

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



**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI OLGULARINDA
EMBRİYOLARIN MORFOKİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ VE ANÖPLOİDİ TARAMASI İÇİN YAPILAN
PREİMPANTASYON GENETİK TANI SONUÇLARI İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tutku Melis AYGÜN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL, 2023

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



**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI OLGULARINDA
EMBRİYOLARIN MORFOKİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ VE ANÖPLOİDİ TARAMASI İÇİN YAPILAN
PREİMPANTASYON GENETİK TANI SONUÇLARI İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tutku Melis AYGÜN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL, 2023

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ ONAY BELGESİ

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı 20111102004 numaralı yüksek lisans öğrencisi Tutku Melis Aygün'ün "Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olgularında Embriyoların Morfokinetik Özelliklerinin İncelenmesi ve Anöplöidi Taraması İçin Yapılan Preimplantasyon Genetik Tanı Sonuçları İle Karşılaştırılması" adlı tez çalışması, Enstitümüz Yönetim Kurulunun 18.09.2023 tarih ve 2023/14 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03.10.2023

Prof. Dr .Tülay İREZ
Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet CINCIK
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meriç KARACAN
Jüri Üyesi

ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tezde;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

18/09/2023

Tutku Melis AYGÜN

İmza

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim sırasında bilimsel çalışmalarda ve tezimde desteğini esirgemeyen; bilgi, görüş ve tecrübelerinden yararlandığım, yol göstericiliği ile bir insanın hayatına nasıl dokunacağını gösteren tez danışmanım değerli hocam **Prof. Dr. Tülay İREZ** başta olmak üzere İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı akademik kadrosunda yer alan saygıdeğer hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim...

Mesleğimde ilk adımı attığım yer olan İstanbul Memorial Şişli Hastanesi'nde ekibinde olmaktan gurur duyduğum Tüp Bebek ve Üreme Genetiği Merkezi Başkanı değerli hocam **Prof. Dr. Semra KAHRAMAN**'a ve tüm klinik doktorlarımıza, IVF Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım değerli büyüklerim; **Bio. Hakan Kadir YELKE**'ye, **Bio. Yeşim KUMTEPE ÇOLAKOĞLU**'na, **Bio. Semra YILDIZ**'a, **Bio. Serkan SELİMOĞLU**'na, **Bio. Caroline Pirkevi ÇETİNKAYA**'ya, çalışma arkadaşlarım **Bio. Dilara KOÇKAN** ve **Bio. Büşra Berksoy**'a teşekkür ederim...

Tez çalışmamda ve tezimin istatistiksel değerlendirmelerinde çok büyük emeği olan, gece gündüz demeden bilimsel araştırmalar için uğraş gösteren, tüm bilgi birikimini iyi bir öğretici olarak aktaran değerli büyüğüm **Bio. Dr. Gülçin ÖZKARA**'ya sonsuz teşekkür ederim...

Beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen COVID19 pandemisinde kaybettiğim canım babam **Vedat Muzaffer AYGÜN** başta olmak üzere annem **Fatma Tuba AYGÜN**'e, babaannem **Türkan AYGÜN**'e, anneannem **Emel BERKOFÇALI**'ya, büyük teyzem **Müjgan BOZKURT**'a ve tüm aileme çok teşekkür ederim...

Öz kardeşimden de öte olan **Buse ÖZBAY**'a ve tüm embriyolog arkadaşlarıma; meslektaşlarıma çok teşekkür ederim...

Saygılarımla,
Tutku Melis AYGÜN

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları (TGK).....	3
2.2.1. TGK sıklığı ve etkileyen faktörler	4
2.2.2. Tekrarlayan gebelik kayıpları nedenleri.....	5
2.3. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Kromozomal Anomaliler.....	8
2.3.1 Öploidide	8
2.3.2. Anöploidide	9
2.4. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI).....	11
2.5. Fertilizasyon ve Embriyo Gelişimi	12
2.6. Preimplantasyon Genetik Tanı.....	17
2.6.1. Trofektoderm biyopsisi	18
3. MATERYAL METOD	21
3.1. Ovulasyon İndüksiyonu	22
3.2. Oosit Toplama.....	22
3.3. Denüdasyon ve ICSI	23
3.4. SEİS'te Fertilizasyon Kontrolü ve Embriyolara ait Morfolojik Değerlendirmelerin Yapılması	25
3.5. Trofektoderm Biyopsi İşlemi	27
3.6. İstatistiksel Analiz.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Grupların Demografik Özelliklerinin Karşılaştırılması	30
4.2. TGK Grubunda Yapılan İstatistiksel Analizler.....	31
4.4. Aİ Grubunda Yapılan İstatistiksel Analizler.....	37
4.5. TGK ve Aİ Grupları Arasında Yapılan İstatistiksel Analizler.....	41
4.6. Tüm Embriyolar ile Yapılan İstatistiksel Analizler	44
5. TARTIŞMA	45
6. KAYNAKLAR	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: GV oosit, MI oosit, MII oositler	12
Şekil 2: ICSI işleminde mikroenjeksiyon pipetleri pozisyonları	12
Şekil 3: MonoPN, 2PN (normal fertilize), 3PN döllenmiş oositler	13
Şekil 4: Morfolojik anomaliliye sahip vakuollü granüle oosit.....	14
Şekil 5: Eşit blastomer boyutlarına sahip embriyolar	15
Şekil 6: Hücreler arası yaygın fragmentasyona sahip 3. Gün embriyoları.....	15
Şekil 7: Morula	15
Şekil 8: Hatching Blastosistler.....	16
Şekil 9: En İyi Kalite, İyi Kalite ve Orta Kalite Blastosistler	17
Şekil 10: Trofektoderm biyopsi işlemi.....	20
Şekil 11: Foliküler sıvı ve HEPES tamponlu medyum.....	23
Şekil 12: HEPES tamponlu medyumda KOK görünümleri.....	23
Şekil 13: Stereo Mikroskop	24
Şekil 14: 16 kuyucuklu EmbryoSlide (VitroLife®, Sweden).....	25
Şekil 15: Sürekli Embriyo İzleme Sistemleri.....	25
Şekil 16: Direkt ya da Rapid Klivaj (1→3) şematize açıklaması	26
Şekil 17: EmbryoViewer Modülü ve Embriyolara ait bölünme zamanlamaları.....	27

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Üreme Tıbbı Alanındaki Derneklerin TGK Tanımları.....	3
Tablo 2: Yaşamla Bağdaşan İnsan Anöploidileri.....	10
Tablo 3: TGK ve Aİ gruplarının demografik ve klinik özellikleri.....	30
Tablo 4: TGK Grubunda PGT-A Uygulanan Embriyoların Morfokinetik Özelliklerinin Karşılaştırılması	32
Tablo 5 : TGK grubunda maternal yaş gruplarına göre embriyoların morfokinetik özelliklerinin karşılaştırılması.....	34
Tablo 6: TGK grubunda kadın VKİ'nin embriyoların morfokinetik özelliklerine etkisi	35
Tablo 7: TGK grubunda erkek yaşının PGT-A Sonuçlarına Etkisi	37
Tablo 8: TGK Grubunda kadın VKİ'nin PGT-A Sonuçlarına Etkisi	37
Tablo 9: Aİ grubunda PGT-A uygulanan embriyoların morfokinetik özelliklerinin karşılaştırılması	38
Tablo 10: Aİ grubunda kadın VKİ'nin embriyoların morfokinetik özelliklerine etkisi	39
Tablo 11: Aİ grubunda maternal yaşın PGT-A Sonuçlarına Etkisi	41
Tablo 12: TGK ve Aİ gruplarında Öploid embriyoların morfokinetik özelliklerinin karşılaştırılması	41
Tablo 13: TGK ve UEİ gruplarında embriyolarda PGT-A sonuçlarının karşılaştırılması	43
Tablo 14: TGK ve Aİ gruplarında maternal yaşın PGT-A sonuçlarına etkisi	43
Tablo 15: TGK ve Aİ gruplarında paternal yaşın PGT-A sonuçlarına etkisi	43
Tablo 16: TGK ve Aİ gruplarında maternal VKİ ≥ 30 olan vakalarda PGT-A sonuçlarının karşılaştırılması	43
Tablo 26: Tüm Embriyolarda Anöploidi için Risk Faktörlerinin Analizi	44

KISALTMALAR LİSTESİ

AFC:	Antral Folikül Sayısı
AFS:	Antifosfolipid Sendromu
AHA:	Assisted Hatching, Zonada Açıklık Bırakılması
Aİ:	Açıklanamayan İnfertilite
AMH:	Anti-Müllerian Hormon
ASRM:	American Society of Reproductive Medicine, Amerikan Üreme Tıbbı Derneği
BE:	Blastomer Boyutlarındaki Eşitlik
BUE:	Blastomer Boyutlarındaki Eşitsizlik
DK:	Direkt Klivaj
ESHRE:	European Society of Human Reproduction and Embryology, Avrupa İnsan Üreme ve Embriyolojisi Derneği
E2:	Estrodiol
FSH:	Folikül Stimüle Edici Hormon
GDE:	Gelişimi Duran Embriyo
hCG:	İnsan Koryonik Gonadotropin
Hipo-hipo:	Hipogonadotropik Hipogonadizm
HTF:	Human Tubal Fluid, İnsan Tubal Sıvısı
HSG:	Histerosalpingografi
ICM:	Inner Cell Mass, İç Hücre Kitlesi
ICSI:	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IMSI:	İntrasitoplazmik Morfolojik Olarak Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu
IU:	İnternasyonal Unit
IVF:	In Vitro Fertilizasyon
KOH:	Kontrollü Ovaryen Hiperstimülasyon
LH:	Luteine-Edici Hormon
MRG:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
Oİ:	Ovulasyon İndüksiyonu
OPU:	Yumurta Toplama İşlemi
PGT:	Preimplantasyon Genetik Tanı
PGT-A:	Anöploidi Taraması İçin Yapılan Preimplantasyon Genetik Tanı
PN:	Pronükleus

PNa: Pronükleus görünme zamanı
PNf: Pronükleus Silinme Zamanı
PVP: Polivinilprolidon
RCOG: Kraliyet Obstetri ve Jinekoloji Okulu
rFSH: Rekombinant Folikül Stimüle Edici Hormon
RK: Reverse Klivaj, Tersine Klivaj
SEİS: Sürekli Embriyo İzleme Sistemi
t2: İki hücreli evreye geçiş zamanı
t3: Üç hücreli evreye geçiş zamanı
t4: Dört hücreli evreye geçiş zamanı
t5: Beş hücreli evreye geçiş zamanı
t6: Altı hücreli evreye geçiş zamanı
t7: Yedi hücreli evreye geçiş zamanı
t8: Sekiz hücreli evreye geçiş zamanı
t9: Dokuz hücreli evreye geçiş zamanı
tSC: Kompaksiyonun başlama zamanı
tM: Morula evresine geçiş zamanı
tSB: Blastülasyonun başlangıç zamanı
tB: Blastosiste ulaşma zamanı
tEB: Blastosistin ekspansiyon zamanı
TB: Trofektoderm Biyopsisi
TE: Trofektoderm
TGK: Tekrarlayan Gebelik Kayıpları
VKİ: Vücut Kitle İndeksi
YGE: Yavaş Gelişen Embriyo
YÜT: Yardımla Üreme Teknikleri
ZP: Zona Pellusida

ÖZET

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI OLGULARINDA EMBRİYOLARIN MORFOKİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE ANÖPLOİDİ TARAMASI İÇİN YAPILAN PRE-İMLANTASYON GENETİK TANI SONUÇLARI İLE KARŞILAŞTIRILMASI

AMAÇ: Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), yardımla üreme tekniklerine (YÜT) başvuran kadınlar arasında en sık görülen üreme sorunlarından biridir. Çalışmamızda TGK ve Açıklanamayan İnfertilite (Aİ) grupları arasında öploid ve anöploid embriyolara ait morfokinetik parametreleri karşılaştırmayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD: Çalışma Memorial Şişli Hastanesi, ART ve Genetik Merkezi'ne başvuran Sürekli Embriyo İzleme Sistemleri (SEİS) nde takip edilen 190 vaka (100 TGK, 90 Aİ) ve 1704 embriyo (TGK:1169, Aİ:535) ile yapılan karşılaştırmalı bir analizdi. 38 yaş üstü, endometriyal veya uterin anomalili ve sperm parametreleri anormal olan vakalar çalışmaya dahil edilmedi. Vakalar kadın vücut kitle indeksine göre göre alt gruplara ayrıldı (<25 , $25-29,9$, ≥ 30). Embriyo sınıflandırmasında Gardner sınıflandırması kullanıldı. PGT-A analizi için Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi kullanıldı. Çalışma grupları arasındaki morfokinetik karşılaştırmalar için öploid ve anöploid embriyolar değerlendirildi. Morfokinetik parametreler Student's t-test; kategorik parametreler ise Ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. $p>0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR: Çalışma gruplarının demografik ve klinik özellikleri; yaş, AMH, bazal FSH, over stimülasyon süresi, total ve matür oosit, 2PN, blastülasyon açısından benzerdi. TGK vakalarında öploid embriyo varlığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. (sırasıyla %43,5 ve %52,3 ($p=0,018$)). VKİ <25 olarak değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılık daha belirgindi (TGK-Öploid: %40,9, Aİ-Öploid: %56,2, $p=0,001$). Vakalar VKİ açısından değerlendirilip karşılaştırıldığında embriyo kalitesi açısından istatistiksel anlamlılık görülmedi. ($p>0,05$). Blastosistlerde direkt klivaj ve ayrı blastomer varlığı iki grupta da benzer bulundu ($p>0,05$). Öploid embriyo morfokinetiğine bakıldığında, TGK vakalarının embriyolarında tSC-tM

aralığı kontrol grubuna kıyasla daha kısa gözlemlendi (sırasıyla $9,3\pm4,8$ 'e karşı $17,0\pm25,5$ ($p<0,001$)).

SONUÇ: Çalışmamızda ileri maternal yaş ve şiddetli erkek faktörü dışlandığında, TGK vakalarında anöploidi prevalansı Aİ grubundaki vakalara göre daha yüksek prevelansa sahipti. Embriyo morfolojisi, blastosistlerdeki direkt klivaj ve ayrı blastomer varlığı çalışma gruplarında benzerdi. TGK grubuna ait öploid embriyoların morulaya ulaşma süresinin Aİ grubundaki öploid embriyolara göre daha kısa olduğu belirlenmiştir. Anöploidi, TGK vakalarındaki kayıpların ana nedenlerinden biri olarak bulunduğu endometriyal faktörlerin dışlandığı TGK olgularına PGT-A önerilmesi faydalı olabilir. Sonuçlarımızın ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: açıklanamayan infertilite, embriyo morfokinetiği, ploid, preimplantasyon genetik tanı, tekrarlayan gebelik kayıpları

Tutku Melis AYGÜN, 2023

ABSTRACT

A MORPHOKINETIC INVESTIGATION OF EMBRYOS BELONGING TO PATIENTS HAVING RECURRENT PREGNANCY LOSSES AND A COMPARISON WITH THEIR RESULTS OF PRE-IMPLANTATION GENETIC TESTING FOR ANEUPLOIDY

OBJECTIVES: Recurrent pregnancy loss (RPL) is one of the most common reproductive problems among women who applied for ART treatment. Studies investigating the embryo related factors in RPL patients are limited in the literature. Thus, in this study, we aimed to compare embryo related factors such as morphokinetics and euploid embryo frequency between RPL and unexplained infertility (UEI) groups.

MATERIALS AND METHODS: This was a comparative analysis with 190 patients (100 RPL, 90 UEI) and 1704 embryos (RPL:1169, UEI:535) that were incubated at Time-Lapse Monitoring System (TLM) in Memorial Sisli Hospital, ART and Genetics Center. Patients with >38 years of age, endometrial or uterine abnormalities and abnormal sperm parameters were excluded from the study. Patients subgrouped according to maternal BMI (<25, 25-29.9, ≥30). Gardner's classification was used for embryo grading. Next Generation Sequencing (NGS) method was used for PGT-A analysis. Euploid embryos were selected for morphokinetic comparisons between study groups. Morphokinetic parameters were compared using Student's t-test. Categorical parameters were compared with Chi-square. $p>0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS: Demographic and clinical characteristics of the study groups were similar in terms of age, AMH, basal FSH, duration of ovarian stimulation, total and mature oocytes, 2PN, blastulation. Frequency of euploid embryos were significantly lower in RPL patients than UEI group (43.5% vs 52.3%, respectively ($p=0.018$)). The statistical significance was more pronounced when BMI was selected as <25 (RPL-Euploid: 40.9%, UEI-Euploid: 56.2%, $p=0.001$). No statistical significance was obtained in terms of embryo quality when patients were grouped according to BMI ($p>0.05$). The occurrence of direct cleavage and separate blastomere in the blastocysts was found to be similar in each group ($p>0.05$). Regarding euploid embryo morphokinetics,

embryos reached to morula after starting compaction (tSC-tM) faster in RPL patients than in UEI patients (9.3 ± 4.8 vs 17.0 ± 25.5 respectively ($p < 0.001$)).

CONCLUSIONS: In this study, aneuploidy prevalence was higher in RPL patients than UEI patients when advanced maternal age and severe male factor were excluded. Embryo morphology, frequencies of direct cleavage and separate blastomere in the blastocysts were similar in study groups. Euploid embryos showed faster development to morula stage in RPL than UEI patients. Since the aneuploidy is found one of the main causes of RPL patients, it may be useful to offer PGD-A to RPL patients whose endometrial factors are excluded. Our results should be confirmed with further studies.

Keywords: embryo morphokinetics, ploidy, preimplantation genetic testing, recurrent pregnancy loss, unexplained infertility

Tutku Melis AYGUN, 2023

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erken ve spontan gebelik kayıpları, gebelikte karşılaşılan en sık komplikasyonlardır. Klinik olarak tanısı konmuş gebeliklerin yaklaşık %20'si spontan abortus ile sonuçlanmaktadır ve bu abortusların yaklaşık %75'i gebeliğin ilk 3 aylık döneminde (ilk 12 haftası) gerçekleşmektedir [1]. Genetik faktörler, endokrin nedenler, immünolojik faktörler ve ileri maternal yaş gebeliğin abortusla sonuçlanmasındaki patolojik sürecin bir parçası olarak bilinmektedir. Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT)'ne başvuran çiftlerin çok büyük bir bölümünü de tekrarlayan gebelik kayıplarına (TGK) sahip vakalar oluşturmaktadır. TGK bilimsel olarak üç veya daha fazla sayıdaki gebeliğin ardışık olarak erken dönemde kaybedilmesi olarak tanımlanmaktadır. TGK'da genetik faktörler ve ileri maternal yaş arasındaki ilişki ile ilgili yapılan birçok araştırma mevcuttur. [2]. Ayrıca, bazı TGK olgularında kadın ve erkekte herhangi bir genetik problem gözlenmese de oluşan embriyonun kromozomal anomalili (anöploid) olması nedeniyle gebelik kayıpları yaşanabilmektedir.

TGK olgularında embriyoya ait kromozomal anomali varlığının tespiti için sıklıkla preimplantasyon genetik tanıya başvurulur. İleri maternal yaş, şiddetli erkek faktörü endikasyonu olmayan TGK olgularında da embriyoya ait genetik faktörlerden söz edilebildiği için embriyo gelişiminin takibi ve genetik tanı testlerinin yapılması TGK'nın aydınlatılmasında büyük öneme sahiptir. Bununla birlikte TGK olgularında embriyoya ait ilgili morfokinetik parametrelerin incelenmesi ile ileri bir araştırma yapılması ihtiyacı doğmaktadır. Embriyo gelişimi birçok ana parametreyi içerisinde barındıran kompleks ve dinamik bir süreci oluşturmaktadır. Embriyoya ait ileri takipler yapıldığında; embriyonun morfokinetiğinin değerlendirilmesi ve anöploidi varlığının tespiti TGK olgularında elzemdir.

Preimplantasyon genetik taramanın yanı sıra embriyoya ait morfokinetik özelliklerin belirlenmesinin çeşitli anöploidilerle ilişkili olabileceği bilinmektedir. Yardımla üreme tekniklerinin gelişmesiyle birlikte sürekli embriyo izleme sistemleri (SEİS) kullanılmaya başlanmış ve embriyolara ait tüm gelişimsel parametreleri detaylı ve geriye dönük değerlendirmek mümkün hale gelmiştir. SEİS, embriyonun gelişimsel yetkinliğini ortaya koymak, embriyo morfokinetiğinin zamana bağlı olarak detaylı incelenmesini sağlamak açısından güvenilir bir araçtır. SEİS ile embriyolara ait morfokinetik özelliklerin tüm olumlu ve olumsuz yönlerini görselleştirme ve

detaylandırma imkanı bulunabilmektedir. SEİS'in kullanılması ile pronükleus (PN) belirme ve silinme zamanları, embriyonun ilk klivaj paternlerindeki zamanlamalar değerlendirilebilmektedir. Ayrıca, embriyoların gelişimlerine bağlı senkronite ve asenkronite, blastomer boyutlarındaki farklılıklar embriyoya ait faktörlerin tanımlanmasında da kilit rol üstlenebilmektedir. Böylece, embriyo gelişiminin sürekli takibi yapılarak nihai amaç olan klinik ve laboratuvara, transfer için seçilebilecek gebelik potansiyeli yüksek bir embriyo bulmak, ayrıca gebeliğe ulaşma süresini de kısaltmak mümkün olabilmektedir. SEİS bu açıdan bakıldığında girişimsel olmayan bir tahmin aracı görevini görmektedir.

Bu çalışma ile, embriyo gelişimi takiplerinin SEİS'ler ile yapılmasını ve blastosist aşamasına ulaşmış uygun kalitedeki embriyoların PGT-A'ya tabi tutularak en az iki kez gebelik kaybı yaşamış olan şiddetli erkek faktörün elendiği ileri maternal yaşa sahip olan veya olmayan vakalarda embriyonun morfokinetiği ile anöploidi sonuçları arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları (TGK)

Klinik olarak tanısı konmuş gebeliklerin yaklaşık %20'si spontan abortus ile sonuçlanmaktadır. Spontan abortus, düşük ile karşı karşıya kalma, düşükle sonuçlanan gebelik veya gecikmiş düşük (missed abort) anlamına gelmektedir. Spontan abortusların yaklaşık %75'i son menstrüel kanamanın ilk günü baz alınarak 20.haftasından önce embriyo veya fetüse ait eklerin bir kısmı veya tamamının mekanik veya ilaç kullanımına bağımlı olmaksızın uterus dışına atılması ile oluşmaktadır [1].

Tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) bilimsel olarak üç veya daha fazla sayıdaki gebeliğin ardışık olarak erken dönemde abortusla sonuçlanması olarak tanımlanmaktadır. Ancak, dünyada üreme tıbbi alanında bazı derneklerin TGK tanımı birbirinden farklılık göstermektedir. ASRM'ye göre ultrasonografik veya histopatolojik olarak tanımlanmış olan iki veya daha fazla gebelik kaybı tekrarlayan gebelik kaybı olarak bilinmekle birlikte bu tanım RCOG'a göre ardışık olarak üç gebelik kaybı ve üzeri olarak belirtilmektedir. ESHRE'ye göre ise yapılan son serum veya idrar hCG değeri ile doğrulanan gebelikler dahil iki kez yaşanan gebelik kaybı TGK olarak tanımlanmaktadır, ektopik veya molar gebelik bu grubun dışında kalmaktadır [14,15].

Tablo 1: Üreme Tıbbi Alanındaki Derneklerin TGK Tanımları

	Gebelik	Ardışıklık	TGK sayısı	Gebelik Haftası
ESHRE 2017	Serum düzeyi veya idrarda hCG ile tanı konulan gebelikler dahil	Ardışık veya ardışık olmayan tekrarlayan gebelik kayıpları	2	Gebeliğin 24. haftasına kadar yaşanan kayıplar
ASRM 2013	Ultrasonografik veya histopatolojik gebelikler dahil	Ardışık gebelik kayıpları	2	Kısıtlama yok ancak <10. gebelik haftasında yaşanan kayıplar
RCOG 2011	Çeşitli tanı testleri ve tahliller sonrası gebelikler dahil	Ardışık gebelik kayıpları	3	Gebeliğin 24. haftasına kadar yaşanan kayıplar

Üç kez ardışık olarak gebelik kaybı yaşanması istatistiki verilere göre %0.34 civarındadır. TKG'ya sebebiyet veren patolojinin varlığının giderilmemesi sonucunda ise kayıpların süreceği belirtilmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında kadınların %1-2'sinin etkilendiği; etiyojolojiye bakıldığında birçok farklı sonucun bir araya gelmesi ile oluştuğu bilinmektedir [16]. Bu bağlamda; genetik faktörler, endokrin ve/veya immünolojik faktörler, enfeksiyonlar ve anatomik nedenler detaylıca irdelenmelidir. Ancak, tüm nedenler araştırıldığında bile tekrarlayan gebelik kayıplarının %40-50'sinde açıklanabilecek herhangi bir neden bulunamamaktadır [17]

2.2.1. TKG sıklığı ve etkileyen faktörler

İlk gebelik zamanında abortus riski kadınlarda %11-13 olarak bulunmuştur. Her bir abortus sonrası ise bu riskte artış gözlenmektedir. Bu durumu etkileyen birçok faktör vardır. Tekrarlayan gebelik kaybı olan vakalarda en değerli prognostik faktör gebelik kaybı sayısıdır [18]. TKG olgularında canlı doğum öyküsünün bulunması ile prognoz farklılık gösterebilmektedir. Aynı zamanda, bir abortus sonrası oluşacak gebeliğin canlı doğumla sonuçlanma ihtimali %80; iki kez ardışık abortus sonrası %70-80; üç kez ardışık abortus sonrası %50-60; dört kez ardışık abortus sonrası %45; beş kez ardışık abortus sonrası %41; altı veya daha fazla kez ardışık abortus sonrası ise %13 olarak bulunmuştur. İleri maternal yaşa sahip olmayan kişilerde ise yaşın tekrarlayan gebelik kayıpları sonrası canlı doğum için prediktif olmadığı belirlenmiştir [19].

TKG olgularında bir canlı doğum öyküsünün bulunması prognoz üzerine tartışmalı bir konudur; canlı doğum öyküsü bulunan kişilerde gebelik kayıplarının yaşanması; canlı doğum öyküsü olmayan kişilerle kıyaslandığında farklı prognoz söz konusu olmaktadır [20]. Ayrıca, sekonder TKG olgularında ilk doğan bebeğin cinsiyetinin erkek olması negatif prognostik bir faktör olarak bulunmuştur [21]. Pre-embriyonik ve embriyonik dönemde gebelik kaybı yaşayan kişilerin, fetal kayıp olgularına göre daha iyi prognoza sahip olduğu bildirilmiştir.

İleri maternal yaşa sahip kişilerde abortus riski doğrudan artmaktadır. 30 yaş öncesi abortus ihtimali bu risk %7-15; 30-35 yaşlarında %8-21; 35-39 yaşlarında %17-28; 40 yaş ve üzerinde ise %34-52'ye çıkmaktadır.

2.2.2. Tekrarlayan gebelik kayıpları nedenleri

a. Konjenital Mullerian Anomaliler

Konjenital anomalilerin gebelik kaybı açısından etkileri net olmamakla birlikte konjenital müllerian anomalilerin uterusu bıraktığı etkiler doğrultusunda gebelik kaybına neden olabileceği düşünülmektedir. Potansiyel müllerian kanal anomalileri arasında septat uterus, unikornuat uterus, arkuat uterus, bikornuat uterus, didelfis uterus yer almaktadır [22]. Septat uterus, genel popülasyoda malformasyonların %80-90'ını oluşturmakla birlikte TGK olgularında görülme sıklığı %3-5 civarındadır. Septat uterus, en sık rastlanan müllerian kanal anomalisi olmakla birlikte en kolay opere edilebilen bozukluktur [23]. Buna ek olarak septat uterus varlığında azalmış vaskülarite ve artmış inflamasyon görülmekte ve buna bağlı olarak uterin distansiyonu izlenmektedir. Bu durumun gebelik kayıpları ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir [24].

TGK öyküsü bulunan kadınlarda uterin malformasyon görülme sıklığı; bulunmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur [25]. Üç ve üzeri gebelik kaybı öyküsü bulunan kadınlarda uterin anomali görülme sıklığı %15.4; iki veya daha fazla gebelik kaybı öyküsü bulunan kadınlarda ise %10.9 bulunmuştur [26]. Bu bağlamda TGK tanısı konan kadınlarda uterusun tanısız görüntülenmesi mutlaka düşünülmelidir.

Histerosalpingografi (HSG), uterin kaviteyi ve tubal potansiteyi değerlendirme ve görselleştirme açısından oldukça yararlı bir görüntüleme yöntemidir. Ancak, uterusun dış konturları HSG ile görüntülenemez. Bu nedenle uterusun dış konturlarını değerlendirmede, lezyonları ayırt etmede ultrasonografi (USG) ve/veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) sistemlerine başvurulabilir [27].

b. Immünolojik nedenler

TGK nedenleri arasında önemli bir role sahip olan immünolojik nedenler gebelik kayıplarının yaklaşık %20'sinden sorumludur. Endometrial hücrelerde yerleşik immün ve inflamatuvar hücrelerin etkisi önemli bir görev üstlenmektedir. Endometriumda bulunan immün ve inflamatuvar hücreler sitokin salınımına neden olmakta ve böylece TGK'nın oluşumunda etkili olabilmektedir [28]. Gebeliğin oluşumunda ve ilerleyen süreçte hem otoimmün hem de alloimmün mekanizmalardan söz edilmektedir ancak maternal yapının yarı allojenik durumunu tolere edebilecek mekanizmalar tam olarak aydınlatılamadığından, anormal immünolojik faktörlerin

üreme potansiyeli üzerindeki olumsuz etkilerini net olarak değerlendirmek pek mümkün değildir.

İmplantasyon mekanizmasında etkili olan endometrial lenfosit topluluğunun %70-80'i tek tip hücrelerden meydana gelmektedir. İmplantasyon sırasında adından söz edilen dezidual granüler lenfosit ve dezidual naturel killer (NK) isimli hücrelerin kökeni periferde her ne kadar benzer olsa da birbirlerinden farklı olduğu belirlenmiştir [29,30]. Yapılan çalışmalarda NK hücrelerinin gebelik kayıplarındaki rolü çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir [31,32].

Yapılan çalışmalarda birkaç otoimmün hastalığın TKG'da kötü prognoza neden olduğu belirtilmiştir. Buna karşın, Antifosfolipid Sendromu (AFS)'nin TKG'da bir tanı ölçütü olduğu tek immün sistem hastalığı olduğu bilinmektedir ve toplumdaki prevalansı %3-5 olarak bildirilmiştir. TKG olgularının %15'inde ise AFS pozitifliği görülmektedir [33]. AFS, genellikle ikinci trimester dönemindeki kayıplarda ilişkilidir ve ikinci trimesterde AFS'ye bağlı gebelik kayıplarının birinci trimester kayıplarına göre %20 oranında arttığı gösterilmiştir. AFS'nin otoimmün bir hastalık olmasının yanında spesifik bir trombofili olduğundan da bahsedilebilmektedir [34]. AFS'nin oluşum mekanizmasında negatif yüklü fosfolipidler ve fosfolipid-protein komplekslerine karşı oluşmuş antifosfolipid antikorları önemli bir yere sahiptir.

Antifosfolipid antikorları üç temel antikor grubu ile ilişkilendirilmiştir;

- Antikardiolipin antikor (ACA)
- Lupus Antikoagülanı (LA)
- Beta-2-glikoprotein I Antikoru

Bu antikorlar varlığında; pıhtılaşma faktörleri ve pıhtılaşma faktörü ile ilişkili fizyolojik inhibitörler, fibrinolitik proteinler, trombositler ve endotel hücreleri ile etkileşimde bozukluklar olabileceği bildirilmiştir [35].

AFS, arteriyel ve venöz tromboz oluşumuna sebebiyet vermesi nedeniyle TKG'ya yol açan ve klinik olarak ilişkilendirilmiş klinik bir patolojidir. TKG öyküsü bulunan kadınlarda antifosfolipid antikorların gebelik kayıpları ve tromboz oluşumunda etkili mekanizmalardan söz edilmektedir. AFS'nin gebelik kaybı üzerindeki etkisi göz önünde bulundurulduğunda anormal plasenta fonksiyonu ile

bağlantısı olabileceği görülmüştür. Çalışmalarda, plasentada nekroz ve trombozun oluştuğu vakalar da bildirilmiştir [36].

c. Endokrin nedenler

Endokrin nedenler TGK oluşumunda %8-12 etkilidir. Luteal faz defekti progesteron ile ilişkili olan ve YÜT uygulamalarında adından sıklıkla söz edilen endokrin bir efekttir. Buna ek olarak, tedavi edilmeyen hipertiroidi, anormal glukoz mekanizması, hiperprolaktinemi olarak adlandırılan prolaktin yüksekliği ve azalmış over rezervi de TGK nedenleri arasında sayılan endokrin faktörlerdendir [37].

Luteal faz defekti, gebelik oluşumunda korpus luteum tarafından salgılanan progesteronun yetersiz kalmasıyla oluşur. Gebeliğin 7-9.haftası sonrasında plasenta, progesteron üretimini korpus luteumdan devralır. Luteal faz defekti olgularında progesteron eksikliği oluşurken endometrium olumsuz olarak etkilenir ve endometrial dokuda stabilite sürdürülemez, endometrial dokunun stabilitesi ve embriyo gelişiminin devamı için progesterona ihtiyaç duyulmaktadır. İnce endometriumun implantasyon başarısı ile direkt ilişkisi bulunmaktadır ve endometrium incelidikçe implantasyon başarısı azalır [38]

TGK’da endokrin faktörlerden biri de hiperprolaktinemidir. Hiperprolaktinemi, prolaktin hormon düzeyinin aşırı yüksek olması durumudur, prolaktin hormon düzeyinin korpus luteum işlevini sekteye uğrattığı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir [39]. Ancak, normal prolaktin düzeyi erken gebeliğin sürdürülmesinde önemli bir parametredir.

TGK’da rolü olan diğer bir endokrin faktör ise tedavi edilmeyen hipertiroididir. Tiroid Stimüle Edici Hormon (TSH) normal değer aralığı gebe olmayan reproduktif çağıdaki kadınlarda 1.0-2.5 mU/L olarak tanımlanmıştır. Reprodüktif çağıdaki kadınların %15-20'sinde antitiroid hormonları bulunmaktadır, TGK oluşumunda hipertiroidi önemli bir yere sahiptir [40].

d. Kromozomal anomaliler

TGK oluşumunda etkili genetik faktörler ise kromozomal anomaliler olarak sınıflandırılmaktadır. Kromozomal anomaliler, sayısal ve yapısal veya marker kromozom gibi her ikisinin kombine olduğu durumları kapsamaktadır. Kromozom anomalileri, klinik olarak tanısı konan gebeliklerin %3-4’ünde görülmektedir. En

yaygın rastlanan kromozomal anomali trizomi 16 ve trizomi 22'dir [41]. Ayrıca, TKG olgularında kromozomal anomaliler çiftlerin %2-8'ini etkilemektedir.

2.3. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Kromozomal Anomaliler

Kromozomal anomaliler, sayısal ve yapısal kromozom anomalileri olarak iki gruba ayrılmaktadır. Sayısal kromozom anomalileri organizmaların hem natürel hem de laboratuvar ortamındaki kromozom sayısında oluşabilecek değişimleridir. Kromozomlar, mitoz ve mayoz bölünmeler sırasında düzenli olarak ayrılamazlarsa farklı kromozom sayısına sahip hücrelerin oluşumuna sebebiyet verebilmektedir [42]. Bunun sonucunda birçok farklı genin oranı değişeceğinden kalıtsal açıdan pek çok sorun ortaya çıkabilir. Kromozomun sayısal anomalilerinde mongolizm, Down sendromu, Turner sendromu, Klinefelter sendromu gibi yaşamla bağdaşabilecek anomalilerden söz edilebilmektedir. İlk 3 ayda abortusla sonuçlanan gebeliklerin %50'si, ikinci trimesterde abortusla sonuçlananların %5-10'u sitogenetik bir anomalinin sonucu olabilmektedir [43, 44].

Normal eşey hücresi içerisinde haploid ($n=23$) sayının iki katı; diploid ($n=46$) kromozom bulunmaktadır. Kromozom sayısı anomalilerinde ise kromozom sayısı öploid veya anöploid olabilir.

2.3.1 Öploid Gamet hücresi içerisindeki haploid sayıdaki kromozomları ve tam katlarını ifade etmektedir. Ancak her öploid kromozom seti normal dizilimi oluşturmaz. Öploidinin, monoploid ve poliploid olmak üzere iki tipi mevcuttur. Monoploidilerde her kromozomdan yalnızca bir tane bulunduğu için tüm genomda tek kopya halindedir. Mayoz bölünme sırasında monoploidilere denk gelen kromozom eşleşmesi olmadığı için kromozomların kutuplara çekilme olayı düzensiz gerçekleşir, bu durum ile dengeli olmayan eşey hücreleri meydana gelmektedir. Poliploidilerde ise mayoz bölünme sırasında kromozom sayıları yarıya inmez ve bu durum kromozom sayılarının haploid sayının üç, dört katı şeklinde yükselmesi ($3n, 4n$) ile sonuçlanabilir. Özellikle zigotun ilk mitoz bölünmesi sırasında kromatidlerin farklı kutuplara çekilmesi veya enine çeper oluşumunun engellenmesiyle meydana gelmektedir [46]. Ayrıca, ICSI sikluslarında bir oositin birden fazla spermle fertilize olması durumunda veya anormal yapıya sahip morfolojik anomalili oositlerin (örneğin, dev oositler) fertilize olması ile de poliploidilere rastlanmaktadır [47].

2.3.2. Anöploid Bir veya daha fazla kromozomun sayısının değişmesi olarak tanımlanmaktadır. Öploidinin aksine, anöploidide kromozomlar set olarak değil sayı olarak artabilir veya azalabilir [48]. En sık rastlanan genetik bozukluk olarak karşımıza çıkan anöploidilerin oluşum mekanizmasında üç ana nedenden söz edilebilmektedir. Bunlardan birincisi, hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılamaması (nondisjunction)'dır. Bunun sonucunda bir hücre tek kopya (monozomik) diğeri ise üç kopya (trizomik) olabilmektedir [49]. İkincisi, yine hücre bölünmesi sırasında kromozomların kutuplara çekilmesini sağlayan iç iplikçiklerinin hücresel yaşlanmaya bağlı olarak çekilmemesi veya düzensiz çekilmesidir. Sonuncusu ise anafaz aşamasında geri kalma (anafaz lagging) durumudur; hücre göçü sırasında yaşanan hata sonucunda kromozomların göç edeceği yere gidemez ve çoğunlukla ortadan kaybolur. Bu durum sonucunda biri normal diğeri ise monozomik hücre oluşur [50]. Bu üç nedene bağlı olarak anöploidilerin bir mayoz hatası olduğu sonucuna varılabilmektedir.

Anöploidinin, monozomi ve nullisomi adı verilen çeşitlerinden bahsetmek mümkündür;

- **Monozomi:** Diploid kromozom sayısına sahip bireyde tek bir kromozomun eksik olması durumudur. Buna örnek olarak Turner Sendromu verilebilir.
- **Nullisomi:** Organizmada homolog kromozom çiftinin kaybı olarak tanımlanmaktadır. Nullisomi sonucu oluşan bireyler aynı tip kromozomu kaybetmiş iki anöploid ($n-1$) gametin biraraya gelmesi sonucunda oluşmaktadır. Bir set içerisindeki kromozomlardan bir veya birkaçının sayısının artması olayıdır.

Ülkemizde Yakut ve arkadaşlarının yaptığı bir klinik çalışmada 457 spontan abortus materyali incelenmiş, en sık görülen kromozomal anomaliler arasında Turner Sendromu, triploidi ve trizomi 16'nın olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, spontan abortus vakalarında anne yaşı arttıkça trizomilerde artış dikkat çekmektedir [51]. Yaşamları bağdaşan insan anöploidileri tabloda gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 2: Yaşamla Bağdaşan İnsan Anöploidileri

Kromozom Anomalisi	Sendrom	Hesaplanan Frekans
Trizomi 21	Down Sendromu	1/7000 erkek doğum
Trizomi 18	Edward Sendromu	1/4000 erkek doğum
Trizomi 13	Patau Sendromu	1/5000 erkek doğum
47,XXX	Üçlü X Sendromu	1/1000 dişi doğum
47, XXY	Klinefelter Sendromu	1/1000 erkek doğum
45,XO	Turner Sendromu	1/500 dişi doğum

Kromozom anomalilerinin bir diğer sınıflandırması da yapısal anomalilerdir. Yapısal anomalilerinde genom bazında değişikliklere yol açabilecek olaylardan söz edilebilmektedir. Bu olaylarda kromozom sayısında bir değişiklik olmaz ancak kromozomlara ait parçalar açısından kaybolma, artma veya yer değişikliği olmasıyla birlikte genetik materyal değişebilmektedir [52]. Kromozomal yapının değişmesi sırasında, kromatidlerden birinde veya kromozomlarda bir veya birden fazla noktada kırılmalar izlenebilir. Kırılmalar kendiliğinden oluşabildiği gibi viral enfeksiyon, iyonize radyasyon veya maruziyet sonucu da oluşabilmektedir. X ve Gama ışınları, ultraviyole (UV) ışık veya maruz kalınan çeşitli kimyasal maddeler aracılığıyla da kırılmalar gözlenebilir. Yapısal kromozomal anomaliler; delesyon, duplikasyon, inversiyon ve translokasyon olarak sınıflandırılabilir.

Delesyon, kromozomların parça kaybetmesi, kromozomlardaki parçaların silinmesi olayıdır. Delesyonların oluşumu sırasında sentromersiz kısım kaybolur ancak oluşan kromozom parçası ve kromozom parçasının meydana getirdiği delesyon halkası sentromere sahipse hücrede varlığını sürdürebilir. Eğer delesyon, sentromersiz bölgede meydana gelirse halka kromozom oluşumu izlenir. Philadelphia Kromozomu ve Cri du Chat Sendromu insan kromozomunda meydana gelen delesyonlara örnek olarak verilebilir [51].

Duplikasyon, kromozomun herhangi bir parçası fazla barındırması olayıdır. Duplikasyonda delesyonun tersine parça çoğalması durumu mevcuttur. Drosophila'da Bar duplikasyonu örnek verilebilir. Duplikasyon, delesyondan daha sık görülmekle birlikte daha az tehlikelidir.

İnversiyon, bir kromozomdaki iki farklı kırık noktasının 180 derece dönmesi ve tekrar birleşmesi sonucu oluşan kromozom yapısındaki değişikliktir. İnversiyonlu parça eğer sentromer içeriyorsa bu perisentrik; içermiyorsa da parasentrik inversiyon

olarak tanımlanır. İnversiyonlar genellikle fenotipte etki yaratmazlar ancak taşıyıcılarda dengesiz gamet formasyonuna neden olarak yapıyı değiştirebilmektedir. İnversiyon 9 sıklıkla rastlanılan bir dengeli kromozom değişimidir [53]. 4131 inversiyonlu olgunun karyotipi incelenmiş, perisentrik inversiyona sahip 62 olguda inversiyon 9 saptanmış ve bu olgulardan %27.4'ünün tekrarlayan gebelik kaybı vakası olduğu sonucuna varılmıştır. Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında inversiyon 9 görülme sıklığı fazla bulunmuştur [54].

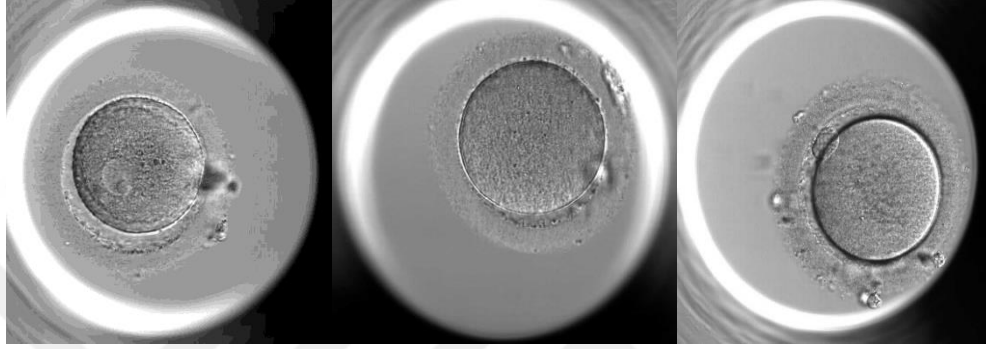
Translokasyon, yapısal kromozom anomalilerindendir ve kromozom segmentlerinin kromozomlar arası değişimidir, parça değişimi homolog olmayan kromozomlarda gerçekleştiğinde resiprokal translokasyon; bağımsız iki akrosentrik kromozomun sentromer veya p kollarından iç içe geçmesi ise Robertsonian Translokasyon olarak isimlendirilir, popülasyonda görülmek sıklığı 1/1000dir. Resiprokal Translokasyonun genellikle en az iki kromozom arasındaki iki kırık oluşumu ile meydana gelir. Resiprokal translokasyonda dengesiz gamet oluşumu %85lere kadar çıkabilmektedir ve etkilenen bireylerde mental retardasyon görülebilmektedir. Robertsonian Translokasyonda ise dengesiz gamet oluşumu sonrası trizomik veya monozomik zigotlar ortaya çıkabilmektedir.

2.4. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI, sperm hücresinin ZP ve oolemmayı geçerek oosit sitoplazması içerisine kullanılan özel çaplı pipetler yardımıyla enjekte edilmesi esasına dayanır. Geçmiş zamanlarda ICSI, yalnızca sperm faktörlü infertil olgularda kullanılmış olsa da günümüzde infertilite olgularının neredeyse tamamında kullanılan bir mikromanipülasyon işlemi haline gelmiştir [55].

İnfertilite yakınması ile YÜT'e başvuran olgularda birden çok oosit elde etmek amacıyla ovulasyon indüksiyonu (OI) ve kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) protokolleri uygulanmakta ve belirli ilaçlar kullanılarak oosit üretimini tetiklemek için ovaryumlar uyarılmaktadır. Bu protokoller maternal yaş, önceki deneme siklus sayıları, over rezervi ve FSH düzeylerine göre olguların klinik özelliklerine göre değişebilmektedir [56]. ICSI işlemi bu protokollerin sonrasında YÜT'ün tam orta noktasında anahtar-kilit rol oynamaktadır. ICSI işlemi, yumurta toplama operasyonunu takiben alınan oositlerin gerekli muamelesi (inkübasyon, denudasyon

vb. işlemler) sonrasında MII aşamasında olup matür olarak değerlendirilen oositlere, konsantrasyon sonrasında uygun sperm seçimi yapılarak iyi motilite ve morfolojideki spermier seçilerek oosit sitoplazması içerisine mikroyenjeksiyon pipeti ile bırakılması adımlarını kapsamaktadır [57]. ICSI işlemi özel mikromanipülatörler yardımıyla inverted mikroskop ile uygulanmaktadır. Germinal veziküllü ve/veya MetafazII oositlere ICSI uygulanmamaktadır.



Şekil 1: GV oosit, MI oosit, MII oositler
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

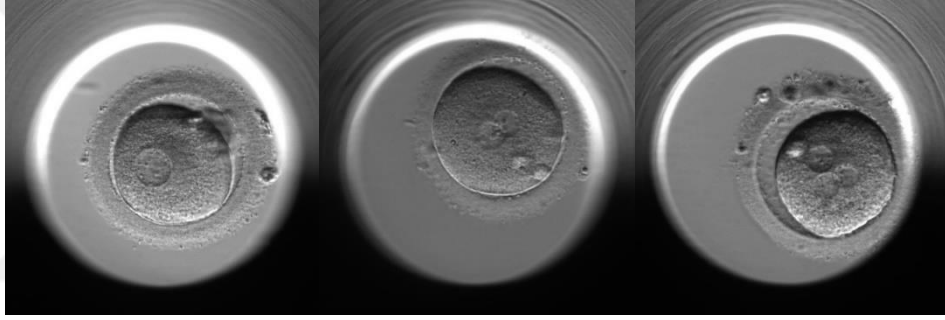


Şekil 2: ICSI işleminde mikroyenjeksiyon pipetleri pozisyonları
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

2.5. Fertilizasyon ve Embriyo Gelişimi

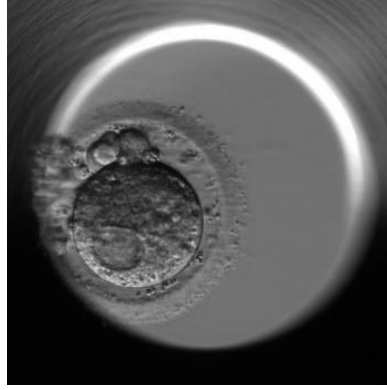
ICSI işlemi sonrası sperm ile aktive olan oosit sekonder polar cisimciğini atar ve maternal PN oluşur, sperm paketlenmiş haldeki kromatinlerini açarak zarını yok eder ve oosite benzer olarak sperm hücresi de bazı değişimler göstererek paternal PN' i oluşturup dişi pronükleusa doğru ilerler. Bunun sonucunda ICSI sonrası yaklaşık 16-

20. Saatte, paternal ve maternal olmak üzere iki PN oluşumu gözlenir. İki PN varlığı normal fertilizasyonun göstergesi olarak kabul edilir ve bu yapı zigot olarak adlandırılır [58]. Ancak, PN kontrolü sırasında normalin dışında yalnızca 1 veya 2'den fazla pronükleus varlığı da izlenebilmektedir. Bu duruma monoPN ve 3PN denmektedir ve çoğunlukla anormal fertilizasyon göstergesidir. MonoPN izlenmesi durumunda kromozom seti eksikliği açısından yaşamla bağdaşmayan bir embriyo oluşumuna neden olabilir veya 3PN izlenmesi durumunda ekstra bir kromozom seti bulunacağından triploidiye neden olabilecek genetik anormalliğe yol açabilmektedir. Bunun dışında oluşan PNler normalden çok daha büyükse hem sitoplazmik hücre artığı olarak anılan fragmantasyon varlığına neden olabilecek hem de kromozomal anomalinin olabileceği hakkında bilgi verecektir [59].



Şekil 3: MonoPN, 2PN (normal fertilize), 3PN döllenmiş oositler
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

Oosit morfolojisi göz önünde bulundurulduğunda oosit sitoplazmasının homojen bir yapıda olması gerekir ancak denudasyon sonrası oositlerin %60-70'inde dismorfizm dikkat çekmektedir [60]. Oositler morfolojik olarak anormal sitoplazmik yapısına, vakuollere, granülasyona veya genişlemiş perivitellin aralığa sahip olabilir [61]. Sitoplazmada granülasyon gözlenmesi embriyo gelişimi açısından netlik içermemekle birlikte oositte bulunan vakuolün 14 mikrometreden büyük olması ile embriyonun daha az sayıda blastomer oluşturmaya neden olabileceği ve bu durumda embriyo gelişiminde yavaşlamalara öncülük edeceği bilinmektedir [62].



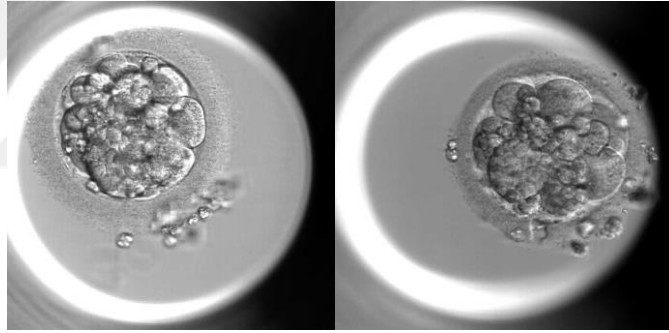
Şekil 4: Morfolojik anomaliliye sahip vakuollü granüle oosit
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

ICSI sonrası 24-26. Saatte zigot, ilk klivaja girerek iki blastomerli bir embriyo yapısını oluşturur. Embriyolar in vitro koşullarda optimal sıcaklık, nem ve gaz oranlarına sahip konvansiyonel inkübatörlerde ve/veya özelleşmiş kapalı kameralı sistemlerden olan SEİS'lerde takip edilir. Fertilizasyon günü 0. Gün olarak kabul edildiğinde embriyolar; ikinci günde 4 blastomerli, üçüncü günde ise 6-10 blastomerli yapı oluşturur. Embriyo klivaja girerken bazen iki blastomer oluşumu yerine üç blastomere bölünür ve bu durum direkt klivaj (DK) olarak adlandırılır. Direkt klivajın embriyoda kromozomal anöploidilerin bir göstergesi olabildiği iletilmiştir. Aynı zamanda, 2 blastomerli evreden 3 blastomerli evreye geçişin 5 saate eşit veya az olması da direkt klivaj olarak tanımlanmıştır [63]. Embriyodaki bir blastomer oluşumu sonrasında hücreyi geri alıp tekrar klivaja girmesi reverse klivaj (RK) olarak adlandırılır bu durumun da implantasyon oranını düşürdüğü ve genetik anomalilerin oluşumuna öncülük ettiği ifade edilmektedir [64]. Buna ek olarak, klivaj sırasında embriyodaki her blastomer, sitoplazmayı eşit şekilde paylaşamaz, sitoplazmik moleküllerin eşit dağılmaması durumunda ise blastomerlere eşit oranda mesajcı ribonükleik asit (mRNA) protein yapı molekülleri aktarılamaz. Blastomer boyutları arasındaki eşitsizliğin anöploidi oranlarında artışa sebebiyet verebildiği ve buna bağlı düşük implantasyon başarısına sahip olduğu düşünülmektedir [65].



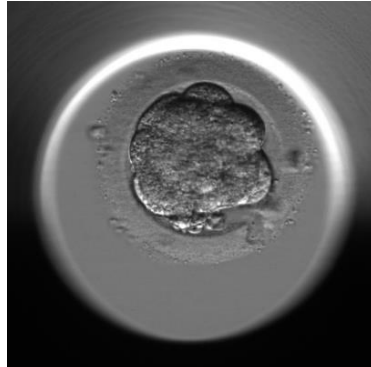
Şekil 5: Eşit blastomer boyutlarına sahip embriyolar
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

Ayrıca, embriyo değerlendirmesi sırasında özellikle üçüncü günde sitoplazmik hücre artığı olarak adlandırılan fragmentasyonun değerlendirilmesi yapılması embriyo gelişiminin takibi açısından önemlidir. Fragmentasyon varlığının anöploidi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [66]. Ancak, fragmentasyon varlığı %10'un altında olduğunda embriyo gelişiminde herhangi bir olumsuzluğa neden olmadığı belirtilmiştir.



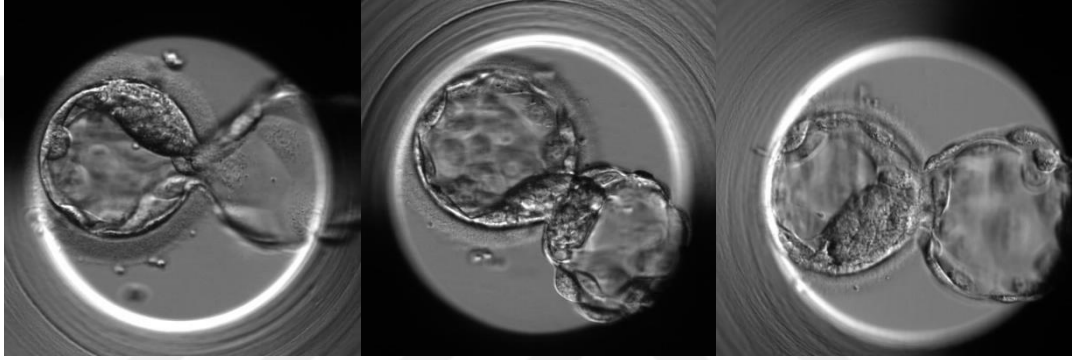
Şekil 6: Hücreler arası yaygın fragmentasyona sahip 3. Gün embriyoları
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

Dördüncü günde 16-32 blastomerli bir yapı halini alan embriyoda blastomerlere ait hücresel konturlar kaynaşarak morula yapısını oluşturur.



Şekil 7: Morula
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

Beşinci günde farklılaşmış bir yapıya bürünen embriyo, iç hücre kitlesi (embriyoblast) bebeği oluşturacak ve dış hücreleri yani trofektoderm hücreleri (trofoblast) ise plasentayı oluşturacak evreye ulaşarak yaklaşık 8 embriyoblast ve 99 trofoblast hücresinin oluşturduğu embriyo yapısı halinde blastosist adı altında sınıflandırılır. Blastosist ekspansiyona devam ederken ZP'yi baskılayarak inceltir ve hücreler ZP'den dışarı çıkar, bu olaya hatching denir [67]. Chimote ve arkadaşları spontan hatching blastosistlerin implantasyon potansiyelinin olmayanların aksine daha fazla olduğunu ve bunun doğrudan pozitif gebelik ile ilişkilendirildiğini bildirmişlerdir [68].



Şekil 8: Hatching Blastosistler
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

Blastosist aşamasında embriyolar 6 parametrede değerlendirilir. Blastosist sınıflandırmasında en sık Gardner skorlaması kullanılmaktadır.

1. Blastosöl volümü embriyonun %50'sinden azdır.
2. Blastosöl volümü embriyonun %50'si kadar veya daha fazladır.
3. Blastosöl volümü embriyonun tamamı kadardır.
4. Embriyo ekspansedir ve ZP incelmeye başlamıştır.
5. Hatching başlamıştır.
6. Embriyonun %50'sinden fazlası ZP dışına çıkmıştır.

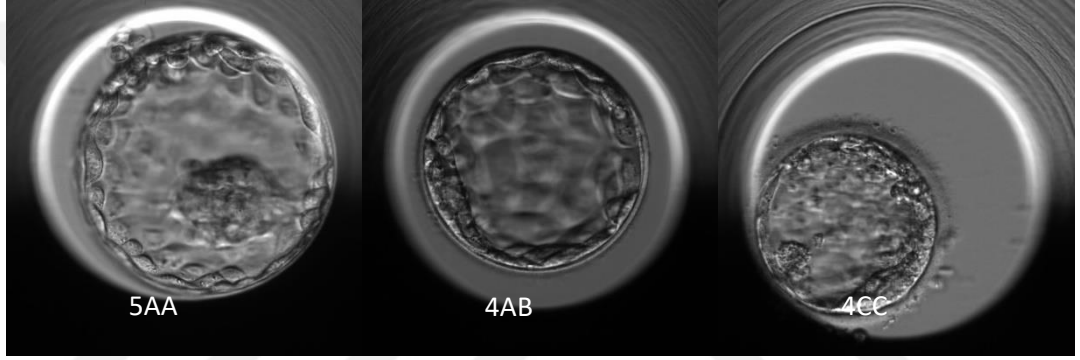
Embriyoya ait iç hücre kitlesinin büyüklüğü implantasyon başarısının artması ile ilişkili olabildiği öne sürülmektedir [69]. ICM ve trofektoderm sınıflandırması hücrelerin bağlantısı ve yoğunluğuna göre 3 kategoride değerlendirilmektedir. ICM hücrelerinin yoğunluğu ve hücre paketlenmelerinin sıklığı iyi kalite embriyo göstergesidir [70].

ICM Kalitesi;

- A. Hücreler sıkı paketlenmiş ve çok sayıda hücre bir arada
- B. Hücreler arası kümeleşme az, ancak çok sayıda hücre bir arada
- C. Çok az sayıda hücre bir arada

TE Kalitesi;

- A. Epitel yapı yakın dizilimli ve sıkı paketlenmiş
- B. Epitel yapı daha az hücreye sahip
- C. Epitel yapıda hücre yok denecek kadar az



Şekil 9: En İyi Kalite, İyi Kalite ve Orta Kalite Blastosistler
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

2.6. Preimplantasyon Genetik Tanı

Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT), genetik biliminin gelişmesiyle birlikte implantasyon öncesi aşamasındaki embriyoların kromozomal açıdan değerlendirilmesi olarak tanımlanabilmektedir. Embriyo transferi öncesinde, embriyolar henüz blastosist aşamasında iken alınacak 5-6 hücrenin incelenmesi embriyonun genetik yapısı ile ilgili ön bilgi verebilmektedir [70]. Bu tanı testi ile yaşamla bağdaşabilecek sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler saptanabilmektedir. Özellikle, yardımcı üreme teknikleri ile ebeveyn olmak isteyen ve canlı doğuma ulaşma süresini kısaltmayı amaçlayan bireylere ekstra bir embriyo seçim imkanı sunmaktadır. Bununla birlikte, sağlıklı bireyi oluşturabilecek kromozom sayısına ve/veya yapısına sahip embriyoların belirlenmesi ve implantasyon ihtimali olmayan; abortusla sonuçlanabilecek embriyoların gereksiz transferinin önüne geçebilmesi sağlanmaktadır.

PGT, dünyada ilk kez Handyside ve arkadaşları tarafından cinsiyete bağlı hastalıklar için embriyoların implantasyon öncesinde cinsiyetlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır [71]. 1968 yılında Gardner ve Edward tarafından yapılan bir çalışmada ise tavşan embriyosuna ait hücrelerden biyopsi alınarak X kromozomuna ait kromatin yapıları incelenmiştir [72]. İnsan embriyoları için PGT, dünyada ilk kez polar cisim biyopsisi ile 1987 yılında uygulanmış, Verlinsky ve arkadaşları tarafından uluslararası bir kongrede bildirilmiştir [73]. Ülkemizde ilk olarak 1997 yılında Prof. Dr. Semra Kahraman ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. Böylece PGT, yardımcı üreme tekniklerinin yaygın hale gelmesi ve moleküler genetik alanındaki yenilikler ile dünyanın birçok yerinde rutinde kullanılmaya başlanmıştır.

Klinikte kullanılan PGT'nin başlıca kullanım alanı anöploidilerin belirlenmesidir, buna anöploidi taraması için yapılacak preimplantasyon genetik tanı (PGT-A) adı verilmektedir. Bu tanı yöntemi ile tekrarlayan gebelik kayıpları başta olmak üzere şiddetli erkek faktörü gibi vakalarda embriyoya ait kromozomal anomaliler implantasyon öncesinde tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda ileri anne yaşına bağlı tekrarlayan abortus vakalarında anöploidi artışı izlenmektedir [74,75]. PGT-A ile kromozomları belirlenen ve sayısal anöploidilerin ekarte edildiği vakalarda abortus oranlarında azalma ve başarılı implantasyon görülmektedir. Buna karşın, 2019 yılında Irani ve arkadaşları tarafından yapılan bir klinik çalışma sonrasında öploid embriyo transferinin ileri maternal yaşta gebelik oranlarını değiştirmedeği sonucuna varılmıştır [76].

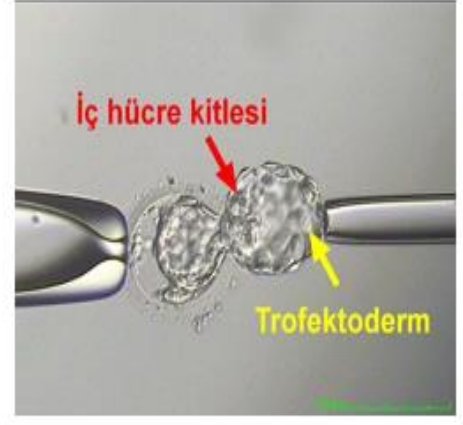
2.6.1. Trofektoderm biyopsisi

ICSI işlemini takiben 5.günde embriyo ve/veya embriyoların blastosist aşamasına ulaşması beklenmektedir. ICSI sonrası normal fertilize izlenen oositlerden gelişen embriyoların yaklaşık %40'ı blastosist adı verilen farklılaşmış evreye ulaşmaktadır. Blastosist aşamasındaki bir embriyo iç hücre kitlesi (ICM), blastosöl kavite ve dış hücrelerden oluşmaktadır [67]. Embriyonun iç hücre kitlesi, ICM yani bebeği oluşturacak hücrelere; dış hücresi yani trofektoderm (TE) hücreleri ise bebeğin eşi olan plasentayı oluşturacak hücrelere farklılaşır. PGT-A bu anlamda 5.güne ulaşan blastosistlere ait TE hücrelerinden alınacak yaklaşık 5-6 hücreye ait biyopsi örnekleri incelenerek uygulanmaktadır.

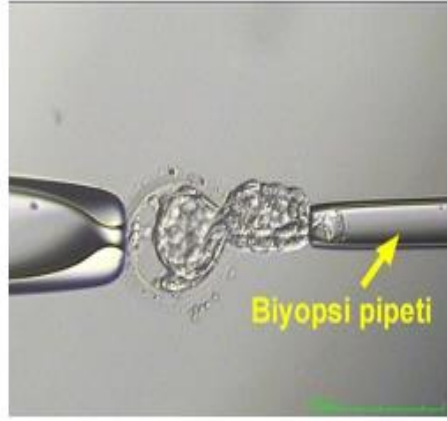
Genetik biliminin gelişmesiyle adından söz edilen polar cisim biyopsisi ve blastomer biyopsisine nazaran TB işlemi daha avantajlıdır. TB işleminde biyopsi materyali embriyonun, plasentayı oluşturacak olan TE hücrelerinden elde edilecek hücre gruplarını içerdiği için embriyonun canlılığı açısından en az öneme sahip olması beklenmektedir. Bu işlem ile embriyonun bebeği oluşturacak hücrelerine; iç hücre kitlesine dokunulmayacağından embriyo daha az etkilenmiş olacaktır [77]. TB işleminin bu yöndeki diğer bir avantajı ise embriyoların kültür ortamında yaklaşık 5 gün süre ile incelenmesi sonrasında 5.güne ulaşamayan embriyolara herhangi bir işlem yapılamayacak olmasıdır. Beşinci güne kadar gelişimini devam ettirmeyen ve blastosist aşamasına ulaşamayan embriyolar için anöploidilerin arttığı ve implantasyon oranlarının azaldığını gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur. Coll ve arkadaşları TE biyopsisi ve klivaj dönem uygulanan blastomer biyopsisine dair araştırma yapmış ve TE uygulanan embriyolarda daha yüksek öploid oranı olduğunu belirtmişlerdir [78]. Bu bağlamda TB işleminde embriyolarda öploid şansının arttığı ve öploid embriyo bulma ve/veya daha yüksek implantasyon başarısına sahip olacağı düşünülen embriyoların seçimine imkan sunabileceği düşünülmektedir. 2013 yılında Scott ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma bulguları göz önünde bulundurulduğunda yalnızca blastosist aşamasına ulaşan embriyolara TB yapılması önerilmiştir [79].



Biyopsi öncesi blastokist aşamasındaki hatching embriyo



Embriyo holding pipetle tutulur



5-6 trofektoderm hücresi biyopsi pipeti ile aspire edilir



Lazer ışınları ya da sadece biyopsi pipetini holding pipetine sürterek trofektoderm hücreleri blastokisten ayrıştırılır.



Biyopsi sonrası normal gelişimine devam eden blastokist

Şekil 10: Trofektoderm biyopsi işlemi
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

3. MATERYAL METOD

Çalışmamız T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunuldu. 07.04.2022/24 sayı ve 24.03.2022 tarihli yerel etik kurul onayı alındı.

01.04.2022 – 01.10.2022 tarihleri arasında İstanbul Özel Memorial Şişli Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı bünyesindeki Embriyoloji Laboratuvarı'nda prospektif olarak yürütülen bu çalışmaya;

- ≥ 3 kez gebelik kaybı yaşayan
- 38 yaş ve/veya altı
- Mutlak PGT-A uygulanacak
- Sürekli Embriyo İzleme Sistemleri'nde takip edilecek

vakalar dahil edildi,

- Şiddetli Erkek Faktörü (Azoospermi, kriptozoospermi, vb.)
- Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı
- Endometrial Faktör (ince endometrium, endometriozis vb.)
- Tek Gen Hastalığı
- Translokasyon Taşıyıcılığı

bulunan vakalar çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışmaya tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü bulunan 100 vaka dahil edildi. Kontrol grubu olarak belirlenen açıklanamayan infertil grubunda ise 90 vaka yer aldı. Çalışma toplamda 190 vaka üzerinden ilerledi.

3.1. Ovulasyon İndüksiyonu

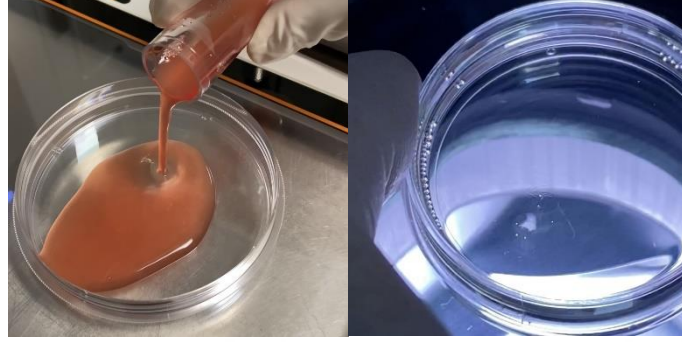
İstanbul Özel Memorial Şişli Hastanesi Tüp Bebek ve Üreme Genetiği Merkezi'ne başvuran ve çalışmada yer alan 190 vakaya folikül gelişiminin tetiklenmesi, ovulasyon zamanlamasının yapılması ve çok sayıda oosit elde edilmesini sağlamak amacıyla ovulasyon indüksiyonu (Oİ) uygulandı. Oİ bu vakalarda menstrüasyonun ikinci gününde çeşitli dozlarla rekombinant folikül stimüle edici hormon (rFSH) veya FSH+LH kombinasyonu olan Human Menopozal Gonadotropinler (HMG) ile sağlandı. Ovulasyon indüksiyonunda rFSH kullanımı veya HMG kullanımında doz seçenekleri her vakada farklılık gösterdi. Doz seçimi vakaların vücut kitle indeksleri, yaşları, anti-müllerian hormon (AMH) düzeyleri ve over yanıtına göre belirlendi. VKİ normal sınırlarda olan vakalarda başlangıç dozu 75-150 internasyonal unit (IU) olarak ayarlandı. Ayrıca over yanıtına göre, dozlar kademeli olarak arttırıldı. Buna karşın, çalışmamızda vakalardan bağımsız olmak üzere 600 IU/gün dozun üzerine çıkılmadı.

Çalışmamızda ovulasyon indüksiyonu uygulanan vakalara özgü doz seçimi yapıldıktan sonra kandan estradiol (E2) değeri ölçümü yapıldı. E2 değeri 600-1500 pg/ml arasında olduğu belirlenen vakalarda ise hCG enjeksiyonu ile trigger yapılarak yumurta toplama işlemi planlandı.

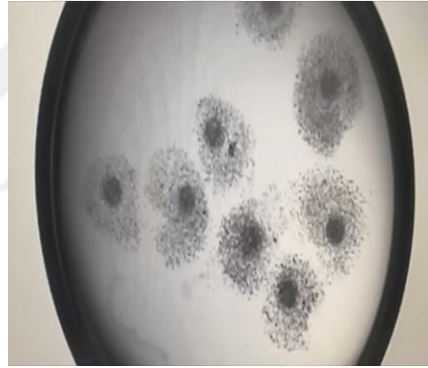
3.2. Oosit Toplama

Ovulasyon indüksiyonu ve kontrollü over stimülasyonu (KOS) sonrası hCG enjeksiyonundan yaklaşık 36 saat sonra yumurta toplama işlemi (OPU), transvajinal ultrason eşliğinde sedasyon ile embriyoloji laboratuvarına bağlı işlem odasında gerçekleştirildi. OPU işleminin gerçekleştirileceği laminar hava akım kabini çalıştırıldı ve yeterli sayıdaki petri kabı 37 dereceye ayarlanmış ısıtıcı tabla üzerine yerleştirildi. OPU sırasında, aspire edilen folikül sıvısının içeriği laminar hava akım kabini içerisinde alttan aydınlatmalı stereo mikroskobu kullanılarak incelendi ve oosit-kümüllüs kompleksleri (KOK) ayıklandı. Ayıklanan KOK'lar bir gece önceden ısıtılmış ve üzeri parafin yağ (LifeGlobal®, Seattle, ABD) ile kaplanmış %5 HSA içerikli HEPES tamponlu solüsyon (LifeGlobal®, Seattle, ABD) içerisinde steril cam pastör pipeti (Origio) kullanılarak aktarıldı. KOK'lar bu medyum içerisinde birkaç kez yıkanarak folikül sıvısı içeriğinden uzaklaştırıldı. OPU işlemi bittiğinde HEPES tamponlu medyum (LifeGlobal®, Seattle, ABD) içerisinde kümülüsler için belli bir

oranda disseksiyon işlemi gerçekleştirildi, bir gün önceden hazırlanmış ve gazlanmış kültür ortamına (HTF) (LifeGlobal®, Seattle, ABD) aktarıldı. KOKlar %5,8 CO₂, %5.0 O₂ ve 37°C'deki inkübatörde denüstasyon işlemine kadar yaklaşık 3 saat bekletildi.



Şekil 11: Foliküler sıvı ve HEPES tamponlu medyum
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)



Şekil 12: HEPES tamponlu medyumdaki KOK görünümü
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

3.3. Denüstasyon ve ICSI

OPU işlemi sonrası 3.saatte denüstasyon işlemi gerçekleştirilmek üzere KOK'lar inkübatörden çıkarıldı. Oositi çevreleyen kümülüs-korona kompleksi, işlem sabahı hazırlanmış %5 HSA içerikli HEPES tamponlu (LifeGlobal®, Seattle, ABD), Hyalüronidaz enzimi (Irvine Scientific®, ABD) içerikli medyuma aktarılarak hem mekanik hem enzimatik yolla uzaklaştırıldı. Bu işlem sırasında KOK'lar yaklaşık 10-20 saniye enzim ile muamele edildi. Oositler dış çevresinde yalnızca zona pellusida kalacak şekilde denüde edildi. Denüde edilen oositler için stereo mikroskop altında matürasyon kontrolü yapıldı.



Şekil 13: Stereo Mikroskop

(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

Metafaz II (MII) aşamasındaki olgun olarak değerlendirilen oositler ICSI için ayrılarak %5.6 CO₂ , %5.0 O₂ ve 37 C'deki inkübatörde ICSI için yaklaşık yarım saat bekletildi. İntrasitoplazmik Morfolojik Olarak Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu (IMSI) ile seçilen spermeler işlem sabahı hazırlanmış HEPES tamponlu ICSI petrisine (Falcon®, Corning, ABD) aktarıldı. ICSI petrisi %5 HSA içerikli HEPES tamponlu bir sperm havuzu, polivinilprolidon (PVP) damlacığı, IMSI damlacığı ve toplamda 5 adet oosit damlacığı barındıracak şekilde hazırlandı ve üzeri 4 ml parafin yağ ile kaplandı. MetafazII oositler, ICSI için petrideki oosit damlacıklarına aktarıldı. Germinal vezikül (GV) ve Metafaz I (MI) aşamasındaki oositler işleme alınmadı.

Tutucu (Holding) pipet (Optimas®, Türkiye) ve ICSI pipetleri (Optimas®, Türkiye) mikromanipülatörde uygun pozisyona alındı. Hazırlanan ICSI petrisi mikromanipülatör üzerindeki ısıtıcı tablaya yerleştirildi. ICSI pipeti ile sperm havuzundan alınan sperm hücrelerinin PVP (Irvine Scientific®, ABD) aktarılması sağlandı. PVP'de kuyrukları kırıldı ve hareketsiz hale getirilerek pipet içerisine aspire edildi. Oosit damlacığına gidilerek her bir oositin polar cisimciği saat 12 hizasında olacak şekilde saat 3 hizasından oosit içerisine girilip sitoplazma hafifçe aspire edildi ve aspire edilen sitoplazma spermle birlikte yeniden oosit sitoplazması içerisine bırakıldı. Bu işlem her bir oosit için tekrarlandı. ICSI tamamlanması sonrası oositler %5 HSA içerikli kültür mediumu ile hazırlanmış ve üzeri 2 ml parafin yağ ile kaplanmış 16 kuyucuklu EmbryoSlide (VitroLife®, Sweden)'a aktarıldı. SEİS'te takibe alındı.



Şekil 14: 16 kuyucuklu EmbryoSlide (VitroLife®, Sweden)

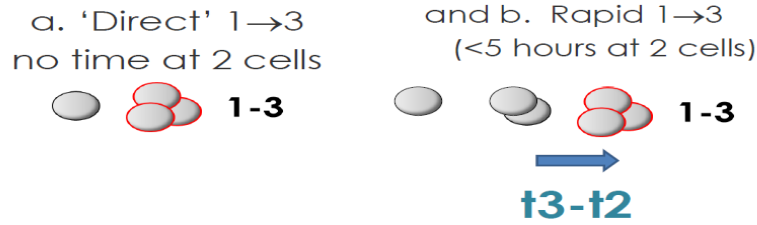


Şekil 15: Sürekli Embriyo İzleme Sistemleri
(İstanbul Memorial Şişli Hastanesi IVF Laboratuvarına ait fotoğraflar kullanılmıştır.)

3.4. SEİS'te Fertilizasyon Kontrolü ve Embriyolara ait Morfolojik Değerlendirmelerin Yapılması

ICSI sonrası 16-20.saatte fertilizasyon kontrolü için PN skorlaması yapıldı. Her bir oositteki PN'ler değerlendirildi. 2PN varlığı normal fertilizasyon, 1PN varlığı monoPN, üç PN varlığı 3PN olarak sınıflandırıldı. Ayrıca, PN görünme ve silinme zamanları incelendi. ICSI sonrası yaklaşık 24-26.saatte ilk klivaj kontrolü yapıldı. 28.saat sonrası gecikmiş klivaj olarak değerlendirildi. Klivaj varlığı saptandığında blastomerler arası boyut eşitliği even veya uneven olarak sınıflandırıldı. Ayrıca, embriyonun 1 blastomerli evreden 3 blastomerli evreye ve 2 blastomerli evreden 5 blastomerli evreye bölünmesi direkt klivaj olarak adlandırıldı. Buna ek olarak 2 blastomerli evreden 3 blastomerli evreye geçiş saatinin 5 ve/veya altında olması yine

direkt klivaj olarak değerlendirildi. Embriyolara ait fragmentasyon varlığı yüzdesel olarak hesaplandı.



Şekil 16: Direkt ya da Rapid Klivaj (1→3) şematize açıklaması

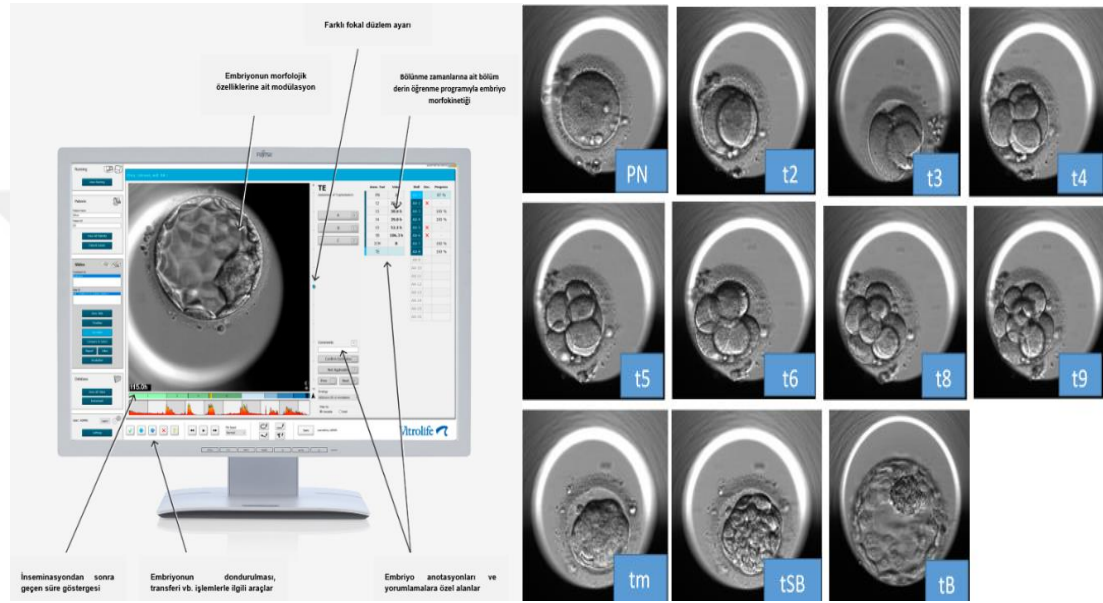
Üçüncü gün gelişiminde embriyolar 6-10 blastomerli, >%5 fragmentasyon ve eşit büyüklükte blastomere sahipse (blastomer even, BE) Grade I olarak ; 6-10 blastomerli >%10 fragmentasyon ve blastomerler arası büyüklükteki eşitsizliklere (blastomer uneven, bue) sahipse Grade II olarak ; 6-10 blastomerli >%15 fragmentasyon ve blastomerler arası eşitsizliklere (blastomer uneven, bue) sahipse GradeIII olarak sınıflandırıldı. Üçüncü günde >5 blastomerli embriyolar yavaş gelişen embriyo (YGE), >3 blastomerli embriyolar ise gelişimini durdurmuş embriyo (GDE) olarak değerlendirildi.

Dördüncü gün gelişiminde; Morula, Kompakte ve Kavitasyon başlangıcı olarak değerlendirilen embriyolar Grade I olarak sınıflandırıldı. Embriyolardaki vakuol ve/veya ayrı blastomer varlığı izlenmesi halinde skor bir grade düşürüldü. Ayrı blastomer varlığı içeren morula, kompakte veya kavitasyon başlangıcındaki embriyolar Grade II olarak değerlendirildi. Blastomerler arası konturların kaybolmadığı ve >10 blastomerin sayılabildiği embriyolarda blastomerler arası eşitsizlikler varsa embriyolar dördüncü günde Grade II, yoksa Grade III olarak sınıflandırıldı. <10 blastomerli embriyolar dördüncü günde Grade IV veya gelişime göre GDE olarak değerlendirildi.

Beşinci gün embriyo gelişiminde blastosist aşamasına ulaşan embriyolar Gardner skorlamasına göre yapıldı. En İyi Kalite (TQ), İyi Kalite (GQ), Orta Kalite (MQ) ve Zayıf Kalite (PQ) olarak değerlendirmeye alındı. Blastosist aşamasına ulaşamayan embriyolar YGE veya GDE olarak kabul edildi. 6AA, 5AA, 4AA olarak değerlendirilen blastosistler TQ ; 6AB, 6BA, 5AB, 5BA, 4AB, 4BA, 3AB blastosistler GQ; 6BB, 5BB, 4BB, 3BB embriyolar MQ olarak sınıflandırıldı. Blastosist

aşamasındaki embriyolarda ICM ve TE hücreleri gruplarına katılmayarak ayrı halde dominant kalan blastomerler ayrı blastomer olarak adlandırıldı.

Her bir embriyo için SEİS'te EmbryoViewer (VitroLife®, Sweden)'a kaydedildi. Kayıt sonrası PNa, PNf, t2, t3, t4, t5, t6, t8, t9, tSC, tM, tSB, tB, tEB parametreleri not edildi. Tüm mitoz bölünme zamanları ICSI sonrası saat birimiyle verildi.



Şekil 17: EmbryoViewer Modülü ve Embriyolara ait bölünme zamanlamaları

3.5. Trofektoderm Biyopsi İşlemi

Trofektoderm biyopsi (TB) işlemi, embriyoya ait morfolojik değerlendirme ve sınıflandırılma yapılması sonrasında embriyonun gelişimi açısından kendisini tolere edebilecek; yeterli hücre sayısına sahip ve belirli ekspansiyona ulaşmış beşinci veya altıncı günde blastosist evresindeki embriyolara uygulandı. TB işleminin blastosist evresinde sağlıklı bir şekilde yapılabilmesi için embriyo gelişiminin 3. gününde, dış blastomerler arasında oluşan kaviteyi çevreleyen ZPnin her biri 8 milisaniye olan ve 10 µm genişliğinde lazer atışı ile açıldı (assisted hatching), bu işlem ile blastosist aşamasında yeterli ekspansiyona ulaşan embriyolara ait belirli hücre gruplarının ZP'dan dışarı salınması (hatching) sağlandı.

TB işleminin hemen öncesinde embriyolar, üzeri önceden 4 ml parafin yağ (LifeGlobal®, Seattle, ABD) ile kaplanmış Ca²⁺ / Mg²⁺ içerikli %20 insan serum

albumin (HSA) (LifeGlobal®, Seattle, ABD)'li HEPES tamponlu kültür solüsyonuna (LifeGlobal®, Seattle, ABD) aktarıldı ve iç çapı 30 µm'lik biyopsi pipeti (Optimas®, Türkiye) ile yaklaşık 5-6 trofektoderm hücresi yavaş ve kontrollü şekilde aspire edildi. Alınan TB örnekleri fosfat tampon solüsyonu (PBS)'nda yıkanarak her biri yaklaşık 1 ml PBS içerikli eppendorf tüp içerisine çapı yaklaşık 135 mikrometre olan biyopsi pipeti kullanılarak total volüm 2 ml olacak şekilde aktarıldı (tübing işlemi). PBS'e aktarılan biyopsi örnekleri çalışılncaya dek -20°C'de muhafaza edildi.



3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda veriler SPSS v. 12 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 12.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılarak analiz edildi. Çalışma gruplarında yer alan parametrelerin normal dağılıma sahip olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile incelendi.

Normal dağılıma uyan parametreler için Student t-test; uymayan parametrelerin karşılaştırılmasında ise non-parametrik Mann Whitney U test kullanıldı. Normal dağılıma sahip veriler ortalama $\pm$ standart sapma, normal dağılıma sahip olmayan veriler ise minimum-maksimum olarak, kategorik veriler ise yüzde olarak gösterildi. Bağımsız grupların ortalamaları arasındaki karşılaştırmalar ANOVA test ile yapıldı. Anlamlı çıkan gruplarda anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferroni test ile bakıldı. Ayrıca, kategorik verilerin karşılaştırılması Ki-kare testi ile yapıldı.

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi sonrası hangi testin hangi parametreler için kullanıldığı Bulgular başlığı (Bkz. 4.Bulgular) altında yer alan her bir tablonun altında belirtildi. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Demografik Özelliklerinin Karşılaştırılması

Çalışma Nisan 2022 – Kasım 2022 tarihleri arasında İstanbul Özel Memorial Şişli Hastanesi Tüp Bebek ve Üreme Genetiği Merkezi bünyesinde Embriyoloji Laboratuvarında TGK grubunda 100 ; Aİ grubunda 90 vaka ile yapılmıştır.

Tablo 3: TGK ve Aİ gruplarının demografik ve klinik özellikleri

Demografik ve Klinik Özellikler	TGK (n=100)	Aİ (n=90)	p-değeri
	Ort.±Std.	Ort.±Std.	
Maternal Yaş	33,12 ± 3,70	33,93±3,21	,153
Paternal Yaş*	35,51 ± 4,48	36,44±5,24	,189
Kadın VKİ	24,48 ± 4,50	23,04±3,80	,009
D3 FSH	8,96 ± 3,27	8,79±2,34	,931
AMH	2,62 ± 1,92	2,80±1,57	,104
İnfertilite Süresi (yıl)	4,37 ± 2,92	3,71±3,49	,043
Deneme Sayısı	2,86 ± 2,24	2,21±1,87	,033
Toplam Stimulasyon Süresi (Gün)*	11,18 ± 1,56	11,01±1,32	,434
Trigger günü ≥17 mm folikül	6,49 ± 3,45	7,02±2,89	,154
Trigger günü ≤16 mm folikül	5,43 ± 3,53	5,90±3,90	,450
OPUda alınan toplam oosit	10,88 ± 5,70	11,44±5,02	,433
MII	9,47 ± 4,88	9,69±4,08	,579
2PN*	7,81 ± 4,05	7,96±3,40	,785
% Matürasyon	88,50 ± 12,65	86,72±13,87	,438
% Fertilizasyon	84,29 ± 15,18	83,24±14,30	,470
% Blastulasyon	71,57 ± 20,91	69,87±21,31	,585

VKI: Beden kütle indeksi, FSH: Folikül uyarıcı hormon, AMH: Antimüllerian hormon, PN: Pronükelus. *Normal dağılıma uyan parametreler Student t-test ile analiz edildi. Diğer parametrelerin karşılaştırılmasında non-parametrik Mann Whitney U test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyinde (p<0,05) bulunanlar koyu renk olarak belirtilmiştir.

Çalışmaya katılan TGK olgularında yaşlar 23 ile 39 arasında ; Aİ grubunda ise 24 ile 38 arasında değişmekte olup, ortalamalar 33,12±3,70; 33,93±3,21 yaş olarak saptanmıştır.

Olguların D3 FSH, AMH, Toplam Stimülasyon Süresi, Trigger Günü ≥17 mm ve ≤16 mm folikül Folikül Sayıları, OPU’da Alınan Toplam Oosit Sayısı, MII Oosit

Sayısı, Normal Fertilize Olan Oosit Sayısı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Matürasyon, Fertilizasyon ve Blastulasyon yüzdeleri açısından iki grupta da anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

TGK grubunda oosit matürasyonu %88,50; fertilizasyon %84,29; blastulasyon ise %71,57'dir. Kontrol grubu olan Aİ grubunda oosit matürasyonu %86,72; fertilizasyon %83,24; blastulasyon %69,87 olarak bulunmuştur.

Kadın VKİ, İnfertilite Süresi ve Deneme Sayısı dikkate alındığında gruplarda istatistiksel anlamlılık mevcuttur ($p<0,05$).

Çalışmamızda maternal ve paternal yaş, vücut kitle indeksi ve ayrı blastomer varlığında TGK ve Aİ grubunda embriyo morfokinetiği incelenmiş; maternal yaş, embriyo morfolojisi ve vücut kitle indeksinin embriyo morfokinetiğinde değişiklikler ortaya çıkardığı görülmüştür.

4.2. TGK Grubunda Yapılan İstatistiksel Analizler

TGK olgularında ileri maternal yaş olması durumunda morula aşamasından sonra süreçlerin uzadığı gözlenmiştir ($p<0,001$).

TGK grubunda morfokinetik parametrelerin embriyo kalitesine bağlı olarak 4. güne kadar değiştiği belirlenmiştir ($p<0,001$).

Vücut kitle indeksinin 30 ve üzeri olduğu durumlarda süreçlerin daha kısa veya uzun seyrettiği ve istatistiksel anlamlılık gösterdiği görülmüştür ($p<0,021$; $p=0,017$). Ayrı blastomer varlığının embriyo morfokinetiğini değiştirmedeği görülmüştür ($p>0,05$). Gruplarda VKİ'nin 25 ve altı olduğu durumda PGT-A sonuçları ile istatistiksel anlamlılık saptanmıştır ($p<0,05$).

TGK olgularında maternal ve paternal yaşın PGT-A sonuçlarını öploid ve anöploid açısından anlamlı bir şekilde değiştirmedeği görülmüştür ($p>0,05$).

TGK olgularında embriyo genetiğine bağlı olarak morfokinetik parametrelerde yalnızca tEB aşamasında istatistiki anlamlılık bulunmuştur, ancak Aİ grubunda t8, tSB, tB, tEB, t2-t8 aşamalarında öploid ve anöploid embriyoların farklı seyrettiği görülmüş ve istatistiksel anlamlılık bulunmuştur.

Tablo 4: TKG Grubunda PGT-A Uygulanan Embriyoların Morfokinetik Özelliklerinin Karşılaştırılması

	PGT Sonuç	N	Ortalama Std. Sapma	Minimum Maksimum	p-değeri
PNa	Mozaik	36	8,24±1,77	4,99-12,56	,132
	Euploid	157	7,97±1,58	4,89-15,40	
	Anöplöid	165	8,38±2,08	4,73-22,14	
PNf	Mozaik	35	23,64±3,57	16,64-30,38	,736
	Euploid	157	23,40±3,19	15,89-31,90	
	Anöplöid	164	23,21±3,23	16,15-34,30	
t2	Mozaik	36	26,12±3,53	19,69-33,38	,695
	Euploid	161	25,77±3,35	14,22-35,90	
	Anöplöid	169	25,61±3,26	18,65-37,05	
t3	Mozaik	36	36,47±5,03	25,88-46,85	,921
	Euploid	161	36,48±4,54	23,65-47,27	
	Anöplöid	169	36,67±4,30	26,49-50,19	
t4	Mozaik	36	38,41±4,83	30,66-47,50	,851
	Euploid	161	38,11±4,21	29,50-50,13	
	Anöplöid	169	37,96±4,52	28,12-57,10	
t5	Mozaik	36	49,05±7,40	34,45-64,66	,846
	Euploid	160	49,25±6,54	32,33-62,65	
	Anöplöid	169	49,62±7,25	30,38-79,71	
t6	Mozaik	36	52,65±6,85	34,45-65,67	,878
	Euploid	158	52,43±6,25	38,76-71,42	
	Anöplöid	168	52,14±6,87	32,80-80,95	
t7	Mozaik	34	54,25±6,68	42,17-67,42	,804
	Euploid	150	54,52±6,87	39,76-78,92	
	Anöplöid	162	54,95±7,43	41,76-85,21	
t8	Mozaik	36	58,35±6,96	42,17-71,83	,592
	Euploid	157	56,89±8,19	39,76-93,44	
	Anöplöid	164	57,49±8,69	43,04-88,53	
t9	Mozaik	35	67,77±9,94	48,09-85,47	,643
	Euploid	154	66,96±9,42	42,86-93,44	
	Anöplöid	160	67,86±9,10	48,91-92,29	
tSC	Mozaik	35	77,73±9,37	57,84-95,43	,417
	Euploid	157	76,90±9,58	46,53-105,80	
	Anöplöid	156	78,29±8,98	60,65-113,94	
tM	Mozaik	35	86,72±8,47	71,78-102, 26	,531
	Euploid	156	86,16±8,65	65,82-112,31	
	Anöplöid	159	87,27±8,83	64,63-117,94	
tSB	Mozaik	34	97,26±7,26	86,67-111,	,593

	Euploid	150	96,24±8,85	62,95-118,85	
	Anöploid	154	97, 20±8,83	68,47-120,27	
tB	Mozaik	34	105,46±7,68	92,08-123,04	,154
	Euploid	146	103,37±8,16	81,74-127,09	
	Anöploid	140	97, 20±8,83	78,48-138,02	
tEB	Mozaik	29	113,41±7,08	103,64-128,04	,024*
	Euploid	126	109,66±7,55	90, 25-132,46	
	Anöploid	119	111,46±7,28	89,73-132,97	
t2-t8	Mozaik	36	32, 24±5,34	22,48-41,59	,385
	Euploid	157	31,01±6,47	21,26-65,19	
	Anöploid	163	31,91±7,01	22,26-57,18	
t8-tM	Mozaik	35	28,55±5,72	18,86-38,70	,493
	Euploid	156	30,50±10,56	9,51-96,15	
	Anöploid	158	29,94±7,60	9,61-52,87	
tSC-tM	Mozaik	35	8,99±4,85	0,75-23,73	,660
	Euploid	156	9,35±4,81	0,76-23,32	
	Anöploid	158	10,01±10,12	1,75-90,59	
t8-tSC	Mozaik	35	19,56±5,55	7,00-29,51	,807
	Euploid	157	21,21±10,58	2,75-91,88	
	Anöploid	156	20,94±6,79	4,50-47,16	
tM-tSB	Mozaik	34	10,80±5,13	3,76-20,48	,346
	Euploid	147	11,51±8,93	2,51-101,64	
	Anöploid	151	10,31±5,30	2,10-29,08	
tSB-tEB	Mozaik	28	15,38±4,29	6,86-24,88	,590
	Euploid	125	15,00±5,57	6,75-45,04	
	Anöploid	118	15,35±5,40	7,75-49,05	

Gruplar arası karşılaştırmalar ANOVA test ile yapılmıştır. Anlamli çıkan gruplarda anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferroni test ile bakılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyinde ($p<0,05$) bulunanlar koyu renk olarak belirtilmiştir.

TGK olgularında öploid, mozaik ve anöploid embriyolara ait morfokinetik parametreler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Morfokinetik parametreler embriyo kalitesine göre karşılaştırıldığında; TQ embriyoların t8, tM, tSB, tB, tEB ve t2-t8 evrelerine GQ ve MQ embriyolara kıyasla daha kısa sürede ulaştığı gözlenmiştir (t8: TQ vs GQ $p=0,003$, TQ vs MQ $p= 0,022$; tM: TQ - MQ $p=0,003$; tSB: TQ - MQ $p=0,004$; tB: TQ - GQ $p=0,034$, TQ - MQ $p<0,001$; tEB: TQ - MQ $p=0,001$; t2-t8 : TQ - GQ $p=0,004$, TQ - MQ $p=0,027$).

30 yaşın altındaki TGK olgularında embriyo morfokinetiği dikkate alındığında t8-tM, t8-tSC ve tSB-tEB süreleri 36-38 yaş aralığındaki TGK olgularına göre daha düşük bulunmuş, istatistiksel anlamlılık izlenmiştir (p=0,002; p=0,002; p<0,001).

Tablo 5 : TGK grubunda maternal yaş gruplarına göre embriyoların morfokinetik özelliklerinin karşılaştırılması

	Maternal Yaş	n	Ort.±Std.	Min.-Maks.	p-değeri
PNa	≤30	204	8,62±2,15	2,99-19,98	,215
	31-35	293	8,28±2,06	4,84-22,14	
	36-38	137	8,37±2,43	4,73-18,85	
PNf	≤30	204	24,37±4,52	16,79-54,80	,068
	31-35	292	23,79±3,69	15,89-40,37	
	36-38	133	23,32±4,50	15,74-41,36	
t2	≤30	207	26,71±4,65	19,29-58,30	,093
	31-35	294	26,46±4,03	18,39-44,12	
	36-38	137	25,70±4,23	14,22-37,82	
t3	≤30	205	36,66±5,52	21,92-58,30	,647
	31-35	293	36,68±5,45	22,84-58,93	
	36-38	135	36,17±5,47	20,06-55,14	
t4	≤30	204	38,73±5,24	23,96-58,30	,549
	31-35	293	38,83±6,19	28,12-71,86	
	36-38	134	38,16±6,49	22,09-72,42	
t5	≤30	202	48,41±8,13	24,00-71,26	,963
	31-35	288	48,63±8,51	30,33-83,89	
	36-38	132	48,51±9,49	29,57-93,86	
t6	≤30	200	51,82±7,32	30,12-72,01	,335
	31-35	283	52,92±8,81	32,04-85,20	
	36-38	128	52,06±9,50	31,57-93,86	
t7	≤30	190	55,12±8,31	30,12-85,54	,550
	31-35	255	55,56±9,39	35,29-100,96	
	36-38	122	54,46±10,00	38,57-106,31	
t8	≤30	200	58,07±9,72	35,38-98,30	,611
	31-35	267	58,84±10,62	39,76-104,46	
	36-38	120	57,91±9,64	42,17-91,27	
t9	≤30	198	67,29±10,53	35,38-106,05	,237
	31-35	258	67,96±11,40	42,78-115,97	
	36-38	119	65,89±10,97	42,86-93,11	
tSC	≤30	191	77,88±10,73	41,13-117,07	,452
	31-35	246	78,81±10,45	46,53-123,69	
	36-38	119	79,39±11,35	55,09-116,03	
tM	≤30	181	87,12±9,70	61,92-117,94	,334
	31-35	241	87,37±8,93	65,40-121,01	
	36-38	109	88,74±10,21	63,82-117,97	
tSB	≤30	163	97,54±8,48	79,65-120,20	,886
	31-35	235	97,98±8,62	71,97-139,96	
	36-38	93	97,65±11,50	62,95-122,91	
tB	≤30	145	104,11±8,20	85,15-127,03	,144
	31-35	203	104,28±8,37	78,48-138,02	

tEB	36-38	81	106,25±8,83	93,20-140,08	,466
	≤30	118	110,23±7,41	94,65-132,54	
	31-35	162	110,25±7,62	89,73-132,97	
t2-t8	36-38	61	111,53±6,71	98,04-129,58	,222
	≤30	200	31,34±7,71	6,00-61,04	
	31-35	266	32,62±9,24	2,50-70,94	
t8-tM	36-38	120	32,61±7,74	18,76-54,40	<0,001 (≤30 vs 36-38 yaş p=0,002)
	≤30	181	29,75±7,58	8,75-57,04	
	31-35	240	29,14±7,79	8,01-51,67	
tSC-tM	36-38	109	33,79±14,62	9,51-104,66	,574
	≤30	181	9,16±4,78	0,75-28,85	
	31-35	240	9,74±8,66	0,75-90,59	
t8-tSC	36-38	109	9,96±5,46	3,00-36,05	<0,001 (≤30 vs 36-38 yaş p=0,002)
	≤30	191	20,42±7,02	3,75-47,16	
	31-35	246	20,14±7,18	2,00-42,16	
tM-tSB	36-38	119	24,07±13,73	3,00-92,40	,246
	≤30	162	10,86±6,02	1,75-31,82	
	31-35	234	11,19±7,89	2,10-101,64	
tSB-tEB	36-38	88	12,49±8,98	2,76-75,37	<0,001 (≤30 vs 36-38 yaş p<0,001)
	≤30	117	14,55±3,88	6,75-29,71	
	31-35	162	14,87±4,10	6,76-26,25	
	36-38	58	17,77±8,41	8,00-49,05	

Gruplar arası karşılaştırmalar ANOVA test ile yapılmıştır. Anlamlı çıkan gruplarda anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferroni test ile bakılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyinde (p<0,05) bulunanlar koyu renk olarak belirtilmiştir.

TGK olgularında kadın yaşının morfokinetik özellikleri t8-tM, t8-tSc, tSB-tEB aşamalarında etkilediği gözlenmiştir (p<0,001).

Tablo 6: TGK grubunda kadın VKİ'nin embriyoların morfokinetik özelliklerine etkisi

	VKİ	n	Ort.±Std.	Min.-Maks.		p-değeri
PNa	<25	385	8,61±2,23	4,84	22,14	,014 (<25 vs 25-29,9 p=0,045)
	25-29,9	193	8,14±2,21	2,99	18,85	
	≥30	56	7,96±1,38	5,39	12,53	
PNf	<25	375	24,14±4,28	16,02	54,80	,056
	25-29,9	199	23,29±4,19	15,74	40,37	
	≥30	55	24,21±2,89	18,40	34,98	
t2	<25	380	26,54±4,33	14,22	58,30	,396
	25-29,9	200	26,04±4,55	18,39	44,12	
	≥30	58	26,50±2,88	21,35	35,98	
t3	<25	379	36,76±5,60	21,92	58,93	,066
	25-29,9	196	35,89±5,54	20,06	53,55	
	≥30	58	37,56±4,06	22,09	48,71	
t4	<25	379	38,88±5,69	23,96	66,63	,156
	25-29,9	195	38,01±6,40	28,12	72,42	
	≥30	57	39,41±6,04	22,09	63,10	
t5	<25	374	48,40±7,95	24,00	79,01	,088
	25-29,9	192	48,09±9,64	29,57	93,86	
	≥30	56	50,91±8,69	35,23	79,71	

t6	<25	368	52,29±7,47	30,12	91,27	,023 (<25 vs ≥30 p=0,045; 25-29,9 vs ≥30 p=0,019)
	25-29,9	189	51,72±10,09	31,57	93,86	
	≥30	54	55,30±8,70	43,15	85,20	
t7	<25	344	54,97±7,98	30,12	91,27	,062
	25-29,9	170	54,71±10,92	35,29	106,31	
	≥30	53	57,98±9,98	47,01	86,79	
t8	<25	360	58,31±9,59	35,38	98,30	,705
	25-29,9	175	58,22±11,28	39,76	104,46	
	≥30	52	59,50±9,64	47,01	92,04	
t9	<25	352	67,65±10,48	35,38	106,05	,522
	25-29,9	171	66,49±11,80	42,78	115,97	
	≥30	52	67,58±12,06	49,05	110,63	
tSC	<25	339	78,36±10,29	41,13	113,94	,705
	25-29,9	166	79,20±11,46	52,80	123,69	
	≥30	51	78,46±11,39	58,32	117,07	
tM	<25	322	87,46±9,18	64,63	117,97	,337
	25-29,9	160	88,26±9,92	61,92	121,01	
	≥30	49	86,03±9,85	63,82	117,53	
tSB	<25	311	98,52±8,60	79,65	122,91	,043 (<25 vs 25-29,9 p=0,036)
	25-29,9	144	96,20±10,59	62,95	139,96	
	≥30	36	97,59±7,05	86,44	115,39	
tB	<25	267	104,83±8,33	85,15	140,08	,265
	25-29,9	129	103,72±8,94	78,48	138,02	
	≥30	33	106,11±6,82	94,05	119,34	
tEB	<25	210	110,43±7,17	92,42	132,54	,100
	25-29,9	104	109,83±8,04	89,73	132,97	
	≥30	27	113,25±5,86	102,39	125,60	
t2-t8	<25	359	31,79±8,13	6,00	69,80	,315
	25-29,9	175	32,60±9,12	2,50	70,94	
	≥30	52	33,42±8,32	24,26	63,00	
t8-tM	<25	321	30,07±9,76	8,01	104,66	,021 (25-29,9 vs ≥30 p=0,021)
	25-29,9	160	31,66±9,93	10,76	78,60	
	≥30	49	27,41±7,56	9,61	52,87	
tSC-tM	<25	321	9,71±7,80	,75	90,59	,566
	25-29,9	160	9,65±5,31	,75	28,04	
	≥30	49	8,58±5,26	1,85	36,05	
t8-tSC	<25	339	20,79±9,35	2,00	92,40	,057
	25-29,9	166	22,28±9,15	3,00	69,83	
	≥30	51	19,08±5,87	7,75	33,31	
tM-tSB	<25	309	11,53±7,64	2,10	101,64	,143
	25-29,9	139	10,41±7,64	1,75	75,37	
	≥30	36	12,93±6,06	3,52	32,37	
tSB-tEB	<25	207	14,60±3,83	6,75	29,71	,013 (<25 vs 25-29,9 p=0,017)
	25-29,9	104	16,32±6,96	7,91	49,05	
	≥30	26	16,26±5,25	8,25	32,01	

Gruplar arası karşılaştırmalar ANOVA test ile yapılmıştır. Anlamlı çıkan gruplarda anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferroni test ile bakılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyinde ($p<0,05$) bulunanlar koyu renk olarak belirtilmiştir.

TGK grubunda maternal ve paternal yaşın embriyo ploidi üzerine etkisi bulunmamıştır ($p=0,278$; $p=0,416$).

TGK grubunda maternal ve paternal yaşın, VKİ'nin, ayrı blastomer varlığının ve direkt klivaj bulgularının öploid ve anöploid oranlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği görölmüştür ($p>0,05$).

Tablo 7: TGK grubunda erkek yaşının PGT-A Sonuçlarına Etkisi

Erkek Yaş	PGT Sonuç			p-değeri
	Öploid (n=158)	Mozaik (n=58)	Anöploid (n=169)	
≤39 (n=312)	129 (%41,3)	49 (%15,7)	134 (%42,9)	0,416
40-49 (n=71)	27 (%38)	9 (%12,7)	35 (%49,3)	
≥50 (n=2)	2 (%100)	0	0	

Gruplar arası karşılaştırmalar Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır.

TGK grubunda kadın VKİ'nin embriyo ploidisine etkisi görölmemiştir ($p=0,149$).

Tablo 8: TGK Grubunda kadın VKİ'nin PGT-A Sonuçlarına Etkisi

Kadın VKİ	PGT Sonuç			p-değeri
	Öploid (n=158)	Mozaik (n=58)	Anöploid (n=170)	
<25 (n=242)	94 (%38,8)	32 (%13,2)	116 (%47,9)	0,149
25-29,9 (n=111)	51 (%45,9)	22 (%19,8)	38 (%34,2)	
≥30 (n=33)	13 (%39,4)	4 (%12,1)	16 (%48,5)	

Gruplar arası karşılaştırmalar Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır.

Gruplarda embriyo kalitesi göz önünde bulundurulduğunda; kadın yaşının embriyo kalitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olabileceği saptanmıştır ($p=0,005$). Kadın yaşı ≤30 olduğunda TQ embriyo elde etme oranı %54'ken 36-38 yaşları arasında bu oran %44'e kadar azalmaktadır. Paternal yaşın ise bu grupta bir etkisi görölmemiştir ($p=0,983$).

4.4. Aİ Grubunda Yapılan İstatistiksel Analizler

Aİ grubunda embriyoların morfokinetik özelliklerinin embriyo kalitesi ile karşılaştırılması sırasında t8, tSB, tB, tEB, t2-t8 aşamalarında öploid ve anöploid embriyoların farklı seyrettiği saptanmıştır ($p>0,010$; $p>0,016$; $p>0,003$; $p>0,017$; $p>0,009$). Buna ek olarak mozaik embriyolar ve anöploid embriyolar göz önünde bulundurulduğunda t9, tSB, tB, tEB sürelerinde anlamlı farklılık izlenmiştir ($p>0,035$; $p>0,031$; $p>0,012$; $p>0,012$).

Tablo 9: Aİ grubunda PGT-A uygulanan embriyoların morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması

	PGT Sonuç	n	Ort±Std.	Min.-Maks.	p-değeri
PNa	Mozaik	35	7,88 ± 1,56	5,33-12,97	,566
	Öploid	168	8,17± 1,85	4,89-16,64	
	Anöploid	110	8,27±1,99	4,91-18,20	
PNf	Mozaik	38	22,86±2,88	16,33-29,43	,323
	Öploid	170	23,37±3,48	16,87-40,13	
	Anöploid	113	23,77±3,35	16,82-34,24	
t2	Mozaik	38	25,32±2,92	18,58-31,69	,366
	Öploid	171	25,82±3,82	18,87-46,90	
	Anöploid	114	26,22±3,33	20,03-35,99	
t3	Mozaik	38	35,76±4,91	25,37-45,94	,102
	Öploid	171	36,52±4,75	25,08-50,09	
	Anöploid	114	37,43±4,39	22,79-51,53	
t4	Mozaik	37	37,74±4,42	29,27-47,11	,090
	Öploid	171	37,96±4,57	25,08-51,49	
	Anöploid	114	39,07±4,47	30,34-52,41	
t5	Mozaik	37	49,24±8,72	34,18-77,27	,543
	Öploid	171	49,41±6,82	25,08-67,21	
	Anöploid	113	50,27±6,47	32,25-69,97	
t6	Mozaik	37	51,46±7,89	40,02-78,27	,055
	Öploid	171	51,64±7,42	4,89-89,22	
	Anöploid	113	53,67±6,91	32,59-89,22	
t7	Mozaik	37	54,12±8,26	40,02-79,52	,063
	Öploid	170	53,90±8,52	32,59-104,03	
	Anöploid	112	56,27±8,35	41,29-96,15	
t8	Mozaik	37	56,94±9,24	41,27-79,52	,011 Öploid vs Anöploid p=0,010
	Öploid	168	56,57±8,63	32,59-80,49	
	Anöploid	110	59,92±10,09	45,62-99,65	
t9	Mozaik	27	65,29±12,36	46,93-91,77	,020 Mozaik vs Anöploid p= 0,035
	Öploid	148	68,12±9,74	32,59-97,49	
	Anöploid	90	70,95±10,12	45,88-108,07	
tSC	Mozaik	27	78,84±9,76	59,92-95,85	,106
	Öploid	148	78,09±7,88	57,41-101,75	
	Anöploid	88	80,36±7,34	62,17-98,64	
tM	Mozaik	36	85,80±9,54	66,75-106,47	,189
	Öploid	162	86,24±8,17	64,92-113,40	
	Anöploid	106	87,95±7,93	72,14-108,16	
tSB	Mozaik	36	95,19±9,77	79,29-118,85	,006 Mozaik vs Anöploid p=0,031 Öploid vs Anöploid p=0,016 <0,001 Mozaik vs Anöploid p<0,012
	Öploid	157	96,33±7,58	80,21-118,07	
	Anöploid	102	99,19±7,96	83,22-118,03	
tB	Mozaik	34	102,24±9,25	86,46-123,19	<0,001 Mozaik vs Anöploid p<0,012
	Öploid	143	103,38±7,30	87,42-124,29	
	Anöploid	99	106,82±8,26	91,56-135,34	

					Öploid vs Anöploid p=0,003
tEB	Mozaik	28	108,08±7,96	91,97-126,98	Mozaik vs Anöploid p=0,012 Öploid vs Anöploid p=0,017
	Öploid	129	109,79±7,10	92,21-132,30	
	Anöploid	69	112,83±7,36	96,92-139,06	
t2-t8	Mozaik	37	31,54±7,91	20,48-51,03	Öploid vs Anöploid p=0,009
	Öploid	168	30,84±7,40	0,75-55,60	
	Anöploid	110	33,78±9,02	22,51-65,36	
t8-tM	Mozaik	36	28,93±7,09	13,97-43,45	,902
	Öploid	162	29,54±7,77	8,65-61,62	
	Anöploid	106	29,12±11,58	5,75-88,97	
tSC-tM	Mozaik	36	26,67±33,09	1,25-106,47	,036
	Öploid	162	15,84±24,36	2,88-99,65	
	Anöploid	106	22,72±30,25	1,00-102,45	
t8-tSC	Mozaik	27	20,29±6,28	9,71-35,52	,759
	Öploid	148	21,36±6,71	3,90-51,99	
	Anöploid	88	21,69±11,51	2,35-79,67	
tM-tSB	Mozaik	36	9,39±5,29	2,50-29,09	,078
	Öploid	156	10,13±5,03	0,75-30,66	
	Anöploid	102	11,42±6,00	2,00-25,13	
tSB-tEB	Mozaik	28	16,01±3,87	10,01-23,56	,481
	Öploid	129	15,02±3,88	9,02-29,82	
	Anöploid	69	15,42±4,69	8,29-33,70	

Gruplar arası karşılaştırmalar ANOVA test ile yapılmıştır. Anlamlı çıkan gruplarda anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferroni test ile bakılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyinde (p<0,05) bulunanlar koyu renk olarak belirtilmiştir.

Tablo 10: Aİ grubunda kadın VKİ'nin embriyoların morfokinetik özelliklerine etkisi

	VKİ	N	Ort.	Min.	Maks.	p-değeri
PNa	<25	395	8,38±2,31	4,68-26,64		,711
	25-29,9	115	8,36±2,27	4,89-18,20		
	≥30	25	8,77±2,79	5,07-14,75		
PNf	<25	392	24,08±3,84	15,59-40,53		,502
	25-29,9	118	24,17±4,19	16,82-37,51		
	≥30	25	23,19±3,07	16,33-28,41		
t2	<25	392	26,64±4,16	18,87-46,90		,279
	25-29,9	120	27,05±5,12	20,03-54,86		
	≥30	25	25,56±3,08	18,58-31,16		
t3	<25	389	36,34±5,11	23,19-51,79		,013 (<25 vs 25-29,9 p=0,021)
	25-29,9	119	37,89±6,45	22,79-74,53		
	≥30	25	38,05±5,81	24,33-49,79		
t4	<25	386	38,71±5,86	23,19-74,03		,344
	25-29,9	118	39,60±6,47	26,48-76,03		
	≥30	25	39,45±6,22	25,08-55,82		
t5	<25	376	48,70±8,35	23,19-79,95		,111
	25-29,9	117	50,00±9,10	28,76-90,54		
	≥30	25	51,80±12,21	27,00-88,55		
t6	<25	370	51,84±8,76	27,26-95,84		,082
	25-29,9	110	53,74±7,87	30,51-75,02		

	≥ 30	23	53,86 $\pm$ 6,57	40,02-69,00	
t7	< 25	361	54,86 $\pm$ 9,40	27,26-104,03	,088
	25-29,9	108	57,10 $\pm$ 9,68	30,51-96,15	
	≥ 30	23	56,20 $\pm$ 8,50	40,02-80,86	
t8	< 25	350	58,48 $\pm$ 10,72	32,59-105,10	,023 (< 25 vs 25-29,9 $p=0,021$)
	25-29,9	108	61,76 $\pm$ 12,05	30,51-99,65	
	≥ 30	23	58,03 $\pm$ 8,77	41,27-81,11	
t9	< 25	289	68,12 $\pm$ 11,24	32,59-105,10	,019 (< 25 vs 25-29,9 $p=0,023$)
	25-29,9	92	71,83 $\pm$ 12,31	34,77-108,07	
	≥ 30	23	71,26 $\pm$ 12,75	48,78-95,18	
tSC	< 25	272	79,65 $\pm$ 9,61	57,41-112,25	,013 (< 25 vs 25-29,9 $p=0,016$)
	25-29,9	89	83,03 $\pm$ 10,71	54,98-117,24	
	≥ 30	23	82,66 $\pm$ 10,64	65,07-111,55	
tM	< 25	301	86,66 $\pm$ 8,27	64,92-113,42	$< 0,001$ (< 25 vs 25-29,9 $p=0,003$; 25 vs ≥ 30 $p=0,023$)
	25-29,9	98	90,40 $\pm$ 11,00	65,24-114,76	
	≥ 30	21	92,13 $\pm$ 9,61	75,93-118,06	
tSB	< 25	284	97,40 $\pm$ 8,40	79,29-126,55	,005 (< 25 vs 25-29,9 $p=0,003$)
	25-29,9	92	100,81 $\pm$ 9,50	81,81-121,59	
	≥ 30	20	98,46 $\pm$ 7,66	87,35-109,84	
tB	< 25	258	104,38 $\pm$ 8,40	86,46-136,21	,045 (< 25 vs 25-29,9 $p=0,042$)
	25-29,9	80	107,07 $\pm$ 8,60	89,62-123,19	
	≥ 30	18	105,88 $\pm$ 9,74	93,05-130,60	
tEB	< 25	207	110,42 $\pm$ 7,34	91,97-139,06	,381
	25-29,9	59	111,53 $\pm$ 7,16	93,37-126,31	
	≥ 30	15	112,59 $\pm$ 10,25	100,53-139,85	
t2-t8	< 25	350	32,11 $\pm$ 9,33	0,75-71,29	,010 (< 25 vs 25-29,9 $p=0,008$)
	25-29,9	108	35,32 $\pm$ 10,93	0,76-65,36	
	≥ 30	23	32,30 $\pm$ 7,82	22,69-54,98	
t8-tM	< 25	301	29,03 $\pm$ 8,61	5,75-88,97	,123
	25-29,9	98	29,44 $\pm$ 11,58	6,19-87,92	
	≥ 30	21	33,34 $\pm$ 7,16	19,93-52,09	
tSC-tM	< 25	301	20,30 $\pm$ 28,38	1,00-102,45	,153
	25-29,9	98	18,12 $\pm$ 25,91	1,75-106,47	
	≥ 30	21	8,74 $\pm$ 4,09	2,50-20,76	
t8-tSC	< 25	272	20,79 $\pm$ 8,26	2,35-75,21	,077
	25-29,9	89	22,26 $\pm$ 10,90	2,50-79,67	
	≥ 30	23	24,6 $\pm$ 37,10	13,05-45,58	
tM-tSB	< 25	283	11,03 $\pm$ 5,60	0,75-31,95	,019 (< 25 vs ≥ 30 $p=0,024$; 25-29,9 vs ≥ 30 $p=0,017$)
	25-29,9	92	11,43 $\pm$ 5,62	2,75-29,09	
	≥ 30	20	7,62 $\pm$ 3,84	2,00-17,26	
tSB-tEB	< 25	207	15,24 $\pm$ 4,41	7,50-33,70	,393
	25-29,9	59	15,13 $\pm$ 3,11	9,66-23,02	
	≥ 30	15	16,71 $\pm$ 4,23	12,75-30,02	

Gruplar arası karşılaştırmalar ANOVA test ile yapılmıştır. Anlamlı çıkan gruplarda anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferroni test ile bakılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyinde ($p < 0,05$) bulunanlar koyu renk olarak belirtilmiştir.

Ayrı blastomer varlığının embriyo morfokinetiğini anlamlı bir şekilde değiştirmedeği görülmüştür ($p > 0,05$).

Tablo 11: Aİ grubunda maternal yaşı PGT-A Sonuçlarına Etkisi

Maternal Yaş	PGT Sonuç			p-değeri
	Öploid (n=191)	Mozaik (n=39)	Anöploid (n=133)	
≤30 (n=90)	47 (%52.2)	12 (%13.3)	31 (%34.4)	0.919
31-35 (n=176)	93 (%52.8)	17 (%9.7)	66 (%37.5)	
36-38 (n=97)	51 (%52.6)	10 (%10.3)	36 (%37.1)	

Gruplar arası karşılaştırmalar Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır.

PGT sonuçlarına göre Aİ grubunda embriyoların %41.04'ünde (133/324) anöploidi gözlenmiştir. PGT-A sonuçlarının (öploid, mozaik, anöploid) ve embriyo kalitesinin (TQ, GQ, MQ) dağılımı Aİ hastalarında VKİ, maternal ve paternal yaş grupları arasında benzer bulunmuştur ($p>0,05$).

Anöploidi için risk faktörleri değerlendirildiğinde, GQ ve MQ Embriyolarda anöploidi riski TQ embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. ($p=0,020$; $p=0,016$).

Aİ grubunda ayrı blastomer varlığı ve direkt klivaj varlığının embriyo kalitesi ile anlamlı ilişkileri bulunmuştur. Direkt klivaj varlığında embriyonun kalitesi negatif yönde etkilenmektedir ($p<0,001$).

TQ embriyolar ve MQ embriyolar kendi aralarında karşılaştırıldığında; ayrı blastomer ve direkt klivaj görülme oranı MQ embriyolarda TQ embriyolara göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır ($p<0,001$).

4.5. TGK ve Aİ Grupları Arasında Yapılan İstatistiksel Analizler

Çalışmada öploid embriyoların morfokinetik özelliklerinin her iki grupta benzer olduğu görülmüştür.

Tablo 12: TGK ve Aİ gruplarında Öploid embriyoların morfokinetik özelliklerinin karşılaştırılması

	TGK/Aİ	n	Ort.±Std.	p-değeri
PNa	TGK	149	8,01±1,59	,612
	Aİ	151	8,11±1,79	
PNf	TGK	148	23,50±3,23	,844
	Aİ	153	23,43±3,57	
t2	TGK	152	25,89±3,38	,978
	Aİ	154	25,90±3,93	
t3	TGK	152	36,55±4,61	,963
	Aİ	154	36,53±4,79	

t4	TGK	152	38,23±4,25	,619
	Aİ	154	37,97±4,68	
t5	TGK	151	49,29±6,65	,844
	Aİ	154	49,44±6,96	
t6	TGK	149	52,55±6,33	,277
	Aİ	154	51,68±7,54	
t7	TGK	141	54,48±6,98	,456
	Aİ	153	53,80±8,60	
t8	TGK	148	56,86±8,32	,602
	Aİ	151	56,35±8,51	
t9	TGK	145	66,98±9,54	,482
	Aİ	131	67,79±9,68	
tSC	TGK	148	76,78±9,42	,342
	Aİ	131	77,78±7,89	
tM	TGK	147	86,02±8,40	,843
	Aİ	145	86,22±8,27	
tSB	TGK	142	96,32±8,89	,932
	Aİ	140	96,40±7,58	
tB	TGK	138	103,46±8,06	,758
	Aİ	128	103,75±7,36	
tEB	TGK	119	109,83±7,49	,906
	Aİ	115	109,95±7,22	
t2-t8	TGK	148	30,86±6,51	,694
	Aİ	151	30,55±7,24	
t8-tM	TGK	147	30,47±10,57	,496
	Aİ	145	29,73±7,75	
tSC-tM	TGK	147	9,34±4,80	<0,001
	Aİ	145	17,00±25,49	
t8-tSC	TGK	148	21,18±10,60	,931
	Aİ	131	21,28±6,58	
tM-tSB	TGK	139	11,64±9,10	,112
	Aİ	139	10,23±5,15	
tSB-tEB	TGK	118	15,07±5,67	,905
	Aİ	115	15,00±3,96	

Gruplar arası karşılaştırmalar Student's t-test ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyinde ($p<0,05$) bulunanlar koyu renk olarak belirtilmiştir.

Çalışmamızda TGK ve Aİ gruplarında öploid embriyo oranlarının anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p<0,023$). TGK grubuna ait öploid embriyoların tSCden tMye ulaşma süresinin Aİ grubundaki öploid embriyolara göre daha kısa olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Tablo 13: TGK ve Aİ gruplarında embriyolarda PGT-A sonuçlarının karşılaştırılması

	PGT-A Sonuçları			p-değeri
	Euploid (n=359)	Mozaik (n=77)	Aneuploid (n=315)	
TGK (n=386)	168 (%43,5)	37 (%9,6)	181 (%46,9)	0,018
UEI (n=365)	191 (%52,3)	40 (%11)	134 (%36,7)	

Gruplar arası karşılaştırmalar Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 14: TGK ve Aİ gruplarında maternal yaşın PGT-A sonuçlarına etkisi

	PGT-A Sonuçları			p-değeri
	Öploid (n=169)	Mozaik (n=30)	Anöploid (n=159)	
TGK (n=182)	76 (%41,8)	13 (%7,1)	93 (%51,1)	0,035
Aİ (n=176)	93 (%52,8)	17 (%9,7)	66 (%37,5)	

Gruplar arası karşılaştırmalar Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 15: TGK ve Aİ gruplarında paternal yaşın PGT-A sonuçlarına etkisi

	PGT-A Sonuçları			p-değeri
	Öploid (n=301)	Mozaik (n=67)	Anöploid (n=251)	
TGK (n=312)	139 (%44,6)	31 (%9,9)	142 (%45,5)	0,040
Aİ (n=307)	162 (%52,8)	36 (%11,7)	109 (%35,5)	

Gruplar arası karşılaştırmalar Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır.

TGK ve Aİ grubu karşılaştırıldığında TGK grubunda maternal yaş arttığında Aİ grubuna göre anöploidi oranında artış izlenmektedir ($p>0,035$). Benzer olarak aynı gruplar karşılaştırıldığında paternal yaş artarsa anöploidi riskinin de arttığı istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p>0,040$).

Tablo 16: TGK ve Aİ gruplarında maternal VKİ ≥ 30 olan vakalarda PGT-A sonuçlarının karşılaştırılması

	PGT-A Sonuçları			p-değeri
	Öploid (n=21)	Mozaik (n=7)	Anöploid (n=23)	
TGK (n=33)	13 (%39,4)	4 (%12,1)	16 (%48,5)	0,785
UEI (n=18)	8 (%44,4)	3 (%16,7)	7 (%38,9)	

Gruplar arası karşılaştırmalar Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır.

4.6. Tüm Embriyolar ile Yapılan İstatistiksel Analizler

Çalışmamızın lojistik regresyon analizine göre maternal ve paternal yaş, kadın VKİ, ayrı blastomer ve direkt klivaj varlığının tüm olgular için anöploidi açısından değerlendirilecek ana risk faktörünün embriyo kalitesi olduğu belirlenmiştir.

Tablo 17: Tüm Embriyolarda Anöploidi için Risk Faktörlerinin Analizi
(Lojistik Regresyon)

Variables in the Equation									
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1	Maternal yaş (≤ 30 , 31-35, 36-38)			1,867	2	,393			
	Maternal yaş 31-35 (Ref ≤ 30)	,268	,208	1,657	1	,198	1,307	,869	1,965
	Maternal yaş 36-38 (Ref ≤ 30)	,070	,261	,071	1	,790	1,072	,643	1,787
	Paternal yaş (≤ 39 , 40-49, ≥ 50)		,059	2	,971	,059			
	Maternal yaş (≤ 30 , 31-35, 36-38)	-,061	,253	,059	1	,809	,941	,573	1,544
	Paternal yaş (kucuk ve esit 39 yas :1 ; 40-49 yas arası: 2 ; 50 ve büyük:2(2)	-21,047	27987,108	,000	1	,999	,000	,000	.
	Kadın VKİ (< 25 , 25-29.9, ≥ 30)			1,118	2	,572			
	Kadın VKİ 25-29.9 (Ref < 25)	-,122	,202	,365	1	,546	,885	,595	1,316
	Kadın VKİ ≥ 30 (Ref < 25)	,255	,346	,544	1	,461	1,291	,655	2,544
	Emb. kalitesi (TQ, GQ, MQ)			24,497	2	,000			
	Emb. Kalitesi GQ (Ref TQ)	,739	,185	15,969	1	,000	2,094	1,457	3,009
	Emb. Kalitesi MQ (Ref TQ)	1,285	,316	16,558	1	,000	3,613	1,946	6,707
	Ayrı Blast Varlığı (Ref Ayrı Blast Yok)	-,123	,322	,146	1	,702	,884	,470	1,663
	Direkt Klivaj Varlığı (Ref Direkt Klivaj Yok)	-,983	,360	7,440	1	,006	,374	,185	,758
	Constant	-,631	,193	10,710	1	,001	,532	-,631	
a. Variable(s) entered on step 1: maternal age (≤ 30 :1, 31-35:2, 36-38:3), Paternal yaş (≤ 39 :1, 40-49:2, ≥ 50 :3), Kadın VKİ (< 25 :1, 25-29.9:2, ≥ 30 :3), Emb. Kalitesi (TQ:1 , GQ:2, MQ: 3), Ayrı Blast Varlığı (yok:0, var:1), Direkt Klivaj Varlığı (yok:0, var:1)									

Hosmer Lemeshow Test $p=0,886$, model $p<0,001$

Dependent Variable: euploid/aneuploid

5. TARTIŞMA

PGT-A'nın yanı sıra embriyoya ait morfokinetik özelliklerin belirlenmesinin çeşitli anöploidilerle ilişkili olabileceği bilinmektedir. Yardımla üreme tekniklerinin gelişmesiyle birlikte SEİS kullanılmaya başlanmış ve embriyolara ait tüm morfokinetik parametreleri detaylı ve geriye dönük halde değerlendirebilmek mümkün hale gelmiştir. SEİS, embriyonun gelişimsel yetkinliğini ortaya koymak, embriyo morfokinetiğinin zamana bağlı olarak incelenmesini sağlaması açısından güvenilir bir araçtır. SEİS ile embriyolara ait morfokinetik özelliklerin tüm olumlu ve olumsuz yönlerini görselleştirme imkanı da bulunabilmektedir. SEİS'in kullanılması ile PNa ve PNf zamanları, embriyonun ilk klivaj paternlerindeki zamanlamalar ve blastomerlere ait parametreler değerlendirilebilmektedir. Geçmişten günümüze kadar yapılan araştırmalarda, embriyo gelişiminde ikinci kutup cisimciği atımından itibaren pronukleusların oluşumu, silinmesi, hücre bölünme zamanları, morula evresine geçiş ve embriyoda blastosist evresi zamanları irdelenmiştir [80, 81]. Bu parametreler eşliğinde embriyoların SEİS kullanılarak gözlemlenmesi gebelik potansiyeli yüksek olabilecek embriyo seçimi açısından prognozistik etkiyi ön plana çıkarmaktadır.

Bu çalışmada TGK öyküsü bulunan vakalarda embriyolara ait morfokinetik parametrelerin, embriyonun ploidi statüsü ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır.

Günümüzde embriyonun ploidi statüsünü morfokinetik parametreler ışığında inceleyen ve uluslararası hakemli dergilerde yayınlanmış toplam on iki çalışma bulunmuştur. Bu çalışmaların yalnızca ikisi çalışmamıza benzer; prospektif olarak incelenmiştir. Bu iki çalışmadan yalnızca biri blastosist dönem embriyolar üzerinde ilerlemiştir. Yang Z ve arkadaşları PGT uygulanan 138 vakanın embriyolarına ait morfokinetik parametreleri prospektif olarak incelemiş ve çalışma sonucunda morfokinetik parametrelerle değerlendirilen embriyolar ve konvansiyonel inkübatörlerde değerlendirilen embriyolarla karşılaştırıldığında morfokinetik parametre ilave edilen olgulardaki abort oranlarının değişmediği sonucuna varılmıştır. Ancak, yine aynı çalışmada anöploidik embriyoların tSB sürelerinde gecikmeler olduğu bildirilmiştir [83].

Bu bilgiler ışığında, bizim çalışmamızın hasta grubuna ≥ 2 kez gebelik kaybı yaşamış, 38 yaş ve/veya altında, mutlak PGT-A uygulanacak ve embriyoları Sürekli Embriyo İzleme Sistemleri'nde takip edilecek olan şiddetli erkek faktöründen bağımsız endometriyal faktör olmayan ve genetik hastalık öyküsü bulunmayan toplamda 190 vaka dahil edilmiştir. Çalışmada yer alan TGK olgularında yaşlar 23 ile 39 ; kontrol grubunda ise 24 ile 38 arasında değişmekte olup, ortalamalar $33,12 \pm 3,70$; $33,93 \pm 3,21$ yaş olarak saptanmıştır. Çalışmamızda TGK ve kontrol grubu arasında yaş açısından istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p=0,153$). Ayrıca, TGK ve kontrol grubunda D3 FSH, AMH, Toplam Stimülasyon Süresi, Trigger Günü ≥ 17 mm ve ≤ 16 mm folikül Folikül Sayıları, OPU'da Alınan Toplam Oosit Sayısı, MII Oosit Sayısı, Normal Fertilize Olan Oosit Sayısı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$).

Metwally ve arkadaşlarının çalışmasında VKİ 30 ve üzeri olan TGK olgularının sonraki gebeliklerinde de kayıp yaşama riskinin anlamlı olarak arttığı sonucuna varılmıştır [84]. Çalışmamızda TGK grubunda ($n=100$) kadın VKİ infertilite süresi ve deneme sayısı Aİ grubundan ($n=90$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). VKİ'nin 30 ve üzeri olduğu durumlarda embriyo bölünme zamanlarının tekrarlayan gebelik kayıpları olan vakalarda daha kısa veya uzun seyrettiği ve istatistiksel anlamlılık gösterdiği görülmüştür ($p<0,021$; $p=0,017$). Ayrıca, gruplarımızda VKİ'nin 25 ve altı olduğu durumda PGT-A sonuçları ile istatistiksel anlamlılık saptanmıştır ($p<0,05$). Artan VKİ'nin embriyo bölünme zamanlarındaki asenkronite göz önünde bulundurulduğunda bu durumu sekteye uğratabileceği düşünülmüştür. Bartolacci ve arkadaşları 2019 yılında maternal VKİ'nin SEİS'te embriyo morfokinetiğini nasıl etkilediğini incelemiş ve 1528 vakanın 7180 embriyosuna ait histolojik ve morfokinetik parametrelerini incelemiştir. Çalışma sonucunda artan maternal VKİ'nin klivaj dönem embriyolarda yavaş gelişime neden olduğu sonucuna varılmıştır, çalışmamızla uyumludur [85].

Çalışmamızda tekrarlayan gebelik kayıpları olan vakalarda yapılan değerlendirmede ileri maternal yaştan embriyo morfokinetiğinde embriyonun morula evresinden sonraki süreçlerde gecikme olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Yine de maternal yaştan embriyo ploidi üzerine etkisi bulunamamıştır ($p=0,278$; $p=0,416$). 30 yaşın altındaki TGK olgularında embriyo morfokinetiği dikkate alındığında t8-tM, t8-tSC ve tSB-tEB süreleri 36-38 yaş aralığındaki TGK olgularına göre daha düşük

bulunmuş, istatistiksel anlamlılık izlenmiştir ($p=0,002$; $p=0,002$; $p<0,001$). Ancak, embriyo kalitesi göz önünde bulundurulduğunda; maternal yaşın embriyo kalitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olabileceği saptanmıştır ($p=0,005$). Kadın yaşı ≤ 30 olduğunda TQ embriyo elde etme oranı %54'ken 36-38 yaşları arasında bu oran %44'e kadar düşmektedir. Paternal yaşın ise bu grupta bir etkisi görülmemiştir ($p=0,983$).

Ayrıca çalışmamızda, maternal yaş grupları, vücut kitle indeksi ve ayrı blastomer varlığında TGK ve kontrol grubunda embriyo morfokinetiği detaylı incelenmiş; maternal yaşın ve vücut kitle indeksinin embriyo morfokinetiğinde değişiklikler ortaya çıkardığı görülmüştür. Del Carmen Nogales ve arkadaşlarının ileri maternal yaştaki TGK vakalarının da yer aldığı çalışmasında 485 blastosist klivaj zamanlamaları açısından değerlendirilmiş, çalışma verilerine göre t3 ve t2-t5 aralığı anöploidiler ile ilişkilendirilmiştir [86]. Mozaik embriyolar ve anöploid embriyolar göz önünde bulundurulduğunda t9, tSB, tB, tEB sürelerinde anlamlı farklılık izlenmiştir ($p>0,035$; $p>0,031$; $p>0,012$; $p>0,012$), bu sonucumuz Yang Z ve arkadaşlarının çalışması ile uyumludur [83]. Minasi ve arkadaşları öploid embriyoların tSb, tB ve tEB sürelerinin anöploid embriyolara göre daha kısa seyrettiğini ileri sürmüşlerdir [85]. Campbell ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 98 blastosiste ait morfokinetik parametreler incelenmiş, ploidiye karşı körleme yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda öploid ve anöploid embriyoların statüsünün öğrenilmesinin ardından anöploid embriyoların öploid embriyolara kıyasla tSC evresinde gecikmeler olduğu; yine aynı şekilde tB sürelerinde gecikmeler olduğu istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur [87]. Buna benzer olarak bizim çalışmamızda da TGK ve kontrol grupları karşılaştırıldığında öploid embriyo oranlarının anöploid embriyolara göre bazı parametreler göz önünde bulundurulduğunda anlamlı farklılık gösterdiği izlenmiştir ($p<0,023$). Çalışmamızda TGK grubuna ait öploid embriyoların tSCden tMye ulaşma süresinin kontrol grubunda yer alan öploid embriyolara göre daha kısa olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Böylece SEİS'e bakılarak TGK olgularında morfokinetik parametrelerin öploidi açısından yol gösterici olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, embriyoda ayrı blastomer varlığı ve direkt klivaj izlenmesi durumu da araştırılmıştır. Kontrol grubunda ayrı blastomer varlığı ve/veya direkt klivajın embriyo kalitesi açısından istatistiki olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Özellikle direkt klivaj varlığında embriyo kalitesinin negatif yönde etkilendiği gözlenmiştir ($p<0,001$). Zhan ve arkadaşları 21,261 embriyonun yer aldığı bir

çalışmada direkt klivaj varlığına sahip embriyoların düşük morfolojili blastosist formasyonuna sahip olduğu ve dolaylı olarak öploid embriyo elde etme oranlarını düşürdüğünü belirtmişlerdir [88], bu sonuç bizim çalışmamızla da örtüşmektedir. TQ embriyolar ve MQ embriyolar kendi aralarında karşılaştırıldığında; ayrı blastomer ve direkt klivaj görülme oranı MQ embriyolarda TQ embriyolara göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan tek merkezli bir çalışmada tek öploid embriyo transferlerinin klinik sonuçlarını etkileyen parametreler araştırılmış, çalışma grubu olarak gebelik ve abort vakaları karşılaştırılmıştır [89]. Çalışma verilerine göre öploid embriyo transferi yapılan ve abortusla sonuçlanan vakalarda embriyo kalitesi, ayrı blastomer varlığı öploid embriyoların abortusla sonuçlanmasına etki eden faktörler olarak belirtilmiştir.

Çalışmamızda ileri maternal yaş ve şiddetli erkek faktörü dışlandığında, TKG vakalarında anöploidi prevalansı Aİ grubundaki vakalara göre daha yüksek prevelansa sahip olduğu gözlenmiştir. TKG grubuna ait öploid embriyoların tM süresinin Aİ grubundaki öploid embriyolara göre daha kısa olduğu belirlenmiştir. Anöploidi, TKG vakalarındaki kayıpların ana nedenlerinden biri olarak bulunduğu şiddetli erkek faktörün ve endometriyal faktörlerin dışlandığı TKG olgularına PGT-A uygulanmasının yanı sıra transfer edilebilecek embriyonun seçim kriterlerini karşılayabilecek olan morfokinetik parametrelerin de ayrıca değerlendirilebilmesi için SEİS takibine başvurulması önerilmektedir.

Embriyoya ait ploidi statüsünü yalnızca morfokinetik parametrelerle açıklayabilmek henüz tam olarak mümkün olmadığından bu konu ile ilgili daha fazla çalışma grubu ile prospektif çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Atasü, T. and Ş. Şahmay, Abortus. Jinekoloji, Nobel, 2001. 2: p. 533-545

Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 785, 108320. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108320>

Starč, A., Trampuš, M., Pavan Jukić, D., Rotim, C., Jukić, T., & Polona Mivšek, A. (2019). INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. *Acta clinica Croatica*, 58(3), 508–515. <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.03.15>

Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., & Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human reproduction* (Oxford, England), 20(5), 1144–1147. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh870>

Speroff L. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility*. 7 ed. Portland: Lippincott Williams&Wilkins, 2007: 84.

Wasilewski, T., Łukaszewicz-Zajac, M., Wasilewska, J., & Mroczko, B. (2020). Biochemistry of infertility. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 508, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.039>

Vollenhoven, B., & Hunt, S. (2018). Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1835. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16509.1>

Szamatowicz, M., & Szamatowicz, J. (2020). Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility. *Advances in medical sciences*, 65(1), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.12.008>

Chu, K. Y., Patel, P., & Ramasamy, R. (2019). Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Current opinion in urology*, 29(3), 267–271. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000590>

Freour, T., Delvigne, A., & Barrière, P. (2010). L'exploration de l'homme du couple infécond [Evaluation of the male of the infertile couple]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, 39(8 Suppl 2), S45–S52. [https://doi.org/10.1016/S0368-2315\(10\)70030-2](https://doi.org/10.1016/S0368-2315(10)70030-2)

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: asrm@asrm.org, & Practice Committee of the American Society

for Reproductive Medicine (2021). Fertility evaluation of infertile women: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 116(5), 1255–1265. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.08.038>

Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2012). Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human reproduction update*, 18(1), 73–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>

Son, W. Y., Das, M., Shalom-Paz, E., & Holzer, H. (2011). Mechanisms of follicle selection and development. *Minerva ginecologica*, 63(2), 89–102.

No GG. RCOG The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First- trimester and Second-trimester Miscarriage. 2011;(17):1-18.

ASRM. American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;99(1):63.

El Hachem, H.; Crepaux, V.; May-Panloup, P.; Descamps, P.; Legendre, G.; Bouet, P.E. Recurrent pregnancy loss: Current perspectives. *Int. J. Women's Health* 2017, 9, 331–345.

Ewington, L.J.; Tewary, S.; Brosens, J.J. New insights into the mechanisms underlying recurrent pregnancy loss. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. 2019, 45, 258–265.

Kolte AM, van Oppenraaij RH, Quenby S, Farquharson RG, Stephenson M, Goddijn M, Christiansen OB; on behalf of the ESHRE Special Interest Group Early Pregnancy. Non-visualized pregnancy losses are prognostically important for unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2014; 29:931–937

Seshadri, S., Morris, G., Serhal, P., & Saab, W. (2021). Assisted conception in women of advanced maternal age. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*, 70, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.06.012>

ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik, R., Christiansen, O. B., Elson, J., Kolte, A. M., Lewis, S., Middeldorp, S., Nelen, W., Peramo, B., Quenby, S., Vermeulen, N., & Goddijn, M. (2018). ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Human reproduction open*, 2018(2), hoy004. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy004>

Dai, R., Pan, Y., Fu, Y., Liu, Q., Han, W., & Liu, R. (2018). Role of male genetic factors in recurrent pregnancy loss in Northeast China. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 224, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.02.030>

Passos, I. M. P. E., & Britto, R. L. (2020). Diagnosis and treatment of müllerian malformations. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 59(2), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.01.003>

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: ASRM@asrm.org, & Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2016). Uterine septum: a guideline. *Fertility and sterility*, 106(3), 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.05.014>

Rikken, J., Leeuwis-Fedorovich, N. E., Letteboer, S., Emanuel, M. H., Limpens, J., van der Veen, F., Goddijn, M., & van Wely, M. (2019). The pathophysiology of the septate uterus: a systematic review. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 126(10), 1192–1199. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15798>

Carbonnel, M., Pirtea, P., de Ziegler, D., & Ayoubi, J. M. (2021). Uterine factors in recurrent pregnancy losses. *Fertility and sterility*, 115(3), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.12.003>

Saravelos SH, Yan J, Rehmani H, Li TC. The prevalence and impact of fibroids and their treatment on the outcome of pregnancy in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2011; 26(12):3274-9.

Passos, I. M. P. E., & Britto, R. L. (2020). Diagnosis and treatment of müllerian malformations. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 59(2), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.01.003>

Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med*. 2013 Jun 26;11:154. doi: 10.1186/1741-7015-11-154. PMID: 23803387; PMCID: PMC3699442.

Tang AW, Alfievic Z, Turner MA, Drury JA, Small R, Quenby S. A feasibility trial of screening women with idiopathic recurrent miscarriage for high uterine natural killer cell density and randomizing to prednisolone or placebo when pregnant. *Human reproduction (Oxford, England)* 2013;28: 1743-1752.

King K, Smith S, Chapman M, Sacks G: Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2010, 25:52–58

Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA. Progesterone inhibits in vitro embryotoxic Th 1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000;15:46-59.

Ito K, Karasawa M, Kawano T, et al. Involvement of decidual V α 14 NKT cells in abortion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;97:740-744

Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98(5):1103-11.

Knight, J. S., & Kanthi, Y. (2022). Mechanisms of immunothrombosis and vasculopathy in antiphospholipid syndrome. *Seminars in immunopathology*, 44(3), 347–362. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00916-w>

Santos TDS, Ieque AL, de Carvalho HC, Sell AM, Lonardoni MVC, Demarchi IG, de Lima Neto QA, Teixeira JJV. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Journal of reproductive immunology* 2017;123: 78-87.

Song Y, Wang HY, Qiao J, Liu P, Chi HB. Antiphospholipid Antibody Titers and Clinical Outcomes in Patients with Recurrent Miscarriage and Antiphospholipid Antibody Syndrome: A Prospective Study. *Chinese medical journal* 2017;130: 267-272.

Dimitriadis, E., Menkhorst, E., Saito, S., Kutteh, W. H., & Brosens, J. J. (2020). Recurrent pregnancy loss. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 98. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00228-z>

Saxtorph, M. H., Hallager, T., Persson, G., Petersen, K. B., Eriksen, J. O., Larsen, L. G., Hviid, T. V., & Macklon, N. (2020). Assessing endometrial receptivity after recurrent implantation failure: a prospective controlled cohort study. *Reproductive biomedicine online*, 41(6), 998–1006. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.08.015>

Fullerton, P. T., Jr, Monsivais, D., Kommagani, R., & Matzuk, M. M. (2017). Follistatin is critical for mouse uterine receptivity and decidualization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(24), E4772–E4781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620903114>

Bernardi LA, Cohen RN, Stephenson MD. Impact of subclinical hypothyroidism in women with recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2013; 100(5):1326-31.

Lanasa MC, Hogge WA, Kubik CJ, Ness RB, Harger J, Nagel T, et al. A novel X chromosomelinked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185(3):563-8.

Tharapel, A. T., Tharapel, S. A., & Bannerman, R. M. (1985). Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: a review. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 92(9), 899–914. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1985.tb03069.x>

Colley, E., Hamilton, S., Smith, P., Morgan, N. V., Coomarasamy, A., & Allen, S. (2019). Potential genetic causes of miscarriage in euploid pregnancies: a systematic review. *Human reproduction update*, 25(4), 452–472. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz015>

Park, S. J., Min, J. Y., Kang, J. S., Yang, B. G., Hwang, S. Y., & Han, S. H. (2022). Chromosomal abnormalities of 19,000 couples with recurrent spontaneous abortions: a multicenter study. *Fertility and sterility*, 117(5), 1015–1025. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.01.011>

Gersen S, Keagle MB. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Humana Press, New York. 3rd ed. 2013.

Kang, H. J., & Rosenwaks, Z. (2008). Triploidy--the breakdown of monogamy between sperm and egg. *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), 449–454. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082602hk>

Lehner, A., Kaszas, Z., Murber, A., Rigo, J., Jr, Urbancsek, J., & Fancsovits, P. (2015). Giant oocytes in human in vitro fertilization treatments. *Archives of gynecology and obstetrics*, 292(3), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3679-0>

Warecki, B., Bast, I., Tajima, M., & Sullivan, W. (2023). Connections between sister and non-sister telomeres of segregating chromatids maintain euploidy. *Current biology : CB*, 33(1), 58–74.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.11.038>

Kuliev, A., & Verlinsky, Y. (2004). Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Human reproduction update*, 10(5), 401–407. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh036>

Bizard, A. H., & Hickson, I. D. (2018). Anaphase: a fortune-teller of genomic instability. *Current opinion in cell biology*, 52, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.012>

Yakut, S., Toru, H. S., Çetin, Z., Özel, D., Şimşek, M., Mendilcioğlu, İ., & Lüleci, G. (2015). Chromosome abnormalities identified in 457 spontaneous abortions and their histopathological findings. *Türk patoloji dergisi*, 31(2), 111–118. <https://doi.org/10.5146/tjpath.2015.01303>

Viotti M. (2020). Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. *Genes*, 11(6), 602. <https://doi.org/10.3390/genes11060602>

Sheng YR, Hou SY, Hu WT, Wei CY, Liu YK, Liu YY, Jiang L, Xiang JJ, Sun XX, Lei CX, Wang HL, Zhu XY. Characterization of Copy-Number Variations and Possible Candidate Genes in Recurrent Pregnancy Losses. *Genes (Basel)*. 2021 Jan 22;12(2):141. doi: 10.3390/genes12020141. PMID: 33499090; PMCID: PMC7911754.

Mohsen-Pour, N., Talebi, T., Naderi, N., Moghadam, M. H., Maleki, M., & Kalayinia, S. (2022). Chromosome 9 Inversion: Pathogenic or Benign? A Comprehensive Systematic Review of all Clinical Reports. *Current molecular medicine*, 22(5), 385–400. <https://doi.org/10.2174/1566524021666210806161128>

Elbistan, M. , Şengül, T. , Kara, N. , Karakuş, N. & Güven, D. (2012). Perisentrik inversiyon 9 gözlenen olguların değerlendirilmesi . *Sağlık Bilimleri Dergisi* , 21 (2) , 82-86 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/eujhs/issue/44553/552689>

Fuentes, F., Muñoz, E., Contreras, M. J., Arias, M. E., & Felmer, R. (2022). Bovine ICSI: limiting factors, strategies to improve its efficiency and alternative approaches. *Zygote (Cambridge, England)*, 30(6), 749–767. <https://doi.org/10.1017/S0967199422000296>

Haddad, M., Stewart, J., Xie, P., Cheung, S., Trout, A., Keating, D., Parrella, A., Lawrence, S., Rosenwaks, Z., & Palermo, G. D. (2021). Thoughts on the popularity of ICSI. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 38(1), 101–123. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01987-0>

Isikoglu, M., Avci, A., Kendirci Ceviren, A., Aydınuraz, B., & Ata, B. (2021). Conventional IVF revisited: Is ICSI better for non-male factor infertility? Randomized controlled double blind study. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 50(7), 101990. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101990>

Fishel S. (2018). First in vitro fertilization baby-this is how it happened. *Fertility and sterility*, 110(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.03.008>

Kikuchi, K., Somfai, T., Nakai, M., & Nagai, T. (2009). Appearance, fate and utilization of abnormal porcine embryos produced by in vitro maturation and fertilization. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 66, 135–147.

Bartolacci, A., Intra, G., Coticchio, G., dell'Aquila, M., Patria, G., & Borini, A. (2022). Does morphological assessment predict oocyte developmental competence? A systematic review and proposed score. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 39(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02370-3>

Braga, D. P., Setti, A. S., Figueira, R.deC., Machado, R. B., Iaconelli, A., Jr, & Borges, E., Jr (2013). Influence of oocyte dysmorphisms on blastocyst formation and quality. *Fertility and sterility*, 100(3), 748–754. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.021>

Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Shebl, O., Jesacher, K., & Tews, G. (2005). Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and sterility*, 83(6), 1635–1640. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.009>

Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M. J., Bellver, J., & Meseguer, M. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and sterility*, 98(6), 1458–1463. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135>

Coticchio, G., Barrie, A., Lagalla, C., Borini, A., Fishel, S., Griffin, D., & Campbell, A. (2021). Plasticity of the human preimplantation embryo: developmental dogmas, variations on themes and self-correction. *Human reproduction update*, 27(5), 848–865. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab016>

Liu, J., Zhou, Y., Tong, L., Wang, X., Li, Y., & Wang, H. (2022). Developmental potential of different embryos on day 3: a retrospective study. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 42(7), 3322–3327. <https://doi.org/10.1080/01443615.2022.2125291>

Bamford, T., Barrie, A., Montgomery, S., Dhillon-Smith, R., Campbell, A., Easter, C., & Coomarasamy, A. (2022). Morphological and morphokinetic

associations with aneuploidy: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 28(5), 656–686. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac022>

Moore, K.L., Persaud, T.V.N. & Torchia, M.G. (2011). ‘Chapter 2’ *The developing human: Clinically Oriented Embryology 9th edition*, Philadelphia: Saunders

Chimote, N. M., Chimote, N. N., Nath, N. M., & Mehta, B. N. (2013). Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer. *Journal of human reproductive sciences*, 6(3), 183–188. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.121420>

Irani, M., Reichman, D., Robles, A., Melnick, A., Davis, O., Zaninovic, N., Xu, K., & Rosenwaks, Z. (2017). Morphologic grading of euploid blastocysts influences implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertility and sterility*, 107(3), 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.11.012>

Baatarsuren, M., Sengebaljir, D., Ganbaatar, C., Tserendorj, T., Erdenekhuyag, B., Baljinnyam, L., Radnaa, E., Dorjpurev, A., Ganbat, G., Boris, T., Khangarid, A., & Jamiyansuren, J. (2022). The trophoctoderm could be better predictable parameter than inner cellular mass (ICM) for live birth rate and gender imbalance. *Reproductive biology*, 22(1), 100596. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100596>

Greco, E., Litwicka, K., Minasi, M. G., Cursio, E., Greco, P. F., & Barillari, P. (2020). Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4381. <https://doi.org/10.3390/ijms21124381>

Handyside, A. H., Pattinson, J. K., Penketh, R. J., Delhanty, J. D., Winston, R. M., & Tuddenham, E. G. (1989). Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet (London, England)*, 1(8634), 347–349. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)91723-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)91723-6)

Edwards, R. G., & Gardner, R. L. (1967). Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature*, 214(5088), 576–577. <https://doi.org/10.1038/214576a0>

Verlinsky, Y., & Kuliev, A. (1994). Human preimplantation diagnosis: needs, efficiency and efficacy of genetic and chromosomal analysis. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology*, 8(1), 177–196. [https://doi.org/10.1016/s0950-3552\(05\)80031-8](https://doi.org/10.1016/s0950-3552(05)80031-8)

Peuranpää, P. L., Gissler, M., Peltopuro, P., Tiitinen, A., & Hautamäki, H. (2022). The effect of paternal and maternal factors on the prognosis of live birth in

couples with recurrent pregnancy loss. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 101(12), 1374–1385. <https://doi.org/10.1111/aogs.14469>

Reig A, Franasiak J, Scott RT Jr, Seli E. The impact of age beyond ploidy: outcome data from 8175 euploid single embryo transfers. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Mar;37(3):595-602. doi: 10.1007/s10815-020-01739-0. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32173784; PMCID: PMC7125286.

Irani, M., Zaninovic, N., Rosenwaks, Z., & Xu, K. (2019). Does maternal age at retrieval influence the implantation potential of euploid blastocysts?. *American journal of obstetrics and gynecology*, 220(4), 379.e1–379.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.11.1103>

Cornelisse, S., Zagers, M., Kostova, E., Fleischer, K., van Wely, M., & Mastenbroek, S. (2020). Preimplantation genetic testing for aneuploidies (abnormal number of chromosomes) in in vitro fertilisation. *The Cochrane database of systematic reviews*, 9(9), CD005291. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005291.pub3>

Coll, L., Parriego, M., Boada, M., Devesa, M., Arroyo, G., Rodríguez, I., Coroleu, B., Vidal, F., & Veiga, A. (2018). Transition from blastomere to trophectoderm biopsy: comparing two preimplantation genetic testing for aneuploidies strategies. *Zygote* (Cambridge, England), 26(3), 191–198. <https://doi.org/10.1017/S0967199418000084>

Scott, K. L., Hong, K. H., & Scott, R. T., Jr (2013). Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertility and sterility*, 100(3), 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.004>

de los Santos MJ, Arroyo G, Busquet A, Calderón G, Cuadros J, Hurtado de Mendoza MV, Moragas M, Herrero R, Ortiz A, Pons C, Ten J, Vilches MA, Figueroa MJ; ASEBIR Interest Group in Embryology. A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate. *Fertil Steril*. 2014 Apr;101(4):981-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.043. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24502893.

Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction* (Oxford, England), 26(10), 2658–2671. <https://doi.org/10.1093/humrep/der256>

Yang, Z., Zhang, J., Salem, S. A., Liu, X., Kuang, Y., Salem, R. D., & Liu, J. (2014). Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC medical genomics*, 7, 38. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-38>

Metwally, M., Saravelos, S. H., Ledger, W. L., & Li, T. C. (2010). Body mass index and risk of miscarriage in women with recurrent miscarriage. *Fertility and sterility*, 94(1), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.021>

Bartolacci, A., Buratini, J., Moutier, C., Guglielmo, M. C., Novara, P. V., Brambillasca, F., Renzini, M. M., & Dal Canto, M. (2019). Maternal body mass index affects embryo morphokinetics: a time-lapse study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(6), 1109–1116. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01456-3>

Del Carmen Nogales, M., Bronet, F., Basile, N., Martínez, E. M., Liñán, A., Rodrigo, L., & Meseguer, M. (2017). Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. *Fertility and sterility*, 107(1), 229–235.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.019>

Minasi, M. G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M. T., & Greco, E. (2016). Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Human reproduction* (Oxford, England), 31(10), 2245–2254. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew183>

Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., & Hickman, C. F. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive biomedicine online*, 26(5), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.006>

Zhan, Q., Ye, Z., Clarke, R., Rosenwaks, Z., & Zaninovic, N. (2016). Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome. *PloS one*, 11(12), e0166398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166398>

Kahraman S., Cetinkaya M, Pirkevi C, Yelke H, Kumtepe Y. (2013) 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.