

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM  
ANABİLİM DALI**

**DONMA ÇÖZME EMBRYO TRANSFERİ İLE  
ELDE EDİLEN GEBELİKLERİN  
OBSTETRİK VE PERİNATAL SONUÇLARI**

**Dr.Zehra YILMAZ**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA  
2010**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM  
ANABİLİM DALI**

**DONMA ÇÖZME EMBRYO TRANSFERİ İLE  
ELDE EDİLEN GEBELİKLERİN  
OBSTETRİK VE PERİNATAL SONUÇLARI**

**Dr.Zehra YILMAZ**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı  
Prof.Dr.Hakan YARALI**

**ANKARA  
2010**

## **TEŞEKKÜR**

Bu çalıőmanın gerçekleőmesinde yaptıkları katkı ve desteklerinden dolayı Sayın Danıőman Hocam ve Ana Bilim Dalı Baőkanımız Prof. Dr. H.Yaralı'ya , Uzm. Dr. İ.Esinler'e, Uzm. Dr. Ö.Özyüncü'ye içtenlikle teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tüm hocalarımıza, birlikte çalıőtığım tüm asistan ve diğer görevli arkadaşlara, beni her zaman destekleyen aileme ve eőime çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Yılmaz Z.,Donma Çözme Embryo Transferi İle Elde Edilen Gebeliklerin Obstetrik ve Perinatal Sonuçları. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanlık Tezi, Ankara, 2010.** Embryo dondurma işlemi yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ile tedavide birçok avantaj sağlamaktadır. Ovulasyon indüksiyonu ve oosit toplama işlemine gerek kalmadan hastaya gebelik şansı verilmekte, çoğul gebelikleri azaltırken kümülatif gebelik oranlarını artırmaktadır. Tüm bu avantajlar embryo dondurma işlemini YÜT'nin önemli bir parçası haline getirmiştir. Bu çalışmada donma çözme embryo transfer sikluslarının ( $n=236$ ) sonuçları değerlendirildi, kontrol grubu olan taze embryo transfer sikluslarının ( $n=656$ ) sonuçları ile karşılaştırıldı. Kontrol grubu bayan yaşı, vücut kitle indeksi ve embryo transfer tarihi benzer olan hasta grubundan seçildi. Donma çözme embryo transferi ile elde edilen gebeliklerin ( $n=67$ ) obstetrik ve perinatal sonuçları, taze embryo transferi ile elde edilen gebeliklerle ( $n=295$ ) ve spontan yolla elde edilen gebeliklerin ( $n=1000$ ) obstetrik ve perinatal sonuçları ile karşılaştırıldı. Klinik gebelik oranları donma çözme embryo transfer siklusları ile taze embryo transfer sikluslarında sırasıyla %31 ve %45 olarak bulundu ( $p<0.05$ ). Çoğul gebelik oranı taze embryo transfer sikluslarında (%46.2) anlamlı olarak donma çözme embryo transfer sikluslarından daha yüksek bulundu (%29.4) ( $P<0.05$ ). Abortus ve ektopik gebelik oranları her iki grupta benzerdi. Tekiz gebeliklerde doğum haftası, doğum ağırlığı ve preterm doğum sıklığı her üç grupta benzerdi. İkiz gebeliklerde ise doğum haftası ve preterm doğum sıklığı her üç grupta benzerdi fakat doğum ağırlığı taze embryo transfer grubunda spontan gebelik grubuna göre daha yüksek bulundu ( $p<0.05$ ).İntra uterin ölüm oranları her üç grupta benzerdi. Total malformasyon oranı donma çözme embryo transfer grubunda (%7.5) taze embryo transfer (%3.3) ve spontan gebelik gruplarına (%4.6) göre daha yüksek gözlemlendi, fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuç olarak embryo dondurma işleminin gebelik sonuçlarını ve fetal gelişmeyi olumsuz etkilemediği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** embryo, donma çözme, obstetrik sonuç, malformasyon

## ABSTRACT

**Yilmaz Z., Obstetric and Perinatal Outcome of Pregnancies After Transfer of Frozen Thawed Embryos, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Obstetrics and Gynecology, Ankara, 2010.** Embryo cryopreservation offers several advantages in assisted reproductive technology (ART) programmes. It provides a chance of pregnancy without ovarian stimulation and oocyte retrieval and also increases cumulative pregnancy rate while decreasing multiple pregnancy. All these advantages make embryo cryopreservation an essential part of ART programmes. This study evaluates the outcome of frozen-thawed embryo transfer cycles ( $n=236$ ) and compare with a control group of the fresh embryo transfer cycles ( $n=656$ ). The control group is matched according to maternal age, body mass index and date of embryo transfer. The obstetric and perinatal outcome of pregnancies obtained after transfer of cryopreserved embryos ( $n=67$ ) is also compared with pregnancies obtained after fresh embryo transfer ( $n=295$ ) and with spontaneous pregnancies ( $n=1000$ ). The clinical pregnancy rates per embryo transfer in frozen-thawed and fresh embryo transfer cycles were %31 and %45 respectively ( $p<0.05$ ). Multiple pregnancy rate in fresh embryo transfer group (%46.2) was significantly higher than frozen-thawed embryo transfer group (%29.4) ( $P<0.05$ ). The miscarriage and ectopic pregnancy rates were comparable between two groups. Gestational age at delivery, birthweight and frequencies of preterm birth for singletons were comparable between three groups. For twins gestational age at delivery and frequencies of preterm birth were comparable between three groups but birthweight was significantly higher in fresh embryo transfer group than spontaneous pregnancy group ( $p<0.05$ ). Intrauterine deaths were comparable between three groups. Total malformation rate was higher in frozen-thawed embryo transfer group (%7.5) than fresh embryo transfer (%3.3) and spontaneous pregnancy group (%4.6), however difference between groups did not reach statistical significance. In conclusion embryo cryopreservation did not influence outcome of pregnancies and fetal development adversely.

**Key words:**embryo,frozen thawed, obstetric outcome, malformation

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Amaçlar.....	2
1.2 Kapsam.....	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Embryo Kriyopreservasyonunun Tarihçesi.....	6
2.2 Kriyoprotektanlar.....	7
2.3 Embryo Kriyopreservasyon Yöntemleri.....	7
2.3.1 Yavaş Kademeli Soğutma Yöntemi.....	7
2.3.2 Vitrifikasyon Yöntemi.....	8
2.4 Embryo Kriyopreservasyonu Evresi.....	10
2.4.1 Pronükleer Evrede Embryo Kriyopreservasyonu.....	10
2.4.2 Erken Bölünme Evresinde Embryo Kriyopreservasyonu.....	11
2.4.3 Blastosit Evresinde Embryo Kriyopreservasyonu.....	13
2.5 Embryo Transfer Şekli.....	16
2.6 Embryo Kriyopreservasyonunda Başarıyı Etkileyen Faktörler.....	18
2.6.1 Hasta Yaşı.....	18
2.6.2 Embriyolojik Faktörler.....	18
2.6.3 Ünitenin Deneyimi.....	19
2.6.4 Diğer Faktörler.....	19
2.7 Embryo Kriyopreservasyonunun Obstetrik ve Perinatal Sonuçları.....	20
2.8 Embryo Kriyopreservasyonu ve Etik.....	21
3. BİREYLER VE YÖNTEMLER.....	22

4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	40
7. KAYNAKLAR.....	41

## SİMGELER ve KISALTMALAR

YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri
IVF	İnvitro Fertilizasyon
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu
ET	Embryo Transferi
GIFT	Gamet İnter Fallopiyan Transfer
ZIFT	Zigot İnter Fallopiyan Transfer
TET	Tubal Embryo Transfer
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
VKI	Vücut Kitle İndeksi
OHSS	Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PROH	1,2 Propenediol
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
USG	Ultrasonografi
PPROM	Preterm Prematür Membran Ruptürü
GHT	Gestasyonel Hipertansiyon
GDM	Gestasyonel Diabetes Mellitus
HELLP	Hemoliz, Karaciğer enzimlerinde yükselme, Trombositopeni Sendromu



## ŞEKİLLER

### Sayfa No:

Şekil 1	Sitoplazması homojen,pronukleusları belirgin zigot görüntüsü.....	10
Şekil 2	(a) 2.günde 4 hücreli normal bir embryo görüntüsü.....	11
	(b) 3.günde 8 hücreli normal bir embryo görüntüsü.....	11
Şekil 3	(a) 3.günde fragmantasyon gözlenmeyen bir embryo görüntüsü.....	12
	(b) 3.günde yüksek oranda fragmantasyon gösteren bir embryo görüntüsü.....	12
Şekil 4	(a) (b) 3.günde kriyopreservasyon öncesi ve sonrası 8 hücreli 4 embryo görüntüsü.....	12
Şekil 5	(a) (b) Homojen ve kümelenmiş iç hücre kitlesi ve belirgin blastosit kavitesine sahip blastositin kriyopreservasyon öncesi ve sonrası görüntüsü.....	14
Şekil 6	Ünitemizde uygulanan donma çözme embryo transfer sikluslarının toplam siklusa oranı.....	26

## TABLÖLAR

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1 Çalışmaya Katılan Hastaların Demografik Özellikleri.....	27
Tablo 2 Donma Çözme ve Taze Embryo Transfer Sikluslarının Embryolojik Özellikleri.....	27
Tablo 3 Donma Çözme ve Taze Embryo Transfer Sikluslarının Gebelik Sonuçları.....	28
Tablo 4 Gebelik Komplikasyonları.....	29
Tablo 5 Ortalama Doğum Haftaları ve Doğum Ağırlıkları.....	30
Tablo 6 Gebeliklerin Neonatal Sonuçları.....	30
Tablo 7 Majör ve Minör Malformasyonlar.....	31

## 1.GİRİŞ

1978 yılında ilk Invitro fertilizasyon ile (IVF) bebeğinin doğumundan sonra Yardımcı Üreme Tekniklerinde (YÜT) birçok gelişme meydana gelmiş, ovulasyon indüksiyon rejimlerindeki değişiklikler ile birlikte embryo kültür ortamındaki iyileşmeler ile transfer için iyi kalitede birden çok embryo oluşumuna neden olmuştur. İki den fazla embryo transferi gebelik oranını artırmakla birlikte çoğul gebelik oranlarını da artırmaktadır. Çoğul gebeliği ve çoğul gebeliğin getirdiği antenatal ve postnatal komplikasyonları önlemek amaçlı birçok IVF merkezinde ikiden fazla embryo transferi yapılması önerilmemektedir. Embryo kriyopreservasyonu kullanılmayan embryoların dondurulup saklanması sağlayarak hastaya tek IVF siklusu ile birden fazla embryo transferi şansı sağlayarak IVF başarısını artıran bir yöntemdir [1].

İlk olarak 1983 yılında embryo kriyopreservasyonu sonucu insanlarda gebelik elde edilmesiyle birlikte kriyobiolojideki gelişmeler hızla devam etmiştir. Üreme hücreleri ve dokularının başarılı bir şekilde dondurulup saklanması YÜT gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır.

1998 yılında embryo kriyopreservasyonunun Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanması ile birlikte ülkemizde de birçok infertilite kliniğinde embryo dondurma işlemi başlamıştır. Bizim merkezimizde ilk olarak 2002 yılında uygulama başlamış ve artarak devam etmiştir.

## 1.1.Amaçlar

- 2002-2008 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı infertilite ünitesinde uygulanan donma çözme embryo transferi sonrasında elde edilen gebelik oranlarını belirlemek ve taze embryo transferi sonrasında elde edilen gebelik oranları ile karşılaştırmak.
- Donma çözme embryo transferi ile elde edilen gebeliklerin obstetrik sonuçlarını belirlemek ve taze embryo transferi ve spontan yolla elde edilen gebeliklerin obstetrik sonuçları ile karşılaştırmak.
- Donma çözme embryo transferi ile elde edilen gebeliklerden doğan bebeklerin perinatal sonuçlarını belirlemek ve taze embryo transferi sonrasında ve spontan yolla elde edilen gebeliklerden doğan bebeklerin perinatal sonuçları ile karşılaştırmak.
- Donma çözme embryo transferi ile elde edilen gebeliklerden doğan bebeklerdeki major ve minör konjenital malformasyon oranlarını belirlemek ve taze embryo transferi sonrasında ve spontan yolla elde edilen gebeliklerden doğan bebekler ile karşılaştırmak.

## 1.2.Kapsam

Kasım 2002-Aralık 2008 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı infertilite ünitesinde donma çözme embryo transfer siklusu yapılan hastalar çalışmaya alınmıştır. 1.Kontrol grubu olarak aynı tarihlerde benzer yaş ve BMI olan taze embryo transfer siklusu yapılan hastaların ilk siklusları, 2.Kontrol grubu olarak da aynı tarihlerde benzer yaşta olan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Doğumhane bölümünde spontan gebelik sonrasında doğum yapan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

## 2.GENEL BİLGİLER

İnfertilite çiftlerin bir yıllık süre içerisinde çocuk istemeleri ve korunma yöntemi kullanmamalarına rağmen gebeliğin olmaması olarak tanımlanmaktadır. Çiftlerin yaklaşık %85-90'ı bir yıl içerisinde kendiliğinden gebe kalırlar. İnfertilite çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkilemekte ve önemli bir klinik problem olarak ortaya çıkmaktadır [2].

Son 30 yılda infertilite insidansında önemli değişiklik olmamakla birlikte infertilite tedavisinde çok önemli ilerlemeler meydana gelmiştir. Bunlardan en önemlisi in vitro fertilizasyon (IVF) ve diğer yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) kullanılabilir hale gelmesidir. IVF ilk olarak tedavi edilemeyen tubal infertilite hastaları için kullanılırken, 1980'li yıllarda diğer tedavilere yanıt vermeyen tüm infertilite hastaları için kullanılmaya başlamıştır. IVF'e paralel olarak Gamet Intrafallopian Transfer (GIFT), Zigot Intrafallopian Transfer (ZIFT) ve Tubal Embryo Transfer (TET) geliştirilmiştir. Geçmişte bazı infertil hastalar için avantajlı olabilen bu invaziv teknikler günümüzde artık nadir durumlar dışında kullanılmamaktadır [3]. YÜT'deki gelişmeler bunlarla sınırlı kalmamış, baş döndürücü şekilde devam etmiştir. Günümüzde Intrasiitoplazmik Sperm İnjesiyon (ICSI), Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE), Preimplantasyon Genetik Tanı, oosit ve embryoların kriyopreservasyonu YÜT içinde sayılmakta ve birçok infertilite hastasına tedavi seçeneği sunmaktadır [3].

Günümüzde IVF uygulamalarında başarılı ovulasyon indüksiyon protokolleri sonucunda fazla sayıda yumurta, buna bağlı olarak aralarından seçim yapılabilecek fazla sayıda embryo elde edilebilmektedir. Transfer edilmeyen embryoların daha sonra kullanılmak üzere dondurulup saklanması sağlayan embryo kriyopreservasyonu IVF tedavisinin çok önemli bir parçasıdır.

Günümüzde gelişmelerle birlikte YÜT ile yüksek gebelik oranları sağlanmakta, fakat çoğul gebelik oranları da artmaktadır [4]. Birçok ülkede embryo transfer sayısına kısıtlama getirilmiş olsa bile IVF ile ilgili gebeliklerin %20-30'unu çoğul gebelikler oluşturmakta, IVF sonrası doğan bebeklerin de yaklaşık yarısı çoğul gebeliklerden doğmaktadır [5]. Çoğul gebelikler ise beraberinde maternal ve neonatal komplikasyonları getirmekte, fetal morbidite ve yüksek maliyete neden olmaktadır [4]. Çoğul gebeliği ve çoğul gebeliğin getirdiği antenatal ve postnatal komplikasyonları önlemek amaçlı birçok IVF merkezinde ikiden fazla embryo transferi yapılması önerilmemektedir. Embryo kriyopreservasyonu ile kullanılmayan embryoların saklanması gebelik olmaması durumunda tekrar kullanılması sağlanır.

Embryo kriyopreservasyonunun getirdiği en önemli avantaj dondurulan embryoların transfer edileceği sıklıta hasta hazırlamasının kolay olmasıdır. Ovulasyon indüksiyon ajanlarının kullanımına, oosit toplamak için cerrahi girişime gerek kalmadan hastaya kendi siklusunda embryo transfer olanağı sağlanmakta ve benzer gebelik oranları elde edilebilmektedir. Donma çözme embryo transfer siklusunun maliyeti taze embryo transfer siklusunun maliyetinin beşte biri kadardır [6].

Günümüzde YÜT'nin amacının tek, sağlıklı bebeğin doğumu olması gerektiği konusunda fikir birliği vardır [4]. Bunun sonucu olarak uygun olan hastalara elektif tek embryo transfer stratejisi IVF/ICSI pratiğinde önem kazanmaktadır [7]. Elektif tek embryo transferinin önem kazanmasıyla embryo kriyopreservasyonunun günümüzde önemi daha da artmıştır. Elektif tek embryo transferi ve efektif kriyopreservasyon programı ile çoğul gebelik oranı azalmakta, oosit toplama başına kümülatif gebelik oranı artmaktadır. [7]

Embryo kriyopreservasyonun kullanım endikasyonlarından bir tanesi de taze embryo transferinin riskli olduğu durumlardır. Ovaryan hiperstimulasyon sendromu IVF komplikasyonlarından bir tanesidir ve gebelik olması halinde şiddetlenir, aynı zamanda gebelik durumunda tedavisi zorlaşır. Bu hasta grubunda embryoların dondurulup saklanması ve daha sonraki siklusta transfer edilmesi de bir seçenek olabilir [8]. OHSS için risk faktörü taşıyan hastalarda embryoların dondurulup transferin bir veya iki siklus sonra yapılmasının OHSS gelişimini engellediği [9] fakat gebelik oranlarını değiştirmediği çalışmalarında gösterilmiştir [6].

Sonuç olarak hastaya birden fazla embryo transfer şansı verilmesini sağlayan embryo dondurma işlemi YÜT'lerinde başarı şansını artıran bir yöntem olarak kabul edilmektedir, getirdiği avantajlar ve kriyobiolojideki gelişmeler ile birlikte embryo kriyopreservasyonu modern infertilite tedavisinin bir parçası olmuştur..

## **2.1.Embryo Kriyopreservasyonunun Tarihçesi**

Kriyopreservasyon ilk kez İtalya'da 1776 yılında hayvan spermlerinde yavaş dondurma yöntemiyle gerçekleştirilmiş, bu yöntemle dondurulan spermlerde çözme sonrası hareketlilik tespit edildiği 1938 yılında yayınlanmıştır. İlk orjinal krioprotektan solüsyonu 1949 yılında Christopher Polge tarafından bulunmuş,1972 yılında Whittingham 1.0 mol/lit dimetilsulfoksit (DMSO) içeren solusyonda fare embryolarını dondurmaya başarmıştır [10].

İlk olarak 1983'de Trounson ve Mohr kriyopreservasyon ve çözme işlemi takiben 8 hücreli embryo transferi ile elde edilen gebelik bildirmişlerdir. Embryo 4 ay sıvı nitrojende beklemiştir [11]. İlk canlı doğum ise 1984 yılında Zeilmaker ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [12]. 1985 yılında Lassalle ve arkadaşları kriyoprotektan olarak 1.5 mol/lit 1,2 propanediol kullanarak 2-3.gün insan embryolarını yavaş kademeli soğutma yöntemi ile dondurmışlardır, günümüze kadar bu metod erken bölünme evre insan embryolarının dondurulmasında sıklıkla kullanılmıştır [13].

İnsanlarda gebeliklerin elde edilmesi ile birlikte insan kriyobiyolojisinde kullanılan teknikler hızla gelişmeye devam etmiş, 1986 yılında IVF sonrası elde edilen olgun oositlerin dondurulup çözülmesi ile elde edilen ilk gebelik bildirilmiştir. Bunu 1996 yılında matür, 1999 yılında immatür oositlerin kriyopreservasyonu sonrası mikroenjeksiyon uygulamasıyla gerçekleşen gebelikler izlemiştir. İlerleyen yıllarda ovaryan doku bankası ve embryoların birden fazla dondurulup çözülmesi işlemleri gerçekleşmiştir [14].



## **2.2.Kriyoprotektanlar**

Kriyoprotektanlar hücreleri donma ve çözme esnasında soğuk şok hasarından koruyan küçük moleküllerdir.Hücreye penetrasyon kapasitelerine göre intrasellüler ve ekstrasellüler olarak ikiye ayrılır. Günümüzde birçok merkezde embryo kriyopreservasyonunda intrasellüler kriyoprotektan olarak 1,2 propenediol (PROH) veya dimethylsulfoxide (DMSO), blastosit kriyopreservasyonu için glyserol kullanılmaktadır.Ekstrasellüler kriyoprotektanlar ise ekstrasellüler osmotik basıncı artırarak hücrel dehidratasyona yardımcı olur ve osmotik şoku azaltır. Sukroz ekstrasellüler kriyoprotektanlar içinde en sık kullanılanıdır.

## **2.3.Embryo Kriyopreservasyon yöntemleri**

Günümüzde embryolar yavaş kademeli soğutma yöntemi ve vitrifikasyon yöntemi olmak üzere iki yöntemle dondurulabilmektedir.

### **2.3.1.Yavaş Kademeli Soğutma Yöntemi:**

1983 yılında ilk olarak 8 hücreli embryonun yavaş kademeli soğutma yöntemi ve DMSO kullanımı ile başarılı bir şekilde dondurulması ve gebelik elde edilmesinden sonra yavaş kademeli soğutma yöntemi bir çok merkezde tercih edilen yöntem olmuştur.Günümüze gelene kadar bazı değişiklikler eklense de bir çok IVF merkezinde yavaş kademeli soğutma yöntemi standart yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir.Bu yöntemde yavaş ve kontrollü dondurma işlemi uygulanmaktadır [15]. Bu yöntemde düşük konsantrasyonda kriyoprotektan içeren solusyona konulan hücreler su kaybederken,kriyoprotektanlar hücre içerisine difüzyonla osmotik denge kuruluna kadar girerler.İntrasellüler su ile yer değiştiren kriyoprotektanlar hücrenin donma noktasını düşürürler.Bu şekilde solusyonlar -5 ile -15 C arasında donmadan kalabilir.Başarılı bir dondurma protokolünde aşırı soğumanın engellenmesi gereklidir [16].

Aşırı soğumayı önlemek için kontrollü bir şekilde ekstrasellüler ortama buz kristalleri yerleştirme işlemine seeding adı verilir. Seeding otomatik veya manuel yolla yapılabilir. Seeding sonrası hücreler su kaybetmeye devam ederler [16]. Hücreden su kaybı ve ekstrasellüler buz kristalleri oluşumunun dengeli olması gerekmektedir. Çok fazla hücresel su kaybı intrasellüler kriyoprotektan konsantrasyonunu toksik seviyeye çıkartabilir [16]. Düşük konsantrasyonda kriyoprotektan kullanılması, intra ve ekstrasellüler ortamdan dengeli bir şekilde sıvı geçişinin olması yavaş kademeli soğutma yöntemini güvenilir kılmaktadır. Fakat düşük konsantrasyondaki kriyoprotektan ajanların hücre içi kristal oluşumunu engellemede yetersiz kalışı, bu yöntemin yavaş oluşu ve pahalı makinelere ihtiyaç duyulması zaman içerisinde farklı protokoller geliştirilmesine neden olmuştur [17].

### **2.3.2. Vitrifikasyon Yöntemi**

Vitrifikasyon yöntemi ilk olarak 1985 yılında Rall ve Fahy tarafından embryo kriyopreservasyonunda yavaş kademeli soğutma yöntemine alternatif olarak yayımlandıktan sonra hayvan embryolarında bu yöntemle ilgili çalışmalar yapılmıştır [18]. 1998 yılında Mukaida ve arkadaşları 4-8 hücreli insan embryolarının vitrifikasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde dondurmaya başarmışlardır [19]. Vitrifikasyon yönteminde yavaş kademeli soğutma yönteminden farklı olarak yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan ajanlar kullanılmakta (4-8 mol/l), seeding ve yavaş soğutma işlemi olmadan embryolar çok hızlı bir şekilde (15.000-30.000°C/dk) soğutulmaktadır [20]. İntrasellüler ve ekstrasellüler buz kristalleri oluşumu olmamaktadır. Vitrifikasyon tekniğinin avantajı yavaş soğutma yöntemine göre basit ve hızlı olması, pahalı otomatik freezerlara ihtiyaç olmaması, buz kristalizasyonun lethal etkisinin olmamasıdır [15].

2008 yılında yayınlanan ve 1984-2006 yılları arasında yapılan vitrifikasyon ve yavaş kademeli soğutma yöntemlerinin karşılaştırıldığı randomize kontrollü çalışmaların meta analizinde hem erken bölünme evre embryolarında hem de blastositlerde çözme sonrası canlılık oranı vitrifikasyon yönteminde anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur [21].

2008 yılında Balaban ve arkadaşlarının 3.gün embryolarında yaptıkları çalışmada çözme sonrası canlılık oranı, blastulasyon oranı vitrifikasyon yönteminde anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur [22]. Bu çalışmadan farklı olarak ise Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 3.gün embryolarında iki yöntem arasında çözme sonrası canlılık ve klinik gebelik açısından anlamlı fark bulunamamıştır [23].

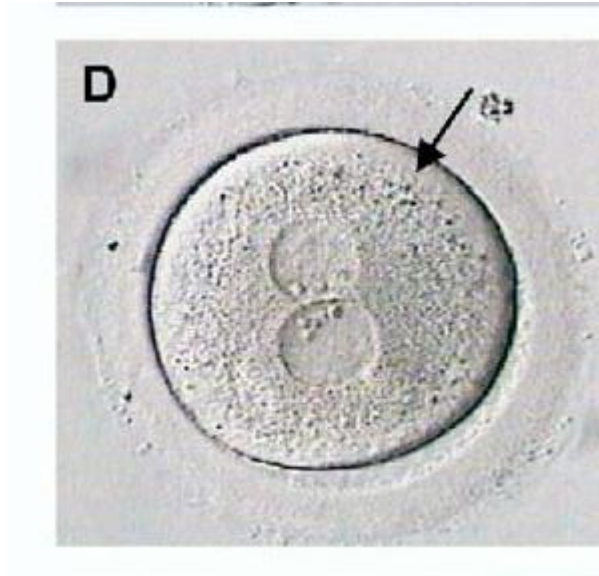
Sonuç olarak bugüne kadar yapılan çalışmalarda vitrifikasyon yönteminde çözme sonrası embryo canlılık oranları anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunurken, klinik gebelik ve canlı doğum oranları ile ilgili az sayıda çalışma bulunmakta, bu çalışmalarda da belirgin bir fark bulunmamaktadır. Aynı zamanda vitrifikasyon yönteminde kullanılan yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanların potansiyel sitotoksik etkisi, bu embryolardan doğan çocuklarda konjenital malformasyon riski ile ilgili bilgiler günümüzde sınırlıdır. Bu konu ile ilgili gelecekte çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [24].

## 2.4.Embryo Kriyopreservasyonu Evresi

Embryolar 1.günden (Pronükleer evre) ,5-6.güne kadar (Blastosit evre) başarıyla dondurulabilir.

### 2.4.1.Pronükleer Evrede Embryo Kriyopreservasyonu (1.gün)

Pronukleus aşamasındaki oositler genellikle PROH veya sükröz kullanılarak dondurulur. En yüksek canlılık oranları zigotların inseminasyonundan 20-22 saat sonra dondurulduğunda elde edilmektedir . Zigot aşamasında dondurulan hücrelerin zona pellusidalarının intakt, sitoplazmalarının homojen, pronukleuslarının belirgin ve net olarak gözlenmesi gerekir [16]. Literatürde pronükleer evrede dondurulan embryoların çözme sonrası canlılık oranı %75-80 arasında bildirilmektedir [25].



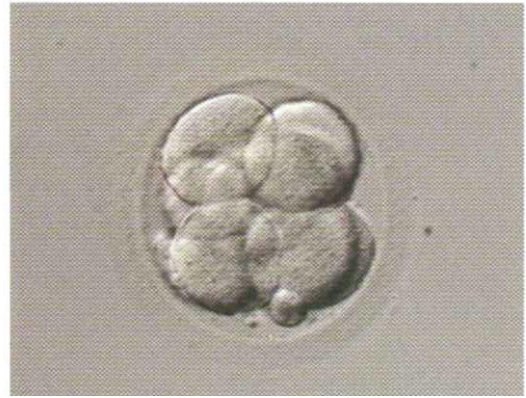
**Şekil 1:** Sitoplazması homojen,pronukleusları belirgin zigot görüntüsü

### 2.4.2. Erken Bölünme Evresinde Embryo Kriyopreservasyonu (2.-3.gün)

IVF merkezlerinin çoğunda embryo kriyopreservasyonu bu aşamada yapılır. Erken bölünme aşamasında embryolar DMSO veya PROH kullanılarak dondurulabilir. Erken bölünme dönemi embryolarında post inseminasyondan sonra ilk ayrılmanın 25-27. saatlerde olması, 2.günde 4, 3. günde 6-8 hücreli blastomer olması, total hacmin %10'undan az veya hiç sitoplazmik fragmentasyonun olmaması ve multinükleasyonun olmaması embryonun implantasyon potansiyelinin yüksek olduğunu gösteren morfolojik kriterlerdir [15].

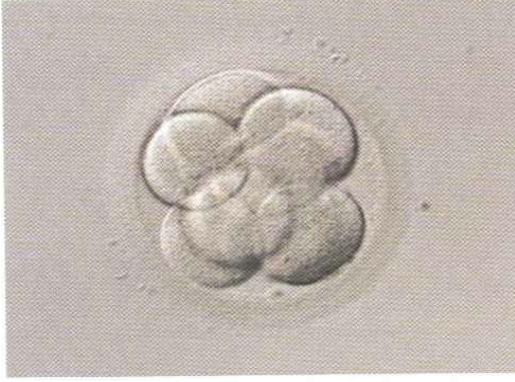


(a)



(b)

**Şekil 2:** (a) 2. günde 4 hücreli normal bir embryo görüntüsü (b) 3.günde 8 hücreli normal bir embryo görüntüsü



(a)



(b)

**Şekil 3:** (a) 3. günde fragmantasyon gözlenmeyen bir embryo görüntüsü (b) 3.günde yüksek oranda fragmantasyon gösteren bir embryo görüntüsü



(a)



(b)

**Şekil 4:** (a) 3. günde kriyopreservasyon öncesi 8 hücreli 4 embryo görüntüsü (b) Şekil a'daki embryoların kriyopreservasyon ve çözme işlemi sonrası görüntüsü,çözme işlemi sonrası blastomerler intakt görünümündedir.

### **2.4.3.Blastosit Evresinde Embryo Kriyopreservasyonu (5.-6.gün)**

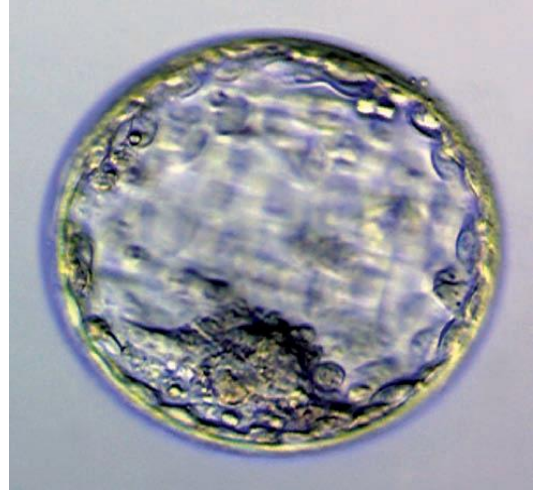
Blastosit aşamasındaki embryo erken bölünme aşamasındaki embryoya göre daha fazla sayıda hücre içermesi nedeniyle çözme sonrasında bazı blastomerlerin canlılığını yitirmesi durumunda bile genel canlılığını yüksek derecede koruyabildiği savunulmaktadır. Belirgin blastosit kavitesi,homojen ve kümelenmiş iç hücre kitlesi ve düzenli bir trofoektodermal hücre tabakasına sahip olan embryolar blastosit döneminde dondurulur [16].

İlk olarak blastosit dondurma işlemi Cohen tarafından gerçekleştirilmiş,bu işlemde kriyoprotektan olarak %10'luk gliserol kullanılmıştır.%52 canlılık oranı,transfer edilen blastosit başına %35 implantasyon oranı elde edilmiştir [26]. Bunu izleyen yıllarda yetersiz kültür ortamlarında blastosite gidiş oranı %25'in üzerine çıkmadığı için yöntemin kullanımına bir süre ara verilmiştir. Zamanla blastosit gelişiminde vero-cell ko-kültürlerinin kullanımı ile blastosite gidiş oranı %50-60'lara çıkmış [27] , %9'luk gliserol ve 0.2Mlık sükroz solusyonu ile iki aşamalı kriyopreservasyon kullanılarak %80 üzerinde canlılık,transfer edilen blastosit başına %10 canlı doğum oranı bildirilmiştir [28]. Günümüzde ko-kültürlerin yanı sıra blastosit kültürü için geliştirilmiş ardışık kültür sistemleri ile %50-60 arasında blastosite gidiş oranları elde etmek mümkündür.Halen kullanılmakta olan kültür ortamlarında embryoların yaklaşık %60'ının blastosit aşamasına ulaşabilmesi ve dondurulacak embryo sayısının azalması nedeni ile birçok IVF merkezinde blastosit kriyopreservasyonu kullanılmamaktadır [16].

İlk kez Fahry tarafından blastositlerin vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmasından sonra günümüzde bu yöntemle daha yüksek canlılık ve gebelik oranları bildirilmiştir. Vanderzwalmen 2002 yılındaki çalışmasında büyük blastosel kavitesinin dondurma öncesi redüksiyonu ile çözme sonrasında canlılık oranlarını %50'den %70'e,gebelik oranlarını %5'den %20'e yükseltmiştir [29]. Literatürde blastosit evresinde dondurulan embryoların çözme sonrası canlılık oranı %90 civarındadır [34].



(a)



(b)

**Şekil 5:** (a) Homojen ve kümelenmiş iç hücre kitlesi ve belirgin blastosit kavitesine sahip blastosit görüntüsü (b) Şekil a'daki blastositin kriyopreservasyon ve çözme işlemi sonrası görüntüsü, iç hücre kitlesi canlı görünmektedir.

Son yıllarda yapılan karşılaştırmalı çalışmalar incelendiğinde, Salumets ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada embryolar zigot evresinde, 2. gün veya 3. günde dondurulmuş ve sonuçları karşılaştırılmış, çözme sonrası en yüksek canlılık oranı zigot evresinde, en düşük canlılık oranı 3. gün embryolarında elde edilmiştir. Fakat klinik gebelik ve implantasyon oranlarında belirgin fark bulunamamıştır [31]. Karşılaştırmalı yapılan diğer bir çalışmada ise zigot, bölünme ve blastosit aşamasında dondurulan embryolarda benzer canlılık oranları bildirilmiş, fakat blastosit transferi ile daha yüksek gebelik ve implantasyon oranları bildirilmiştir [30]. Daha yeni bir çalışma olan Anderson ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı bir çalışmada 3. Gün ve 5. gün dondurulan embryoların sonuçları araştırılmış, 5. gün embryo transferinde daha yüksek canlılık, devam eden gebelik ve implantasyon oranları elde edilmiştir [32].



Buna karşılık Konc ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 2.,3. ya da 5. gün dondurulan embryolarda benzer çözme sonrası canlılık ve klinik gebelik oranları elde edilirken, blastosit evresinde dondurulan embryolarda anlamlı olarak daha yüksek implantasyon oranları elde edilmiştir [33]. En son 2009 yılında Moragianni ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada pronuklear, erken bölünme ve blastosit evresinde dondurulan embryolar karşılaştırıldığında erken bölünme evresinde dondurulan embryolarda anlamlı olarak çözme sonrası canlılık oranı zigot ve blastosit evresine göre daha düşük bulunurken, implantasyon ve klinik gebelik oranları açısından her üç grupta anlamlı bir fark bulunamamıştır [34].

Sonuç olarak günümüzde embryo kriyopreservasyonun hangi gelişim evresinde yapılması gerektiği tartışmalı olup, en yüksek canlılık ve gebelik oranlarının elde edilebileceği tek bir gelişim aşaması ve en uygun kriyopreservasyon protokolünün belirlenmesi için randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 2.5.Embryo Transfer Şekli

Çözülen embryolar hastanın doğal siklusunda veya endometriumun östrojen ve progesteron kullanılarak hazırlandığı sikluslarda transfer edilebilir. Östrojen hastanın siklusunun birinci gününde başlanabileceği gibi GnRH analogları kullanılarak over fonksiyonu tamamen baskılandıktan sonra da başlanabilir [1]

Doğal siklusta transferin avantajı herhangi bir ilaç kullanılmamasıdır, birçok hasta bu yüzden doğal siklusu tercih etmektedir. Bu yaklaşım ancak menstruasyon düzensizliği olmayan, ovulasyonun kanıtlandığı hastalarda tercih edilebilir. Fakat menstruasyon düzensizliğinin olmaması her zaman ovulasyonun olduğu anlamına gelmez. Eğer transfer hastanın doğal siklusunda yapılacaksa ovulasyon zamanının seri ultrason ile foliküler gelişim ve ovulasyon takibi, serum veya idrar LH hormon ölçümü ile belirlenmesi gerekebilir [35]. Östrojen ve progesteron ile endometriumunun hazırlandığı siklusun avantajı transfer zamanının kontrolünün daha iyi olmasıdır, embryo çözme ve transfer işleminin hem hasta hem de klinik için en uygun zamanda yapılmasını sağlar. Fakat özellikle GnRH analogları kullanıldığı zaman pahalı olmaktadır [1].

Her iki siklusu karşılaştıran randomize prospektif çalışma bulunmamakla birlikte 2006'da yapılan retrospektif bir çalışmada öncesinde GnRH analogu kullanılan östrojen progesteron ile endometriumun hazırlandığı siklusta transfer ile hastanın doğal siklusunda transfer karşılaştırılmış, her iki yaklaşım arasında implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum açısından fark bulunamamıştır [36]. Farklı olarak 2007'de yapılan başka bir retrospektif çalışmada ise doğal siklusta transfer ile GnRH analog kullanılmadan östrojen kullanılan siklus karşılaştırılmış, doğal siklusta daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir. Estrojen ile sağlanan yüksek serum östrodiol seviyesinin embryonun implantasyonunu etkileyebileceği belirtilmiştir [37].

Günümüzde donma çözme embryo transferlerinde en çok kullanılan siklus modaliteleri doğal siklus veya endometriyumun suni olarak GnRH analogları kullanarak veya kullanmayarak östrojen ve progesteron ile hazırlandığı suni sikluslardır. Şu an için kesin veri olmamakla birlikte menstruasyon düzensizliği olmayan hastalarda her iki yaklaşım da uygulanabilir. Fakat eğer östrojen progesteron preparatları kullanılacaksa beraberinde GnRH analoglarının da kullanılmasının faydalı olabileceğini belirten yayınlar vardır. Ovulasyon indüksiyon ajanlarının kullanımını destekleyen herhangi bir çalışma yoktur. Pratikte çok nadir kullanılan bu ajanlar kullanılacaksa klomifan sitratın anti östrojenik etkisinden dolayı kullanılmaması önerilmektedir [37].

Sonuç olarak günümüzde hangi siklus rejiminin diğerine üstün olduğunu söylemek mümkün değildir, her üç siklusu karşılaştıran randomize kontrollü çalışmaya gerek duyulmaktadır.

## **2.6.Embryo Kriyopreservasyonunda Başarıyı Etkileyen Faktörler**

1989 yılında Fugger ve arkadaşlarının ABD'deki 25 IVF merkezinin embryo kriyopreservasyon sonuçlarını yayınladıkları çalışmada transfer başına klinik gebelik oranı %13.4 olarak bildirilmiştir [38]. 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda ise donma çözme embryo transfer sonrası %25-30 klinik gebelik, %15-20 canlı doğum oranları bildirilmektedir. 1990'lı yıllardan günümüze olan süreçte laboratuvar prosedürlerindeki olumlu gelişmeler sonucunda donma çözme embryo transfer sonrası daha yüksek klinik gebelik ve implantasyon oranları elde edilebilmektedir. Günümüzde donma çözme embryo transferinde transfer başına yaklaşık %37 klinik gebelik, %29 canlı doğum bildirilmektedir [39].

Genel olarak taze embryo siklus başarısını etkileyen klinik faktörlerin donma çözme embryo transfer siklusunun başarısını da etkileyeceği söylenebilir. Donma çözme embryo transfer siklusunun başarısını etkileyen faktörler şunlardır..

**2.6.1.Hasta Yaşı:** Taze siklusa benzer şekilde ilerleyen bayan yaşı donma çözme embryo transfer başarısını etkileyen en önemli faktördür. Toner ve arkadaşları yaş ve bazal FSH değeri ile embryo kriyopreservasyonu başarısı arasında ilişki göstermişlerdir [40].

**2.6.2.Embriyolojik Faktörler:** Taze embryo transfer sikluslarında morfolojik olarak iyi kalitedeki embryo transferinin kötü olana göre gebelik oranının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Aynı şekilde embryo kalitesinin donma çözme embryo transfer siklus başarısını da etkilediği çalışmalarda gösterilmiştir [41]. Embryonun dondurulmadan önceki blastomer sayısı ve morfolojik görünümü, çözme işlemi sonrası blastomer kaybı transfer sonrası gebelik oranlarını etkilemektedir [42].

Başarılı bir dondurma yöntemi sonucunda embryoyu meydana getiren blastomerlerin en az %50'sinin canlılıklarını koruyup gelişimlerini devam ettirmeleri gereklidir. Her ne kadar blastomerlerin %50'si yaşayan bir embryo canlı kabul edilse de yaşayan blastomer sayısı arttıkça embryonun implantasyon potansiyeli artmaktadır. Literatürde çözme sonrası blastomerlerin tümü yaşayan embryolarda daha yüksek gebelik ve implantasyon oranları bildirilmektedir [43].

Transfer edilen embryo sayısı da gebelik oranını etkileyen önemli faktörlerden bir tanesidir. Randomize kontrollü çalışmalarda hem taze hem de donma çözme embryo transfer sikluslarında iki embryo transferinde tek embryo transferine göre daha yüksek gebelik ve canlı doğum oranı bildirilmiştir [44-45].

Embryo dondurma süresi ile ilgili yapılan çalışmalarda ise dondurulan embryoların bekletilme süresinin embryo canlılık ve implantasyon oranını [46], klinik gebelik, spontan düşük veya canlı doğum oranlarını etkilemediği gösterilmiştir [47]

**2.6.3. Ünitinin deneyimi:** Yardımcı üreme tekniklerinin başarısında ünitinin deneyimi ve laboratuvar standartları önemlidir. IVF/ICSI ünitelerinde uygun olan hastalara embryo kriyopreservasyon seçeneği sunulmalıdır. Deneyimli ve laboratuvar standartları iyi bir klinikte beş hastanın birinde kriyopreservasyon için iyi kalitede embryo elde edilmelidir. Donma çözme işlemi sonrasında ortalama %75-80 embryo canlılık oranı hedeflenmelidir.

**2.6.4. Diğer faktörler:** Over stimülasyon protokolünün klinik sonuç üzerinde etkisinin olmadığı gösterilmekle birlikte [48], ICSI'nin IVF'e göre üstünlüğü, endometriumun transfer öncesi hazırlanması ve transfer zamanı ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur. Oehninger ve arkadaşları donma çözme embryo sikluslarında ICSI ile IVF arasında embryo kaybı ve gebelik sonuçları arasında fark gösterememişken [48], Abbeel ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ICSI grubunda çözme sonrası embryo kaybı ve gebelik kaybı daha yüksek bulunmuştur [49].

Wang ve arkadaşlarının 2001 yılında yayınladığı ve 3570 donma çözme embryo transfer siklusunun incelendiği retrospektif çalışmada hastanın yaşı, infertilite etiyojisi ve daha önce yapılan taze embryo transfer sonucunun donma çözme embryo transfer başarısını etkileyen faktörler olduğu gösterilmiştir [50]. El-Toukhy ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışmada ise donma çözme embryo transfer siklusuna giden 459 hasta iki gruba ayrılmış, taze siklus sonucunda gebelik elde edilen hasta grubunda, taze siklusta gebelik elde edilmeyen hasta grubuna göre daha yüksek implantasyon ve klinik gebelik oranları elde edilmiştir [51]

## **2.7.Embryo kriyopreservasyonunun obstetrik ve perinatal sonuçları**

Embryo kriyopreservasyonun güvenilirliği her zaman önemli araştırma konusu olmuştur.Embryo kriyopreservasyonu ve çözme işlemleri önemli hücresel değişikliklere neden olmaktadır. Fakat bu zamana kadar yapılan çalışmalarda bu hücresel değişikliklerin embryolar üzerine olumsuz etkisi gösterilmemiştir. Hayvan embryolarında yapılan çalışmalarda embryo dondurma işleminin mutojenik olmadığı gösterilmiş, dondurulmuş embryolardan doğan yavrularda herhangi bir anormallik saptanmamıştır [52]. 1995 yılında Fransa'da donmuş embryo transferi sonucu meydana gelen farelerde morfolojik ve davranışsal bazı farklılıklar saptanmıştır [53]. Bu çalışmada embryo kriyopreservasyonun ölümcül olmasa da bazı yan etkilerinin olabileceği,embryo dondurma ve çözme işleminin sonuçlarının geç zamanda ortaya çıkabileceği sorusunu akla getirmiştir.

Literatürde yapılan populasyon bazlı çalışmalarda artmış risk görünmemekle birlikte [69-73], Belva ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmada embryo kriyopreservasyonu yapılan ICSI gebeliklerinde 2 kat artmış konjenital malformasyon bildirmişlerdir [62]. Günümüzde embryo kriyopreservasyonunun IVF programının bir parçası olmasına rağmen bu gebeliklerden doğan çocukların perinatal sonuçları ile ilgili sınırlı çalışma vardır, her ne kadar bu çalışmalarda artmış risk görünmemekle birlikte gelecekte özellikle uzun dönem sonuçları ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 2.8.Embryo Kriyopreservasyonu ve Etik

Embryo kriyopreservasyonu günümüzde YÜT'nin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Gelecekte daha başarılı over stimülasyon protokollerinin kullanımı, transfer edilen embryo sayısının azaltılması ve gebelik oranlarının artması ile gelecekte saklanan embryo sayısı da gün geçtikçe artacaktır.

Kriyobiolojideki gelişmeler ile birlikte embryoların uzun süre saklanabilmesi beraberinde etik problemleri de getirmiştir. Ailenin çocuk isteği tamamlanınca embryoların geleceğinin ne olması gerektiği tartışma konusu olmuştur. Bugün için embryolar ailelerin daha sonra tekrar çocuk isteğine karşılık saklanabilir, infertil başka bir çiftin kullanımı için donasyon yapılabilir, bilimsel araştırma amaçlı kullanılabilir ya da imha edilebilir [15]. Hoffman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dondurulup saklanan embryoların %88'inin ailelerin daha sonra tekrar kullanımı için saklandığı, %2'sinin diğer çiftlere donasyon amaçlı saklandığı, %2'sinin imha edildiği gösterilmiştir [54].

IVF tedavisi için dondurulmuş ve artık kullanılmayacak olan embryolar embryonik kök hücre çalışmaları için kaynak oluşturmaktadır. ASRM etik komitesi 2002 yılında embryonik kök hücre araştırmaları için embryoların kullanılıp kullanılmaması, kullanılırsa hangi koşullar altında kullanılması gerektiğine dair bildiri yayınlamıştır. ASRM etik komitesi insan yararlılığı için gerekli bilgileri edinmek amaçlı, embryoya saygı duyarak saklanan embryoların kullanılmasını etik olarak kabul edilebilir olduğunu söylemiştir. Embryoların araştırma için kullanılmasından önce ailelerden bilgilendirilmiş onam formu alınmalı, embryoların para karşılığı satılmayacağı, en fazla fertilizasyondan 14 gün sonraya kadar kullanılabilceği ailelere açıklanmalıdır. Şüphesiz aileler kendi embryoları hakkında karar verecektir. Gelecekte yaşanabilecek sorunları ortadan kaldırmak için mutlaka ailelerden yazılı onam formu alınması gereklidir. Ailelere daha sonra kararlarından vazgeçme veya değiştirme şansı da verilmelidir [15].

### **3.BİREYLER ve YÖNTEM**

#### **3.1 Hasta Seçimi**

Bu çalışma Kasım 2002-Aralık 2008 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Tüp Bebek Ünitesinde donma çözme embryo transferi yapılan 236 hastayı kapsamaktadır. Aynı yıllarda ICSI sonrası ilk siklusunda taze embryo transferi yapılan benzer yaş ve VKİ olan 656 hasta 1.kontrol grup olarak seçilmiştir. TESE siklusları çalışmaya dahil edilmemiştir. Yine aynı tarihlerde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde spontan gebelik sonrası doğum yapan benzer yaştaki 1000 hasta 2.kontrol grubu olarak seçilmiştir.

Hastalar retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Donma çözme embryo ve taze embryo transferi sonucu elde edilen gebeliklerin obsterik ve perinatal sonuçları hastaların dosyalarından ve epikrizlerinden elde edilmiş, tüm hastalara telefon açılarak elde edilen bilgiler doğrulanmıştır. Spontan gebelik sonrasında doğum yapan hastaların bilgileri doğumhane bilgilerinin kayıtlı olduğu Maternal Fetal Ünitesi'den elde edilmiştir. Çalışmamız Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

#### **3.2 Hastalara Uygulanan Protokoller**

Hastalara işlem öncesi işlemin tıbbi sonuçları ve komplikasyonları anlatılır. İşlemin başarı garantisinin olmadığı, oosit toplanması esnasında uygulanacak işlemlerin risklerinin olduğu, muhtemel fetal anomali riski olduğu anlatıldıktan sonra eşlerin imzaları alınır. Adetin 2-4. günleri arasında başlangıç kan E2 düzeylerine bakılır ve aynı gün bazal ultrasonografi (USG) yapılır. Arzu edilen USG'de 12 mm çaptan büyük kist olmaması ve E2'nin 60 pg/ml altında olmasıdır.



E2 ve USG sonrasında hastanın yaşı, bazal USG’de antral folikül sayısı, VKİ’ne göre uygun ovulasyon indüksiyon protokolü belirlenir, uygun görülen dozda gonadotropin injeksiyonuna başlanır. 18 mm çaptan büyük en az 3-4 folikül varlığında i.m.  $\beta$ hCG(10.000 i.u.) uygulanır,  $\beta$ hCG uygulandıktan 36 saat sonra lokal anestezi altında transvajinal USG eşliğinde yumurta toplama işlemi yapılır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsine ICSI işlemi uygulandı. Bu işlem için eşin spermi yıkandıktan sonra yumurta etrafındaki hücreler eritilir, mikroenjeksiyon için hazır hale getirilir. Yumurta etrafındaki hücreler eritildikten sonra yumurta olgunluğu değerlendirilir. Metafaz-2 yumurta (olgun yumurta); Metafaz-1 yumurta (orta derecede olgun yumurta); Germinal-vezikül yumurta (olgun olmayan yumurta) olmak üzere üç tip olgunlukta yumurta vardır. Sadece metafaz-2 yumurtalara mikroenjeksiyon yapılır. Mikroenjeksiyon sonrası döllenmiş yumurta inkübatöre konur.

Transfer öncesi embryolar mikroskop altında blastomer sayısı, blastomerlerin eşit büyüklükte olup olmaması, fragmentasyon varlığı ve bunun embryo hacmine oranına, multinukleasyon içerip içermemesine göre değerlendirilip skorlaması yapılır. Embryo skorlama sistemi Steer ve arkadaşlarının 1992 yılında yayınladıkları embryo skorlama sisteminin modifiye şekli esas alınarak şu şekilde yapılmaktadır [55]

Grade 1: Blastomerleri eşit büyüklükte, fragmentasyon içermeyen, sitoplazması homojen embryo

Grade 2a: < %20 fragmentasyon içeren embryo

Grade 2b: Blastomerleri eşit büyüklükte olmayan embryo

Grade 2c: Sitoplazması homojen olmayan embryo

Grade 3: > %20 fragmentasyon içeren embryo

Grade 4: > %50 fragmentasyon içeren embryo

Çalışmada olan tüm hastalara embryo transferi yumurta toplama işleminden üç gün sonra yapıldı. Tüm hastalara vajinal veya i.m. progesteron ile luteal faz desteği sağlandı.

### **3.3 Uygulanan kriyopreservasyon yöntemi**

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Tüp Bebek Ünitesinde uygun olan hastalara embryo kriyopreservasyon seçeneği sunulmaktadır. Kabul eden hastalara embryoların dondurularak müteakip aylarda kullanılmak üzere ve 5 yılı geçmemek şartıyla klinikte saklanacağı, saklanma süresinin sonunda, eşlerden birinin ölümü veya boşanma durumunda, veya eşlerin talebi halinde bu süreden önce saklanan embryoların imha edileceği beyan edilerek hastalardan onay alınır .

Embryo kriyopreservasyonu embriyoner gelişimin 3.gününde, en az altı blastomere sahip, multinukleasyon içermeyen ve %15' in altında fragmentasyon içeren embryolara uygulanmaktadır. Embriyolar yavaş kademeli soğutma yöntemi ile dondurulur. Kriyopreservasyon işlemi için 1,2 propenediol, sukroz, human serum albumin içeren Embriyo Dondurma Kiti (Embryo Freezing Pack, Medicult; Tekservis) kullanılmaktadır. Embriyolar kriyoprotektan solüsyonla dengelenip, kriyoviallere yüklendikten sonra Kryo 360-1.7 programmable freezer'a (Planer; Sunbury on Thames, UK) yerleştirilir. Sıcaklık 22°C den 0°C ye -2°C/dakika, 0°C den -7°C ye -0.3 ° C/dakika olacak şekilde düşürülür. -7°C de 5 dakika bekledikten sonra manuel seeding yapılır. Daha sonra -35 ° C ye -0.3°C/dakika olacak şekilde soğutulur. -35°C'den -150°C'ye ise -50°C/dakika soğutulup, kriyovialler sıvı nitrojen içine yerleştirilir.

Çözme işlemi için kriyovialler 30 °C su banyosunda 30 saniye bekletilerek hızlı çözülür. Kriyoprotektan Embriyo çözme kiti ( Embryo Thawing Pack, Medicult; Tekservis) ile aşamalı olarak uzaklaştırılır. Çözülen embryoların mikroskop altında morfolojik özelliklerine göre canlılıkları belirlenir.  $\geq$ %50 blastomerleri sağlam olan embryolar canlı kabul edilir. Embryolar 4 saatlik inkübasyon sonrası transfer edilir.

Tüm hastalara embryo transferi GnRH agonisti ve östrojen kullanılarak endometriumun hazırlandığı sikluslarda yapıldı, vajinal veya i.m.progesteron ile luteal faz desteği sağlandı. Transferden 2 hafta sonra gebelik testi uygulandı.

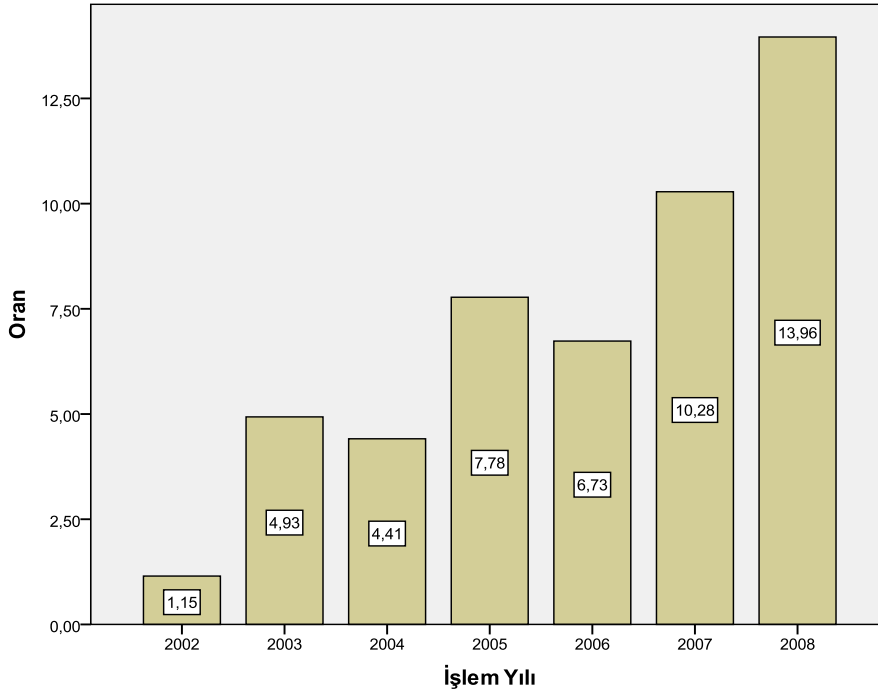
### 3.4 Tanımlar

Pozitif βHCG oranı βHCG değerinin  $\geq 20$  mIU/ml olması, implantasyon oranı USG’de gözlenen gestasyonel kese sayısının transfer edilen embryo sayısına oranı, klinik gebelik 6.haftada USG ile fetal kalp atımının görülmesi, spontan abortus 20. gebelik haftasından önce gebelik kaybı olarak tanımlandı. İntrauterin kayıp 20.gebelik haftasından sonra intrauterin fetusun kaybı, preterm doğum 37.gebelik haftasından önce doğumun olması, düşük doğum ağırlıklı bebek <2500gr’ın altında doğan bebek, çok düşük doğum ağırlıklı bebek ise <1500gr altında doğan bebek olarak tanımlandı.

Majör malformasyon tanımı fonksiyonel bozukluğa neden olan veya cerrahi olarak düzeltilme ihtiyacı olan malformasyon olarak kullanıldı. Diğer malformasyonlar Aase’nin 1990 yılında yayınladığı liste esas alınarak minör kabul edildi. Total malformasyon oranı etkilenmiş canlı doğum+etkilenmiş ölü doğum+malformasyon nedeni ile tıbbi terminasyon’ nun tüm canlı ve ölü doğuma oranı şeklinde hesaplandı [56].

## 4.BULGULAR

1998 yılında embryo kriyopreservasyonunun Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanması ile birlikte ülkemizde de birçok infertilite ünitesinde embryo dondurma işlemi başlamıştır. Bizim merkezimizde embryo kriyopreservasyonu 2002 yılında başlamıştır ve artarak devam etmektedir. Uygun olan hastalara embryo kriyopreservasyonu seçeneği önerilmektedir. Kabul eden hastalar göz önüne alındığında ünitemizde uygulanan donma çözme embryo transfer sikluslarının toplam siklusa oranının yıllara göre dağılımı şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6: Ünitemizde Uygulanan Donma Çözme Embryo Transfer Sikluslarının Toplam Siklusa Oranı

Çalışmadaki hastaların demografik özellikleri Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1: Çalışmaya Katılan Hastaların Demografik Özellikleri**

	<b>Donma-Çözme ET</b> <i>n=236</i>	<b>Taze ET</b> <i>n=656</i>
Bayan Yaşı	31.4±4.7	31.5+/-3.3
VKİ	25.4±2.7	24.8+/-3.8
İnfertilite Süresi (ay)	95±58.3 <sup>a</sup>	87±57.2 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> değerleri arasındaki fark;p=0.57

Her iki gruptaki embriyolojik data tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2:Donma Çözme ve Taze Embryo Transfer Sikluslarının Embriyolojik Özellikleri**

	<b>Donma-Çözme ET</b> <i>n=236</i>	<b>Taze ET</b> <i>n=656</i>
Transfere Gitme Oranı, <i>n</i> (%)	216/236 (91.2)	656/656 (100)
Ortalama Transfer Edilen Embryo Sayısı, <i>(n)</i>	2.62±1.068	2.8±0.035
Transfer Edilen Grade 1 Embryo Sayısı, <i>(n)</i>	0.11±0.34 <sup>a</sup>	0.56±0.94 <sup>a</sup>
Transfer Edilen Grade 2a Embryo Sayısı, <i>(n)</i>	0.02±0.15 <sup>b</sup>	0.19±0.48 <sup>b</sup>
Transfer Edilen Grade 2b Embryo Sayısı, <i>(n)</i>	1.57±1.18 <sup>c</sup>	1.26±1.11 <sup>c</sup>
Transfer Edilen Grade 2ab Embryo Sayısı, <i>(n)</i>	0.96±0.99 <sup>d</sup>	0.81±0.97 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c</sup> değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır; p<0.01

<sup>d</sup> değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır; p<0.05

Her iki gruptaki hastaların gebelik sonuçları tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3:Donma Çözme ve Taze Embryo Transfer Sikluslarının Gebelik Sonuçları**

	<b>Donma-Çözme ET</b> <i>n=216</i>	<b>Taze ET</b> <i>n=656</i>
Pozitif $\beta$ HCG Oranı/ET , (%)	(40.3) <sup>a</sup>	333/656 (50.8) <sup>a</sup>
Klinik Gebelik Oranı/ET, (%)	(31.0) <sup>b</sup>	(45.0) <sup>b</sup>
İmplantasyon Oranı/ET (%)	(14.0) <sup>c</sup>	(24.2) <sup>c</sup>
Canlı Doğum Oranı/ET, (%)	(23.6) <sup>d</sup>	(34.0) <sup>d</sup>
Spontan Düşük Oranı/klinik gebelik, (%)	(18.2)	(16.4)
Ektopik Gebelik Oranı/klinik gebelik, (%)	(1.5)	(2.9)
Çoğul Gebelik Oranı/doğum, (%)	(29.4) <sup>e</sup>	(46.2) <sup>e</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır;  $p<0.05$

Donma çözme, taze embryo transferi ve spontan yolla elde edilen gebeliklerin gebelik komplikasyonları tablo 4’te gösterilmiştir.

**Tablo 4: Gebelik Komplikasyonları**

<b>Parametreler</b>	<b>Donma-Çözme ET</b>	<b>Taze ET</b>	<b>Spontan</b>
<b>Tekiz</b>	<i>n</i> =36	<i>n</i> =120	<i>n</i> =971
PPROM, <i>n</i> (%)	0/36 (0)	3/120 (2.5)	25/971 (2.6)
GDM(A1-A2), <i>n</i> (%)	2/36 (5.6)	6/120 (5.1)	46/971 (4.7)
GHT, <i>n</i> (%)	2/36 (5.6) <sup>a</sup>	6/120 (5.1) <sup>b</sup>	14/971 (1.4) <sup>a,b</sup>
Preeklampsi- HELLP, <i>n</i> (%)	1/36 (2.8)	0/120 (0)	16/971 (1.6)
<b>İkiz</b>	<i>n</i> =14	<i>n</i> =99	<i>n</i> =29
PPROM, <i>n</i> (%)	2/14 (14.3)	5/99 (5.3)	2/29 (6.5)
GDMA1-A2, <i>n</i> (%)	1/14 (7.1)	8/99 (8.4)	1/29 (3.2)
GHT, <i>n</i> (%)	1/14 (7.1)	4/99 (4.2)	0/29 (0)
Preeklampsi-HELLP, <i>n</i> (%)	0/14 (0)	2/99 (2.1)	2/29 (6.5)

<sup>a,b</sup> değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır;  $p < 0.05$

Tablo 5’te her üç grubun ortalama doğum haftaları ve doğum ağırlıkları verilmektedir.

**Tablo 5:Ortalama Doğum Haftaları ve Doğum Ağırlıkları**

	<b>Donma Çözme ET</b> <i>n=50</i>	<b>Taze ET</b> <i>n=219</i>	<b>Spontan</b> <i>n=1000</i>
Ortalama Doğum Haftası			
Tekiz	37.1+3.1	37.6+1.7	37.6+1.7
İkiz	33.2+4.7	34.9+2.7	34.04+3.8
Ortalama Doğum Ağırlığı			
Tekiz	3141.9+783.4	3071.7+589.1	3163.7+1148.3
İkiz	2095.4+841.3	2375.9+620.2 <sup>a</sup>	2133.6+737.4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır;  $p<0.05$

Tablo 6’da her üç gruptaki hastaların neonatal sonuçları verilmektedir.

**Tablo 6: Gebeliklerin Neonatal Sonuçları**

<b>Parametreler</b>	<b>Donma-Çözme ET</b> <i>n=67</i>	<b>Taze ET</b> <i>n=330</i>	<b>Spontan</b> <i>n=1029</i>
Canlı Bebek Sayısı, <i>n</i>	66	325	1015
Kız Bebek Sayısı, <i>n</i> (%)	40/67 (59.7)	178/330 (54.0)	560/1029 (54.4)
Erkek Bebek Sayısı, <i>n</i> (%)	27/67 (40.3)	152/330 (46.0)	469/1029 (45.6)
<2500 gr Bebek Sayısı			
Tekiz, <i>n</i> (%)	4/36 (11.1)	14/120 (11.7)	107/971 (11.1)
İkiz, <i>n</i> (%)	17/28 (60.7)	90/198 (45.4) <sup>a</sup>	39/58 (67.2) <sup>a</sup>
<1500 gr Bebek Sayısı			
Tekiz, <i>n</i> (%)	2/36 (5.6)	4/120 (3.4)	34/971 (3.5)
İkiz, <i>n</i> (%)	7/28 (25)	14/198 (7.1) <sup>b</sup>	13/58 (22.4) <sup>b</sup>
<37 hafta Bebek Sayısı			
Tekiz, <i>n</i> (%)	8/36 (22.2)	19/120 (15.9)	147/971 (15.2)
İkiz, <i>n</i> (%)	22/28 (78.6)	132/198 (66.7)	40/58 (70.0)
İntrauterin Ölen Bebek Sayısı, <i>n</i> (%)	1/67 (1.5)	5/330 (1.5)	14 (1.4)

<sup>a,b</sup> değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır;  $p<0.05$



Donma çözme embryo transferi yapılan hasta grubunda 1 hastaya trisomi 21,1 hastaya da hidrosefali nedeniyle tıbbi terminasyon uygulandı. Taze embryo transferi yapılan hasta grubunda ise 1 hastaya omfolosel,1 hastaya kardiyak anomali,1 hastaya da anensefali nedeni ile tıbbi terminasyon uygulandı.

Donma çözme embryo transferi yapılan hasta grubunda total malformasyon oranı %7.5, taze grupta %3.3, spontan grupta %4.6 bulundu. İstatistiksel fark olmamakla birlikte en yüksek malformasyon oranı donma-çözme embryo transferi yapılan hasta grubunda gözlendi.(Tablo 7).

**Tablo 7 Major ve Minör Malformasyonlar**

<b>Malformasyon</b>	<b>Donma-Çözme ET</b> <i>n=67</i>	<b>Taze ET</b> <i>n=330</i>	<b>Spontan</b> <i>n=1029</i>
Majör, <i>n</i> (%)	4 (6)	8 (2.4)	36 (3.5)
	Meningosel (1)	Omfolosel (1)	
	ASD (2)	ASD (5)	
	Hidrosefali (1)	Kardiyak anomali (1)	
		Anensefali (1)	
Minör, <i>n</i> (%)	0 (0)	3 (0.9)	7 (0.7)
		Club foot (1)	
		Pelviaktazi (2)	
Aneuploidi, <i>n</i> (%)	1 (1.5)	0 (0)	4 (0.4)
	Tr 21 (1)		
Total, <i>n</i> (%)	5 (7.5)	11 (3.3)	47 (4.6)

## 5.TARTIŞMA

İnfertilite günümüzde önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmakta, bu sağlık problemine karşı YÜT'leri gün geçtikçe geliştirmektedir. Bugüne kadar yaklaşık 3.5 milyon bebek YÜT sonrasında doğmuştur [57]. YÜT sonrasında doğan bebeklerin sağlık durumu her zaman merak konusu olmuştur. Bazı çalışmalarda artmış prematürite riski ve artmış konjenital malformasyon riski belirtilmiştir [57]. Bu riskler YÜT ile artan çoğul gebelik oranlarına ve infertilite hastalarının paternal özelliklerine bağlanmıştır. Yapılan çalışmalarda infertilite tedavisinden bağımsız, infertilite süresinin de kendi başına gebelik ve perinatal sonuçlarını ve malformasyon oranlarını kötü yönde etkilediği gösterilmiştir [58-60].

1984 yılında embryo kriyopreservasyonu ile ilk canlı bebeğin doğumundan sonra embryo kriyopreservasyonu getirdiği avantajlardan dolayı birçok infertilite ünitesinde kullanılmaya başlanmış, tedavinin rutin parçası olmuştur. Zamanla dondurulan embryo sayısı, embryo kriyopreservasyon sikluslarının sayısı ve sonuç olarak da bu gebeliklerden doğan bebeklerin sayısı artmış, artmaya da devam etmektedir [57]. Embryo kriyopreservasyon işleminin embryo'ya zarar verip vermediği, işlemin gebelik ve bu gebeliklerden doğan bebekleri olumsuz etkileyip etkilemediği, bu bebeklerin uzun dönemdeki sağlık problemleri araştırılmıştır.

Biz de bu çalışmamızda ünitemizde 2002-2008 yılları arasında yapılan donma çözme embryo transfer sikluslarından elde edilen gebelik oranlarını ve bu gebeliklerin obstetrik ve perinatal sonuçlarını, ünitemizde aynı tarihlerde taze embryo transfer siklusu yapılan hastalarla ve spontan gebelik sonrası doğum yapan hastalarla karşılaştırmayı planladık. Çalışmamıza 236 tane donma çözme ve 656 tane taze embryo transferi yapılan hasta, 1000 tane de spontan gebelik sonrası doğum yapan hasta dahil edildi.

Donma çözme embryo transferinde klinik gebelik oranı hastanın yaşı, kullanılan dondurma yöntemi, embryonun hangi evrede dondurulduğu, çözme işlemi sonrası blastomer kaybının olup olmaması, transfer edilen embryo kalitesi ve sayısı gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte literatürde son çalışmalarda embryo kriyopreservasyonu sonrası klinik gebelik oranları %27.3-%37.5 arasında bildirilmektedir [23, 33]. 2009 yılında yayınlanan ve 2006 yılında ABD'deki 483 infertilite ünitesinden alınan bilgileri yansıtan çalışmada donma çözme embryo transferi sonrasında %36.9 klinik gebelik, %28.9 canlı doğum oranı bildirilirken, taze embryo transferi sonrasında bu oranlar sırasıyla %43.2 ile %35.4'tür [61]. Embryo kriyopreservasyon sonucu gebelik oranları genellikle taze embryo transferine göre düşük olmaktadır, bunun nedeni en iyi embryoların taze transfer için seçilmesi ve diğer embryoların dondurulması olabileceği gibi kriyopreservasyon işleminin kendisinin de embryoya zarar vermesi olabilir [62].

Bizim çalışmamızda ünitemizdeki donma çözme embryo transferi sonrasında embryo transferi başına klinik gebelik oranı %31, canlı doğum oranı %23.6, taze embryo transferi sonrasında ise % 45 ve %34 olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 3). Klinik gebelik oranlarını etkileyecek faktörlerden hasta yaşı ve BMI her iki grupta benzerdi. İnfertilite süresi donma çözme embryo transferi grubunda klinik olarak daha fazlaydı, istatistiksel olarak ise sınırdan anlamlıydı ( $p=0.57$ ) (Tablo 1). Her iki grupta da transfer edilen embryo sayısı benzerdi, fakat taze embryo transfer grubunda klinik gebelik oranını etkileyecek transfer edilen grade 1 ve grade 2a embryo sayısı donma çözme embryo transfer grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. Kontrol grubu olan taze embryo transfer siklusundaki hastalarının ilk siklusu çalışmaya alındı. Bu da elde edilen gebelik oranları açısından embryo kriyopreservasyon grubu için dezavantaj olmaktadır.

Çalışmamızda donma çözme embryo transferi grubunda spontan abortus oranı %18.2, taze embryo transfer grubunda %16 olarak bulundu, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 3). 1999 yılında Aytoz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ICSI yapılan embryo kriyopreservasyon sonrası gebeliklerde spontan abortus oranı %26, taze embryo transferi sonrasında ise bu oran %18.6 olarak bulunmuştur, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.13). Fakat aynı fark embryo kriyopreservasyon yapılan IVF grubunda gözlenmemiştir [63]. Daha yeni bir çalışmada da Belva ve arkadaşları 793 embryo kriyopreservasyonu ve ICSI gebeliği ile 3073 taze embryo transferi yapılan ICSI gebeliğinin obstetrik sonuçlarını inceledikleri çalışmada embryo kriyopreservasyon grubunda spontan abortus oranı %16.2, taze embryo transfer grubunda %13.9 bulunmuştur, embryo kriyopreservasyon grubunda bir miktar artmış risk göstermişlerdir (OR:1.20,%95 CI) [62].

Ektopik gebelik insidansı genel populasyonda yaklaşık %1.5-2 arasındadır . Ektopik gebelik insidansının IVF ve ET ile arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ektopik gebelik insidansı IVF hastalarında yaklaşık olarak %2-%5 arasında bildirilmiştir [64]. Özellikle tubal hastalığı olan hastalarda risk artışı daha fazladır [65].Donma çözme embryo transferinin taze embryo transferine göre ektopik gebelik riskini artırıp artırmadığı ile ilgili literatürde farklı çalışmalar bulunmaktadır. Yakın zamanda yapılan meta-analizde IVF yapılan hastalarda donma çözme embryo transferinin taze embryo transferine göre ektopik gebelik riskini artırmadığı belirtilmiştir [66]. Aytoz ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada embryo kriyopreservasyon yapılan ICSI gebelikleri ve taze embryo transferi yapılan ICSI gebeliklerinde benzer ektopik gebelik oranları bildirmişlerdir (%2.8,%2.3) [63], yine benzer şekilde Belva ve arkadaşları da ektopik gebelik açısından embryo kriyopreservasyonu ve taze embryo transfer gebeliklerinde fark gözlememişlerdir.(%2.1,%1.6) [62]. Bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde donma çözme embryo transfer grubunda ektopik gebelik oranı %1.5, taze embryo transfer grubunda %2.9 olarak benzer şekilde bulundu (Tablo 3).

Çalışmamızda çoğul gebelik oranı taze embryo transfer grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (%46.2, %29.5) (Tablo 3). Literatürde de bizim çalışmamıza benzer sonuçlar bulunmaktadır. Kallen ve arkadaşlarının 2005 yılında İsveç'teki IVF merkezlerinden aldıkları sonuçları yayınladıkları çalışmada transfer edilen embryo sayıları benzer olmakla birlikte taze embryo transferi yapılan ICSI gebeliklerinde %22.1, embryo kriyopreservasyon gebeliklerinde %11.38 ikiz gebelik oranı bildirilmiştir [67]. Transfer edilen embryo sayısı benzer olmakla birlikte taze embryo transferi sonrasında çoğul gebelik oranlarının daha yüksek olmasının nedeni taze embryoların implantasyon potansiyelinin daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir [67].

Literatürde donma çözme embryo transferi sonucu elde edilen IVF/ICSI tekiz gebeliklerinde preterm doğum oranı %9.2 ile %12 arasında, taze IVF/ICSI tekiz gebeliklerinde ise preterm doğum oranı %7.4 ile %14 arasında bildirilmektedir [57].

Wang ve ark.larının 1996-2000 yılları arasındaki Avustralya'da uygulanan tüm IVF/ICSI gebeliklerinin sonuçlarını yayınladıkları çalışmada YÜT sonrasında elde edilen gebeliklerde spontan gebeliklere göre 2.4 kat artmış preterm doğum riski belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada taze embryo transfer sonrasında elde edilen tekiz gebeliklerde embryo kriyopreservasyon sonrasında elde edilen gebeliklere göre 1.3 kat artmış preterm doğum riski bildirilmiştir. Bu çalışmada IVF ve ICSI ayrımı yapılmamıştır [68]. Literatürde benzer şekilde taze embryo transfer gebeliklerinde artmış preterm doğum riskini gösteren çalışmalar mevcuttur [67, 69]

Farklı olarak IVF ve ICSI gebeliklerini ayrı ayrı incelediği Aytoz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tekiz embryo kriyopreservasyonu sonrasında elde edilen ICSI gebeliklerinde %15.2, taze embryo transferi ile elde edilen gebeliklerde %4.5 preterm doğum oranı bildirilmiştir ( $p<0.05$ ) [63].

Benzer şekilde Belva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise tekiz embryo kriyopreservasyonu sonrasında elde edilen ICSI gebeliklerinde %11.4, taze embryo transferi ile elde edilen gebeliklerde %8.4 preterm doğum oranı belirtilmiş, bu çalışmada embryo kriyopreservasyon grubunda bir miktar artmış risk gösterilmiştir (OR:1.41) [62]. İkiz gebeliklerde ise literatürdeki çalışmalarda donma çözme embryo transferi sonucu elde edilen IVF/ICSI gebeliklerinde preterm doğum oranı %33 ile %62 arasında, taze IVF /ICSI gebeliklerinde ise %47.6 ile % 61.3 arasında belirtilmiştir [57]. Literatürdeki çalışmalarda ikiz gebeliklerde preterm doğum oranı açısından embryo kriyopreservasyonu ile taze embryo transferi sonrasında elde edilen gebeliklerde fark gözlenmemiştir [62]. Bizim çalışmamızda ise donma çözme embryo transfer grubunda hem tekiz hem de ikiz gebeliklerde her iki gruptan daha fazla prematürite oranı bulunmuştur, fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 6). Bizim çalışmamızda spontan gebelik sonrası hem tekiz hem de ikiz gebeliklerde prematürite oranı normal popülasyonda görülen prematürite oranından yüksek bulunmuştur, bu da Hacettepe Üniversitesi Hastanesinin referans hastane olup yüksek riskli gebeliklerin sevk ediliyor olmasından kaynaklanmaktadır.

Literatürde embryo kriyopreservasyonu ile elde edilen gebeliklerin neonatal sonuçlarının incelendiği çalışmalarda embryo kriyopreservasyonun doğum ağırlığının kötü yönde etkilemediği gösterilmiştir. Wang ve arkadaşları taze embryo transferi ve IVF/ICSI gebeliği sonrasında doğan bebeklerde embryo kriyopreservasyonu sonrasında doğan bebeklere göre 1.5 kat artmış düşük doğum ağırlığı bildirmişlerdir [68]. Aynı şekilde Kallen ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada da embryo kriyopreservasyonu sonrasında doğan bebeklerde taze embryo transferine göre daha az düşük doğum ağırlığı saptanmıştır (OR 0.49)[67]. Literatürdeki diğer çalışmalarda tekiz gebeliklerde düşük doğum ağırlığı açısından fark gözlenmemiştir [57]. Bizim çalışmamızda ise tekiz gebeliklerde her üç grupta düşük doğum ağırlıklı bebek oranında fark yoktu. İkiz gebeliklerde ise literatürden farklı şekilde taze embryo gebeliklerinde düşük doğum ağırlıklı bebek oranı spontan ve donma çözme embryo gebeliklerine göre daha düşük bulundu (Tablo 6).

Prematürite ve doğum ağırlığı perinatal morbidite ve mortaliteyi etkileyen en önemli faktörlerdir. Yapılan çalışmalarda embryo kriyopreservasyonun preterm doğum ve düşük doğum ağırlıklı bebek oranlarını taze embryo transferine göre kötü yönde etkilemediği gösterilmiş, hatta kontrollü bazı çalışmalarda embryo kriyopreservasyonu sonrasında daha düşük preterm ve düşük doğum ağırlıklı bebek oranları belirtilmiştir [67-69]. Embryo kriyopreservasyonundan fayda gören hasta grubu kontrollü ovaryan stimülasyona iyi yanıt verip iyi kalitede birden fazla embryo oluşturan hasta grubudur [70]. Donma ve çözme işleminin fiziksel stresine dayanıp canlı kalan embryo taze embryoya göre daha iyi kalitede olabilir [57]. Sonuç olarak embryo kriyopreservasyonu hem hasta hem de embryo için pozitif seleksiyon yapabilmektedir..Bu da embryo kriyopreservasyon sonrasında elde edilen gebeliklerde daha düşük preterm ve düşük doğum ağırlıklı bebek oranı görülmesinin nedeni olabilir.

Embryo kriyopreservasyonunun bir avantajı da hastanın doğal siklusunda transfer olanağının olmasıdır. Günümüzde ovaryan stimülasyonunun oogenezi, embryo kalitesini, endometrium reseptivitesi ve sonuç olarak da perinatal sonuçları etkilediğini gösteren yayınlar mevcuttur [71]. Taze embryo transfer sikluslarındaki ovaryan stimülasyonu için kullanılan hormonların endometrium üzerinde olumsuz etkisi implantasyon ve plasental gelişimi kötü yönde etkileyebilir [72].

Embryo kriyopreservasyonu ile ilgili en önemli konulardan birtanesi de işlemin güvenilir olup olmamasıdır. Kullanılan kriyoprotektan solusyonlarının ve donma çözme işlemi sırasında embryoda meydana gelen metabolik değişikliklerin doğacak çocukları etkileyip etkilemeyeceği her zaman merak konusu olmuştur. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde embryo kriyopreservasyonu güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. İsviçre [73] , Avustralya [69], USA' den yapılan popülasyon bazlı çalışmalarda artmış risk görünmemektedir.

Fakat Belva ve arkadaşları yakın zamanda Brüksel'den yayınladıkları çalışmada embryo kriyopreservasyonu yapılan ICSI gebeliklerinde 2 kat artmış konjenital malformasyon riski göstermişlerdir. Bu çalışmada embryo kriyopreservasyonu yapılan ICSI gebeliğinden doğan 547 bebek ve embryo kriyopreservasyonu yapılan IVF gebeliğinden doğan 390 bebek daha önce Bonduelle ve arkadaşları tarafından yine aynı merkezden yayınlanan taze embryo transferi yapılan ICSI ve IVF bebeğinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada taze embryo transfer yapılan ICSI grubunda %4.2, embryo kriyopreservasyonu yapılan ICSI grubunda %8.4 major malformasyon riski belirtilmiştir (OR 2.05). Fakat aynı IVF gruplarında gözlenmemiştir (%4.1, %4.6; OR 0.86) [69]. Bu çalışma embryo kriyopreservasyonu ve ICSI birlikteliğinin malformasyon riskini artırabileceğini, bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir.

2009 yılında Danimarka'dan yayınlanan çalışmada ise 660 embryo kriyopreservasyonu yapılan IVF, 224 embryo kriyopreservasyonu yapılan ICSI gebeliğinden doğan tekiz bebekler 3425 taze embryo transferi yapılan ICSI ve 6904 taze embryo transferi yapılan IVF bebeği ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda 4800 spontan gebelik sonucu doğan bebek alınmıştır. Bu çalışmada embryo kriyopreservasyonu yapılan ICSI grubunda %7.0, taze embryo transfer yapılan ICSI grubunda %7.8, spontan grupta ise %6.3 oranında total malformasyon oranı gözlenmiştir. Embryo kriyopreservasyon grubunda artmış risk gözlenmemiştir [72].

Bizim çalışmamızda 67 embryo kriyopreservasyonu ve ICSI gebeliğinden doğan bebek, 330 taze embryo transferi ve 1029 spontan gebelik sonucu doğan bebek vardı. Embryo kriyopreservasyon grubunda total malformasyon oranı %7.5, taze embryo transfer grubunda %3.3, spontan grupta ise %4.6 olarak gözlemlendi. En yüksek malformasyon oranı embryo kriyopreservasyon grubunda gözlenmesine rağmen hasta sayısının az olması nedeni ile istatistiksel olarak arada fark gözlenmedi.



Sonuç olarak literatüre baktığımızda embryo kriyopreservasyon sonrası elde edilen gebeliklerin obstetrik ve perinatal sonuçları taze embryo transferi sonucu elde edilen gebeliklere benzerdir. Preterm doğum ve düşük doğum ağırlığının embryo kriyopreservasyonu gebeliklerinde taze embryo transfer gebeliklerine göre daha az görüldüğüne dair literatürde çalışmalar mevcuttur. Yine yapılan çalışmalarda son 25 yıldır kullanılan yavaş soğutma tekniği ile dondurulan embryolardan doğan bebeklerde taze embryo transferine göre yüksek malformasyon oranları bildirilmemiştir. Fakat özellikle bu çocukların uzun dönemdeki sağlık durumları ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Günümüzde embryo dondurma işlemi getirdiği avantajlar ile modern infertilite tedavisinin ayrılmaz bir parçası olmuştur ve infertilite kliniklerinde uygun olan hastalara embryo dondurma seçeneği sunulmalıdır.
- Deneyimli ve laboratuvar standartları iyi bir klinikte beş hastanın birinde dondurmak için iyi kalitede embryo elde edilmeli, donma çözme işlemi sonrasında ortalama %75-80 embryo canlılık oranı elde edilmelidir.
- Donma çözme embryo transferi ile elde edilen gebeliklerin sonuçları ve bu gebeliklerden doğan bebeklerin sağlık durumları merak konusu olmuştur, incelenmiştir.
- Çalışmamızda taze embryo transferi sonrasında klinik gebelik oranı ve canlı doğum oranı daha yüksek bulunmuştur.
- Çalışmamızda donma çözme embryo transferi sonrasında elde edilen gebeliklerin obstetrik ve perinatal sonuçları taze embryo transferi sonrasında elde edilen gebeliklerin sonuçları ile benzer bulunmuştur.
- Embryo dondurma işleminin prematürite ve düşük doğum ağırlığına neden olmadığı gösterilmiştir.
- Donma çözme embryo transferi ile doğan bebeklerdeki malformasyon oranı daha yüksek bulunmuştur, fakat çalışmamızda az sayıda hasta olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- Donma çözme embryo transferi sonrasında doğan bebeklerin uzun dönemdeki sağlık durumları ile ilgili daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Granne, I., T. Child, and G. Hartshorne, *Embryo cryopreservation: evidence for practice*. Hum Fertil (Camb), 2008. **11**(3): p. 159-72.
2. Mosher, W.D. and W.F. Pratt, *Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends*. Fertil Steril, 1991. **56**(2): p. 192-3.
3. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, Leon Speroff, Marc A. Fritz, Seventh edition, p.1215
4. Devroey, P., B.C. Fauser, and K. Diedrich, *Approaches to improve the diagnosis and management of infertility*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(4): p. 391-408.
5. Reddy, U.M., et al., *Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop*. Obstet Gynecol, 2007. **109**(4): p. 967-77.
6. Bergh, C., et al., *Cumulative birth rates following cryopreservation of all embryos in stimulated in vitro fertilization (IVF) cycles*. J Assist Reprod Genet, 1995. **12**(3): p. 191-4.
7. Tiitinen, A., et al., *Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation*. Hum Reprod, 2001. **16**(6): p. 1140-4.
8. Sills, E.S., et al., *Ovarian hyperstimulation syndrome and prophylactic human embryo cryopreservation: analysis of reproductive outcome following thawed embryo transfer*. J Ovarian Res, 2008. **1**(1): p. 7.
9. Navot, D., P.A. Bergh, and N. Laufer, *Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment*. Fertil Steril, 1992. **58**(2): p. 249-61.
10. Whittingham, D.G., S.P. Leibo, and P. Mazur, *Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C*. Science, 1972. **178**(59): p. 411-4.
11. Trounson, A. and L. Mohr, *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo*. Nature, 1983. **305**(5936): p. 707-9.
12. Zeilmaker, G.H., et al., *Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos*. Fertil Steril, 1984. **42**(2): p. 293-6.

13. Lassalle, B., J. Testart, and J.P. Renard, *Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol*. Fertil Steril, 1985. **44**(5): p. 645-51.
14. Breckjaer, H.E. and J.G. Grudzinskas, *Cryobiology in human assisted reproductive technology. Would Hippocrates approve?* Early Pregnancy, 2001. **5**(3): p. 211-3.
15. Michelmann, H.W. and P. Nayudu, *Cryopreservation of human embryos*. Cell Tissue Bank, 2006. **7**(2): p. 135-41.
16. Assisted Reproductive Technologies, third edition, David K Gardner, Ariel Weissman, Colin M Howles, Zeev Shoham, p.247
17. Rezazadeh Valojerdi, M., et al., *Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos*. J Assist Reprod Genet, 2009. **26**(6): p. 347-54.
18. Rall, W.F. and G.M. Fahy, *Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification*. Nature, 1985. **313**(6003): p. 573-5.
19. Mukaida, T., et al., *Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos*. Hum Reprod, 1998. **13**(10): p. 2874-9.
20. Liebermann, J., et al., *Potential importance of vitrification in reproductive medicine*. Biol Reprod, 2002. **67**(6): p. 1671-80.
21. Loutradi, K.E., et al., *Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis*. Fertil Steril, 2008. **90**(1): p. 186-93.
22. Balaban, B., et al., *A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation*. Hum Reprod, 2008. **23**(9): p. 1976-82.
23. Li, Y., et al., *[Comparison of vitrification and slow-freezing of human day 3 cleavage stage embryos: post-vitrification development and pregnancy outcomes]*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2007. **42**(11): p. 753-5.
24. Kolibianakis, E.M., C.A. Venetis, and B.C. Tarlatzis, *Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better?* Curr Opin Obstet Gynecol, 2009. **21**(3): p. 270-4.
25. Borini, A., et al., *Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1127**: p. 49-58.
26. Cohen, J., et al., *Birth after replacement of hatching blastocyst cryopreserved at expanded blastocyst stage*. Lancet, 1985. **1**(8429): p. 647.

27. Menezes, Y.J., D. Sakkas, and L. Janny, *Co-culture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro*. *Microsc Res Tech*, 1995. **32**(1): p. 50-6.
28. Kaufman, R.A., et al., *Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles*. *Fertil Steril*, 1995. **64**(6): p. 1125-9.
29. Vanderzwalmen, P., et al., *Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification*. *Hum Reprod*, 2002. **17**(3): p. 744-51.
30. Veeck, L.L., *Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw?* *Reprod Biomed Online*, 2003. **6**(3): p. 367-74.
31. Salumets, A., et al., *Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer*. *Hum Reprod*, 2003. **18**(9): p. 1890-5.
32. Anderson, A.R., M.L. Weikert, and J.L. Crain, *Determining the most optimal stage for embryo cryopreservation*. *Reprod Biomed Online*, 2004. **8**(2): p. 207-11.
33. Konc, J., K. Kanyo, and S. Cseh, *Clinical experiences of ICSI-ET thawing cycles with embryos cryopreserved at different developmental stages*. *J Assist Reprod Genet*, 2005. **22**(5): p. 185-90.
34. Moragianni, V.A., et al., *Outcomes of day-1, day-3, and blastocyst cryopreserved embryo transfers*. *Fertil Steril*, 2009.
35. Ghobara, T. and P. Vandekerckhove, *Cycle regimens for frozen-thawed embryo transfer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(1): p. CD003414.
36. Gelbaya, T.A., et al., *Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study*. *Fertil Steril*, 2006. **85**(3): p. 603-9.
37. Morozov, V., et al., *Natural cycle cryo-thaw transfer may improve pregnancy outcome*. *J Assist Reprod Genet*, 2007. **24**(4): p. 119-23.
38. Fugger, E.F., *Clinical status of human embryo cryopreservation in the United States of America*. *Fertil Steril*, 1989. **52**(6): p. 986-90.
39. Sunderam, S., et al., *Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2006*. *MMWR Surveill Summ*, 2009. **58**(5): p. 1-25.
40. Toner, J.P., L.L. Veeck, and S.J. Muasher, *Basal follicle-stimulating hormone level and age affect the chance for and outcome of pre-embryo cryopreservation*. *Fertil Steril*, 1993. **59**(3): p. 664-7.
41. Karlstrom, P.O., et al., *Prognostic factors for the success rate of embryo freezing*. *Hum Reprod*, 1997. **12**(6): p. 1263-6.

42. Edgar, D.H., et al., *The developmental potential of cryopreserved human embryos*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **169**(1-2): p. 69-72.
43. Pal, L., et al., *Postthaw blastomere survival is predictive of the success of frozen-thawed embryo transfer cycles*. Fertil Steril, 2004. **82**(4): p. 821-6.
44. Thurin, A., et al., *Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization*. N Engl J Med, 2004. **351**(23): p. 2392-402.
45. Lahav-Baratz, S., et al., *Analyzing factors affecting the success rate of frozen-thawed embryos*. J Assist Reprod Genet, 2003. **20**(11): p. 444-8.
46. Machtinger, R., et al., *The effect of prolonged cryopreservation on embryo survival*. Gynecol Endocrinol, 2002. **16**(4): p. 293-8.
47. Riggs, R., et al., *Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos*. Fertil Steril, 2008.
48. Oehninger, S., J. Mayer, and S. Muasher, *Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo cryopreservation*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **169**(1-2): p. 73-7.
49. Van den Abbeel, E., et al., *Embryo freezing after intracytoplasmic sperm injection*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **169**(1-2): p. 49-54.
50. Wang, J.X., Y.Y. Yap, and C.D. Matthews, *Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception*. Hum Reprod, 2001. **16**(11): p. 2316-9.
51. El-Toukhy, T., et al., *Cryo-thawed embryos obtained from conception cycles have double the implantation and pregnancy potential of those from unsuccessful cycles*. Hum Reprod, 2003. **18**(6): p. 1313-8.
52. Whittingham, D.G., M.F. Lyon, and P.H. Glenister, *Long-term storage of mouse embryos at -196 degrees C: the effect of background radiation*. Genet Res, 1977. **29**(2): p. 171-81.
53. Dulioust, E., et al., *Long-term effects of embryo freezing in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 589-93.
54. Hoffman, D.I., et al., *Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research*. Fertil Steril, 2003. **79**(5): p. 1063-9.
55. Hardarson, T., et al., *Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation*. Hum Reprod, 2001. **16**(2): p. 313-8.

56. Bonduelle, M., et al., *Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999)*. Hum Reprod, 2002. **17**(3): p. 671-94.
57. Wennerholm, U.B., et al., *Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data*. Hum Reprod, 2009. **24**(9): p. 2158-72.
58. Draper, E.S., et al., *Assessment of separate contributions to perinatal mortality of infertility history and treatment: a case-control analysis*. Lancet, 1999. **353**(9166): p. 1746-9.
59. Basso, O. and D.D. Baird, *Infertility and preterm delivery, birthweight, and Caesarean section: a study within the Danish National Birth Cohort*. Hum Reprod, 2003. **18**(11): p. 2478-84.
60. Zhu, J.L., et al., *Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort*. BMJ, 2006. **333**(7570): p. 679.
61. Jungheim, E.S., et al., *Embryo transfer practices in the United States: a survey of clinics registered with the Society for Assisted Reproductive Technology*. Fertil Steril, 2009.
62. Belva, F., et al., *Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles*. Hum Reprod, 2008. **23**(10): p. 2227-38.
63. Aytoz, A., et al., *Obstetric outcome of pregnancies after the transfer of cryopreserved and fresh embryos obtained by conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1999. **14**(10): p. 2619-24.
64. Lesny, P., et al., *Transcervical embryo transfer as a risk factor for ectopic pregnancy*. Fertil Steril, 1999. **72**(2): p. 305-9.
65. Strandell, A., J. Thorburn, and L. Hamberger, *Risk factors for ectopic pregnancy in assisted reproduction*. Fertil Steril, 1999. **71**(2): p. 282-6.
66. Jee, B.C., C.S. Suh, and S.H. Kim, *Ectopic pregnancy rates after frozen versus fresh embryo transfer: a meta-analysis*. Gynecol Obstet Invest, 2009. **68**(1): p. 53-7.
67. Kallen, B., et al., *In vitro fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods*. Fertil Steril, 2005. **84**(3): p. 611-7.
68. Wang, Y.A., et al., *Preterm birth and low birth weight after assisted reproductive technology-related pregnancy in Australia between 1996 and 2000*. Fertil Steril, 2005. **83**(6): p. 1650-8.

69. Shih, W., et al., *Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection*. Hum Reprod, 2008. **23**(7): p. 1644-53.
70. Wada, I., et al., *Birth characteristics and perinatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos*. Hum Reprod, 1994. **9**(3): p. 543-6.
71. Santos, M.A., E.W. Kuijk, and N.S. Macklon, *The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo*. Reproduction, 2009.
72. Pinborg, A., et al., *Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The Danish National Cohort Study 1995-2006*. Fertil Steril, 2009.
73. Kallen, B., et al., *In vitro fertilization (IVF) in Sweden: risk for congenital malformations after different IVF methods*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005. **73**(3): p. 162-9.