









DOI: 10.38136/jgon.1031669

Farklı inseminasyon teknikleri ile elde edilmiş insan embriyolarının erken fertilizasyon ve klivaj dinamikleri yönünden morfokinetik analizi: Prospektif kardeş oosit çalışması**Morphokinetic analysis of early fertilization and embryo cleavage dynamics based on the mode of insemination technique used on human embryos: A prospective sibling oocyte study**Güvenç KARLIKAYA¹Necati FINDIKLI²Turan AKSOY¹Orçun OLCAY¹Bilgen TEKE³F.Kübra BOYNUKALIN³Lale Susan KARAKIŞ¹Mustafa BAHÇECİ² Orcid ID:0000-0002-0366-1037 Orcid ID:0000-0001-9362-5912 Orcid ID:0000-0003-4161-3404 Orcid ID:0000-0002-1417-1842 Orcid ID:0000-0002-0436-6769 Orcid ID:0000-0002-4721-2786 Orcid ID:0000-0003-1870-5415 Orcid ID:0000-0002-5626-3251¹ Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezi, İnfertilite Kliniği, İstanbul, Türkiye² Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezi, Embriyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye**ÖZ**

Amaç: Bu çalışmada kendi gamet hücreleri kullanılarak Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) tedavisi gören çiftlerde, inseminasyon için kullanılan In Vitro Fertilizasyon (IVF) veya Intra- Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) yönteminin embriyo morfokinetik gelişim zamanlarında bir değişiklik yapıp yapmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntem: Çalışma Nisan 2014 – Ekim 2015 tarihleri arasında Bahçeci Fulya IVF Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmada, YÜT uygulanan 37 siklus dahil edildi. Her bir siklusta alınan oositler IVF ve ICSI adı ile rastgele ve mümkün olduğu ölçüde eşit sayıda iki gruba ayrıldı ve adı geçen yöntemle eş zamanlı olarak insemine edildi. Fertilizasyon kontrolü sonrasında oluşan tüm embriyolar time lapse inkübatör içinde inkübe edilerek, embriyo dondurma veya transfer aşamasına kadar olan süreçte morfokinetik kontrol noktalarına göre skorlandı.

Bulgular: Dinamik embriyo gelişim parametreleri karşılaştırıldığında, takip başlangıç kriteri olarak inseminasyon zamanı alındığında, çalışmanın her iki kolunda olan embriyolar benzer klivaj dinamikleri ve kalite oranları gösterdiler. Pronukleus silinme zamanı takip başlangıç kriteri olarak alındığında ise, çalışma grupları arasında ekspansiyon blastokist aşamasına ulaşım süresi IVF ile insemine edilen embriyolar lehine anlamlı farklılık gösterdi ($p<0.02$).

Sonuç: Kullanılan farklı inseminasyon teknikleri in vitro ortamda üretilen embriyoların morfokinetik davranışları üzerinde genel olarak anlamlı bir fark oluşturmamakla birlikte, uygun olgularda inseminasyon tekniği olarak IVF kullanılması, ekspansiyon blastokist aşamasına daha erken ulaşılmasını sağlama açısından embriyo skorlama süreçlerinde göz önüne alınması gereken önemli bir bulgudur.

Anahtar Kelimeler: Time-lapse görüntüleme, blastosist kültürü, In Vitro Fertilizasyon (IVF), Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI), Embriyo Morfokinetiği

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to assess whether in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) have different effects on the embryo's morphokinetic development in couples undergoing assisted reproduction technologies (ART) treatment using their own gametes.

Materials and Method: The study was conducted at the Fulya Bahceci IVF Centre between April 2014 and October 2015. Thirty seven cycles of ART were included to the study. Oocytes obtained at each cycle were randomly selected to undergo fertilization through either IVF or ICSI. All embryos formed after fertilization were incubated in time lapse incubator up until the time of embryo transfer or embryo freezing. The embryos were scored according to morphokinetic check points.

Results: When the dynamic embryo development parameters were compared using the time of insemination as the starting point of follow up, embryos in both groups demonstrated similar cleavage dynamics. When the point at which the pronuclei disappeared was chosen as the starting point for follow up, the time to reach the expanded blastocyst stage was shorter in the group of oocytes fertilized through IVF ($p<0.02$).

Conclusions: The use of different fertilization techniques does not appear to have a significant effect on the morphokinetic behaviour of embryos developed in vitro. However, the use of IVF for insemination of oocytes in appropriate cases may allow the more rapid development of the embryo to the expanded blastocyst stage.

Keywords: Time-lapse imaging, blastocyst culture, In vitro fertilization (IVF), Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), embryo morphokinetics

Sorumlu Yazar/ Corresponding Author:

Güvenç Karlıkaya

Adres: Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezi, Hakkı Yeten cd, Terrace Fulya, Kat 3, 34394, Şişli, İstanbul, Türkiye

E-mail: gkarlikaya@bahceci.com

Başvuru tarihi : 06.12.2021

Kabul tarihi : 21.01.2022

GİRİŞ

Yardımla üreme tedavileri ve laboratuvar tekniklerindeki ilerlemelerin en belirgin sonucu; transfer edilecek kaliteli embriyoların daha kesin parametrelerle belirlenebilmesi ve buna bağlı olarak gebelik oranlarında herhangi bir olumsuzluk yaşanmaksızın transfer edilecek embriyo sayısının azaltılabilmesi olmuştur. Bu sayede çoğul gebelikler ve bunlara bağlı komplikasyonların önüne geçmek mümkün hale gelmiştir (1).

Embriyoların, bünyesinde time-lapse görüntüleme sistemi barındıran inkübatörler içerisinde inkübe edilerek morfokinetik olarak da takip edilebilmesi, klasik morfolojiye dayanılarak yapılan değerlendirmenin ötesinde, klinik sonuçların iyileştirilmesine yardımcı olan umut verici ve invazif olmayan bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (2,3). Bu sistemlerde, oositlerin inseminasyon sonrası kültürde tutuldukları son aşamaya kadar çok sayıda morfokinetik değişken bakımından değerlendirilmesi ve ölçümlenebilmesi mümkün olduğundan, oluşturulan farklı skorlama ve tahmin modelleri ile embriyoların implantasyon ve olası anöploidi risklerinin önceden tahmin edilmesi, ve böylece tedavi süreçlerinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır (4,5). Bununla birlikte adı geçen model geliştirme amaçlı yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, embriyo morfokinetik parametrelerinin hastaya (obezite, sigara kullanımı vb.), tedaviye (gonadotropin dozu, stimülasyon protokolü vb.) ve laboratuvar ortamına (inseminasyon metodu, kültürdeki oksijen konsantrasyonu, embriyo kültür metodu vb.) ait pek çok farklı değişkene bağlı olarak değişebildiğini göstermektedir (6)

Bu faktörler arasında yer alan farklı inseminasyon metodlarının (IVF ve ICSI) embriyo morfokinetiği üzerinde oluşturduğu olası değişiklikler bugüne kadar sadece birkaç çalışma tarafından araştırılmıştır ve bu çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (7,8). Uygulanmaya başlandığı ilk yıllarda özellikle şiddetli erkek faktörü gözlenen olgularda kullanılan ICSI yöntemi, özellikle son yıllarda daha geniş bir endikasyon grubunda kullanılmaya başlanmış olup günümüzde dünya genelinde yardımcı üreme teknikleri uygulanan çiftlerin önemli bir kısmında inseminasyon yöntemi olarak daha fazla tercih edilir hale gelmiştir (9). Günümüze kadar gerçekleştirilen time lapse embriyo morfokinetiği (TLM) tabanlı tahmin modelleri tasarımları gereği yalnızca ICSI ile döllenmiş embriyoları içermektedir. Bugüne kadar IVF ile döllenmiş veya her iki inseminasyon tekniğinin birlikte kullanıldığı bir model mevcut değildir (10,11,12). Ayrıca son dönemde yayınlanan mevcut TLM modellerinin büyük ölçüde çalışmanın yapıldığı merkeze özgü olduğu, çalışmanın dışın-

da olan farklı merkezlerde kullanımlarının beklenen sonuçları veremediği gösterilmiştir (13,14). Sonuç olarak, her IVF ünitesi, ICSI ve IVF ile döllenmiş tedavi döngülerinin oranı da dahil olmak üzere yerel laboratuvar uygulamalarını yansıtan kendi verilerine dayanarak kendi tahmin modelini geliştirmeye çalışmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, kardeş oositler üzerinde IVF veya ICSI yöntemi ile gerçekleştirilen inseminasyonun, time-lapse olarak izlenen uzun süreli embriyo kültürünün her adımı sırasında erken ve geç morfokinetik parametreleri nasıl etkilediğini belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma dizaynı ve hasta seçimi

Çalışma Nisan 2014-Ekim 2015 tarihleri arasında Bahçeci Fulya IVF Merkezinde prospektif olarak gerçekleştirildi. Kadın yaşının 38 ve daha genç olduğu, sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ml'den fazla, total motilitenin %50'den fazla ve normal morfolojinin %4'ten fazla olan ve kardeş oositlerinde IVF/ICSI kombinasyonu ile inseminasyon kararı alınan çiftler çalışmaya dahil edildi. Çalışma öncesi gerekli etik kurul izni Yeni Yüzyıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etik Kurulu'ndan alındı (BAEK 2014/2/4).

Ovülasyon İndüksiyon Protokolleri ve Yumurta Toplama İşlemi Tüm hastalara tedavi protokolü olarak kısa antagonist protokolü uygulandı. Stimülasyona menstruasyonun 2. ya da 3. günü başlandı, uygulanacak gonadotropin dozu, transvajinal ultrason ile değerlendirilen antral folikül sayısı, vücut kitle indeksi ve olgunun yaşı göz önüne alınarak 150-450 IU/gün aralığında belirlendi. Prematür LH yükselmesini önlemek amacı ile önde giden folikül boyutu 13 mm ulaştığında ya da serum östradiol düzeyi >250 pg/ml olduğunda gonadotropin releasing hormon antagonisti başlandı ve ovülasyon tetikleme gününe kadar devam edildi. Ovülasyon tetikleme, 18 mm ve üzerinde en az 3 folikül belirlendiğinde, 0,25 mg hCG veya 0,2 mg triptorelin enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Yumurta toplama işlemi enjeksiyondan 34-36 saat sonra transvajinal ultrasonografi eşliğinde 17 G tek lümen iğne ile gerçekleştirildi.

IVF veya ICSI ile İnseminasyon

Yumurta toplama işlemi sonrası foliküler sıvı içerisinde bulunan kümülüs-oosit kompleksleri (KOK) tek aşamalı kültür mediumu (SSM®, Irvine Scientific, USA) içerisine alınarak inkübatöre yerleştirildi. Çalışmaya dahil edilen hastalarda OPU işleminden 2-2,5 saat sonra alınan kümülüs-oosit komplekslerinin (KOK)

sayıca yarısı ICSI amaçlı olarak hyaluronidaz (Hyaluronidase, Irvine Scientific, USA) enzim uygulamasına tabii tutuldu ve uygun olan (M2) oosit sayısına bakılarak kalan oositler IVF işleminde kullanılmak üzere inkübatöre kaldırıldı.

İnseminasyonda kullanılacak sperm örneği sperm yıkama mediumu (Sperm washing medium, Irvine Scientific, USA) ve separasyon mediumu (Isolate®, Irvine Scientific, USA) kullanılarak dansite gradient yöntemi ile hazırlandı. Uygun şartlarda ve sürede spermlerin seçilmesi ve immobilizasyon sonrası hazırlıklarını müteakip, oositler spermin bulunduğu kap içerisine hazırlanmış olan damlacıklara konuldu ve embriyolog tarafından her bir oosite 1 sperm enjekte edilecek şekilde mikroenjeksiyon işlemi gerçekleştirildi.

IVF ile inseminasyonda kullanılacak sperm örneği her bir KOK için 100.000 progresif motil sperm olacak şekilde hazırlandı. 4-kuyucuklu NUNC kültür kaplarının her bir kuyucuğuna, 125 mikrolitrelik pipetör ve ucuna takılı steril eppendorf 100 mikrolitrelik pipet ucu yardımı ile daha önceden enzim uygulaması öncesinde inkübatöre kaldırılmış olan 2 adet KOK transfer edildi ve daha önceden yıkanarak hazırlanmış sperm örneğinden her bir kuyucuk içerisinde 100.000 hareketli sperm olacak şekilde konularak inseminasyon amaçlı gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Çalışmada tüm embriyo kültür aşamaları SSM kültür mediumu ile gerçekleştirildi.

İnseminasyon Sonrası Embriyo Kültürü

Çalışmada, fertilizasyon sonrası dinamik embriyo kültürü ve takibi amaçlı olarak Unisense Fertilitech tarafından üretilmiş olan, kendi içerisinde optik bir gözlem ve kayıt sistemi olan ve iç haznesine yerleştirilen embriyoların %6 CO₂ ve %5 O₂ gaz karışımında ve 37°C'de dış ortamdan izole bir şekilde geliştirilmesine olanak veren time-lapse inkübatörü (EmbryoScope; Vitrolife, Danimarka) kullanıldı. İnseminasyon işlemlerinin yapıldığı günden bir gün sonra sabah saatlerinde (İnseminasyon sonrası 16-20. saatler) ICSI ile inseminasyon yapılan oositlerde inverted mikroskop kullanılarak fertilizasyon kontrolü gerçekleştirildi. Kontrol sonrası her iki gruba ait döllenmiş oositler (zigotlar) öncelikle kültür kabının ilk altı kuyucuğuna ICSI ile döllenmiş olan oositler, yedinci kuyucuktan itibaren ise IVF ile döllenmiş olan oositler gelecek şekilde cihaz için özel olarak tasarlanmış kültür kabı içerisine (EmbryoSlide; Vitrolife, Danimarka) aktarıldıktan sonra time-lapse inkübatörüne yerleştirildi. Bu aşamada cihaz üzerinde gerekli zamansal bilgiler ve veri girişleri gerçekleştirilerek inkübasyon süreci başlatıldı. Her bir embriyonun dinamik kültürde büyütüldüğü süre boyunca gelişimleri 7 farklı fokal düzlemde ve 20 dakikalık aralıklar ile elektronik olarak kayıt

altına alındı. Kayıtlar mevcut literatürde belirtildiği şekilde tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, tM, tSB, tB, tEB ve tHB zamansal parametrelerine göre değerlendirilip skorlandı (7). Embriyoların blastokist aşamasına kadar büyütülmesi planlanan olgularda embriyo gelişiminin 3. gününde kayıt duraklatıldı, gelişmekte olan tüm embriyolar yeni embryoslidde kültür kabına aktarıldı, embryoslidde cihaza yüklendi ve kayıt ve skora süreci kaldığı yerden devam ettirildi.

Sonuç Ölçütleri ve İstatistiksel Analiz

Ana sonuç ölçütleri olarak inseminasyon tekniğine göre bölünmedeki ve blastokist aşamasında standart ve standart olmayan morfolojik parametrelerdeki farklılıklar ele alındı. Gruplar arası fertilize olan zigotlar χ^2 testi ile, parametrelere ait ortalamalar t-testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olarak p değerinin 0,05'ten küçük olarak tespit edildiği durumlar kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 37 sıklusa ait genel hasta özellikleri Tablo 1'de sunulmaktadır.

Tablo 1. Demografik özellikler

Siklus sayısı	37
Kadın yaşı	29,5 ± 5
Ortalama Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	26,3 ± 6,2
Ortalama FSH (mIU/ml)	6,2 ± 1,7
İnfertilite tipi	
Primer	23 (62%)
Sekonder	14 (38%)
İnfertilite süresi (yıl)	5,7 ± 1,2
Önceki deneme sayısı	1,8 ± 1,1
Alınan oosit sayısı n, (Ortalama)	892 (24,7 ± 8,1)
Sperm konsantrasyonu (x10 ⁶ ; Ortalama)	53,4 ± 11,4
Toplam sperm hareketliliği (Ortalama %)	52,4 ± 5,6

Toplamda 781 kardeş oosit IVF veya ICSI yöntemi kullanılarak insemine edildi. İnseminasyon sonrası 611 zigot (%78,2) normal fertilizasyon gösterdi. Her bir sıklusta fertilize olan zigot sayısına bağlı olarak her bir gruba ait maksimum 6 zigot, time-lapse monitör (TLM) cihazına aktararak takibe alındı. Tablo 2'de farklı inseminasyon metodu uygulanan oositler ve bu gruplardan TLM cihazına aktararak değerlendirmeye alınan embriyo sayıları verilmiştir.

Tablo II. İnseminasyon sonuçları

	IVF		ICSI	
	n	%	n	%
Tüm oositler	781			
İnsemine edilen oosit sayısı	365	%46,7	416	%53,3
Fertilize olan zigot sayısı	276	%75,6	335	%80,5
TLM olarak kültüre edilen zigotlar	405			
	195	%70,6	210	%62,6

Fertilizasyon oranları açısından IVF ve ICSI ile insemine edilen gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi (%75,6' ye karşı %80,5).

Dinamik embriyo kültür sistemi içinde büyütülen her bir zigot için skorlanan morfokinetik değişimler literatürde belirtilen farklı zamansal başlangıç noktalarına göre (t0= insemasyon saati ve t0= pronükleusların silinmesi zamanı tPNf) incelenerek Tablo 3 ve Tablo 4'te sırası ile listelenmiştir. Gruplar arasındaki olası morfokinetik farklılıkların karşılaştırılması için zamansal başlangıç noktasının insemasyon saati olarak alındığı incelemede, her iki grup arasında embriyo takibinin yapıldığı en son aşama olan hatching blastokist aşamasına (tHB) kadar gözlenen farklı parametreler arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p<0,05). Bununla birlikte aynı verilerin zamansal başlangıç noktası, pronükleusların silinmesinin gözlenmeye başladığı saat (tPNf) olarak alındığı zaman incelenmesi sonrasında IVF grubundaki zigotların ICSI grubundaki zigotlara kıyasla anlamlı bir oranda (p=0,02) erken saatte ekspansiyon blastokist aşamasına ulaştıkları tespit edildi.

Tablo III. T0 olarak insemasyon zamanının alınması ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması

	IVF		ICSI		p
	n	Ort. ±SS	n	Ort. ±SS	
Morfokinetik parametreler	n	Ort. ±SS	n	Ort. ±SS	p
tPNf	195	25,7 ± 3,4	210	25,5 ± 4,6	0.6212
t2	195	28,8 ± 4,1	210	28,2 ± 5,2	0.2003
t3	195	38,4 ± 6,3	210	37,8 ± 6,0	0.3269
DC 1 → 3	195	%7,2 (14)	210	%10,9 (23)	0.3021
t4	195	40,8 ± 7,0	210	40,3 ± 6,0	0.4397
t5	191	50,6 ± 9,0	206	50,0 ± 9,4	0.5170
t6	181	54,8 ± 9,7	197	53,7 ± 8,2	0.2333
t7	174	57,6 ± 8,7	187	57,5 ± 9,2	0.9157
t8	160	60,3 ± 9,6	164	59,4 ± 8,9	0.3820
t9+	121	69,2 ± 11	139	67,1 ± 9,9	0.1065
cc2a (t3-t2)	181	10,3 ± 4,2	185	10,8 ± 3,4	0.2110
cc2b (t4-t2)	181	12,3 ± 5,2	185	12,5 ± 4,1	0.6827
tM	112	79,9 ± 13,1	126	77,8 ± 13,0	0.2164
tSB	100	87,0 ± 10,8	110	85,3 ± 12,3	0.2905
tB	81	102,2 ± 8,2	81	102,1 ± 9,4	0.9426
tEB	59	108,6 ± 8,0	69	110,7 ± 7,9	0.1386
tHB	18	120,2 ± 8,2	18	118,2 ± 8,3	0.4720

tPNf: Pronükleus silinme zamanı, t2-t9 = 2-9 Hücre bölünme zamanı, DC 1/3: 1-3 hücreye direk klivaj, cc2a/cc2b: Hücre siklusu süresi, tM: Morula oluşma zamanı, tSB: Blastulasyon başlama zamanı, tB: Blastokist oluşma zamanı, tEB: Ekspansiyon blastokist oluşma zamanı, tHB: Hatching blastokist oluşma zamanı

Tablo IV. T0 olarak tPNf zamanının alınması ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması

	IVF		ICSI		p
	n	Ort. ±SS	n	Ort. ±SS	
Morfokinetik parametreler	n	Ort. ±SS	n	Ort. ±SS	p
t2	195	3,1 ± 2,2	210	2,8 ± 1,2	0.0862
t3	195	12,7 ± 4,7	208	12,3 ± 4,4	0.3781
t4	194	15,1 ± 5,5	208	14,8 ± 4,3	0.5413
t5	191	25,0 ± 8,1	206	24,6 ± 8,8	0.6385
t6	181	29,2 ± 8,3	197	28,0 ± 8,4	0.1637
t7	174	32,2 ± 7,7	187	32,5 ± 8,2	0.7208
t8	160	34,8 ± 8,6	164	34,7 ± 8,0	0.9137
t9+	121	43,9 ± 10,3	139	42,2 ± 9,5	0.1676
tM	112	54,3 ± 12,9	126	53,2 ± 12,7	0.5086
tSB	100	61,5 ± 10,9	110	60,9 ± 12,1	0.7072
tB	81	76,7 ± 8,3	81	77,9 ± 8,9	0.3762
tEB	59	83,2 ± 8,1	69	86,5 ± 7,7	0.0198*
tHB	18	95,3 ± 8,7	18	94,6 ± 7,7	0.7998

*: p<0,05; t2-t9 = 2-9 Hücre bölünme zamanı, tM: Morula oluşma zamanı, tSB: Blastulasyon başlama zamanı, tB: Blastokist oluşma zamanı, tEB: Ekspan-

TARTIŞMA

IVF ve ICSI tekniklerinin embriyo gelişimi üzerindeki olası etkilerini 2010 yılı öncesi statik embriyo kültürü kullanarak kardeş oositler üzerinde değerlendiren çalışmalar, sperm faktörüne bağlı olgularda ICSI lehinde bir fertilizasyon artışı ve IVF lehinde bir embriyo kalite artışına işaret ederken, erkek faktörü olmayan olgularda bu durumun fertilizasyon metodundan ziyade bireysel gamet kalitesine bağlı olduğunu göstermiştir (15-19). Bu çalışmalarda karşılaşılan ortak zayıf nokta, statik embriyo kültürüne bağlı olarak embriyonun gelişiminin sadece kısıtlı bir aşamasında değerlendirilebilmesi ve farklı fertilizasyon metodlarının embriyonun morfokinetik gelişimine etkilerinin net olarak belirlenememesidir. Aynı zaman diliminde inseminasyon yapıldığında, fertilizasyon sürecinin IVF grubunda ICSI grubuna göre daha uzun olduğu artık bilinen bir gerçektir. Ancak, ileri embriyo gelişim aşamalarında karşılaşılabilecek diğer farklılık ve benzerliklerin sadece statik gözlem ve ölçümler ile anlaşılabilmesi mümkün değildir. Yakın geçmişte klinik kullanıma sunulan dinamik embriyo kültür sistemleri bu açıdan önemli bilgiler sağlamaktadır.

Yakın bir süre önce, adı geçen sistemlerin kullanıldığı fakat kardeş oositler yerine vakaların gruplanarak embriyo gelişimlerinin incelendiği iki farklı çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan ilki, Cruz ve arkadaşları tarafından 2013 yılında Embryoscope® sistemi kullanarak donasyon tedavisi gören hastaların oosit/embriyoları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, statik embriyo kültüründe yapılan geçmiş çalışmalar ile paralel olarak, başlangıç noktası için inseminasyon saati alındığında, IVF ile döllen embriyolarda ICSI ile dölenenlere göre klivaj döneminde daha yavaş bir embriyonik gelişim gözlemlenmiştir. Bu yavaş gelişim, embriyoların kültürde kalma süreleri artıkça istatistiksel olarak anlamını yitirmiş ve blastokist aşamasında IVF metodu lehine bir farklılık oluşmuştur (8). Bodri ve arkadaşları benzer bir çalışmayı doğal veya düşük doz ovülasyon indüksiyonu kullanılan farklı yaş aralığındaki infertil kadınlarda yapmıştır. Farklı tedavi şekli kullanılmış olmasına rağmen, elde ettikleri sonuçlar Cruz ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlara genel olarak benzerlik göstermektedir (7). Her iki çalışmada da ICSI ve IVF gruplarında kullanılan sperm parametrelerinde farklılık mevcuttur (iyi kalitedeki spermlerin IVF grubuna atanması gibi). Bu nedenle, ICSI ile elde edilen embriyolarda daha düşük kaliteli spermlerin kullanılmış olması bu embriyoların morfokinetik özelliklerini olumsuz yönde etkilemiş olabilir.

Çalışmamızda, sonuçların yorumlanması aşamasında adı ge-

çen farklılıkların önüne geçebilmek amacı ile kardeş oositlerde aynı özellikte ve aynı şartlarda hazırlanmış sperm örneği ve özellikleri kullanılmıştır. Böylece elde edilen sonuçlar üzerinde baba adayı kaynaklı kişisel farklılıkların gözlenme olasılığını en aza indirilmiştir.

Literatürdeki çalışmaların oosit gelişiminde kullanılan ovaryen stimülasyon protokolleri yönünden de farklılık gösterdiği görülmektedir. Cruz ve arkadaşları oosit donasyonu modelinde elde edilen oositleri standart ovülasyon indüksiyonu ile elde ediyor iken, Bodri ve arkadaşları infertil bir hasta popülasyonunda doğal siklus veya minimal ovülasyon indüksiyonu kullanmışlardır (7,8). Günümüze kadar gerçekleştirilen ovülasyon indüksiyonu ve olası klinik sonuçları analiz eden güncel çalışmalar, farklı ovülasyon indüksiyonu protokollerinin de oosit kalitesini ve olgunluk düzeyini büyük ölçüde değiştirebildiğini, bu durumun da beraberinde erken embriyonik gelişim esnasında önceden tahmin edilemeyen morfokinetik farklılıklar oluşturabileceğini vurgulamaktadır (6). Çalışmamızda, tek bir merkezde tedaviye alınan infertil olgularda, klasik antagonist protokolü standart olarak uygulanmış ve olguların kendi oositleri randomize edilmiştir. Bu konuda halen iyi tasarlanmış ve mevcut farklılıkları ölçebilen daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda IVF ve ICSI teknikleri, özellikle adı geçen şartların sonuçlar üzerindeki etkilerini en aza indirebilmek amacı ile şiddetli erkek infertilitesi olmayan vakalarda kardeş oositler üzerinde dinamik embriyo kültür sistemi kullanımıyla karşılaştırılmıştır. Böylece şiddetli erkek infertilitesi olgularında karşılaşılabilecek, temel sperm testlerinde gözlenemeyen, hastaya özgü olumsuzlukların etkisi en aza indirilmiş; kardeş oositlerin kullanılmasıyla da gruplar arasındaki farklılıkların sonuçlara yanlı etkisi ortadan kaldırılmıştır. Dinamik embriyo kültür sistemi, statik embriyo kültüründe gözlenmesi teknik olarak mümkün olmayan pek çok morfokinetik parametre açısından iki farklı fertilizasyon tekniğinin karşılaştırılabilmesini sağlamıştır.

İnseminasyon zamanına göre yapılan önceki çalışmalarda, IVF ile elde edilen embriyoların erken klivaj dönemine kadar anlamlı olarak yavaş geliştiği, ancak blastokist aşamasına gelindikçe bu farkın ortadan kalktığı; hatta IVF ile elde edilen blastokistlerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek kaliteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, önceki çalışmalardan farklı olarak embriyoların klivaj dönemine kadar olan gelişme süresinde IVF ve ICSI yöntemleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte, embriyo morfokinetik parametreleri pronükleusun silinme zamanından itibaren değerlendirildiğinde, IVF ile inseminasyon yapılan embriyoların ekspansiyon

blastokist evresine istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha hızlı ulaştığı görülmüştür.

YÜT'de genel pratik, sperm faktörü olmayan olgularda da inseminasyon metodu olarak ICSI tercih edildiğini göstermektedir (9). Sperm faktörü olmayan olgularda, IVF ve ICSI inseminasyon metodlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda, fertilizasyon oranlarının ICSI lehine yüksek olması ve beklenmedik total fertilizasyon başarısızlıkları ile daha az karşılaşıyor olması, infertilite merkezlerinin ICSI metodunu yaygın kullanmasının en önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Ancak bu olgularda embriyo gelişim parametrelerine ve gebelik oranlarına bakıldığında, her iki inseminasyon metodu arasında farklılık olmadığı görülmektedir (20). Bununla birlikte, ICSI tekniğinin yaygın uygulanan bir yöntem olması; invazif doğası, uygulayıcı tecrübesi ve teknik faktörlerin başarı oranlarını doğrudan etkilemesi ve imprinting bozukluklarına neden olabileceği yönündeki kuvvetli şüphelerin varlığı nedeniyle sorgulanması gereken bir durumdur (21).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, gruplar arasında embriyo gelişimi açısından dinamik morfometrik parametrelerde anlamlı bir embriyo gelişim farklılığına işaret etmemektedir. Üstelik, IVF ile insemine edilen embriyolarda ekspansiyon blastokist aşamasına ulaşma hızının daha yüksek olması, uygun olgularda bu metodun daha liberal kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamız, gerek içerdiği hasta grubunun homojenliği, gerekse kardeş oosit kullanımına olanak sağlaması bakımından literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır. Bununla beraber, elde edilen sonuçların confirmasyonu amacıyla klinik sonuçların da değerlendirildiği daha yüksek sayıda hasta popülasyonuna sahip geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1-Rachel B.Mejia, Emily A.Capper, Karen M.Summers, PatrickTen Eyck, Bradley J.Van Voorhis. Elective transfer of one embryo is associated with a higher cumulative live birth rate and improved perinatal outcomes compared to the transfer of two embryos with in vitro fertilization. *F&S Reports* 2021; 2: 50-57

2-Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., Requena, A., 2012. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and Sterility* 2012;98:1481-89

3-Rubio, I., Galán, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herero, J., Meseguer, M. Clinical validation of embryo culture and

selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and Sterility*2014; 102 (5):1287-1294

4-Basile, N., Vime, P., Florensa, M., Aparicio Ruiz, B., García Velasco, J.A., Remohí, J., Meseguer, M., 2015. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Human Reproduction* 2015;30(2):276-283

5-Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Hickman, C.F.L., 2013. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive BioMedicine Online*2013;26:477-485

6-Barrie, A., McDowell, G., Troup, S., 2021. An investigation into the effect of potential confounding patient and treatment parameters on human embryo morphokinetics. *Fertility and Sterility* 2021;115(4);1014-1022

7-Bodri, D., Sugimoto, T., Serna, J.Y., Kondo, M., Kato, R., Kawachiya, S., Matsumoto, T., 2015. Influence of different oocyte insemination techniques on early and late morphokinetic parameters: retrospective analysis of 500 time-lapse monitored blastocysts. *Fertility and Sterility*2015;104(5);1175-1181

8-Cruz, M., Garrido, N., Gadea, B., Muñoz, M., Pérez-Cano, I., Meseguer, M. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. *Reproductive BioMedicine Online*2013;27; 367-375

9-De Geyter, C., Wyns, C., Calhaz-Jorge, C., de Mouzon, J., Ferraretti, A.P., Kupka, M., Nyboe Andersen, A., Nygren, K.G., Gossens, V. 20 years of the European IVF-monitoring Consortium registry: what have we learned? A comparison with registries from two other regions. *Human Reproduction* 2020;35(12);2832-2849

10-Kirkegaard, K., Kesmodel, U.S., Hindkjær, J.J., Ingerslev, H.J. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 2013;28(10);2643-2651

11-Reignier, A., Lammers, J., Barriere, P., Freour, T. Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*2018;36(4);380-387

12-Tejera, A., Aparicio-Ruiz, B., Meseguer, M. The use of morphokinetic as a predictor of implantation. *Minerva Obstetrics and Gynecology* 2017;69(6);555-567

13-Fréour, T., le Fleuter, N., Lammers, J., Spingart, C., Reignier, A., Barrière, P. External validation of a time-lapse prediction model. *Fertility and Sterility*2015;103(4);917-922

- 14-Kirkegaard, K., Campbell, A., Agerholm, I., Bentin-Ley, U., Gabrielsen, A., Kirk, J., Sayed, S., Ingerslev, H.J. Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: a large multi-centre outcome analysis. *Reproductive BioMedicine Online*2014;9(2);156-158
- 15-Khamsi, F., Yavas, Y., Roberge, S., Wong, J.C., Lacanna, I.C., Endman, M. Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*2001;75(2);342-347
- 16-Pisarska, M.D., Casson, P.R., Cisneros, P.L., Lamb, D.J., Lipshultz, L.I., Buster, J.E., Carson, S.A. Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. *Fertility and Sterility*1999;71(4);627-632
- 17-Ruiz, A., Remohí, J., Minguez, Y., Guanes, P.P., Simón, C., Pellicer, A. The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*1997;68(1);171-173
- 18-Yang, D., Shahata, M.A., Al-Bader, M., Al-Natsha, S.D., Al-Flamerzia, M., Al-Shawaf, T. Intracytoplasmic sperm injection improving embryo quality: Comparison of the sibling oocytes of Non-Male-Factor couples. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*1996: 13(4);351-355
- 19-Yoeli, R., Orvieto, R., Ashkenazi, J., Shelef, M., Ben-Rafael, Z., Bar-Hava, I. Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*2008;25(1);23-28
- 20-Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion 2020
- 21-Bosch E, Espinós JJ, Fabregues F, Fontes J, García-Velasco J, Llácer J, Requena A, Checa MA, Bellver J; Spanish Infertility SWOT Group (SISG). ALWAYS ICSI? A SWOT analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(9);2081-2092.