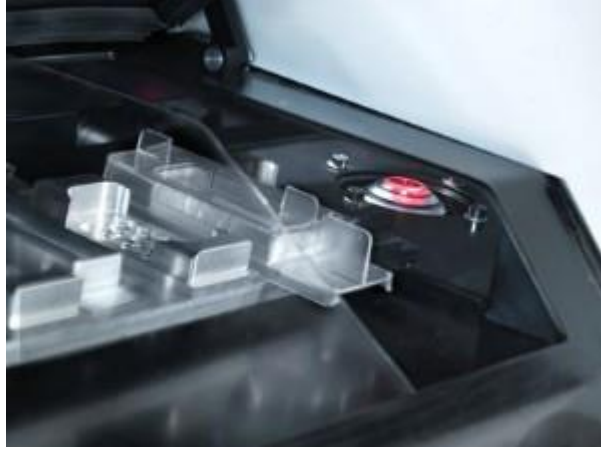
3.1. Retrospektif Kohort Çalışmasının Temelleri

Çalışmamız için İstanbul Acıbadem Üniversitesi'nin Tıbbi Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu'ndan gerekli etik kurul onayı alındı (Konu: ATADEK 2013-519, Sayı: B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/1956).

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 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®).

Çeşitli endikasyonlar sebebiyle (tekrarlayan gebelik kayıpları, translokasyon ya da inversiyon taşıyıcılığı, anomalili fetüs öyküsü, ileri anne yaşı) IVF'e başvuran infertil çiftlere, genetik danışmanlık hizmeti verilmekte ve onamları alınarak PGT planlanmaktadır. Bunun yapılabilmesi için beşinci güne ulaşmış blastosist evresindeki embriyonun dış hücre tabakasından (trofektoderm) yüksek büyütme altında mikropipet yardımıyla 4-6 hücre alınıp analiz için genetik laboratuvarına teslim edilmektedir. Bu örnekler 12-24 saatte aCGH ile incelenerek genetik tanı konulmaktadır. Buna göre embriyoların kromozom sayılarında azalma ya da artış (anöploidi) tespit edilebilmekte ve normal sayıda kromozom içeren embriyoların (öploidi) transferi yapılmaktadır.

Çalışmamız kapsamında geriye yönelik bu verileri inceleyerek bölünme zamanları ve bunlar arasındaki oransal ilişkiyi embriyonun öploid ya da anöploid olması ile ilgili prediksyon amaçlı kullandık. Dolayısıyla, hiç bir hastanın tedavi süreci etkilenmedi, embriyolarına tedavi için planlanan PGT dışında herhangi invazif bir işlem uygulanmadı sadece veritabanımızdaki embriyo kayıtları istatistiksel yöntemlerle incelenerek laboratuvarımıza özgü kinetik bir anöploidi/ öploidi karşılaştırmasının yapılması amaçlandı.

3.2. Çalışmaya Dahil Olan Olguların Özellikleri

Bu çalışma Şişli Memorial Hastane'si Tüp Bebek Laboratuvarı'nda Ekim 2011-Kasım 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.

Araştırmaya dahil olan hastalar IVF uygulamalarını Şişli Memorial Hastanesi'nde yaptırdı ve embriyoları ise time-lapse inkübatörde (EmbryoScope®) takip edildi. Ayrıca, bu hastaların aşağıda belirtilen endikasyonlar sebebiyle beşinci günde embriyolarına PGT uygulandı, ve dolayısıyla, üçüncü günde biyopsi yapılmış embriyolara sahip hastalar çalışmadan dışlandı:

- Tekrarlayan gebelik kayıpları (≥ 2)
- Anomalili fetüs öyküsü
- İleri anne yaşı (≥ 38)

Sunulan retrospektif gözlemsel kohort çalışması blastosist transferi uygulanmış ve çeşitli infertilite sebeplerinden dolayı merkezimize müracaat etmiş toplam 88 hastanın 94 siklus verisini içermektedir (Tablo 3-1). Daha detaylı bakacak olursak, çalışma 1059 kümülüs oosit kompleksi ve 868 metafaz II oosit içermektedir. Vakaların tüm oositleri ICSI yöntemiyle döllenmiş olup, bunlardan gelişen embriyolar bir SEİS olan EmbryoScope™ inkübatöründe (Unisense Fertilitatech, Aarhus, Danimarka) takip edilip standart YÜT uygulamasına tabii tutulmuşlardır.

Tablo 3-1: Çalışmaya dahil olan 88 hastanın özellikleri. Sayılar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Kadın yaşı	34.92 \pm 5.44
Vücut kitle indeksi (kg/m²)	25.30 \pm 4.60
Önceki deneme sayısı	2.39 \pm 2.52
Toplanan oosit sayısı	10.98 \pm 6.10
Metafaz II oosit sayısı	8.98 \pm 4.73

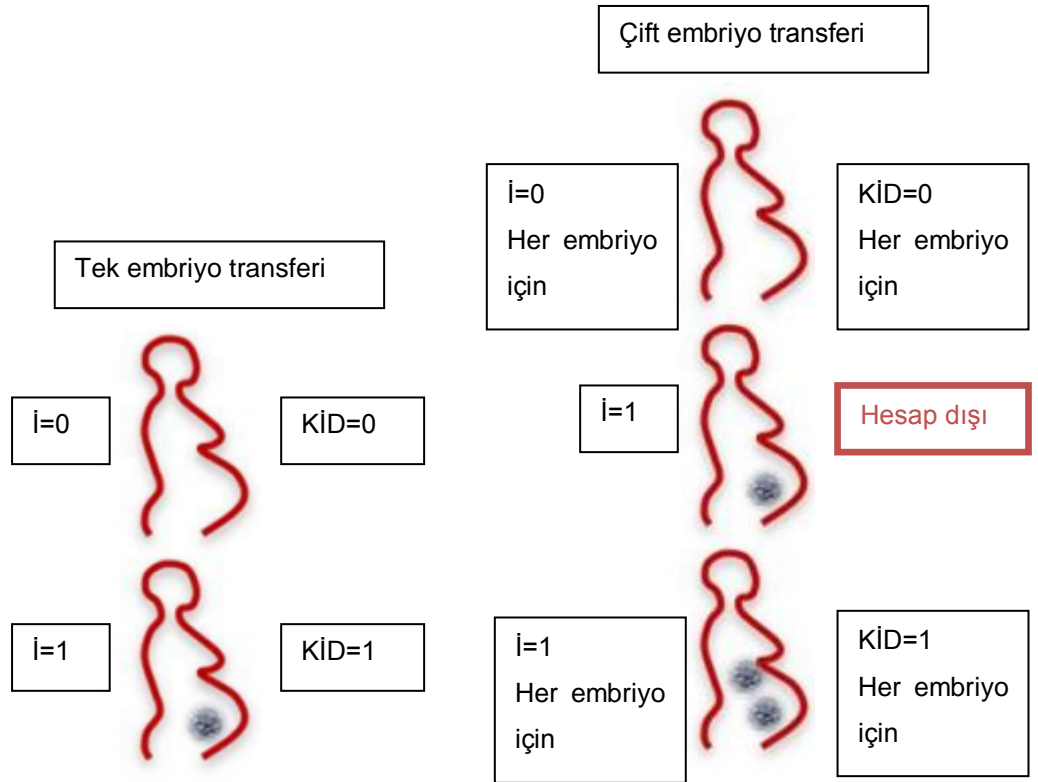
3.3. Ovaryum Stimülasyonu ve Siklus Takibi

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 sayısı ile 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 hiyalüronidaz 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. Trofektoderm Biyopsi İşlemleri

Trofektoderm biyopsi uygulanacak embriyolar gelişimlerinin üçüncü gününde dış blastomerler arası oluşan kavitenin üzerindeki ZP'den her biri 8 milisaniye gücünde ve 10 µm genişliğinde lazer atışı ile açılırlar. Blastosist evresine geldiklerinde embriyolar üzeri önceden ısıtılmış parafin yağı (LifeGlobal®, Seattle, ABD) ile kaplanmış ve HEPES'li Ca^{2+} / Mg^{2+} içeren embriyo kültür sıvısına (Life Global®, Seattle, ABD) alınırlar. Biyopsi kabı işleminden en az 20 dakika önce hazırlanarak 37°C'de ısıtılır. İç çapı 30 µm olan biyopsi pipeti ile dört ila altı trofektoderm hücresi yavaş ve dikkatli bir şekilde aspire edilir.

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 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. Sekiz hücre evresinden sonra gelişimini durdurmuş embriyolar ise GDE olarak kaydedildiler.

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 ya da 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

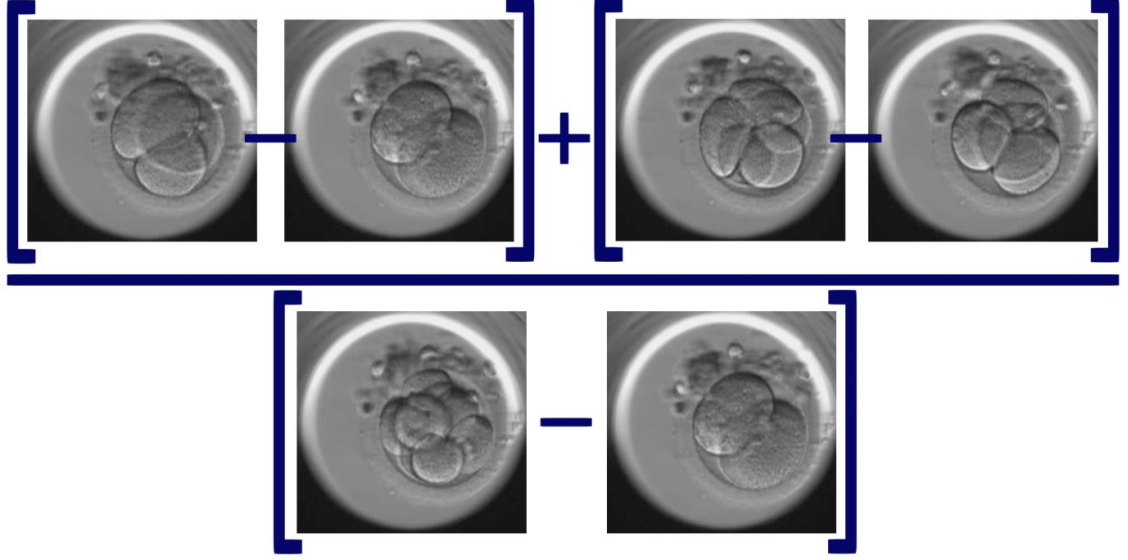
Elde edilen veriler öncelikle EmbryoViewer® bilgisayarına otomatik olarak kaydedildi ve buradan analiz için Microsoft Excel'e aktarıldı. Sürekli değişkenlerdeki istatistiksel anlamlı farklılık, uygun oldukları durumlarda *Student's T* ve *Mann-Whitney U* testi kullanılarak incelendi. Kategorik veriler, iki ve dört hücre aşamalarında blastomer boyutları, direkt klivaj ve multinükleasyon *Chi-Square* testi ile değerlendirildi. 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.

Öploid ve anöploid insan embriyolarının karşılaştırmalı kinetik analizini yapmak amacıyla bölünmelerin sayısal zamanlamalarının yanında (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, tM, TSB, tB, tEB) üç kinetik denklem, üç morfolojik gözlem ve excel tabanlı hesaplamalar 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:** Beş hücreden sekiz hücreye geçiş zamanı (**t8-t5**)
- **Morfolojik değerlendirme 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 kriteri 2:**
direkt klivaj bulgusu

Bir blastomerden üç blastomere doğrudan geçiş olarak tanımlanmıştır.

- **Morfolojik değerlendirme kriteri 3:**
multinükleasyon bulgusu

İki ve/ veya dört hücre evrelerinde bir blastomerde bir çekirdekten fazla görülmesi olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

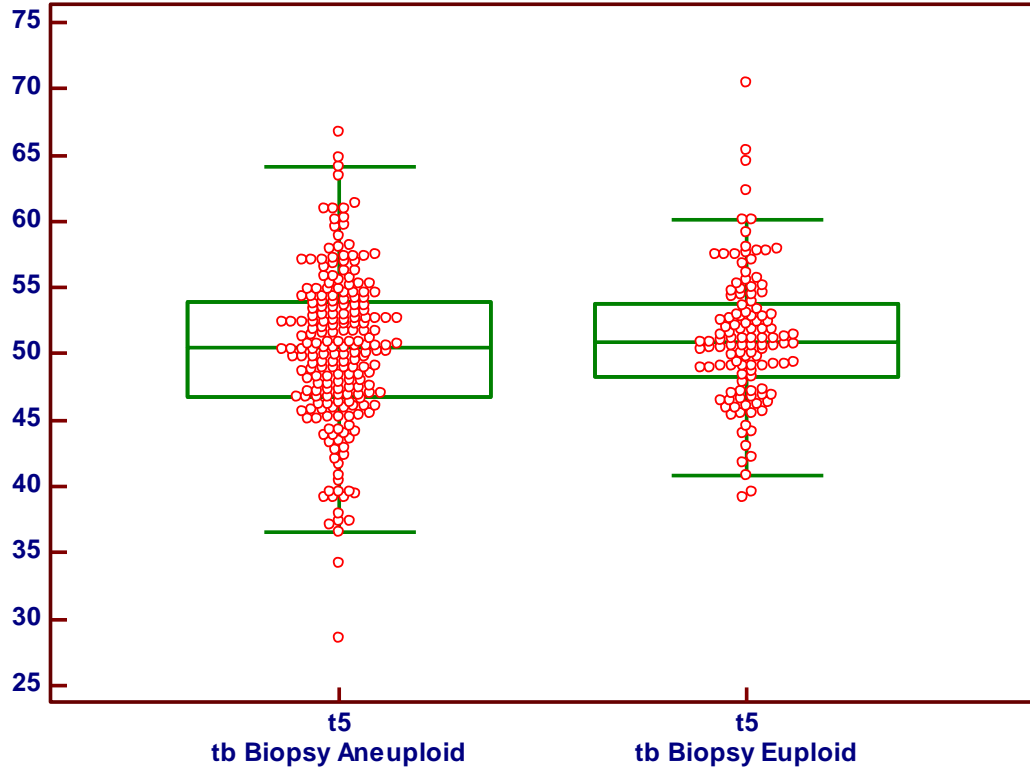
4.1. Mitoz Bölünmelerin Sayısal Zamanlamalarının ve Kinetik Denklemlerin Karşılaştırması

İncelenen mitoz bölünmelerin sayısal zamanlamaları erken dönemde (sekiz hücre öncesi) öploid ve anöploid embriyolar açısından anlamlı farklılık göstermemektedir (Tablo 4-1; Şekil 4-1).

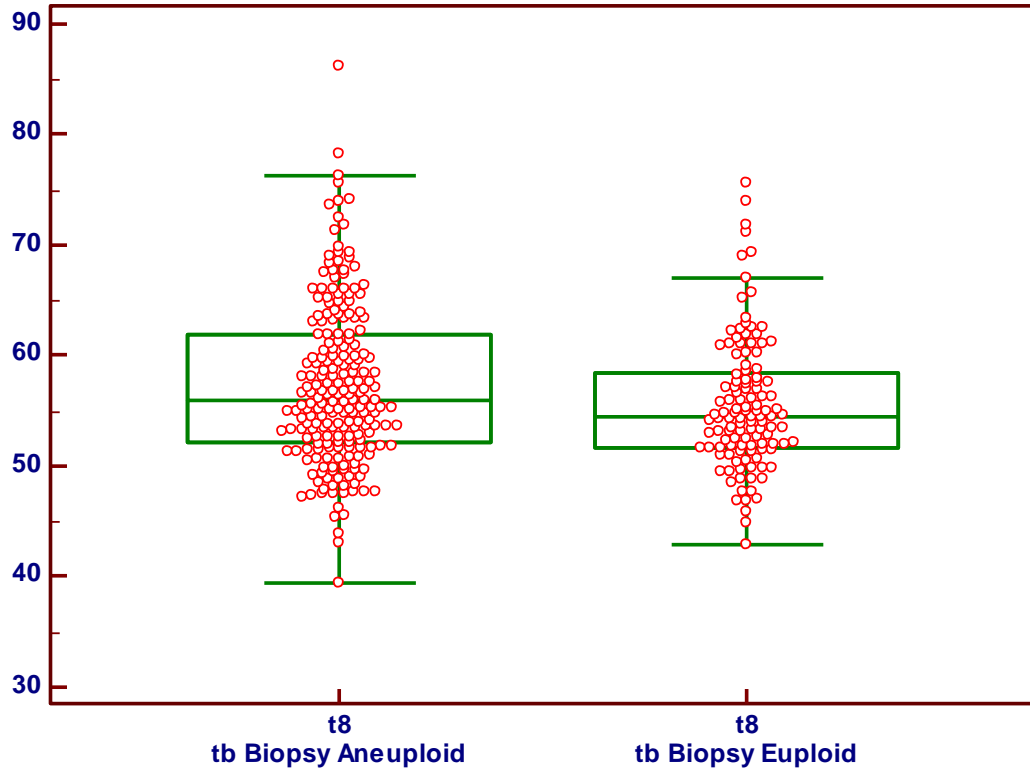
Tablo 4-1: Bölünmelerin sayısal zamanlamalarının ve üç kinetik denklemin anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması

	Anöploid embriyolar (n=216)		Öploid embriyolar (n=120)		
	Ortalama	%95 CI	Ortalama	%95 CI	p
t2	26.279	25.892 - 26.666	26.057	25.578 - 26.537	0.5097
t3	37.472	36.944 - 38.000	37.441	36.801 - 38.080	0.6417
t4	38.628	38.105 - 39.150	38.261	37.618 - 38.903	0.2276
t5	50.218	49.438 - 50.997	51.214	50.300 - 52.128	0.2416
t6	52.196	51.490 - 52.902	52.514	51.616 - 53.413	0.9286
t7	54.249	53.460 - 55.038	53.956	53.015 - 54.896	0.7024
t8	57.297	56.326 - 58.268	55.566	54.487 - 56.645	0.0316
t9+	69.482	68.381 - 70.582	70.781	69.498 - 72.064	0.1633
tM	85.531	84.350 - 86.711	84.063	82.639 - 85.486	0.1841
tSB	97.598	96.453 - 98.744	95.592	94.278 - 96.907	0.0097
tB	105.268	104.164 - 106.372	102.092	100.791 - 103.393	0.0002
tEB	111.488	110.388 - 112.588	108.216	106.899 - 109.533	0.0002
t8-t5	7.079	6.223 - 7.935	4.352	3.729 - 4.976	0.0005
CS2-8	0.754	0.727 - 0.780	0.830	0.806 - 0.855	0.0002
CS4-8	0.350	0.316 - 0.385	0.242	0.213 - 0.271	0.0002

Sekiz hücreye ulaşma zamanı iki grup arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p=0.0316$) (Şekil 4-2).

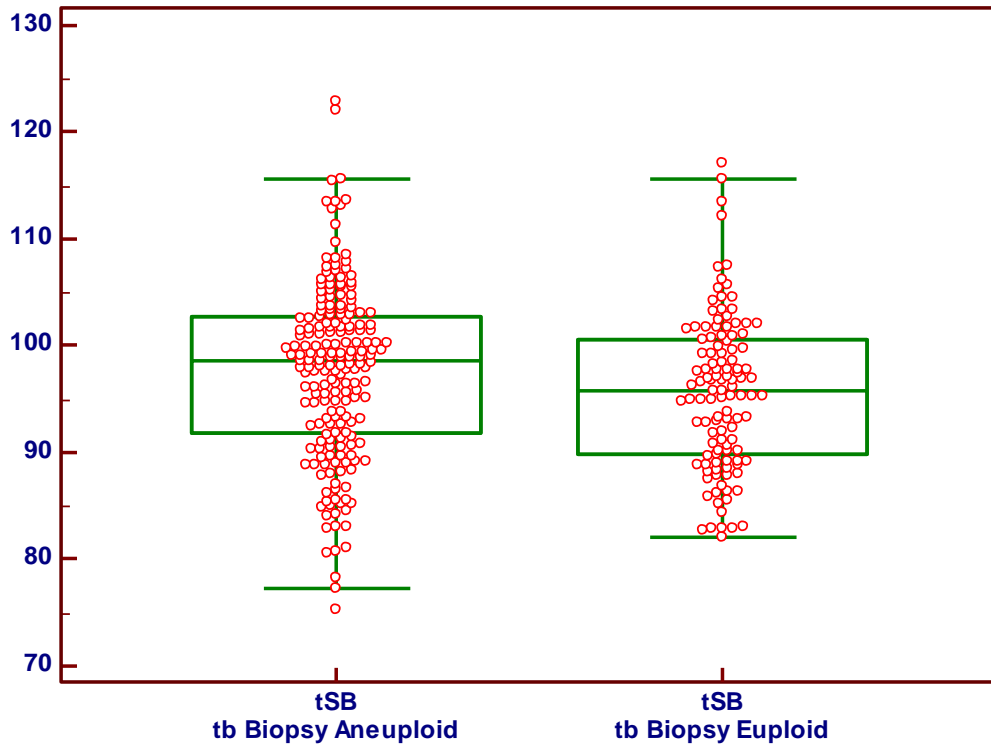


Şekil 4-1: Beş hücreye bölünme zamanının (t5) anöplid ve öplid embriyolar arası karşılaştırması ($p=0.2416$).

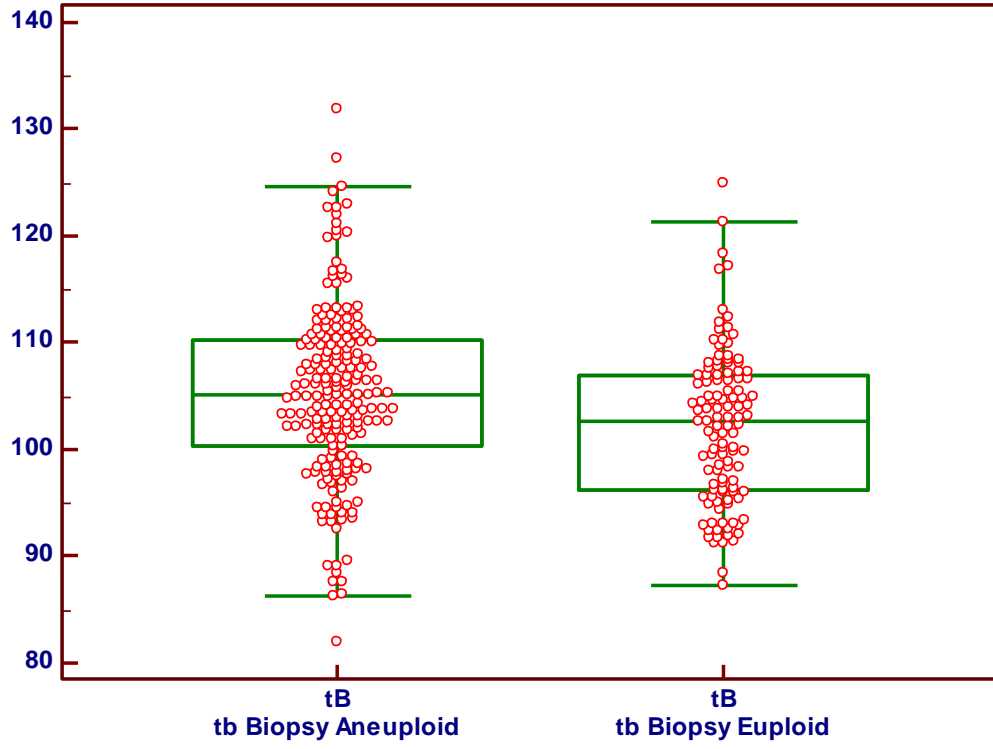


Şekil 4-2: Sekiz hücreye bölünme zamanının (t8) anöplid ve öplid embriyolar arası karşılaştırması (p=0.0316).

Ayrıca blastülasyon zamanı (tSB), blastosiste ulaşma zamanı (tB) ve blastosel kavitesinin en geniş olduğu zaman (tEB) öploid ve anöploid embriyolar arasında anlamlı derecede farklı görülmüştür (Tablo 4-1; Şekil 4-3; Şekil 4-4; Şekil 4-5). Son olarak, incelenen üç kinetik denklem de (CS 2-8; CS 4-8; t8-t5) gruplar arası anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

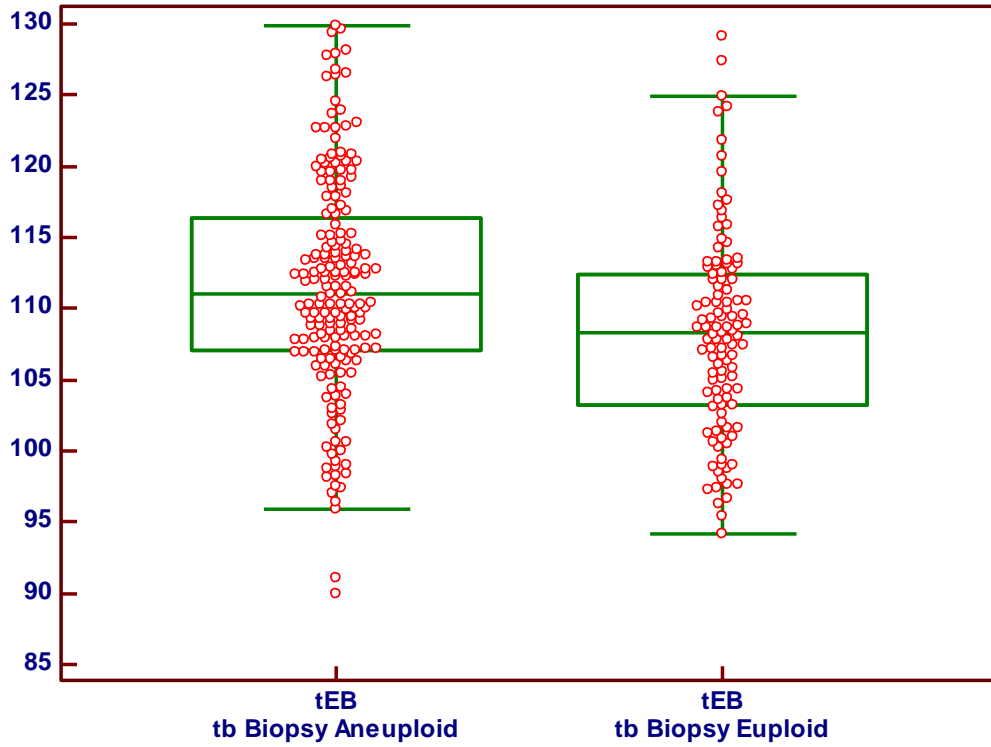


Şekil 4-3: Blastülasyon zamanının (tSB) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması (p=0.0097).



Şekil 4-4: Blastosist evresine ulaşma zamanının (tB) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması (p=0.0002).

Blastosistin genişleyip Gardner'a göre 3-4 evresine ulaşma zamanı (tEB) anöploid ve öploid embriyolar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0.0002$) (Şekil 4-5). tEB zamanı bu iki grup arasında karşılaştırıldığında, $tEB \leq 102$ saat ve öncesinde olan embriyoların öploid oranının %53.33 oranına ulaştığı bulunmuştur. Bu zaman $102 < tEB \leq 114$ saat aralığında olduğunda öploid oranı %39.01'e, $tEB > 114$ saat olduğunda ise öploid oranı %23.37'ye düşmektedir.

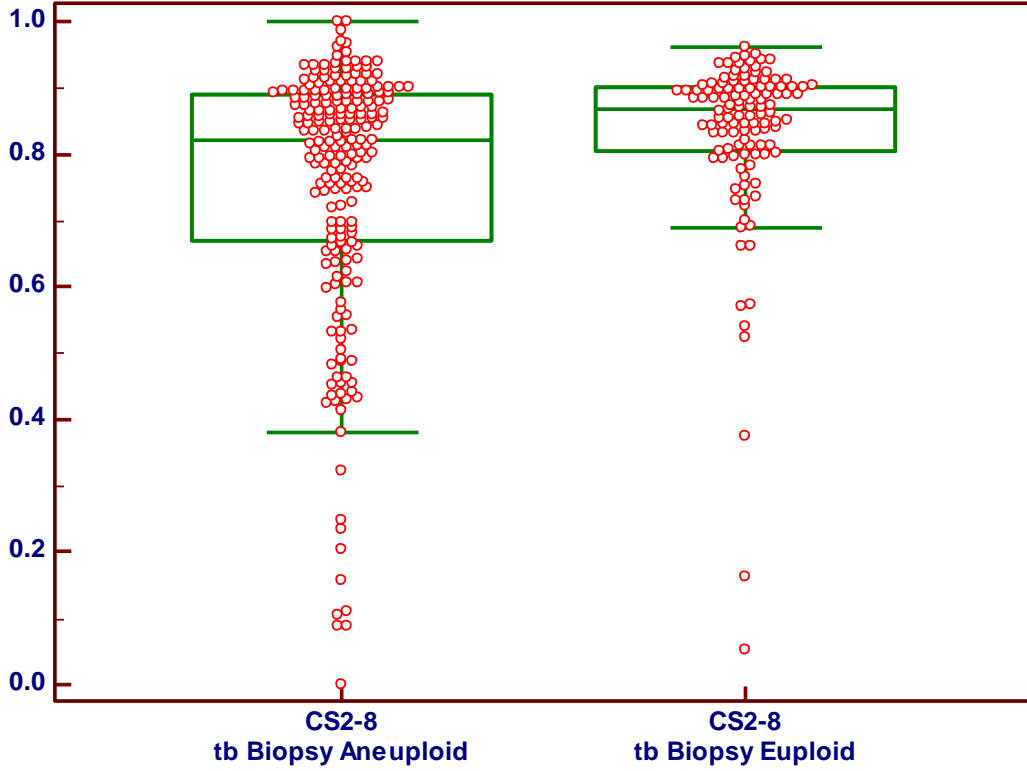


Şekil 4-5: Blastosistin genişleyip Gardner'a göre 3-4 evresine ulaşma zamanının (tEB) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması ($p=0.0002$).

4.2. İki Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi:

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

KS2-8 denkleminin 0.8-1.0 aralığında sonuç vermesi halinde söz konusu embriyonun öploid olma olasılığı %43.25 oranına ulaşmaktadır. Bu oran 0.6-0.8 değerleri için %26.31 olarak hesaplanmıştır. KS2-8'in sonucu 0.6 ve altında ise embriyonun sadece %15.55 öploid olma olasılığı bulunmaktadır (Şekil 4-6).

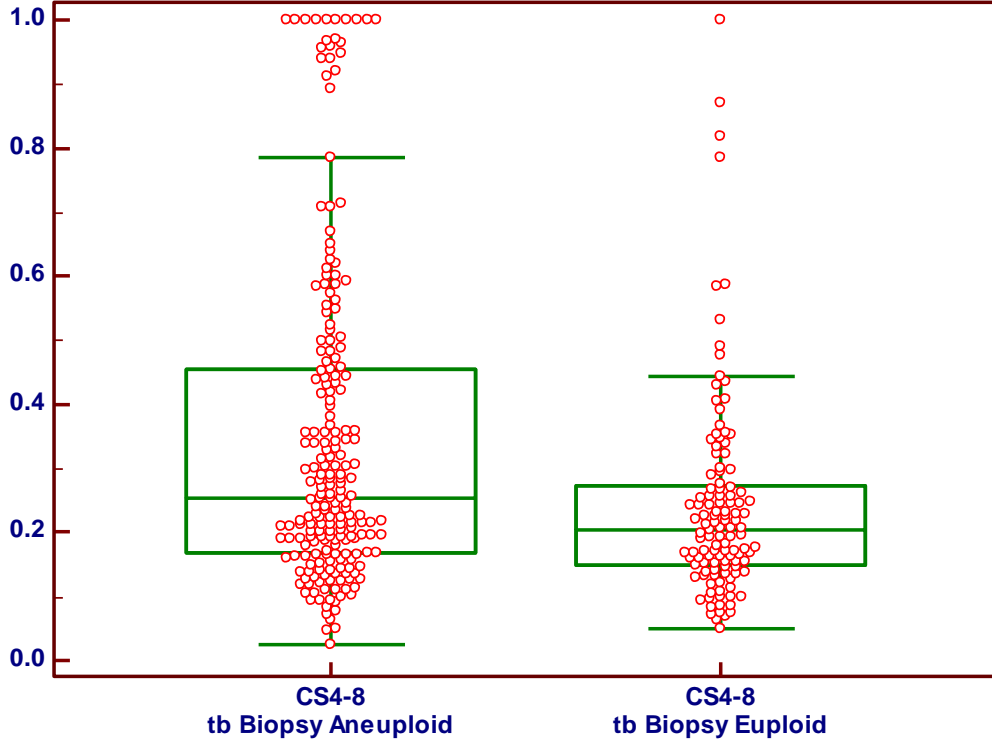


Şekil 4-6: İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesinin (KS2-8) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması (p=0.0002).

4.3. Dört Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi:

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

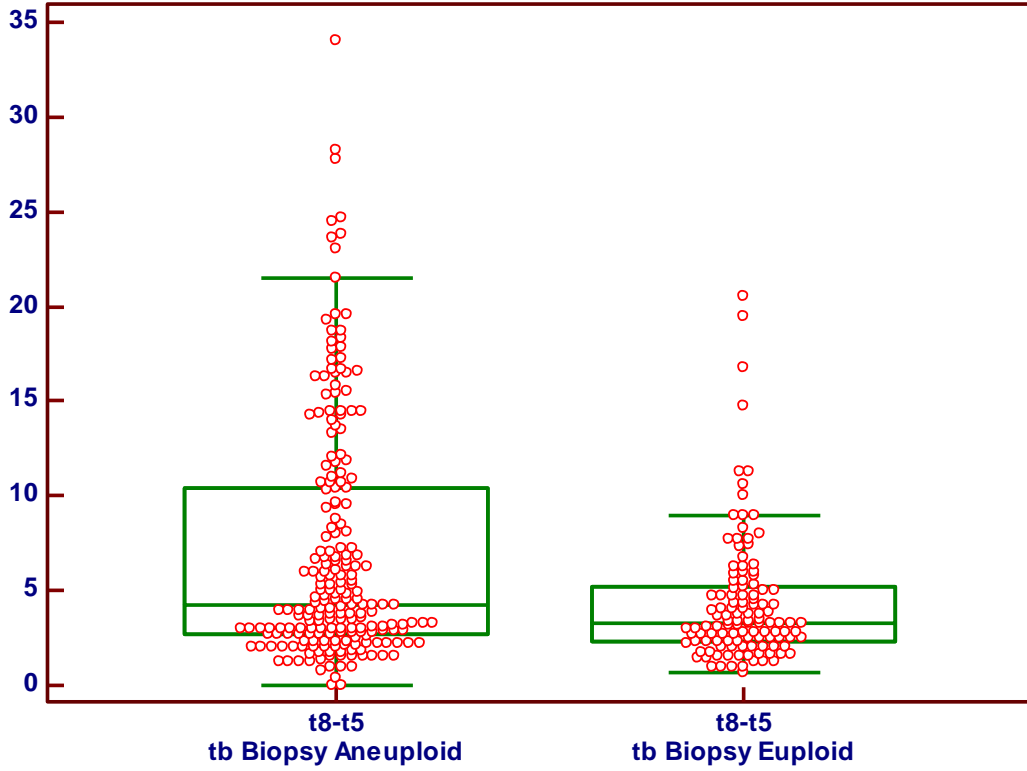
Bu denklemin sonuçları KS2-8'e benzer bir eğilim göstermektedir (Şekil 4-7). KS4-8 denklem sonucunun 0-0.2 arası olması halinde embriyonun öploid olma olasılığı %44.03 olarak hesaplanmıştır. Oranının değeri arttıkça (0.2'den 0.8'e), kademeli olarak öploid oranı %38.84'ten %17.72'ye düşmektedir.



Şekil 4-7: Dört hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesinin (KS4-8) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması (p=0.0002).

4.4. Beş Hücreden Sekiz Hücreye Ulaşma Zamanı (t8-t5):

Embriyo beş hücreden sekiz hücreye ne kadar çabuk geçerse, öploid oranı o kadar yüksek bulunmuştur (Şekil 4-8). Altı saat içerisinde embriyo beş hücreden sekiz hücreye ulaşırsa öploid oranı %41.6-%44.44 olarak bulunmuştur. Altı saat ve sonrasında ise öploid oranı %22.01'e kadar düşmüştür.



Şekil 4-8: Beş hücreden sekiz hücreye ulaşma zamanının (t8-t5) anöploid ve öploid embriyolar arası karşılaştırması (p=0.0005).

4.5. Morfolojik Değerlendirme Kriterleri

4.5.1. İki Hücre Evresinde Eşit Olmayan Blastomer Varlığı

İki hücre evresinde blastomerler eşit değilse embriyonun anöploid olma olasılığı %71.4 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4-2). Ancak, eşit blastomer varlığında da anöploid olma olasılığı %63.3 olarak bulunmuştur. Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p= 0.3894$).

Tablo 4-2: Öploid oranlarının iki hücre evresinde eşit ya da eşit olmayan blastomer boyutlarına göre karşılaştırması.

	Eşit değil	Eşit
Anöploid	30 (%)	186
Öploid	12	108

4.5.2. Dört Hücre Evresinde Eşit Olmayan Blastomer Varlığı

Dört hücre evresinde blastomerler eşit değilse embriyonun anöploid olma olasılığı %66.7 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4-3). Ancak, eşit blastomer varlığında da anöploid olma olasılığı %63.2 olarak bulunmuştur. Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p= 0.6232$).

Tablo 4-3: Öploid oranlarının dört hücre evresinde eşit ya da eşit olmayan blastomer boyutlarına göre karşılaştırması.

	Eşit değil	Eşit
Anöploid	70	146
Öploid	35	85

4.5.3. Direkt Klivaj Bulgusu

Mitoz bölünmeler esnasında direkt klivaj görülmesi (bir blastomerin iki yerine üç hücreye bölünmesi) embriyonun anöplöid olma olasılığını %82.8 oranına yükseltmektedir (Tablo 4-4). Bu değer direkt klivaj görülmemiş ise %62.5 olarak bulunmuştur. Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p= 0.0489$).

Tablo 4-4: Öplöidi oranlarının embriyoda direkt klivaj (DK) varlığına göre karşılaştırması.

	DK Yok	DK Var
Anöplöid	192	24
Öplöid	115	5

4.5.4. Multinökleasyon Bulgusu

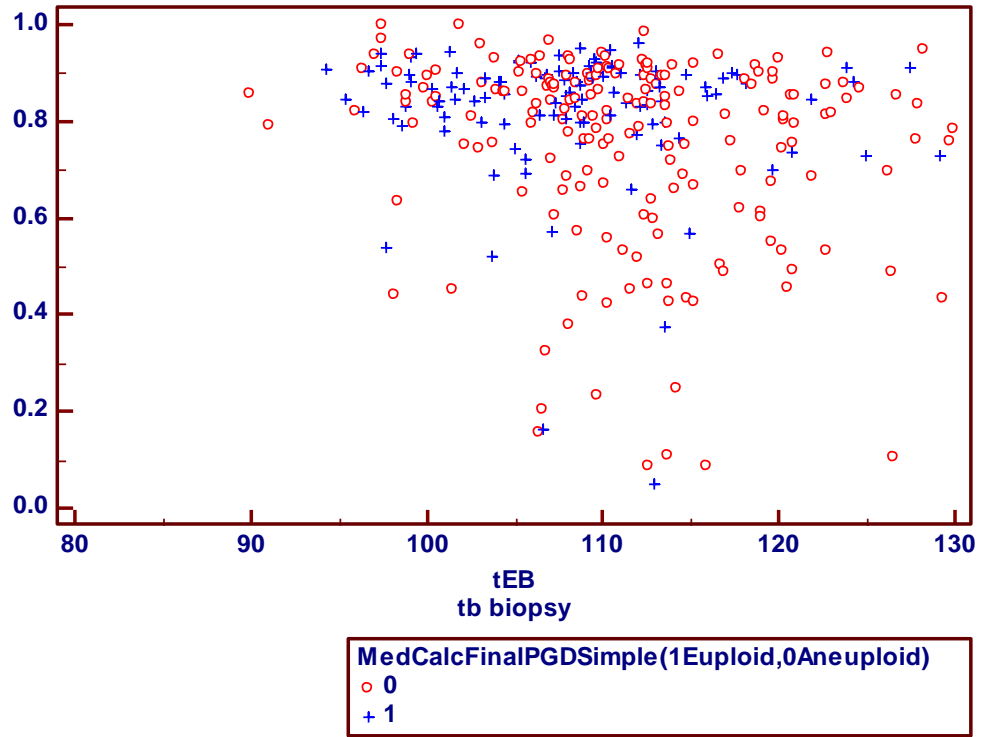
Mitoz bölünmeler esnasında blastomerlerde multinökleasyon (birden fazla çekirdek görülmesi) embriyonun anöplöid olma olasılığını %69 oranına yükseltmektedir (Tablo 4-5). Ancak, bu değer multinökleasyon görülmemiş ise %62.3 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p= 0.2940$).

Tablo 4-5: Öplöidi oranlarının embriyoda multinökleasyon (MN) varlığına göre karşılaştırması.

	MN Yok	MN Var
Anöplöid	147	69
Öplöid	89	31

4.6. İki Hücreden Sekiz Hücreye Geçiş Evresinin Klivaj Senkronitesi (KS2-8) ve Blastosistin Genişleme Zamanının (tEB) Beraber Değerlendirilmesi

İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi (KS2-8) ve blastosistin genişleme zamanı (tEB) beraber değerlendirildiğinde, $0.8 < KS2-8 \leq 1$ ve $tEB \leq 102$ saat için öploidi oranı %56.75'e ulaşmaktadır. En kötü senaryo olan $KS2-8 \leq 0.8$ ve $tEB > 114$ saat için ise öploidi oranı %15.78'e düşmektedir (Şekil 4-9; Tablo 4-6).



Şekil 4-9: İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesinin (KS2-8) blastosistin genişleme zamanı (tEB) ile değerlendirilmesi ve anöploid, öploid embriyolar arası karşılaştırması.

Tablo 4-6: Öplöidi oranlarının iki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi (KS2-8) ve blastosistin genişleme zamanı (tEB) ile değerlendirilmesi.

Öplöidi %	tEB ≤ 102	102 < tEB ≤ 114	tEB > 114
0.8 < KS2-8 ≤ 1	%56.75		%30.76
KS2-8 ≤ 0.8			%15.78

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 ⁽²⁵⁻²⁶⁾.

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 seyredilemek 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 ⁽²⁷⁾.

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 ⁽²⁸⁻²⁹⁻³⁰⁾. Dolayısıyla, yaygın kullanım için oluşturulacak blastosist, implantasyon ve/ veya anöploidi prediksyon algoritmalarında bölünme zamanlarının tam değerleri kullanılmamalıdır. Ancak, laboratuvarımızda oluşturulan iki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi (KS2-8) ve dört hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesi (KS4-8) her tüp bebek laboratuvarına kendi kinetik verisini esnek olarak inceleme olanağı tanımakta ve embriyo gelişiminin dinamiğini daha iyi tercüme edebilmektedir (Çetinkaya et al., yayın aşamasında).

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.

Tez çalışmamızda, beşinci günde aCGH yöntemi ile PGT uygulanmış embriyoların retrospektif olarak kinetik verilerinin değerlendirilmesi için kullandığımız KS2-8'e benzer olarak, dört hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesini de (KS4-8) kullandık. KS4-8 dört hücreden sekiz hücre evresine geçerken embriyonun zamansal olarak beş, altı ve yedi hücre evrelerinde ne kadar kaldığını göstermektedir. Yararlanılan üçüncü formül, beş hücreden sekiz hücreye ulaşma zamanıdır (t8-t5). Ayrıca, dört morfolojik değerlendirme kriteri de kullanılmıştır; iki ve dört hücre evrelerinde eşit olmayan blastomer varlığı, direkt klivaj ve multinükleasyon bulguları.

Embriyonun mitotik senkronitesini değerlendiren KS2-8 ve KS4-8 formülleri öploid ve anöploid embriyolar için karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur; öploid embriyolar daha senkron bölünmektedir. Ayrıca, beş hücreden sekiz hücreye geçiş öploid embriyolar için daha hızlı olmaktadır. Altı saat içerisinde embriyo beş hücreden sekiz hücreye ulaştığında öploid oranı %41.6-%44.44 olarak bulunmuş, altı saat ve sonrasında ise öploid oranı %22.01'e kadar düşmüştür. Morfolojik değerlendirme kriterlerine bakıldığında ise, iki ve dört hücre evrelerinde eşit olmayan blastomer varlığı ve multinükleasyon bulgusu anöploid varlığı ile ilişkilendirilememiştir. Ancak, direkt klivaj varlığı (bir blastomerin iki yerine üç hücreye bölünmesi) embriyonun anöploid olma olasılığını %82.8 oranına yükseltmekte, bu değer direkt klivaj görülmemiş ise %62.5 olarak kalmaktadır.

Ayrıca, blastülasyon zamanı (tSB), blastosist oluşum zamanı (tB) ve blastosistin genişleme zamanı (tEB) öploid embriyolar için daha erken olmaktadır (Tablo 4-1). İki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj

senkonitesi (KS2-8) blastosistin genişleme zamanı (tEB) ile birlikte değerlendirildiğinde, $0.8 < KS2-8 \leq 1$ ve $tEB \leq 102$ saat için öploidi oranı %56.75'e ulaşmaktadır. En kötü senaryo olan $KS2-8 \leq 0.8$ ve $tEB > 114$ saat için ise öploidi oranı %15.78'e düşmektedir. Dolayısıyla, bu modelleme her embriyo için bireysel bir anöploid risk prediksyonu sağlamıştır.

Bu tez çalışmamızda oluşturulan anöploid risk modeli her ne kadar kesin sonuç veren genetik testlerin yerini hiçbir zaman tutamayacak olsa da hem beşinci günde biyopsiye uygun kalitedeki blastosistler arasında önceliklendirme yapabilmek, PGT yaptıracak hastaya en doğru bilgiyi vererek ek maliyetin önüne geçebilmek açısından, hem de rutinde benzer kalitede olan blastosistler arasında morfoljik seçimin ötesine geçerek kinetik bir ayırım yapmak için kullanılabilir. Öte yandan, oluşturulan modelin klinikte kullanımı anöploid riski çok yüksek blastosistlerin transfer edilmemesi yönünden doğrudan implantasyon açısından önemli olacaktır. Zira bu embriyoların klinik gebelik oluşturma ihtimali çok düşüktür.

6. SONUÇ

Tez çalışmamız kapsamında time-lapse görüntüleme tekniği ile öploid ve anöploid insan embriyolarının karşılaştırmalı kinetik analizini gerçekleştirdik. Beşinci günde trofektoderm biyopsisi yapılan ve aCGH yöntemi ile incelenen embriyoların retrospektif olarak bölünme zamanlamalarını ve bunların çeşitli oranlarını araştırdık. Özellikle iki hücreden sekiz hücreye geçiş evresinin klivaj senkronitesini (KS2-8) ve blastosistin genişleme zamanını (tEB) kullanarak bir anöploidi prediksyon modeli oluşturduk. Her ne kadar önerilen bu algoritma kesin sonuç veren genetik testlerin yerini hiçbir zaman tutamayacak olsa da hem beşinci günde biyopsiye uygun kalitedeki blastosistler arasında önceliklendirme yapabilmek, PGT yaptıracak hastaya en doğru bilgiyi vererek ek maliyetin önüne geçebilmek açısından, hem de rutinde benzer kalitede olan blastosistler arasında morfoljik seçimin ötesine geçerek kinetik bir ayırım yapmak için kullanılabilir. Nitekim, morfolojik değerlendirmeler her zaman kişiler arası ve kişinin farklı zamanlarda yapacağı değerlendirme farklılıklarına açıktır. SEİS'lerde ise embriyonun klivaj zamanlarının, morula ve blastosist oluşum zamanlarının belirlenmesi ve kaydedilmesi cihaz tarafından oluşturulmuş videoların geriye alınıp tekrar izlenebilme özelliği sayesinde kullanıcıya kolaylık sağlamış, subjektiviteyi azaltmış ve daha temiz veri eldesini sağlamıştır. Sonuç olarak, insan embriyosunun sekiz hücreye bölünme zamanının (t8), beş hücreden sekiz hücreye geçiş zamanının (t8-t5), blastosist oluşumunun farklı evrelerinin (tSB, tB, tEB) ve laboratuvarımızda tanımlanmış olan klivaj senkronitelerinin (KS2-8 ve KS4-8) anöploid ve öploid embriyolar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiğini bulduk. Dolayısıyla, seçilmiş klivaj döngülerinin zamansal oranları, bu tez araştırmamızda sonuçlarını aktardığımız retrospektif kohort çalışmamızın bireysel analizini sağlamış ve bir anöploidi prediksyon modelinin temellerini atmıştır. Her ne kadar önerilen modelin ileride implantasyon açısından

geliştirilmesi gerekse de gelecekte IVF laboratuvarlarında uygulanarak embriyo seçimine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

7. ÖZET

Time-lapse görüntüleme tekniği ile öploid ve anöploid insan embriyolarının karşılaştırmalı kinetik analizi

Embriyonun kromozom sayısının belirlenmesinde kullanılan tekniklerdeki gelişmeler (örn. array Komparatif Genomik Hibridizasyon (aCGH)) ve sürekli embriyo izleme sistemlerinin IVF laboratuvarlarında kullanılması morfokinetik verilerin genetik tanı ile birleştirilerek kıyaslanmasını sağlamıştır. Bu tez çalışmamızın amacı, kendi IVF laboratuvarımızın koşullarına uygun, beşinci günde biyopsi uygulanmış embriyoların morfokinetik verilerini retrospektif olarak değerlendirerek normal (öploid) ya da artmış/ azalmış (anöploid) kromozom sayısını embriyoya genetik tanı yapmaksızın morfokinetik verileri kullanarak ne ölçüde öngörebileceğimizi araştırmaktır. Çalışmaya, beşinci günde trofektoderm biyopsisi uygulanmış 88 infertil çifte ait 336 embriyo dahil edilmiştir. Bu morfokinetik analiz kapsamında, insan embriyosunun sekiz hücreye bölünme zamanının (t8), beş hücreden sekiz hücreye geçiş zamanının (t8-t5), blastosist oluşumunun farklı evrelerinin (tSB, tB, tEB) ve laboratuvarımızda tanımlanmış olan klivaj senkronitelerinin (KS2-8 ve KS4-8) anöploid ve öploid embriyolar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiğini bulduk. Dolayısıyla, seçilmiş klivaj döngülerinin zamansal oranları, bu tez kapsamında sonuçlarını aktardığımız retrospektif kohort çalışmamızın bireysel analizini sağlamış ve bir anöploidi prediksyon modelinin temellerini atmıştır. Her ne kadar önerilen bu algoritma kesin sonuç veren genetik testlerin yerini hiçbir zaman tutamayacak olsa da hem beşinci günde biyopsiye uygun kalitedeki blastosistler arasında önceliklendirme yapabilmek, preimplantasyon genetik tanı yaptıracak hastaya en doğru bilgiyi vererek ek maliyetin önüne geçebilmek açısından, hem de rutinde benzer kalitede olan blastosistler arasında morfoljik seçimin ötesine geçerek kinetik bir ayırımı sağlaması yönünden embriyo seçimine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sürekli embriyo izleme sistemi, morfokinetik, preimplantasyon genetik tanı, anöplöidi, senkronite.

8. SUMMARY

Comparative kinetic analysis of euploid and aneuploid human embryos using time-lapse imaging

Recent technical improvements in the numerical investigation of human chromosomes (e.g. array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)) and the use of time-lapse imaging systems in IVF laboratories have allowed the comparative analysis of morphokinetic data and genetic diagnoses. The aim of our study was to create and evaluate the predictive capacity of an aneuploidy model using retrospectively the morphokinetic data of embryos generated in our IVF laboratory conditions and biopsied on day 5 of their development. A total of 336 embryos belonging to 88 infertile couples, biopsied on day 5 and finally genetically diagnosed as being euploid (normal number of chromosomes) or aneuploid (gain or loss of chromosomes) were included in the study. In the framework of this morphokinetic analysis of human embryos, the time to achieve eight cells (t_8), the time from five to eight cells (t_8-t_5), different stages in blastocyst development (t_{SB} , t_B , t_{EB}) and expressions of cleavage synchronicity (CS2-8 and CS4-8) developed in our laboratory showed a clear statistical difference between aneuploid and euploid embryos. Therefore, ratios based on selected cleavage cycles allowed in this retrospective cohort study a personalized analysis of aneuploidy rates and laid the foundations of an aneuploidy prediction model. Although this proposed algorithm can never replace genetic techniques giving an exact diagnosis, it can aid in the prioritization of good quality blastocysts to be biopsied, in the information to patients who want to have a preimplantation genetic diagnosis and avoid additional costs. Also, in the daily routine of IVF laboratories the model can help in choosing embryos of the same quality kinetically and to go beyond morphology.

Keywords: Time-lapse imaging, morphokinetic, preimplantation genetic diagnosis, aneuploidy, synchronicity.

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. 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.
10. 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.
11. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2(8085):366.
12. 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.
13. Veeck L, Zaninovic N. *An Atlas of Human Blastocysts*. Taylor & Francis; 2003.
14. 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.
15. Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 Suppl 4: 105-114.
16. 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.
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. *Reprod BioMed Online*, 2011; 22: 632–646.
18. 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.

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

- 28.** 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.
- 29.** 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.
- 30.** 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

10. TEŞEKKÜR

Türkiye’de ilk Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programını kuran ve beni kabul ederek, yüksek lisansa başlamamı sağlayan Program Sorumlumuz Prof. Dr. Tülay İrez’e ve Tez Danışmanım Prof.Dr.İmer Okar’ a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tezimin oluşturulmasındaki 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 süresince, fikir ,öneri ve yardımlarından dolayı Mol.Bio.Caroline Pirkevi ve Dr. Murat Çetinkaya’ya teşekkür ederim.

Bu süreçteki destek ve sabır için eşim Mehmet Suat Çolakoğluna sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

11. ETİK KURUL KARARI

T.C.

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

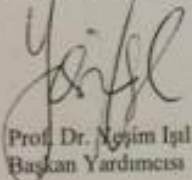
TIBBİ ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

SAYI: B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/1356
KONU: ATADEK 2013-519

Sayın Dr. Yeşim Kumtepe ÇOLAKOĞLU,

ATADEK 2013-519 kodlu, Dr. Yeşim Kumtepe Çolakoğlu ve Dr. Murat Çetinkaya tarafından yürütülecek olan "Time-lapse görüntüleme tekniği ile öploid ve anöploid insan embriyolarının karşılaştırmalı kinetik analizi" başlıklı projesi, Acıbadem Üniversitesi Etik Kurulu'nun 20 Ağustos 2013 tarihli 83. toplantısında incelenmiş; etik açıdan uygun bulunmuştur. (Karar No:2013-519)

Saygılarımızla,



Prof. Dr. Neşim Işıl Ülman
Başkan Yardımcısı

Gölsuyu 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

TIBBİ ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

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. Mevlüt 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	Yeşim Kumtepe	Soyadı	Çolakoğlu
Doğ.Yeri	İğdır	Doğ.Tar.	04.11.1977
Uyruğu	TC	TC Kim No	24523510136
Email	ykumtepe@yahoo.com.tr	Tel	0532 7059191

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1999
Lise	Bursa Yıldırım Beyazıt Lisesi	1993

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
1. Biyolog	Şişli Memorial Hastanesi	2007 - halen
2. Biyolog	Prof.Dr.M.Turan Çetin Tüp Bebek Merkezi	2005-2007

Yayınlar / Tebliğler

- (2014) Murat Çetinkaya, Caroline Pirkevi, Hakan Yelke, Yeşim Kumtepe, Zafer Atayurt, Semra Kahraman. Relative kinetic expressions defining cleavage synchronicity are better predictors of blastocyst formation and quality than absolute time points. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2014 Nov 5
- (2013) Semra Kahraman, Murat Cetinkaya, Caroline Pirkevi, Hakan Yelke, Yesim Kumtepe. 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. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology* 3(2):55-61

Oral prezentasyonlar:

1. (2014) Başar MM, Dokuzeylül-Güngör N, Kumtepe-Çolakoğlu Y, Selimoğlu S, Alkan E, Kahraman S. Effects of medical treatment and the sex steroid levels on testicular sperm retrieval rate in Klinefelter syndrome. The 104th Annual Meeting of AUA May 16-21, 2014, Orlando, USA. PD24-07
2. (2014) Başar MM, Dokuzeylül-Güngör N, Tüfekçi MA, Kumtepe-Çolakoğlu Y, Şenel T, Kahraman S. Comparison of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcomes between ejaculated and testicular extracted spermatozoa in couples with recurrent implantation failure. The 104th Annual Meeting of AUA May 16-21, 2014, Orlando, USA. PD24-11
3. (2014) Beyazyurek C, Yapan CC, Ekmekci GC, Yelke H, Kumtepe Y and Kahraman S. The importance of aneuploidy screening in translocation carriers: Evidence from comprehensive chromosomal screening. Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) Annual Meeting, Canterbury, UK, 29th April – 2nd May 2014
4. (2013) Y. Kumtepe, S. Kahraman, M. Cetinkaya, C. Pirkevi, H. Yelke, M. Montag. Blastocyst culture using time-lapse in good prognosis IVF patients and elective SET: a randomized pilot study. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 07 - 10 July 2013, London
5. (2013) M. Cetinkaya, C. Pirkevi, Y. Kumtepe, C. Beyazyurek, C. G. Ekmekci, H. Yelke, S. Kahraman. Comparative kinetic evaluation of aneuploid and euploid embryos using time-lapse. 12th International Preimplantation Genetic Diagnosis, 8 – 11th May 2013, Istanbul, Turkey
6. (2013) H. A. Tac, N. Gulum, C. Beyazyurek, H. Yelke, Y. Kumtepe, C. G. Ekmekci, S. Kahraman. Preimplantation genetic diagnosis of single-gene disorders: Experience with more than 250 cycles for 57 different

monogenic conditions. 12th International Preimplantation Genetic Diagnosis, 8 – 11th May 2013, Istanbul, Turkey

7. (2009) G. Altin, S. Milik, Z.N. Candan, H. Yelke, S. Unal, Y. Kumtepe, Z. Atayurt and S. Kahraman. Comparing the developmental competency of chromosomally normal and abnormal embryos biopsied on day 3. 9th International Conference on Preimplantation Genetics. Miami, Florida USA, April 23 – 25, 2009

Poster prezentasyon:

1. (2014) Synchronicity Of Cleavage Cycles Predicts Blastocyst Formation And Quality. Caroline Pirkevi, Murat Çetinkaya, Yeşim Kumtepe Çolakoğlu, Hakan Yelke and Semra Kahraman. American Society for Reproductive Medicine 70th Annual Meeting, October 18–22, 2014, Hawaii, USA
2. (2014) C. Pirkevi, M. Cetinkaya, Y. Kumtepe Colakoglu, Z. Atayurt, H. Yelke, S. Kahraman. Cleavage synchronicity thresholds derived from aneuploid embryos predict embryo implantation and live birth in an infertile cohort without PGS. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 29 June to 2 July 2014, Munich – Germany
3. (2014) N. Gulum, H.A. Tac, C. Beyazyurek, H. Yelke, Y.K. Colakoglu, C.G. Ekmekci, S. Kahraman. Preimplantation genetic diagnosis of single-gene disorders: experience for 74 different monogenic conditions. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 29 June to 2 July 2014, Munich – Germany
4. (2014) H. Yelke, Y. Kumtepe, Z. Atayurt, S. Yildiz, C. Pirkevi, H.A. Tac, C.G. Ekmekci, M. Cetinkaya, S. Kahraman. Is it obligatory to apply trophectoderm biopsy on the fifth day. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 29 June to 2 July 2014, Munich – Germany
5. (2013) M. Cetinkaya, C. Pirkevi, H. Yelke, Y. Kumtepe, Z. Atayurt, S. Kahraman. An additive model using morphokinetics to predict embryos of

highest implantation potential. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 07 - 10 July 2013, London

6. (2013) C. Pirkevi, M. Cetinkaya, H. Yelke, Y. Kumtepe, Z. Atayurt, S. Kahraman. Synchronicity of cleavage cycles predicts blastocyst formation and quality. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 07 - 10 July 2013, London
7. (2013) C. G. Ekmekçi, H. A. Tac, N. Gulum, C. Beyazyurek, H. Yelke, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Healthy ongoing pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for coenzyme Q10 deficiency. 12th International Preimplantation Genetic Diagnosis, 8 – 11th May 2013, Istanbul, Turkey
8. (2013) C. G. Ekmekci, H. A. Tac, N. Gulum, C. Beyazyurek, H. Yelke, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Birth of a healthy baby after preimplantation genetic diagnosis for Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type. 12th International Preimplantation Genetic Diagnosis, 8 – 11th May 2013, Istanbul, Turkey
9. (2013) C. G. Ekmekçi, H. A. Tac, N. Gulum, C. Beyazyurek, H. Yelke, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Birth of a healthy twin after preimplantation genetic diagnosis for Leber congenital amaurosis (RPE65 gene). 12th International Preimplantation Genetic Diagnosis, 8 – 11th May 2013, Istanbul, Turkey
10. (2013) C. G. Ekmekçi, H. A. Tac, N. Gulum, C. Beyazyurek, H. Yelke, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Healthy live birth after preimplantation genetic diagnosis for progressive myoclonus epilepsy, Lafora type. 12th International Preimplantation Genetic Diagnosis, 8 – 11th May 2013, Istanbul, Turkey
11. (2013) C. G. Ekmekçi, H. A. Tac, N. Gulum, C. Beyazyurek, H. Yelke, Y. Kumtepe, S. Kahraman. The importance of aneuploidy screening in translocation carriers: Evidence from comprehensive chromosomal screening. 12th International Preimplantation Genetic Diagnosis, 8 – 11th May 2013, Istanbul, Turkey

12. (2012) H. Yelke, Z. Atayurt, S. Yildiz, S. Unal, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Is it possible to decrease the negative effect of poor sperm on infertility by the use of IMSI? European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE). July 1 – 4, 2012, Istanbul, Turkey
13. (2012) Z. Atayurt, H. Yelke, S. Unal, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Human embryo vitrification with home-made or commercial solutions: how quality of vitrification solution affects post thaw embryo quality and clinical result. European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE). July 1 – 4, 2012, Istanbul, Turkey
14. (2011) Saliha Hale Karagözoğlu, M.D., Semra Kahraman, M.D. Prof., Hakan K. Yelke, MSc., Caroline Pirkevi, PhD., Sevil Ünal, BSc. and Yeşim Kumtepe, Bsc. Does Poor Ovarian Response Affect the Early Pregnancy Loss Rate In Couples With Severe Male Infertility? American Society for Reproductive Medicine 67th Annual Meeting 2011, October 15–19, Orlando, Florida
15. (2010) G.Altin, S.Unal, H.Yelke, Y.Kumtepe, Z.Atayurt, S.Milik, C.Beyazyürek, C.Cınar, G.Karlikaya, S.Kahraman. Complete Or Partial Correction Of Aneuploidic Embryos On Day 3 Forming Hatching/Hatched Blastocysts on Day 5. 10th International Congress Preimplantation Genetic Diagnosis. May 5-8, 2010, Montpellier, France
16. (2009) S. Unal, H. Yelke, G. Altin, Z. N. Candan, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Results With Respect To Number of MII Oocyte. ASRM 2009, Atlanta, Georgia, 17 – 21 October 2009