



**T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DONDURULMUŞ ÇÖZÜLMÜŞ VE TAZE EMBRİYO
TRANSFERİNİN EMBRİYO CANLILIĞI VE GEBELİK
SONUÇLARINA ETKİSİ**

SEVİL ÜNAL

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay İrez**

İSTANBUL

2019



**T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DONDURULMUŞ ÇÖZÜLMÜŞ VE TAZE EMBRİYO
TRANSFERİNİN EMBRİYO CANLILIĞI VE GEBELİK
SONUÇLARINA ETKİSİ**

SEVİL ÜNAL

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay İrez**

İSTANBUL

2019

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: Sevil ÜNAL

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Sevil ÜNAL tarafından hazırlanan "Dondurulmuş Çözülmüş ve Taze Embriyo Transferinin Embriyo Canlılığı ve Gebelik Sonuçlarına Etkisi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:08/08/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

imza

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Ramazan DANSUK

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Melike ERKAN

İstanbul Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Leman ŞENTURAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

I.BEYAN

Bu tezin bana ait olduğunu, tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, içinde yer alan bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

SEVİL ÜNAL



II.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini paylaşan, değerli danışmanım ve hocam, Sayın **Prof. Dr.Tülay İREZ'e** ,

Yüksek lisans eğitimimde beni destekleyen, gerekli bilgi, tecrübe ve sahip olduğu bilimsel verileri paylaşan değerli yöneticim Sayın **Op. Dr. Aret KAMAR'a**

Benden hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim ve varlığı ve sevgisiyle destek veren canım oğluma teşekkürlerimi borç bilirim.

İçindekiler

I.BEYAN.....	i
II.TEŞEKKÜR	ii
IV.SİMGE VE KISALTMALAR	vii
V.TABLO LİSTESİ	viii
VI.ŞEKİL LİSTESİ.....	x
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1.Erkek Faktörü	4
4.2.Kadın Faktörü.....	6
4.2.1. İleri Kadın Yaşı.....	6
4.2.2. Ovülatuar Faktör	7
4.2.3. Tubal Faktör	7
4.2.4. Servikal Faktör.....	7
4.2.5. Açıklanamayan/ İzah Edilemeyen İnfertilite(UEI)	8
4.2.6. Polikistik Over Sendromu (PKOS).....	9
4.3.Yardımcı Üreme Tekniklerinde Kriyoprezervasyon	13
4.3.1. Kriyoprezervasyon Endikasyonları	13
4.3.2. Kriyopreservasyon Teknikleri	15
4.3.3. Kriyoprezervasyon Esnasında İzlenen Hücresel Değişiklikler.....	15
4.3.4. Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılan Kriyoprotektan Maddeler	17
4.3.5. Kriyoprezervasyon Yöntemleri	19
4.3.6. Embriyo Çözdürme.....	22

4.4.Embriyo Gelişiminin Takibi ve Kalitelendirilmesi	23
4.4.1.Yumurta Toplanma (OPU) İşlemi İle Kumulus Oosit Kompleksinin (KOK) Elde Edilmesi ve Sperm Eldesi (0.Gün)	23
4.4.2.Fertilizasyonun Değerlendirilmesi (1.Gün).....	26
4.4.3.Klivaj Dönemi Embriyo Sınıflandırması.....	28
4.4.4.Blastokist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi.....	30
4.5.Embriyo Transferi ve Transfer Edilecek Embriyo Sayısının ve Transfer Gününün Belirlenmesi.....	32
5.GEREÇ VE YÖNTEM	35
5.1.Hasta Seçimi.....	35
5.2.Hastaların Klinik Olarak Hazırlanması	35
5.2.1.Dondurulmuş embriyo transfer (DET) Protokolü	36
5.2.2.Taze Embriyo Transfer Protokolü	36
5.3.Sperm Hazırlama.....	37
5.4.Oosit Toplama (OPU) İşlemi	37
5.5.Oosit Soyma İşlemi (Denudasyon).....	38
5.6.Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI)	38
5.7.Fertilizasyon Değerlendirmesi	39
5.8.Klivaj Değerlendirmesi	40
5.9.Blastokist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi.....	40
5.10.Vitrifikasyon yöntemi ile embriyo dondurma ve Çözdürme Protokolleri	40
5.11.Embriyo Transferi (DET).....	43
5.12.Gebelik Değerlendirmesi.....	44
6.BULGULAR	45
7.TARTIŞMA	55
8.SONUÇ	59

9.KAYNAKLAR	60
10.EKLER.....	68
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	68
11.ÖZGEÇMİŞ	70
12.İNTİHAL RAPORU	71



IV.SİMGE VE KISALTMALAR

AMH	Antimüllerian Hormon
BMI	Beden Kitle İndeksi
COK	Kumulus oosit kompleksinin
DET	Dondurulmuş embryo transferi
E2	Östradiol
EG	Etilen Glikol
ET	Embriyo transferi
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GV	Germinal Vezikül
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBSS	Earle'nin Dengeli Tuz Çözeltisi
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GL	Gliserol
HEPES	2- [4- (2-hidroksietil) piperazin1-il] etansülfonik asit
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
HSA	İnsan Serum Albumini
ICM	İç Hücre Kitlesi
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IGF-2	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2
IVF	İn -Vitro Fertilizasyon
KOH	Kontrollü Over Hiperstimülasyonu

LH	Luteinizan Hormon
MI	Metafaz1
MII	Metafaz 2
OHSS	Ovaryan Hiperstimulasyon Sendromu
OPU	Oosit Pick Up
PB	Polar Body
PN	Pronükleus
PVP	Polivinil Pirrolidon
PROH	Propilen glikol
P	Progesteron
PG-F2a	Prostaglandin F2a
PKO	Polikistik Over
PKOS	Polikistik Over Sendromu
TESE	Testiküler sperm ekstraksiyon
YÜT	Yardımla Üreme Teknikleri

V.TABLO LİSTESİ

Tablo 1. WHO kriterlerine göre normal semen parametreleri	5
Tablo 2. Kruger kesin kriterlerine göre normal sperm morfolojisi (Kruger vd, 1986).	5
Tablo 3. PKOS tanı kriterleri	9
Tablo 4. OHSS risk faktörleri ve önlenmesi	12
Tablo 5. Embriyo dondurma endikasyonları	14
Tablo 6. Hücre membranından geçebilme özelliklerine göre kriyoprotektan çeşitleri ...	18
Tablo 7. Embriyo çözme protokolü.....	42
Tablo 8. Yaş gruplarına göre biyokimyasal gebelik oranları (Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması)	46
Tablo 9. Yaş gruplarında klinik gebelik oranları (Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması).....	46
Tablo 10. Yaş gruplarında canlı doğum oranları (Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması).....	47
Tablo 11. Embriyo transfer gününe göre (3. gün ve 5 gün) Taze ET ve DET gruplarında biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının karşılaştırması	47
Tablo 12. Klivaj dönemi & blast dönemi transfer günleri biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranları, Taze ET ve DET grupları karşılaştırılması	48
Tablo 13. Endometrial kalınlıklarına göre biyokimyasal gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırması	48
Tablo 14. Endometrial kalınlıklarına göre klinik gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırması	49
Tablo 15. Endometrial kalınlıklarına göre canlı doğum oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırması.....	49
Tablo 16. Transfer edilen embriyo sayısının (1 veya 2), Taze ET ve DET gruplarında, biyokimyasal gebelik oranları karşılaştırılması	50
Tablo 17. Transfer edilen embriyo sayısının (1 veya 2), Taze ET ve DET gruplarında, klinik gebelik oranları karşılaştırılması.....	50
Tablo 18. Transfer edilen embriyo sayısının (1 veya 2), Taze ET ve DET gruplarında, canlı doğum oranları karşılaştırılması	50

Tablo 19. Transfer edilen embriyo kalitesine (Grade1 ve 2) göre, Taze ET ve DET yapılan gruplarda, biyokimyasal gebelik oranları karşılaştırılması	51
Tablo 20. Transfer edilen embriyo kalitesine (Grade1 ve 2) göre, Taze ET ve DET yapılan gruplarda, klinik gebelik oranları karşılaştırılması	511
Tablo 21. Transfer edilen embriyo kalitesine (Grade1 ve 2) göre, Taze ET ve DET yapılan gruplarda, canlı doğum oranları karşılaştırılması.....	52
Tablo 22. Transfer edilen embriyo sayısına göre (1 veya 2 embriyo), çoğul gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırılması	52
Tablo 23. Transfer gününe göre (3.gün ve 5.gün), çoğul gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırılması	53
Tablo 24. 3. günde embriyo transferi yapılan vakalarda, progesteron (P4) değerine göre, klinik gebelik oranları; Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması	53
Tablo 25. 5. günde embriyo transferi yapılan vakalarda, progesteron (P4) değerine göre, klinik gebelik oranları; Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması	54
Tablo 26. Canlı doğum haftası dağılımına göre Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması	54

VI.ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Yavaş dondurma yöntemi soğutma hızları	20
Şekil 2. Vitrifikasyon yöntemi soğutma hızları	22
Şekil 3. Normal Sperm Yapısı	24
Şekil 4. Normal Sperm Morfolojisi	24
Şekil 5. Kümüls Oosit Kompleksi	25
Şekil 6. Oosit matürasyonu	26
Şekil 7. Dölllenmiş Yumurta (Zigot)	26
Şekil 8. Anormal döllenme	27
Şekil 9. Klivaj dönemi embriyo kalitelendirme örnekleri	28
Şekil 10. 4. Gün embriyo kalitelendirme örnekleri	29
Şekil 11. Blastokist aşamasındaki ICM ve trafektoderm hücre kitleleri	31
Şekil 12. Blastokist Dönemi Embriyo Kalitelendirme Örnekleri	32
Şekil 13. AHA/ ET/ ET Kateteri	34
Şekil 14. Blastokist evresindeki embriyonun vitrifikasyon yöntemi ile dondurma /çözme aşamaları	41
Şekil 15. Biyopsi uygulanan bir embriyonun vitrifikasyon yöntemi ile dondurma /çözme aşamalarına ait görüntüler	43

1.ÖZET

IVF uygulamalarında kullanılan KOH protokolleri sonucunda çok sayıda embriyonun gelişmesi ve embriyo transferi sonrası halen iyi kalitede emriyonun kalması, PKOS'lu hastalarda OHSS ve ona bağlı komplikasyonların önlenmesi, uterin veya tubaya ait anomalilerin mevcudiyeti embriyoların dondurulmasını gerektiren endikasyonlardır. Dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferi yapılan hasta grubunda kadın yaşı, embriyo dondurma günü, transfer edilen embriyo sayısı, endometriyal kalınlık ve vitrifikasyon yönteminin, çözme sonrası embriyo canlılığına ve klinik gebelik sonuçları üzerine farklı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda dondurulmuş embriyoların transferinde gebelik ve canlı doğum parametrelerini etkileyen faktörleri incelemek istedik. Bu çalışmada embriyoların dondurularak saklanan embriyoların başka bir siklusta çözülerek transferi (DET) planlanmış olan 808 vaka retrospektif olarak incelenmiştir. Çalışmada kadın yaşı, endometrium kalınlığı, transfer günü, P4 hormon değeri ve transfer edilen embriyo sayısına göre biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum sonuçları incelenmiştir. Çalışma için hastalara rutin uygulama dışında herhangi bir tedavi şekli önerilmemiştir. Embriyoların dondurularak saklanması ve saklanan embriyoların başka bir siklusta çözülerek transfer yapılması (DET) yönteminin pek çok avantajı mevcuttur. Bu yöntemle, kadına uzun süren hormon ilaçlarının verilmesi engellendiği gibi tüp bebek işlemindeki gerekli birçok aşamaya ihtiyaç olmayacağı yüksek gebelik oranları elde edilmekte ve çiftlere ekonomik ve psikolojik pek çok avantajlar sağlanmaktadır. Tüm çalışma değerlendirildiğinde,embriyoların dondurularak başka bir siklusta transferi (DET) işlemi Yardımcı Üreme Teknikleri'nde (YÜT) kümülatif olarak başarı şansını arttıran bir yöntem olarak görülmüştür. Ayrıca başarıda endometrium kalınlığının, tek ya da 2 embriyo transferinin blastokist dönemi transferinin önemi anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferi, Kriyoprezervasyon, Polikistik Over Sendromu, OHSS, Vitrifikasyon.

2.ABSTRACT

The Effect of Frozen and Fresh Embryo Transfer on Embryo Vitality and Pregnancy Results

As a result of the KOH protocols used in IVF applications, obtaining multiple embryos, retaining a large number of good quality embryos after embryo transfer, OHSS and related complications in PCOS patients prevention, presence of uterine or tubal anomalies are indications that require embryos to be frozen. In the frozen-thawed embryo transfer group; It is known that embryo freezing day, woman's age, the number of transferred embryos, endometrial thickness and vitrification method have different effects on embryo viability and clinical pregnancy outcomes after thawing. (Loutradi at al., 2008; Lan at al., 2019). In this study, 808 cases with embryos were cryopreserved and transferred by thawing them in another cycle (DET). These cases are examined in a retrospective way. In this study, clinical pregnancy results were examined according to female age, endometrial thickness, transfer date and number of embryos transferred. Patients were not offered any treatment other than routine treatment. There are many advantages to the freeze-storage of embryos and the transfer of thawed embryos by thawing them in another cycle (DET). With this method, long-term treatment of hormone medications to women is prevented and high pregnancy rates, which will not require many stages of in vitro fertilization, are provided and couples are provided with many economic and psychological advantages. When the whole study was evaluated, the transfer of embryos to another cycle (DET) by freezing was seen as a cumulative method for increasing the chances of success in assisted reproduction techniques (ART). In addition, the importance of endometrial thickness, single or two embryo transfer and blastocyst transfer was understood in success.

Keywords: Frozen-thawed embryo transfer, Cryopreservation, Polycystic Over Syndrome, OHSS, Vitrification

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası embriyo gelişimi gerçekleşmiş ancak farklı endikasyonlar sebebiyle embriyoların dondurularak saklanması ve bir başka siklusa transferinin yapılmasının, gebelik sonuçları üzerine pozitif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir(Mosher ve Pratt, 1991).

KOH sikluslarında fazla sayıda oosit elde etmek için kullanılan ovulasyon indüksiyon ilaçları suprafizyolojik seviyelerde steroid hormon üretimine yol açarak endometriyal reseptiviteyi bozar ve implantasyonu düşürür. Farklı endikasyonlar sebebiyle IVF sikluslarında 2/3 lük hasta grubunda embriyoların total veya kısmi olarak dondurulması gerekebilir. Bu endikasyonlardan en önemlisi olan OHSS durumunda ise embriyoların total olarak dondurulması gerekebilir(MacDougall ve Tan, 1993).

Embriyo kriyoprezervasyonu, Yardımla Üreme Teknikleri(YÜT)nin kullanımının yaygınlaşması ile potansiyel fertilitate prezervasyonu için önemli bir alternatif oluşturmuştur. Kriyoprezervasyon uygulamaları fizyolojik olmayan ve yüksek soğutma hızı ile ozmotik değişikliklere ihtiyaç duyan laboratuvar uygulamalarıdır. İnsan embriyolarının kriyoprezervasyonu yardımla üreme teknikleri (YÜT) alanında çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu teknik ayrıca transfer sonrası kalan iyi kalitede embriyolar da dondurularak hastaya ikinci bir transfer şansı verilmesi amaçlanır.

Bu çalışmada, farklı endikasyonlar nedeniyle embriyoları dondurulan hastalarda, başka bir siklusa embriyolar çözülerek transfer planlanmış ve DET siklusundaki endometriyal implantasyona etki eden faktörlerin taze transfer yapılan vakalar ile karşılaştırılması yapılarak bu faktörlerin biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum sonuçları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

İnfertilite, düzenli cinsel ilişkiye rağmen, 6 ay boyunca hiçbir koruyucu yöntem kullanmaksızın gebelik oluşmaması durumudur. İnfertilite toplumdaki çiftlerin %15-30'unu ilgilendiren bir problemdir. Kadın yaşının 35'in üzerinde olduğu çiftlerde ise yumurta rezervinin azalması söz konusu olabileceğinden direkt YÜT'lerine başvurulabilir(Bayer at al.,2008).

Günümüzde infertil çiftlerin tedavisinde yardımcı üreme tekniklerinden; en sık olarak İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) kullanılmaktadır. İnfertilite primer(¹) ve sekonder(²) infertilite olmak üzere ikiye ayrılır. Primer infertilite, bir kadının daha önce hiç gebe kalamamasına, hiç çocuk sahibi olamamasına denir. Sekonder infertilite ise en az bir gebelik gerçekleşmiş ve çocuk doğurmuş olan bir kadının artık gebe kalamamasına denir (WHO. Geneva,1991). Son yıllarda kadınlar arasında kariyer planlamasının ve eğitim düzeyinin artışı, evlilik yaşının ve boşanma oranının artışı, doğum kontrolü, ileri anne olma yaşı gibi nedenlerden dolayı fertilité ve doğum oranları azalmaktadır ve infertilite kliniklerine başvuran hasta sayısında ileri derecede artış bulunmaktadır(Gomel ve Yarali, 1993). İnfertilite nedenleri; %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın sorumludur. %10-15 çiftte ise açıklanamayan infertilite mevcuttur(Berek ve Novak, 2007).

4.1.Erkek Faktörü

İnfertil çiftlerin %30-40'ında erkek faktör infertilitesi tespit edilmektedir. İlk değerlendirmede erkek partnerlerden tıbbi hikaye alınması gerekmektedir. Geçirilmiş ameliyatları, geçirilmiş ateşli hastalıklar, inmemiş testis hikayesi, böbrek hastalığı, diyabet öyküsü, sorgulanmalıdır. Ayrıca erkek infertilitesini etkileyebileceğinden dolayı kullandığı ilaç, tütün ve alkol alışkanlıkları da sorgulanmalıdır(Hakim ve ark.,2004).

Erkek infertilitesini 3 grup altında incelemek mümkündür. Bunlar; sperm üretim bozuklukları, sperm fonksiyon bozuklukları ve reprodüktif kanal sistemindeki anormalliklerdir.

Tedavi yaklaşımını belirlerken ise genetik nedenler, gonadotropin yetmezliği, anatomik nedenler, geçirilmiş enfeksiyonlar, immünolojik ve idiopatik olarak 6 grupta incelenmek mümkündür (Glover ve Barratt,1999).

Erkek infertilitesini belirlemede standart test semen analizidir. Semen analizi testi 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası yapılmalıdır. Semen analizi parametreleri günden güne farklılıklar gösterebilir. Bu sebeple erkek infertilitesini değerlendirirken en az 2-4 hafta ara ile uygun şartlarda yapılmış 2 semen analizinin olması gereklidir. Konsantrasyon, motilite ve morfoloji en önemli semen analizi kriterlerleridir (Orhan,2008).

2010 “WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen” kitabında referans değerleri aşağıdaki gibi verilmiştir (Cooper,2010).

Tablo 1.WHO kriterlerine göre normal semen parametreleri

PARAMETRE	Normal Değerler*
Semen hacmi	1,5 ml
Toplam sperm sayısı	39 milyon
Sperm sayısı	15 milyon
Hareketli sperm sayısı	>%40
İleri hareketli sperm	>%32
Vitalite (canlı sperm)	>%58

*:WHO 2010

(Cooper TG, 2010).

Tablo 2. Kruger kesin kriterlerine göre normal sperm morfolojisi (Kruger vd, 1986).

Baş	Uzunluk 5-6 mikron Genişlik 2.5-3.5 mikron
Akrozom	Başın %40-%70'ini oluşturmali
Boyun	Genişlik 1 mikron Uzunluk 1.5 x baş uzunluğu
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrık olmayan Kırık içermeyen

Eğer semen analizi normal ise erkek partnerin daha fazla incelenmesine gerek yoktur. Gerekli görüldüğü durumlarda anamnez, fizik muayene ve semen analizi testlerine ek olarak, genetik testler, hormonal testler ve radyolojik tanı yöntemlerine de başvurulabilir (Üstün.2011).

4.2.Kadın Faktörü

İnfertil bir çiftte yaklaşımda, kadın faktörünün değerlendirilmesi tanı ve tedavide oldukça önemli bir unsur olup kadından alınan anamnez ve fizik muayene ile başlar. İnfertil kadınların %35 i her yıl medikal yardım için başvurmaktadır. Anamnez esnasında adetlerin düzenli olup olmadığını, anormal kanamaları, üreme sistemine ait enfeksiyon hikayesini, bunların yanında önceki tedavi denemelerini, düşükleri, gebelikleri ve geçirdiğiniz operasyonları sorgulanmalıdır. Ayrıca kadına ait muayenede hirsütizmin sorgulanması ve muayenesi de mutlaka yapılmalıdır(Bayer at al.,2008).

Kadın fertilitesi hipotalamus, hipofiz ve overyan aksın koordinasyonu ve aralarındaki etkileşim sayesinde düzenlenir. Bu sebepten dolayı kadın infertilitesi farklı hastalıklardan, reproduktif sistem, nöroendokrin ve immün sistemin disfonksiyonundan kaynaklanabilmektedir. Kadın infertilitesinin gözlenen en sık sebepleri; ileri kadın yaşı, ovulasyon bozuklukları, tubal faktör, servikal faktör ve açıklanamayan infertilitedir (Smith at al., 2003).

4.2.1. İleri Kadın Yaşı

Yapılan çalışmalara göre infertilite de yaş faktörü oldukça önemlidir.

Buna göre evli kadınların;

- %11.3 veya yaklaşık 2.1 milyon kadın infertildir
- 25-29 yaş aralığında infertilite %7
- 30-34 yaş aralığında infertilite %10.9
- 35-39 yaş aralığında infertilite %10.5
- 40-44 yaş aralığında infertilite % 20.3 oranındadır(Bayer at al.,2008).

Hasta yaşı ilerledikçe, over rezervinin azalmasına bağlı olarak oosit ve embriyo sayısındaki azalma, anöploidi artışına bağlı olarak embriyo fragmantasyon oranının

yükselmesi ve embriyo kalitesinin düşmesi ve tüm bu faktörlerin etkisi ile implantasyon oranındaki azalma ile karşı karşıya kalınmaktadır (Munne at al.,1995).

4.2.2. Ovülatuar Faktör

Ovülasyon bozuklukları kadına bağlı infertilitenin %30-40'lık oranından sorumludur. Bu bozukluklar, amenore, anovulasyon ve adet düzensizlikleriyle kendisini belli eder. Yumurtlamanın olmaması, adet düzensizliklerine bağlı infertilitenin en önemli nedenidir (anovulasyon). Ovulasyon; hipotalamus, hipofiz ve over aksın düzenli çalışmasıyla kontrolü sağlar. Bu aksta meydana gelebilecek bozukluklar sonucunda anovulasyon meydana gelebilir. Anovulasyon tanısı ile birlikte hipotalamus-hipofiz bozuklukları, polikistik over sendromu (PKOS), prematüre over yetmezliği ve hipotiroidizm gibi hastalıklar düşünülmelidir (Miller at al.,1999).

Ovülasyonun tayini için, ultrasonografi (USG) ile ovulasyon takibi yapılarak, serumda bazal FSH, E2 ve P4 hormon düzeylerinin bakılması mümkündür. Ayrıca Klomifen sitrat uyarı testi (CCCT) ile de over rezervi kontrol edilerek overlerin cevabı gözlenir. Bu test özellikle 40 yaşın üzerinde veya ailede prematür over yetmezliği bulunan kadınlarda kullanılır(Fanchin at al.,1994).

4.2.3. Tubal Faktör

İnfertil kadınların yaklaşık %20'sinde tubal ya da peritoneal faktör bulunmaktadır. Risk faktörleri içinde; geçirilmiş ektopik gebelik öyküsü, rüptüre appendisk, RİA kullanımı öyküsü ve pelvik enflamatuvar hastalık öyküsü mevcuttur. Asemptomatik pelvik enfeksiyon geçirilmiş olma ihtimali de vardır. Başlıca tanı yöntemleri histerosalpingografi (HSG) ve laparoskopidir (L/S). HSG ile normal kaviteye sahip uterin-tuba yapısının gözlenmesi, kavite ve her iki tubaya ait dolum defektinin olmayışı ile teyid edilir. Tanısal bir araç olmasının yanında HSG 'nin terapötik faydaları da vardır.(Bayer at al., 2008).

4.2.4. Servikal Faktör

Serviks üremede önemli bir rol oynar. Serviks sperme geçiş yolu sağlayarak, önce uterin kaviteye sonra da fallopian tüplere ulaşmasına izin verir. İnfertil olguların % 5-10 kadarında servikal faktör etkilidir. E2 servikal mukusun miktar ve kıvamını artırır.

Mukusta meydana gelen enfeksiyon ve immünolojik problemler infertiliteye sebebiyet verir.

Servikal faktör şüphesini, tıbbi geçmişteki anormal PAP smear, geçirilmiş LEEP uygulaması, postkoital kanama, kriyoterapi, koniazasyon gibi uygulamaların mevcudiyeti arttırır(Bayer at al.,2008).Servikal mukus yeterliliğini ve sperm-mukus etkileşimini değerlendirmek için postkoital test kullanılır. Mukusun incelenmesinde hareketli spermatozoa görüldüğünde postkoital test pozitif kabul edilmeli ve servikal faktör düşünülmemelidir. (Eimers at al.,1994).

4.2.5. Açıklanamayan/ İzah Edilemeyen İnfertilite(UEI)

Nedene yönelik değerlendirme sonucunda infertiliteyi izah edecek bir problem saptanmayan olgular açıklanamayan infertilite(Unexplained Infertility; UEI) olarak adlandırılır.

Bu çiftlerde, infertilite süresi 2 yılı aşmış olmasına karşın, semen analizinde kriterlerin normal sınırlarda, ovülasyonun düzenli, hormonal profil sınırlarda, uterin kavitenin normal yapıda ve tubal pasajın açık olduğu gözlenir. İnfertil hasta grubunun yaklaşık %5-25'lik bir bölümünü açıklanamayan infertilite olguları kapsamaktadır.(Kahraman ve Yakın, 2000)

UEI 'nin olası nedenleri olarak, anormal servikal sekresyonlar, erken implantasyonda defektleri, endometrial reseptivite anormallikleri, anormal tuba-silia aktivitesi, ovulasyon mekanizmasındaki bozukluklar, lüteinize anovulatuvar follikül sendromu, hormonal anomaliler, bozulmuş oosit veya sperm fertilizasyon kapasitesi, endometriozis, immünolojik faktörler, bozulmuş peritoneal sıvı antioksidan fonksiyonu, implantasyon başarısızlıkları olarak gözlenir. (Preutthipan ve Linasmita, 2003)

4.2.6. Polikistik Over Sendromu (PKOS)

Polikistik over sendromu (PKOS) kendini kronik anovulasyon, menstürel düzensizlikler, hirsütizm, oligomenore, disfonksiyonel kanamalar ve infertilite ile gösteren genetik alt yapısı olan bir sendromdur. PKOS vakalarında genetik alt yapının olduğuna dair yapılan bir çalışma da insan lökosit antijen (HLA) Drw 6 frekansının arttığı ve 6. kromozom üzerindeki HLA-DR bölgesinin PKOS gelişimi ile ilgili olduğu

gösterilmiştir (Hague at al.,1990). Tanısı öncelikli olarak USG ile konulurken kanda FSH / LH hormon düzeyleri bakılarak da teyid edilir.

PKOS'da Lüteinizan hormon (LH) yüksekliği %50 oranında iken folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyesi düşük ya da normaldir. USG ile yapılan kontrollerde ise over dokusunda 10'dan fazla antral follikül gözlenir.

Tablo 3. PKOS tanı kriterleri

<p><u>PKOS Tanı Kriterleri</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Oligo/anovulasyon• Hiperandrojenizm klinik ve/veya biyokimyasal bulguların varlığı• Ultrasonografide polikistik overlerin görüntülenmesi olarak belirlenmiştir.	 <p>Uterus Haf. High Per. 105G Gn. 1 C1 / M5 P4 / L3 SRI H Low</p>
---	--

(Rotterdam ESHRE/ASRM-2004)

2003'de Rotterdam kriterleri oluşturularak polikistik over tanısı için belirlenen 3 kriterden en az ikisinin bulunması gerektiği bildirildi. (Rotterdam ESHRE/ASRM-2004)

Bu üç kriter:

- Oligo ve/veya anovulasyon izlenmesi
- Hiperandrojenizm klinik ve/veya biyokimyasal bulguların varlığı
- Ultrasonografide polikistik overlerin görüntülenmesi olarak belirlenmiştir.

LH aktivitesinin artışı PKOS olgularındaki overlerde granuloza ve teka hücrelerindeki LH reseptör aşırı salınımına bağlıdır. Yüksek LH seviyelerinin etkisi ile PKOS'da teka hücrelerinin aşırı sentezlenmesiyle ovaryan androjenlerde yükseliş görülmektedir (Karadeniz, 1996).

4.2.6.1. Polikistik Over Sendromunun (PKOS) Belirti ve Bulguları

Başlıca klinik özellikler; hiperandrojenizm bulguları, obezite, kronik anovulasyon ve infertilitedir.

- **Hiperandrojenizm**

PKOS'da Lüteinizan hormon (LH) yüksekliği %50 oranında iken folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyesi düşük ya da normaldir. LH aktivitesinin artışı PKOS olgularındaki overlerde granuloza ve teka hücrelerindeki LH reseptör over ekspresyonuna bağlıdır. Yüksek LH seviyelerinin etkisi ile PKOS'da teka hücrelerinin aşırı sentezlenmesiyle ovaryan androjenlerde yükselme görülmektedir (Karadeniz, 1996). Polikistik over sendromunda en sık görülen hiperandrojenizm bulgusu hirsutizmdir. Hirsutizm modifiye Ferriman-Gallwey skalası ile değerlendirilir (Hatch at al.,1981). Bu metot ile üst dudak, göğüs bölgesi, sırtın alt ve üst kısımları, çene, alt ve üst abdomen, kol ve bacakların üst kısımları olmak üzere toplam dokuz alanda kıl dağılımı 0-4 arasında skorlandırılarak toplam Ferriman-Gallwey skoru ≥ 6 hirsutizm olarak tanımlanır.

- **Obezite**

PKOS hastalarında %50-70'lik insülin rezistansı bulunmaktadır (DeUgarte at al.,2005). Hiperinsülinemi ve insülin direnci PKOS'lu kadınların kilosu normal seviyede olanlarda %30, obez olanlarda ise %75 lik bir kısmında görülür. İnsülin direncinin altında yatan sebep tam olarak saptanamamıştır. İnsülin reseptör sayısındaki düşüşler, insülin reseptörüne bağlı sinyal iletimindeki değişiklikler, reseptör fosforilasyonundaki bozukluklar ve post reseptör defekt insülin direncinin gelişmesinde rol oynar. (Legro at al., 1998)

- **Kronik anovulasyon**

PKOS da kronik anovulasyon, anormal follikülogenezisi yansıtır. PKOS da dolaşımdaki FSH un düşük, LH ve AMH nin yüksek olması nedeniyle granuloza hücrelerinde aromataz sisteminin tam olarak aktive olmaması ve LH reseptörlerinin oluşmaması sonucunda anormal follikülogenezis görülür (Ebner vd,2006). İnfertil çiftlerin %15'de sorun ovulasyon bozukluklarından kaynaklanmakta iken kadına bağlı infertilite nedenleri arasında ise ovulasyon bozukluğu %40 gibi yüksek bir seviyededir. PKOS olgularda az da olsa spontan ovulasyon oluşabilir ve gebelik görülebilir

PKOS'da infertilitenin başlıca nedeni anovulasyon olmasına rağmen, bu hastalarda erken gebelik kayıpları da görülebilir. Yüksek LH ve tonik LH salınımı endometriumun kalitesini bozarak implantasyonu engeller ve erken gebelik kayıpları

ortaya çıkar. LH yüksekliği oosit için uygun olmayan ortam ve olgunlaşma dışında, birinci mayotik bölünmenin erken tamamlanması sonucu da erken gebelik kaybına neden olabilir (Cocksedge at al.,2008)

- **Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)**

Over hiperstimülasyon sendromu (OHSS), yumurtalıklarında çok sayıda yumurta bulunan polikistik overli hastalarda uyarıcı hormonal tedaviye aşırı yanıt sonucunda gelişebilen riskli bir durumdur. Bu olgularda tüm embriyolar dondurulup, kadında hayati risk oluşturan OHSS tablosunun gerilemesinden sonra başka bir adet siklusunda embriyoların çözülerek transfer işlemi gerçekleştirilmesi, OHSS tablosunun yaratabileceği yan etkilerden korunmayı ve hatta OHSS tablosunun gelişimini engellemekte kullanılan en etkili yöntemdir.

OHSS'unda, artan kapiller geçirgenlik sonucu proteinden zengin sıvı intravasküler aralığı terkeder. Buna bağlı olarak hemokonsantrasyon, üçüncü boşluklarda sıvı birikimi ve bütün bunların klinige yansımaları ile abdominal gerginlik, asit, hipovolemi, oligüri, plevral ve/veya perikardiak efüzyon, böbrek, karaciger ve solunum yetersizliği ortaya çıkabilir (Delvigne, 2009).OHSS hafif, orta, şiddetli ve kritik olarak dört sınıfta incelenir.

OHSS'yi tedavi etmekten ziyade oluşumunu engellemek hedeflenmelidir. Bunun için riskli hasta grubu iyi belirlenmelidir. OHSS' nin bilinen risk faktörleri şunlardır;

- Geçirilmiş OHSS öyküsü
- Usg ile PKO tespit edilmesi (>8 antral folikül varlığı)
- Kanda AMH' nun >3,3ng/mL olması
- KOH'a cevap veren folikül sayısı fazlalılığı(>10mm üzeri >20 adet follikül)
- Ovülasyon indüksiyonunda hızlı yükselen E2 konsantrasyonu cevabı
- OPU'da toplanan oosit sayısının yüksek olması
- Luteal faz desteği için progesteron yerine HCG kullanmak
- Gebelik ve çoğul gebelik (Delvigne, 2009).

- Düşük BMI olan zayıf vücut yapılı hastalar da riskli gruba oluşturur. (Ryley ve Bayer vd,2004)

GnRH agonisti ve gonadotropin tedavisi kullanılan hastalarda OHSS riski artmaktadır. PKOS'lu hastalarda KOH sonrası gebelik oluşması durumunda, özellikle çoğul gebelik ve molar gebelik durumlarında OHSS riski artar. Luteal fazın HCG ile desteklendiği durumlarda da OHSS riski artar. (Kyrou1 ve Kolibianakis, 2011)

OHSS'nin oluşmasını engellemek için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bunlardan en sık başvurulan hCG 'nin verilmemesi veya geciktirilmesidir (Coasting). (Waldenstöm at al.,1999) OHSS nin önlenmesi için uygulanan diğer bir yöntemde, oosit matürasyonunu sağlayan HCG yerine GnRH agonist ile LH nin tetiklenmesidir (Kyrou and Kolibianakis, 2011).

Tablo 4. OHSS risk faktörleri ve önlenmesi

OHSS Risk Faktörleri	OHSS Önlenmesi
Genç Yaş	Antagonist siklusta agonist triggering
Düşük BMI	Step-up protokol seçimi
PKOS	Siklus iptali
Yüksek Doz Gonadotropin	HCG iptali
Yüksek E2	Total embriyo dondurma
OHSS Öyküsü	Coasting (ilaçsız gün)
Hırşutismus	Metformin

(ASRM 2008)

Bir başka yaygın yöntem olan ve aynı siklusta transfer işleminin yapılmayarak tüm gelişen embriyoların dondurulması ve OHSS bulgularının olmadığı başka bir siklusta endometrium hazırlığı yapılarak dondurulmuş olan embriyoların çözülmesi sonrasında transfer işleminin gerçekleştirilmesidir (Battaglia at al.,2010).

4.3.Yardımcı Üreme Tekniklerinde Kriyoprezervasyon

1776'da İtalya'da hayvan spermlerinin kontrollü yavaş dondurması ile kriyoprezervasyon ilk kez gerçekleştirilmiştir. 1938 yılında bu yöntemle dondurulmuş spermlerde çözme sonrası hareketlilik tespit edilmiştir. 1947 yılında tavşan oositlerinin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir.

İlk başarılı embriyo dondurma işlemi ise 1972 yılında Whittingham ve arkadaşları tarafından fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Wilmot ve Rowson, dondurup- çözüldükleri sığır embriyolarından gebelik elde ettiklerini bildirmiştir. Yapılan bu ilk çalışmalarda DMSO (dimetilsülfoksit) kriyoprotektan olarak kullanılmış ve dakikada 0.2°C'lik bir soğutma hızı uygulanmıştır. Sonraki yıllarda farklı hayvan ve insan embriyoları başarılı şekilde dondurulmuştur (Bağış vd, 2002).

1977 yılında dondurulup çözülen fare oositleriyle fertilizasyon ve oositlerle gerçekleştirelen canlı doğumlar bildirilmiştir.

1983 yılında insanlarda ilk kez IVF sonrası dondurulup çözülmüş embriyolarla elde edilen gebelik gerçekleştirilmiş, İlk canlı doğum 1984 yılında gerçekleşmiştir. (Breadkjaer vd 2001). 1986 yılında ise ilk kez IVF sonrası dondurulup çözülmüş olgun oositler ile gebelik elde edilmiştir.

Geçirilmiş yumurtalık cerrahisi, aile geçmişinde erken menapoz öyküsü, kemoterapi veya radyoterapi hikayesi olan kadınlarda fertilitenin korunması için uygulanan oosit, embriyo ve over doku kriyoprezervasyonu yöntemleri yeni gelişmelere açıktır.

4.3.1. Kriyoprezervasyon Endikasyonları

Kriyoprezervasyon hücre ve dokuların çözülme işlemi sonrası kullanılmak amacıyla dondurulmasıdır. Hücreler veya dokular sıfır derecenin altında, 77 K ya da -196 oC de sıvı azot (likit N) içerisinde kontrollü olarak soğutularak korunur. Bu işlemin temel amacı hücrelerin tüm biyolojik aktivitesinin korunması ve programlanmış hücre ölümünün durdurulmasıdır (Gosden, 1994).

IVF uygulamalarında kullanılan süper ovülasyon protokolleri sonucunda çok sayıda embriyonun elde edilmesi, embriyo transferi sonrası çok sayıda iyi kalitede emriyonun kalması, sınırlı sayıda embriyo transferi ile yüksek gebelik oranlarının elde edilebilmesi ve buna bağlı olarak çoğul gebelik oranlarının düşürülmesi, PKOS'lu hastalarda OHSS ve ona bağlı komplikasyonların önlenmesi, uterin veya tubaya ait anomalilerin mevcudiyeti embriyoların dondurulmasını gerektiren endikasyonlardır.

Tablo 5. Embriyo dondurma endikasyonları

1.	Hormon tedavisi ile yumurtalıkları aşırı uyarılmış ovarian hiperstimülasyon sendromu (OHSS) riski olan vakalarda
2.	Taze transfer sonrası kalan iyi kalite embriyoların varlığında
3.	Preimplantasyon genetik tanı (PGT) yapılacak olgularda
4.	Endometrium (rahim içi zarı) kalınlığının gebelik için yeterli olmaması
5.	Cerrahi girişim ya da tedavi gerektiren acil durumlarda
6.	Tedavi seyrinde saptanan polip, myom veya rahim içi yapışıklık gibi tutunma şansını kötü yönde etkileyebilecek durumlarda
7.	Tekrarlayan tutunma başarısızlığı olgularında rahim içi alıcılığı arttırmak amacı ile dondurulabilmektedir.

(Battaglia at al.,2010)

Embriyoların dondurularak saklanması ve saklanan embriyoların başka bir siklusa çözülerek transfer yapılması(DET) yönteminin pek çok avantajı mevcuttur. Tüp bebek denemesinde gebelik elde edilememesi, gebelik elde edildiği halde düşükle sonlanması veya doğumla sonlanan bir gebelikten sonra çiftin tekrar bir bebek dünyaya getirmeye karar vermesi durumunda, daha önce kendi sperm ve yumurta hücrelerinin döllenişle elde edilen ve dondurulan embriyoları çözülüp kadın rahmine yerleştirilerek gebelik sağlanabilir. Bu yöntemle, kadına uzun süren hormon ilaçlarının verilmesi engellendiği gibi tüp bebek işlemindeki gerekli birçok aşamaya ihtiyaç olmayacağı için çiftlere ekonomik ve psikolojik pek çok avantajlar sağlanmaktadır.

Teknik olarak çok daha uzun süreler saklanabilmesine rağmen, ülkemizde embriyoların dondurularak saklanma süresi “Sağlık Bakanlığı Üremeye Yardımcı Teknikler Üst Kurulu”nun hazırladığı yönetmelik gereğince 5 yıl olarak

sınırlandırılmıştır. Yine bu yönetmeliğe göre embriyo dondurma ve çözme işlemi ancak eşlerin yazılı onayıyla gerçekleştirilebilmekte, çiftin boşanması, eşlerden birinin ölümü veya saklama süresinin dolması durumunda saklanan embriyolar imha edilmektedir. (ÜYTE Yönetmeliği, 2014)

Tüm açılarıyla değerlendirildiğinde embriyo dondurma işlemi Yardımcı Üreme Teknikleri'nde (YÜT) kümülatif olarak başarı şansını arttıran bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Balaban, 2008).

4.3.2. Kriyopreservasyon Teknikleri

Embriyo dondurma işlemi, dondurulacak embriyonun kryoporotektan ile kaplanarak kademeli veya çok hızlı soğutulması ve daha sonra sıvı nitrojen içerisinde -196 °C'de saklanması aşamalarından oluşur. Sıvı nitrojenin sahip olduğu ısıda (-196 °C) hücre siklusu devam etmemektedir. Dondurma işleminin başlangıcında , -5 ile -15°C arasında soğutma sağlanırken ortamda buz kristallerinin oluşması durumunda, kontrolsüz oluşan buz kristalleri hücre yapısına zarar vererek embriyonun çözme sonrası dejenerasyonuna ve canlılığını koruyamamasına yol açarlar. Sıvı nitrojen içerisinde bulunan bir embriyoyu yaşamsal yönden etkileyebilecek en önemli faktör dış ortamda bulunan ve DNA üzerinde mutajenik etkisi bulunan radyasyondur.

4.3.3. Kriyoprezervasyon Esnasında İzlenen Hücresel Değişiklikler

Sıcaklık azaldıkça hücrelerin içinde bulunan solusyonda fiziksel ve kimyasal değişiklikler izlenmektedir. Bu değişiklikler sırası ile aşağıda özetlenmiştir;

- 1.** Solusyon içinde bulunan çözülmüş gazların çözünürlüğü azalır. Dondurma sıvısı %6'lık CO₂ ile inkübe edilmiş sodyum bikarbonat içeriyor ise gazların çözünürlüğünün azalması hava kabarcıklarının oluşmasına ve hücrelerin zarar görmesine neden olabilir.
- 2.** Ortamda bulunan su sıvı fazdan katı faza geçmeye başlar ve saf buz kristalleri oluşturur. Bu sırada ortamda kalan sıvı fazdaki su mevcut tuz için çözücü görevi görür ve sonuçta ortamda oldukça viskoz bir tuz solusyonu oluşur. Sıcaklık düştükçe buz kristalleri artarak, hücre zarına baskı yapar ve zarar verebilir.

3. Sıcaklık azaldıkça saf su kristallerinin miktarı daha da artar ve ekstrasellüler ortamda bulunan tuz için çözücü görevi görecektir olan sıvı fazdaki suyun miktarı iyice azalır. Sıcaklık belli bir noktaya gelince (kültür ortamı için $-10,-17^{\circ}\text{C}$, sodyum klorid için -21°C) oluşan viskoz tuz solusyonu kristalleşmeye başlar. Bu yüzden kryoprotektan maddeler kullanılmaz ise molarite yükselir ve pH’da büyük değişiklikler olur. Bu durum solusyon etkisi’ olarak adlandırılır. Solusyon etkisi lipoproteinlerin yapısını bozar ve hücre zarının zarar görmesine neden olur.

4. Hücre dışı ortamdaki tuz konsantrasyonunun artması hücre içinde bulunan suyun ozmotik basınçtan dolayı dışarı çıkmasına neden olur ve hücrede pasif dehidrasyona bağlı büzülme izlenir. Hücre hacmindeki azalma belli bir aşamadan sonra stoplazmik yapıya geri dönüşümsüz zararlar verir ve hücre ölür. Bu yüzden özellikle oosit ve embriyo gibi yüksek miktarda su içeren hücrelerin dondurulması sırasında başarılı sonuçlar elde etmek için kryoprotektan sıvıların mutlaka kullanılması gerekmektedir (Balaban, 2008).

Dondurma işlemi sırasında, embriyonun içerisinde bulunan solüsyonda izlenen değişiklikleri kontrol etmek için 3 temel yöntem izlenir.

- **Dondurma ve Çözme Hızlarının Kontrolü**

Soğutma ve dondurma hızı da dondurma işleminin başarısında etkili olan önemli bir faktördür. Dondurma hızı arttıkça intrasellüler buz kristalleri oluşma olasılığı artar. Her hücre için farklı bir optimum donma hızı vardır. Bu hız özellikle hücrenin hacmine ve membran yapısına bağlıdır. Bu faktörler suyun, iyonların ve metabolitlerin difüzyon hızını belirler.

- **Kriyoprotektanların Kullanılması**

Dondurma hızının kontrolü uygun oranlarda vitalite ve klivaj elde etmek için tek başına yeterli değildir, aynı zamanda kryoprotektan maddelerin de kullanılması gereklidir. Gliserolün kryoprotektan etkisi Polge tarafından 1949 yılında spermler üzerinde yapılan çalışmalar sırasında bulunmuştur. Günümüzde farklı non-toksik kimyasalların kryoprotektan olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir.

- **Seeding işlemi**

Kryoprotektanlar buz kristalleri oluşumu öncesi yaklaşık -15 °C'ye ulaşırlar (supercooling). Bu durumda oluşan ısı ortam sıcaklığını yükseltir ve lineer şekilde azalması gereken sıcaklıkta sapma izlenir. Embriyo dondurma işleminin başarısı için supercooling olayının engellenmesi gerekir. Whittingham supercooling'i engellemeden dondurmuş olduğu 8 hücreli fare embriyolarının canlılığını sürdürmediğini bildirmiştir. Supercooling'i engellemenin yolu sıvı nitrojen içerisine batırılmış forseps ile dondurma çubuklarına kısa bir süre dokunmak ve buz kristallerinin oluşumunu sağlamaktır. Bu işleme 'seeding' adı verilir ve ideal olarak -7 °C'de yapılması gerekliydi (Delilbaşı, 2008).

4.3.4. Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılan Kriyoprotektan Maddeler

Kriyoprotektan maddeler hücre membranından geçebilen (permeabl); İntrasellüler, ya da büyük molekül ağırlıklı hücre zarından geçemeyen (non-permeable); Ekstrasellüler özelliklerdedir (Palasz ve Mapletoft, 1996). Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptirler ve dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol (EG), 1.2 propanediol, 2.3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkollerini kapsamaktadır.

Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise, (glikoz, sükroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı sakkaritler) ve yüksek molekül ağırlıklı polimer karakterli (polivinil alkol (PVA), polivinil pirrolidon (PVP) ve diğer bazı polimerler kriyoprotektanlardır (Balaban 2008). Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar donma işlemi süresince şekillenen buz kristallerinin oluşumunu azaltarak ve soğutmadan önce hücreleri dehidre ederek gösterirler.

Aynı zamanda kriyoprotektanlar hücreleri yüksek konsantrasyonda tuz ile çevrelediğinden hücreleri yoğun dehidratasyona maruz kalmalarını sağlayarak da korumaktadırlar.

Oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu için en sık kullanılan kriyoprotektanlar, gliserol, etilen glikol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve 1, 2-propanediol (PROH) dür.

Kryoprotektanlar suda çözünüp, su molekülleri ile hidrojen bağı oluşturabilir ve hücre içine girebilirler. Kryoprotektanların aktivitesi solusyonların donma noktasını düşürmesine ve sıvı içerisindeki tuz ve diğer çözümlerin miktarının azalmasını sağlamasına bağlıdır. Ayrıca, kryoprotektanlar buz oluşum hızını da düşürerek oluşan buz kristallerinin şeklini değiştirebilirler. Embriyonun ileri gelişimini kötü yönde etkilememesi için, kryoprotektanların çözme sonrası ortamdan mümkün olduğunca hızlı bir şekilde uzaklaştırılması gerekmektedir.

Sukroz hücre içine penetre olmaz fakat osmotik basıncı arttırarak kryoprotektan gibi davranır. Osmotik basınç artınca hücre içinde bulunan su hücre dışına çıkar (dehidrasyon). Bu nedenle aynı dondurma solusyonunun içinde, hücre içine giremeyen kryoprotektan dehidrasyona sebep olurken, hücre içine girebilen kryoprotektan suyun yerini alır ve intrasellüler buz kristalleri oluşma riskini azaltır. Çözme esnasında kullanılabilen ve hücre içine giremeyen kryoprotektan, osmotik basıncı ayarlama özelliği sayesinde kryoprotektanın hücre dışına çıkması sırasında fazla ve hızlı su girişini engeller. (Palasz ve Mapletopt, 1996).

Tablo 6. Hücre membranından geçebilme özelliklerine göre kriyoprotektan çeşitleri

İntrasellüler Kriyoprotektanlar	Ekstrasellüler Kriyoprotektanlar	
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Makromoleküller	Sakkaritler
Gliserol	Dekstran	Glukoz
Etilen Glikol (EG)	Ficoll 70	Sükroz
Propilen Glikol (PROH)	Polivinilprolidon	Trehaloz
2,3 Bütanediol	Bovin serum albumin (BSA)	Galaktoz
Dimetilasetamid (DMA)	Mannitol	Raffinoz

(Luz Holanda, 2009)

İnsan embriyolarının her aşamasında dondurma işlemi için en uygun kriyoprotektan DMSO'dur (Trounson vd, 1983; Van der Elst, 1995). Gliserol, DMSO'ya kıyasla daha düşük bir toksisiteye sahip olmasına rağmen hücre içersine girme hızı

DMSO'dan daha düşüktür. Bu sebepten dolayı hücre üzerindeki ozmotik stresin kontrolü için en çok tercih edilen kriyoprotektan DMSO'dur.

4.3.5. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Embriyoların kriyoprezervasyon uygulaması için 3 temel yöntem geliştirilmiştir.

- 1) Klasik yavaş dondurma protokolü (slow-freezing)
- 2) Hızlı dondurma (rapid-freezing)
- 3) Vitrifikasyon (camlaştırma) olmak üzere aşağıdaki gibi 3 ana gruba ayrılır.

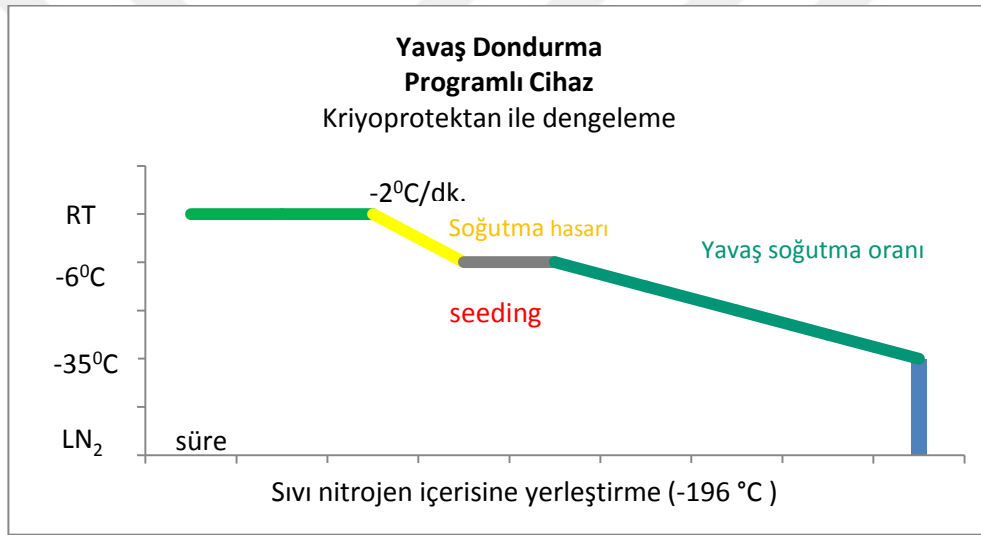
4.3.5.1. Klasik Yavaş Dondurma (Slow Freezing)

Klasik yavaş dondurma yönteminde, programlanmış bir soğuma hızını sağlayabilmek için planner cihazı kullanılır. Planer cihazı ile amaçlanan programlı yavaş dondurma esnasında oda ısısından -6°C 'a kadar $2^{\circ}\text{C}/\text{dk}$. soğuma hızı sağlanır. Yavaş dondurma işleminde buz kristali oluşumu manuel olarak yapılan seeding(tohumlama) işlemi ile embriyodan uzak bölgeden başlatılarak kontrol altında tutulur(Elder and Dale, 2000).

- Yavaş dondurma protokolü birkaç farklı aşamada dondurma aşaması ile gerçekleştirir.
- Düşük yoğunlukta kriyoprotektan kullanılır.
- Embriyoların GL, EG, DMSO ya da PGL gibi hücre içine nüfuz edebilen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlardan birisinin değişik molar konsantrasyonlarındaki çözeltileri kullanılır.
- Planer cihazı aracılığıyla -30°C ile -70°C arasındaki bir sıcaklığa ulaşmaya kadar kademeli yavaş soğutma yani $-0.2-2^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ soğutma hızı sağlanır.
- Kriyoprotektan çözeltisi ve embriyo arasında ozmotik dengeyi (ekilibasyonu) sağlamak amacıyla, oda ısısında (RT) işlem yapılır.
- Buz kristallerinin oluşumunun -5°C ile -6°C 'ler arasında başlatılması planlanır.
- Kriyoprotektanlar buz kristalleri oluşumu öncesi yaklaşık -15°C 'ye ulaşırlar (supercooling).

- Buz kristali oluşumu manuel olarak yapılan seeding işlemi ile embriyodan uzak bölgeden başlatılarak kontrol altında tutulur.
- -196 °C soğutma sağlandığında örnekler sıvı azot içersine daldırılır ve saklanır.

Yavaş dondurma yönteminde soğuma hızının planlanandan hızlı olması durumunda düşük yoğunlukta kriyoprotektan kullanılmasına bağlı olarak hücre içinde buz kristalleri oluşması ve hücre hasarı gözlenmesi mümkündür. Soğuma hızının planlananda yavaş yapıldığı durumlarda ise kriyoprotektana maruz kalma süresinin artmasından dolayı hücreler hasara uğrayabilmektedir.



Şekil 1. Yavaş dondurma yöntemi soğutma hızları

4.3.5.2.Hızlı Dondurma (Rapid Freezing)

Hızlı dondurma, ağırlıklı olarak sperm dondurma işlemlerinde kullanılan bir yöntemdir. Dondurulacak olan doku veya hücelere yüksek donma hızlarının (dakikada yaklaşık 1200-1250°C) uygulanmasından önce, bir ara basamak olarak yaklaşık -80°C ta sıvı azot buharında bekletilmesi sağlanır. Bu şekilde hücrelerin kısmen dehidrate edilmesi sağlanır. Bu aşamadan sonra dondurulan materyal direkt -196 °C sıvı azot içersine daldırılır.

Bu yöntemde kriyoprtektan olarak GL, PrOH, DMSO ya da EG gibi hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanlardan ve sükroz, trehaloz, laktoz ya da galaktoz gibi hücre

içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlar ile karıştırılarak elde edilen dondurma çözeltilerinin kullanılır (Cseh vd, 1997).

4.3.5.3.Vitrifikasyon

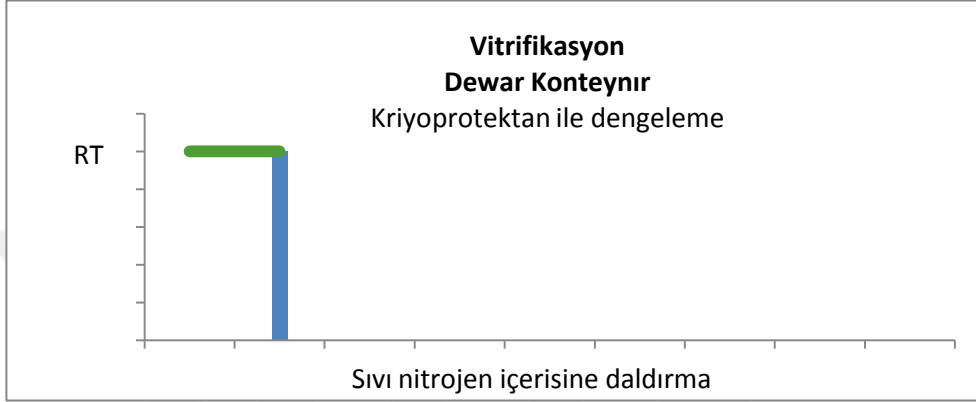
Vitrifikasyon yöntemi, yüksek kriyoprotektan yoğunluğu ile yüksek soğutma hızı (20000-22000 dk/°C) sağlanarak buz kristali oluşmadan dondurulacak materyalin veya hücrenin direkt camlaştırılması vitrifiye edilmesi) ile dondurulması yöntemidir. (Stachecki and Cohen, 2004). Vitrifikasyon yöntemi ile oosit, klivaj dönemi embriyo, 5. veya 6.gün blastokist aşamasındaki embriyolar, endometrial hücreler, over dokusu ve hatta organlar camlaştırılarak dondurulabilir. Bu yöntemde amaç buz kristallerinin oluşturulmaması esasına dayanır.

- Vitrifikasyon için öncelikli olarak hücrelerin ekilibrium(dengelenme) solüsyonu içersinde bekletilerek dengelenmesi sağlanır.
- İkinci aşamada ise hücreler yüksek yoğunluktaki kriyoprtektana kısa süreli (30-45 sn) olarak maruz bırakılır. Vitrifikasyonda en çok kullanılan kriyoprotektanlar DMSO ve gliserol'dür.
- Vitrifikasyon tekniğinde yüksek kriyoprotektanlar yoğunluğu içeren solüsyonlar kullanılmaktadır. Ancak kullanılan kriyoprotektan miktarı oldukça düşüktür.
- Vitrifikasyon tekniğinde sıcaklığın ani düşürülmesi çok önemlidir. Ani ısı düşüşüyle birlikte hücre etrafında cam bir katı yüzey oluşturularak koruma amaçlanır.

Dondurulacak materyal ekilibrium aşamasından sonra kriyoprotektan madde ile kaplanarak direkt sıvı azota daldırılır ve yüksek soğutma hızı sağlanır. Vitrifikasyon için gereken kriyoprotektan miktarı azalmakta, böylece toksik hasar riski düşmektedir. Soğuğa duyarlı olan biyolojik yapıların zarar gördüğü, sıcaklık dereceleri olan -5 ila -15°C arası hızla geçilerek buz oluşumu engellenmiş olur.

Vitrifikasyon yönteminde de soğuma hızının yeterince hızlı yapılması durumunda buz kristalleri oluşarak camlaşmanın tam gerçekleşmemesi söz konusu olabilir. Bu durum çözüldüğünde hücrelerin hasar görmesine sebep olur (Begin at al.,2003).

Vitrifikasyon yönteminde oluşabilecek bir diğer risk de hücrelerin ekilibrium süresinin yetersiz gelmesi ve hücre içine girmesi gereken kriyoprotektan ile hücre dışına çıkması gereken suyun yer değiştirememesinden kaynaklanır.(Vanderzwalmen vd, 2004)



Şekil 2. Vitrifikasyon yöntemi soğutma hızları

Embriyolar 1.günden 6. güne kadar gelişimlerinin her aşamasında dondurulabilmektedir. Günümüzde oosit ve blastokist aşamasında vitrifikasyon yöntemi ile daha verimli sonuçlar elde ediliyorken, yavaş dondurma yöntemiyle ise PN ve erken klivaj dönemi embriyolarda daha verimli sonuçlar alınmıştır. Hızlı dondurma yöntemi ise ağırlıklı olarak sperm dondurma işlemlerinde kullanılan bir yöntemdir.(Kuwayama 2005)

4.3.6. Embriyo Çözdürme

Embriyoların çözdürülme işlemi için belirlenen siklusta kadın rahim içi(endometrium) hazırlığının yapılması implantasyonun elde edilmesi için önemlidir. Dondurulmuş çözülmüş embriyo transferleri (DET) planlandığında ise, endometrium hazırlığı doğal(natürel) siklus seyrinde, USG ve kan E2, P4 düzeyleri takip edilerek endometriumun implantasyon için en uygun zamanının dondurulan embriyonun günü ile senkronizasyonunu sağlandıktan sonra transfer işlemi gerçekleştirilir veya menstürasyonum birinci gününden itibaren programlanmış olarak, sadece endometrium desteği sağlanarak yine dondurulmuş olan embriyonun günü ile rahim içinin senkronizasyonu sağlanır.

Embriyoların çözdürme işlem (thawing veya warming), embriyoları taşıyan strow, vial veya embriyoları içerisinde bulunduran taşıyıcının, sıvı azottan çıkarıldıktan sonra, genellikle 1 M süzkroz içerisinde direkt daldırılarak çözülmesi ile gerçekleştirilir. Daha sonra sırası ile 0,5 M süzkroz - 0,25 M süzkroz ve 0,125 M süzkroz solüsyonlarında belirli sürelerde bekletilirler. Kriyoprotektanların uzaklaştırılması için süzkroz, trehaloz veya galaktoz gibi hücre içine nüfuz edemeyen şekerler kullanılmaktadır. Bu maddelerin ortamda bulunması sebebiyle kriyoprotektan madde yoğunluk farkından dolayı hücre dışına çıkar. Son olarak PBS-HSA solüsyonu içerisinde yıkanan embriyo kriyoprotektanlardan tamamen uzaklaştırılarak uygun kültür ortamına alınırlar (Trounson vd1983,Toner vd 1991).

4.4.Embriyo Gelişiminin Takibi ve Kalitelendirilmesi

Embriyo gelişiminin ilk basamağı HCG uygulamasının ardından 32-36.saatler arasında yapılan yumurta toplama (OPU) ve sperm alımını takiben gerçekleştirilen mikroyenjeksiyon işlemi(ICSI) ile döllenmenin gerçekleştirilmesi ile sağlanır. Döllenmenin sağlanmasını takiben invitro ortamda 3-5 gün süre ile embriyo gelişimi ve kalitesi takip edilir.

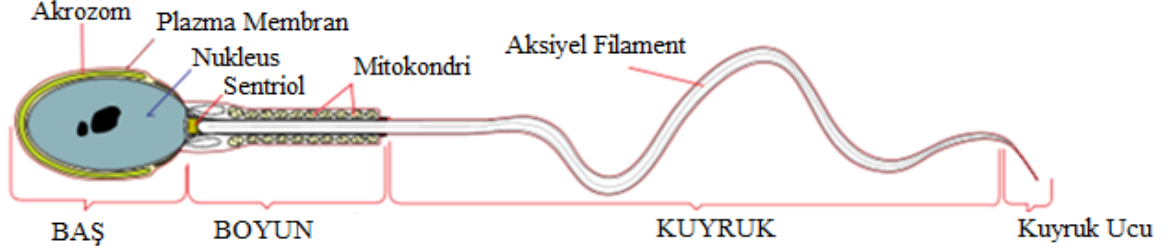
4.4.1.Yumurta Toplanma (OPU) İşlemi İle Kumulus Oosit Kompleksinin (KOK) Elde Edilmesi ve Sperm Eldesi (0.Gün)

Oosit toplama(OPU) ve sperm hazırlığı sonrası mikroyenjeksiyon (ICSI) işlemleri uygulanır. Bu süreçte, detayları aşağıda sıralanan,

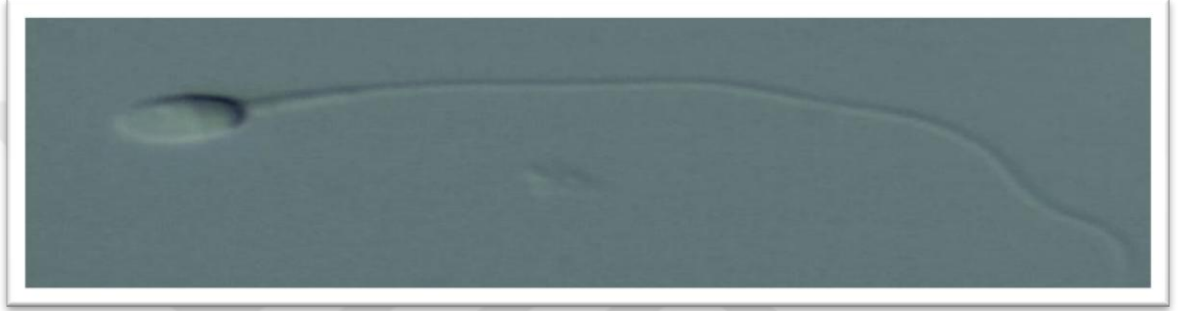
- Sperm için morfoloji, motilite/motilite paterni ve fonksiyon değerlendirmesi
- Oositler için KOK eldesi ve oosit matürasyon değerlendirmesi yapılır.

OPU işlemi ile paralel olarak her vaka için sperm seçimi ve toplama süreci uygulanmaktadır. Sperm sayısı, hareketlilik ve morfoloji yapılarına göre değerlendirilir.

Normal sperm yapısı; oval şekilli, 4-5 µm boy/2.5-3.5 µm en boyutlarında başa ve boyun dahil 55µm uzunluğunda kuyruğa sahip ve herhangi bir morfolojik defekt içermeyen spermdir.



Şekil 3. Normal Sperm Yapısı



Şekil 4. Normal Sperm Morfolojisi

4.4.1.1. Kümülüs Oosit Kompleksi (KOK)

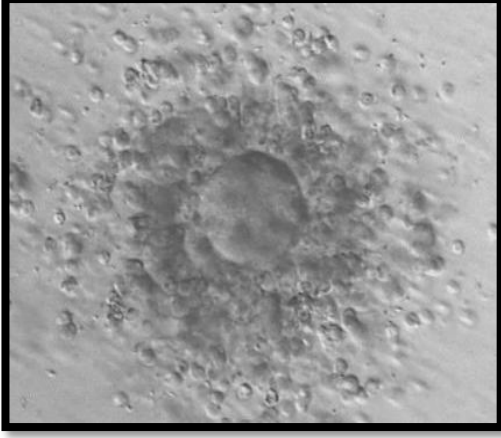
OPU işleminden sonra elde edilen KOK, oosit maturasyonu için gerekli olan ortamı sağlar. KOK, aşağıdaki yapılardan oluşur;

Zona pelusida: Oositi çevreleyen glikoprotein yapıda bir kılıftır. Ortalama 25um kalınlığındadır.

Korona radiyata: Zonayı çevreleyen destekleyici hücre tabakasıdır. Zonayı geçerek oolemmaya (oosit hücre zarı) ulaşan kanallar vasıtasıyla oositin hücre dışı alışverişini sağlar.

Kümülüs ooforus: Koronayı çevreleyen destekleyici yoğun hücre kütesidir. Hyaluronan adı verilen matriks yapısı içerisine gömülü şekilde bulunurlar. OPU sürecinde oositler milyonlarca kümülüs hücresi ile çevrili olarak gelirler.

Granulosa hücreleri: KOK'u ve folikül iç yüzeyini çevreleyen hücre kütesidir.



Şekil 5. Kümülüs Oosit Kompleksi

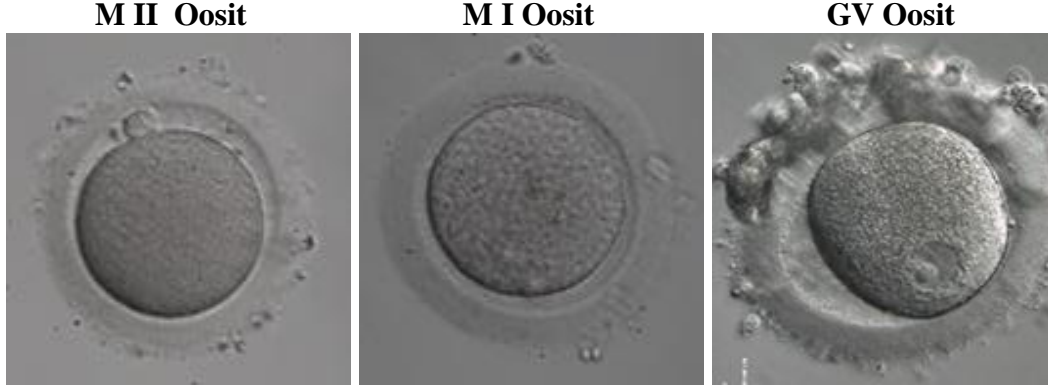
4.4.1.2.Oosit Matürasyon Değerlendirmesi

OPU sürecinde oositler milyonlarca kümülüs hücresi ile çevrili olarak gelirler. OPU esnasında aspirasyon sıvısında ilk aşamada KOK gözlenmesi de granuloza hücrelerinin varlığı foliküle girildiğinin işareti olarak kabul edilir. Oositler, ICSI öncesinde hyaluronidaz enzimi ve mekanik pipetleme ile kümülüs hücrelerinden temizlenirler ve invert mikroskop altında maturasyon değerlendirilmesi yapılır.

MII (Metafaz II): Mayoz bölünmenin metafaz 2 aşamasındaki olgun oositi belirten ifadedir. 1. Polar cisimciğın gözlenmesi ile tanımlanır. Metafaz II aşamasındaki oosit, ICSI için uygundur.

MI (Metafaz I): Henüz tam olgunluğa ulaşmamış, mayoz bölünmenin metafaz I aşamasındaki immatür oositi belirten ifadedir. MII'den farkı polar cisimciğın gözlenmemesidir.

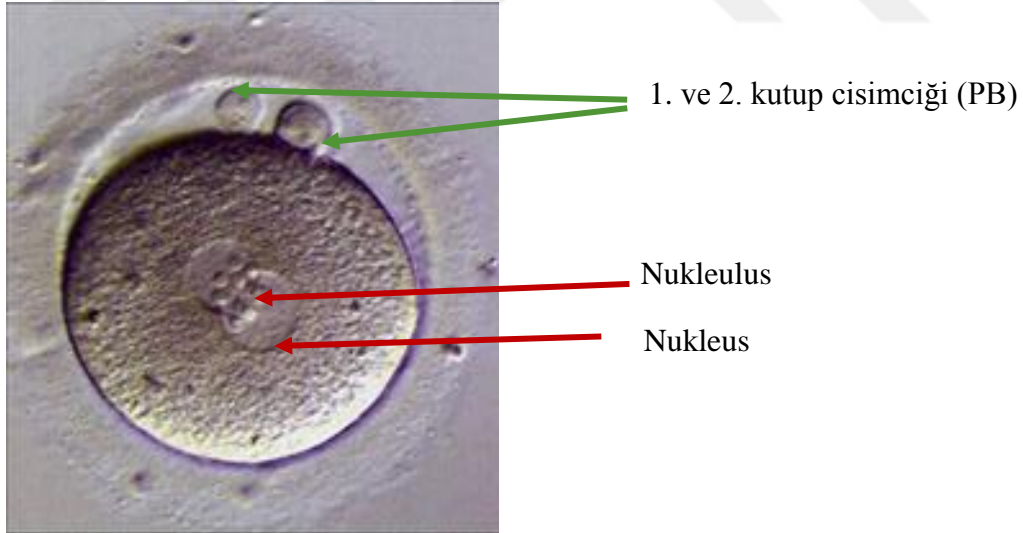
GV (Germinal Vezikül): Mayoz bölünmenin profaz 1 aşamasındaki immatür oositi belirten ifadedir. ICSI için kullanılamaz.



Şekil 6. Oosit matürasyonu

4.4.2.Fertilizasyonun Değerlendirilmesi (1.Gün)

Fertilizasyon kontrolü IVF veya mikroenjeksiyon işleminden 12-18 saat sonra yapılmalıdır. Fertilizasyon, kısaca tek bir sperm çekirdeğinin oositten gelen çekirdek ile aktive olmuş oosit sitoplazması içinde birleşmesi olarak özetlenebilir.(Gardner vd 2004) .Çekirdekler döllenmenin en basit ve kolayca gözlemlenebilen işaretleridir. Normal fertilizasyonda 2 pronükleus ve birinci ve ikinci kutup cisimciği gözlenir.



Şekil 7. Döllenmiş Yumurta (Zigot)

Anormal döllenme gözlenen yumurtaların ayrılarak takip edilmesi önemlidir.

1 PN: Anormal döllenme bulgusudur. Pronükleuslardan 1 tanesinin eksik olması durumudur. IVF tedavilerinde ortalama %1-2 oranında gözlenmektedir. Gametlerden birinin pronükleus oluşturmaması durumudur. Gelişen embriyo haploid olacağından dolayı 3.günden sonra embriyo gelişimi gözlenmez.

3 PN: Diğer bir anormal döllenme durumudur.1 tane fazla pronükleus(PN) gözlenmesi durumudur. IVF tedavilerinde ortalama %1 oranında gözlenmektedir. ICSI uygulanan oositlerde fazla pronkleusun oositten kaynaklanma ihtimali daha yüksektir. İleri kadın yaşı vakalarında daha sık gözlenir.

Multi PN: 3 PN'den fazla pronükleus gözlenmesi durumudur. Nadir gözlenen bir anomalidir. Oosit kaynaklı olma ihtimali yüksektir. İleri kadın yaşı vakalarında daha sık gözlenir.



Şekil 8. Anormal döllenme

PN oluşum aşamasında her iki çekirdekte meydana gelen olayların eř zamanlı olması döllenme ve ileri embriyo gelişimi açısından önemlidir Erken zigot oluşumunda ekirdeik ve ekirdeiğe bağlı oluşumlar büyük önem taşır. Eř zamanlı gelişim göstermeyen döllenme aktivitelerine sahip zigotlarda yüksek oranda kromozomal anomali, anormal klivaj ve gelişim blokajı nedeni ile nadir blastokist oluşumu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre belirli formlardaki ekirdeik ve çekirdek cisimciklerine sahip embriyolarda diğerlerine kıyasla daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları sağlanmaktadır (Kahraman vd 2002).

PN skorlama sistemi kullanılarak yapılan değerlendirmede, A,B,C,D,E,F olarak belirlenen zigotlarda ekirdeik yapıları büyüklük ve dağılım sıralamaları farklılık göstermesine rağmen normal döllenen zigot olarak kabul edilir ve embriyo gelişiminde fark gözlenmez iken G ve J olarak sınıflanan zigotlarda normal döllenen zigot olarak kabul edilir fakat diğerlerinden ayrı olarak takip edilir. (Kahraman vd 2002)

4.4.3.Klivaj Dönemi Embriyo Sınıflandırması

Zigot aşamasından 4-8 hücreli bir embriyo oluşumuna kadar geçen süre (2-4 gün) klivaj dönemi olarak tanımlanır. Bu dönem içerisinde zigot birbiri ile yapısal anlamda değişiklik göstermeyen ardışık iki-üç bölünme geçirir.

2. günden 4. güne kadar olan klivaj dönemindeki embriyolar değerlendirilirken göz önüne alınan kriterler blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, embriyonun içerdiği fragmantasyon oranı ve sitoplazma yapısıdır. Normal klivaj hızına sahip bir embriyo ICSI işlemine 24-25. Saat sonra 2 hücre, 2.günde yani ICSI işleminden 42-44 saat sonra 3-4 hücre, 3.günde yani ICSI işleminden 66-68 saat sonra 6-8 hücre ve 4.günde yani ICSI işleminden 90-92 saat sonra ise birleşme işaretlerine bağlı olarak 10 ve üzerinde hücreye sahip olan embriyodur.

2. gün. 4,0,BE



3.gün: 8,0,BE



4. Gün 10↑,0,BE (BB)



Şekil 9. Klivaj dönemi embriyo kaliteleme örnekleri

ESHRE 2011 yılında hücre sayısı, fragmantasyon varlığı, embriyonun büyüklüğüne göre yüzdesi, blastomerlerin eşit büyüklükte olup olmaması gibi özellikleri dikkate alınarak bölünme evresindeki embriyoların kalitesini değerlendirmek amacı ile embriyo skorum sistemi oluşturulmuştur;

Tablo 6. Klivaj dönemi embriyo kalitelendirmesi (2. ve 3. gün)

Kalite 1	İkinci günde 2-4, üçüncü günde 6-8 blastomerlidir. Blastomerleri eşit büyüklükte, yuvarlak veya oval, blastomer sitoplazmaları şeffaftır ve fragman içermez.
Kalite 2	Blastomer sayı ve şekli 1. Kalite embriyoya benzemekle birlikte yani eşit blastomer morfolojisine sahip, ancak %5-10 oranında fragmentasyon içeren veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
Kalite 3	Blastomerler birbirinden hafifçe farklı, %10 üzerinde fragmentasyona sahip veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
Kalite 4	Blastomer sayısı net sayılamayan, %30 dan fazla fragmentasyona sahip, blastomerler birbirinden belirgin derecede farklı veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo.

(Eshre 2011)

Embriyo kalitesinin düşüşüyle birlikte embriyonun ileri gelişim gösterme, canlılığını devam ettirme ve implantasyon potansiyelide azalmaktadır.

3. günden sonra takip eden bölünmeler ile embriyonun hücre sayısı artar ve 16-32 hücreden oluşan sıkı bir kitle haline gelir. 4. günde ise, ICSI den 92-96 saat sonra hücre sayısını arttırarak kompaktlaşma evresine girmesi beklenir. Bu aşamadaki bir embriyoya ‘morula’ adı verilir. Moruladan sonra kavitasyon dönemi başlar. Kavitasyonun oluşması ile kaviteden salgılanan sıvı, blastosöl oluşumunu tetikler.

Morula



Kavitasyon



Şekil 10. 4. Gün embriyo kalitelendirme örnekleri

4.gün embriyolarının kalite değerlendirmesi řu şekilde yapılmaktadır;

Tablo 7. Klivaj donemi embriyo kalitelendirmesi (4. gun)

Kalite 1	Early blastokist, kavitasyon ve full morula ve herhangi bir anomali (fragmentasyon, vakuolizasyon vb.) içermeyen
Kalite 2	Morula veya compact embriyo morfolojisine sahip en az bir anomalinin eşlik ettiği embriyo
Kalite 3	Morula veya compact embriyo morfolojisine sahip 2 veya 3 anomalinin eşlik ettiği veya 10 huce ve uzeri blastomer sayısına sahip birleşmeye başlamış embriyo
Kalite 4	Blastomer sayısı 10 veya daha az sayıda olan herhangi bir birleşme bulgusu gozlenmeyen embriyo

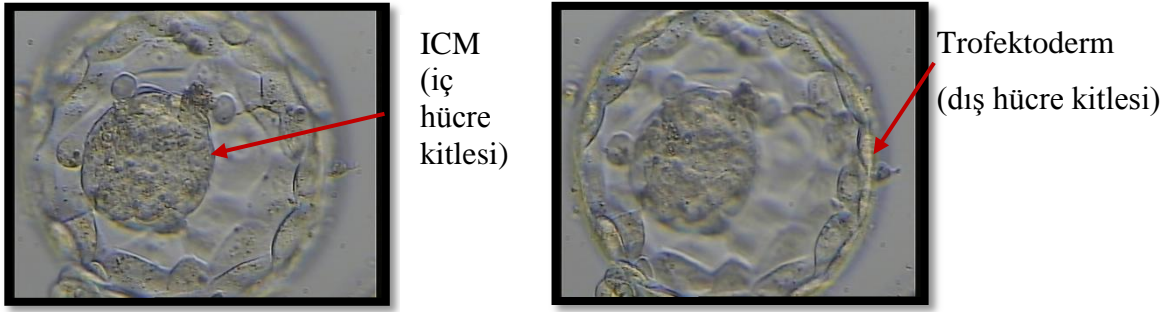
(Eshre 2011)

4.4.4.Blastokist Donemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi

Kavitasyon ilerledikçe kompaktlaşma sırasında hucelerin (blastomerlerin) kutuplaşmasıyla iki farklı huce grubunu (trofoektoderm-dış huce kutlesi ve inner cell mass-i huce kutlesi) oluşarak ‘‘blastokist ’’ adı verilen yapıyı oluşturur. Trofektoderm tabakasını oluşturan huceler arası bağlar sıklıdır ve başkalaşım sırasında bu huceler tarafından iç kısımda blastosol adı verilen sıvı oluşturulur. Blastosol içerdiği değişik iyon ve protein konsantrasyonu bakımından i huce kutlesinin ileri gelişimi için son derece kritik bir onem taşır.

Bu aşamada oluşan embriyonun yapısal değerlendirmesinde kullanılan u temel kriter şunlardır;

1. Blastosol kavitesinin buyukluğu
2. İ huce kutlesini oluşturan hucelerin sayısı ve yapısıdır.
3. Trofektoderm hucelerinin yapısı ve dizilimi



Şekil 11. Blastokist aşamasındaki ICM ve trafektoderm hücre kitleleri

4.4.4.1. Blastosöl Kavite Oluşumuna Göre Sınıflandırma

Kavitasyonun başlaması, embriyo yeterliliğini ve canlılığını yansıtan bir bulgudur. Embriyonun blastokist oluşturma zamanı çok önemlidir. Gardner ve arkadaşları iyi kalitede gelişen bir blastokistin implantasyon başarısını ve gebelik oranlarını olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir (Gardner vd 2004).

Tablo 8. Blastosel kavitesinin sınıflandırılması

1. Early Blastokist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından azdır.
2. Blastokist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından fazladır.
3. Full Blastokist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün tümünü kaplamıştır.
4. Expanded Blastokist: Blastosel kavitesi volümü artmış, çap büyümüş, zona iyice incelmıştır.
5. Hatching Blastokist: Trofoektoderm hücrelerinin bir kısmı zona katmanı dışına çıkmaya başlamıştır.
6. Hatched Blastokist: Embriyo tümüyle zona katmanı dışına çıkmıştır.

(Gardner vd 2004)

4.4.4.2. İç Hücre Kitlesi (Inner Cell Mass-ICM) ve Trofoektoderm Hücre Yapısına Göre Değerlendirilmesi

İyi kalitede bir blastokistin mikroenjeksiyondan yaklaşık 106-108 saat sonra geniş bir blastosöl içine doğru uzanan belirgin bir iç hücre kitlesine (inner cell mass : ICM) ve birbirine düzgün bağlanmış trofoektoderm hücrelerine sahip olması gerekmektedir.

Tablo 9. İç Hücre kitlesi Sınıflandırması (ICM) (Gardner vd 2004)

-
- A. Sıkı, paket şeklinde çok sayıda hücre içeren ICM
 - B. Gevşek bir grup halinde çok sayıda hücre içermeyen ICM
 - C. Çok az hücreden oluşan ICM
-

Tablo 10. Trofektoderm hücrelerinin Sınıflandırması(Gardner vd 2004)

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

IVF ve ICSI sonrasında embriyoların transferinde, implantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyoların seçilebilmesi, klivaj dönemi ve blastokist döneminde, tüm bu morfolojik değerlendirme kriterlerinin birlikte kullanımı ile mümkündür.

4AA (Expanded Blastokist) 5AA(Hatching Blastokist) 6AA(Hatched Blastokist)



Şekil 12. Blastokist Dönemi Embriyo Kalitelendirme Örnekleri

4.5.Embriyo Transferi ve Transfer Edilecek Embriyo Sayısının ve Transfer Gününün Belirlenmesi

Embriyo transferi (ET), ART’de en önemli basamaklardan biridir. ART bir bütün olarak ele alındığında başarıda %30 embriyo transfer işlemi rol oynar (Mansour et al., 2002). ET tekniğinin standardizasyonunda doktor ve embriyoloğun tecrübesi ve uyum içerisinde çalışmalarının da başarı oranını etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir

(Cohen et al., 1998). ET başarısındaki bir diğer etken ise embriyoların katatere yüklenip uterin kaviteye bırakılmaları arasında geçen süredir; bu sürenin iki dakikayı geçmemesi gerekmektedir (Brinsden et al.1999).

Embriyo transfer aşamasında gebelik elde edilmesini etkileyen önemli 3 faktör vardır. Bunlar;

- 1) Endometrial reseptivite
- 2) Embriyo kalitesi ,
- 3) Embriyo transferinin başarı ile gerçekleştirilmesi.

Embriyo, endometriuma reseptivitenin maksimum olduğu dönemde implante olur. Bu nedenle ART uygulamalarında embriyo transferinin yapıldığı dönemde endometriyumun reseptif olması implantasyon ve gebelik şansını artırır

Transfer edilecek embriyo sayısı belirlenirken hem yüksek gebelik oranlarının elde edilmesi hedeflenmekte, hem de çoğul gebelik riskinin mümkün olabilecek en az düzeyde olması amaçlanmaktadır. Transfer edilecek embriyo sayısı kadın yaşı ve daha önce uygulanan başarısız tüp bebek denemeleri göz önüne alınarak seçilmektedir. Ayrıca kadın yaşı çok genç ise ve tüp bebek uygulaması ilk kez yapılıyorsa, iyi kalitede blastokist varlığında tek embriyo transferi planlanabilir (ÜYTE Yönetmeliği, 2014).

Bazı çalışmalar 3. Gün ve 5. Gün transferi arasında anlamlı bir fark olmadığını savunurken diğerleri blastokist transferi ile özellikle implantasyon oranlarının anlamlı bir şekilde arttığını ileri sürmektedir.

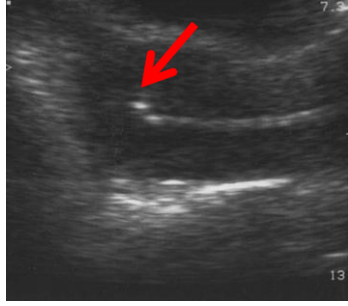
İleri kadın yaşı ve tekrarlayan başarısız denemeleri olan çiftlerde ve dondurulmuş çözülmüş embriyo transferi yapılan çiftlerde, transfer öncesi embriyonun dış çeperi olan zona pelusida'nın laser ile inceltilmesi veya tam açıklık yapılması (AHA) işlemi uygulanır. Bu işlem AHA(Assisted Hatching-yardımla yuvalama) olarak adlandırılmakta ve embriyonun zona'dan ayrılmasını kolaylaştırarak implantasyon şansını olumlu etkilemektedir.

Başarılı bir embriyo transfer işleminin amacı embriyoları problemsiz bir şekilde implantasyon olma ihtimalinin en yüksek olduğu zamanda ve en uygun yer olan fundusa yerleştirmektir.

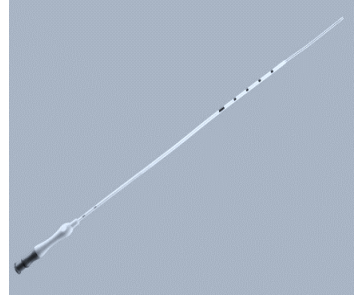
AHA (Assisted Hatching)



USG ile embriyo transferi



Embriyo transfer kateteri



Şekil 13. AHA/ ET/ ET Kateteri

5.GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.Hasta Seçimi

İstanbul Tüp Bebek Merkezinde; 01 Ocak-31 Temmuz 2018 tarihleri arasında, tüp bebek uygulaması sonrası farklı endikasyonlar nedeniyle dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferi yapılan 808 hastaya ait veriler bu çalışmada yer almaktadır. Bu hastalardan 25 siklus iptali gerçekleşmiş ve DET yapılan 783 hasta taze embriyo transferi yapılmış olan 344 hasta ile karşılaştırılmıştır. Bu hastaların verileri; kadın yaşı, transfer yapılan günleri, transfer edilen embriyo sayısı, endometriyal kalınlık, HCG günü P4 değerleri incelenenel biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum üzerine etkileri istatistiksel olarak incelenmiştir. Değerlendirilen bu parametreler ‘‘Pearson Ki-Kare Analizi’’ ve ‘‘Fisher's Exact Test’’ ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Çalışmada hastaya ait P4 değeri, transfer günü endometrium kalınlığı, transfer edilen embriyo kalitesi, transfer edilen embriyo sayısı, gebelik ve canlı doğum bulduları rutin takip formlarından elde edilmiştir. Çalışma datası, embriyoları dondurulmuş-çözülmüş olan hasta grubunda halen uygulanmakta olan tedavi süreçlerinin embriyo canlılığı ve klinik gebelik sonuçlarına etkisinin taze embriyo transferi yapılan vakalar ile karşılaştırılması şeklinde ve elde edilen verilerin dosya taraması şeklinde kullanılmasını içermektedir.

Çalışma için hastalara rutin uygulama dışında herhangi bir tedavi şekli önerilmemektedir.

Çalışma, ‘Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul’una sunuldu ve 2019/30-08 sayı ve 05.07.2019 tarihli etik kurul onayı alındı.

5.2.Hastaların Klinik Olarak Hazırlanması

Dondurulmuş embriyo transferi ve taze embriyo transferi planlanan hastaların tedavi şeması aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

5.2.1.Dondurulmuş embriyo transfer (DET) Protokolü

Çalışmaya alınan hastalarda, taze uygulamalarında farklı endikasyonlar ile embriyoları dondurulmuş olan vakaların, dondurulmuş embriyo transferi(DET) programına alındıklarında izlenen tedavi protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

- Asetin 4.-5. Günü kontrol ediliyor e2 ve progesteron değerlerine bakıldı
- Adetin 9-10. Günü tekrar kontrol edilerek rahim içi kalınlığına bakıldı. E2 ve p4 sonucuna göre estrofem desteğine 2x3 olacak şekilde başlandı.
- Adetin 12-14. Günü kontrol edilerek endometrium kalınlığı 8 mm üzerinde triple-line görünümünde ise progesteron seviyesi 1,2 ng/ml altında olması halinde transfer için hazırlığa başlandı.

Embriyonun dondurma güne göre örneğin 3. Gün ise 4 gün progesteron kullanıp transfer yapılarak 5. gün embriyolarında 5 gün progesteron kullandıktan sonra transfer yapılarak endometrium hazırlığı sağlanmıştır.Bunun için aşağıdaki tedavi protokolü takip edilmiştir.

- crinone jel 1x1 vaginal gebelik testine kadar
- progestan 50 mg 1x1 gebelik testine kadar
- estrofem 3x2 gebelik testine kadar devam edecek şekilde
- Dondurulmuş- çözülmüş embriyo transferi gerçekleştirildikten sonra ise luteal faz desteği devamlılığı sağlanmıştır.

5.2.2.Taze Embriyo Transfer Protokolü

Embriyo herhangi bir engel teşkil edecek endikasyonu bulunmayan hastalarda KOH sağlandıktan sonra Ovitrelle amp2 ile HCG uygulaması yapılan hastalarda, Hcg günü progesteron seviyesi 1,2 ng/ml altında olan hastalara opu günü itibariyle

- Crinone jel 1x1 vaginal gebelik testine kadar
- Progestan 50 mg 1x1 gebelik testine kadar
- Estrofem 3x2 gebelik testine kadar devam edecek şekilde tedavi protokolü uygulanmıştır.
- Taze embriyo transferi sonrası luteal faz desteğine devam edilmiştir.

5.3.Sperm Hazırlama

Oosit toplama(OPU) günü tüm hastalardan mastürbasyon yoluyla toplanan semen örnekleri sperm sayı ve hareketlilikleri değerlendirildikten sonra uygunluğuna göre swim-up veya gradient yöntemiyle hazırlık işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde swim-up işlemi için All Grad Wash(Life Global) ,gradient işlemi için ise All Grad%100 (Life Global)sperm yıkama mediumları kullanıldı.

Swim-up işleminde; Semen sperm yıkama mediumu(All Grad Wash-Life Global) ilave edilerek tüpe(Falcon 2095) aktarıldı. Birkaç kez pipetlenerek karışmaları sağlandı. Bu süspansiyon 2 adet (Falcon 2095) santrifüj tüpüne paylaştırılarak 10 dakika 800 rpm' de santrifüj (Heraus –Labofuge 400) edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp her tüpe 0.5'er ml sperm yıkama mediumu ilave edilerek 45 derecelik açıyla 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, üste doğru yüzen spermeler küçük tüpe(5 ml Falcon 2003) aktarılarak ICSI işlemi için hazırlandı.

Gradient işlemi için ise %90 ve %50'lik gradient medyumları (All Grad%100 Life Global) hazırlandı. Konik tüpün altına sırasıyla 0,5 ml %90'lık üzerine 0,5 ml ml%50'lik spermgrad medyumunu ve bunların üzerine de 0,5 ml semen örneği konuldu. Tüpler 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Cam pastör pipet ile gradient ve semen tabakaları geçilerek pellet alındı ve temiz bir tüpe (Falcon 2095) aktarılıp 1 ml yıkama medyumunu (All Grad Wash Life Global) ile karıştırılıp 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tekrar süpernatant alınarak sperm sayısına bağlı olarak pellete 0.5-1 ml kültür medyumunu eklenerek ICSI işlemi için hazırlandı.

5.4.Oosit Toplama (OPU) İşlemi

Oosit toplanması işlemi HCG den 32-36 saat sonra, transvajinal ultrasonografi eşliğinde sedasyon anestezi altında yapıldı. İşlem için tek yada çift lümenli steril aspirasyon iğneleri kullanılarak follikül aspirasyonu sağlandı. Follikül sıvısı 37 °Clik ısıtıcı bloklar içerisinde EBSS (Sigma) solüsyonu ile flush yapılarak 14 ml'lik tüplere (Falcon 2001) alındı. Petri dishlere alınan sıvı yine ısıtıcı zemin ve sterio mikroskop altında taranarak COC (kumulus-oosit kompleksi) tayini yapıldı. COC bulunduğu, pastör pipeti ile Life Global HEPES+HSA solüsyonu içeren four well

(Nunc) kaplarına alındı. İşlem sırasında oosit kalitesini ve embriyo gelişimini etkileyebilecek olan ısı, osmolarite ve pH değişimlerini en aza indirmek için, oositler en kısa zamanda kültür medyumuna alınıp inkübatöre kaldırıldı.

5.5.Oosit Soyma İşlemi (Denudasyon)

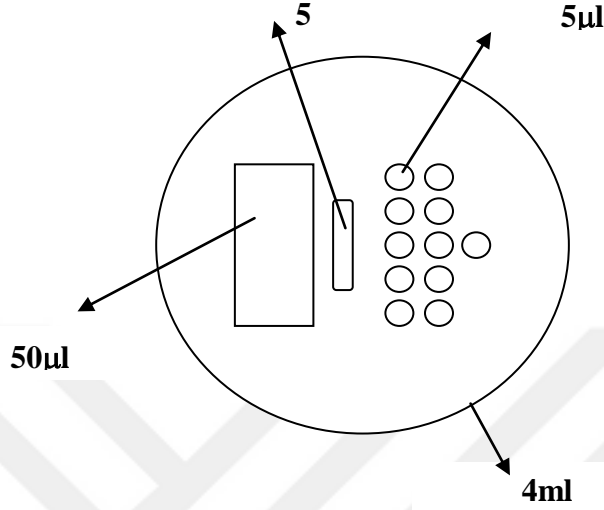
OPU işlemini takiben HCG uygulamasının 37. saatinde tüm oositlere denudasyon işlemi uygulandı. Bu işlem için 80IU/ml hyalüronidaz (Life Global) enzimi 1/ 3 oranında G-HEPES (Life Global) medyumuna ile dilue edilerek 60 mm lik petri dishlere dropletler hazırlandı. Daha sonra sırasıyla enzimatik ve mekanik denudasyon işlemi, uygun çaplardaki, 270-150 µm çaplarında farklı denudasyon pipetleri ile pipetleme işlemi yapılarak uygulandı. Pipetleme işlemi sonrası etrafında kumulus hücresi kalmamış olan oositler temiz dropletlerden birisinin içerisine konularak ve stereo mikroskop 10X büyültmede maturasyon değerlendirmesi yapıldı. Denüstasyon sonrası oositlerin bulunduğu dish ICSI işlemine kadar inkübe olması için inkübatöre kaldırıldı.

5.6.Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI)

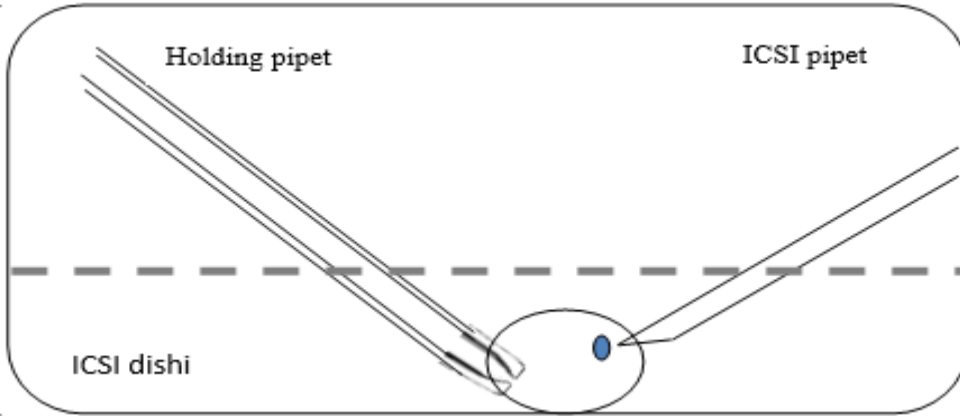
Denudasyon işlemini takiben olgun (Metafaz II) oositlere ICSI işlemi uygulandı. ICSI işlemi HCG uygulamasının 38. saatinde mikro pipetler yardımı ile Hoffman modülasyonu olan inverted mikroskobun ısıtıcı tablası (370C) olacak şekilde ve objektif büyütmesi 400X büyütmede iken motil spermiler ile uygulandı. . Daha önceden ICSI uygulamak amacıyla, petri dish te HEPES tamponlu medium ile yağ altında dish hazırlığı yapıldı.

Hazırlanan ICSI dishinde sperm drobuna insemine edilen spermiler ICSI pipeti ile seçilerek PVP'ye (Polyvinylpyrrolidone 10% w/v) alındı ve kuyruğu kırılarak immobilizasyonu sağlandı. Petri dishe ICSI uygulanabilecek matüriteye ulaşmış olan (MII) oositler yüklendi. ICSI işlemi inverted mikroskop kullanılarak mikroskoba monte edilen mikromanipulator ve enjektör sistemi ile her bir matür oosite bir sperm insemine olacak şekilde uygulandı.

Şekil 5. ICI işlemi için hazırlanan kap



Şekil 6. ICI işleminde kullanılan mikromanüplasyon sistemi



ICSI işlemi tamamlandıktan sonra bir gün önceden hazırlanan kültür mediumuna (Life Global) konularak inkübatöre kaldırıldı.

5.7.Fertilizasyon Değerlendirmesi

Fertilizasyon ICSI işlemini takiben 12-18. saatte inverted mikroskopta yapıldı. Fertilizasyon kontrolünde tek bir sperm çekirdeğinin oositten gelen çekirdek ile aktive olmuş oosit sitoplazması içinde birleşmesi olarak özetlenerek not alındı. 2 adet PN

yapısının ve 2 adet polar cisimciğin (PB) mevcudiyeti gözlenmiş olan döllenmiş yumurtalar normal döllenme bulgusu göstermiş olarak anormal olanlardan ayrıldı.

5.8.Klivaj Değerlendirmesi

Klivaj dönemi embriyo değerlendirme ESHRE 2011 kriterlerine uygun olarak, blastomer sayısı, blastomer morfolojisi, fragmantasyon oranı (%) ve sitoplazmada granülasyon, vakuol vb yapıların durumu incelenerek yapıldı. Normal klivaj hızına sahip olan embriyolar günüyle uyumlu gelişim gösterdiği takdirde, takip edilerek ileri günlerdeki gelişimleri gözlenmeye devam edildi., 2. günde 2-4 hücre, 3. günde 6-8 hücre ve 4. günde kompaktlaşma bulguları normal gelişim olarak kabul edildi. Kalitelerine göre embriyolar gruplara ayrıldı: Grade 1,2,3,4 olarak. Bu tez için fertilizasyon sonrasında embriyoların gelişimi 3.güne kadar takip edildi ve grade 1 ve 2 kalitede olan embriyoların 3.gün vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonu yapıldı. Bu çiftlerin bir sonraki DET sikluslarında 3.gün embriyo transferi yapıldı.

5.9.Blastokist Dönemi Embriyo Gelişim Değerlendirilmesi

5. ve 6. Güne ulaşan embriyolar blastosist aşamasına ulaştıklarında Gardner ve arkadaşlarının skalasına uyumlu olarak yapılan embriyo kalite değerlendirme ile sınıflandırıldı. Blastosol büyüklüğü ve dolayısıyla ekspansiyonun değerlendirme ile 1,2,3,4,5,6 olmak üzere erken blastokistten total olarak zonayı terk etmiş olmasına kadar değerlendirilerek yukarıda belirtildiği şekilde 2. Ve 3. olarak da ICM ve Trofektoderm incelemeleri yapıldı. En iyi kalite olanlar öncelikli olacak şekilde numaralandırılarak donduruldu ve özel haritalandırma ile her hasta kendine ait adreste -196 derece sıvı azotta DET siklusuna kadar muhafaza edildi.

5.10.Vitrifikasyon yöntemi ile embriyo dondurma ve Çözdürme Protokolleri

Merkezimizde embriyoların daha sonra çözülerek transfer edilebilmesi için dondurularak saklanması işlemi , transfer sonrası kalan embriyoların saklanması, trofektoderm biyopsi sonrası saklama ya da embriyo transferini engelleyen herhangi bir komplikasyon nedeniyle embriyoların saklanması gereken durumlarda uygulandı..Embriyo dondurma için, tüm dünyada artık standart olarak kabul edilen

vitrifikasyon yöntemi tercih edildi..Bu doğrultuda, çözme işleminden 0.5-1 saat kadar sonra transfere geçildi. Klivaj dönem embriyolarda çözmeden hemen sonra, canlılığın tespiti ile transfere geçildi.

Dondurulacak embriyolar, çözme sonrası transfer planlamasına uygun sayıda ve kalitelerine göre gruplandırılıp sıralandırılarak dondurulurken, biyopsi uygulanan embriyolar ise embriyo sırasına göre numaralandırılarak tek tek donduruldu.

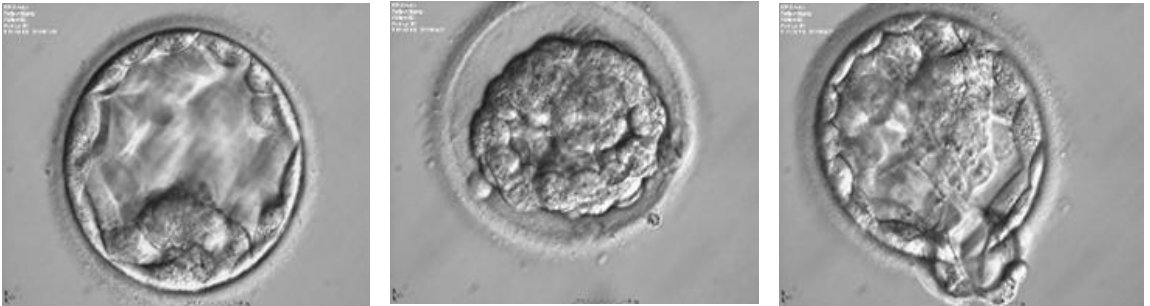
Vitrifikasyon yöntemi ile 3. 4. Ve 5. gün embriyolarında yüksek kriyoprotektan içeriği olan ,Kitazato Vitrication kit ve Warming kit kullanıldı. Laboratuvarımızda blastokist dondurma işleminde, çözme sonrası canlılık oranını artırıcı etkisi olan, “artificial shrinkage” olarak tanımlanan, trofektoderimde lazer ile açıklık yapılarak blastosölün boşaltılması metodu tercih edildi.

Vitrifikasyon için birinci olarak hücrelerin ekilibrium solüsyonu (ES) içersinde 8-10 dk bekletilerek dengelenmesi sağlandı. İkinci aşamada ise hücreler yüksek yoğunluktaki kriyoprotektan (DMSO+EG) içeren vitrifikasyon solüsyonuna (VS) kısa süreli (30-45sn) olarak maruz bırakıldı. Daha sonra dondurulacak materyal strow üzerine damlalar şeklinde kriyoprptektan içersinde yüklenerek direkt sıvı azota daldırılarak yüksek soğutma hızı sağlandı. Vitrifikasyon yöntemi ile klivaj dönemi embriyolar, 5.ve 6.gün blastokist aşamasındaki embriyolar donduruldu. Daha sonra tüm örnekler hastaya özel belirlenmiş olan tank adresine kaldırılarak muhafaza edildi.

Dondurma öncesi

Çözme sonrası(shrinkage)

Çözme sonrası 5.saat



Şekil 14. Blastokist evresindeki embriyonun vitrifikasyon yöntemi ile dondurma /çözme aşamaları

Embriyo çözme protokolünde(thawing veya warming) ise, üzerine çiftin adı-soyadı, işlem tarihi ve kaçınıcı gün, kaç embriyo dondurulduğunun bilgisinin yazılmış olduğu barkod yapıştırılmış olarak tanktan sıvı azot içersinde çıkarılan strowlar kimlik

kontrolünden geçirildi. Embriyolar daha önceden 37°C getirilmiş olan Center well dish(Nunc) içerisine 1 ml ve 1 M sükröz içerisine direkt daldırılarak çözülmesi ile gerçekleştirildi.

Tablo 7. Embriyo çözme protokolü

Center well: 1 M sükröz solüsyonu (37°C)

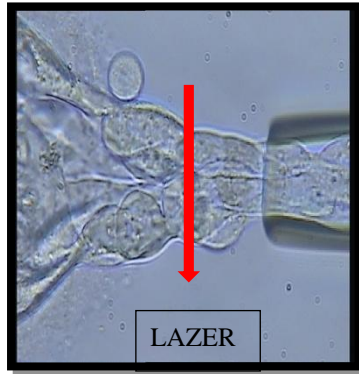
1. kuyucuk: 0,5 M sükröz solüsyonu (oda ısısı)
 2. kuyucuk: 0,25 M sükröz solüsyonu (oda ısısı)
 3. kuyucuk: 0,125 M sükröz solüsyonu (oda ısısı)
 4. kuyucuk: PBS-HSA solüsyonu (oda ısısı) şeklinde bir kap hazırlandı.
-

Bu aşamada işlemin mikroskop altında yapılarak, çözme sırasında embriyoların strawdan ayrılarak solüsyon içerisine geçtikleri gözlemdi. Daha sonra sırası ile 0,5 M sükröz - 0,25 M sükröz ve 0,125 M sükröz solüsyonlarında belirli sürelerde bekletilirler. Son olarak PBS-HSA solüsyonu içerisinde yıkanan embriyo kriyoprotektanlardan tamamen uzaklaştırılarak Life Global kültür mediumuna alındı. Çözme işlemi yapılan embriyolara, uygun Ph ortamının sağlanabilmesi için , %7 CO2 ve %5.5 O2 gaz ortamı sağlanmış olan ,37°C ısıda inkübasyonu ve tekrar sıvı alımı sağlandı. Transfer işleminden önce 2-4 saat re-expanse olabilmeleri için inkübasyon sağlandı.

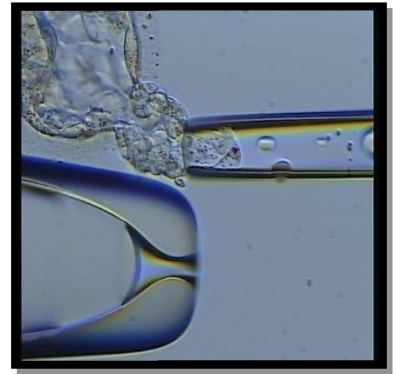
Biyopsi Öncesi



Trafektoderm Biyopsi I



Trafektoderm Biyopsi II



Biyopsi ile 4-5 Blastomer Çözme Sonrası (shrinkage) Çözme 4-5 Saaat Sonrası Alınması



Şekil 15. Biyopsi uygulanan bir embriyonun vitrifikasyon yöntemi ile dondurma /çözme aşamalarına ait görüntüler

5.11.Embriyo Transferi (DET)

Embriyo transferi endometrium ile embriyonun gününün uyumu sağlandığı gün yapıldı. Tüm vakalar natürel sıklısta takip edilerek ovülasyonun varlığında sonra ,luteal faz desteği için hastalara doğal progesteron etkili Crinone vajinal Jel (% 8) verilerek endometrium desteği sağlandı. Transfer işlemi dolu mesane ile ve USG altında yapıldı. Vajen ve serviks temizlendikten sonra steril bir katater ile servikal kanaldan geçildi.

Klinisyen, ET için hazır olduğunu belirttiğinde embriyoların içinde bulunduğu kültür dishi, bulunduğu inkübatörden çıkarılarak stereomikroskop altında embriyolar katetere (Cook K-Jet) yüklendi. Yükleme esnasında sırasıyla, 5µl hava, 10µl kültür mediumu çekildikten sonra embriyolar katetere yüklendi ve tekrar 5µl hava çekildi. (Frankfurter et al.2004; Silberstein et al., 2004) Son olarak ET sırasında katetere temas edebilecek kan ve mukusun embriyoya temasını engellemek amacıyla kateterin ucuna kültür mediumu çekilerek dengelenmesi sağlandı ve steril sponch yardımıyla kateter yatay tutularak klinisyene teslim edildi. Transfer sonrasında katater içerisinde embriyo, kan, mukus kalıp kalmadığı kontrol edildi

Bazı çalışmalar 3. Gün ve 5. Gün transferi arasında anlamlı bir fark olmadığını savunurken diğerleri blastokist transferi ile özellikle implantasyon oranlarının anlamlı bir şekilde arttığını ileri sürmektedir.

5.12.Gebelik Değerlendirmesi

Embriyo transferinden 12 gün sonra, kanda yapılan β HCG testi ile gebelik varlığı kontrol edildi. Eğer testin sonucu 20 mIU/mL' nin üzerinde ise 14.günde ikinci bir β HCG lm yapıldı. β hcg seviyesinde yükselme görülen vakalar, son adetin birinci gününden itibaren hesaplanarak gebeliğin 7. haftasında USG ile gebelik kesesi (SAC) ve fetal kalp atımı (FHR) gözlenmesi için kontrole alındı. Elde edilen gebelikte, kese(SAC) pozitif olgular klinik gebelik olarak değerlendirildi.



6.BULGULAR

Çalışmamızda 01.01.2018 ile 01.07.2018 tarihleri arasında İstanbul Tüp Bebek Laboratuvarı'nda farklı endikasyonlar sebebiyle embriyoları dondurulmuş olup daha sonra çözülerek embriyo transferi için tedaviye alınmış olan 808 çiftin dahil edilerek taze embriyo transferi ve dondurulup-çözölmüş embriyo transferinin gebelik üzerine etkisi farklı parametreler karşılaştırılarak değerlendirildi.Bu çalışmada değerlendirilen parametreler aşağıdaki gibidir;

- Yaş gruplarına göre Taze ET ve DET(dondurulmuş çözölmüş embriyo transferi) yapılan grupların biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının karşılaştırması (Tablo 8, 9, 10).
- Embriyo transfer gününe göre (3. gün ve 5 gün) Taze ET ve DET gruplarında biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının karşılaştırması(Tablo11).
- Klivaj dönemi & blast dönemi transfer günleri biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranları, Taze ET ve DET grupları karşılaştırılması(Tablo12).
- Endometrial kalınlıklarına göre Taze ET ve DET gruplarında biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının karşılaştırması(Tablo13,14,15).
- Transfer edilen embriyo sayısının (1 veya 2), Taze ET ve DET gruplarında, biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranları karşılaştırılması (Tablo16,17,18).
- Transfer edilen embriyo kalitesine (Grade1 ve 2) göre, Taze ET ve DET yapılan gruplarda ,biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının karşılaştırılması(Tablo19,20,21).
- Transfer edilen embriyo sayısına göre (1 veya 2 embriyo), çoğul gebelik oranlarının(G-SAC bakılarak),Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırılması(Tablo 22).
- Transfer gününe göre(3.gün ve 5.gün), çoğul gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırılması(Tablo 23).

- 3. ve 5. günde embriyo transferi yapılan vakalarda, progesteron (P4) değerine göre, klinik gebelik oranları; Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması (Tablo 24,25).
- Canlı doğum haftası dağılımına göre Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması (Tablo 26).

Tablo 8. Yaş gruplarına göre biyokimyasal gebelik oranları (Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması)

Yaş Grubu	Biyokimyasal Gebelik		p
	Taze ET	DET	
<26 (n=61)	50,0%	71,2%	0,506**
26-34 (n=432)	57,8%	68,7%	0,051*
35-39 (n=295)	49,4%	60,7%	0,073*
40-44 (n=271)	28,5%	46,1%	0,002*
>44 (n=68)	9,1%	11,4%	0,751**

*: Pearson Ki-Kare Analizi **: Fisher's Exact Test

Tablo 8'de ;Taze ET yapılan gruba göre DET yapılan grupta, 40-44 yaş grubunda biyokimyasal gebelik oranı daha yüksek olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir(P<0,05).

Tablo 9. Yaş gruplarında klinik gebelik oranları (Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması)

Yaş Grubu	Klinik Gebelik		p
	Taze ET	DET	
<26 (n=61)	50,0%	59,3%	0,655**
26-34 (n=432)	50,0%	62,6%	0,030*
35-39 (n=295)	41,6%	52,4%	0,086*
40-44 (n=271)	20,8%	36,9%	0,003*
>44 (n=68)	0,0%	8,6%	0,130**

*: Pearson Ki-Kare Analizi **: Fisher's Exact Test

Tablo 9’da ;Taze ET yapılan gruba göre DET yapılan grupta, 26-34 yaş ve 40-44 yaş grubunda klinik gebelik oranı daha yüksek olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (P<0,05).

Tablo 10. Yaş gruplarında canlı doğum oranları (Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması)

Yaş Grubu	Canlı Doğum		p
	Taze ET	DET	
<26 (n=61)	0,0%	37,3%	0,404**
26-34 (n=432)	41,1%	47,4%	0,289*
35-39 (n=295)	29,2%	39,3%	0,097*
40-44 (n=271)	13,8%	17,0%	0,470*
>44 (n=68)	0,0%	2,9%	0,514**

*: Pearson Ki-Kare Analizi **: Fisher's Exact Test

Tablo 10’da ; Taze ET yapılan gruba göre DET yapılan grupta, tüm yaş gruplarında canlı doğum oranı daha yüksek olarak belirlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

Tablo 11. Embriyo transfer gününe göre (3. gün ve 5 gün) Taze ET ve DET gruplarında biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının karşılaştırılması

Transfer günü	Biyokimyasal Gebelik		p*	Klinik Gebelik		p*	Canlı Doğum		p*
	Taze ET	DET		Taze ET	DET		Taze ET	DET	
3.gün (n=510)	33,5%	40,2%	0,119	25,9%	32,2%	0,123	17,9%	22,4%	0,209
5.gün (n=464)	80,4%	75,8%	0,486	73,9%	67,9%	0,408	60,9%	48,3%	0,106

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 11’de; 3. gün ve 5.gün embriyo transferi yapılan vakalarda, Taze ET ve DET yapılan gruplar arasında, biyokimyasal , klinik gebelik ve canlı doğum oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş olmakla birlikte, 3. gün embriyo

transferlerinde DET yapılan grupta sayısal olarak yükselme gözlenirken, 5. gün embriyo transferinde ise Taze ET yapılan grupta sayısal olarak yükselme gözlenmiştir.

Tablo 12. Klivaj dönemi & blast dönemi transfer günleri biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranları, Taze ET ve DET grupları karşılaştırılması

Transfer günü	Biyokimyasal Gebelik		p*	Klinik Gebelik		p*	Canlı Doğum		p*
	Taze ET	DET		Taze ET	DET		Taze ET	DET	
2+3+4 (n=618)	33,3%	41,1%	0,046	25,3%	34,0%	0,018	17,8%	23,7%	0,075
5+6 (n=509)	80,9%	73,4%	0,265	74,5%	65,6%	0,219	59,6%	46,3%	0,083

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 12’de; Klivaj dönemi (2+3+4.gün) ve blastokist dönemi (5+6.gün) embriyo transferi yapılan, Taze ET ve DET grupları arasında, biyokimyasal , klinik gebelik ve canlı doğum oranları karşılaştırılmıştır. Klivaj dönemi (2+3+4.gün) embriyo transferi yapılan DET grubunda Taze ET yapılan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (P<0,05).

Hcg verildiği gün Usg ile ölçülen endometrial kalınlık dikkate alınmıştır.

Tablo 13. Endometrial kalınlıklarına göre biyokimyasal gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarındakarşılaştırması

Endometrial kalınlık	Biyokimyasal Gebelik		p
	Taze ET	DET	
<8 mm (n=75)	0,0%	37,5%	0,431**
8 - <9 mm (n=94)	18,8%	59,0%	0,006*
9 - <10 mm (n=196)	41,7%	56,6%	0,045*
10 - <11 mm (n=246)	38,6%	56,8%	0,004*
11 - <12 mm (n=209)	31,7%	61,4%	0,001*
12 - <14 mm (n=237)	52,5%	67,3%	0,097*
≥14 mm (n=70)	45,5%	69,7%	0,001*

*: Pearson Ki-Kare Analizi**: Fisher's Exact Test

Tablo 14. Endometrial kalınlıklarına göre klinik gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırması

Endometrial kalınlık	Klinik Gebelik		p
	Taze ET	DET	
<8 mm (n=75)	0,0%	25,0%	0,422**
8 - <9 mm (n=94)	12,5%	53,8%	0,004*
9 - <10 mm (n=196)	31,9%	50,0%	0,014*
10 - <11 mm (n=246)	29,5%	48,4%	0,002*
11 - <12 mm (n=209)	28,3%	55,1%	0,001*
12 - <14 mm (n=237)	47,5%	58,9%	0,216*
≥14 mm (n=70)	34,8%	63,6%	0,001*

*: Pearson Ki-Kare Analizi**: Fisher's Exact Test

Tablo 15. Endometrial kalınlıklarına göre canlı doğum oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırması

Endometrial kalınlık	Canlı Doğum		p
	Taze ET	DET	
<8 mm (n=75)	0,0%	12,5%	0,595**
8 - <9 mm (n=94)	12,5%	30,8%	0,157*
9 - <10 mm (n=196)	20,8%	34,4%	0,044*
10 - <11 mm (n=246)	21,6%	33,9%	0,037*
11 - <12 mm (n=209)	20,0%	39,9%	0,005*
12 - <14 mm (n=237)	40,0%	41,1%	0,902*
≥14 mm (n=70)	25,8%	50,5%	0,001*

*: Pearson Ki-Kare Analizi**: Fisher's Exact Test

Tablo 13, 14, ve 15'te Taze ET ve DET yapılan grupların endometrial kalınlık ölçümlerine göre, DET yapılan grupta biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında genel olarak daha yüksek ve istatistiksel anlamlı fark tespit edilmiştir (P<0,05).

Tablo 16. Transfer edilen embriyo sayısının (1 veya 2), Taze ET ve DET gruplarında, biyokimyasal gebelik oranları karşılaştırılması

Embriyo transfer günü	Transfer edilen embriyo sayısı	Biyokimyasal Gebelik		p*
		Taze ET	DET	
3	1 (n=128)	28,1%	35,9%	0,344
	2 (n=382)	35,6%	41,4%	0,250
5	1 (n=244)	81,0%	75,3%	0,566
	2 (n=220)	80,0%	76,4%	0,689

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 17. Transfer edilen embriyo sayısının (1 veya 2), Taze ET ve DET gruplarında, klinik gebelik oranları karşılaştırılması

Embriyo transfer günü	Transfer edilen embriyo sayısı	Klinik Gebelik		p*
		Taze ET	DET	
3	1 (n=128)	25,0%	28,1%	0,689
	2 (n=382)	26,3%	33,3%	0,137
5	1 (n=244)	76,2%	67,3%	0,402
	2 (n=220)	72,0%	68,7%	0,738

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 18. Transfer edilen embriyo sayısının (1 veya 2), Taze ET ve DET gruplarında, canlı doğum oranları karşılaştırılması

Embriyo transfer günü	Transfer edilen embriyo sayısı	Canlı Doğum		p*
		Taze ET	DET	
3	1 (n=128)	21,9%	18,8%	0,660
	2 (n=382)	16,3%	23,4%	0,086
5	1 (n=244)	66,7%	51,6%	0,185
	2 (n=220)	56,0%	44,6%	0,282

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 16, 17 ve 18'e göre Taze ET ve DET yapılan gruplarda 1 embriyo ve 2 embriyo transferi yapılmış olan vakalarda biyokimyasal, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında istatistiksel bir anlamlılık tespit edilmemiştir.

Tablo 19. Transfer edilen embriyo kalitesine (Grade1 ve 2) göre, Taze ET ve DET yapılan gruplarda, biyokimyasal gebelik oranları karşılaştırılması

Transfer edilen embriyo sayısı	Grade	Biyokimyasal Gebelik		p*
		Taze ET	DET	
1	1 (n=245)	74,1%	75,7%	0,854
	2 (n=147)	24,7%	41,9%	0,027
2	1 (n=109)	59,1%	75,9%	0,116
	2 (n=349)	32,7%	39,6%	0,183

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 19'da; 1 adet Grade 2 embriyo transferi yapılan, DET grubunda Taze ET grubuna göre, biyokimyasal gebelik oranı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (P<0,05).

Tablo 20. Transfer edilen embriyo kalitesine (Grade1 ve 2) göre, Taze ET ve DET yapılan gruplarda, klinik gebelik oranları karşılaştırılması

Transfer edilen embriyo sayısı	Grade	Klinik Gebelik		p*
		Taze ET	DET	
1	1 (n=245)	66,7%	66,5%	0,987
	2 (n=147)	21,9%	36,5%	0,050
2	1 (n=109)	54,5%	71,3%	0,133
	2 (n=349)	22,4%	32,2%	0,046

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 20'de, 1 adet ve 2 adet Grade 2 embriyo transferi yapılan vakalarda, DET grubunda Taze ET grubuna göre, klinik gebelik oranı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (P<0,05).

Tablo 21. Transfer edilen embriyo kalitesine (Grade1 ve 2) göre, Taze ET ve DET yapılan gruplarda, canlı doğum oranları karşılaştırılması

Transfer edilen embriyo sayısı	Grade	Canlı Doğum		p*
		Taze ET	DET	
1	1 (n=245)	59,3%	50,9%	0,413
	2 (n=147)	17,8%	24,3%	0,333
2	1 (n=109)	40,9%	46,0%	0,669
	2 (n=349)	13,6%	21,8%	0,050

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 21’de; 1 veya 2 adet embriyo transferi yapılan ve embriyo kalitesi Grade 2 olan DET grubunda canlı doğum oranları sayısal olarak daha yüksek tespit edilmiş olup, 2 embriyo transferi yapına gared 2 embriyo verilen DET grubunda Taze ET gruba göre, canlı doğum oranı istatistiksel olarak anlamlı yüksek olarak saptanmıştır(P<0,05).

Tablo 22. Transfer edilen embriyo sayısına göre (1 veya 2 embriyo), çoğul gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırılması

Transfer edilen embriyo sayısı	Gebelik kesesi sayısı (G-SAC)	Taze ET	DET	p*
1	Tek (n=416)	38,2%	49,5%	0,057
2		61,8%	50,5%	
1	İkiz (n=103)	21,1%	25,0%	0,717
2		78,9%	75,0%	

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 22’de; 1 ve 2 embriyo transferi yapılan Taze ET ve DET gruplarındaki hastalarda ilk ultrason kontrolünde belirlenen gebelik kesesi (G-SAC)sayısına bakılarak çoğul gebelik oranları karşılaştırılmış ve her iki grupta anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Tablo 23. Transfer gününe göre (3.gün ve 5.gün), çoğul gebelik oranlarının Taze ET ve DET gruplarında karşılaştırılması

Transfer günü	Gebelik kesesi sayısı (G-SAC)	Taze ET		DET	p*
		Taze ET	DET		
3 (n=148)	Tek	84,2%	90,1%	0,285	
	İkiz	15,8%	9,9%		
5 (n=312)	Tek	73,5%	78,2%	0,539	
	İkiz	26,5%	21,8%		

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 23’de; 3. gün ve 5.gün embriyo transferi yapılan Taze ET ve DET gruplarındaki hastalarda ilk ultarson kontrolünde belirlenen gebelik kesesi(G-SAC) sayısına bakılarak çoğul gebelik oranları karşılaştırılmış ve her iki grupta anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Üçüz gebelik sadece üç vakada görüldüğünden istatistiki olarak değerlendirmeye alınamamıştır.

Tablo 24. 3. günde embriyo transferi yapılan vakalarda, progesteron (P4) değerine göre, klinik gebelik oranları; Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması

Progesteron (P4)	Klinik Gebelik		p*
	Taze ET	DET	
<0,5 (n=986)	24,3%	31,9%	0,104
0,50-0,80 (n=93)	38,5%	40,0%	0,929
0,81-1,00 (n=31)	10,0%	0,0%	0,640
>1,00 (n=17)	28,6%	100,0%	0,073

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 24’te; 3. günde embriyo transferi yapılan vakalarda, HCG uygulanan gün bakılan progesteron(P4) değerine göre, Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılmasında klinik gebelik oranlarında istatistiksel olarak anlamlılık gösteren bir fark tespit edilmemiştir.

Tablo 25. 5. günde embriyo transferi yapılan vakalarda, progesteron (P4) değerine göre, klinik gebelik oranları; Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması

Progesteron (P4)	Klinik Gebelik		p*
	Taze ET	DET	
<0,5 (n=986)	72,7%	67,8%	0,731
0,50-0,80 (n=93)	84,6%	68,4%	0,299
0,81-1,00 (n=31)	54,5%	100,0%	0,377
>1,00 (n=17)	100,0%	66,7%	0,212

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 25’de; 5. günde embriyo transferi yapılan vakalarda, HCG uygulanan gün bakılan progesteron(P4) değerine göre, Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılmasında klinik gebelik oranlarında istatistiksel olarak anlamlılık gösteren bir fark tespit edilmemiştir. Kliniğimizde P4 değeri 1,2 nin üstü olduğu durumlarda embriyo transferi yapılmamaktadır.

Tablo 26. Canlı doğum haftası dağılımına göre Taze ET ve DET gruplarının karşılaştırılması

Canlı doğum	Canlı doğum haftası	Taze ET	DET	p*
Tek (n=308)	<29	0,0%	0,4%	0,677
	29-33	2,8%	3,4%	
	34-37	35,2%	28,3%	
	>37	62,0%	67,9%	
İkiz (n=63)	<29	0,0%	9,4%	0,071
	29-33	30,0%	5,7%	
	34-37	50,0%	71,7%	
	>37	20,0%	13,2%	

*: Pearson Ki-Kare Analizi

Tablo 26’ da DET ve Taze ET yapılarak gebelik elde edilen ve tek veya ikiz canlı doğum yapmış olan vakaların doğum haftaları karşılaştırılarak analiz edilmiş olup istatistik anlamlılığı gösteren bir fark gözlenmemiştir.

7.TARTIŞMA

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası embriyo gelişimi gerçekleşmiş ancak farklı endikasyonlar sebebiyle embriyoların dondurularak saklanması ve bir başka siklusta transferinin yapılmasının, gebelik sonuçları üzerine pozitif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Mosher at al.,1991).

Bu çalışmada farklı endikasyonlar nedeni ile embriyoları dondurulmuş olan 808 çift incelenmiş ve bunlardan 783 hastaya dondurulmuş embriyoları çözülerek transfer (DET) yapılmıştır. Ayrıca 344 çifte de taze embriyoları ile transfer yapıp DET yapılan grup ile biyokimyasal gebelik, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarına etki eden parametreler incelenerek, karşılaştırma yapılmıştır.

Dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferi yapılan(DET) hasta grubunda; embriyo dondurma günü, transfer edilen embriyo sayısı, kadın yaşı, endometriyal kalınlık ve P4 değerinin vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş embriyoların, çözme sonrası embriyo canlılığına ve klinik gebelik sonuçları üzerine farklı etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Loutradi at al., 2019).

Artan kadın yaşının genel olarak IVF başarısını düşürdüğü bilinmektedir (Rowe T.,2006)).Kadınlar üreme yıllarından geçerken doğurganlıkta ilerleyen bir düşüş göstermektedir. Doğurganlıktaki düşüş, oosit kalitesindeki değişiklikler, yumurtlamanın sıklığı ve etkinliği, cinsel fonksiyon, rahim sağlığı ve hamilelik komplikasyonları riski gibi sayısız potansiyel nedene bağlanabilir. Çalışmamızda tüm yaş gruplarında dondurma çözme sonrası et yapılan(DET) grubunda, daha yüksek klinik gebelik saptadık. Bu durum 40-44 yaş grubunda istatistiksel anlamlılık göstermekte idi. Ancak canlı doğum açısından bu yaş gruplarında farklılık gözlenmedi. Bu durum embriyo transfer günü için de geçerliydi. Klivaj dönemi ve Blastokist aşamasında dondurulmuş ve çözülmiş embriyo transferleri ile taze transferler arasında dondurulmuş-çözülmiş transferler lehine istatistiksel anlamlı farklılık görülmüştür. Klivaj ve Blastokist transferleri göz önüne alındığında biyokimyasal, klinik gebelik ve doğum oranlarının

iki kat'a yakın artış gösterdiği anlaşılmıştır. Bu durum da gerek taze gerekse dondurulmuş embriyo transferlerinde blastokist aşamasındaki embriyonun önemini ortaya koymuştur. Papanicolau ve arkadaşlarının 2019 da yaptıkları bir çalışmada tüm embriyoları dondurma stratejisi ile blastokist transferleri sonrasında başarının yükseldiği vurgulanmıştır (Papanicolau ve ark. 2019).

Çalışmamızda endometrium kalınlığının 8-14 mm aralığında biyokimyasal ve klinik gebelik açısından gruplar arasında bir farklılık görülmediği ancak, canlı doğum açısından 9-14 mm arasında istatistiki olarak anlamlı bir yükselme olduğu görülmüştür. Endometriumun değerlendirilmesi, yardımcı üremede önemli bir bileşendir. Endometrial kalınlık yardımcı üremede başarı için prognostik bir faktör olarak tanımlanmıştır. Endometriyumun 'ince' olduğu değerlendirildiğinde, doktorlar ve hastalar tedavi döngüsüne devam edip etmeme konusunda karar vermektedir. İnce endometriyumun tanımı, çalışmalar arasında farklılık göstermektedir, ancak çoğu çalışmada, insan koryonik gonadotropin (HCG) uygulamasının yapıldığı gün endometrial kalınlık <7 mm veya <8 mm olarak kullanılmaktadır (Kimberly ,ve ark. 2019). Her ne kadar birkaç vaka bildirimi, yaklaşık 4 mm endometrial kalınlıkta embriyo transferinden sonra hamileliği tanımlamış olsa da taze IVF sikluslarının gözlemsel çalışmaları, klinik gebelik veya ince endometriyumlu canlı doğum olasılığının azaldığını göstermiştir(Kovacs ve ark., 2003; Kumbak ve ark., 2009; Vaegter ve ark., 2017; Yuan ve ark, 2016; Zhao ve ark, 2014). Vaegter ve ark. (2017), daha kalın endometriyumlu vakalara kıyasla, endometrial kalınlıkta <7 mm ve 7-10 mm canlı doğum oranlarında anlamlı azalma olduğunu bulmuşlardır. Kumbak ve ark. (2009), endometriyal kalınlığın <7 mm olduğu durumlarda klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Kovacs ve arkadaşları (2003), <10 mm endometrial kalınlığın, düşük gebelik oranı ile ilişkili olduğunu, ancak bu çalışmaya toplam 1228 döngüden sadece 8 mm endometrial kalınlığa sahip altı vakanın dahil olduğunu açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz 9 mm üzeri endometrium kalınlığının anlamlı olarak canlı doğumu etkilediği sonucu yapılan çalışmaları doğrulamaktadır.

OHSS hastalarda HCG yerine OHSS' ye yol açmayan GnRH analogu ile yumurta olgunlaşmasını sağlayarak OHSS engellenir ve GnRH analogunun luteal faz

desteğinde yetersizliğe sebep olması nedeniyle taze siklusta transferin yapılamayarak tüm embriyoların dondurulması ve daha sonra dondurulmuş-çözölmüş embriyo transferi yapılarak hastanın olası risklerden korunması sağlanır (Jee at al., 1988; Rizk and Aboulghar, 1999).

Endometriyum luteal faz desteğine rağmen yeterince kalınlaşmadığı durumlarda implantasyona negatif etkisi olacağı düşünölerek embriyolar dondurulur. Ayrıca transfer sonrası kalan iyi kalitede embriyolar da dondurularak hastaya ikinci bir tranfer şansı verilmesi amaçlanır. (Blankstein at al.,1987)

Buna rağmen, KOH sikluslarında östrojenin aşırı artışı ve GNRH sikluslarında progesteron salgılanmasının azalmasına bağlı olarak lüteal fazın kısaldığı bu nedenle de taze transfer yapılan sikluslarda endometriumun reseptif özelliğini kazanmasının daha zor olduğu belirtilmektedir (Delilbaş, 2008).

Child ve ark. (2003), transfer günü endometriyal kalınlığın 8 mm'den az olmasının kötü gebelik sonuçları ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

DET sikluslarının bir diğer kullanım alanı zayıf over rezervli olguların ardışık sikluslarda stimüle edilmeleriyle elde edilmiş olan embriyoların havuzlanmasıdır. Bu yöntem ile elde edilen embriyoların daha sonra çözölerek transfer edilmeleri ile neredeyse normal yanıtli olgular kadar gebelik oranlarının olduğu bildirilmektedir (Cobo at al.,2012).

Embriyo dondurmanın negatif etkileriyle ilgili de yayınlar mevcuttur. Örneğin; epigenetik değişiklikler, DNA hasarı, kromozom anomalileri, iğ iplikçik deformasyonları (Wong at al., 2014). Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz embriyoların çözölme sonrası yüksek canlılık oranları ve taze siklusa benzer gebelik oranları nedeniyle vitrifikasyonun zararlı etkileri gözlenmemiştir.

AbdelHafez ve ark. (2010), yaptığı çalışmada vitrifikasyonun yavaş dondurma yöntemine kıyasla; canlılık oranını, klinik gebelik oranını, devam eden gebelik ve implantasyon oranlarını istatistiksel olarak yükselttiğini göstermişlerdir (AbdelHafez at al., 2010; Van den Abbeel at al, 1997; Li at al, 2014).

Yapılan bir başka çalışmada gösterilmiştir ki, 5. ve 6 günde donmuş blastosistlerin morfolojik olarak değerlendirilmesi dondurma çözme sonuçlarında etkilidir ve blastosist aşamasında embriyoların dondurularak çözülmesi ile taze embriyo transferi yapılması arasında bir farklılık bulunmamıştır.(Levens et al., 2008;Sunkara and Siozos, 2010)

Çalışmamızda taze embriyo transferlerine kıyasla dondurulmuş embriyo transferlerinin daha başarılı olduğu görülmektedir. Literatürde dondurulmuş embriyo transferi yapılan grupta optimum endometrial hazırlığın yapılabilmesi ve implantasyon çerçevesinin yakalanabilmesinin gebelik oranlarını yükselttiğini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır.(Mackens at al, 2017). Bu durum endometrial reseptivitenin doğal siklusta daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda HCG günü progesteron değeri (P4) dikkate alındığında 0,5 ile 1,20 arasında klinik gebelik açısından bir farklılık gözlenmedi. 2019 RBMO' da yayınlanan bir başka makaleye göre PKOS nedeniyle DET ve taze embriyo transferi yapılan vakalarda serum P4, endometrial kalınlık açılarından canlı doğuma etkileri karşılaştırıldığında bir farklılık bulunmamıştır.(Vuong and Pham, 2019; Venetis et al., 2013).

Çalışmamızda taze ya da dondurulmuş sikluslarda yapılan embriyo transferlerinde klinik gebeliğin 2 embriyo transferi ile anlamlı bir yükselme gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca bu olgularda çoğul gebelik durumları incelendiğinde sadece olguların % 22 sinde ikiz durumunun ortaya çıkması ülkemizde uygulanan YÜT yönetmeliğinin tekrar gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Sonuçlarımız embriyo kalitesinin morfolojik değerlendirmesinin her zaman başarıda önemli bir payı olduğunu göstermiştir.

8.SONUÇ

Bu çalışmada farklı endikasyonlar nedeni ile embriyoları dondurulmuş olan 808 hasta incelenmiş ve bunlardan 783 hastaya dondurulmuş embriyoları çözülerek transfer yapılmıştır. Ayrıca 344 çiftede taze embriyoları ile transfer yapılarak,DET yapılan grup ile aşağıdaki parametreler karşılaştırılmıştır.

Kadın yaşı, endometrial kalınlık, P4 değeri, transfer edilen embriyo kalitesi, transfer edilen embriyo sayısı ve transfer günü etkenlerinin biyokimyasal, klinik ve canlı doğum oranlarına etkilerine bakıldığında;

Dondurulmuş çözülmüş embriyo transferi (DET) yapılan grupta tek embriyo transferi yapılan 35 yaş altı grupta ve 2 embriyo transferi yapılan ileri yaş 40-44 yaş grubunda gebelik oranlarının taze embriyo transferi yapılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu gözlenmiştir. Yine DET grubunda klivaj dönemi embriyo transferi yapıldığında gebelik oranlarında artış gözlenmiştir. KOH için kullanılan stimulan ilaçların negatif etkisi olmadığından DET grubunda endometrium kalınlıkları yüksek tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak transfer edilen embriyo kalitesi düştüğü durumlarda bile gebelik oranları DET grubunda yüksek olarak gözlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, OHSS riski olan PKOS lu hastalarda, yüksek E2 ile seyreden KOH vakalarında, endometrial kalınlığın yeterli olmadığı vakalarda, total embriyo dondurularak , başka bir siklusta DET protokolü ile rahim içi hazırlığı yapıldıktan sonra embriyoların çözülüp transfer işleminin gerçekleştirilmesinin ,vakaların gebelik şansını düşürmediği gibi kümülatif olarak gebelik oranını yükselten ve pek çok komplikasyon yaşanmasını engelleyen güvenli bir yöntemdir.

9.KAYNAKLAR

Abdel Hafez, FF., Desai, N., Abou-Setta, AM., Falcone, T., Goldfarb, J., (2010), “Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis”, *Reprod Biomed Online*, 20, 209-22.

Bağış H, Sağırkaya H, Dınyes A. Vitrification of pronuclear stage mouse embryos in microdrops vs. cryotubes and the effect of the sugar content of the vitrification solution. *Theriogenology* 2002; 57: 461.

Balaban, B., (2008), “Kriyoprezervasyon”, “In vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri”, Delilbaşı, L., Ankara:Güneş Tıp Kitapevleri

Battaglia, D.E., Eaton, D.L., Sadler-Fredd, K. and Patton, P.E. (2010) ‘Cumulative pregnancy rates offer a more comprehensive view of overall in vitro fertilization success for a given cycle than fresh or frozen pregnancy rates alone’, 58th Annual Meeting of The Pacific Coast Reproductive Society. Indian Wells California (USA), 14–18 April 2010.

Bayer R.S.Alper.M.,Penzias S.A.(2008) *İnfertilite El Kitabı*, Boston IVF.Nobel Tıp.

Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre H., Dinyess, A., Keefer, C.L. (2003), Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solidsurface vitrification (SSV) methods, *Theriogenology*, 59:1839-1850.

Berek JS, Novak E. *Berek&Novaks gynecology*. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2007.

Blankstein, J., Lunenfeld, B., Serr, D.M, Mashiach, S. (1987). Ovarian Hyperstimulation Syndrome Prediction By Number And Size Of Preovulatory Ovarian Follicles, *Fertility and Sterility*, 47:597-602

Chen, SU. Yang YS.(2009), “Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles and the time schedule for clinical practise”, *Taiwan J*

Obstet Gynecol, 48, 15-22.

Chian, R.C.Gulekli, B. Buckett, W.M., Tan, S.L. (1999). Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome, *N Engl J Med*, 341:1624.

Child, T.J., Gulekli, B., Sylvestre, C., Tan, S.L. (2003). Ultrasonographic Assessment of Endometrial Receptivity at Embryo Transfer In An In Vitro Maturation of Oocyte Program, *Fertility and Sterility*, 79(3):656-58.

Cobo, A., Garrido, N., Crespo, J., Jose, R., Pellicer, A., (2012), "Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients", *Reprod Biomed Online*, 24, 42432.

Cochrane Database Syst Rev. 2009 Apr 15;(2):CD006105.

Cocksedge A.K.Li T, Saravelos S, Metwally M: A reappraisal of the role of polycystic ovary syndrome in recurrent miscarriage. *RBM Online Vol 17 No 1*. 2008 151–161

Cooper, TG. (2010), "The WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction", "WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen", 5th.Edition.

Cseh, S., Corselli, J., Nehlsencannarella, S.L., Bailey, L.L., Szalay, A.A. (1997). The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages, *Theriogenology*, 48:43-50.

D. Kyrou¹, E.M. Kolibianakis, H.M. Fatemi, T.B. Tarlatzi, P. Devroey, and B.C. Tarlatzis: Increased live birth rates with GnRH agonist addition for luteal support in ICSI/IVF cycles: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, Vol.17, No.6 pp. 734–740, 2011

Delilbaşı L. (2008), "In Vitro. Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri", 1. Basım, Güneş Kitabevi, 229, 235-237

Delvigne A. Symposium: Update on prediction and managemet of ohss. *Reprod Biomed Online* 2009; 19:8-13.

Delvigne A. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. *Reprod Biomed Online* 2009; 19:8-13.

Dr. R.Sinan Karadeniz, (1996), Pcos'da Ultrasonografik Ovarial Değişikliklerin Klinik ve Endokrin Bulgular Arasındaki İlişkisi. Doktora Tezi.

Ebner T.Sommergruber M., Moser M., Shebl O., Schreier-Lechner E., Tews G. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles *Hum Reprod.* 2006 Aug;21(8):2022-6

Eimers, JM., Te Velde, ER., Gerritse, R., Van Kooy, RJ., Kremer, J., Habbema, JD., (1994), "The validity of the postcoital test for estimating the probability of conceiving", *Am J Obstet Gynecol*, 171, 65-70.

Elder, K. and Dale, B. (2000) 'Cryopreservation', in *In vitro fertilization*. 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 192–224.

Engin Üstün, Y., (2011), "İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi", "Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar ", Editör: Çelik, Ö., Adana: Nobel Kitabevi.

European Society for Human Reproduction and Embryology [ESHRE] / American Society for Reproductive Medicine [ASRM], (2004).

Fanchin R., de Ziegler D., Olivennes F. et al., Exogenous follicular stimulation hormone ovarian reserve test (EFFORT): a simple and reliable screening test for detecting poor responders in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994;9:1607-11

Gardner D K, Weissman A, Howles C M, Shoham Z, (2004), *Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives Second Edition*:171-180

Gardner K.D, 2007, "In Vitro Fertilization A Practical Approach", 161-182

Glover D.T, Barratt L.R.C (1999). *Male Fertility and Infertility* Cambridge University Press 1.published

Gomel VUB. Yarali H. (1993), Investigation of the infertile couple. In *Reproductive Endocrinology and Infertility*:143-155.

Gosden, R.G., et al., (1994), "Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees", *C. Hum Reprod*, 9(4), 597-603.

Hague, WM., Adams, J., Algar, V., et al., (1990), "HLA associations in patients with polycystic ovaries and in patients with congenital adrenal hyperplasia caused by 21- hydroxylase deficiency", *J Clin Endocrinol*, 32, 407-415.

Hakim RB, Gray RH, Zacur, (1998), *H Fertil Steril*;70:632-7

Hassan MAM, Kilicli SR (2004), *Fertil Steril*;81:384-92

Hatch, R., Rosenfield, R.L., Kim, M.H., Tredway, D., (1981), Hirsutism: implications, etiology, and management, *Am J Obstet Gynecol*, 140:815-830

HE Bredkjaer, JGT Grudzinskas, (2001), "Cryobiology in Asisted Reproductive Technology. Would Hipocrates approve?" *Early Pregnancy: Biology and Medicine Vol:5, No:3*, 211-213

Jee BC, Suh CS, Kim YB, Kim SH, Choi YM, Kim JG, et al. (2010), Administration of intravenous albumin around the time of oocyte retrieval reduces pregnancy rate without preventing ovarian hyperstimulation syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Obstet Invest*; 70:47- 54.

Johnson, M., Everitt, B. (1988). *Essential Reproduction*, Oxford, Blackwell Scientific Publications Third Edition.

Kahraman S, Kumtepe Y. Sertyel S. Dönmez E. Benkhalifa M Fındıklı N. Vanderzwalmen. P: (2002), Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility *Hum Reprod*, Vol17, Issue 12, , 3193–3200

Kahraman S. Yakın, Y., (2000), "Ovülasyon İndüksiyonu" , *Organon*.

Kruger, TF., Menkveld, R., Stander, FS., Lombard, CJ., Van der Merwe, JP., van Zyl, JA., et al., (1986), "Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization", *Fertil Steril*, 46, 1118-23.

Kimberly E. Liu, Michael Hartman, Alex Hartman Management of thin endometrium in assisted reproduction: a clinical practice guideline from the Canadian Fertility and Andrology Society. *RBMO 2019*, 39 , 1 ,49-62

Kovacs P, Matyas S, Boda K, Kaali SG The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod.* 2003 Nov;18(11):2337-41.

Kumbak B, Erden HF, Tosun S, Akbas H, Ulug U, Bahçeci M. Outcome of assisted reproduction treatment in patients with endometrial thickness less than 7 mm. *Reprod Biomed Online.* 2009 Jan;18(1):79-84.

Kuwayama, M., Vajta G, Ieda S, Kato O., (2005), Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of paternal contamination. *Reprod Biomed Online.* 11(5): p.608-14.

Lan N. Vuong, Toan D. Pham, Vinh Q. Dang, Tuong M. Ho, (2019), Live birth rates with a freeze-only strategy versus fresh embryo transfer: secondary analysis of a randomized clinical trial, *RBMO Volume 38, Issue 3, Pages 387-396.*

Legro RS, Finegood D, Dunafin, (1998), A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab;* 83:2694-8

Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AN, Yauger BJ, Larsen FW., (2008), Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril,* 90:2138–2143.

Li, Z., Wang, YA., Ledger, W., Edgar, DH., Sullivan, EA., (2014), “Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study”, *Hum Reprod,* 29, 2794-801.

Loutradi, K.E., Kolibianakis, E.M., Venetis, C.A., Papanikolaou, E.G., Pados, G., Bontis, I., Tarlatzis, B.C. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis, *Fertility and Sterility,* 90(1):186-193

MacDougall, J., Tan, S.L., Balen, A., Jacobs, H.S. A. (1993). Controlled study comparing patients with, and without, polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilisation, *Hum. Reprod,* 8:233-237.)

Miller, JH., Weinberg, RK., Canino, NL., Klein, NA., Soltes, MR., (1999), “ The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age”, *Am J*

Obstet Gynecol, 181(4), 952-7.

Mosher, W.D., Pratt, W.F. (1991). Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trend, *Fertility and Sterility*, 56:192.

Orhan E., (2008), 'Erkek İnfertilitesi', *Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite*, 1. Baskı, Çeviri Editörü, Nedim Çiçek, Palme Yayıncılık, Ankara, 109148.

Palasz, A.T., Mapletoft, R.J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances, *Biotechnol Adv*, 14:127-149.

Preutthipan, S., Linasmita, V., (2003), "A prospective comparative study between hysterosalpingography and hysteroscopy in detection of intrauterine pathology in patients with infertility", *J Obstet Gynaecol Res*, 29, 33-37.

Rall, W.F., Fahy G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos, *Nature*, 313:573-574.

Rizk, B. and Aboulghar, M.A. (1999), Classification, Pathophysiology and Management Of Ovarian Hyperstimulation Syndrome, In Brinsden, P. (ed.) *In-Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. The Parthenon Publishing Group, New York, London, pp. 131-155

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PKOS consensus workshop group. (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PKOS). *Hum Reprod*; 19: 41-7.

Rowe T. (2006) Fertility and a woman's age. *J Reprod Med*. Mar;51(3):157-63.

Ryley DA, Bayer SR, Eaton A et al., (2004), Influence of body mass index (BMI) on the outcome of 6827 IVF cycles, *Fertil Steril*;82:S38-S39

Papanikolaou E, Chartomatsidou T, Timotheou E, Tatsi P, Katsoula E, Vlachou C, Asouchidou I, Zafeiratis O, Najdecki R In Freeze-All Strategy, Cumulative Live Birth Rate (CLBR) Is Increasing According to the Number of Blastocysts Formed in Women <40 Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jul 3;10:427. doi: 10.3389/fendo.2019.00427. eCollection 2019

S.Mackens, S.Santos-Ribeiro, A.vandeVijver, A.Racca, L.VanLanduyt, H.Tournaye and C.Blockeel, (2017), Frozen embryo transfer are view on the optimal endometrial preparation and timing, *Human Reproduction*, Vol.32,No.11pp.2234–2242

Sesh Kamal Sunkara, Athanasios Siozos, Virginia Noelle Bolton, Yakoub Khalaf, Peter Riven Braude, and Tarek El-Toukhy, (2010), The influence of delayed blastocyst formation on the outcome of frozen-thawed blastocyst transfer: a systematic review and meta-analysis, *Human Reproduction*, Vol.25, No.8 pp. 1906–1915

Smith, S., Pfeifer, SM., Collins, JA., (2003), “Diagnosis and management of female infertility”, *JAMA*, 290(13), 1767-70.

Stachecki, J.J. and Cohen, J. (2004) ‘An overview of oocyte cryopreservation’, *Reproductive BioMedicine Online*, 9(2), pp. 152–163.

T.C. Resmi Gazete, Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri (ÜYTE) Hakkında Yönetmelik, 30.09.2014. Sayı:29135, Başbakanlık Basımevi, Ankara

Toner, J.P., Veeck, L.L., Acosta, A.A. and Muasher, S.J. (1991), ‘Predictive value of pregnancy during original in vitro fertilization cycle on implantation and pregnancy in subsequent cryothaw cycles’, *Fertility and Sterility*, 56(3), pp. 505– 508.

Trounson, A. and Mohr, L. (1983) ‘Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo’, *Nature*, 305 (5936), pp. 707–709.

Trounson, A., Mohr, L., (1983), “Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo”, *Nature*, 305, 707-9.

Van den Abbeel, E., Camus, M., Van Waesberghe, L., Devroey, P., Van Steirteghem, AC., (1997), “A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled- rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen”, *Hum Reprod*, 12, 257-61.

Van der Elst, J., Camus, M., Van den Abbeel, E., Maes, R., Devroey, P., Van Steirteghem, AC., (1995), “Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol protocols”, *Fertil Steril*, 63, 92100.

Vanderzwalmen P, Delval A , Lejeune B, Puissant F Zech, (2004), H Vitrification: a promising method for the cryopreservation of human embryos. (Manuscript for the book on cryopreservation of gametes and embryos, ESHRE).

Venetis, C.A., Kolibianakis, E.M., Bosdou, J.K., Tarlatzis, B.C.,(2013), Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum. Reprod. Update.* 19: 433–457

Waldenstöm V, Kalm J, Marks L, Nilsson S., (1999), High pregnancy rates and successful prevention of severe OHSS by prolonged coasting of very hyperstimulated patients: a multicenter study. *Hum Reprod* 14(2):294-298.

WHO. Infertility: (1991), .A tubulation of available data on prevalence of primary of secondary infertility. Geneva.

Yuan X, Saravelos SH, Wang Q, Xu Y, Li TC, Zhou C. Endometrial thickness as a predictor of pregnancy outcomes in 10787 fresh IVF-ICSI cycles. *Reprod Biomed Online.* 2016 Aug;33(2):197-205. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.05.002. Epub 2016 May 13. PMID: 27238372

Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Endometrial pattern, thickness and growth in predicting pregnancy outcome following 3319 IVF cycle. *Reprod Biomed Online.* 2014 Sep;29(3):291-8. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.05.011. Epub 2014 Jun 13. PMID: 25070912

10.EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu



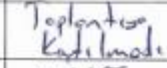
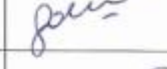



05.07.2019

Sayın Prof.Dr.Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda planladığı "Dondurulmuş-Çözülmüş ve Taze Embriyo Transferinin Embriyo Canlılığı ve Gebelik Sonuçlarına Etkisi" isimli araştırmanızın kurulumuzun 05.07.2019 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.


Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN

EK-1 Etik Kurul Onayı (2.sayfa)

T.C. BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI				
Tarih: 05.07.2019	Karar No: 2019/30-08			
Toplantı Sayısı:30	Prof.Dr.Tülay İREZ'in planladığı "Dondurulmuş-Çözülmüş ve Taze Embriyo Transferinin Embriyo Canlılığı ve Gebelik Sonuçlarına Etkisi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.			
ÜYELER				
Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN	Tıp Fakültesi	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D	Etik Kurul Başkanı	
Prof.Dr.Leman ŞENTURAN	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik Bölümü	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof.Dr.Fatma ÇELİK	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik Bölümü	Üye	
Doç.Dr.Şölen HİMMETOĞLU	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya A.D.	Raportör	
Doç.Dr.Burcu KARADUMAN	Diş Hekimliği Fakültesi	Periodontoloji A.D.	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep HOŞBAY	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi.Ayşe Dilşad YAKUT	Eğitim Fakültesi	Özel Eğitim	Üye	

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı: Sevil ÜNAL

Doğum Tarihi: 29.04.1973

Doğum Yeri: İPSALA

Tel: 0(533) 4122651

E-Mail: sevilunal@gmail.com

Eğitim Düzeyi

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi / Biyoloji / 2006

Lise: Tekirdağ Sağlık Meslek Lisesi /1991

İş Geçmişi

İstanbul Tüpbebek Merkezi IVF Laboratuvarı/ Biyolog 2017-halen

Maslak Acıbadem Hastanesi IVF Laboratuvarı / Biyolog 2012-2017

Memorial Şişli Hastanesi IVF laboratuvarı/ Biyolog 2000-2012

Yabancı Diller

İngilizce / orta

12.İNTİHAL RAPORU

DONDURULMUŞ ÇÖZÜLMÜŞ VE TAZE EMBRİYO TRANSFERİNİN EMBRİYO CANLILIĞI VE GEBELİK SONUÇLARINA ETKİSİ

ORIJINALLIK RAPORU

%27 BENZERLİK ENDEKSİ	%26 İNTERNET KAYNAKLARI	%5 YAYINLAR	%13 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
---------------------------------	-----------------------------------	-----------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.tupbebek-genetik.com İnternet Kaynağı	%7
2	prezi.com İnternet Kaynağı	%4
3	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%3
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%2
5	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
6	Submitted to Beykent Universitesi Öğrenci Ödevi	%1
7	istanbulmedicaljournal.org İnternet Kaynağı	%1
8	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
9	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	%1