

Blastosist Kalitesinin Değerlendirmesinde Kantitatif Yaklaşımın Klinik Gebelik Başarısına Etkisi

Berrin AVCI^{1,2}, Işıl KASAPOĞLU², Gökten KUŞPINAR¹, Seda SARIBAL²,
Gürkan UNCU², Barış ATA³

¹ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

² Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi, Bursa.

³ Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Günümüzde canlı doğum, gebelik şansı ve implantasyon oranını belirleyici blastosist morfolojik parametreleri halen tartışmalıdır. Embriyo morfolojik parametreleri ile transferi sonrası klinik sonuçlar arasındaki ilişki henüz tam olarak anlaşılammış ve fikir birliği oluşmamıştır. Bu amaçla iyi kalite embriyo seçiminde objektif olarak kullanılabilen kantitatif bazı morfolojik parametrelerin implantasyon ve klinik sonuçları belirlemedeki etkinliğini değerlendirebilmek amacı ile; bu çalışmada blastosist ve blastosöl çevre ve alan hesaplamaları, trofoektoderm (TE) hücre sayısı ve iç hücre kitlesi (ICM) alanının implantasyon üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın temel bulgusu blastosist transferi ardından, implantasyon ve sonrasında devam eden klinik gebelik oranının; embriyo kalite skoru, blastosist alan ve çevresi, blastosöl alanı, çevresi ve TE hücre sayısı ile ilişkili olduğudur. Embriyo ICM alan ve çevresi, dairesellik indeksi ve ZP kalınlığının, klinik gebelik oranları üzerinde etkin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Blastosist kalite skoru. Klinik gebelik. İç hücre kütlesi. Trofoektoderm. Blastosöl.

The Impact of the Quantitative Evaluation of Blastocyst Quality on Clinical Pregnancy Success

ABSTRACT

Today, morphological parameters of blastocyst that determine live birth, chances of pregnancy and implantation are still controversial. The relationship between morphological parameters of embryo and clinical outcomes after embryo transfer is not yet fully understood and there is no consensus. In our study, we aimed to evaluate the effectiveness of some quantitative morphologic parameters (blastocyst and blastocyte diameter and area, trophectoderm cell number and inner cell mass area) that could be utilized objectively in selecting good quality embryos for implantation and clinical outcome. The main finding of our study was that the rate of ongoing implantation and clinical pregnancy was associated with embryo quality score; blastocyst area/diameter; blastosol area/diameter and the number of TE cells. The results showed that the ICM area/diameter, ICM roundness index and ZP thickness were not effective on clinical pregnancy rates.

Key Words: Blastocyst quality score. Clinical pregnancy. Inner cell mass. Trophectoderm. Blastocoele.

Üremeye yardımcı tedavi (ÜYT) uygulamalarında temel başarı kriteri canlı doğum eldesidir. Geçmiş yıllarda çoklu embriyo transferleri ile gebelik oranlarının artırılması hedeflenmiştir. Ancak günümüzde, neonatal ve maternal komplikasyonlar göz önünde bulundurularak çoklu gebeliklerin önüne geçilmesi amacı ile bir çok ülkede transfer edilecek embriyo

sayısı yasal düzenlemeler ile kısıtlanmıştır. Bu kapsamda, tek ve implantasyon potansiyeli en yüksek embriyonun transfer için seçimi ÜYT uygulamalarının kritik basamaklarından biridir. Dolayısıyla embriyonun gelişim süreçlerine hasar vermeden, gelişimsel potansiyeli ve implantasyon kapasitesi en yüksek embriyoyu seçme kriterleri ve kullanılan yöntemler daha çok önem kazanmıştır. Embriyoloji laboratuvarlarında morfolojik parametreleri temel alan, inverted mikroskop yardımıyla gerçekleştirilen embriyo değerlendirilmesi erişilebilir en pratik yöntem olması sebebi ile tercih sebebidir. Embriyo değerlendirilmesi için bir çok non-invaziv yöntem geliştirilmiş olsa da, yüksek maliyet ve zaman gerektirmesi sebebiyle rutin olarak kullanılmamaktadır¹.

Geliş Tarihi: 10 Ekim 2017
Kabul Tarihi: 14 Kasım 2017

Dr. Berrin AVCI
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Bursa.
Tel: berrin@uludag.edu.tr
E-posta: 0224 295 40 71

Uzamış embriyo kültürü, fertilizasyon sonrası 5. güne kadar embriyoların değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. İmplantasyon ve klinik gebelik şansı en yüksek embriyonun doğal seleksiyonu ve transferi bakımından blastosist kültürü ve transferi, 3.gün klivaj aşaması transferlerine göre avantajlıdır². Ayrıca blastosist kültürü ve transferinin, transfer gününde embriyonik ve endometrial gelişimdeki senkronizasyon, iyi kalite ve canlılık oranı yüksek tek embriyonun seçilerek transferi ile çoklu gebelik oranlarının azalması bakımından da avantajlıdır¹. Uzamış kültür sürecinde embriyo arrestlerinin oluşması ve dolayısıyla 3. gün canlılığını koruyan embriyonun 5. gün transferinin iptali söz konusu olabileceği için, blastosist kültürünü gerçekleştirecek embriyoloji laboratuvarında optimal şartların oluşturulması gerekir¹. Kültür şartlarının optimize edildiği, kalibrasyon ve kalite kontrol sistemlerinin iyi çalıştığı embriyoloji laboratuvarlarında, tüm IVF endikasyonları için doğru yaklaşım 5. gün blastosist aşamasında embriyo transferidir.

Birçok ÜYT Merkezi embriyoloji laboratuvarında implantasyon ve klinik gebeliğin majör belirteci olarak düşünülen blastosist kalitesi morfolojik olarak üç parametreyi kapsayan skorlama sistemine göre değerlendirilir³. Gardner ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu skorlama sisteminde değerlendirilen üç parametre; blastosöl ekspansiyon oranı ve embriyonun zona pellusidasından (ZP) ayrılması (hatching), iç hücre kütlesi (ICM) boyut ve düzenlenimi, trofoektoderm (TE) hücre sayısı ve düzenlenimi temeline dayanmaktadır. Morfolojik değerlendirme düşük gelişimsel potansiyele sahip embriyoların eliminasyonunda kolay, non-invasif ve klinik sonuç bakımından başarı sağlayan bir sistemdir. Richter ve ark. tarafından önerilen bir diğer skorlama sistemi ise blastosist çevre ölçümü, trofoektoderm hücre sayısı ve iç hücre kitlesi boyut ve şekline dayanmaktadır⁴. Bu sistem, blastosist morfolojisinin kantitatif ölçümleri ile implantasyon potansiyelinin değerlendirmesine olanak sağlamaktadır.

Günümüzde henüz canlı doğum, gebelik şansı ve implantasyon oranını belirleyici blastosist morfolojik parametreleri halen tartışmalıdır. Blastosöl gelişimi ve ekspansiyon oranının implantasyonun önemli belirteci olduğu gösterilmiştir⁵⁻⁸. İç hücre kütesinin şekil ve boyutu ile implantasyon arasındaki ilişki raporlanmıştır. İlgili çekici bir diğer veri ise trofoektoderm hücrelerinin sayı ve düzenleniminin implantasyon ile pozitif korelasyon göstermesidir⁹⁻¹¹. Embriyo morfolojik parametrelerinin kantitatif analizi implantasyon ve klinik gebelik oranlarının belirteci olarak daha net sonuçlar sunmaktadır. Rehman ve arkadaşları çalışmalarında morfolojik parametrelerin formülasyonu ile elde ettikleri blastosist kalite skorunun (BQS) klinik gebelik açısından önemini rapor etmişlerdir. Ayrıca ICM çapı ve dairesellik indeksinin (RI) expanded blastosistlerin implantasyon potansiyeli ile ilişkili

olduğu bildirilmiştir². Klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının blastosist ekspansiyonu ve trofoektoderm hücre sayısı ile korelasyonu rapor edilirken, iç hücre kitlesi şekil ve boyutundan bağımsız olduğu gösterilmiştir^{2,4,12}. Literatürdeki farklı yaklaşımlar ve veriler morfolojik parametreler ile klinik sonuçların arasındaki ilişkinin henüz tam olarak anlaşılmadığını ve fikir birliği olmadığını göstermektedir².

Tüm bu veriler eşliğinde, çalışmamızın temel hedefi blastosist morfolojisinin karakteristik özellikleri; trofoektoderm ve iç hücre kütlesi morfolojisine ek olarak kantitatif değerler olan blastosist çevre ölçümü, dairesellik oranı (roundness index=RI) ve blastosist kalite skorunun (BQS) biyokimyasal – klinik gebelik oranının tahmininde belirteç olup olmadığının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Dizaynı

Çalışmamız, Uludağ Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalı Üreme Sağlığı ve Infertilite Merkezinde 2011 - 2015 yılları arasında rutin klinik uygulama kapsamında 190 hastaya yapılan tek ve iki embriyo transferi gerçekleştirilen döngülere ait verilerin retrospektif değerlendirmesini ve transfer edilen embriyoların kantitatif parametrelerinin karşılaştırmasını kapsamaktadır.

Hasta Karakteristiği

Hastalar transfer sonrası klinik sonuca göre üç grup olacak şekilde ayrıldı. Grup 1; tek veya iki embriyo transferi sonrasında implantasyon gözlemlenmeyen (hCG < 5IU/L) 104 hasta (166 embriyo), Grup 2; tek embriyo transferi sonrasında biyokimyasal gebelik elde edilen (hCG > 10IU/L) 22 hasta (22 embriyo) ve Grup 3; tek veya iki embriyo transferi sonrasında %100 implantasyon ve klinik gebelik (6.hafta fetal kalp atımı) elde edilen 64 hastayı (88 embriyo) içermektedir. Embriyo parametrelerinin implantasyon ve biyokimyasal/klinik gebelik başarısına direkt etkinliğinin araştırılması amacıyla çalışmamızda hastalar karakteristik özelliklerine göre ayırt edilmemiştir. Çalışma hem taze hem de dondurulup-çözülmüş embriyo transferi yapılan döngüleri kapsamaktadır.

Kontrollü Ovaryan Stimülasyon Protokolü

Ovaryan stimülasyon protokolünün seçiminde, hasta karakteristik özelliklerine uygun olarak belirlenen dozda (150–375 IU) rekombinant FSH (r-FSH) (Gonal F, MERCK) menstrüel döngünün 3.-5. günleri arasında başlandı. Hipofizer baskılama fleksible antagonist protokol kapsamında GnRH antagonist (Cetrotide, SERONO) uygulaması ile yapıldı. Follikül boyutları günlük ya da iki günde bir transvajinal ultrason

Blastosist Kalitesinin Değerlendirmesi

(TVUSG) aracılığı ile ölçülerek değerlendirildi. Follikül çapı en az 18 mm olan bir ya da birden çok follikül gözlemlenmesini takiben, final oosit matürasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, en yüksek doz r-FSH uygulanmasından 36 saat sonra ovulasyon indüksiyonu için 250 ug/ 0,5 ml rekombinant hCG (Ovitrelle, MERCK) ya da 100 Unite leuprolide asetat GnRH agonist (Lucrin, ABBOTT) uygulaması yapıldı. Ovulasyon indüksiyonunu takiben 35-36 saat sonrasında transvajinal ultrason eşliğinde foliküllerin aspirasyonu ile oosit toplama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen oositlerin matürasyon seviyelerine göre değerlendirilmelerini takiben, matür (metafaz II) oositlerin inseminasyonu tek bir embriyolog tarafından intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemi ile yapıldı. İnseminasyonu takiben 16-18 saat sonra fertilizasyon değerlendirildi yapıldı ve zigot oluşumu gözlemlenen (erkek ve dişi pronükleusların görüldüğü) tüm embriyolar transfer gününe (5.gün) kadar kültür ortamında bekletildi. Tüm embriyo transferleri abdominal ultrasonografi eşliğinde ve 5. gün yapıldı. Hastalara blastosist aşamasında, en iyi kalite skoruna sahip tek yada iki embriyo transfer edildi. Embriyo transferini takiben 12. günde serum beta-hCG seviyeleri değerlendirilerek biyokimyasal gebelik sonuçları elde edildi. Biyokimyasal gebelik sonuçları pozitif hastalarda gebeliğin 6. haftasında ultrasonografi aracılığı ile fetal kalp atımının varlığına bakılarak klinik gebelikler belirlendi.

Embriyo Değerlendirme

Tüm blastosistler, Gardner ve Schoolcraft tarafından önerilen embriyo sınıflandırma sistemine göre değerlendirildi⁶. Bu sınıflandırma sistemi üç morfolojik parametreyi kapsamaktadır; blastosöl genişleme derecesi (ekspansiyon), ICM skoru ve TE skoru.

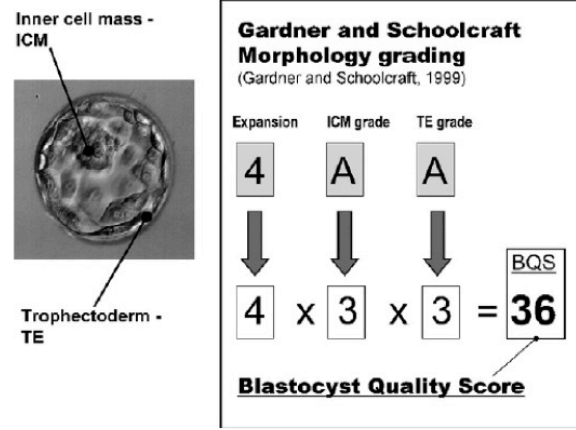
Blastosöl genişleme derecelerine göre kategorizasyon: 1; boyutunun yarısından küçük blastosölülle erken blastosist, 2; boyutunun yarısını az geçen blastosölülle erken blastosist, 3; boşluğu dolduran blastosölülle tam bütün bir blastosist, 4; boyutundan daha büyük blastosölülle genişlemiş bir blastosist, 5; zona pellusidası (ZP) kırılan ve ZP'sından kısmen ayrılan (hatching) blastosist, ve 6; zona pellusidasından tamamen ayrılmış, yuvalanmış blastosist olacak şekilde yapıldı.

ICM hücre sayısı ve yapısına göre kategorizasyon: A; sıkıca oluşmuş sayısız hücre, B; birkaç gevşekçe gruplanmış hücre, ve C; çok az sayıda hücre olarak yapıldı.

Trofoektoderm hücre ve yapısına göre kategorizasyon: A; birbirine bağlı epitel oluşturan çok sayıda hücre, B; gevşek bir epitel oluşturan bir kaç hücre, C; çok az sayıda hücre şeklinde yapıldı.

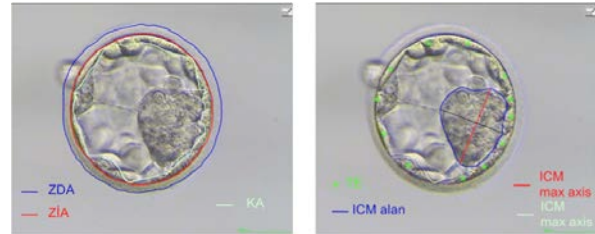
Gardner ve Schoolcraft'ın embriyo sınıflama sistemindeki derecelendirmelerini temel alan, Rahmen ve ark. önerdiği blastosist kalite skoru (BQS) hesaplan-

dı¹⁴. Blastosöl genişleme dereceleri 1-6 sayıları ile karakterize edilirken ICM ve TE derecelendirmesi için 1-3 sayıları (A=3, B=2, C=1) ile karakterize edildi. Bu 3 parametreye verilen puanlar birbiriyle çarpılarak blastosist kalite skoru (BQS) hesaplandı (Şekil 1).



Şekil 1: BQS skorunun hesaplanması

Embriyo transferi öncesinde, tüm transfer edilecek embriyoların görüntüleri alınarak Scion Image J. yazılımı aracılığı ile; blastosist, ICM, TE ve ZP çevre ve alan ölçümleri bilgisayar ortamında yapıldı (Şekil 2). Bu ölçümlere dayanarak, ICM dairesellik oranı (RI=ICM max/min çevre) ve ICM alanının blastosöl alanına oranı (ICM/blastosöl) yazılımı aracılığı ile hesaplandı.



Şekil 2:

Kantitatif Ölçüm Parametreleri. Zona dış sınırlarından blastosist alanı, (ZDA), Zona iç sınırlarından blastosist alanı (ZIA), Blastosöl alanı (KA), Trofoektoderm (TE), İç hücre kütle maksimum çap (ICM max axis), İç hücre kütle minimum çap (ICM min axis).

İstatistiksel Analiz

Verinin istatistiksel analizi SPSS v23.0 istatistik paket programında yapıldı. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler medyan, minimum, maksimum (nonparametrik dağılım) olarak belirtildi. Normal dağılım göstermeyen veri için gruplar arasında karşılaştırmasında Kruskal-Wallis testi, grup içi karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak belirlendi.

Bulgular

Çalışma kapsamında grup 1, 2, 3 olmak üzere transferi gerçekleştirilen sırasıyla 166, 22, 88 olmak üzere, toplam 276 blastosist morfolojisi değerlendirildi ve kantitatif verileri hesaplandı.

Tüm gruplar için; BQS değeri açısından istatistiksel anlamlılık saptandı ($p<0.01$). Ortalama BQS değerleri Grup 1, 2, 3 için sırasıyla 18, 30, 36 olarak hesaplanırken, gruplar arasında Grup 1-Grup 2, Grup 2-Grup 3 arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken, Grup 1- Grup 3 arasında ($p<0.01$) anlamlı fark tespit edildi.

Blastosist çevre ($p<0.01$) ve alan ($p<0.01$) ölçümleri, ZP harici çevre ($p=0.04$) ve alan ($p=0.03$) ölçümleri tüm gruplar için istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi. Belirtilen parametrelerin gruplar arasında ikili kıyaslamasında sadece Grup 1- Grup 3 arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.01$).

ICM çevre ve alan ölçümleri, ZP kalınlığı ve ICM dairesellik oranı (RI) bakımından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$)

Blastosöl alan ölçümü, Blastosöl/ ICM alan değeri tüm gruplar için istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.01$) gösterdiği, gruplar arasında ise sadece Grup 1 ile 3 arasında anlamlı farkların olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.01$)

Tablo I. Blastosist morfolojik ve kantitatif parametreleri ve gruplar arası karşılaştırması

	Grup I	Grup II	Grup III	p değeri	p değeri		
					Grup I-II	Grup I-III	Grup II-III
BQS	18 (3-45)	30 (6-46)	36 (9-45)	< 0.01	0.09	< 0.01	0.92
	26037,5	29312,9	28947,9				
Blastosist alanı(μm^2)	(19665,2-27195923)	(23196,3-40715,4)	(21853,7-38235,8)	< 0.01	0,24	< 0.01	0,53
	576,2	611,6	607,4				
Blastosist çevresi (μm)	(501,4-747,1)	(544,5-739,8)	(529,3-700,8)	< 0.01	0,22	< 0.01	0,57
	18201,7	21427,4	19647,1				
ZP haric alan (μm^2)	(11856,3-39897,8)	(10350,9-32568,9)	(10349,9-30856)	0,03	0,51	0,01	0,27
	490,8	529,1	509,1				
ZP haric çevre (μm)	(399-727,5)	(375,8-654,5)	(391,4-642,1)	0,04	0,66	0,01	0,23
	3947,7	4168,3	3748,5				
ICM alanı (μm^2)	(1576,3-7960,8)	(1674,1-8655,7)	(2469,1-8322,9)	0,61	-	-	-
	260,9	264,9	266,9				
ICM çevresi (μm)	(155,6-823,7)	(161,3-470,5)	(190,3-444,4)	0,99	-	-	-
	8415,8	12935,2	10910				
Blastosöl alanı (μm^2)	(160,2-32404,3)	(2254,6-26526,9)	(2307,7-22081,3)	< 0.01	0,15	< 0.01	0,3
	0,48	0,35	0,36				
ICM/ Blastosöl	(0,05-24,25)	(0,11-2,2)	(0,12-1,97)	< 0.01	0,18	< 0.01	0,35
TE hücre sayısı (n)	9 (2-17)	11 (6-18)	11 (4-17)	< 0.01	0,03	< 0.01	0,97
	1,34	1,28	1,35				
ZP kalınlığı (μm)	(1,07-1,83)	(1,07-1,75)	(1,12-1,67)	0,20	-	-	-

Trofoektoderm hücre sayısı değeri tüm gruplar için değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği saptandı ($p<0.01$). Ortalama TE hücre sayısı değerleri Grup 1, 2, 3 için sırasıyla 9, 11, 11 olarak hesaplanırken, gruplar arasında; Grup 2 ile 3 arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken Grup 1 ile 2, Grup 1 ile 3 arasında ($p=0.028$, $p<0.01$) anlamlı fark tespit edilmiştir (Tablo I).

Tartışma

Çalışmamızın temel bulgusu blastosist transferi ardından, implantasyon ve sonrasında devam eden klinik gebelik oranının; embriyo kalite skoru, blastosist alan ve çevresi, blastosöl alanı, çevresi ve TE hücre sayısı ile ilişkili olduğudur. Embriyo ICM alan ve çevresi, dairesellik indeksi ve ZP kalınlığının, klinik gebelik oranları üzerinde etkin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Trofoektoderm hücrelerinin IVF siklusları sonucunda temel hedef olan canlı doğumu öngörmeye en önemli parametrelerden birisi olduğu yapılan bazı çalışmalarda vurgulanmıştır. Canlı doğumu öngörmeye 1117 taze 5. gün embriyo transferi yapılan siklusta, trofoektoderm hücrelerinin, ekspansiyon derecesi ve ICM gradelemesinden daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır⁸. Aksini iddia eden çalışmalarda, blastosist morfolojisi değerlendirilirken optimal ICM varlığına TE hücrelerinin önemi olmadığı iddia edilmiştir¹⁶⁻¹⁹. Richter ve arkadaşları çalışmalarında ICM boyut ve şeklinin kantitatif ölçütlerinin implantasyon ile ilişkili olduğunu ancak TE grade ve embriyo ekspansiyonundan bağımsız olduğunu ileri sürmüşlerdir¹⁹. Kovacic ve arkadaşları da blastosistleri 1 den 8'e kadar morfolojik olarak skorladığında 1 den 8'e doğru implantasyon oranlarının azaldığını ve normal ICM' in implantasyon için en önemli kriter olduğunu raporlamıştır. Ancak özellikle kullandıkları skorlama sisteminde blastosist grade 1 ve 2'ye bakıldığında morfolojik değişiklik olarak sadece TE skorunun farklı olduğu görülmektedir²¹. Bizim çalışmamızda implantasyon için TE hücre sayısının gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunması, TE hücrelerinin implantasyonu öngörmeye önemli kriter olduğunu desteklemektedir. Çalışmamızda implantasyon ICM boyutundan bağımsız olarak değerlendirilmiştir.

Embriyonik gelişimin erken basamaklarında endometrial invazyon gerektiren ve kompleks bir süreç olan implantasyon için blastosistin sağlıklı TE hücrelerine ihtiyacı olduğu düşünülmektedir²². TE hücrelerinden sekrete edilen hCG maternal ve embriyonik etkileşimde kritik rol oynamaktadır²³. hCG'nin endometrial reseptiviteyi düzenlediği ve immün tolerans üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir²⁴. Mevcut veriler ışığında TE hücrelerinin ve sekrete ettiği hCG'nin implantasyona öncülük ettiği söylenebilir.

Blastosist Kalitesinin Değerlendirmesi

Literatürde, ART sikluslarında nihai amaç olan, blastosist embriyo transferi için uygulanan uzatılmış embriyo kültürleri sonucu transfer edilecek olan embriyonun morfolojik kriterlerinin klinik gebeliğe etkisini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma vardır. Erken klivaj, embriyo kalitesinin varsayılan bir belirteçidir. Ancak uzatılmış embriyo kültürlerinin kullanılması destekleyen, geç dönem embriyo gelişiminin daha sensitif bir marker olduğunu gösteren çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmaktadır¹. Bunun yanında günümüzde henüz canlı doğum, gebelik şansı ve implantasyon oranını belirleyici blastosist morfolojik parametreleri halen tartışmalıdır. Gardner ve Schoolcraft'ın blastosist morfolojik derecelendirmesi¹³ implantasyonu öngörmeye kullanışlı bir şematizasyon sağlasa da, alfanümerik etiketlemeye bağlı bazı limitasyonları bulunmaktadır¹⁴. Özellikle çoğul embriyo transferlerinde, transfer edilen embriyoların ortalama skorlarının hesaplanamaması ve bu nedenle de hangi embriyonun klinik sonuçlara etkisinin olduğu kalitatif olarak verilememesi önde gelen limitasyonlarından. Bu nedenle alternatif embriyo değerlendirme kriterlerine ihtiyaç duyulmuştur. BQS embriyo skorlamasının, Gardner ve Schoolcraft'ın morfolojik derecelendirme sistemine alternatif, aynı kriterlerin kantitatif bir puanlama sistemi ile hesaplanması sonucu klinik sonuçları öngörmeye etkin bir yöntem olduğu öne sürülmüştür¹⁴. Yine yapılan kısıtlı sayıda bazı çalışmalarda BQS' in embriyo hücre sayısı ile korelasyon gösterdiği ve bu nedenle hem morfolojik kriterleri karşılaması hem de hücre sayısını yansıttığı için klinikte sağlıklı bölünen embriyo değerlendirilmesinde kolaylıkla kullanılabilirliği düşünülmüştür²³. Çalışmamızın diğer bir sonucu olan blastosist kalite skoru, blastosist alan ve çevresinin, blastosöl alan ve çevresi ile birlikte, devam eden gebeliği olan hastalarda (grup 3) implantasyonu olmayan hastalardan (grup 1) anlamlı olarak yüksek olmasıdır. BQS skorlarının özellikle implante olan ve klinik gebelik ile sonuçlanan embriyo transferlerinde anlamlı olarak yüksek bulunması BQS skorlama sisteminin klinik sonuçları öngörmeye kullanılabileceğini desteklemektedir.

BQS skorlama sistemine ek olarak kantitatif farklı parametrelerin, iyi kalite embriyo seçiminde kullanılabileceği ve daha objektif kriterlerin sunulabilmesi amacı ile çalışmamızda ilave olarak ayrıca blastosist çevre/alan ve blastosöl çevre/alan değerlendirmelerinin kantitatif olarak klinik sonuçlar üzerine etkisi de değerlendirildi. Artan blastosöl alanı ve blastosist alanı ile birlikte, ICM alanından bağımsız olarak, implantasyon oranlarının arttığı gözlemlendi. Embriyoların implantasyondan sonra klinik gebelik ile sonuçlanması dikkate alındığında ise iki grubun arasında anlamlı fark olmaması bu kriterlerin özellikle sağlıklı implantasyonu öngörmeye kullanılabileceğini desteklemektedir. Yine morfolojik değerlendirmenin Gardner ve Schoolcraft'ın sisteminden farklı olarak numerik değerler kullanılmış olması, ortalama değerlerin

hesaplanması ile birlikte, çoklu embriyo transferi dahi yapılmış olsa, alfanümerik sistemin getirdiği ve hangi embriyonun implante olduğu tartışmalarını doğurmamaktadır. Ayrıca daha önceki çalışmalarda vurgulanan^{23,24}. BQS skorları ve embriyo hücre sayısının paralellik göstermesi, bu çalışmanın bulgularından olan TE hücre sayısı ve BQS skor artışının implantasyon ile paralellik gösteriyor olmasını desteklemektedir. Ancak önceki yapılan çalışmalarda hücre sayısı olarak değerlendirme yapıldığında, hem ICM hem de TE hücreleri hesaplama dahil edilmiştir.

Blastosist morfolojik değerlendirilmesi yapılırken hangi hücre gruplarının daha kritik role sahip olduğu tartışmalı ve henüz netlik kazanmamıştır. Bu çalışmada implantasyon dikkate alındığında, ICM alanının implantasyondan bağımsız olarak değerlendirilmesi ve artan TE hücre sayısı ile sağlıklı implantasyonun paralellik gösteriyor olması blastosist invazyonunda TE hücrelerinin rolünü ön plana çıkarmıştır. Yine ICM ve ZP alanından bağımsız olarak artan blastosist alanının artan implantasyon ile ilişkili olması da bu hipotezi desteklemektedir.

Sonuç olarak mevcut çalışmamızın bulguları, embriyologlar ve klinisyenler için transfer sırasında iyi kalite embriyo seçiminde kullanılabilecek alternatif, kantitatif özellikler olan blastosöl ve blastosist alanlarının kullanılmasını sunacaktır.

Kaynaklar

1. Yin H, Jiang H, He R, Wang C, Zhu J, Luan K. The effects of fertilization mode, embryo morphology at day 3, and female age on blastocyst formation and the clinical outcomes. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61:50-56.
2. Ahlstrom A, Westin C, Reisman E, Wikland M, Hardarson T. Trophoctoderm morphology: An important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2011;26:3289-3296.
3. Honnma H, Baba T, Sasaki M, Hashiba Y, Ohno H, Fukunaga T, Endo T, Saito T, Asada Y. Trophoctoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2012;98:361-367.
4. Thompson SM, Onwubalili N, Brown K, Jindal SK, McGovern PG. Blastocyst expansion score and trophoctoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): A national study. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1577-1581.
5. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993;8:2119-2127.
6. Shapiro BS, Harris DC, Richter KS. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril* 2000;73:582-586.
7. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Thomas S. Large blastocyst diameter, early blastulation, and low pre-ovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertil Steril* 2008;90:302-309.

8. Yoon HJ, Yoon SH, Son WY, Im KS, Lim JH. High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. *Fertil Steril* 2001;75:832–833.
9. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73:1155–1158.
10. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001;76:1157–1167.
11. Zaninovic N, Berrios R, Clarke RN, Bodine R, Ye Z, Veeck LL. Blastocyst expansion, inner cell mass (ICM) formation, and trophectoderm (TM) quality: is one more important for implantation? *Fertil Steril* 2001;76:S8.
12. Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, Decherney AH, Browne PE, Levens ED. Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2013.
13. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. *Toward Reprod Certain Fertil Genet Beyond 1999 Plenary Proc 11th World Congr 1999*;, p. 378–388.
14. Rehman KS, Bukulmez O, Langley M, Carr BR, Nackley AC, Doody KM, Doody KJ. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril* 2007;87:1041–1052.
15. Ahlström A., Westin C., Reisman E., Wikland M., Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Human Reproduction* 2011; 26: 3289-3296.
16. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;74:282–287.
17. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001;76:1157–1167.
18. Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2001;75:1126–1130.
19. Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2004;8:687–694.
20. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;345:1400–1408.
21. Van de Sompel D, Brady M. A systematic performance analysis of the simultaneous algebraic reconstruction technique (SART) for limited angle tomography. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008; 2729-2732.
22. Licht P, Russu V, Lehmeyer S, Wildt L. Molecular aspects of direct LH/hCG effects on human endometrium—lessons from intrauterine microdialysis in the human female in vivo. *Reprod Biol* 2001;1:10–19.
23. Koji M., Nobuyoshi H., Chisato T., Rei H., Toshihiro H., Keiji N. Blastocyst quality scoring based on morphologic grading correlates with cell number. *Fertility and Sterility* 2010; 1135-1137.
24. Matsuura K, Hayashi N, Kuroda Y, Takiue C, Hirata R, Takenami M, et al. 2009 Improved development of mouse and human embryos by tilting embryo culture system. *RBM Online* 2010; 20:358–364.