

**T. C.**

**MALTEPE ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**3.GÜN TÜM EMBRİYOLARI DONDURULMUŞ (TOTAL  
FREEZING) POLİKİSTİK OVER SENDROMLU İNFERTİL  
HASTA GRUPLARINDA, ÇÖZME SONRASI 3. GÜN VE 5. GÜN  
(BLASTOSİST) EMBRİYO TRANSFERİ YAPILANLARIN  
GEBELİK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**BİO. Sevda ALP**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İstanbul**

**2017**



**T. C.**  
**MALTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**3.GÜN TÜM EMBRİYOLARI DONDURULMUŞ (TOTAL  
FREEZING) POLİKİSTİK OVER SENDROMLU İNFERTİL  
HASTA GRUPLARINDA, ÇÖZME SONRASI 3. GÜN VE 5. GÜN  
(BLASTOSİST) EMBRİYO TRANSFERİ YAPILANLARIN  
GEBELİK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**BİO. Sevda ALP**

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

**Prof. Dr. Mehmet CINCIK**

**İSTANBUL**

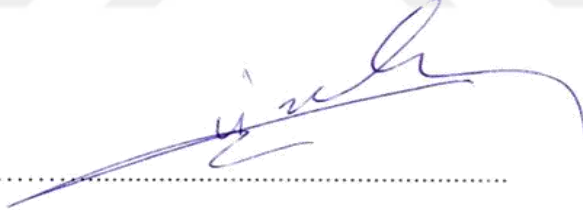
**2017**

T.C. Maltepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

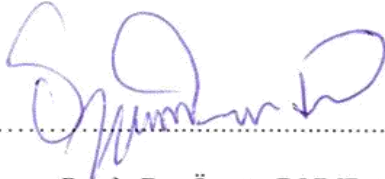
07.11.2017 tarihinde tezinin savunmasını yapan Sevda ALP' e ait "3. Gün Tüm Embriyoları Dondurulmuş (Total Freezing) Polikistik Over Sendromlu İnfertil Hasta Gruplarında, Çözme Sonrası 3. Gün ve 5. Gün (Blastosist) Embriyo Transferi Yapılanlarda Gebelik Oranlarının Karşılaştırılması" başlıklı çalışma, Jürimiz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans Tezi Olarak **Oy Birliği Oy Çokluğuyla** Kabul Edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet CINCIK  
(Başkan)  
(Danışman)



Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ  
(Üye)



Prof. Dr. Özgür DUNDAR  
(Üye)

## YEMİN METNİ

07/11/2017

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "3.Gün Tüm Embriyoları Dondurulmuş (Total Freezing) Polikistik Over Sendromlu İnfertil Hasta Gruplarında, Çözme Sonrası 3.Gün ve 5.Gün (Blastosist) Embriyo Transferi Yapılanların Gebelik Oranlarının Karşılaştırılması" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar olan bütün süreçlerinde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın tarafımda yazıldığını ve yararlandığım bütün eserlerin "Kaynakça"da gösterilenlerden oluştuğunu, "Kaynakça"da yer alan bu eserlerden metin içinde atıf yaparak yararlanmış olduğumu belirtir ve onurumla doğrularım.

151503106

Sevda ALP



## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi sırasında tüm bilgi ve birikimi ile desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Mehmet CINCIK'a,

Klinik embriyoloji mesleğine adım atmamı ve çalışmalarım için tüm imkanları sağlayan sevgili hocam Op. Dr. Düzgün KORKMAZ'a,

Beni ilgi ile adım adım yetiştiren, tecrübe kazandıran laboratuvar direktörüm ve aynı zamanda canım arkadaşım Embriyolog Ebru YİĞİT'e,

Emek verip zaman ayıran ve destekleyen sevgili hocalarım; Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ, Prof. Dr. Özgür DÜNDAR, Prof. Dr. Güler Öztürk, Prof. Dr. Süha SÖNMEZ, Doç. Dr. Yavuz AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Mustafa SARIKAYA'ya,

Hayatıma yön vermemde desteğini esirgemeyen güzel arkadaşım Embriyolog Şenay CANKUT KANAAT'e ,

Her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini her daim hissettiren, üzerimde sonsuz bir emeğe sahip sevgili annem, sevgili babam, kardeşime, aileme teşekkür ederim.

Bio. Sevda ALP

## ÖZET

### **3.GÜN TÜM EMBRİYOLARI DONDURULMUŞ (TOTAL FREEZİNG) POLİKİSTİK OVER SENDROMLU İNFERTİL HASTA GRUPLARINDA, ÇÖZME SONRASI 3.GÜN VE 5.GÜN (BLASTOSİST) EMBRİYO TRANSFERİ YAPILANLARIN GEBELİK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.**

Bu çalışmadaki amacımız OHSS riskinden korunmak ve implantasyon başarı oranını arttırmak için 3.gün tüm embriyoları dondurulmuş (total freezing) olan polikistik over sendromlu infertil hasta gruplarında, çözme sonrası 3.gün ve 5.gün (blastosist) embriyo transferi yapılan hastalar arasında gebelik başarı oranlarını karşılaştırmaktır.

Bu çalışmada 26/01/2015 ile 15/06/2017 tarihleri arasında Bahçelievler Medicana Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Üreme Sağlığı Merkezi'ne başvuran ve PKOS tanısı konulmuş olan 20-40 yaş aralığında YÜT uygulanan 55 kadın hastaya ait veriler retrospektif olarak çalışma kapsamına alınmıştır ve yaş aralığı, oosit sayısı, fertilize oosit sayısı, total freezing yapılmış olan embriyo sayısı ve kalitesi, embriyo transfer günü ve Beta-Human Karyonik Gonadotropin pozitifliğine dair tüm bilgiler tarandı.

Embriyo transferi 3.gün yapılan grubun %76,7'sinin (n=23) dondurulmuş embriyo kalitesi G1, %20,0'sinin (n=6) G1-G2 ve %3,3'ünün (n=1) G1-G2-G3'tür. Embriyo transferi 5.gün yapılan grubun ise %84,0'ünün (n=21) dondurulmuş embriyo kalitesi G1 ve %16,0'sının (n=4) G1-G2'dir. Embriyo transferi 3.gün yapılan olguların %50,0'sinde (n=15), 5.gün yapılan olguların ise %60,0'ında (n=15) gebelik pozitifdir.

Embriyo dondurma-çözme işlemleri sonrasında yapılan 5. gün embriyo transferinin 3.gün embriyo transferine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamasına rağmen, gebelik oluşma potansiyeli açısından daha olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Polikistik over sendromu, kriyoprezervasyon, embriyo transferi, transfer günü

## ABSTRACT

### COMPARISON OF PREGNANCY RATES BETWEEN THE PATIENT GROUPS ON WHOM (BLASTOCYST) EMBRYO TRANSFER WAS PERFORMED ON THE 3RD AND THE 5TH DAY AFTER THE THAWING, AMONGST THE INFERTILE PATIENT GROUP WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME AND SUBJECTED TO TOTAL EMBRYO FREEZING IN DAY 3.

In this study, we aimed to compare the success rates of pregnancy between the patients who underwent (blastocyst) embryo transfer on the 3rd and the 5th day after the thawing among the infertile patient groups with polycystic over syndrome and subjected to total embryo freezing on day 3, in order to reduce the risk of OHSS and to increase the success rate of implantation.

In this study, we retrospectively analyzed the data of 55 female patients between the age of 20-40, who applied to Bahcelievler Medicana Hospital Obstetrics and Gynecology Center between the dates of 26/01/2015 and 15/06/2017, were diagnosed as PCOS and underwent ART. All data regarding age range, number of oocytes, number of fertilized oocytes, number and quality of embryos underwent total freezing, embryo transfer day, and Beta-Human Chorionic Gonadotropin positivity were scanned.

The frozen embryo quality among the group who underwent embryo transfer on day 3 is as follows: %76,7 of those (n=23) is G1, %20 (n=6) is G1-G2 and %3,3 (n=1) is G1-G2-G3. The frozen embryo quality among the group who underwent embryo transfer on day 5 is as follows: %84 of those (n=21) is G1 and %16 (n=4) is G1-G2. Pregnancy is positive in %50 (n=15) of the cases that underwent embryo transfer on day 3, and in %60 (15) of the cases that underwent embryo transfer on day 5.

Although no statistically significant difference was found between the 5th day embryo transfer and the 3rd day embryo transfer, each performed after the embryo freezing-thawing processes, the 5th day embryo transfer seems to provide more positive results in terms of potential pregnancy development.

**Keywords:** Polycystic ovary syndrome, cryopreservation, embryo transfer, transfer day



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
YEMİN METNİ.....	iv
TEŞEKKÜRLER.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii-xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii-xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
TABLolar DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 İnfertilite.....	2
2.1.1 Erkek İnfertilitesi.....	2-3
2.1.2 Kadın İnfertilitesi.....	4-6
2.2 Polikistik Over Sendromu.....	6
2.2.1 Tanı.....	6-8
2.2.2 Patogenez.....	8-9

2.2.3 Klinik ve Laboratuvar.....	9-11
2.2.4 PKOS'un Uzun Dönem Riskleri.....	11-12
2.2.5 PKOS Tedavisi.....	12-13
2.3 Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon.....	14
2.3.1 Tedavi Protokolleri.....	14
2.3.1.1 Doğal Siklusta IVF.....	15
2.3.1.2 GnRH Agonist Protokoller.....	15
2.3.1.2.1 Standart Long Protokol.....	15
2.3.1.2.2 Oral Kontraseptifler ile Kombine Long Protokol.....	15
2.3.1.2.3 Ultralong Protokol.....	16
2.3.1.2.4 Short Protokol.....	16
2.3.1.2.5 GnRH Agonist Stop Protokol.....	16
2.3.1.3 GnRH Antagonist Protokoller.....	17
2.3.1.4 Minimal Stimülasyon Protokoller.....	17
2.3.1.5 GnRH Agonist ve Antagonist Protokoller.....	18
2.3.2. Ovulasyonun Tetiklenmesi.....	18-19
2.4 Oositlerin Toplanması.....	19-20
2.5 Overyan Hiperstimülasyon Sendromu.....	21
2.5.1 OHSS'de Risk Faktörleri.....	21-22

2.5.2 OHSS’de Korunma.....	22-23
2.6 Gametlerin Hazırlanması.....	23
2.6.1 Oositlerin Hazırlanması ve Morfolojik Değerlendirmesi.....	23-25
2.6.2 Mikroenjeksiyon için Spermilerin Hazırlanması.....	25
2.7 ICSI.....	25-26
2.8 Fertilizasyon.....	26-27
2.9 Embriyo Seçimi ve Kültürü.....	27
2.9.1 Pronükleer Evre.....	27-28
2.9.2 Bölünme Evresi.....	28
2.9.3 Erken Bölünme (Early Cleavage).....	29
2.9.4 Bölünme Evresi Sınıflandırması.....	29-31
2.9.5 Dördüncü Gün Embriyolarının Değerlendirmesi.....	31-32
2.9.6 Beşinci Gün Embriyolarının Değerlendirmesi.....	32
2.9.6.1 Blastosel Boşluğu .....	32
2.9.6.2 Dış Hücre Kitlesi(Trofoektodermal Hücreler).....	33
2.9.6.3 İç Hücre Kitlesi(ICM).....	33
2.10 Kriyoprezervasyon.....	34
2.10.1. Embriyo Dondurma Yöntemleri.....	35
2.10.1.1 Programlı (Yavaş) Dondurma Tekniği.....	35

2.10.1.2 Vitrifikasyon.....	35
2.10.2 Embriyoların Farklı Gelişim Safhalarında Dondurulması.....	36-37
2.11 Embriyo Transferi.....	37-39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1 Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon.....	40
3.2 Oositlerin Toplanması, Denüasyonu ve ICSI.....	41-42
3.3 Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesi.....	42-43
3.4 Vitrifikasyon ve Çözdürme Protokolleri.....	43-44
3.5 Embriyo Transferi.....	44
4. BULGULAR.....	45-50
5. TARTIŞMA.....	51-52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR.....	54-71
ÖZGEÇMİŞ.....	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama	İngilizce Açıklama
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri	Assisted Reproductive Technics
ICSI	İn Vitro Sperm Enjeksiyon	Intracytoplasmic Sperm Injection
IVF	İn Vitro Fertilizasyon	İn Vitro Fertilisation
PCO	Polikistik Over	Polycystic Over
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (DSO)	World Health Organization
LDL	Kötü Kolesterol	Bad Cholesterol
HDL	İyi Kolesterol	Good Cholesterol
FOH	Fonksiyonel Overyan Hiperandrojenizm	Functional Ovaryan Hyperandrogenism
PCOS	Polikistik Over Sendromu	Polycystic Over Syndrome
OHSS	Overyan Hiperstimülasyon Sendromu	Ovaryan Hyperstimulation Syndrome
SHBG	Seks Hormon Bağlayıcı Globülin	Sex Hormone Binding Globulin
LH	Lüteinleştirici Hormon	Luteinizing Hormone
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon	Follicle Stimulating Hormone
ASRM	American Üreme Tıbbı Derneği	American Society for Reproductive Medicine
ÜYTE	Üremeye Yardımcı Teknikler	Assited Reproductive Techniques
DMSO	Dimetilsülfoksit	Dimetilsulfoxid
PROH	Propanediol	Propanediol
CC	Klomifen Sitrat	Clomiphene Citrate
IVM	In-vitro Maturasyon	In-vitro Maturation
KOH	Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon	Controlled Ovaryan Hyperstimulation
hMG	Human Menopozal Gonadotropin	Human Menopausal Gonadotropin
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon	Gonadotropin Releasing Hormone
E2	Östradiol	Estradiol
hCG	Human Karyonik Gonadotropin	Human Chorionic Gonadotropin

<b>Kısaltma</b>	<b>Açıklama</b>	<b>İngilizce Açıklama</b>
GnRH-a	Gonadotropin Releasing Hormon Agonisti	Gonadotropin Releasing Hormone Agonist
TV-USG	Transvajinal Ultrasonografi	Transvaginal Ultrasonography
M2	Metafaz-2	Metaphase-2
M1	Metafaz-1	Metaphase-1
SF	Serum Fizyolojik	Serum Physiological
EBSS	Earle'nin Dengeli Tuz Çözeltisi	Earle's Balanced Salt Solution
OPU	Oosit Pick-up	Oocyte pick-up
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu	Intracytoplasmic Sperm Injection
ARDS	Akut Respiratuar Distres Sendromu	Acute Respiratory Distress Syndrome
VEGF	Vasküler Endotelial Growth Faktör	Vascular Endothelial Growth Factor
HES	Hidroksietil Starch	Hydroxyethyl Starch
HEPES	2- [4- (2-hidroksietil) piperazin-1-il] etansülfonik asit	2- [4- (2-hydroxyethyl) piperazin-1 yl] ethanesulfonic acid
PN	Pronükleus	Pronuclei
PB	Polar Body	Polar Body
NPB	Nükleolar Polar Body	Nuclear Polar Body
ESHRE	Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği	European Society of Human Reproduction and Embryology
ICM	İç Hücre Kitlesi	Inner Cell Mass
ET	Embriyo Transferi	Embryo Transfer
FET	Dondurulmuş Çözülmüş Embriyo Transferi	Freeze Embryo Transfer
EC	Erken Bölünme	Early Cleavage
BMI	Beden kitle İndeksi	Body Mass Index
GV	Germinal Vezikül	Germinal Vesicle
CO2	Karbondioksit	Carbon Dioxide
O2	Oksijen	Oxygen

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İnsülin direnci, santral obezite ve polikistik over sendromu arasındaki ilişki.....	9
Şekil 2: Denüstasyon sonrası oositler.....	25
Şekil 3: İki pronükleus görülen döllemiş zigot.....	27
Şekil 4: Bölünme evresinde embriyolar. Sırasıyla; 2 hücreli embriyo, 4 hücreli embriyo, 8 hücreli embriyo.....	29
Şekil 5: Dördüncü günde embriyolar. Sırasıyla; 10 hücreli embriyo, morula.....	32
Şekil 6: Beşinci gün blastokist evresi embriyoları.....	33
Şekil 7 : Dondurulmuş embriyo kalite dağılımları.....	46
Şekil 8: Embriyo transfer günlerinin dağılımları.....	46
Şekil 9: Gebelik sonucu dağılımları .....	47
Şekil 10: Transfer gününe göre gebelik sonucu dağılımları.....	50

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> WHO 2010 semen kriterleri.....	3
<b>Tablo 2 :</b> Polikistik over tanı kriterleri.....	7
<b>Tablo 3 :</b> Polikistik over sendromunun belirti ve bulguları.....	45
<b>Tablo 4 :</b> Tanımlayıcı özelliklerin dağılımları.....	10
<b>Tablo 5 :</b> Embriyo transfer gününe göre tanımlayıcı özellikler.....	47
<b>Tablo 6:</b> Embriyo transfer gününe göre dondurulmuş embriyo özelliklerinin değerlendirilmesi.....	48
<b>Tablo 7:</b> Embriyo transfer gününe göre gebelik oranlarının değerlendirilmesi.....	49





## 1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu, üreme çağındaki kadınlarda sıklıkla görülen ve genellikle anovulasyon problemi olarak kadınlarda infertilite problemlerini de beraberinde getiren endokrin bir bozukluktur. Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) konusunda siklus başarısızlığından çok implantasyon başarısızlığının en büyük faktörü azalmış endometrial reseptiviteden dolayı ortaya çıkan başarısızlıklardır.

İnfertilite tedavisinde YÜT uygulamalarında yeni teknolojik gelişmeler hızla ilerlemiş, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon ve embriyo kriyoprezervasyon yöntemlerinin kullanımı ile gebelik başarı oranı giderek artmıştır. Embriyoların kriyoprezervasyonu çeşitli nedenlerden dolayı zorunlu olarak da yapılmaktadır. Polikistik over sendromu olan hastalarda ovaryan stimülasyon sırasında yumurtalıkların aşırı uyarılması ile ovaryan hiperstimülasyon sendromu(OHSS) meydana gelebilir ve östrojen hormonu fizyolojik dozların üstüne çıktığı durumlarda endometrium bu durumdan olumsuz etkilenir. Bu neden ile tüm embriyolar dondurularak kadında hayati risk oluşturan tablo ortadan kalktıktan sonra bir sonraki siklusta embriyolar çözülerek transfer gerçekleştirilir. Başarılı bir implantasyon için iyi kaliteye sahip bir embriyonun yanı sıra endometrium kalınlığının implantasyon için uygun olması gerekmektedir. Progesteron hormonu yüksekliği saptanan polikistik over sendromu olan hastalarda, özellikle transfer işlemini gerçekleştirirmeden önce embriyoların dondurulması ve ilerleyen bir sonraki siklusta transferinin yapılması ile gebelik ve canlı doğum oranlarında artış görülmektedir.

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) ile yapılan işlemlerde gebelik başarısını arttırmak için artık bir çok klinik frozen embriyo transferi (FET) yapmaktadır. Hem endometrium kalınlığının hem de embriyo kalitesinin iyi olduğu durumlarda beklenen gebelik şansı daha da artmaktadır

Bu tez çalışması ile, amaçlanan PKOS'lu hastalarda OHSS riskini önlemek ve implantasyon başarısını arttırmak için ICSI siklusunda elde edilen embriyoların 3.gün dondurma-çözme kombinasyonları sonrasında 3. ve 5.gün embriyo transferlerinin gebelik sonuçları üzerindeki başarısını incelemektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 İnfertilite**

İnfertilite, kadın yaşının 35'in altında olduğu çiftlerde en az bir yıl boyunca, kadın yaşının 35'in üzerinde olduğu çiftlerde ise 6 ay boyunca hiçbir kontraseptif yöntemi kullanmaksızın düzenli cinsel ilişkide (haftada 3-4 gün) bulunmalarına rağmen kadının gebe kalamama durumudur (1).

İnfertilite oranlarına bakıldığında toplumda üreme çağındaki sağlıklı çiftlerin % 10-15 infertilite problemine rastlanır (2). İnfertilite primer ve sekonder 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 (3). 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 fertilite ve doğum oranları azalmaktadır ve infertilite kliniklerine başvuran hasta sayısında ileri derecede artış bulunmaktadır (4,5).

İnfertilite nedenleri; % 30-40'ında erkek, % 40-50'sinde kadın sorumludur. % 10-15 çiftte ise açıklanamayan infertilite mevcuttur (2,5,6).

#### **2.1.1 Erkek İnfertilitesi**

Günümüzde infertil çiftlerin % 30-40'ında önemli bir etken olarak erkek infertilitesi karşımıza çıkmaktadır (5). Erkek infertilitesinin başlıca nedenleri; anormal sperm üretimi, retrograd ejakülasyon, hormonal ve genetik nedenler, varikosel, kriptorşidizm, enfeksiyon, kemoterapi ve radyoterapidir.

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde detaylı anamnez, fiziki muayene ve semen analizi en önemli rolü oynar. Hastanın anamnezi alınırken çocukluk döneminde geçirmiş olduğu hastalıklar, travma, inmemiş testis, kabakulak, orşite neden olabilecek hastalıklar mutlaka sorgulanmalıdır.

Kemoterapi ve radyoterapi tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar, yakın zamanda geçirilmiş ateşli bir hastalık spermatogenezde etki ederek semen kalitesinin bozulmasına ve hatta azospermiye neden olabilir. Tüberküloz, kabakulak veya üreme organlarında gonore gibi enfeksiyon sonrası oluşan hastalıkların beraberinde getirdikleri reaksiyonlar, üreme kanallarında tıkanıklığa, testislerde sperm üretiminin olmamasına neden olabilmektedir (6). Çocukluk çağında sıklıkla görülen kriptorşidizm sperm yapımını olumsuz etkiler ve ilerleyen yaş ile beraber unilateral kriptorşid vakalarda % 50, bilateral vakalarda % 75 oranında normal semen parametrelerini etkiler ve infertiliteye neden olur (7,8). Fiziki muayene de epididim ve vas-deferens muayene edilir. Günümüzde erkeklerin % 13'ünde sıklıkla görülen ve ilerleyen safhalarında infertiliteyi de beraberinde getiren varikoselin olup olmadığına bakılır. Spermatogenez ısıya karşı oldukça hassastır ve varikoselin bulunduğu testiste atrofi ve ısı artışından kaynaklı sperm parametrelerinde bozulma görülebilir. İnfertil vakaların % 20-40'nda varikozel tespit edilmektedir (9,10). Semen analizi 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında yapılmalıdır. Semen analizinde; spermelerin volüm, konsantrasyon, motilite ve morfoloji, lökosit, yuvarlak hücre ve pH'ına bakılır. Dünya Sağlık Örgütü(WHO) tarafından 2010 yılında semen analizi için tüm bilgiler belirtilmiştir. Erkek infertilitesinde genel olarak aşağıdaki parametreler farklı oranlarda sapmaktadır.

	<b>PARAMETRELER</b>	<b>WHO 2010</b>
1	Miktar	1,5 ml
2	Ph	≥ 7,2
3	ml'deki sperm sayısı	≥ 15 milyon/ml
4	Motilite	% 40
5	Total sperm sayısı	≥ 39 milyon/ml
6	Morfoloji	% 4
7	Vitabilite	≥ 58
8	Lökosit	≤ 1 milyon/ml

**Tablo 1:** WHO 2010 semen kriterleri. A: hızlı progresif motil, B: yavaş progresif motil, C: yerinde motil.

### 2.1.2 Kadın İnfertilitesi

Kadın faktörünün değerlendirilmesi hikaye, fiziki-pelvik muayene, endokrin testler, görüntüleme yöntemleri ve genetik testlerden oluşur. Hikayede hastanın infertilite süresi, uygulanan tedaviler, menstrüel siklus düzeni, kontrasepsiyon öyküsü ve süresi, cinsel ilişki sıklığı, varsa önceki gebelikler, dismenore, disparoni, genel sağlık durumu, tiroid hastalıkları, kullanılan ilaçlar, vücut kitle indeksi, galaktore, hirsütizm ve daha önce geçirmiş olduğu operasyonlar sorgulanmalıdır (11).

Kadın infertilitesinin başlıca sebepleri; ovulatuvar bozukluklar, prematür over yetmezliği, tubal faktör, uterin faktör, servikal faktör, endometriozis, immünolojik nedenler ve yaş faktörüdür.

İnfertil çiftlerin yaklaşık olarak % 15'inde ovulasyon bozukluğu vardır. Kadına bağlı infertilitenin % 30-40'ını ovulatuvar bozukluklar oluşturur. Normal üreme çağındaki kadınlarda ovulatuvar menstrüel siklus 25 ile 35 gün arasında değişmektedir. Ovulasyon düzensizlikleri genellikle düzensiz adet periyotları (oligomenore) veya adet görememe (amenore) ile karakterizedir (12). Over rezervi, serum bazal FSH, bazal estradiol (E2), bazal inhibin-B, anti-mülleryen hormon (AMH) düzeyleri, CCCT (klomifen sitrat challenge test) ile bazal USG'de antral follikül sayısı ve over hacmi ile değerlendirilebilir (13,14).

Prematür over yetmezliği, 35-40 yaşın altındaki kadınlarda over rezervinin azalması ve amenore (adet görememe) ile karakterizedir. Yumurtalıkların işlevini yerine getirememesi nedeni ile normal östrojen hormonu üretimi ve yumurta salınımını gerçekleştirmez.

Kadına bağlı infertilitenin % 40'ını tubal faktör oluşturur. Septik abortus, ektopik gebelik, pelvik inflamatuvar hastalık (PID), reptüre apandisit, endometriozis, tubal cerrahi operasyonları, tüplerin cerrahi olarak bağlanması ve önceden geçirilmiş bazı ameliyatlarda tubaların kapanmasına ya da tubal harabiyete sebep olarak infertiliteye sebep olur (15,16,17,18). İnfertil kadınlarda tuba-peritoneal yeterliliğin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan yöntem histerosalpinografi (HSG)'dir.

İnfertil vakaların % 2-5'inde görülen uterusu ya doğuştan ya da sonradan oluşan anomaliler sonucu gebelik oluşmamaktadır. Septum, myomlar, intrauterin yapışıklıklar(sineşi), polipler ve endometrit gibi enfeksiyona bağlı patolojiler embriyonun implantasyonuna ve gelişimini engellemelerinin dışında preterm doğum, servikal yetersizlik, 1-2. Trimester spontan gebelik kayıpları ve intrauterin gelişme geriliği ile ilgili olup IVF hastalarının gebelik sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir (6,17,19).

Servikte bulunan servikal mukus östrojene karşı duyarlı bezler tarafından preovulatuvar dönemde miktarını ve akışkanlığını artırırken, progesteron ile baskılar. Ejakülasyon sonrasında spermeler hızla servikal mukus içerisine girerler ve karbonhidrat açısından zengin bir glikoprotein olan mukus spermelerin hayatta kalabilmelerini sağlar. Ovulasyon dönemine yakın artan mukusun yapısı inflamatuvar değişikliklerden etkilenir ise spermin geçişini etkileyerek infertiliteye neden olabilir (11).

Yapılan araştırmalarda endometriozisi olan kadınların yaklaşık olarak % 30-40'ının infertil olduğu saptanmıştır. Nedeni tam olarak açıklanamamış olsa da endometriozis, pelvik ağrı, dispareni ve dismenoreye neden olur ve overleri olumsuz etkiler. Ayrıca batin içi yapışıklıklara neden olur ve infertiliteyi de beraberinde getirir (20,21).

İnfertil çiftlerin yaklaşık olarak % 10'unda immünolojik faktörler nedeni ile infertilite gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda Natural Killer (NK) hücreleri plasental hücrelere zarar vererek gebelik kayıplarına neden olmaktadır. Oositin DNA yapısına zarar vererek embriyonun yavaş bölünmesine ve fragmentasyona sebep ve bu durumda implantasyon başarı oranlarını düşürmektedir (22).

Kadın infertilitesinde hastanın yaşı büyük önem taşır. İlerleyen yaş ile birlikte over rezervi azalır, oosit sayı ve kalitesinde hızla azalma olur ve menopoz ile tamamen yok olur. İlerleyen yaş ile overin gonadotropinlere verdiği yanıt ve tedavi başarısı olumsuz etkilenir ve anoploidi oranı artar. Fertilite kadınlarda 20-25 yaşları arasında maksimum seviyededir ve 35 yaş sonrasında bu oran düşmeye başlar, beraberinde oosit sayısında da azalma görülür. 40 yaşından sonra ise fertilite oranları hızla düşer.

Günümüzde kadınlar daha iyi yaşam koşulları sağlamak, kariyer yapmak ve özgürlüğünü kısıtlamamak gibi nedenler başta olmak üzere birçok sebepten dolayı evliliği ve gebelik yaşını ileri yaşlara ertelemektedir. Gebelik yaşının ilerlemesi ile infertilite problemleri de artmaktadır.

## **2.2.POLİKİSTİK OVER SENDROMU**

Polikistik over sendromu (PKOS) reproduktif dönemdeki kadınlarda çok sıklıkla rastlanan bir çok genetik ve çevresel etmenin etkili olduğu kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm ile nitelenen bir reproduktif bozukluktur (23,24).

Kronik anovulasyon klinik olarak kendini menstrüel düzensizlikler, disfonksiyonel kanamalar, oligomenore ve infertilite ile gösterir. Polikistik over sendromu tüm yaş gruplarında anovulasyon, hirsütizm ve infertilitenin en başta gelen nedenidir. Polikistik over sendromunun oluşumunda genetik etkenlerin önemli bir rolü olmakla birlikte kadınların annelerinde % 24, kız kardeşlerinde % 32 oranında PKOS görülür (25). Polikistik over sendromu olan kadınların % 40'ı yumurtlama bozukluğuna bağlı olarak infertildir (26).

### **2.2.1.Tanı**

Etiyolojisi ve patogenezi henüz tam olarak açıklanamayan bu hastalık türünde her menstrüel döngüde gelişerek çatlaması gereken follikül gelişiminin yarıda kalması nedeni ile over ultrasonografisine göre bir overde 2-9 mm çapında yoğun bir stroma etrafında ya da fazla miktarda stroma içinde dağılmış, 12 veya daha fazla follikül söz konusu ise ve/veya over hacmi büyükse (>10 ml) bu overler polikistik olarak tanımlanır (27,28). Bir tek polikistik over görülmesi polikistik over tanımı için yeterlidir. Polikistik overlerin, polikistik over sendromu yoksa uzun dönemde olumsuz etkilere neden olması beklenmez. Ancak overin aşırı uyarılması ile salgılanan yüksek hormon seviyeleri overyan hiperstimülasyon (Ovarian Hyperstimulation Syndrome-OHSS) için risk faktörü oluşturur (29).

Polikistik overleri bulunan fakat polikistik over sendromu olmayan kadınlar, normal overlere sahip kadınlara göre daha çok sayıda follikül, oosit ve embriyo oluştururlar ve canlı doğum yapma olasılıkları % 80 daha fazladır (30).

İlk kez 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından, 7 hastadan oluşan bir seride polikistik overler, hirsutizm, obezite (4 hastada) ve amenore birlikteliği şeklinde bildirilmiştir (31). Bu 7 hastanın her iki overinin ½ ve ¾ kadar çıkarılmış, hastaların tümünde menstrüasyon tekrar gerçekleşmiştir ve her 2 hastada gebe kalmıştır.

1990 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından düzenlenmiş olan bir konferansta en yaygın olarak kullanılan tanı kriterleri oluşturulmuştur (32). Bu kriterlere göre kronik anovülasyon klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ve Cushing sendromu, hiperprolaktinemi, klasik olmayan konjenital adrenal hiperplazi gibi PKOS benzeri kliniğe yol açabilecek etiyolojik nedenlerin ekarte edilmesi gereklidir. Bu tanı kriterleri PKOS'taki heterojen hasta grubu için istenilen seviyede olmasa da tanı açısından belli bir standardizasyonu sağlamıştır (33). Buna karşılık, 2003 yılında Rotterdam'da düzenlenen ASRM/ESHRE toplantısında, 1990 NIH kriterleri gözden geçirilmiştir ve bir önceki toplantıya benzer şekilde diğer etiyolojik nedenler ekarte edildikten sonra PKOS tanısının konulabilmesi için aşağıdaki üç kriterden en az ikisinin birlikteliğinin olması önerilmiştir (34,35).

- 1) Oligo – anovülasyon
- 2) Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
- 3) Ultrasonografide polikistik overler

	1990 NIH Tanı Kriterleri	2003 Rotterdam Yeniden Gözden Geçirilmiş Tanı Kriterleri
1	Kronik anovülasyon	Oligo – anovülasyon
2	Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ve diğer etiyolojik nedenlerin ekarte edilmesi	Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
3		Polikistik overler ve diğer etiyolojik nedenlerin ekarte edilmesi

**Tablo 2 :** Polikistik over tanı kriterleri.

Kronik anovülatuar infertilitenin en sık nedeni olan PKOS, multisistemik reproduktif-metabolik bir sendrom olarak Tip 2 diyabet, dislipidemi, kardiyovasküler hastalık ve endometrial karsinoma gibi uzun dönem sağlık riskleri taşıması nedeni ile günümüzde bir sağlık problemi olarak ön plana çıkmaktadır.

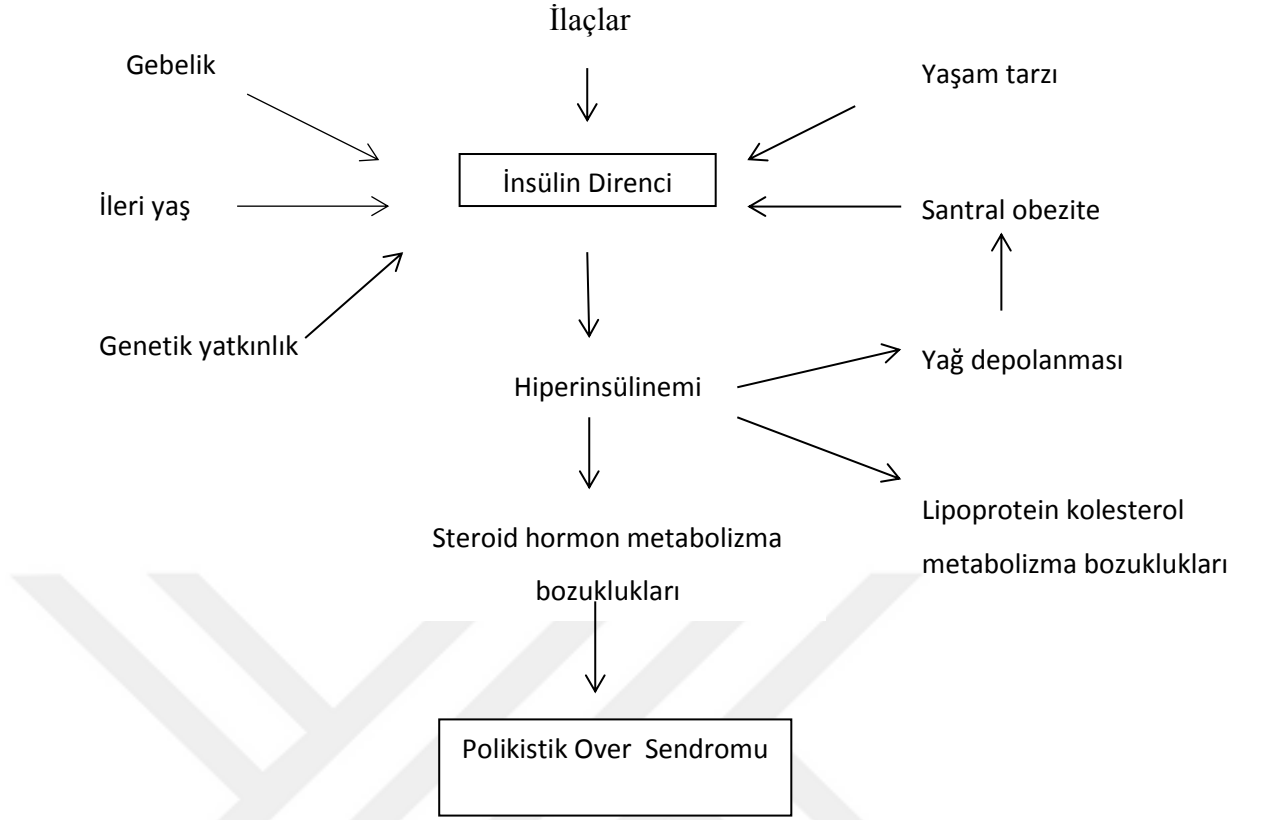
Genel olarak polikistik overler ile polikistik over sendromunu birbirinden ayırmak gerekir (36). Polikistik overler özellikle overlerin ultrasondaki morfolojik görünümünü tanımlarken; polikistik over sendromu ise polikistik overler ile birlikte oligomenore, hiperandrojenizme bağlı komplikasyonlar (sebore, akne, hirsütizm) ve obezite söz konusu olduğunda kullanılır.

### **2.2.2. Patogenez**

Polikistik over sendromunda görülen bozukluklar tek bir nedene bağlı değildir. Birçok genetik bozukluk ve çevresel koşullar bir araya gelince PKOS tablosu ortaya koymaktadır. Bu tabloda en önemli rolü olguların % 50-70'inde bulunan insülin direnci oynuyor (37,38). İnsülin direncine bağlı olarak gelişen insülin salınımı androjen yapımının artmasına (39), yapılan fazla androjen ise menstrüel siklus bozukluklarına, yumurtalık kistlerinin gelişimine ve hirsütizme neden olmaktadır.(1) İnsülin direnci ayrıca hipertansiyon, dislipidemi, Tip 2 DM ve kardiyovasküler bozuklukların gelişme riskini arttırmaktadır (39). İnsülin düzeylerinin düşürülmesi hem hiperinsülinemiye önlemiştir, hem de androjen hormon seviyelerinin düşmesine neden olarak yumurtalık fonksiyonlarının düzelmesine sebep olmuştur (37,40). Ancak yapılan bazı çalışmalar ile androjen düzeylerinin birtakım yöntemler ile düşürülmesinin insülin direnci ve hiperinsülinemi üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Pubertede hirsütizm, santral obezite ve menstrüel siklus bozuklukları ile başvuran bütün olgularda hiperandrojenizm akla gelmelidir.

Hiperandrojenizmin en sık gözlemlenen sebebi PKOS'dur. Hirsütizm, akne ve alopesi hiperandrojenizmin klinik bulgularıdır. Ergenlerde iki yıldan uzun süre ile menstrüel siklus düzensizlikleri gerçekleşirse hiperandrojenizme yönelik tetkikler yapılmalıdır. Bazen de bu durumun aksine menstrüel siklus düzensizlikleri olmamasına rağmen döngüler anovülatuar olabilir ve infertilite tetkikleri sonucunda PKOS ortaya çıkabilir (41).





**Şekil 1 :** İnsülin direnci, santral obezite ve polikistik over sendromu arasındaki ilişki. İnsülin direnci PKOS'un patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır.

### 2.2.3. Klinik ve Laboratuvar

Polikistik over sendromu, genellikle menarş yaşı civarında başlayan menstrüel düzensizlikler (oligo-amenore, disfonksiyonel uterus kanaması), hiperandrojenizm bulguları (hirsütizm, akne, ciltte yağlanma, androjenik alopesi) ve erişkin kadınlarda infertilitenin en sık nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Tablo-2) (42,43). Prematüre pubarş adrenal androjenlerin erken üretilmesi ve salınması sonucunda gerçekleşir ve PKOS'un ilk bulgusu olabilir (44). Gestasyon yaşına göre olumsuz intrauterin koşulların sebep olduğu sorunlar prematüre pubarş ve polikistik over sendromu gibi bozuklukların zeminine temel hazırlayabilir (45,46).

Polikistik over sendromu olan kadınlarda oligomenore (menstrüasyonların yılda 9'dan az olması) veya amenore ile kendini gösteren kronik anovulasyon vardır. Anovulatuvar döngüler uzun dönemde endometrium kanserine, kısa dönemde disfonksiyonel uterus kanamalarına ve infertiliteye neden olabilir (47). Polikistik over sendromunda en sık görülen hiperandrojenizm bulguları olan hirsütizm, akne ve alopesi görülebilir. Olguların büyük bir çoğunluğunda santral obezite bulunur (48).

Polikistik over sendromunda en sık görülen hirsütizm modifiye Ferriman-Gallwey metodu ile değerlendirilir (49). Bu metoda göre üst dudak, çene, göğüs bölgesi, sırtın alt ve üst kısımları, kol ve bacakların üst kısımları, alt ve üst abdomen olmak üzere toplam 9 alanda kıl dağılımı 0-4 arasında skorlandırılarak toplam Ferriman-Gallwey skoru  $\geq 6$  hirsütizm olarak tanımlanır. Akne, ciltte yağlanma ve androjenik alopesi de hiperandrojenizme bağlı olarak karşımıza çıkabilmektedir, fakat tanı konabilmesi için bu klinik bulguların olması şart değildir. Ayrıca etnik özellikler ve her bireyin özelliklerinin farklı olduğunu göz önünde bulundurursak her hastada hirsütizm bulunmayabileceği de akılda tutulmalıdır (50,51). Polikistik over sendromu olan kadınların %40-60'ında obezite görülmektedir (2,20). Obezite genellikle santral obezite tipinde olup, yani bel/kalça oranının artması ile polikistik over sendromu olan kadınlarda ek riskler getirmektedir (52).

Belirti ve Bulgular	%
Hirsütizm	% 60-90
Oligomenore	% 50-90
İnfertilite	% 55-75
Polikistik over	% 50-75
Obezite	% 40-60
Amenore	% 25-50
Akne	% 25
Disfonksiyonel uterus kanaması	% 30
Normal menstrüel patern	% 22

**Tablo 3:** Polikistik over sendromunun belirti ve bulguları. Goldzieher'dan (1961) uyarlanmıştır (42).

Polikistik over sendromunda oral kontraseptif ilaç kullanımı over morfolojisini etkileyebilir. Ayrıca, multifoliküler over hipogonadotropik hipogonadizmden normal döneme geçmekte olan hastalarda overde spontan folliküler aktiviteye ya da ovulasyon indüksiyonu ile over stimülasyonuna bağlı olarak gelişebilmektedir. Ultrasonografik polikistik over görüntüsü, sağlıklı kadınlarda da %20 oranına kadar bulunabilir (53). İnsülin direnci, hiperandrojenizm, LH fazlalığı ve ultrasonografide polikistik over görüntüsü laboratuvar bulgularıdır. Bu bulgular olgularda farklı şekillerde bulunabilir. Polikistik over sendromu olan adölesanlarda serum androjen değerleri yükselmiştir ve bu olguların % 80'ninin androjen kaynağı overdir. Bu durum fonksiyonel ovarian hiperandrojenizm (FOH) olarak adlandırılır. Polikistik over sendromu olan ergenlerin normal şartlara göre daha yüksek LH düzeyleri bulunur ve insülin dirençleri vardır (54).

Adölesanlarda PKOS'u incelediğimizde tanı koyabilmek için NIH ve Rotterdam kriterlerinin dışında ayrıca bir tanı kriteri yoktur. Fakat ergenlere özgü bazı durumlar göz önüne alınmalıdır. Erken perimenarşyal dönemde fizyolojik anovulasyonu PKOS'a bağlı anovulasyondan ayırmak zor olabilir. Çünkü menarştan sonraki ilk iki yıl anovulasyon çok sık periyodlarla görülür. Adölesan dönemde overler multifoliküler olarak görülür ve bu durumda polikistik overden ayırt etmek zor olabilir (55). Polikistik over sendromunda %30'a varan oranlarda hafif-orta düzeylerde prolaktin hormonu yüksekliği görülebilir. Tiroid hastalığı olanlarda menstrüel düzensizlikler görülebilir, fakat çoğu zaman hastalıkla ilişkili diğer semptom ve bulgular tanıya olanak sağlar.

#### **2.2.4. Polikistik Over Sendromu'nun Uzun Dönem Etkileri**

Bazal insülin rezistansına obezitenin etkileri de eklenince PKOS'lu hastalar diyabet gelişimi açısından artmış risk altındadırlar. Aşırı kilolu hiperinsülinemik ve hiperandrojenik, anovulatuvar kadınlarda diyabet gelişme riskinin fazla olduğu mutlaka söylenmelidir. Reprodüktif dönemdeki PKOS hastalarında bozulmuş glukoz toleransı prevalansı bazı çalışmalarda % 31-35, diyabet prevalansı da % 7.5-10 bulunmuştur. Bu oranlar menstrüel siklus düzensizliği yaşamayan kadınlarda anlamlı olarak yüksektir (41). Bu nedenlerle PKOS tip-2 diyabet gelişimi için risk faktörü olarak kabul edilir ve kliniğe başvuran ve PKOS tanısı konulan her hastaya diyabet taraması yapılması

önerilmektedir. PKOS olgularında glukoz homeostaz anormalliklerinin belirlenebilmesinde en iyi metot oral glukoz tolerans testidir (56,57). Hacettepe Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada PKOS hastalarının yanında, anne, baba, erkek kardeş ve kız kardeş olmak üzere tüm birinci dereceden yakınlarında glukoz homeostaz bozuklukları açısından yüksek risk taşıdıklarını gösterir.

PKOS'lu hastalarda görülen hiperandrojenizm, insülin direnci, glukoz intoleransı, tip-2 diyabet, obezite ve santral yağlanma nedeni ile bu hastaların kardiyovasküler hastalık için yüksek risk altında buldukları düşünülmektedir (58,59). Aynı zamanda sendromda tromboz eğiliminin artmış olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (60,61). PKOS'lu kadınlarda artan insülin direnci kan yağlarının yükselmesine neden olmaktadır. Kanda trigliserit ve yoğunluğu düşük olan lipoproteinler (LDL) oranında artış, yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) oranında azalış olmaktadır. PKOS hastası olan kadınlarda damar sertleşmesi (arteroskleroz) riski ortaya çıkmakta ve bu durumda kadınlarda kalp krizi ve felç riskini arttırmaktadır. Genel olarak insülin direnci mekanizması kanda pıhtılaşma eğilimini ve damar tıkanıklığı riskini arttırmaktadır (62,63).

PKOS'lu kadınlarda hem hipertansiyon hem de tip-2 diyabet riskleri ile rahim iç tabakasının dökülmemesi, artan östrojen düzeyi ve ovulasyonun olmaması sonucu olarak progesteron salgılanmaması nedeni ile kanser riski artmaktadır. PKOS ile meme ve over kanseri arasında ilişki olduğuna dair çok az sayıda çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar sonucunda PKOS hastalarında bu kanserlerin gelişme riskinde veya mortalitede artış bulunmamıştır (62,64,65,66). Aynı zamanda PKOS ile beraberinde görülebilen obezite, hipertansiyon, diyabet, infertilite gibi durumlar endometrium kanserinin oluşumunda bilinen nedenlerdir (67).

#### **2.2.5. Polikistik Over Sendromunun Tedavisi**

PKOS'un etiyopatogenezi tam olarak bilinmediği için günümüzde tedavi seçenekleri de genellikle semptomatiktir. Bu anlamda PKOS tedavisinin amaçları; androjenlerin baskılanarak hedef organ etkilerinin azaltılması, adet döngüsü ve buna bağlı düzensizliklerin tedavisi ve infertilite tedavisi şeklinde olmaktadır (68,69). PKOS'un her kadında çıkan belirtileri ve şiddeti farklılık göstermektedir. Bu nedenler tedavi yöntemleri hastaya yönelik olmalıdır. PKOS hastalarında en etkili tedavi

zayıflamadır. Hastaların % 5-10'unda kilo kaybı ve düzelmiş endokrin profili menstrüal döngünün düzene girmesini ve glikoz toleransının artmasını sağlamaktadır. Kilo kaybı ile periferde androjenlerin östrojene dönüşme oranı azalır, SHBG düzeyleri artar. İnsülin düzeylerinde azalma olur (69) ilerleyen yaş ile birlikte gelişebilecek tip-2 diyabet, tromboembolizm ve kardiyovasküler hastalıklar gibi sıkıntılıların oluşma ihtimalini de azaltmaktadır (70).

İnsülin direnci ile PKOS arasındaki kuvvetli ilişki ve hiperinsülineminin hiperandrojenizm ile bozulmuş folikülogenez üzerine etkisi, insülin duyarlılığını arttırıcı ajanların PKOS tedavisinde kullanılmasını oluşturur (68,71). Bu nedenle tedavide öncelik insülin direncini düşürmek ve sonrasında hormonal kontrolü sağlamaktır. Yapılan son çalışmalar metformin tedavisinin obeziteden bağımsız olarak PKOS 'lu kadınlarda hem hirsütizm hem de ovulasyon indüksiyonu için etkili olduğunu, kan şekeri düzeyini dengelediğini ve yüksek erkeklik hormonunu düşürdüğünü göstermektedir (72).

PKOS olan kadınların metformin tedavisi ile büyük çoğunluğunun adet düzensizliğinin ve yumurtlama fonksiyonlarının düzenlendiği gözlemlenmiştir. Fakat metforminin klomifen sitrat(CC) (östrojen düzenleyici) ile birlikte kullanılması, canlı doğum oranı artışında çok iyi sonuçlar vermektedir (73). Ancak gonodotropinler ile kullanıldığında ovulasyon yanıtı açısından etkili olmamaktadır (74).

PKOS'da erken gebelik kaybı sık karşılaşılan bir sorundur. PKOS'lu kadınlarda gebeliklerin %50'ye yakınının ilk 3 ayda spontan düşükle sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Genetik faktörler ve insülin düzeyinin yüksekliği düşük oranını arttırmaktadır. Metformin, klomifen sitrat (CC) ve FSH türevi hormon tedavisine yanıt vermeyen hastalara tüp bebek tedavisi uygulanır. Tüp bebek tedavisinde ilaçlarla yumurtalar dışarıda (IVM: İn vitro maturasyon) veya yumurtalıklar içerisinde geliştirilir ve yeterli olgunluğa erişince toplanarak mikroenjeksiyon işlemi yapılmak üzere sperm hücreleri ile birleştirilir . Döllenen yumurtalar bölünür ve hücre sayısını arttırarak embriyo haline gelir. Aralarında en iyi bölünen ve en iyi kalitede olan embriyo seçilerek transfer işlemi gerçekleştirilir (75).

### **2.3. Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon (KOH)**

Kontrollü overyan stimülasyon (KOS) IVF tedavisi ile birlikte overlerden en iyi sayı ve kalitede oosit elde etmek amacı ile aynı siklusta birden fazla follikülün toplanması için overlerin uyarılması esasına dayanmaktadır. Her hastaya uygulanacak tedavi kadının yaşı, over rezervi, endokrin durumu, over kistin varlığı, endometriozis ve polikistik over sendromu gibi durumlar dikkate alınarak belirlenmelidir. Bu nedenle oosit kalitesini ve canlı doğum oranlarını arttırmak, over rezervi düşük olan hastalarda over yanıtını iyileştirmek ve overyan hiperstimülasyon riskini azaltmak amacı ile çeşitli kontrollü overyan stimülasyon protokolleri geliştirilmiştir.

#### **2.3.1. Tedavi Protokolleri**

GnRH agonist ve GnRH antagonist kullanımına göre IVF protokolleri agonist ve antagonist protokoller olarak adlandırılır. Bir diğer protokol ise klomifen sitratın (CC) gonodotropinler ile kullanıldığı minimal stimülasyon protokolüdür.

Kontrollü overyan stimülasyon protokolleri;

- A. Doğal siklusta IVF
- B. GnRH agonist protokoller
  1. Standart long protokol
  2. Oral kontraseptifler ile kombine long protokol
  3. Ultralong protokol
  4. Short protokol
  5. Ultrashort protokol
  6. Mikrodoz flare protokol
  7. GnRH agonist stop protokolü
- C. GnRH antagonist protokoller
  1. Fiks uygulama
  2. Fleksibl uygulama
  3. Tek doz uygulama
- D. Minimal stimülasyon protokolü

### **2.3.1.1. Doğal Siklusta IVF**

Doğal siklusta amaç ekzojen gonadotropinler kullanılmadan tek oositin mid-siklus LH piki olmadan toplanmasıdır. Sadece monitörizasyon yapılarak hiçbir ilaç gereksiniminin olmaması, maliyetinin az olması, çoğul gebelik ve OHSS gibi risk faktörlerini meydana getirmemesi gibi bir çok avantajı vardır. Özellikle tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan olgularda, poor responder olgularda ve over stimülasyonunun sakıncalı olduğu durumlarda yararlı olabileceği bildirilmiştir (76).

### **2.3.1.2. GnRH Agonist Protokoller**

#### **2.3.1.2.1. Standart Long Protokol**

Bu tedavi protokolüne önceki siklusun luteal fazında ve erken folliküler fazda GnRH'a verilmesi ile başlanır ve günlük uygulanır (Şekil 1). Hipofizer endojen gonodotropin üretimi baskılanır. Böylece kontrolsüz LH pikinin önlenmesi sağlanır ve prematür luteinizasyon ve ovulasyon riski azalır. ABD'de genellikle 0.5-1 mg/gün (minidoz) subkütan leuprolid asetat kullanılır (77). Uzun protokol GnRH agonistine tedavi siklusundan bir önceki siklusun 21. gününde veya tahmini ovulasyondan bir hafta sonra başlanır. Serum E2 değerinin <30 pg/ml olması ile 10-14 günde desentizasyon sağlanır. Agoniste gonodotropinler ile hCG gününe kadar devam edilir (78).

#### **2.3.1.2.2. Oral Kontraseptifler (OK) ile Kombine Long Protokol**

Genellikle menstrüel siklusun 2. veya 3. gününde tedaviye başlanılır. GnRH antagonist sikluslarında tedavinin oral kontraseptifler ile kullanılıp, kullanılmamasını karşılaştıran 6 randomize çalışmadan elde edilen bilgilere göre oral kontraseptif kullanılan sikluslarda devam eden gebelik oranının daha düşük, over stimülasyonunun daha uzun ve kullanılan gonodotropin dozunun daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir (79). Oral kontraseptif kullanılan grupta daha fazla sayıda oosit elde edilmiştir (80). Bu durum oral kontraseptiflerin GnRH antagonistleri ile olumsuz etkileşimi olduğunu göstermektedir.

### **2.3.1.2.3. Ultralong Protokol**

İleri evrede olan endometriozis olgularında sıklıkla kullanılmakla beraber GnRH agonisti kullanımına gonodotropin stimülasyonuna başlamadan 3 ay önceden başlanılır. Sallam ve arkadaşları tarafından yapılan Cochrane derlemesi ve meta analizde endometriozisi olan olgularda IVF ve ICSI öncesinde GnRH agonist kullanımının gebelik başarı oranını dört kat arttırdığı belirtilmiştir (81).

### **2.3.1.2.4. Short Protokol**

Kısa protokolde agonistte tedavi siklusunun birinci veya ikinci günü başlanır ve gonadotropinlerde tedavinin 3. günü eklenir. Her ikisinde ovulasyonun tetiklendiği hCG gününe kadar devam edilir. GnRH-a erken follüküler fazda verilerek flare-up etkisinden follüküler gelişim için faydalanılır. Bu protokol over yanıtı kötü olan ya da stimülasyon yanıtı zayıf olan hastalarda hem GnRH agonistinin flare etkisinden faydalanabilecek hem de prematür luteinizasyon riskini en aza indirgeyecek bir protokoldür. Poor responder olgular için geliştirilmiş bir protokoldür. GnRH agonisti siklusun 3-7 gün arası kullanılmaktadır. Bu protokolde stimülasyondan önceki siklusun 3. günü oral kontraseptif başlanır ve son haptan 3-5 gün sonra 2 gün süre ile GnRH agonisti eg. 2×40 mcg Leuprolid asetat kullanılır. Menstrüasyonun 2-4. günleri arasında başlangıç serum E2 ve LH seviyeleri ölçülür ve TV-USG yapılır. Stimülasyonunun 3. günü yüksek doz gonadotropin eklenir. Leuprolid asetat kullanımına ovulasyon tetikleninceye kadar devam edilir. Stimülasyonun 5. günü down regülasyon gerçekleşinceye kadar GnRH agonisti büyüyen follükülleri stimüle eder ve ilerleyen süre zarfında prematür LH pikini engeller.

### **2.3.1.2.5 GnRH Agonist Stop Protokol**

Stimülasyon önceki siklusun 21. günü daha düşük dozda GnRH agonisti başlanır ve mensle birlikte kesilir. Menstrüasyonun 2-4. günleri arasında başlangıç serum E2 ve LH seviyeleri ölçülür ve TV-USG yapılır. E2 seviyesinin 60 pg/ml'den az olması ve TV-USG'de overlerde 15 mm'nin üzerinde follükül olmaması gerekir. Stimülasyon sonrasında yüksek dozda gonadotropinler ile devam edilir. Bu protokolde overyan supresyon daha az olup stimülasyona over cevabı artmaktadır.



### **2.3.1.3. GnRH Antagonist Protokolleri**

GnRH antagonistlerinin agonistlere göre bazı avantajları vardır. Öncelikle GnRH antagonistleri agonistlerden daha hızlı bir şekilde hipofizer desentizasyon sağlarlar ve hızlıca kompetif antogonizma ile GnRH reseptörlerine bağlanıp bloke ederler ve bu etkileri 8 saat içinde geri döner. Antagonistlerin ilerleyen saatlerde başlar, 'flare-up' etkileri yoktur ve ilaç kesildikten sonra gonadol fonksiyonlar geri döner (82). Stimülasyona menstrüel siklus ile başlanılır, folliküllerin 13-14 mm çapına ulaşması, prematür ovulasyon ve siklus iptali riski ile karşılaşılınca antagoniste başlanılır (fleksibl uygulama). Diğer bir uygulama ise GnRH antagonistinin 6.günde başlanması şeklindedir (fiks uygulama). Tek doz (3 mg) veya multipl doz (0.25 mg/gün) şeklinde başlanarak hCG günü de dahil ovulasyonun tetiklenmesine dek devam edilir. 3 mg'lık tek doz LH pikini 96 saat erteleyebilir (83,84). Al-Inany ve arkadaşlarının fiks ve fleksibl protokolleri karşılaştırdığı bir meta analizde gebelik sonuçlarında uygulanan iki protokol arasında fark olmadığı ancak fleksibl protokolle kullanılan FSH dozunun anlamlı olarak düşük olduğunu bildirmişlerdir (85).

Kalibianakis ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada fleksibl protokol uygulanan hastaların IVF sonuçları açısından fiks uygulamadan üstün olmadığı gösterilmiştir (86). Yapılan başka bir meta-analizde ise uzun GnRH agonist protokolü ile GnRH antagonist protokolü karşılaştırıldığında GnRH antagonist protokol ile canlı doğum oranları etkilenmeden OHSS riskinin yaklaşık olarak % 40 azaldığı bildirilmiştir (87). Antagonist protokollerde diğer bir uygulama şeklide stimülasyonun 7. veya 8. günü tek doz 3 mg GnRH antagonist uygulanmasıdır.

### **2.3.1.4. Minimal Stimülasyon Protokolü**

Minimal stimülasyon protokolü klomifen sitratın (CC) HMG ile birlikte kullanıldığı bir tedavi protokolüdür. Bu tedavide LH düzeyinin yükselmesine bağlı olarak 6. gün veya daha öncesinden klomifen sitrat kullanılmaya başlanılır ve hCG gününe kadar devam eder. hCG enjeksiyonunu takiben 34-36. Saatte oositte aspirasyonu yapılır.

### 2.3.1.5. GnRH Agonist ve Antagonist Protokoller

GnRH agonist ve antagonist protokolleri karşılaştıran bir çok sayıda çalışma ve meta-analiz vardır. 2011 yılında yapılan bir meta-analizde Cochrane GnRH agonist ve antagonist protokolleri karşılaştırdığında canlı doğum ve devam eden gebelik oranları arasında fark olmadığını bildirmiştir (88). Yapılan bu meta-analiz 2016 yılında tekrar güncellenmiş ve canlı doğum oranlarında fark saptanmamıştır. Ayrıca her şiddette OHSS insidansının GnRH antagonist protokollerde daha az şiddette olduğu bildirilmiştir. Ancak over yanıtı kötü olan ve siklus iptali olan GnRH antagonist kullanan olgularda agonist kullananlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (87). Xiao JS ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu bir derlemede normoresponder hastalarda standart long agonist ve antagonist protokolleri karşılaştırılmış ve antagonist sikluslarda OHSS insidansının anlamlı olarak düşük olduğu fakat canlı doğum ve devam eden gebelik oranları arasında fark olmadığı saptanmıştır (89). GnRH antagonist protokoller OHSS insidansında bir azalma sağlasa da ovulasyonun tetiklenmesi hCG ile yapıldığı için yine de OHSS riski mevcuttur.

### 2.3.2. OVULASYONUN TETİKLENMESİ

Ovaryan folliküller 18-22 mm çapına eriştiğinde ovulasyonun tetiklenmesini başlatmak için triger ajanlar uygulanır.

- hCG (üriner/recombinant)
- R-LH
- GnRH agonistleri
- Dual trigger (OPU'dan 34-36 saat önce GnRH agonist + hCG eş zamanlı)

Kontrollü overyan stimülasyonda oosit maturasyonunu sağlamak için bolus hCG kullanılmaktadır. 2016 yılında yapılan rekombinant ve üriner hCG'nin karşılaştırıldığı bir Cochrane meta-analizinde canlı doğum oranları ve devam eden gebelik oranları arasında fark olmadığı bildirilmiştir (90). Ancak rekombinant LH'in yarılanma ömrü 2 saat kadar iken u-hCG'nin yarılanma 24 saat olup çok daha uzundur ve aralarında yaklaşık olarak 7 günlük aktivite farkı vardır (91).

Uzun ömrün daha fazla olması ve yüksek afinitesi nedeni ile u-hCG ile, GnRH-a'ya veya LH'a göre OHSS gelişimine yol açabilir. Yarı ömrü daha kısa olan rekombinant

LH'nın üriner hCG ile karşılaştırıldığı bir çalışmada tek doz rekombinant LH'nın hCG kadar oosit maturasyonu sağlamada etkili olduğu ve hCG ile karşılaştırıldığında OHSS riskinin azaldığı gösterilmiştir (92). GnRH agonistleri flare-up etki ile gonadotropin salınımını arttırarak genellikle antagonist protokollerde ovulasyonu tetiklemek amacı ile kullanılır. 2014 yılında yapılan bir Cochrane meta analizinde GnRH agonistleri ile ovulasyonun tetiklenmesi hCG ile karşılaştırıldığında OHSS riskinin azaldığı gözlemlenmiştir (93).

OPU işleminden 34-36 saat öncesinde standart doz hCG ve GnRH agonist uygulanması 'dual trigger' olarak adlandırılmaktadır. 2013 yılında Lin ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada GnRH antagonist protokol uygulanan normoresponder hasta grubunda hCG ile karşılaştırıldığında ovulasyonu tetiklemek için GnRH agonist ve hCG eş zamanlı ile implantasyon başarısı, gebelik ve canlı doğum oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (94).

#### **2.4. Oosit Toplanması**

Yumurta toplama işlemi (OPU) uzun in vitro fertilizasyon tedavileri (IVF) sürecinde kısa bir süreci oluştursa da, IVF tedavisinin başarı ile sonuçlanmasında en önemli kritik süreçlerden biridir. Follikül aspirasyonu hCG uygulanmasından yaklaşık 34-36 saat sonra yapılmaktadır. GnRH analogları ile gerçekleştirilen bir KOH uygulamasında ilacın doğru saat ve dozda uygulandığı takdirde ovulasyonun tetiklenmesini takiben 38 saatten önce ovulasyon beklenmez.

Oosit toplama işlemi günümüzde son derece basit ve komplikasyonu az olan genel anestezi altında intravenöz sedasyon altında transvajinal ultrason rehberliğinde yapılmaktadır (95,96). İşlemin zamanlaması çok önemlidir, çünkü oosit toplama işlemi erken yapıldığı takdirde immatür oositler elde edilebilirken, işlem geç yapılırsa spontan ovulasyon riski artmakta, oosit kalitesi ve fertilizasyon oranları olumsuz etkilenmektedir. Transvajinal oosit toplama işlemi sırasında mesane yaralanmasını azaltmak ve overlere ulaşımı kolaylaştırmak için, mesane işlem öncesinde boşaltılır. Bu nedenle işlem sonrasında sonda takılması gerekmemektedir. İşlem öncesinde pelvik enfeksiyon riskini azaltmak için vajen, serum fizyolojik(SF) veya formüle edilmiş solüsyonlar ile yeterli derecede irige edilmelidir (97). Enjektöre çekilmiş serum fizyolojik (SF) ile vajen duvarlarının irige edilmesinin ardından SF veya

heparin içerikli medium ile ıslatılmış sponge kullanılarak vajen duvarları, farniksler ve serviksın mekanik olarak temizlenmesi vajen temizliği için yeterli olmaktadır.

OPU işleminde overlerin görüntülenebilmesi için steril plastik bir kılıfın içerisine jel konularak geçirilmiş vajinal ultrason probu kullanılır. İşlem için 16-17 gauge folikül aspirasyon iğneleri kullanılır. İğne tek veya çift lümenli olabilir. Çok sayıda follikül yıkanmasının gerekli olduğu durumlarda çift lümenli iğne tercih edilmelidir (98). OPU öncesinde kullanılacak ekipmanlar 37°C ısıtılmış olmalıdır. Kullanımdan önce aspirasyon iğnesi heparinli medium (EBSS) ile yıkanmalıdır. Follikül sıvısı 100-150 mmHg basınç ile aspire edilmelidir. Böylece follikül duvarları hızlıca çöker ve iğne lümenini tıkamaz.

Posterolateral farniksten proba en yakın ve en büyük olan follikül içerisine girilerek aspire edilmeye başlanılır. Folliküler sıvı ısıtıcı bloklar içerisinde yer alan tüplere alınır ve hızlıca sterio mikroskopta incelenmek üzere embriyologlara gönderilir. Eğer ilk aspirasyon sırasında oosit bulunamazsa flushing medium ile (EBSS veya SF) folliküler tekrar şişirilerek aspire edilir (99). Overdeki tüm folliküler aspire edildikten sonra aspirasyon iğnesi geri çekilerek, heparinize medium bulunan tüpte iğnenin ucu yıkanır ve karşı overde işlem tamamlanır (100,101). Her iki overde görülen küçük veya büyük tüm oositler aspire edilmelidir. Küçük oositlerden de matür bir oosit ve fertilizasyon elde edilebilir.

Folliküller aspire edildikten sonra douglas boşluğundaki sıvı da aspire edilmelidir. Böylece hem douglas boşluğuna düşmüş olan oositler var ise toplanmış olur hem de kanın peritoneal irritasyon nedeni ile yapacağı ağrı azalmış olur. İğne çıkarıldıktan sonra oosit kalabileceği için medium ile yıkanır (102). Kanama olup olmadığı kontrol edilir ve eğer kanama gerçekleşmiş ise tampon ile 1-2 dk kompresyon yapılır (103).

## **2.5. Overyan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)**

Overyan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) sıklıkla in vitro fertilizasyon (IVF) tedavisi sırasında ovulasyonu tetiklemek amacı ile verilen ekzojen ya da gebeliğin oluşumuna bağlı endojen hCG hormonu kaynaklıdır (104,105). Klinik olarak over boyutları ve ve follikül sayısı artmış olan bu tabloda ve batın bölgesinde minimal veya ciddi olgularda plevra ya da periton boşluklarında yaygın olarak sıvı bulunabilir (106). Bu tür bulgular ve belirtiler stimülasyon sırasında da OHSS'nin öngörülmesini sağlar.

Semptomlar sıklıkla karın bölgesinde oluşan şişkinlik ve gerginlik yakınmaları ile başlayıp, bulantı, diare ve kusma ile devam eder. İlerleyen aşamalarda letarji ve iştah kaybı oluşur. Klinik bulgular olarak: kilo miktarındaki hızlı artış, oliguri veya anüri, lökositoz, hipovolemi, hemokonsatrasyon, elektrolit bozukluğu, asit, plevral veya perikardial efüzyon, yetişkin respiratuar distres sendromu (ARDS), tromboembolik sekeller, multipl organ yetmezliği ve hiperkoagülabilitate gibi birçok klinik tablo karşımıza çıkabilir. Overyan stimülasyon sendromu, ovulasyon indüksiyonu yapılan kadınlarda % 0.6-10 oranında karşılaşılan ciddi bir komplikasyondur (107,108). Spontan olarak gerçekleşen OHSS, ilk trimesterin 8-14. haftalarında ortaya çıkarken ovulasyon indüksiyonu sonrasında gerçekleşen OHSS daha erken dönemde (3-8. hafta) görülmektedir (109). YÜT sikluslarında aşırı over cevabı hayati riskler taşıyan OHSS'nin ortaya çıkmasının yanı sıra yüksek seks steroidlerinin seviyesine bağlı olarak azalmış implantasyon oranları ile birliktelik gösterebilir (110,111). Ayrıca oosit ve embriyo kalitesi üzerine de olumsuz etkileri olabileceği ile ilgili klinik çalışmalar mevcuttur (112).

### **2.5.1. OHSS'de Risk Faktörleri**

OHSS'nin önlenmesi için ilk basamak risk taşıyan hastaların seçilmesi ve bu hastalara yönelik tedavi süreçlerinin belirlenmesidir. Bu nedenle risk faktörlerinin çok iyi belirlenmesi gereklidir.

Birincil risk faktörü genç yaştır. OHSS ileri yaştaki kadınlara oranla genç yaşta daha sık görülmektedir (113,114). İlerleyen yaş ile birlikte follikül sayısının ve büyüme hormonunun rezervi azalır, OHSS oluşması halinde hastada hem tromboemboli olasılığı artar hem de gebe kalma başarı oranı düşer (114).

Bir diğerk risk faktörü de vücut kitle indeksidir. Prospektif olarak yapılan bir kohort çalışmada 262 IVF siklus incelenmiştir (115). Bu çalışmada hastanın yaşı, vücut kitle indeksi, serum estradiol (E2) seviyesi, oosit sayısı ve bazal AMH seviyeleri OHSS'yi önceden öngerebilmek için karşılaştırılmıştır. Buna göre AMH'nin 3.36 ng/ml eşik alındığında %91 sensitivite ve %81 spesivite ile OHSS oluşumu öngörmüştür. Braer SL ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (116) antral follikül sayısının ve AMH testinin OHSS riskinin öngörülmesi açısından spesivite ve sensitiviteyi benzer rapor edilmiştir.

İkincil risk faktörleri kontrollü overyan stimülasyon (KOH) sırasında gerçekleşen değişkenlerdir. Bunlardan birincisi KOH sırasında ya da hCG 'nin verileceği gün estradiol seviyesinin yüksek olmasıdır.

### **2.5.2. OHSS Riskinden Korunma**

OHSS'den korunmanın birinci yöntemi hastanın birincil risk faktörleri belirlendikten sonra OHSS için en az risk taşıyan KOH protokolünün kişiye özgü uygulanmasını içerir. OHSS olma ihtimali yüksek olan bir hastada ilk olarak akla gelen yöntem FSH hormonunun dozunun azaltılması olacaktır. OHSS'de birincil korunma da diğerk stratejiler minimal veya hafif protokollerin kullanılmasıdır. Hafif stimülasyonlarda, GnRH antagonistleri kullanılmakta ve 100-150 IU FSH genellikle adet 5.gününde başlanmaktadır ve amaç 10'dan daha az sayıda oosit elde etmektedir. Minimal stimülasyonda ise amaç kломifen sitrat ve düşük doz ekzojen FSH farklı kombinasyonlar ile vererek 5 ve altında oosit elde etmektedir (117).

2011 yılında Al-Inany ve arkadaşlarının 29 çalışma ve 5417 hasta içeren meta-analizlerinde, OHSS riski antagonist grupta agonist gruba göre %50 azalmış olarak rapor edilmiştir (118). Bu durumda yüksek risk taşıyan hastalarda GnRH agonist yerine antagonist bir protokol atanması ile OHSS riskini yarı yarıya azaltmaktadır. OHSS riskini azaltmak için izlenen bir diğerk stratejide insülin hassaslaştırıcı ilaçların kullanımıdır. OHSS'nin primer sonuç olarak test edildiği ve sadece PKOS hastalarının dahil edildiği tek prospektif randomize kontrollü bir çalışmaya (119) göre uzun protokole göre bir önceki siklusun 21. gününde başlanarak beta hCG testinin yapılacağı güne kadar 1500 mg/gün metformin verilmesi kontrol grubuna göre OHSS sıklığını anlamlı olarak azaltmayı başarmıştır (% 30.0'a karşı % 8.3;p:0.003).

Diğer bir yöntem ise in vitro maturasyon tekniğidir. Hiç FSH verilmeden oositlerin toplanması halinde OHSS olma riski 0'a yakındır (120). Embriyo transferi sonrasında luteal destek için hCG yerine progesteron kullanılması da OHSS sıklığında belirgin olarak azaltmaktadır (114). KOH sırasında folliküllerin verdiği cevap ile belirgin bir OHSS riski fark edilir ise uzman hekim tarafından bazı uygulamalar yapılabilir. Bu uygulamalara en tipik örnek 'coasting' yöntemidir. Bu yöntemde gonadotropin enjeksiyon estradiol seviyeleri normal seviyelere düşene kadar tamamen kesilir (121).

İndüksiyon sırasında OHSS riskinin belirgin hale geldiği durumlarda oosit veya embriyoların dondurulması ile OHSS riski ekarte edilebilir. Fakat ovulasyon yine hCG ile tetiklendiği sürece erken OHSS riski ortadan kalkmamaktadır. 2010 yılında yapılan retrospektif bir çalışmada (122) uzun antagonist protokol ile takip edilen hastalara coasting yapılırken GnRH antagonist protokolü uygulanan hastalara GnRH agonist ile tetikleme yapılmış ve elde edilen oositler dondurulmuştur. Birkaç ay sonra oositler çözülerek ICSI işlemi yapılmış ve embriyo transferi ile tedavileri tamamlanmıştır. Coasting yapılan grupta gebelik oranı daha düşük iken orta şiddetli OHSS sıklığı daha fazla görülmüştür.

Sonuç olarak Devroey ve arkadaşlarının önerdiği gibi GnRH antagonisti içeren bir protokol takibinde GnRH agonisti ile ovulasyonu tetikleyip tüm oosit veya embriyoları dondurmak ve bir sonraki çözme siklusu ile dondurulmuş embriyoların transfer edilerek optimum gebelik oranları sağlanabilir.

## **2.6. Gametlerin Hazırlanması ve Kültürü**

### **2.6.1. Oositlerin Hazırlanması ve Morfolojik Değerlendirmesi**

OPU işlemi sırasında aspire edilen folliküler tüpler ile embriyologlara gönderilir. Laminar air flow içerisinde sterio mikroskopta incelenen bu folliküllerden aspire edilen oositler etrafındaki hücre kümesi ile birlikte alınır. Bu hücre kümesi yani kumulus-korona kompleksi yumurtaların olgunluğunu tamamlayabilmesini sağlar. Oositler bir gün önceden hazırlanmış olan kültür sıvısı içerisine konarak inkübatöre kaldırılır. İnkübatör sıcaklığı 37°C, karbondioksit oranını da % 5-6 düzeyinde sabit tutar. Oositler son olgunlaşma aşamalarını beklemek için yaklaşık olarak 2-4 saat inkübatörde bekletilir.

Mikroenjeksiyon işleminden önce yumurtaları çevreleyen kumulus-oosit komplekslerinin tanımlanabilmesi ve maturasyonlarının değerlendirilebilmesi için denüstasyon işlemi yapılarak kumulus hücreleri enzimatik ve mekanik yöntemler ile uzaklaştırılır. Uygun pH değerinin devamlılığının sağlanabilmesi için HEPES tamponlu kültür mediumları kullanılır. Bu prosedürlerin büyük çoğunluğu Earle's tamponlu tuzlu solüsyonlarda (EBSS) ve CO<sub>2</sub> ile dengelenmiş parafin/mineral yağı altında yapılarak mediumun buharlaşması ve pH ve ısıdaki oynamalar engellenir. Kumulus-oosit kompleksleri bir saat öncesinden hazırlanmış olan HEPES tamponlu hyaluronidaz içeren medium içine alınır ve elle çekilmiş cam pastör pipeti ile bir dakika süre ile aspire edilerek temizlenir.

Oositler daha sonra tüm koronal hücrelerden uzaklaştırılana kadar enzim içermeyen kültür solüsyonlarından geçirilir. İşlem sırasında oositlere mekanik zarar vermemek için son derece hafif hareketler ile denüstasyon yapılmalıdır. Sonuçta denüde (çıplak) olan oositler enjeksiyon kabındaki droplara yerleştirilir ve mayotik evresi ve morfolojik özellikleri değerlendirilmek üzere 30-60 dk süre ile inkübatöre kaldırılır. Oosit maturasyonu, çevresinde bulunan kumulus-korona kompleksinin morfolojisi, germinal vezikülün parçalanıp parçalanmaması ve birinci polar cisimciğin atılıp atılmamasına göre değerlendirilmektedir. Matür olan metafaz-2 (M2) aşamasındaki oositlerde, kumulus-korona hücreleri oositin etrafında homojen bir yayılım gösterirken, germinal vezikül parçalanmış ve birinci polar cisimcik atılmıştır. Kontrollü overyan hiperstimülasyon (KOH) sonrasında çapı 18-22 mm arasında olan folliküllerin yaklaşık olarak % 80'inden M2 oosit elde edilir. Geriye kalan % 20 oosit metafaz-1 (M1) ve germinal vezikül (GV)'dür. ICSI öncesinde mayotik değerlendirmelerinin dışında morfolojik özellikleri de değerlendirilmelidir. Çeşitli morfolojik defektler; vakuolizasyon, sitoplazmanın koyu renkte ve granüler olması, perivitellin aralığın genişlemiş olması, zona pellusidanın yapısındaki ve rengindeki değişiklikler, oositin amorf şeklinde olması gibi bir çok özelliktir. Matür oositlerde yani metafaz-2 evresinde GV kaybolmuştur ve birinci kutup cisimciği perivitellin aralıktadır.





**Şekil 2 :** Denüdasyon sonrası oositler. Sırasıyla; olgun olmayan oosit (Profaz 1), olgun olmayan oosit (Metafaz 1), olgun oosit (Metafaz 2) gösterilmektedir (Fotoğraflar Bahçelievler Medicaana Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

### 2.6.2. Mikroenjeksiyon İşlemi İçin Spermilerin Hazırlanması

Tüp bebek tedavisine başlarken hastaların ön tetkikleri arasında yer alan spermiyogram testi mutlaka yapılmış olmalıdır. Kadın partnere yumurta toplama işlemi uygulanırken erkek partnerden de masturbasyon yöntemi ile semen örneği alınır. Ejakülatında canlı sperm hücresi bulunamayan kişilerde cerrahi yöntemler ile sperm aranır. Bazı ÜYTE merkezlerinde cerrahi yöntemlere ön tetkik sonrasında başvurulurken, bir çok merkez fresh gonad dokusu ile yapılan ICSI sonrasında fertilizasyon oranlarının daha fazla olduğunu öngörmektedir. Erkek partnerin steril numune kabı içerisinde vermiş olduğu semen örneği 37°C sıcaklıkta sıcak bir tabla üzerinde 20 dakika likefiye olması için bekletilir. Likefiye olan semenin sperm sayısı, total motilitesi ve morfolojisi makler kamera ile değerlendirilir. IVF hastalarında en önemli kriterlerinden biri progressif hareketli sperm sayısıdır. Mikroenjeksiyon öncesinde spermier gradient ve swim-up yöntemleri ile yüzdürülür. Spermierin yüzdürülmesi iki nedenden dolayı çok önemlidir. Bunlardan birincisi seminal plazmada bulunan yabancı proteinleri temizlemek, ikincisi ise akrozom reaksiyonunu indükleyerek hiperaktivasyon sağlamaktır. Oosit kültürü ve sperm hazırlama işlemi tamamlandıktan sonra mikroenjeksiyon işlemine geçilir.

### 2.7. ICSI (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

Mikroenjeksiyon ilk kez 1992 yılında Brüksel'de yapılan çalışmalar sırasında yanlışlıkla tek bir spermier oosit sitoplazması içerisine bırakılması ve daha sonradan döllemenin gözlemlenmesi sonucunda ortaya çıkan bir şiddetli erkek kısırlığı tedavisi

için geliştirilmiş bir yardımla üreme yöntemidir. Ülkemizde ilk ICSI uygulamaları 1994 yılında gerçekleşmiştir. Oosit kültürü ve sperm hazırlama işlemi tamamlandıktan sonra oosit sitoplazmasının içerisine morfolojik olarak en iyi kalitede olan tek bir sperm hücresinin enjekte edilmesi işlemidir. ICSI işlemi mikroskobun ısıtılmış yüzeyinde, 200-400 kat büyütme altında mikromanipülatör aracılığı ile yapılmaktadır.

Mikroenjeksiyon öncesinde steril, toksik olmayan kültür sıvısı içeren petri kabında sperm havuzu ve oositlerin içerisine konulacağı mikro damlacıklar oluşturulur. Spermiler hafif bir mekanik basınç ile kuyruklarından kırılarak hareketsizleştirilir. Spermin hareketsiz hale getirilmesi bir zar geçirgenliği işlemidir. Bu sayede sperm, sitozolündeki bir faktörü salarak yumurta aktivasyonuna neden olur. Yapılan bu işlemin fertilizasyon başarısını arttırdığı gözlemlenmiştir (123,124). Kuyruğu kırılan sperm enjeksiyon pipeti (ICSI) içerisine çekilir. Oositin kutup cisimciği (polar body) saat 6 veya 12 hizasına getirilir. Mikroenjeksiyon pipeti saat 3 yönünde oosite yaklaştırılır ve tutucu pipet (holding pipet) yardımı ile sabitlenir. Enjeksiyon pipeti penetrasyona izin verecek şekilde ve oolemanın iç yüzeyine dayanacak şekilde zonaya doğru itirilerek yumurtayı aktive etmek için sitoplazma aspirasyonu yapılır ve sperm sitoplazma ile birlikte yumurta içerisine bırakılır. Mikroenjeksiyon işleminden 12-17 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapılır.

## **2.8. Fertilizasyon**

Fertilizasyon tek bir sperm çekirdeğinin, oositten gelen çekirdek ile aktive olması ve ikinci kutup cisimciğini atması ile birlikte erkek ve dişi pronükleuslarının şekillenmesi için geçen sürede dikkate alınarak ICSI yapıldıktan 16-18 saat sonrasında fertilizasyon kontrolü yapılır.

Fertilizasyonun gerçekleşmesi ile singami döneminde pronükleusların zarlari erir; erkek ve dişi pronükleusları sitoplazmada dağılır ve mitoz iğciği şekillenir. Fertilizasyon kontrolünde oosit sitoplazmasında iki pronükleus (2 PN) ve perivitellin aralıkta iki kutup cisimciğinin (2 PB) gözlenmesi fertilizasyonun gerçekleştiğini gösterir. Fertilizasyonun gerçekleşmediği durumlarda çekirdek oluşumu gözlenmez. Fertilizasyon kontrolü yaparken kutup cisimcikleri incelenen materyal üç boyutlu olduğu için her zaman net olarak görülemeyebilir. Bazı durumlarda oosit

sitoplazmasındaki vakuoller büyüklükleri, şekilleri ve lokalizasyonları nedeni ile pronükleuslarla karıştırılabilir.

Bazı durumlarda ICSI sonrasında ilk gün 1 PN veya 3PN oluşumu da gözlenir. Bu tür gelişim gösteren embriyoların gelişimi iyi olsa bile transfer işlemi yapılmamalıdır. Çünkü bu embriyolar anomalili embriyolardır. Fertilizasyon anomalisi gösteren bu oositlerden normal embriyolar gelişir, hatta blastosist evresine kadar gelişimini tamamlayıp implante olabilirler. Bu yüzden bu tür embriyolar ayrı yerlerde kültüre edilerek gelişimlerinin değerlendirilmesi gerekir.



**Şekil 3** : İki pronükleus görüle döllemiş zigot (Fotoğraf Bahçelievler Medicana Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

## **2.9. Embriyo Seçimi ve Kültürü**

### **2.9.1. Pronükleer Evre**

Fertilizasyon kontrolü mikroyenjeksiyon işleminden yaklaşık 16-18 saat sonra yapılır. Bununla birlikte, fertilizasyon daha erken (12-14. saatler) ve daha geç (20-22. saatler) gerçekleşebilmektedir (125). Erkek ve dişi pronükleusların (PN) oluşması, fertilizasyonun gerçekleştiğini gösterir. Araştırmacılar, embriyonun ileri gelişimini belgeleyebilmek adına pronükleus morfolojisinin önemli bir kriter olduğunu vurgulayarak implante olan embriyoların pronükleus ve çekirdekçik öncüllerinin morfolojilerini retrospektif olarak inceleyerek implante olan ve olmayan zigotların pronükleus morfolojisi ve NPB dağılımını kapsayan bir sınıflandırma yapmışlardır. Buna göre; her bir pronükleusdaki NPB sayısı eşit olmalı veya aralarındaki sayısal fark 3'den fazla olmamalı, NPB'ler her iki pronükleusda da dağınık veya sütun oluşturacak

şekilde düzenlenmeli, birinde dağınık diğesinde düzenli olmamalıdır. Bu özellikleri taşıyan en az bir embriyonun transferi ile gebelik oranı % 50, diğesinde ise % 9 olarak saptanmıştır (126). Dişi pronükleusu. İkinci polar cisime yakın bölgede, erkek pronükleusu oosit merkezinde oluşur. Pronükleusların zigotun merkezinde bulunmaması, sperm sentrozomunun yapısal bozukluğunu gösterir (127). Zigotun morfolojik değerlendirmesi yapılırken pronükleusların ekseninden geçtiği varsayılan eksen ile polar cisimciklerin yaptığı açı arttıkça, preembriyoner dönemde gelişimde gerileme ve kromozom anomalilerinde artış olduğu ve embriyoların kötü kalitede geliştiği gösterilmiştir (128). Zigotlarda pronüklear evrede incelenen diğ bir yapıda sitoplazmik halonun varlığıdır. Sitoplazmik halo; ooplazmanın periferinde lokalize olan organellerin, pronükleusların çevresine kümelenmesi ile, oositin periferinde berrak, homojen yarım ay şeklinde alandır. Sitoplazmik halonun gözlemlendiği embriyolardan 3. ve 5. günlerde iyi kalitede embriyoların geliştiği gösterilmiştir (129,130).

### **2.9.2. Bölünme Evresi**

Embriyo canlılığının en önemli göstergesi hücre bölünmesidir. Pronükleusların birleşerek nüklear zarın erimesi ile singami evresine geçen zigotta ortalama 3 saat sonra ilk bölünme gerçekleşir. Bu dönemde embriyoların iki hücreli evreye geçmesi; metabolik ve mitotik aktivasyonunun yeterli olduğunu gösterir. Zigot; ilk bölünmenin ardından embriyo, bölünen hücreler ise blastomer adını alır. Fertilizasyon ile beraberinde atılan kutup cisimciği, zigotta animal kutubun yerini belirler. Animal kutubun karşısındaki kutup vegetal kutup olarak adlandırılır. İlk bölünme kutup cisimciği tarafından başlar. Blastomerler ard arda mitoz bölünme geçirerek sayılarını ikiye katlarlar. Bölünme evresinde erken bölünmenin varlığı, bölünmenin hızı, blastomerlerin şekil ve büyüklüğü, fragmentasyon oranı, blastomerlerdeki nükleus sayısı, perivitellin alan ve zona pellusida özellikleri değerlendirilmektedir.

### **2.9.3 Erken Bölünme (Early Cleavage)**

Mikroenjeksiyondan sonra 25-26 saatlerde ilk mitoz bölünmelerini geçirerek iki hücreye bölünmüş olan embriyolar erken bölünen embriyolar olarak adlandırılır (131). Yapılan araştırmalara göre erken bölünen embriyoların, geç bölünen embriyolara oranla daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip oldukları

gösterilmiştir (131,132,133). Erken bölünen embriyoların morfolojik özellikleri; blastomerlerin eşit olarak bölündüğü simetrik (even), blastomerlerin büyüklükleri arasında % 20'den fazla fark bulunan asimetrik (uneven) ve fragmanlı (% 0-20) embriyolar olarak tanımlanmıştır. Saluments ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada tek embriyo transferinde erken bölünen embriyonun transfer edilmesi ile gebelik oranı % 50 iken, erken bölünme gözlenmeyen grupta gebelik oranı %26.4 olarak saptanarak erken bölünmenin embriyo seçim kriterleri arasındaki önemi vurgulanmıştır (133).

#### 2.9.4. Bölünme Evresi Sınıflandırması

Bölünmenin zamanında gerçekleşmesi ve sürekli olarak gelişim göstermesi embriyonun canlılığını gösteren önemli bir özelliktir. Normal bir bölünme hızına sahip bir embriyo, embriyoner gelişimin ikinci gününde (42-45. saatte) 3-4 blastomerli, 3. gününde 65-70. saatlerde 6-8 blastomerli olması beklenir. Embriyonun ilk iki mitoz bölünme evresi 20 saat, ikinci ve altıncı gün arasında blastomerlerin bölünme zamanı yaklaşık 30 saattir.

Embriyoların normalden hızlı veya yavaş bölünmesi implantasyon başarısını azaltır. Yavaş bölünen embriyolar 3. günde 6 ya da daha az blastomer içerirken, hızlı bölünen embriyolar 3. Günde 9 veya daha fazla blastomer içerir. Yavaş ya da hızlı bölünen embriyolarda, normal hızda bölünen embriyolara göre kromozomal anomali insidansı artar (134,135).



**Şekil 4** : Bölünme evresinde embriyolar. Sırasıyla; 2 hücreli embriyo, 4 hücreli embriyo, 8 hücreli embriyo gösterilmektedir (Fotoğraflar Bahçelievler Medicana Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

Embriyonun kalitesi değerlendirilirken, blastomerlerin şekil ve büyüklüğü, sitoplazmik özellikleri ve fragmantasyon oranı gibi özellikler dikkate alınır (136). İyi kalitedeki embriyolarda, blastomerlerin sitoplazmasının homojen ve şeffaf olması gerektiği hafif organellerin birikimine bağlı granülasyona sahip ise düşük implantasyon oranlarına neden olduğu gösterilmiştir. Perivitellin alandaki, genişlik, darlık ve inklüzyonlar not edilmelidir. Ayrıca zona pellusidanın yapısı ve kalınlığı gibi özellikleri de değerlendirilmelidir (135). Fragmantasyon in vitro gelişen embriyolarda sık karşılaşılan bir özelliktir. Embriyonun kalitesi belirlenirken fragmantasyonun miktarı, dağılımı ve büyüklüğü önemlidir. Embriyoda % 10'dan az fragmantasyon hafif, % 10-20 fragmantasyon orta, %20'nin üzerinde fragmantasyon şiddetli olarak tanımlanmıştır. Embriyoner fragmantasyon dağılımı, fragmanların büyüklüğü ve embriyoda kapladığı hacim dikkate alındığında beş grupta incelenir:

1. Tip -1'de fragmanlar çok küçük ve dağınık olarak bulunabilmektedir.
2. Tip-2'de ise fragmanlar daha yaygındır, koloniler oluşturacak şekilde perivitellin aralıkta bulunurlar ve birden fazla hücrenin parçalanması ile meydana geldiği düşünülmektedir.
3. Tip-3 en sık rastlanan formdur, fragmanlar küçük olmakla birlikte blastomerlerin arasında veya blastomerlerin periferinde bulunabilir.
4. Tip-4'de çoğunlukla blastomerleri kaplayan iri fragmanlar görülür. Tip-4 fragmantasyon genellikle blastomerleri eşit olmayan (uneven) embriyolarda görülür.
5. Tip-5 ise en şiddetli formdur ve genellikle nekrotik blastomerlerin bulunduğu embriyolarda gözlemlenir (137).

Embriyonel gelişim sürecinde her bir blastomer bir nükleus içerir, blastomerlerin en az birinde birden fazla nükleus varlığı multinükleasyon olarak tanımlanır. Multinükleasyon embriyolarda ilk bölünmeden itibaren blastosist evresine kadar olan süreçte gelişimin herhangi bir evresinde gözlemlenebilir ve multinükleolar blastomere sahip embriyolarda, implantasyon başarısını etkileyerek gebelik-canlı doğum oranını azalttığı vurgulanmıştır.

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;

1. Grade-1 Embriyo: İkinci günde 4, üçüncü günde 6-8 blastomerlidir. Blastomerleri eşit büyüklükte (even), yuvarlak veya oval, blastomer sitoplazmaları şeffaftır ve fragman içermez.
2. Grade-2 Embriyo: Blastomer sayısı ve şekli grade-1 embriyolara benzer olmakla birlikte, % 10 fragmantasyon ve uneven (eşit olmayan) blastomere sahip olabilirler.
3. Grade-3 Embriyo: Blastomer sayıları az, fragmantasyon oranı % 20'nin üzerindedir. Uneven blastomer oranı ilk iki gruptaki embriyolara göre daha fazladır.
4. Grade-4 Embriyo: Blastomerlerin şekil, sayı ve büyüklükleri birbirinden farklıdır, fragmantasyon oranı %50 ve üzerinde olabilir. Blastomer sitoplazmaları koyu renkli ve heterojendir.

### **2.9.5 Dördüncü Gün Embriyolarının Değerlendirilmesi**

Embriyo gelişimin 3. gününde 6-8 blastomerli olan embriyonun 4. günde yaklaşık 96 saat sonra hücre sayısını arttırarak kompaktlaşma evresine girmesi beklenir. Kompaktlaşma blastomer sınırlarının seçilemediği, bir seri hücreler arası sıkı bağlantıların (desmozom, gap junction) oluşması sonucu embriyonun kompakt bir yapı oluşturduğu dönemdir. Embriyo kompaktlaşmaya başladığı an morula adını alır. Moruladan sonra kavitasyon dönemi başlar ve kaviteden salgılanan sıvı blastosöl oluşumunu tetikler. Dördüncü gün embriyo değerlendirilmesi;

1. Erken Kompakt: Blastomerler birleşmeye başlamış, fakat hücre sınırları belirgindir.
2. Tam Kompakt: Blastomerler tamamen birbirine yapışmış, hücre sınırları kaybolmuş fakat çekirdekler belirgindir.
3. Geç Kompakt: Hücre sınırları tekrar belirginleşmiş ve hücre sayısı önemli ölçüde artmıştır.



**Şekil 5** : Dördüncü günde embriyolar. Sırasıyla; 10 hücreli embriyo, morula (Fotoğraflar Bahçelievler Medicana Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

### **2.9.6 Beşinci Gün Embriyolarının(Blastokist) Değerlendirilmesi**

Embriyoner gelişimin dördüncü gününde kompaktlaşma sürecinde olan embriyolarda kavitasyon başlamış olmalıdır. Beşinci günde blastomerler arasında boşluklar oluşmaya başlar. Bu sıvı dolu boşluklar gelişim devam ettikçe birbiriyle birleşerek (blastosöl boşluğu) genişler ve embriyo hacminin yarısından fazlasını kapsar. Bu sırada zona pellusida giderek incelir. 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 zona pellusidanın altında dizilen trofoektoderm hücrelerine sahip olması gerekmektedir (138). Embriyonun blastokist oluşturma zamanı çok önemlidir. Gardner ve arkadaşları iyi kalitede gelişen bir blastokistin implantasyon başarısını ve gebelik oranlarını olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir (139). Blastokist skorlaması; blastosöl boşluğunun genişlemesi, iç hücre kitlesi, trofoektoderm hücrelerinin yoğunluğu ve düzeni ve zona pellusida özelliğine göre değerlendirilir.

#### **2.9.6.1 Blastosel Boşluğu**

Kavitasyonun başlaması, embriyo yeterliliğini yansıtan bir bulgudur.

1. Grade-1: Erken blastokist; blastosel boşluğu, embriyo hacminin yarısından az olması.
2. Grade-2: Blastokist; blastosel hacminin embriyo hacminin yarısından fazla olması.
3. Grade-3: Full Blastokist; blastosel hacminin embriyonun tamamını kaplaması
4. Grade-4: Genişlemiş(expanded) Blastokist; blastosel hacmi embriyonun hacminden büyüktür. Zona pellusida incelmeye başlar.



5. Grade-5: Hatching Blastokist; Blastokist zona pellusidadan dışarı çıkmaya başlar.

6. Grade-6: Hatch Blastokist; Blastokist zona pellusidadan tamamen ayrılmıştır.

### 2.9.6.2 Dış Hücre Kitlesi(Trofoektodermal Hücreler)

- A. Birbirine sıkıca bağlı çok sayıda tek katlı yassı hücreden oluşan yapışkan epitel yapı.
- B. Gevşekçe düzenlenmiş, az sayıda hücreden oluşan epitel yapı.
- C. Çok az sayıda ve büyük hücrelerden oluşan epitel yapı.

### 2.9.6.3 İç Hücre Kitlesi(ICM)

- A. Kolay ayırt edilebilen, sıkı paketlenmiş çok sayıda hücreden oluşan ICM.
- B. Kolay ayırt edilebilen, gevşek düzenlenmiş, az sayıda hücreden oluşan ICM.
- C. Zor ayırt edilebilen çok az sayıda hücreden oluşan ICM.

Blastokist transferi; embriyo gelişimi ve kadın genital organların senkronizasyonun sağlandığı, post-genomik, aktivasyonla gelişimlerini seçme şansı verdiği hiperstimülasyon riskinin en az etkili olduğu dönemde transfer yapıldığı ve blastomer biyopsi sonuçlarının alınmasına zaman yarattığı için tercih edilir. Blastokist transferi planlanan kişilerde ikinci gün embriyo kalitesinin, blastokist gelişim potansiyelini belirleyici bir parametre olmadığı, üçüncü gün embriyoların blastokist oluşturma kapasitesi hakkında sağlıklı bilgiler verecek bir parametre olduğu vurgulanmıştır (140,141).



**Şekil 6 :** Beşinci gün blastokist evresi embriyoları (Fotoğraflar Bahçelievler Medicaana Hastanesi IVF Laboratuvarı'ndan alınmıştır).

## 2.10 Kriyoprezervasyon

Yardımla Üreme Teknikleri(YÜT) 1978'de ilk IVF (in vitro fertilizasyon) bebeğinin doğumundan bu yana gün geçtikçe hızla gelişmektedir. Bu nedenle embriyo kriyoprezervasyonu, YÜT'ün hızla gelişmesi ile fertilitate prezervasyonu için önemli bir alternatif olmuştur (142). İnsan embriyolarının gelişimin her evresi için kriyoprezervasyonunda güncel klinik uygulamalarda programlı(yavaş) dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki farklı teknik ile dondurulabilmekte ve  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de içerisinde sıvı nitrojen ile dolu tanklarda uzun yıllar saklanabilmektedir.

İlk kez 1972 yılında fare embriyolarının  $-196^{\circ}\text{C}$  ve  $-296^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulduklarında vitabilitelerini koruyabildikleri bildirilmiştir (143). Aynı dönemde Whittingham ve arkadaşları 8 hücreli fare embriyoları üzerinde çalıştıkları programlı dondurma yöntemi ile ilk canlı doğum sonrasında insan embriyolarına da klivaj döneminde benzer bir teknik uygulamış ve 80'li yıllarda ilk gebelik ve canlı doğum elde edilmiştir (14,145,146). İlk vitrifikasyon fare embriyoları üzerinde 1985 yılında yapılmış olup, insan embriyolarında ilk olarak 1999 yılında yapılmıştır (147).

Ülkemizde 1996 yılında Kasım ayında Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan yönetmelik ile embriyoların dondurularak saklanması için uygulamaya başlanmıştır ve böylece dondurulup çözülen embriyoların transferi ile çok sayıda gebelik ve canlı doğum başarısı elde edilmiştir. Sağlık Bakanlığı'nın 2011 yılında embriyo kriyoprezervasyonunun gerçekleştirilebilmesi için uygulamaya getirdiği ön şartlar şu şekildedir;

1. Embriyo transferi sonrasında geriye iyi kalitede embriyo kalması,
2. Overlerin aşırı uyarılması sonucu overyan hiperstimülasyon(OHSS) bulguları,
3. Endometriyumun embriyo transferi için uygun olmaması,
4. Embriyo transfer günü ateşli hastalık veya herhangi bir rahatsızlık nedeni ile tedavi gerekliliği,
5. Doğurganlık potansiyelini kaybetme riski yaratacak cerrahi veya medikal tedavi öncesinde fertilitenin prezervasyonu.

## **2.10.1 Embriyo Dondurma Yöntemleri**

### **2.10.1.1 Programlı(Yavaş) Dondurma Tekniği**

Embriyo dondurma işlemleri yapılırken PROH, DMSO veya gliserol kullanılır. PROH genel olarak zigot ve erken dönem embriyolarının kriyoprezervasyonunda kullanılırken, DMSO embriyoların gelişimin her evresinde dondurulması için uygundur (148). Blastosistlerin dondurulmasında ise gliserol tercih edilir. Yavaş dondurma yönteminde işleme başlamadan önce embriyo denge evresi düşük bir kriyoprotectant konsantrasyonunda sağlanmaktadır.

Embriyoların hücre dışı osmolarite arttıkça hücre içi çözünür konsantrasyonu artar ve embriyo dehidrasyona uğrar ve büzülür. Yavaş dondurma yönteminde hücre içi çözünür konsantrasyonu hücre dışından yüksektir. Bu nedenle hücre içi donma sıcaklığı düşer ve buz kristali oluşumu önlenmiş olur. Seeding adı verilen işlem sonrası örnekler genellikle 60°C'ye kadar programlı olarak soğutulmakta ve sıvı nitrojen içerisinde konulmaktadır.

### **2.10.1.2 Vitrifikasyon**

Programlı dondurma işleminin pahalı olması ve işlemlerin uzun sürmesi nedeni ile geliştirilmiş bir tekniktir. Vitrifikasyon yönteminde yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlar kullanılarak embriyolar -196°C'lik sıvı nitrojenin içerisinde bırakılır. Böylelikle sıcaklık hızlıca düşer fakat su kaybı minimal düzeylerde olur ve kriyoprotektanlar hücre dışında bir zar görevi görerek hücre içindeki ve çevresindeki su molekülleri sıvı fazdan camsı faza geçer. Böylece buz kristali oluşumu engellenir. Vitrifikasyon işleminde yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlar kullanıldığı için toksisite etkilerini en aza indirmek için süre çok önemlidir. Vitrifikasyon tekniği kullanımı için kısa süreli olması ve cihaz gereksinimine ihtiyaç duyulmaması nedeni ile programlı dondurma tekniğine göre daha avantajlıdır (144).

### 2.10.2 Embriyoların Farklı Gelişim Safhalarında Dondurulması

Pronükleus döneminde oositler, fertilizasyon aşamasını tamamlamıştır. Bu evrenin sonunda birinci hücre siklusunun belirtileri görülür ve devamını da embriyoner gelişim izler. Pronükleus döneminde embriyo kriyoprezervasyonu eski ve halen en çok başvurulan yaklaşımlardan biridir (149,150). Dowling-Lacey ve arkadaşları 2011 yılında pronükleus aşamasında dondurularak 20 yıl saklanıp çözme işlemi sonrasında sağlıklı canlı doğum elde edildiğini bildirmişlerdir (151). Kuwayama ve arkadaşlarının 2005 yılında programlı embriyo dondurma ve vitrifikasyon tekniği ile dondurma işlemini karşılaştırdıkları iki farklı gruptaki hastalarda PN aşamasında dondurulan embriyolar çözme işlemi sonrasında vitabilite, klivaj ve gelişim parametreleri yönünden değerlendirildiğinde vitrifikasyon tekniğinin daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir (152).

Bir çok IVF merkezinde embriyolar gelişimlerinin 2. veya 3. gününde dondurulmaktadır. Bu nedenle klivaj döneminde dondurulacak embriyolar bazı seçim kriterlerine göre seçilerek kriyoprezervasyonu yapılır. Embriyo kriyoprezervasyonu için; fragmantasyon oranının %20'den az, eşit büyüklükte ve homojen yapıda blastomerlerin olması gerekir. Literatürde embriyoların klivaj aşamasında programlı dondurma tekniği ile kriyoprezervasyon uygulamalarında çözme sonrası canlılık oranı yaklaşık olarak % 70-85 olarak verilirken, vitrifikasyon tekniği ile çözme sonrası embriyolarda gözlemlenen canlılık oranı yaklaşık olarak % 80'nin üzerindedir (152,153,154,155).

Wilding ve arkadaşları 2010 yılında yapmış oldukları 262 hasta üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında klivaj dönemi embriyolarına her iki teknik ile dondurmuşlar ve bu iki tekniğin karşılaştırılabilir olduğunu bildirmişlerdir (156). Desai ve arkadaşları klivaj evresinde vitrifikasyon tekniği ile dondurulan 270 siklusun çözme sonuçlarını değerlendirmişler ve vitabilite, klinik gebelik oranları ve perinatal sonuçlar açısından vitrifikasyon tekniğinin güvenilir olduğunu belirtmişlerdir (157).

Dünyada blastosist evresinde embriyo dondurma /çözme işlemi ile elde edilen ilk gebelik programlı dondurma tekniği ile yapılmıştır (158). Vitrifikasyon tekniği ile dondurulup/çözülen blastosist embriyo transferi sonrasında elde edilen yüksek vitabilite ve gebelik oranları, blastosist embriyo kriyoprezervasyonunda vitrifikasyon

tekniklerinin yaygınlaşmasını sağlamıştır (159). İlerleyen yıllarda yapılan bir çok çalışmanın hemen hemen hepsinde vitrifikasyon tekniği ile programlı yavaş dondurmaya göre son derece başarılı vitabilite ve klinik gebelik oranları elde edildiği belirtilmiştir (152,160,161,162,163,164,165).

Stehlik ve arkadaşları 2005 yılında yapmış oldukları çalışmalarında yavaş dondurma tekniği ile % 83,1 ve % 16,7 vitabilite ve klinik gebelik oranı elde ederken, vitrifikasyon tekniği ile bu oranların % 100 ve % 50'ye ulaştığını belirtmişlerdir (166). Bunun üzerine Huang ve arkadaşları çözme işlemi için her iki tekniği kullanarak vitabilite oranları bakımından karşılaştırdıkları çalışmalarında yavaş dondurma sonrasında elde edilen vitabilite oranlarının (% 56,9), vitrifikasyon tekniği ile dondurma sonrasındaki oranlara (% 84) göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu belirtmişlerdir (167). Yine Liebermann ve Tucker tarafından iki tekniğin vitabilite ve gebelik oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada programlı dondurma için % 92.1 ve % 42.9 vitrifikasyon için % 96.5 ve % 46.1 olarak bulunmuştur (168).

## **2.11. Embriyo Transferi**

Yardımcı üreme tekniklerinde KOH uygulandıktan sonra yeterli sayıda oosit elde edilebilmekte ve klasik bir IVF ve ICSI sonrasında transfer edilebilecek kalitede embriyo gelişmektedir. En sık tercih edilen transfer zamanı embriyo gelişiminin 3. günü, embriyonun 6-8 hücreli olduğu aşamaya, embriyo kültüründe kullanılan mediumların geliştirilmesi sayesinde blastokist gelişim hızının artmasına bağlı olarak embriyo transferi 5. ve 6. günlerde gerçekleştirilmektedir (169). Bazı çalışmacılar, 3. ve 5. gün embriyo transferi yapılan hastalarda anlamlı bir fark olmadığını savunurken diğerleri blastokist transferinin, implantasyon potansiyelini yüksek oranda arttırdığını ileri sürmektedir (170,171). IVF ve ICSI sonrasında embriyoların transferinde, implantasyon potansiyeli en yüksek olan embriyoların seçilebilmesi için bütün morfolojik değerlendirme kriterlerinin birlikte değerlendirilmesi gerekir. Literatürde embriyo transferinin 3. veya 5. gün yapılmasının avantaj ve dezavantajlarını karşılaştıran çalışmalar vardır (169,172,173,174).

Hangi embriyoların 5. güne kadar gelişim gösterebileceğini değerlendirirken en önemli kriter 3. gündeki blastomer sayısıdır. 72. saatte 8 hücreli hale gelen embriyolar blastokist transferi için en uygun adaylardır. Yardımcı üreme tekniklerinde transfer edilen embriyo sayısı ile gebelik oranları arasında doğrudan bir ilişki vardır. Gebelik başarısını arttırmak için ikiden fazla embriyo transfer edildiğinde çoğul gebelik oranı artmaktadır. Bu nedenle çoğul gebeliklerin sonucunda komplikasyon oranlarının yüksek olması ve erken doğum gibi nedenler ile transfer edilen embriyo sayısı azaltılmıştır.

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın Mart 2010 tarihinden itibaren geçerli olan talimatnamesi uyarınca 35 yaşın altında olan genç hastalarda tek embriyo transferi, 35 yaşın üzerinde olan hastalarda ise iki embriyo transferi yapılmaktadır.

Tüp bebek tedavisinin en son fakat en önemli aşaması gelişen embriyoların rahim içerisine yerleştirilmesi yani 'embriyo transferi' işlemidir. Embriyo transferi oldukça kolay ve ağrısız bir işlemdir ve anestezi gerektirmez. Embriyo transferi hasta litotomi pozisyonundayken jinekolojik masada dolu mesane ve transabdominal ultrasonografi eşliğinde transservikal olarak yapılır. Transfer işlemi sırasında embriyoyu fundusun 1 cm altında bırakmak gerekir. Amaç fundusta travma yaratmamaktır.

Transfer işlemi sırasında kataterde kan görülmesi, fundusa değinilmesi ve kataterin kıvrılması gibi problemler gebelik başarı oranını azaltmaktadır (175,176). Bu nedenle transfer işleminin kolay ve rahat yapılması için deneme transferi yapılması gerekmektedir. Deneme transferinin yapılması katater seçiminin daha doğru yapılmasını, uterus aksının gerçek transfer öncesinde net bir şekilde bilinmesini sağlar ve zor embriyo transferi oranlarını azaltmaktadır. Mansour ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 335 hasta deneme transferi yapılan grup ile yapılmayan grup olarak karşılaştırılmıştır ve deneme transferi yapılan grupta gebelik ve implantasyon başarı oranı daha yüksek bulunmuştur (177).

Transfer sırasında spekülümün serviksin en iyi görülebileceği şekilde yerleştirilmesi gerekir. Uygun olmayan spekülüm hem serviksin görüntülenmesini zorlaştırır, hem de uterus pozisyonunu olumsuz etkiler. Vajen ve serviks işlem öncesinde steril sponge yardımı ile serum fizyolojik veya özel dengeli solüsyonlar ile temizlenerek bakteriyel kontaminasyon bir ölçüde azaltılır ve servikal mukus

uzaklaştırılır. Serviks travmatize edilmeden nazikçe temizlenmelidir. Servikal mukus uzaklaştırılmaz ise embriyo transfer kataterinin ucuna yapışabilmektedir. Embriyolarda kaviteye enjekte edilirken katater ucundaki mukusa yapışıp katater içerisinde kalabilmektedir veya embriyolar bırakıldıktan sonra mukusa yapışabilmekte ve katater geri çekilirken kavitenin dışına atılabilmektedir (178,179). Transfer kataterinin yumuşak yapıda olması transfer başarı oranını arttıracaktır. Bazı zor embriyo transferi vakalarında sert kataterler ile kaviteye giriş sağlanabilmektedir. Fakat, sert kataterler özellikle kaviteye girişi kolaylaştırırsa da, daha fazla travma, kanama ve uterin kontraksiyonlara yol açabilmektedir. Zor gerçekleşen embriyo transferlerinde klinik gebelik oranlarının azaldığı Sallam HN tarafından yapılan meta analizde gösterilmiştir (180).

Embriyo transferinin ultrason eşliğinde yapılması kataterin uterin kavitede fundusa dokunulmaksızın uygun yere yerleştirilmesini sağlar. Abdominal ultrason eşliğinde transfer yapılabilmesi için mesanenin dolu olması gerekmektedir. Mesanenin dolu olması servikauterin açının düzleşmesini sağlar ve ileri derecede anteversiyonu olan uteruslarda kataterin kaviteye girişini kolaylaştırır (181). Öncelik steril boş bir katater ile servikal kanaldan kaviteye geçiş provası yapılır. Kataterin servikal kanalda nasıl yol aldığı belirlendikten sonra embriyoloji laboratuvarında 20-30 µl transfer kültür ortamı içerisinde embriyolar katatere yüklenir. Katater ultrasonografik gözlem altında kavite içerisine yerleştirilerek embriyolar intrauterin boşluğa transfer edilir. Transfer sonrasında 1 saat yatak istirahati uygulanır. Bu konuda yapılan bir araştırmada daha uzun süreli istirahatlerin sonuçlar üzerine etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (182).

Transferden sonraki 12. günde kantitatif beta hCG ölçümü yapılır. Eğer test pozitif ise iki gün sonra tekrarlanır ve artışın sağlıklı olup olmadığına karar verilir. Sağlıklı bir artış gözlenir ise 15 gün sonra gebelik ultrasonografisine çağırılır.

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu retrospektif çalışma 26/01/2015 ile 15/06/2017 tarihleri arasında Bahçelievler Medicana Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Üreme Sağlığı Merkezi'ne başvuran ve PKOS tanısı konulmuş olan 20-40 yaş aralığında YÜT uygulanan 55 kadın hastaya ait veriler retrospektif olarak çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışma kapsamındaki 55 hastaya kontrollü ovaryan hiperstimülasyon siklusu uygulanmıştır ve matür oositleri toplanarak, ICSI işlemi yapılmıştır. Fertilize olan oositlerin gelişimi gözlemlenerek 3.gün grade 1-2 kalitede olan embriyoların OHSS riskini önlemek ve azalmış endometrial reseptiviteden dolayı implantasyon başarısını arttırmak için vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonu sağlanmıştır.

3.gün kriyoprezervasyonu yapılan 55 hastanın 30'nun embriyoları aynı gün çözülerek transferi yapılmıştır, geriye kalan 25 hastanın embriyoları yine 3.gün çözülerek 5.güne kadar kültür ortamında gelişimleri takip edilmiştir ve iyi kalitede olan embriyonun transferi 5.gün yapılarak gebelik başarı oranları karşılaştırılmıştır.

Rotterdam kriterlerine göre PKOS tanısı konulan ve KOH siklusu sonrası oosit sayısı<15 olan ve KOH'a kötü yanıt veren, hidrosalpinksi, endometriozisi bulunan hastalar ve testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) sonrasında sperm elde edinilmiş olan hastalar çalışmadan çıkarıldı.

#### **3.1 Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon**

Çalışmaya katılan PKOS hastalarına (n=55) bireyselleştirilmiş dozlarda gonadotropin (Gonal-F; Serona, Türkiye) ile menstrüel siklusun 3.gününde indüksiyon başlandı. Gonadotropin tedavisi başladıktan 5-6 gün sonra GnRH antagonist (Orgolutran; Organon, Türkiye veya Cetrotide; Serona, Türkiye) tedavisi eklenerek ekzojen gonadotropin uyarısına devam edildi. Folliküller büyüme düzenli olarak ultrason ölçümleri ile takip edildi ve folliküler 18-20 mm çapına ulaşınca 500 IU hCG (Ovitrelle; Serona, Türkiye) uygulandı.



### 3.2 Oositlerin Toplanması, Denüasyonu ve ICSI

Oosit toplama işlemi hCG yapıldıktan 34-36 saat sonra gerçekleştirildi. Hastalara işlem öncesinde intravenöz sedasyon yöntemi ile anestezi uygulandı. Oosit toplama işlemi için vajen, steril salin solüsyon ile (EBSS) yıkandı. Oosit toplama işlemi vajinal ultrasonografi eşliğinde 17 gauge aspirasyon iğnesi ile 15-20 mm çapındaki her bir folliküle tek tek girilerek 140 mm Hg vakum basıncında aspire edildi ve folliküller sıvı flushing medium içeren (EBSS) 14 ml'lik tüplere alındı. Aspirasyon işlemi ile tüp içerisine alınan follikül sıvıları laminar air flow kabinin içerisindeki petri dishlerine (BD Falcon, 100×20 mm) dökülüp, sterio mikroskop altında oositler bulundu. Yumurta toplama işlemi günü center-well dish (BD Falcon 60×15 mm, Biosciences, ABD) içerisine inkübatörde 37°C'de ısınmış olan oosit karşılama mediumu (G-Mops Plus, Vitrolife, Sweden) dishin iç ve dış kısmına 1'er ml konuldu ve dishin iç kısmı parafin yağ ile kapatıldı. Toplanan oositler center-well dishin dış kısmında pasteur pipet ile aspire edilerek iç kısmına bırakıldı.

Yumurta toplama işlemi bittikten sonra toplanan oositler bir gün önceden four well dish (BD Falcon 4 well plates, Biosciences, ABD) içerisinde hazırlanmış olan G-IVF inkübasyon mediumunda 2 saat inkübe edilerek ICSI saatine kadar bekletildiler. Oosit toplama işleminin ardından hastaların eşlerinden semen örneği alındı. Spermier yoğunluk gradienti ve swim-up yüzdürme yöntemleri ile santrifüj edilerek hazırlandı. Hazırlık sonunda semen içerisinde yer alan lökositler, immotil veya anormal sperm hücreleri motil sperm hücrelerinden ayrıştırıldı. Ayrılan sperm hücreleri kapasitasyon amacı ile protein içeren HEPES tamponlu sperm yıkama mediumunda (Sperm Wash Medium, Vitrolife, Sweden) 37°C'de, % 6'lık CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakıldı.

OPU işlemi sonrasında mikroenjeksiyon işlemi için oositleri çevreleyen kumulus-korona oosit komplekslerinin uzaklaştırılması ve maturasyonlarının değerlendirilebilmesi için denüasyon işlemi yapılarak kumulus hücreleri enzimatik ve mekanik yöntemler ile uzaklaştırıldı. Bu işlem sırasında center-well (BD Falcon 60×15 mm, Biosciences, ABD) dishin iç kısmında HEPES tamponlu hyalüronidaz içeren medium içine alınan oositler 1 dk içinde aspire cam pastör pipet ile aspire

edilerek temizlendi. Serbest kalan oositler kültür mediumunda 4-5 kez yıkandı. Kumulus-korona kompleksinden kurtulan oositler maturasyon için değerlendirildi.

Mikroenjeksiyon işlemi öncesinde steril, toksik olmayan petri dishine 37°C’de ısınmış olan kültür ortamı ile aynı pH’a sahip, aminoasit ve antibiyotik içerikli medium (G-MOPS Plus, Vitrolife, Sweden) ile sperm havuzu ve oositlerin içerisine konulacağı mikrodamlacıklar ve spermelerin immobilizasyonu için insan albümini ve polivinilpirolidon (pvp) içeren medium (ICSI, Vitrolife, Sweden) konuldu. Spermeler pvp içerisinde hafif bir mekanik basınç ile kuyruklarından kırılarak hareketsizleştirildi. Oositin kutup cisimciği 6 veya 12 saat hizasına getirilerek tutucu pipet ile (Holding Pipet) sabitlendi. Spermeler enjeksiyon pipeti (ICSI Pipet) içerisine alındı ve enjeksiyon pipeti zonaya doğru itirilerek oositin aktivasyonunu sağlamak için sitoplazma aspirasyonu yapıldı ve sperm oositin içerisine bırakıldı. ICSI işlemi bittikten sonra oositler 37°C’de, % 6’lık CO<sub>2</sub>, % 94.0 nem ve % 5’lik O<sub>2</sub>’li kültür ortamına alınmak üzere inkübatöre konuldu.

### **3.3 Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesi**

Mikroenjeksiyon işleminden 18-20 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapıldı. ICSI işleminden 16-18 saat sonrasında anne ve babadan gelen pronükleuslar oositin ortasında birleştiler. İlk gün iki polar body görülmesi döllenmenin gerçekleştiğini gösterir. Döllenen oositler yaklaşık olarak 24-30 saat sonunda ilk mitoz bölünmelerini gerçekleştirdi ve 2 hücreli bir embriyo oluşturdu. İkinci gün 42-45 saat sonunda 3-4 hücreli ve üçüncü gün 66-70 saat sonunda 6-8 hücreli embriyolar oluştu.

Embriyo kalitesi hücre sayısı, blastomerlerin şekli ve büyüklüğü, perivitellin aralığındaki sitoplazmik fragmantasyonların büyüklüğü, simetrisi ve klivaj oranları da morfolojik olarak değerlendirildi. Kalitelerine göre embriyolar gruplara ayrıldı: Grade 1,2,3,4. Bu tez çalışması için grade 1 ve 2 kalitede olan embriyolar istatistiksel olarak değerlendirmeye alındı. Grade 1 embriyo; blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte, 0 fragmantasyona sahip, grade 2 embriyo;blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte ve 0-20 arası fragmantasyon oranına sahip embriyolar olarak tanımlandı. Fertilizasyon sonrasında embriyoların gelişimi 3.güne kadar takip edildi ve grade 1 ve 2 kalitede olan embriyoların 3.gün vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonu

(Total freezing) yapıldı. Bu çiftlerin bir sonraki FRET sikluslarında 3.gün embriyo transferi yapılmıştır, bir kısmına ise 3.gün çözme işlemi sonrasında 5.güne kadar gelişimleri takip edilip 5.gün transferi yapılmıştır.

3.gün çözme işlemi yapılan embriyoların gelişiminin dördüncü gününde kompaktlaşma ve embriyolar sıkı bir hücre kümesi şeklinde görüldü. İyi gelişim gösteren embriyoların gelişimin beşinci gününde blastomerler arasında blastomerler arasında boşluklar oluştu ve gelişim devam ettikçe bu boşluklar birbirleri ile birleşerek genişledi, embriyo hacminin yarısından çoğunu kapladı. Zona pellusida incelik. Blastokistin farklılaşması ile trofoblastlar ve iç hücre kitlesi oluştu. Blastosöl boşluğunun büyüklüğü, iç hücre kitlesi, trofoektodermal hücrelerin özelliklerine ve zona pellusidanın özelliğine göre blastokist skorlaması yapıldı.

#### **3.4. Vitrifikasyon ve Çözdürme Protokolleri**

Vitrifikasyon işlemi klivaj dönemindeki embriyolar için yüksek konsantrasyonlarda kriyopektan olarak kullanılan MOPS tamponlu medium (RapitVit Cleave, Vitrolife, Sweden) ile yapıldı. -4°C’de saklanan medium buzdolabından çıkartıldı ve four well dishin (BD Falcon 4 well plates, Biosciences, ABD) her bir drobuna üç mediumdan 0,5’er µl konuldu ve 37°C sıcaklıkta 20 dakika kadar laminar air flow üzerinde bekletildi. Cryotop üzerine çiftin adı-soyadı, işlem tarihi ve kaçınıcı gün, kaç embriyo dondurulduğunun bilgisinin yazılmış olduğu barkod yapıştırıldı. Vitrifikasyon işlemi yapılacak olan embriyolar kültür mediumu içerisinden pipet ile alınıp, birinci droptaki medium içerisine 5 dakika bekletilmek üzere bırakıldı ve sırasıyla ikinci dropta 2 dakika, üçüncü dropta 30 saniye bekletilerek sterio mikroskop altında straw üzerine yüklendi ve hızla sıvı nitrojen ile dolu taşıma tankının içerisine daldırıldı. Cryotop sıvı nitrojenin içerisine bırakıldı ve -196°C olan sıvı nitrojen dolu tanktaki lokasyonuna yerleştirildi. Yüksek konsantrasyonlardaki kriyopektanlar camlaşmanın oluşumunu sağlayarak buz kristallerinin oluşumunu engelledi. Böylece dondurma sırasında embriyo minimum zarar gördü.

3.gün vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonu yapılan embriyolar bir sonraki FRET (Dondurulmuş çözülmüş embriyo transferi) siklusu için işlem günü transferden 2-4 saat öncesinde çözüldü. Embriyo çözme işleminde kriyopektan olarak kullanılan ve -4°C’de saklanan medium (RapitWarm Cleave, Vitrolife, Sweden)

buzdolabından çıkartıldı ve four well dishin (BD Falcon 4 well plates, Biosciences, ABD) her bir drobuna dört mediumdan 0,5'er µl konuldu ve 37°C sıcaklıkta 20 dakika kadar laminar air flow üzerinde bekletildi. Çözme işlemi yapılacak olan 3.gün embriyosunun bulunduğu cryotop içerisi sıvı nitrojen dolu taşıma tankının içerisine konuldu. Straw birinci dropta bulunan medium içerisine doğru daldırıldı ve maximum 1 dakika içerisinde embriyo bulundu. Sırasıyla ikinci droptaki mediumda 1 dakika, üçüncü droptaki mediumda 2 dakika ve dördüncü droptaki mediumda 5 dakika bekletildi ve bir gün öncesinde hazırlanmış olan 37°C'de, % 6'lık CO2'li ortamda gazlandırılmış kültür mediumunun (G-TL, Vitrolife, Sweden) bulunduğu center well dishin içerisine çözme işlemi yapılan embriyo konuldu ve transfer saatine kadar inkübatöre kaldırıldı.

### **3.5 Embriyo Transferi**

Embriyo transferi dolu mesane ve transabdominal ultrasonografi ile transservikal olarak yapıldı. Transfer sırasında spekülüm serviksi en iyi şekilde görecektek şekilde yerleştirildi. Vajen ve serviks spanch yardımı ile özel salin solüsyon (EBSS) ile temizlendi. Steril bir katater ile servikal kanaldan geçiş provası yapıldı. Sonrasında embriyolar transfer için kültür sıvısı (G-TL, Vitrolife, Sweden) içerisinde katatere yüklenir. Transfer katateri (Wallace, PEB623, Denmark) içindeki embriyo, ultrasonografik gözlem altında intrauterin boşluğa transfer edildi. Transfer sonrasında katater içerisinde embriyo, kan, mukus kalıp kalmadığı kontrol edildi. Hasta embriyo transferi sonrasında 2 saat istirahat ettikten sonra taburcu edildi. Luteal faz desteği için hastalara doğal progesteron etkili (Crinoe Jel % 8 Progesteron, Serona, Türkiye) 600 mg/gün, intravaginal olarak sağlandı. Transferden sonraki 12.günde kanda kantitatif beta hCG ölçümü yapıldı. Eğer test pozitif ise iki gün sonra tekrarlandı ve artışın sağlıklı olup olmadığına bakıldı. 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 (183,184).

#### 4. BULGULAR

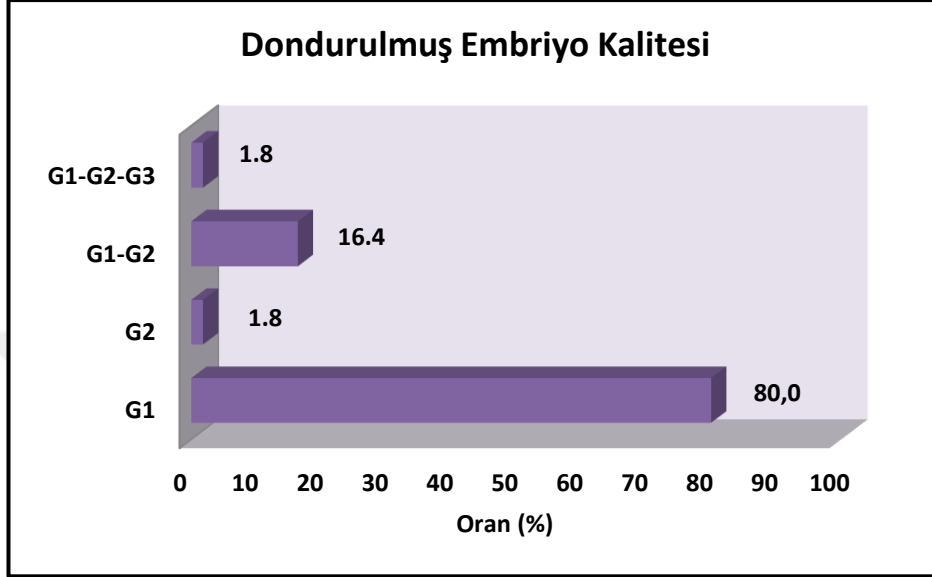
Çalışma 26/01/2015 ile 15/06/2017 tarihlerinde Medicana Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı'nda, 55 olgu ile gerçekleştirilmiştir. Olguların yaşları 20 ile 40 arasında değişmekte olup, ortalama  $28,25 \pm 4,65$  yıl saptanmıştır.

<b>Yaş (yıl)</b>	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	20-40 (28)
	<i>Ort±Ss</i>	28,25±4,65
<b>Toplam Oosit sayısı</b>	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	14-80 (25)
	<i>Ort±Ss</i>	29,09±12,30
<b>Fertilizasyon</b>	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	3-50 (14)
	<i>Ort±Ss</i>	15,56±8,16
<b>Dondurulmuş embriyo sayısı</b>	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	2-50 (8)
	<i>Ort±Ss</i>	10,18±8,26
<b>Kalitelere Göre Dondurulmuş Embriyo Sayıları</b>	<b>G1</b>	44 (80,0)
	<b>G2</b>	1 (1,8)
	<b>G1-G2</b>	9 (16,4)
	<b>G1-G2-G3</b>	1 (1,8)
<b>Embriyo transfer günü</b>	<b>3.gün</b>	30 (% 54,5)
	<b>5.gün</b>	25 (% 45,5)
<b>Gebelik sonucu</b>	<b>3.gün ET Negatif</b>	15 (% 50,0)
	<b>3.gün ET Pozitif</b>	15 (% 50,0)
	<b>5.gün ET Negatif</b>	10 (% 40,0)
	<b>5.gün ET Pozitif</b>	15 (% 60,0)

**Tablo 4:** Tanımlayıcı özelliklerin dağılımları. David K.Gardner tarafından önerilen skorlama sistemi ile yapılmıştır(185).

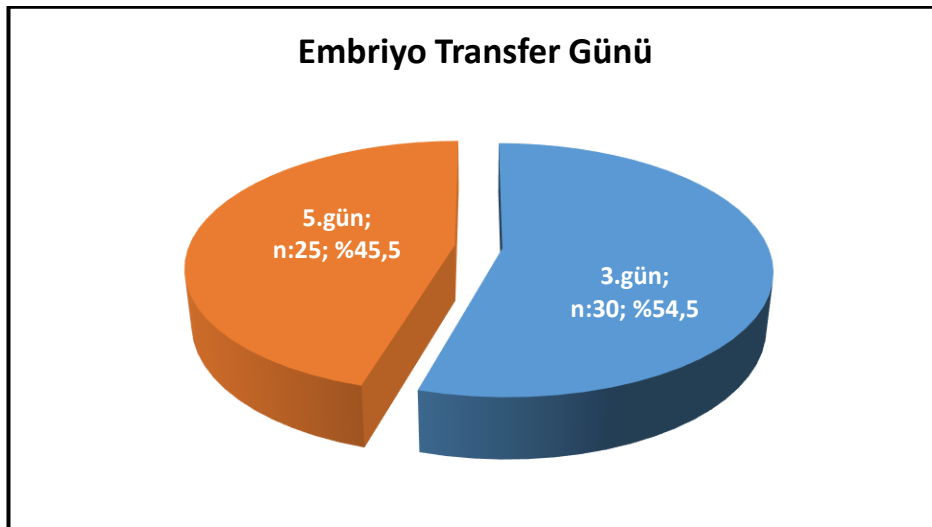
Toplam Oosit sayıları 14 ile 80 arasında değişmekte olup, ortalama  $29,09 \pm 12,30$ ; Fertilize olan oosit sayısı 3 ile 50 arasında değişmekte olup, ortalama  $15,56 \pm 8,16$  saptanmıştır.

Olguların dondurulmuş embriyo sayıları 2 ile 50 arasında değişmekte olup, ortalama  $10,18 \pm 8,26$ 'dır. Dondurulmuş embriyo kalitesi incelendiğinde ise; %80,0'ünün (n=44) G1, %1,8'inin (n=1) G2, %16,4'ünün (n=9) G1-G2 ve %1,8'inin (n=1) G1-G2-G3 olduğu saptanmıştır.



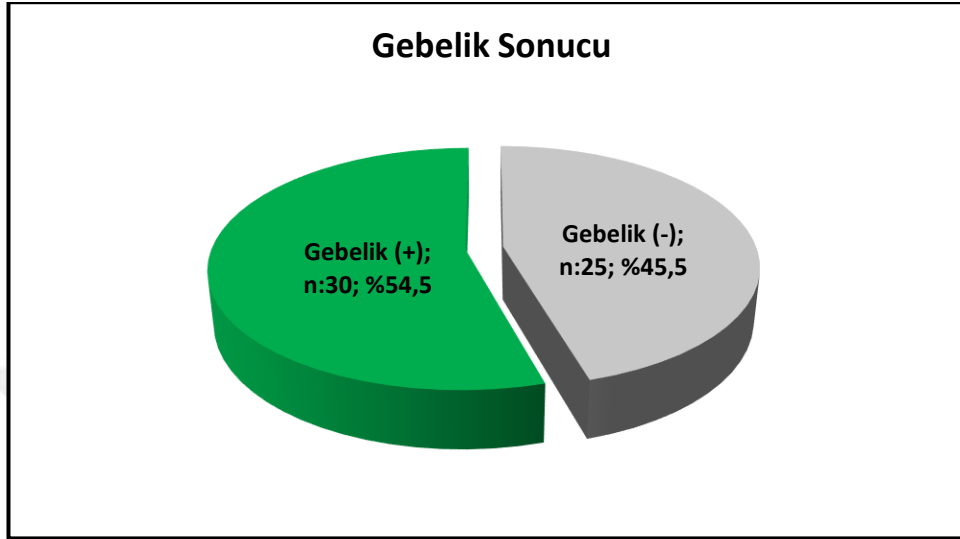
*Şekil 7: Dondurulmuş embriyo kalite dağılımları*

Embriyo transferi olguların %54,5'inde (n=30) 3.gün, %45,5'inde (n=25) 5.gün gerçekleştirilmiştir.



*Şekil 8: Embriyo transfer günlerinin dağılımları*

Negatif gebelik oranı %45,5 (n=25), pozitif gebelik oranı %54,5 (n=30) saptanmıştır.



Şekil 9: Gebelik sonucu dağılımları

		Embriyo Transfer Günü		P
		3.gün transfer grubu (n=30)	5.gün transfer grubu (n=25)	
Yaş (yıl)	Min-Mak	21-40 (27)	18-37 (29)	<sup>a</sup> 0,580
	(Medyan)			
	Ort±Ss	27,93±4,62	28,64±4,75	
Toplam Oosit sayısı	Min-Mak	15-80 (28,5)	14-46 (24)	<sup>b</sup> 0,155
	(Medyan)			
	Ort±Ss	31,20±13,79	26,56±9,93	
Fertilizasyon	Min-Mak	3-50 (14,5)	5-28 (14)	<sup>b</sup> 0,866
	(Medyan)			
	Ort±Ss	16,17±9,33	14,84±6,60	

<sup>a</sup>Student t Test

<sup>b</sup>Mann Whitney U Test

**Tablo 5:** Embriyo transfer gününe göre tanımlayıcı özelliklerin değerlendirilmesi.

Embriyo transferi 3.gün yapılan olguların yaş ortalaması 27,93±4,62; 5.gün yapılan olguların yaş ortalaması 28,64±4,75'tir. Gruplara göre yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Embriyo transferi 3.gün yapılan olguların toplam oosit sayıları ortalama 31,20±13,79; 5.gün yapılan olguların toplam oosit sayıları ortalama 26,56±9,93'tür. Gruplara göre toplam oosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05). Beşinci gün embriyo transferi yapılan olgulardaki toplam oosit sayısı yüksekliği dikkat çekici düzeydedir.

Embriyo transferi 3.gün yapılan grupta fertilizasyon ortalama 16,17±9,33; 5.gün yapılan grupta fertilizasyon ortalama 14,84±6,60'tır. Gruplara göre fertilizasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

		Embriyo Transfer Günü		P
		3.gün transfer grubu (n=30)	5.gün transfer grubu (n=25)	
<b>Dondurulmuş embriyo sayısı</b>	<i>Min-Mak</i>	2-50 (7)	2-23 (11)	<sup>b</sup> 0,239
	<i>(Medyan)</i>			
	<i>Ort±Ss</i>	10,17±10,08	10,20±5,55	
<b>Dondurulmuş embriyo kalitesi</b>	<b>G1</b>	23 (76,7)	21 (84,0)	<sup>c</sup> 0,736
	<b>G1-G2</b>	6 (20,0)	4 (16,0)	
	<b>•G1-G2-G3</b>	1 (3,3)	0 (0)	

•Grupta yer alan olgu sayısı yetersiz olduğundan karşılaştırmaya dâhil edilmemiştir.

<sup>b</sup>Mann Whitney U Test

<sup>c</sup>Fisher's Exact Test

**Tablo 6:** Embriyo transfer gününe göre dondurulmuş embriyo özelliklerinin değerlendirilmesi.



Embriyo transferi 3.gün yapılan olguların dondurulmuş embriyo sayıları ortalama  $10,17 \pm 10,08$ ; 5.gün yapılan olguların dondurulmuş embriyo sayıları ortalama  $10,20 \pm 5,55$ 'tir. Gruplara göre dondurulmuş embriyo sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

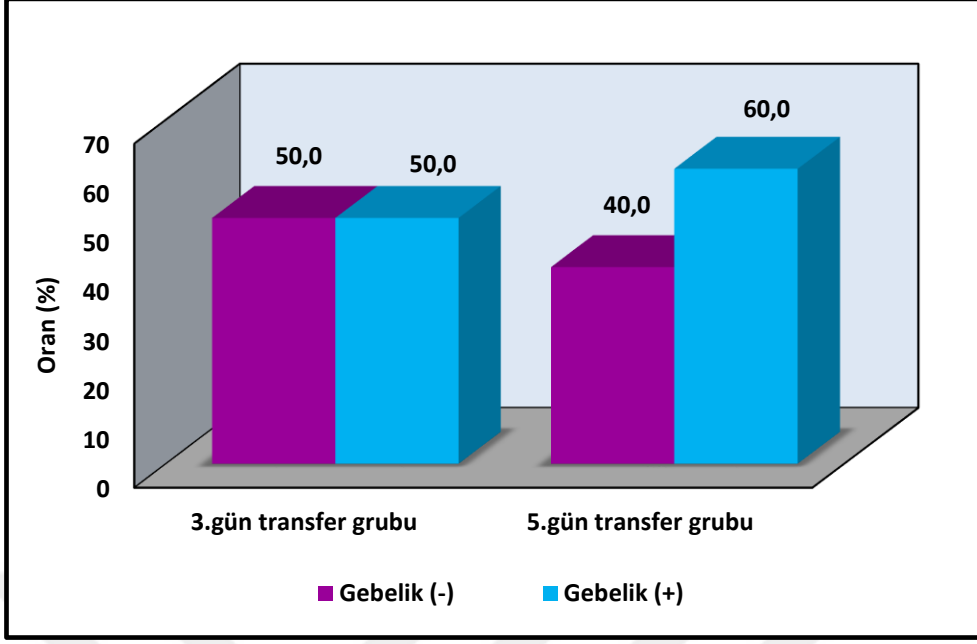
Embriyo transferi 3.gün yapılan grubun %76,7'sinin ( $n=23$ ) dondurulmuş embriyo kalitesi G1, %20,0'sinin ( $n=6$ ) G1-G2 ve %3,3'ünün ( $n=1$ ) G1-G2-G3'tür. Embriyo transferi 5.gün yapılan grubun ise %84,0'ünün ( $n=21$ ) dondurulmuş embriyo kalitesi G1 ve %16,0'sinin ( $n=4$ ) G1-G2'dir. Transfer gününe göre dondurulmuş embriyo kalitesi istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p > 0,05$ ).

		Embriyo Transfer Günü		P
		3.gün transfer grubu (n=30)	5.gün transfer grubu (n=25)	
Gebelik sonucu	Negatif	15 (50,0)	10 (40,0)	<sup>d</sup> 0,588
	Pozitif	15 (50,0)	15 (60,0)	

<sup>d</sup>Pearson Chi-Square Test

**Tablo 7:** Embriyo transfer gününe göre gebelik oranlarının değerlendirilmesi.

Embriyo transferi 3.gün yapılan olguların %50,0'sinde ( $n=15$ ), 5.gün yapılan olguların ise %60,0'ında ( $n=15$ ) gebelik pozitifdir. Transfer gününe göre gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).



*Şekil 10: Transfer gününe göre gebelik sonucu dağılımları*

## İSTATİSTİKSEL İNCELEMELER

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenlerin iki grup karşılaştırmalarında Student t Test, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin iki grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi ve Fisher's Exact test kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirildi.

## 5. TARTIŞMA

Yardımla üreme teknikleri son 30 yılda teknolojik alanda hızla ilerleme kaydetmiştir (186) ve son yıllarda kontrollü hiperstimülasyon sonucu elde edilen embriyoların vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonunun yapılması ve ilerleyen siklularda transfer edilmesi işlemi ile hasta dostu yaklaşımlar kullanıma kazandırılmıştır.

YÜT uygulamaları ile prematür luteinizasyonu önlemek için uygulanan antagonistler ovaryan hiperstimülasyon sendromunda (OHSS) gelişen komplikasyon oranı, agonist sikluslarına göre % 50 azaldığı bildirilmiştir (187). Bazı olgularda hCG günün progesteron (P) hormonunun yükselmesi ile implantasyon penceresinde kayma gerçekleşir ve bu nedenle implantasyon ve gebelik oranlarında azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (188). Progesteron hormonu yüksekliği saptanan hastalarda, özellikle polikistik over sendromu olan olgularda transfer işlemini gerçekleştirmeden embriyoların dondurulması ve ilerleyen bir sonraki siklusta transferin yapılması ile gebelik ve canlı doğum oranlarının arttığı bildirilmiştir (189).

Yardımla üreme tekniklerinde embriyo transferi için en önemli aşama başarılı bir implantasyon için iyi kaliteye sahip bir embriyo ve endometrial reseptivitenin varlığıdır. Rienzi L. ve arkadaşlarının 2002 yılındaki yaptıkları bir çalışmada embriyo transferi 3. ve 5. günlerde yapılan olgularda benzer gebelik sonuçları elde edildiği bildirilmiştir (190). Bizim çalışmamız da bunu desteklemektedir.

Coşkun S. ve arkadaşlarının yapmış oldukları prospektif randomize bir çalışmada 201 infertil hasta değerlendirmeye alınmıştır ve 3.gün ve 5.gün embriyo transferlerinin istatistiksel olarak klinik gebelik ve implantasyon oranları benzer sonuçlar vermiştir (191). Bizim çalışmamızda farklı olarak embriyoların tümü dondurularak sonraki siklusta transfer edilmiş ancak sonuçlar benzer bulunmuştur.

Fernandez-Shaw S ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları randomize bir çalışmada vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan klivaj ve blastokist evresindeki embriyoların çözme işlemi sonrasında blastokist embriyo transferlerinin gebelik oranları daha yüksek olmasına rağmen klivaj evresinde yapılan embriyo transferleri

ile arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir. Bu sonuç Guerif ve arkadaşları tarafından elde edilen sonuç ile benzerdir (192).

Glujovsky ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada 3.gün ve 5.gün blastokist aşamasında yapılan embriyo transferlerinin klinik gebelik oranları ve canlı doğum oranları karşılaştırılmış ve blastokist evresinde embriyo transferi yapılmasının anlamlı olarak yüksek sonuçlar verdiği saptanmıştır. Papanikolau ve arkadaşları yapmış oldukları meta-analiz ile blastokist embriyo transferinin klinik üstünlüğünü önererek daha olumlu sonuçlar elde edildiğini vurgulamışlardır (198). Embriyo transfer günü ile ilgili yapılan çalışmalar 5.gün blastokist transferi için, 3.gün bölünme evresinde en iyi morfolojiye sahip embriyo seçimi ile % 50'ye varan gebelik oranları elde edilebileceğini savunmuşlardır (193,194,195).

Doğrudan ovaryan hiperstimülasyon yapılan polikistik over sendromu olan hastalarda ovaryan hiperstimülasyon (OHSS) riskinin varlığı bir süredir bilinmektedir (196,197). Bu tez çalışmasında polikistik over sendromu olan hastalarda OHSS riskini önleyebilmek, azalmış endometrial reseptiviteden dolayı implantasyon başarısını arttırabilmek için fertilizasyon sonrasında gelişen iyi kalitedeki (G1-G2) tüm embriyolar 3. gün vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş, ilerleyen süreçte bir sonraki sikluslarında hastaların bir kısmının embriyoları 3. gün çözülerek transfer edilmiştir. Bir diğer kısmı da 3. gün çözülerek 5. güne kadar kültür ortamında gelişimi takip edilerek 5.gün transferi yapılmıştır. Dondurma-çözme kombinasyonları sonuçları ile yapılan bu çalışmada embriyo transferi 3.gün yapılan olguların %50,0'sinde (n=15), 5.gün yapılan olguların ise %60,0'ında (n=15) gebelik pozitifdir. Transfer gününe göre gebelik oranları göreceli artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır .

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Analiz sonuçları incelendiğinde embriyo dondurma-çözme işlemleri sonrasında yapılan 5. gün embriyo transferinin 3.gün embriyo transferine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamasına rağmen, gebelik oluşma potansiyeli açısından daha olumlu sonuçlar verdiği değerlendirilmektedir. Fakat çalışmanın retrospektif olması ve hasta sayısının az olması çalışmanın gücünü etkilemiştir. Diğer yandan polikistik over sendromu olan hastaları OHSS riskinden korumak için klivaj aşamasında dondurulan iyi kalitedeki embriyolarının (G1-G2) çözme işlemi sonrasında kültür ortamında 5. güne kadar geliştirilmesi hayatta kalma şansı en yüksek olan blastokisti elde etme olasılığını arttırırken, implantasyon başarısının olasılığını arttırdığı görülmektedir.

Bu çalışma ile Bahçelievler Medicana Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Üreme Sağlığı Merkezi'nde 26/01/2015 ile 15/06/2017 tarihleri arasındaki polikistik over sendromu teşhis konulan hasta verileri retrospektif olarak gözden geçirildi. Çalışma kapsamında geniş örneklemin olduğu, çok merkezli çalışmalara ihtiyaç duyulmakla beraber kontrollü randomize çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmanın sonucu olarak seçilmiş vakalarda 3. gün embriyo dondurma işleminin ardından bir sonraki FRET siklusunda çözme işlemi yapılarak 5. gün embriyo transferi yapılmasının en azından gebelik başarısını düşürmediği olasılıkla implantasyon başarısını arttıracaklarını öngörmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Sezgin H. Hocaoglu Ç.(2013) İnfertilitenin psikiyatrik yönü. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar 2014;6(2):165-184.
2. Gomel VUB. Yarali H. Investigation of the infertile couple. In Reproductive Endocrinology and Infertility 1993:143-155.
3. Önder İ., Ünlü., ‘Kadında İnfertilitenin tanısı, Serviksten kaynaklanan İnfertilite, Troid’ten kaynaklanan infertilite, In vitro fertilizasyon ve embriyo transferi’, Kadında ve erkekte infertilite, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara, 450:7,17, 124-30, 238, 405-406, 665-677, 737,(1995).
4. Speroff L. Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology an infertility. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2005.
5. Berek JS, Novak E. Berek&Novaks gynecology. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2007.
6. Orhan E., ‘Erkek İnfertilitesi’, Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite, 1. Baskı, Çeviri Editörü, Nedim Çiçek, Palme Yayıncılık, Ankara, 109-148(2008).
7. Baisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen HE, Haavisto AM, Schmidt IM, Chellakooty M, Damgaard IN, Mau C, Reunanen M, Shakkebaek NE, Toppari J. (2004) Difference In Prevalance Of Congenital Cryptorchidism In Infants Between Two Nordic Countries. Lancet, 363:12 64-9.
8. Ceylan K, Yılmaz Y, Yıldız A, Kuş A,&Gönülalan H. (2006). Kriptorşidizm:164 Olgunu; Birlikte Bulunan Anomali, Komplikasyon, Tedavi Modalitesi, Hasta Yaşı Açısından İrdelenmesi. Tıp Araştırma Dergisi 4(3),24-26.
9. Ficarra V, Cerruta MA, Liguori G, Mazzoni G, Minucci S, Tracia A.&Gentile V.(2006). Treatment Of Varicocele In Subfertile Men: The Cochrane Review: A Contrary Opinion European Urology, 46(2), 258-263.
10. Baazem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A&Zini a. (2011) Varicocele And Male Factor Infertility Treatment: A New Meta-Analysis And Review Of The Role Of Varicocele Repair. European Urology. 60(4) 796-808.

11. Speroff L, Fritz MA (2007) Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite Çev. Editörleri Erk A, Günalp S. Kadın İnfertilitesi Güneş Tıp Kitabevleri. Ankara. 7. Baskı. s: 1012-1068.
12. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. Br Med J (Clin Res Ed) 1985;291:1693-1697.
13. Maseelall P, McGovern PG. Ovarian reserve screening: what the general gynecologist should know. Womens Health (Lond Engl) 2008;4:291-300.
14. Ola B, Li TC. Implantation failure following in-vitro fertilization. Curr Opin Obstet Gynecol 2006;18:440-445.
15. Westram L. Effect of pelvic inflammatory disease on fertility. Venereology 1995;8:219-222.
16. Aksu T. Demirtaş E. (2004). Yardımcı Üreme Teknikleri içinde: Kadın Hastalıkları ve Doğum Tanı ve Tedavi. Eds: Günalp GS. Tuncer ZS. Pelikan Yayınları, İstanbul, s:567-583.
17. Ghadir S, Ambartsumyan G, DeCherney A. (2014) Infertility. In: DeCherney AH, Nathan L, Laufer N, Roman AS. Current Diagnosis&Treatment Obstetrics.
18. Corpus SF, Opmeer BC, Van der Veen F, (2007) The Predictive Value Of Medical History Taking And Chlamydia Igg ELİSA Antibody Testing in the Selectin of Subfertile Women For Diagnostic Laposroscopy: A Clinical Prediction Model Approach. Human Reproduction, 22:p:1353-1358.
19. Ekin Y. (2005). Kadın Hastalıkları ve Doğum. Klinisyen Tıp Kitabevleri, Ankara.
20. The practice Committee of the American Society for reproductive Medicine. Endometriozis and infertility. Fertil Steril 2004;82:40-5.
21. Oral E, Elter B. (2010) Endometriozisin Tedavisinde Kanıta Dayalı Tıp Yaklaşımı: İnfertilite Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics, 3(3):62-73.

22. Odabaş H. (2009). Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Olgularda Endometriyal CD56+Natürel Killer Hücrelerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Adana, (Danışman:Prof. Dr. Turan Çetin)
23. Witchel SF. Hirsutizm and polycystic ovary syndrome In: Lifshitz F(ed)- Pediatric Endocrinology New York, Informa Healthcare USA Inc, 2007: 325-48.
24. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic Endocrinol Metab 2004;89: 2745-9.
25. Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, Go RC, Azziz R. Prevalance of polycystic ovary syndrome(PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. Fertil Seril 2001;75-53-8.
26. Diamanti-Kandorakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanism and implications. Endocr Rev, 2012;33(6):981-1030
27. Adams J, Polson DW, Abdulwahid N, et al. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. Lancet 198; ii:1375-8.
28. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome(PCOS). HUM Reprod 2004;19: 41-7.
29. Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. Obstet Gynecol Surv 2002;57:755-67.
30. Engmann L. Maconochie N, Sladkevicius P, Bekir J, Campbell S, Tan SL. The outcome of in-vitro fertilization treatment in women with sonographic evidence of polycystic ovarian morphology. Hum Reprod 1999; 14: 167-71.
31. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol 1935; 29:181-91.
32. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam GR(eds). Polycystic ovary syndrome. Boston: Blackwell Scientific Publications.



33. Aziz, R., Ehrmann D., Legro, R.S., Whitcomb, R.W., R., Fereshetion, A.G., et. Al (2001). Troglitazone improves ovulation and hirsutizm in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial, *J Clin Endocrinol Metab*; 86:1626-1632.
34. Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS consensus workshop Group. Revised 2003 consensus an diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:19-25.
35. Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS consensus workshop Group. Revised 2003 consensus an diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;19:41-7.
36. Jacobs HS. Polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 1987;1:113-31.
37. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.
38. Legro RS, Gnatuk CL, Kunselman AR, Dunaif A. Changes in glucose tolerance over time in women with polycystic ovary syndrome: a controlled study. *J Clin Endocrinal Metab* 2005;90:3236-42.
39. Mukherjee S, Maitra A. Molecular&Genetic factors contributing to insülin resistance in polycystic ovary syndrome. *Indian J Med Res* 2010;131:743-60.
40. Bremer AA, Miller WL. The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenism and insülin resistance. *Fertil Steril* 2008;89:1039-48.
41. Soloman CG, Hu FB, Dunaif A, et al. Long or highly irregular menstrual cycles as a marker for risk of type 2 diabetes mellitis. *Jama* 2001;286:2421-6.
42. Goldzieher JW, Green JA. The polycstic ovary 1. Clinical and histological features. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;2:325-38.
43. Franks S. Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:263-72.
44. Ibanez L, Valls C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: antogeny of the low birth weight effect. *Clin Endocrinol(oxf)* 2001;55:667-72.

45. Cisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Colman RJ, Abbott DH. Increased adiposity in female rhesus monkeys exposed to androgen excess during early gestation. *Obes Res* 2003;11:279-86.
46. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome-a hypothesis. *J Endocrinol* 2002;174:1-5.
47. Witchel SF. Hirsutism and polycystic ovary syndrome In: Lifshitz F(ed)-*Pediatric Endocrinology* New York, Informa Healthcare USA Inc, 2007:325-48.
48. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:266-72.
49. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:815-30.
50. Williamson K, Gum AJ, Johnson N, Milsom SR. The impact of ethnicity on the presentation of polycystic ovarian syndrome. *Aust N Z J Obstet Gynecol* 2001;41:202-6.
51. Carmina E, Kayama T, Chang L, Stanczyk FZ, Labo RA. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1807-12.
52. Bjorntorp P. The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease. *Acta Med Scand Suppl* 1988;723:121-34.
53. Palson DW, Adams J, Wadsworth J, Franks S. Polycystic ovaries-a common finding in normal women. *Lancet* 1988;1:870-2.
54. Rosenfield RL, Cooke, D.W., Radovick, S. Puberty and its disorders in the female. In: Sperling MA(ed). *Pediatric Endocrinology 3<sup>rd</sup> ed*-Philadelphia, Saunders Elsevier, 2008:530-609.
55. Khan U. Polycystic ovary syndrome in adolescents *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2007;20:101-4.
56. Yildiz BO, Gedik o. Assessment of glucose intolerance and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2004;8:649-56.
57. Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, Bayraktar M. Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2031-6.

58. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol(Oxf)* 2004;60:1-17.
59. Legro RS. Polycystic ovary syndrome and cardiovascular disease a premature association? *Endocr Rev* 2003;24:302-12.
60. Kelly CJ, Lyall H, Petrie JR, et. Al. A specific elevation in tissue plasminogen activator antigen in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3287-90.
61. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, et al. Is plaminogen activator inhibito-1 a cardiovascular risk factor in young women with polycystic ovary syndrome? *Reprod Biomed Online* 2004;9:505-10.
62. Daniilidis A, Dinas K. Long term health consequences of polycystic ovarian syndrome: a review analysis. *Hippokratia*, 2009;13(2):90-2.
63. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit. W, et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010;95(5):2038-49. Doi: 10.1210/jc.2009-2724.
64. Atioma WU, El-Mahdi E, Hardiman P. Familial associations in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2003;80(1):143-145. Doi: 10.1016/s0015-0282(03)00502-8.
65. Navaratnarajah R, Pillay OC. Hardiman P. Polycysticovary syndrome and endometrial cancer. *SeminReprod Med*, 2008;26(1):62-71. Doi: 10.1055/s-2007-992-926.
66. Jakimiuk AJ, Issa T. PCOS and cancer risk. *Falia Histochem Cytobiol*, 2009;47(5): s 101-5. Doi:10.2478/v10042-009-0092-1.
67. Barry JA, Azizia MM, Hardimen PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review anda meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2014;20(5):748-58. Doi: 10.1093/humupd/dmuor.
68. Yildiz BO. Recent advances in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13: 1295-305.

69. Gomel V. Polikistik Over Sendromu (Çeviri Demirtaş E, Yaralı H). Attar E, Ata B(Editörler). Gomel'in Jinekolojisi Nobel Tıp Kitabevleri 2007.s.293-304.
70. McFarland C. Treating polycystic ovary syndrome and infertility MCN AM J Matern Child Nurs, 2012; 37(2): 116-21. Doi: 10.1097/NMC.0b013e31824239ce.
71. Yildiz BO, Chang W, Azziz R. Polycystic ovary syndrome and ovulation induction. Minerva Ginecol 2003;55:425-39.
72. Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin,rasiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inosital) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. Cochrane database Syst Rev, 2012; 5(5): CD003053. Doi:10.1002/14651858.CD003053.pubs.
73. Mall E, van der Veen F, van Welly M. The role of metformin in polycystic ovary syndrome: a systematic review. Hum Reprod Update, 2007;13(6) 527-37. Doi: 10.1093/humupd/dmm026.
74. Yarali H, Yildiz BO, Demiral A, et al. Co-administration of metformin during rFSH treatment in patients with clomiphene citrate-resistant polycystic ovarian syndrome: a prospective randomized trial. Hum Reprod 2002;17:289-94.
75. Costella MF, Misso ML, Wang J, Hart R, Rombauts L, Melder A, et al. The treatment of infertility in polycystic ovary syndrome: a brief update. Aust N Z J Obstet Gynecol, 2012;52(4):400-3. Doi: 10.1111/j. 1479-828x.2012. 01448x
76. Pabuçcu R, Pabuçcu EG. İntrauterin inseminasyon ve in vitro fertilizasyonda ovulasyon indüksiyonu yöntemleri. Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics 2013;6(1):22-41.
77. Albuquerque LE, Tso LO, Saconato H, Albuquerque MC, Maceda CR. Depot versus Daily administration of gonadotropin-releasing hormone agonist protocols for pituitary down regulation in assisted reproduction cycles. Cochrane Database Syst Rev 2013;31;(1): CD002808.
78. Shresta D, La X, Feng HL. Comparison of different stimulation protocols used in vitro fertilization: a review. Ann Transi Med 2015;3(10):137.
79. Griesinger G, Kolibianakis EM, Venetis C, Diedrich K, Tarlatzis B. Oral contraceptive pretreatment significantly reduces angoing pregnancy likelihood

- in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an updated meta-analysis. *Fertil Steril* 2010;94(6):2382-4.
80. Smulders B, Van Oirschat SM, Farquhar C, Rombauts L, Kremer JA. Oral contraceptive pill, progestogen or estrogen pre-treatment for ovarian stimulation protocols for women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;20;(1):CD006109.
81. Sallam HN, Garcia-Velasco JA, Dias S, Arici A. Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization(IVF) for women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;25;(1):CD004635.
82. Ron-El R, Raziel A, Schachter M, Strassburger D, Kasterstein E, Friedler S. Induction of ovulation after GnRH antagonists. *Hum Reprod Update*. 2000;6:318-321.
83. Chabbert-Buffet N, Olivennes F, Bouchard P. GnRH antagonists *Clin Obstet Gynecol*. 2003;46(2):254-264.
84. Tarlatzis BC, Bili HN Gonadotropin-releasing hormone antagonists: impact of IVF practice and potential non-assisted reproductive technology applications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003;15:259-264.
85. Al-Inany H, Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI. Optimizing GnRH antagonists administration: meta-analysis of fixed versus flexible protocol. *Reprod Biomed Online* 2005;10(5):567-70.
86. Kaliblanakis EM, Venetis CA, Kalageropoulou L, Papanikolaou E, Tarlatzis BC. Fixed versus flexible gonadotropin-releasing hormone antagonist administration in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2011;95(2):558-62.
87. Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, Broekmans FJ. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;4:CD001750.
88. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;11;(5):CD001750.

89. Xiao JS, Su CM, Zeng XT. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in supposed normal ovarian responders undergoing IVF: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(9):e106854.
90. Youssef MA, Abau-Setta AM, Lam WS. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotropin for final oocyte maturation triggering in IVF and ICSI cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;23(4):CD003719.
91. Ron-EL R, Lazrel A, Schachter M, et al. Induction of ovulation after GnRH antagonists. *Human Reproduction Update* 2000;6(4):318-321.
92. European Recombinant LH Study Group. Human recombinant luteinizing hormone is as effective as, but safer than, urinary human chorionic gonadotropin in inducing final follicular maturation and ovulation in in vitro fertilization procedures: results of a multicenter double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2607.
93. Youssef MA, Van der Veen F, Al-Inany HG, Machtar MH, Griesinger G, Nagi Mohesen M, Aboufoutouh I, Van Wely M. Gonadotropin-releasing hormone agonist versus hCG for oocyte triggering in antagonist-assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;31(10):CD008046.
94. Lin MH, Wu FS, Lee RK, Li SH, Lin SY, Hwu YM. Dual trigger with combination of gonadotropin-releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin significantly improves the live-birth rate for normal responders in GnRH-antagonist cycles. *Fertil Steril* 2013;100(5):1296-302.
95. Ditkoff EC, Plumb J, Selick A, Save MV. Anesthesia practices in the United States common to in vitro fertilization(IVF) centers. *J Assist Reprod Gene.* 1997;14:145-7.
96. Hammarberg K, Enk K, Nilsson L, Wiklund M. Oocyte retrieval under the guidance of a vaginal transducer: evaluation of patient acceptance. *Hum Reprod.* 1987;2:487-90.
97. Tsai YC, Lin MY, Chen SH, Chung MT, Loo TC, Huang KF, Lin LY. Vaginal disinfection with povidone iodine immediately before oocyte retrieval is effective in preventing pelvic abscess formation without compromising the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet.* 2005;22:173-5.

98. Cohen J, Avery S, Campbell S, Mason BA, Riddle A, Sharma V. Follicular Aspiration using a syringe suction system may damage zona pellucida. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986;4:224-6.
99. Biljan MM, Dean N, Hemmings R, Bissanette F, Tan SL. Prospective randomized trial of the effect of two flushing media on oocyte collection and fertilization rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997;68:1132-4.
100. Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Feger B, Plumerec, Gerlinger P. Transvaginal sonographically controlled follicle puncture for oocyte retrieval. *Fertil Steril* 1985;44:656-62.
101. Edwards RG, Steptoe PC. Current status of in vitro fertilization and implantation of human embryos. *Lancet* 1983;2:1265-9.
102. Gleicher M, Friberg J, Fullan N, et al. Egg retrieval for in vitro fertilization by sonographically controlled culdocentesis. *Lancet* 1983;2:508-9.
103. Bennett SJ, Waterstone JJ, Cheng WC, Parsons J. Complications of transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration: a review of 2670 consecutive procedures. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:72.
104. Devroey P, Polyzos NP, Blackeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. *Hum Reprod* 2011;26:2593-7.
105. Fu CF, Lee TH, Chen CD, et al. Unexpected Pregnancy and Ovarian Hyperstimulation Syndrome Following IVF Cycle with All Embryos Frozen: A Case Report. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2005;44(1):83-6.
106. Rutkowski A, Dubinsky I. Ovarian Hyperstimulation Syndrome Imperatives For The Emergency Physician. *The Journal of Emergency Medicine* 1999; 17(4):669-72.
107. Davis M, Kennedy R. Ovarian Hyperstimulation Syndrome: Aetiology, Prevention and Management. *Reviews in Gynecological and Perinatal Practice* 2006;6(1-2):26-32.
108. Oztekin O, Soylu F, Tatli O. Spontaneous Ovarian Hyperstimulation Syndrome. In: A Normal Singleton Pregnancy. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2006;45(3):272-5.

109. Akbay E, Uzunçakmak C, İdil NS, et al. Recurrent Spontaneous Ovarian Hyperstimulation Syndrome with Hypothyroidism: A Case Report. *Bakırköy Tıp Dergisi* 2010;6(19):42-5.
110. Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 2001;16:221-5.
111. Kodaman PH, Taylor HS. Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004;31:745-66.
112. Pena JE, Chang PL, Thornton MH, 2nd, Sauer MV. Serum estradiol levels after 4 days of ovarian hyperstimulation in oocyte donors are predictive of embryo quality and clinical outcomes. *Gynecol Obstet Invest* 2002;54:207-12.
113. Aramwit P, Pruksananonda K, Kasettrat N, Jammeecha K. Risk factors for ovarian hyperstimulation syndrome in Thai patients using gonadotropins for in vitro fertilization. *Am J Health Syst Pharm* 2008;65:1148-53.
114. Delvigne A. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. *Epidemiology of OHSS. Reprod Biomed Online* 2009;19:8-13.
115. Lee TH, Liu CH, Huang CC, Wu YL, Shih YT, Ho HN et al. Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod* 2008;23:160-7.
116. Braer SL, Dolleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Braekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46-54.
117. Teamoto S, Kato O. Minimal ovarian stimulation with clomiphene citrate: a large-scale retrospective study. *Reprod Biomed Online* 2007;15:134-48.
118. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J et al. GnRH antagonists are safer than agonists: an update of a Cochrane review. *Hum Reprod Update* 2011;17:435.
119. Palomba S, Falbo A, Carrillo L, Villani MT, Orio F, Russa T et al. Metformin reduces risk of ovarian hyperstimulation syndrome in patients with polycystic ovary syndrome during gonadotropin-stimulated in vitro fertilization cycles: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril* 2011;96:1384-90e4.



120. De Mouzan J, Gaossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V e al. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012.
121. D'Angela A, Brown J, Amso NN. Coasting (with holding gonadotropins) for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2011: CD002811.
122. Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:1137-40.
123. Dozartzev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Quian C, Dhont M. Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection; the role of the sperm cell. *Hum Reprod* 1995;10: 403-7.
124. Fisherl S, Lisi F, Rinoldi L, et al. Systematic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection n the human. *Hum Reprod* 1995;10:497-500.
125. Gautier J, Minsbull J, Lokha M.(1990). Cyclin is a component of maturation promoting factor from *Xenopus*. *Cell*, 60.487.
126. Tesarik J, Greco E.(1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*, 14:1318.
127. Scott L. Pronuclear coring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online* 2003;6:201-14.
128. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fartini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 2003;80:341-9.
129. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Motheves CD.(1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formaton in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*, 12:532.
130. Hesters L, Prisant N, Fanchin R, Mendez Lazano DH, Feyereisen E, Frydman R, Tachdjian G, Frydman N. Impact of early cleaved zygote morphology on

- embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril* 2008;89:1677-84.
131. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997;12:1531-15-36.
  132. Sakkas D, Pervical G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;6:1150-1156.
  133. Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod.* 2003;18:821-825.
  134. Herbert M, Walstenholme J, Murdoch AP, Butler TJ. Mitotic activity during preimplantation development of human embryos. *J Reprod Fertil* 1995;103:209-14.
  135. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270-83.
  136. Staessen C, Camus M, Khan I, Smitz J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC. An 18-month survey of infertility treatment by in vitro fertilization, gamete and zygote fallopian transfer, and replacement of frozen hawed embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1989,6(1):22-29.
  137. Textbok of Assisted Reproductive Techniques-Laboratory and Clinical Perspectives. Gardner DK, Weissman A, Hawles CM, Shoham Z, Eds., 2<sup>n</sup> ed., Martin Dunitz, 2002.
  138. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and tranfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999,11(3):307-311.
  139. Garner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocysts transfer. *Fertil Steril.* 2000,73(6):1155-1158.
  140. Langley MT, Marek DM. Gardner DK, Doody KM, Doody KJ. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Hum Reprod* 2001;16:902-8.

141. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocysts stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7: CD002118.
142. Lobo R. Current Concepts: Potential Options for Preservation of Fertility in Women. *N Engl J Med* 2005;353:64-73.
143. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P.(1972). Survival of Mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science*, 178:411.
144. Trounson A, M.L., Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. In *Nature*. 1983. p.707-709.
145. Zeilmaker GH, A.A. Van Gent I et al., Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos, in *Fertil. Steril*. 1984. p.293-296.
146. Whittingham DG, L.S., Mazur P., Survival of Mouse embryos frozen to -196 degrees and -296 degrees C., in *Science*. 1972. p.411-414.
147. Kuleshova L, G.L., Magli C et al., Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report, in *Hum. Reprod*. 1999. p.3077-3079.
148. Van der Elst J, Camus M, Van den Abbeel E, et al.(1995). Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2 propanediol protocols. *Fertil Steril*, 63:92.
149. Veeck, L.L., Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? *Reprod Biomed Online*, 2003.6(3): p.367-74.
150. Damario, M.A., et al., Embryo cryopreservation at the pronuclear stage and efficient embryo use optimizes the chance for a liveborn infant from a single oocyte retrieval . *Fertil Steril*, 2000.73(4):p.767-73.
151. Dowling-Lacy, D., et al., Live birth from a frozen-thawed pronuclear stage embryo almost 20 years after its cryopreservation. *Fertil Steril*, 2011.95(3):p.1120 e1-3.
152. Kuwayama, M., et al., Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005. 11(5): p.608-14.
153. Chi, H.J., et al., Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Hum Reprod*, 2002.17(8): p.2146-51.

154. Rama Raju, G.A., et al., Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online*, 2005.11(4):p.434-7.
155. Rezazadeh Valojerdi, M., et al., Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet*, 2009.26(6):p.347-54.
156. Wilding, M.G., et al., Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet*, 2010.27(9-10):p.549-54.
157. Desai, N., et al., Clinical pregnancy and live births after transfer of embryos vitrified on day 3. *Reprod Biomed Online*, 2010.20(6):p.808-13.
158. Menezo, Y., et al., Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril*, 1992.58(5):p.977-80.
159. Yakota Y., et al., Successful pregnancy following blastocyst vitrification: case report. *Hum Reprod*, 2000.15(8): p.1802-3.
160. Liebermann, J., et al., Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online*, 2003.7(6):p.623-33.
161. Chai, D.H., et al., Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program. *Fertil Steril*, 2000.74(4):p.838-9.
162. Mukaida T., et al., Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril*, 2001.76(3):p.618-20.
163. Vanderzwalmen, P., et al., Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod*, 2003.18(7): p.1504-11.
164. Takahashi, K., et al., Perinatal outcome of blastocysts transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril*, 2005.84(1):p.88-92.
165. Lin, T.K., et al., Cryotop vitrification as compared to conventional slow freezing for human embryos at the cleavage stage: survival and outcomes. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2010.49(3): p.212-8.

166. Stehlik, E., et al., Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online*, 2005.11(1): p.53-7.
167. Huang, C.C., et al., Successful pregnancy following blastocysts cryopreservation using supercooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod*, 2005.20(19): p.122-8.
168. Liebermann J. and M.J. Tucker, Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril*, 2006.86(1):p.20-6.
169. Gardner D, Balaban B. Choosing between day 3 and day 5 embryo transfers. *Clin Obstetrics Gynecol* 2006;49(1):85-92.
170. Balaban B, Urman B. Embryo culture as a diagnostic tool. *Reprod Biomed Online* 2003;7:671-82.
171. Balaba B, Urman B, Alatos C, Mercan R, Aksoy S, Isiklar A. Blastocysts-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril* 2001;75:514-8.
172. Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, et al. (2003). Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *R&M Online*, 6:323.
173. Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. (2005). Cleavage stage versus blastocysts stage transfer in assisted conception(Cochrane review). From the Cochrane Library, Issue 2, Chichester, UK.
174. Milki AA, Hunckley MD, Behr B.(002). Comparison of blastocysts transfer to day 3 transfer with assisted hatching in older patient. *Fertil Steril*, 78(6):1244.
175. Lewin A, Schenker JG, Avrech O, Shapira S, Safran A, Friedler S. The role of uterine straightening by possible bladder distension before embryo transfer in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:32-4.
176. Coroleu B, Carreras O, Veiga A, Martell A, Martinez F, Belil I, Hereter L, Barri PN. Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000;15:616-20.

177. Mansour R, Aboulghar M, Serour G. Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990;54:678-81.
178. Egbase PE, al-Sharhan M, al-Othman S, al-Mutawa M, Uda EE, Grudzinskas JG. Incidence of microbial growth from the tip of the embryo transfer catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following in-vitro fertilization and embryo transfer *Hum Reprod* 11:1687-1996.
179. Fanchin R, Harmas A, Benqoudia F, Lundkvist U, Olivennes F, Frydman R. Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 70:866, 1998.
180. Sallam HN. Embryo transfer: factors involved in optimizing the success. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17(3):289-98. Review.
181. Oorusso F, Depalo R, Bettocchi S, Vacca M, Vimercati A, Selvaggi L. Outcome of in vitro fertilization after transabdominal ultrasound-assisted embryo transfer with a full or empty bladder. *Fertil Steril* 2005;84:1046-8.
182. Li B, Zhou H, Li W. Bed rest after embryo transfer *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;5. [Epub ahead of print].
183. Balaban B, Urman B. Embryo culture as a diagnostic tool. *Reprod Biomed Online* 2003;7:671-82.
184. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Isiklar A. Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril* 2001;75:514-8.
185. Gardner DK, Lane M et al. (2000) blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 73:1155-58
186. Sutcliffe AG, Ludwig M. Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 2007;370 (9584):351-9.
187. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmas F, Sterrenburg M, Smit J, et al. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(5):CD001750.

188. Al-Azemi M, Kyrov D, Kolibianakis EM, Humaidon P, van Vaerenbergh I, Devroey P, et al. Elevated progesterone during ovarian stimulation for IVF. *Reprod Biomed Online* 212;24:381-8.
189. Healy MW, Patounakis G, Connell MT, Devine K, De Cherney AH, Levy MJ, Hill MJ. Does a frozen embryo transfer ameliorate the effect of elevated progesterone seen in fresh transfer cycles? *Fertil Steril* 2016;105(1):93-9.e1.
190. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi MG, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stage compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2002;17:1852-5.
191. Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 2000;15:1947-52.
192. Gardner D, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft B. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004;81:551-5.
193. Schwarzler P, Zech H, Auer M, Pfau K, Gobel G, Vanderzwalmen P, Zech N. Pregnancy outcome after blastocyst transfer as compared to early cleavage stage embryo transfer. *Hum Reprod* 2004;19:2097-102.
194. Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review) *Cochrane Database of Syst Rev.* 2012 [PubMed]
195. Lunenfeld B, Insler V. Classification of amenorrhoeic states and their treatment by ovulation induction. *Clin Endocrinol* 1974;3:223-37.
196. Schenker JG, Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: A current survey. *Fertil Steril* 1978;30:255.
197. Papanikolaou E, Kolibianakis E, Tournaye H, Venetis C, Fraternali H, Talatzis B, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008;23:91-9. Doi: 10.1093/humrep/dem339.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevda ALP

Doğum Yeri- Yılı: İstanbul – 18.10.1991

Eğitim Durumu:

2010-2014 : Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-  
Zonguldak. Lisans

2015-2017 : Maltepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji-  
İstanbul. Yüksek Lisans

Çalıştığı Kurum ve Kuruluşlar:

10/11/2014 - 08/07/2017 : Bahçelievler Medicana Hastanesi Tüp Bebek Merkezi,  
Biyolog.

10/07/2017 - Halen : Altunizade Acıbadem Hastanesi Tüp Bebek Merkezi,  
Biyolog.