



T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ UYGULAMALARINDA TÜM
EMBRİYOLARIN DONDURULARAK TRANSFERİNİN ÖTELENMESİ
YAKLAŞIMININ KLİNİK SONUÇLAR BAKIMINDAN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra DEMİRARSLAN ÜKER

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Hüsniye Doğruman

Prof. Dr. Engin Oral

İSTANBUL

Ağustos 2017

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/08/2017

Prof. Dr. Hüsniye DOĞRUMAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Engin ORAL

İstanbul Üniversitesi

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Üye

Doç. Dr.Cenk KIĞ

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Üye

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BÜŞRA DEMİRARSLAN ÜKER

İTHAF

Sevgili eşim Muhammed ÜKER'e ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini paylaşan, değerli danışmanım sayın Prof. Dr.ENGİN ORAL ve HÜSNİYE DOĞRUMAN'a

Yüksek lisans eğitimimde, işe başladığım günden beri bana yardımcı olan ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli klinik başkanımız Prof. Dr. MUSTAFA BAHÇECİ 'ye;

Yüksek lisans tezimi yazarken bana destek olan değerli direktörümüz Dr. NECATİ FINDIKLI'ya laboratuvar sorumlumuz TURAN AKSOY'a, Tez yazımdaki istatistik değerlendirmelerinde ve bununla birlikte ihtiyacım olan her aşamada bana yardımcı olan kıymetli MERAL GÜLTOMRUK 'a, tezimin yazımı için desteklerini esirgemeyen sevgili MÜNEVVER ÇOBAN'a , tez yazımda kullandığım şekilleri sağlayan değerli çalışma arkadaşım ASUMAN İŞLER GÜLEL'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince, bıkmadan gösterdiği bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Klinik Embriyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. TÜLAY İREZ'e;

Eğitimime başladığım ilk günden beri bana her konuda yardımcı olan ve manevi gücü bana hissettiren çok kıymetli annem HASİBE DEMİRARSLAN'a, babam ABDULLAH DEMİRARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana destek olan ablam VİLDAN ŞENTÜRK'e ve kardeşlerim ASLIHAN DEMİRARSLAN, ZEYNEP DEMİRARSLAN'a, sabrı ve bana olan güveni için sevgili eşim MUHAMMED ÜKER'e sonsuz kez teşekkür ederim.

Bu çalışma BAHÇECİ SAĞLIK GRUBU tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
İTHAF	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar	viii
GRAFİKLER	ix
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite.....	3
2.1.1. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi:.....	4
2.1.2. Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi :.....	6
2.2. Yardımcı Üreme Teknikleri.....	9
2.2.1. IVF Laboratuvarlarında Güvenilir Kriyoprezervasyon Tekniklerinin Gerekliliği.....	12
2.2.2. Vitrifikasyon Metodu.....	12
2.2.3. Blastosist ve Bölünme Aşaması Vitrifikasyonu.....	14
2.2.4. Çözündükten Sonra Kuluçka Süresinin Etkisi.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	16
3.2. Ovulasyon İndüksiyon Protokolleri ve Yumurta Toplama İşlemi.....	17
3.3. Kullanılan Cihaz, Solüsyon ve Malzemeler.....	18
3.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	18
3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar.....	19
3.3.3. Kullanılan Malzemeler.....	19
3.4. ICSI Teknikleri ile İnseminasyon Uygulaması.....	20
3.4.1. Hazırlık İşlemleri.....	20
3.4.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU).....	22
3.4.3. İnseminasyon İçin Sperm Örneğinin Hazırlanması.....	24

3.4.4.	Inseminasyon Öncesi Hayluronidaz Enzim Uygulaması.....	25
3.4.5.	ICSI Uygulaması.....	26
3.4.6.	Fertilizasyon Kontrolü, Embriyo Takibi ve Taze Transfer.....	26
3.4.7.	Embriyoların Değerlendirilmesi	27
3.4.7.1.	Döllenme Sonrası 42-46 (İdeal 44) Saat Ve 66-68 Saat:.....	27
3.4.7.2.	Döllenme Sonrası 112-116 Ve 136-138 Saat:.....	27
3.4.7.3.	“3-6” Arası Olarak Değerlendirilen Blastosistlerin İcm ve Trofoektoderm Sınıflandırması:.....	28
3.4.7.4.	“3.Gün” Embriyolarının Seçilmesi	28
3.4.7.5.	“3.Gün” Embriyolarının Dondurulması.....	28
3.4.7.6.	“3.Gün” Embriyolarının Çözülmesi ve 5. Güne Kadar Takip Edilmesi	29
3.4.8.	Uygulama aşamaları:.....	32
4.	İSTATİSTİK	35
5.	BULGULAR	36
6.	TARTIŞMA	42
7.	SONUÇ	44
8.	KAYNAKLAR	45

ŞEKİLLER

Şekil 1 Zeiss Marka Manipulator Görsele	18
Şekil 2 Zeiss Marka Mikroskop Görsele	18
Şekil 3 Azot Tankı Görsele	19
Şekil 4. OPU Uygulaması İçin Hazırlanan 3 Damlacıklı Kültür Kabı Görsele	20
Şekil 5. Hyaluronidaz Uygulaması İçin Hazırlanan 4 Damlacıklı Kültür Kabı Görsele	21
Şekil 6. ICSI Sonrası Oositlerin Büyütüldüğü Standart Kültür Kabı Görsele ..	21
Şekil 7. ICSI İçin Kullanılan Kültür Kabının Hazırlanması	22
Şekil 8. OPU İşleminde Kullanılan Cihazların Görsele	23
Şekil 9. OPU İşlemi Sırasında Elde Edilen KOK Görüntüleri (10X).....	24
Şekil 10. Hyaluronidaz Uygulaması İçin Kullanılan Kültür Kabı Görsele	26
Şekil 11. Gelişmekte Olan Bir İnsan Embriyosuna Ait Görüntüler	31
Şekil 12. Sıvı Nitrojen İle Dolu Rezervuar Görsele	32
Şekil 13. Taşıma Çubuğu Görsele	33
Şekil 14. Lazer İşlemi Sonrası Kapanmış Embriyo Görsele	33
Şekil 15. Solüsyon İçerikli Petri Kabı Görsele.....	34
Şekil 16. Dondurma İşlemi Tamamlanmış Embriyoların Taşıma Çubuğuna Yüklenmesinden Azot Dolu Tanka Yerleştirilmesi Aşamalarının Görseleleri.....	35

TABLolar

Tablo 1. Çalışmada kullanılan solüsyonlar	19
Tablo 2. Çalışmada kullanılan atılabilir malzemeler.....	20
Tablo 3. Sperm hazırlığı amaçlı gradyen solüsyonların hazırlanışı	24
Tablo 4. Çalışmaya Ait Genel Tanımlayıcı Özellikler.....	36
Tablo 5. Siklus ve Embriyolojik Özellikler.....	38
Tablo 6. FET ve FRESH-ET Transfer Sonuçları Tablosu	39
Tablo 7. Anne Yaşının 37 Yaş Kriteri Baz Alınarak Verilerin Değerlendirilmesi.....	40

GRAFİKLER

Grafik 1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Yaş Aralıkları.....	37
Grafik 2. İnfertilite Nedenleri	38
Grafik 3. FET ve FRESH-ET Transfer Sonuçları Grafiği	39
Grafik 4. Anne Yaşının 37 Yaş Kriteri Baz Alınarak Verilerin Değerlendirilmesi Grafiği	41



SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbondioksit
COS	Kontrollü Overyan Stimülasyon
DET	Dondurulmuş Embriyo Transferi
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagles mediumu
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPBS	Dulbecco'nun fosfat tamponlu salin solüsyonu
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EG	Etilen glikol
FET	Frozen Embriyo Transfer
g	Gravite (Santrifüj dönüş hızı)
ICSI	Intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	In vitro fertilizasyon
KOK	Kümüls oosit kompleksleri
LAF	Laminar Air Flow
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mol/l	Mol/litre

nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
OPU	Oosit (Yumurta) Toplama İşlemi
PVP	Polivinilpirolidon
YÜT	Yardımla Üreme Teknikleri
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre

ÖZET

Embriyo dondurma işlemi, yardımcı üreme teknolojisinde (YÜT) bir devrimdir. Dondurulmuş embriyoların transferi YÜT'ün iyi bilinen bir parçası olarak son dönemlerde artarak kullanılmaktadır. Dondurulmuş embriyo transferi (DET) taze siklusa oranla birçok avantaja sahiptir, bunların arasında; benzerlik, yüksek gebelik olasılığı ve canlı doğum oranına sahip olması en önemlileridir. Buna ek olarak, bazı randomize çalışmalarda ve meta-analizlerde DET sonrası gebelik oranının taze siklusa kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir [15]. DET 'nin diğer yararı ise doğal, uyarılmamış bir döngüde embriyo transferi ihtimalidir. Suni bir siklüsün, implantasyon başarısızlığına yol açan endometrial reseptiviteyi (ER) olumsuz etkileyebileceği gösterilmiştir. [16-17].

DET, ovaryum stimülasyonuna iyi yanıt veren kadınlarda, seçmeli tek embriyo transferini artıran, çoklu gebeliklerden ve aynı zamanda yumurtalık hiperstimülasyon sendromundan kaçınarak ekstra kaliteli embriyoların korunması için yararlı bir yöntemdir. Dondurma tekniğinin iyileştirilmesinden bağımsız olarak, güvenli yönleri ve doğan çocukların sağlığı üzerindeki etkisi belirsizdir [50].

Bu çalışmaya; hasta ve stimülasyon özelliklerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları olmayan 337 DET, 236 TAZE olmak üzere toplamda 573 siklus dahil edildi.

DET siklus grubunun gebelik oranı, klinik gebelik oranı, devam eden gebelik oranı, TAZE siklus grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti. ($p=0,010$ $p=0,014$ $p=0,037$). Grupların abortus oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (0,957).

37 yaş ve üstü hastalarda DET siklus grubunun gebelik oranı, klinik gebelik oranı, devam eden gebelik oranı TAZE siklus grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p=0,013$ $p=0,017$ $p=0,007$). Grupların abortus oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (0,957). 37 yaş altı hastalarda gruplarda gebelik özelliklerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

ABSTRACT

Introduction of embryo cryopreservation was a revolution in assisted reproductive technology (ART). Transfer of frozen embryos has been increasingly used during the past few decades, as it is a well-known part of ART. Compare to fresh cycles, frozen embryo transfer (FET) has several advantages, among them; the similarity, possibility of higher pregnancy and live birth rate are of great importance. In addition, higher pregnancy rate after FET compared to fresh cycles was reported in some randomized trials and meta-analysis [15]. The other benefit of FET is possibility of embryo transfer in a natural, non-stimulated cycle. It is shown that an artificial cycle may adversely affect endometrial receptivity leading to implantation failure [16-17].

FET also is a useful method for preserving extra good quality embryos in women with good response to ovarian stimulation, increasing elective single embryo transfer and avoiding multi-gestations as well as ovarian hyperstimulation syndrome. Regardless of cryopreservation technique improvements, safety aspects and its impact on the health of children born are uncertain [50].

This study included 573 cycles totaling 337 FET, 236 FRESH without statistically significant differences in patient and stimulation characteristics.

The pregnancy rate, the clinical pregnancy rate and the ongoing pregnancy rate of the FET cycle group were statistically higher than the FRESH Cycle group ($p = 0,010$ $p = 0,014$ $p = 0,037$). There was no statistically significant difference in abortus rates of the groups ($p = 0.957$).

The pregnancy rate, the clinical pregnancy rate and the ongoing pregnancy rate of the FET cycle group of the patients aged 37 years and over were statistically higher than that of the FRESH group ($p = 0,013$ $p = 0,017$ $p = 0,007$). There was no statistically significant difference in abortus rates of the groups ($p = 0.957$). There was no statistically significant difference in the characteristics of pregnancy among the groups under the age of 37.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmplantasyon, yardımcı üreme tekniklerinin başarısı için önemli adımlardan birini temsil eder [37].

Etkililiği üç ana parametreye dayanır:

- Embriyo kalitesi,
- Endometriyal alıcılık (ER)
- Dengeli bir embriyo-endometriyum etkileşimi [38].

Dolayısıyla ER, doğal ve kısırlık tedavi döngülerinde tedavi yöntemi için gereklidir. Bununla birlikte, kontrollü ovaryum hiperstimülasyonunun (COH) YÜT siklusları boyunca ER'yi olumsuz etkilediği öne sürülmüştür [39-40]. Bu etkileşim, folliküler faz boyunca estradiol (E2) ve progesteronun (P) suprafizyolojik düzeyleri tarafından yönlendirilir ve bu da morfolojik ve biyokimyasal endometrium değişikliklerine ve doğal çevrimlerden daha gelişmiş bir endometriuma yol açar. Sonuçta, bu fizyolojik değişiklikler tedavilerin başarı oranlarını etkileyebilir. Bu değiştirilmiş hormon seviyeleri, endometriyum ve aktarılan embriyoların implantasyon başarısızlığından sorumlu bir endometrial çevreye yol açtığını göstermiştir.

YÜT'de, en yüksek gebelik oranları taze oosit bağış döngülerinde elde edilir. Bu döngülerde, endometriyum yapay olarak astarlanarak embriyolar aktarılır.

COH sırasında ortaya çıkan suprafizyolojik hormonal düzeylerin etkilerini yaşamamış bir ortama dönüştürür [42]. Oositler aynı kalitede olmasına rağmen, paylaşılan oosit döngüleri ile ilgili bazı çalışmalar oosit donörlerine kıyasla alıcılarda gebelik oranlarını belirgin olarak daha yüksek bulmuştur ve bu, üstün ER kalitesi ile ilişkili olabilir [41, 42].

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) uygulamaları son yıllarda oldukça önemli gelişim aşamaları kaydetmesine karşın tedavi seçeneklerinde başarı halen büyük oranda dışarıdan hormon alımı sonrası çoklu folikül gelişimi ve oluşturulmuş embriyolar içerisinde en iyisinin seçimi ve uygun şartlarda olduğu düşünülen uterus ortamına nakli sürecine dayanmaktadır. Gebelik oluşturma potansiyeli en yüksek

embriyonun üretilmesi ve seçilebilmesi için gerekli olan çoklu folikül gelişimi amaçlı alınan yüksek doz hormonların aynı tedavi sürecinde uterus iç tabakası (endometriyum) gen ifadesini (gen ekspresyonu) ve embriyoyu kabul etme potansiyelini (reseptivite) olumsuz etkiler yaptığı son yıllarda gerçekleştirilmiş çalışmalarda gösterilmiştir. YÜT uygulamalarında gelişmekte olan embriyoların belirli bir aşamada dondurulması ve belirli bir süre uterusun dinlendirilmesi sonrası çözülerek uterusu nakli, özellikle son birkaç yıldır bu problemlerin çözümü için oldukça ümit verici bir yaklaşım olarak bazı gruplar tarafından önerilmektedir. Fakat bu yaklaşımın etkinliği konusunda halen yeterli çalışma ve bilimsel literatür mevcut değildir.

Çalışmamız içerdiği süre ve yüksek sayıda siklusun çalışma kapsamına alınması bakımından dünya literatürüne olası katkısı sebebiyle oldukça önemlidir. Ayrıca elde edilecek sonuçların, öncelikle tüm embriyoların dondurularak uterusun dinlendirildiği ve endometriyum reseptivitesinin doğala daha yakın olduğu bir ortamda embriyo naklinin yapıldığı tedavi yaklaşımının klinik sonuçlar bakımından olumlu ve olumsuz yönlerinin belirlenmesi ile ileriki çalışmalara önemli bir kaynak oluşturması ve yeni YÜT tedavi yaklaşımlarının da önünü açması hedeflenmiştir.

Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmamızın amacı; yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında gelişmekte olan tüm embriyoların dondurularak transferinin ötelenmesi yaklaşımının blastosist transferi planlanmış hastalarda klinik sonuçlar bakımından incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.İnfertilite

İnfertilite, reproduktif çağda olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye girmesine rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır [20]. İnfertilite reproduktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk 6 ay içinde, geri kalanların ancak %10'u takip eden 6 ay içinde gebe kalabilmektedir [21,22]. Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilir. %20-25 çiftte hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenir. %15 çiftte ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamaz (açıklanamayan infertilite) [23]. Fertilite oranları 20-25 yaş arasında maksimuma ulaşır. 30-32 yaş- lar arasında rölatif bir azalma görülür ve 40 yaş sonrasında hızlı bir düşüşe geçer. Toplam fertilite oranları 25-29 yaşta %4-8 azalırken bu oran 30-34 yaş arasında %15-19, 35-39 yaşta %26-46 ve 40-45 yaşta %95 şeklinde azalma gösterir [24]. Çiftlerin %85'i ilk bir yıl içinde gebe kalabildikleri için bu süre zarfında detaylı bir inceleme yapmak yalancı pozitif test sonuç- larının ve yararsız tedavi uygulamalarının artmasına yol açacağı ve spontan gebelik şansını kayırabileceği için gereksizdir [25].

Bu süreyi beklemeksizin araştırılmaya başlanacak çiftler şu kriterler ile sınırlandırılmıştır.

- 1) 35 yaş üstü kadınlar.
- 2) Oligo/amenoreik kadınlar.
- 3) Bilinen ya da şüphelenilen uterin, tubal hastalığı ya da endometriozisi olan kadınlar.
- 4) Abdominal ve pelvik cerrahi geçiren kadınlar.
- 5) Bilinen ya da şüphelenilen semen anormalliği mevcut olan erkekler.
- 6) Geçirilmiş ürogenital cerrahi öyküsü, genital patolojik bulgusu olan erkekler.
- 7) Cinsel yolla bulaşan hastalık geçirmiş olan erkekler [26].

2.1.1. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi:

İnfertil bir erkek değerlendirilirken ilk yapılacak işlem 4-6 hafta ara ile en az 2 kez semen analizidir. Semen örneği 3-6 günlük cinsel perhiz sonrası alınmalı ve en geç 1 saat içinde değerlendirilmelidir. 2010 WHO (World Health Organization) Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen kitabında referans değerler aşağıdaki gibidir:

Semen analizi için en düşük referans değerler (5. persentil ve %95 güvenlik aralıkları)

Parametreler	En düşük referans değer
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (10 ⁶)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ / ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10 ⁶ per ml)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

Eğer değerler WHO kriterlerine göre normal gelmişse, tek test yeterli kabul edilmelidir. Sadece, en az iki testin de anormal bulunması durumunda, ileri androlojik araştırma gerekir. Ürolojik değerlendirmeye detaylı anamnez ve fizik muayene ile başlanır. Pretestiküler, testiküler ve posttestiküler infertilite nedenleri

araştırılmalı, gerektiğinde endokrinolojik, genetik, ultrasonografik tetkikler ve biyopsiye başvurulmalıdır. Böylece infertilitenin medikal ya da cerrahi tedavi ile düzeltilemeyeceği durumlarda IUI (İntrauterin inseminasyon) ya da yardımcı üreme teknikleri kullanılacak hastaların tanımlanması ve olası gebelikte çocukları etkileyecek genetik anormalliklerin belirlenmesi mümkün olacaktır. Oligozoospermi (<20 milyon spermatozoa/mL), astenozoospermi (<%50 motil spermatozoa) ve teratozoospermi (<%4 normal form) ayrımının yapılması önemlidir. Çoğu kez her üç patoloji de, OAT (oligo-asteno-teratozoospermi) sendromu şeklinde bir arada karşımıza çıkar. Azospermide (standart mikroskopik incelemede sperm yokluğu) olduğu gibi, şiddetli OAT sendromu durumunda da (<1 milyon spermatozoa/mL), erkek genital sisteminde tıkanıklık ve genetik bozukluk sıklıklarında bir artış vardır. Azospermi prevalansı %2 iken, infertil popülasyonda görülme sıklığı %10-20'tir.

Erkek infertilitesinin etyoloji ve dağılımı (%) [27]

Cinsel faktörler	1.7
Ürogenital enfeksiyonlar	6.6
Konjenital anomaliler	2.1
Varikosel	12.3
Endokrin bozukluklar	0.6
İmmünolojik faktörler	3.1
Diğer hastalıklar	3.0
İdiyopatik semen bozuklukları	75.1

(OAT) sendromu) veya gösterilebilir bir neden yokluğu

Erkek infertilitesini anatomik olarak 3 ana başlıkta toplamak mümkündür [28]:

1) Pretestiküler nedenler: Kromozomal (Klinefelter sendromu, Kallman sendromu, Y mikrolelesyonu, Kistik Fibroz), hormonal (hipogonadotropik hipogonadizm,

hiperprolaktinemi), koital (erektıl disfonksiyon, endokrin, nöral, ejakulatuar yetmezlik (psikoseksüel, ilaç, cerrahi) nedenler bu gruptandır.

2) Testiküler nedenler: Konjenital (inmemiş testis, immotil silia, vas deferens yokluğu), infeksiyon (orşitis), vasküler (torsiyon, varikosel), antispermatojenik ilaçlar (kemoterapi, x-ray), immünolojik, tümör (germ hücreli tümörler, testiküler mikrolithiazis), idiyopatik nedenler bu gruptandır.

3) Posttestiküler nedenler: Obstrüktif

(epididimal, vazal) ve aksesuar bez infeksiyonları bu guba dahildir.

2.1.2. Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi :

İnfertil bir çifte yaklaşımda, kadın faktörünün değerlendirilmesi tanı ve tedavide önemli bir unsurdur. İnfertilite nedeni her ne olursa olsun gebelik, kadının anatomi ve fizyolojisi ile yakından ilişkilidir.

Kadın infertilitesinin etyoloji ve dağılımı

- Ovulatuar disfonksiyon ~%40
- Tubal ve pelvik patolojiler ~%40
- Sık görülmeyen nedenler (uterin, servikal patolojiler) ~%10
- Açıklanamayan infertilite ~%10

İnfertil bir kadının değerlendirilmesine ayrıntılı anamnez ve fizik muayene ile başlanmalıdır.

Anamnezde; infertilite süresi, varsa daha önce kullanılan kontrasepsiyon yöntemleri, seksüel öykü, koitus sıklığı, varsa önceki gebelikleri, menarş ve menarştan bu yana menstrual siklus düzeni ve karakteri, sistemik hastalıklar, daha önceden geçirilmiş operasyonlar, sigara, alkol ya da sürekli kullanılan ilaçlar, tiroid hastalığı, androjenik deri değişiklikleri, galaktore, pelvik veya abdominal ağrı, dismenore ve disparoni varlığı, anormal PAP smear sonuçları, ailede erken menopoz, infertilite ve anomalili doğum öyküsü sorgulanmalıdır.

Fizik muayenede; ağırlık ve vücut kitle indeksi (BMI) belirlenmelidir (normal BMI aralığı:18.5-25 kg/m²). Sekonder seks karakterlerine bakılmalı, androjen

hakimiyeti olup olmadığı, galaktore varlığı incelenmelidir. Tiroidde nodül ve hassasiyet sorgulanmalıdır.

Pelvik muayene ve spekulum muayenesi ile anatomi mutlaka değerlendirilmelidir. Vagina (septum, hymen imperforatus, Rokitansky Küster Mayer sendromu açısından) ve serviks (akıntı, konjenital servikal patolojiler açısından) ayrıntılı incelenmelidir. Rektovaginal muayene pelvik muayenenin bir parçası olarak daima yapılmalıdır.

USG: Transvaginal ve Abdominal Ultrasonografi uterin, endometrial ve adneksiyal patolojilerin ayırıcı tanısında yardımcı olmaktadır. Ayrıca ovulasyon ve folikül takibinde de sıklıkla kullanılmaktadır [29].

Ovulasyonun değerlendirilmesi: Ovulasyonun değerlendirilmesi hem çiftlerin ilişki zamanlamasını kolaylaştırması açısından hem de hastanın yardımcı üreme tekniklerine yönlendirilmesi açısından önemlidir. Ovulasyon testleri direkt ya da indirekt olarak 2 gruba ayrılır [30]. Direkt yöntemler; ovulasyonun direkt vizualizasyonunu içeren USG ve laparoskopidir. İndirekt yöntemler ise; ovulasyona eşlik eden faktörlerin tespit edilmesinden ibarettir. İndirekt testler: Bazal vücut ısısı takibi (progesteronun termojenik etkisi ile luteal fazda vücut ısısının 0.5°C yükselmesi ve adet görülmesi ile tekrar düşmesi ile oluşan bifazik eğri), östrojen ve LH ölçümü (kan, idrar veya tükürükte), servikal mukus tayini, midluteal progesteron ölçümü (beklenen adet gününden 1 hafta önce önce yapılmalıdır ve 3 ng/ml'nin üzerindeki değerler ovulasyonun oluştuğunun objektif kanıtıdır) ve endometrial biyopsidir [31]. Sekretuar de-ğişiklikler ovulasyonu gösterir, normal siklus günü ile histoloji arasında 2 günden fazla fark mevcutsa luteal faz defekti için altın standart olmaktadır [32].

Tubal ve pelvik patolojilerin değerlendirilmesi: Kullanılan yöntemler Histerosalpingografi (HSG), histereskopi, sonohisterografi ve laparoskopidir. İlk tercih edilmesi gereken yöntem HSG'dir. HSG ile hem tubal geçiş, hem de uterin kavite değerlendirilebilir. Proksimal, mid ve distal tuba iç yapısı hakkında çok değerli bilgiler vermesinin yanında submüköz myom, endometrial polip, intruterin sineşi ve müllerian defektler gibi intrauterin patolojileri de tanımlamada yardımcı olmaktadır. HSG ile saptanan intrauterin patolojilerin saptanmasında histereskopi

çok yararlıdır. Ofis şartlarında uygulanabilmesi ve operatif histeroskopi olarak da kullanılabilme imkanının olması avantajlarıdır. Laparoskopi infertilite incelemelerinin son basamağını oluşturur. Diğer yöntemler ile tanı konulamayan pelvik adezyonlar ve endometriozisin tanı ve tedavisinde önemli olmasının yanında, transservikal olarak verilen metilen mavisi ile tubal patensi de değerlendirmesi açısından da kıymetlidir [33].

Servikal faktör değerlendirmesi: Servikal mukus incelemesi, post koital test ve anti sperm antikörlerin araştırılması günümüzde sadece gerekli vakalarda kullanılmaktadır. Rutin infertilite araştırmasında önerilmemektedir.

Tubal faktör: Distal tubal hastalıklarda hasar hafif ise cerrahi sonrası gebelik oranları %40-50 oranında artabileceği için cerrahi denebilir. Ancak şiddetli distal tubal hasar olan hastalarda en uygun seçim İVF olmalıdır. İVF başarısı bu grupta cerrahinin %10-35'lik başarısına göre daha yüksektir. Bu hastalarda spontan gebelik oluşması durumunda ektopik gebelik olma riski beşte bir oranında artacaktır [34]. Cerrahiye rağmen iki yıl içinde gebe kalamayan ileri yaş grubundaki hastalar direkt olarak İVF'e yönlendirilmelidir. İVF'e yöneltilen tek bir hasta grubunda cerrahi yapılması daha uygundur ki bunlar hidrosalpenksi olan hastalardır. Bu grup hastalarda hidrosalpenksteki inflamatuvar sıvının endometriyum ve embriyo üzerindeki toksik etkisi nedeniyle gebelik oranları %50 azalmakta, abortus oranları artmaktadır [35]. Proksimal tubal hasarı olanlarda İVF diğer seçeneklere göre daha uygun olacaktır.

Endometriosis: Endometriozisin infertiliteye nasıl sebep olduğu tam olarak anlaşılamasa da oosit gelişimini ve embriogenezi engellediği bilinmektedir [36]. Evre 1 ve 2'de endometriozisi olan hastalarda bekleme, cerrahi, klomifen sitrat ya da GnRH tedavileri ve IUI denenebilir. Bu tedavilerle gebelik elde edilemeyen ve ileri yaş grubuna dahil hastalarda İVF seçilmelidir. Evre 3 ve 4 endometrioziste seçenek direkt olarak İVF olmalıdır. Bu gruptaki hastalarda cerrahi ağrı semptomlarını gidermek amacıyla yapılabilir. Tüm bu incelemeler ve değerlendirmeler sonucunda İVF uygulanması gereken durumları erkek faktörü, tubal faktör, endometriosis ve açıklanamayan infertilite olarak gruplamak daha doğru olacaktır.

2.2.Yardımcı Üreme Teknikleri

Steptoe ve Edwards 1978 yılında doğal siklus ile tek bir preovulatuvar insan oositini IVF yaparak ve blastokist evresinde uterusu transferi ile gebelik elde etmişler ve bu gebelik bir term doğumla sonuçlanmıştır [18]. Bu başarı infertilite tedavisinde yeni bir çağı başlatmıştır. Geçen 30 yıl içerisinde ovulasyonun uyarılması, oositlerin toplanması, oosit ve embriyo kültürü, embriyoların dondurularak saklanması ve embriyo transfer tekniklerinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1991 yılında sadece YÜT yöntemleri kullanılarak yılda 3200'ün üstünde canlı doğum gerçekleştirilmiştir [19]. IVF işlemi dışardan gonadotropin verilmesi ile yapılan kontrollü over uyarılmasını, transvajinal ultrasonografi altında oosit toplama işlemini, laboratuvarda fertilizasyonu ve embriyoların uterusu transservikal olarak transferini içeren YÜT'den birisidir. YÜT birçok tekniği kapsamına alır: Gametin intrafallopian tüpe transferi (GİFT) aspire edilen oosit ve spermatozoanın direkt fallop tüplerine yerleştirilmesi , zigotun intrafallopian tüpe transferi (ZİFT) aspire edilen oosit ve spermatozoanın laboratuvarda fertilizasyonu sonucu ortaya çıkan zigotların fallopian tüpe direkt transferi, sperm ile veya mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu (MESA) veya testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile elde edilmiş spermlerin intrasitoplazmik olarak injekte edildiği yöntemleri (ICSI), yardımcı embriyo tutunma tekniğini, preimplantasyon genetik teşhisi (PGT), verici oositleri ve embriyoların dondurularak saklanmasını saymak mümkündür [51].

1970'lerin sonlarında, tüpleri kapalı olan infertil Lesley Brown, İngiltere'deki Oldham General Hospital'da Patrick Steptoe ve Robert Edwards'ın yardımına başvurdu. O zaman, oositlerin insan vücudunun dışındaki döllenmesi olarak bilinen süreç yani in vitro fertilizasyon (IVF) tamamen deneysel ve denendiğinde fallop tüpünde sadece düşükler ve başarısız bir gebelikle sonuçlanmıştı (Steptoe ve Edwards 1976). Yumurtalarını uyararak için ilaç kullanmadan Lesley Brown laparoskopik yumurta alma işlemine girdi, tekli yumurta laboratuvarda döllendi ve daha sonra uterusu geri gönderildi. Embriyo transfer işlemi sonrasında Temmuz 1978' de IVF' in ilk canlı doğumu olan Louise Brown dünyaya geldi [52].

İmplantasyon, yardımcı üreme tekniklerinin başarısı için önemli adımlardan birini temsil eder [37]. Etkililiği üç ana parametreye dayanır: embriyo kalitesi, endometriyal alıcılık (ER), dengeli bir embriyo-endometriyum etkileşimi [38].

İmplantasyon penceresi, endometriyumun blastosist eklenmesi için yeterli morfolojik ve işlevsel durumu kazandığı kendine sınırlı bir periyottur.

Dolayısıyla ER, doğal ve kısırlık tedavi döngülerinde konsept için gereklidir. Bununla birlikte, kontrollü ovaryum hiperstimülasyonunun (COH) YÜT siklusları boyunca ER'yi olumsuz etkilediği öne sürülmüştür [39-40]. Bu etkileşim, folliküler faz boyunca estradiol (E2) ve progesteronun (P) suprafizyolojik düzeyleri tarafından yönlendirilir ve bu da morfolojik ve biyokimyasal endometrium değişikliklerine ve doğal çevrimlerden daha gelişmiş bir endometrioma yol açar. Sonuçta, bu fizyolojik değişiklikler tedavilerin başarı oranlarını etkileyebilir.

Bu değiştirilmiş hormon seviyeleri, endometriyum ve aktarılan embriyoların implantasyon başarısızlığından sorumlu bir endometrial çevreye yol açtığını göstermiştir.

YÜT'de, en yüksek gebelik oranları taze oosit bağış döngülerinde elde edilir. Bu döngülerde, endometriyum yapay olarak astarlanarak embriyolar aktarılır.

COH sırasında ortaya çıkan suprafizyolojik hormonal düzeylerin etkilerini yaşamamış bir ortama dönüştürür [42]. Oositler aynı kalitede olmasına rağmen, paylaşılan oosit döngüleri ile ilgili bazı çalışmalar oosit donörlerine kıyasla alıcılarda gebelik oranlarını belirgin olarak daha yüksek bulmuştur ve bu, üstün ER kalitesi ile ilişkili olabilir [41, 42]. Benzer şekilde, donmuş embriyo transferlerinde (DET) endometrial priming, E2 ve P kullanılarak başarılabılır ve endometrial gelişim, gonadotropinler ile COH döngülerine göre daha hassas şekilde kontrol edilebilir [43,44]. Bugüne kadar, embriyo kriyoprezervasyon teknikleri, dondurulmuş embriyoların kalitesi ve implantasyon potansiyeli taze embriyolarla benzerdir [45,46]. Çalışmaların çoğunda taze ve DET'ni karşılaştıran taze transfer için en iyi kalite embriyolar seçilir ve sonuçlar iki tedavi türü arasında benzerdir [47]. Bazı çalışmalar, artmış risk sahipli ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) olan hastalarda tüm embriyoların dondurulması ve daha sonraki siklusta çözündürme transferinin yapılması ile iyi sonuçlar vermiştir [48-49].

Wong ve arkadaşlarının çalışmalarındaki sonuçlara göre; dondurma işleminin stratejisinde embriyo transferi ötelendiği için yumurtalık uyarımı döngüsündeki yumurtalık uyarısı gerçekleşmez. Yumurtalık hiperstimülasyonunun, embriyo implantasyonu için endometriyumun alıcılığını olumsuz etkilediği öne sürüldüğü için bu strateji faydalı olabilir. Dondurma stratejisi, yumurtalık stimülasyonlu döngüde gebelik oluşmadığından OHSS riskini düşürür [71].

İnsan embriyolarının dondurarak saklanması, yardımcı üreme teknolojileri laboratuvarlarında artık rutin bir işlemdir. Herhangi bir protokolün üstünlüğü konusunda herhangi bir görüş birliği bulunmamaktadır ve embriyo dondurma yöntemi, embriyonun dondurulması için seçim kriterleri, embriyo çözme yöntemi ve dondurulmuş çözülmüş embriyoların transferi için endometriyum hazırlığı günlerinde merkezler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Son on yılda in vitro fertilizasyon (IVF) döngüsü başına dondurulmuş-çözdürülen embriyo transfer döngüsü sayısı istikrarlı bir şekilde arttı ve aynı zamanda canlı doğumlarla sonuçlanan dondurulmuş-çözdürülen embriyo transferlerinin yüzdesi arttı. Günümüzde, IVF'den sonraki kümülatif gebelik oranı için insan embriyolarının kriyoprezervasyonu her zamankinden daha önemlidir. (Fertil Steril- 2014; by American Society for Reproductive Medicine.)

1937'de Luyet, kristalizasyonun herhangi bir canlı organizma ya da sistemle uyuşmadığını ve olası durumlarda kaçınılması gerektiğini yazdı.

Kriyoprezervasyon sırasında hücrelerin maruz kaldığı fiziksel stresin iki önemli yönü vardır: İlki, Membran geçirgenliği ve hücre iskeleti yapısındaki değişikliklerle ilişkili olan soğğun doğrudan etkisi (soğuk şok yaralanması).İkincisi; Buz kristallerinin oluşmasıyla gerçekleşen hücre yapısının ve işlevinin bozulması.

Bu iki önemli sorunun çözümü, kriyoprotektanların kullanılmasıyla ve uygun soğutma/ ısıtma oranlarının uygulanmasıyla bulundu.

1978'de In Vitro Fertilizasyonun (IVF) geliştirilmesi kriyobiyolojiye daha fazla destek sağladı ve ardından kriyoprezervasyon ile elde edilen ilk gebelikler yayımlandı.

Kriyoprezervasyonun sağ kalım seviyesiyle ilgili sorunları hızla tanımlandı, bugüne kadar tatmin edici çözümler arandı ve test edildi. Buradaki amaç

kriyoprezervasyonun zararlı sonuçlarını nihai olarak ortadan kaldırmaktır. Başka bir deyişle asıl amaç “embriyo ya da gameti dondurmak değil zamanı dondurmaktır” [1],[2],[3],[4].

2.2.1. IVF Laboratuvarlarında Güvenilir Kriyoprezervasyon Tekniklerinin Gerekliliği

Yüksek hayatta kalma oranlarına sahip olan embriyo ve gametlerin dondurulması olasılığı, tüm doğurganlık tedavilerinin çeşitliliğini değiştiren muazzam bir esneklik sunar.

IVF'de birden fazla embriyo elde edilmesi ve bu alandaki en yeni trendlerin blastosist evresinde tekli embriyo transferi lehinde olması, transferden sonra artan embriyoların olması ile sonuçlanır. Eğer bu embriyolar dondurularak saklanırsa, gelecekteki bir döngüde kümülatif implantasyonu ve gebelik oranlarını belirgin şekilde arttırarak kullanılabilir [5].

Embriyo sağkalımı ve implantasyon potansiyelinin korunması üzerine vitrifikasyonun mükemmel prognozu, tek bir embriyo transferinin belirgin bir şekilde seçilmesine, dolayısıyla IVF alanındaki çoklu doğumların şansının azalmasına katkıda bulunmaktadır. Bu çoklu gebelikler klinik bilim camiasında geçerli endişelerin gündeme gelmesine sebep olmuştur.

Ayrıca, gelişmekte olan bir over hiperstimülasyon sendromu ile sperm toplanmasında zorlayıcı uygulamalar nedeniyle döllenmeyi iptal etmek veya embriyo transferini ertelemek gerektiği durumlarda embriyo yada oositlerin dondurulması seçeneği devreye girebilir.

2.2.2. Vitrifikasyon Metodu

Vitrifikasyon son zamanlarda klinik uygulamaya konulan kriyoprezervasyonun ikinci önemli yöntemidir. Vitrifikasyon terminolojik olarak “cam” anlamına gelen latince “vitreum” kelimesinden türemiştir. Sıvı bir maddenin hızlıca dondurulmasıyla kristal olmayan cam gibi bir maddeye dönüştürülmesidir. Vitrifikasyon, hücrenin sitoplazmasında kristal oluşumunun en aza indirgenmesini sağlar ve bu da sağ kalıma meydan okuyan yaralanmanın ana nedenidir. Bu başarı iki

temel unsura dayanmaktadır: ilk olarak dondurma öncesinde, gametler / embriyolar, uygun kriyoprotektana yerleştirilir ve bu da dehidrasyona neden olur, daha sonra bu kriyoprotektanlar hücrelerdeki suyun yerini almaya başlar. İkinci olarak kültürdeki 37°C lik yüksek sıcaklığın nitrojenin -196°C olan yüksek soğukluğuna oranı kullanılır. Dolayısıyla hücre içindeki sıvı ortamda kristaller oluşmaz ancak camla benzer bir bileşim oluşturmak için katılaştır.

Pratikte, IVF laboratuvarında vitrifikasyon, teknik yaklaşımı ile ilgili mükemmel esneklik seçenekleri sunar. Farklı seçenekler aşağıdakilerle ilgilidir;

- a) Dondurma / soğutma ve çözme sırasında embriyoların / gametlerin maruz kaldığı kriyokoruyucu ajanların türleri, kombinasyonları, konsantrasyonu ve hacmi
- b) Maruz kalma süresi
- c) Soğutma/ısıtma oranları
- d) Açık veya kapalı vitrifikasyon sistemi
- e) Dondurulmuş embriyo/gametlerin depolanma metodu

Burada, bu açıdan ortaya çıkabilecek seçenekler ve endişeler analiz edildi [6].

Kriyoprezervasyonun geleneksel tekniğini vitrifikasyonla karşılaştıran protokollerde, vitrifikasyonda hücre içi kriyoprotektan konsantrasyonunun dört kat daha fazla olduğu bazı temel farklılıklar vardır. Vitrifikasyonda soğutma hızı, geleneksel kriyoprezervasyon protokollerini karakterize eden kademeli dondurma oranı ile karşılaştırıldığında, 0,3-1 ° C / dakikada 25,000 ° C / dakikaya ulaşmaktadır. Çözündükten sonra yüksek hayatta kalma oranları ile karakterize edilen farklı vitrifikasyon protokolleri geliştirildi [7],[8].

Vitrifikasyon ve ısınma protokollerindeki temel adımlar şunlardır:

- a) Embriyo/gametlerin sürekli olarak yüksek kriyoprotektanların dehidrasyonuna maruz kalmaları
- b) Embriyo/gametlerin en küçük hacimde sıvıyla seçilen taşıyıcıya yüklenmesi
- c) -196°C de hızlıca dondurma
- d) Maruz bırakılma

e) Rehidrasyona yönelik kriyoprotektan konsantrasyonunun kademeli olarak düşük konsantrasyona maruz kalmasıyla ısıtılır ve kriyoprotektan malzemenin çıkarılması ve fizyolojik ortamın yeniden tesis edilmesi için "yıkama" yapılır. Başarılı bir vitrifikasyon geliştirmek ve sağlamak için aşağıdakileri kullanıyoruz:

- 1) Azami bir dondurma hızına izin veren minimum bir hacim (0.5 -2 µl) kullanarak embriyo / gametlerin seçilen taşıyıcıya yüklenmesi,
- 2) daha düşük konsantrasyonlarda kriyoprotektan kullanımına izin veren, böylece toksik ve ozmotik zararı azaltmayı amaçlayan farklı kriyoprotektanları birleştirmek ve
- 3) son derece yüksek soğutma hızlarına ve hatta daha yüksek ısınma oranlarına ulaşmak. Çalışmalar, ısınma oranlarının soğumaktan daha önemli olabileceğini gösterdiğinden, 42,000 ° C / dakikalık ısınma oranları, yaralanmadan sorumlu olan zararlı sıcaklık bölgesinden hızlı bir geçişi garantiler ve mayoz iğ ve sitoplazmik lipid damlacıklarını etkiler [9],[10].

2.2.3. Blastosist ve Bölünme Aşaması Vitrifikasyonu

Dondurulmuş bir blastosistten ilk gebelik Yokota ve ark. tarafından bildirilmiştir [11]. Blastosist embriyo transferinin, implantasyon potansiyeline ve dolayısıyla daha yüksek klinik gebelik oranlarına göre ideal embriyo seçimi sağladığı belgelenmiştir.

Ayrıca, blastosist evresindeki embriyoların, embriyonik genomun aktivasyonunu başarıyla gerçekleştirdiği ve intrauterin çevre ile senkronize olmasına karşın [11], toksisite ve metabolik strese karşı daha fazla direnç ve daha iyi sağkalım oranları sergilemeklelediği desteklenmektedir.

Embriyolar blastosist aşamasına kadar takip edildiğinde kriyoprezervasyon için daha az embriyo kalacaktır, bu nedenle kriyoprezervasyon yönteminin güvenilir olması büyük önem taşır.

Bölünme evresi embriyolarının vitrifikasyonu ile ilgili olarak da blastosist kültürünün kullanımı için geçerli olan katı kriterleri kullanmak aynı derecede önemlidir.

Yüzey-hacim oranı oositlerde, zigotlarda ve bölünme evresi embriyolarında blastosistin yüzey hacmine oranla daha düşüktür [10],[12], bu nedenle blastosistler su moleküllerini kurutmak ve kriyoprotektan molekülleri ile değiştirmek için daha yüksek bir kapasite sergiler. Blastosistin büzülmesi / yapay kollajen çöküş tekniği trofoektoderm hücre birleşiminde 500 ms'lik bir lazer atışının uygulanmasıyla veya zona pellusida'yı delmek için mikroiğneler kullanarak ve daha sonra mekanik olarak mikro-aspirasyonla gerçekleştirilir. Her iki durumda da, blastokoel boşluğu 2-3 dakika içinde çöker ve on dakikalık bir kültürden sonra blastosist vitrifikasyonuna izin verir. Bu teknik, blastosist boşluğunun tamamen dehidrasyonuna bağlı hücre içi kristal oluşum insidansını düşürmekte ve böylece kriyoprotektan erişilebilirliğini arttırmaktadır. Hayatta kalma ve gebelik oranlarının arttığı rapor edilmiştir[13].

2.2.4. Çözüldükten Sonra Kuluçka Süresinin Etkisi

En çok dikkat edilmesi gereken, çözüldükten sonra embriyoların kalitesini doğru bir şekilde değerlendirmektir, çünkü embriyoların yeniden genişmesi normalin ötesinde gecikebilir.

Transfer yapılmadan önce 3-4 saat kuluçka yapılmalıdır. Kuluçka süresi arttıkça, çözüldükten sadece birkaç saat sonra yeniden tamamen genişlemiş görünen embriyoların geri çekilmesi gözlenirken, başlangıçta geri çekilen embriyolar daha sonra genişleyebilir. Bu transfer öncesi embriyo seçimi için karar vermede bazı hatalara neden olabilir.

Transfer öncesi inkübasyon süresine (20 saat = H20, 4 saat = H4) göre, 80 ve 115 çözdürme döngüsü için iki strateji Guerif ve arkadaşları tarafından karşılaştırıldı. Aktarım döngüsü oranı benzer iken (sırasıyla H20 ve H4 için% 52'ye karşı% 52'ye karşılık), yeniden genişleyen embriyoların oranı H20 grubunda H4 grubuna göre (% 36'ya karşı% 80) çok daha yüksekti. Son olarak transfer edilen embriyo başına implantasyon oranı H20 grubunda H4 grubuna göre daha yüksekti (% 23.4'e karşı% 6.1). Bu sonuçlar dondurulup çözdürülmüş embriyolar için kültür koşullarının

uygunluğuna dair bir gösterge yerine, embriyoların transfer edilmesi için daha iyi seçilmesine yardımcı olabilecek daha uzun bir inkubasyondan sonra embriyoların hayatta kalma oranlarının daha iyi değerlendirilmesini gerektirdiğini göstermiştir (Guerif ve ark., 2003). Bir embriyonun transferi, ikiz gebelik oranını düşürmenin umut verici bir yolu olarak grnebilse de, embriyo dondurma, daha fazla gebelik elde etme şansına izin verebileceği sürece etkinliğini açıkça gösterecektir. Bu gelişme, hem donma için hem de donma prosedürünün etkinliği için mevcut olan "spernmerik- ihtiyaç fazlası" embriyoların sayısı ile ilgilidir [14].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Bu alışmada Ocak 2010 – Aralık 2015 tarihleri arasında çalışmaya katılma kriterleri bakımından uygun (Kadın yaşının 40'tan genç olan, ovaryen stimülasyona iyi yanıt alınan ve blastosist ile transfer yapılan antagonist siklusları) bulunmuş taze embriyo transferi gerçekleştirilen hastalar ile (1.grup) tedavide tüm embriyoları 3. Gün dondurulan, daha sonraki bir zaman diliminde bu embriyoların üzülerek blastosist aşamasına kadar kültürü sonrası transferi gerçekleştirilen (2.grup) olguların embriyolojik ve klinik sonuçları karşılaştırılacaktır. İlgili veriler, klinikte elektronik ortamda tutulan veri bankasından çalışmaya dahil olma ve hariç turulma kriterleri bakımından filtrelenerek elde edilecek veriler retrospektif olarak incelenecektir.

Çalışma genelinde olgular veya embriyolar üzerinde herhangi bir girişimsel bir işlem veya girişimsel olmayan bir madde kullanımı gerçekleştirilmeyecektir.

Çalışmaya dahil olacak olgularda yaş, deneme sayısı, vücut kitle indeksi, semen parametreleri gibi tanımlayıcı değişkenler; embriyolojik kriterler olarak işlem başına toplanan oosit sayısı, elde edilen olgun oosit sayısı, fertilize olan zigot sayısı, blastosist aşamasına ulaşan embriyo sayısı ve dondurulmaya müsait embriyo sayısı; klinik kriterler olarak ise biyokimyasal gebelik oranı, klinik gebelik oranı ve implantasyon oranı değişkenleri gruplar arası karşılaştırma kriterleri olarak incelenecektir.

3.2.Ovulasyon İndüksiyon Protokolleri ve Yumurta Toplama İşlemi

Tüm hastalara tedavi protokolü olarak gonadotropin kullanılarak ovulasyon indüksiyonu yapılmış pitüiter desensitizasyon amacı ile GnRH Antagonisti kullanılmıştır. Hastalar menstrüel siklusun 2 ya da 3. günü merkeze gelerek kan ve ultrasonografik değerlendirmeye tabi tutulmuşlardır. Kanda progesteron düzeyi 1.5 ng/ml'nin altında olan olgular ve transvajinal ultrasonografide kistik oluşum saptanmayan olgularda ovulasyon indüksiyon protokolü uygulanmaya başlanmıştır. Hastalara günlük 225 IU rekombinant FSH (Gonal- F, Merck Serono, Sweden) verilmiş indüksiyonun 6. günü antagonist (Cetrotide, Merck Serono)tedavi başlanmış ve hCG gününe kadar devam edilmiştir. Hasta belirli aralıklarla kan ve ultrasonografi ile monitorize edilmiş ve 18 mm ve üzerinde 3 folikül belirlendiğinde hCG enjeksiyonu (Ovitrelle, Merck Serono) yapılmıştır. Yumurta toplama işlemi enjeksiyondan 35 saat sonra transvajinal ultrasonografi eşliğinde 17 G tek lümen iğne ile yapılmıştır.

3.3.Kullanılan Cihaz, Solüsyon ve Malzemeler

3.3.1. Kullanılan Cihazlar



Şekil 1 Merkezimizde Kullanılan Zeiss Marka Manipulator Görşeli



Şekil 2 Merkezimizde Kullanılan Zeiss Marka Mikroskop Görşeli



Şekil 3 Merkezimizde Kullanılan Azot Tankı Görseli

3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar

Çalışmada Tablo 1’de detaylı üretici ve katalog numaraları verilen kimyasal ve solüsyonlar kullanılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

Solüsyon adı	Katalog no:	Üretici Firma
Modifiye HTF medium	90126	Irvine Scientific
Sperm yıkama medium	9983	Irvine Scientific
PureSperm-100	ET-HIS05-QI/04	Nidacon
Continuous Single Culture Complete Medium	90165	Irvine Scientific
Serum Substitute Supplement (SSSTM)	99193	Irvine Scientific
Hyaluronidase Solüsyonu	90101	Irvine Scientific
%10’luk PVP	90123	Irvine Scientific
Embriyo kültür yağı	9305	Irvine Scientific

3.3.3. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada Tablo 2’de detaylı üretici ve katalog numaraları verilen atılabilir malzemeler kullanılmıştır.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan atılabilir malzemeler

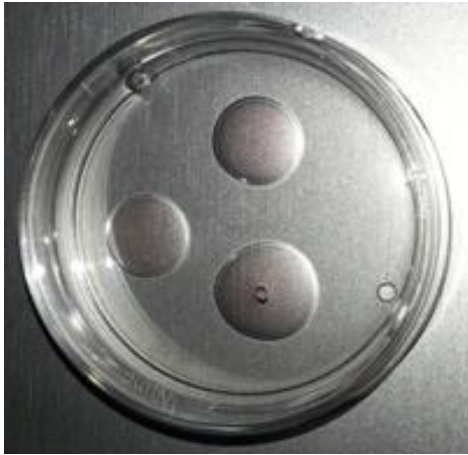
Malzeme adı	Marka	Katalog no:	Üretici Firma
Konik tüp (15 ml)	Falcon	352095	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı (15 ml) tüp	Falcon	352001	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı (5 ml) tüp	Falcon	352003	BD Sciences
25 cm ² 'lik flask	Falcon	353009	BD Sciences
60 cm kültür kabı	NUNC	150270	Thermo Scientific
60 cm kültür kabı	Falcon	353652	BD Sciences
Oosit toplama seti	Smiths	ONS1833	Smiths Medical

3.4. ICSI Teknikleri ile İnseminasyon Uygulaması

3.4.1. Hazırlık İşlemleri

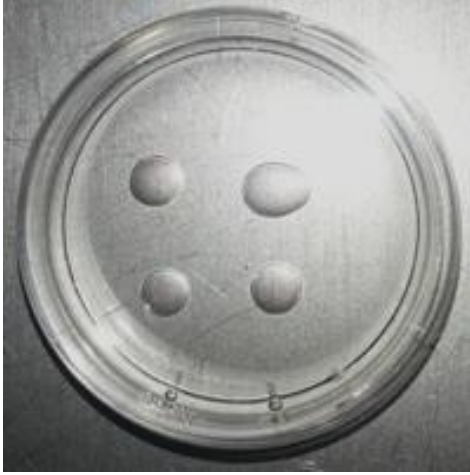
Komplet medium hazırlığı: CSC wtHSA mediumu kullanılarak hazırlanır.

OPU kültür kabı hazırlığı: Her bir 60 cm'lik kültür kabında üç adet 300 ul'lik komplet medium damlacığı olacak şekilde, iki adet 60 cm'lik kültür kabı olarak hazırlanır ve damlacıkların üzeri embriyo kültür yağı ile kaplanır (Şekil 4).



Şekil 4. OPU Uygulaması İçin Hazırlanan 3 Damlacıklı Kültür Kabı Görseli

Hyaluronidaz kültür kabı hazırlığı: Her bir 60 cm'lik kültür kabında dört adet 30 ul'lik komplet medium damlacığı olacak şekilde iki adet 60 cm'lik kültür kabı olarak hazırlanır ve damlacıkların üzeri embriyo kültür yağı ile kaplanır (Şekil 5).



Şekil 5. Hyaluronidaz Uygulaması İçin Hazırlanan 4 Damlacıklı Kültür Kabı Görseli

Standart kültür kabı hazırlığı: ICSI sonrası oositlerin fertilizasyon kontrol zamanına kadar büyümelerini sağlamak amacıyla 60 cm'lik kültür kabı içerisine Şekil 6'da görüldüğü gibi 18 adet her biri yaklaşık 20 ul'lik komplet kültür mediumu damlacığı hazırlanır ve damlacıkların buharlaşmasına izin vermeden üzerleri kültür yağı ile kaplanır.



Şekil 6. ICSI Sonrası Oositlerin Büyütüldüğü Standart Kültür Kabı Görseli

Yukarıda anlatıldığı şekilde bir gün önceden hazırlanan kültür kapları ve tüpler, içerdikleri kültür mediumlarının uygun gazlanmasını sağlayabilmek için kapakları yarı açık şekilde %5 O₂, %6 CO₂ içeren ve 37°C ve %95 nem kontrolünde olan inkübatörlerde gece boyunca gazlanmaya bırakılır.

ICSI kültür kabı hazırlığı: ICSI için kullanılacak kültür kaplarının hazırlığı için mHTF mediumu kullanılır. 60 cm'lik Falcon 353652 kültür kabının kapak kısmı ters çevrilerek orta bölgeye 10 mikrolitrelik üç adet yıkama drobu ve 5 mikrolitrelik 4 adet oositleri içine alıp ICSI yapılacak droplar, bunların arasına dikdörtgen 10 mikrolitrelik sperm havuzu damlacığı ve onun yanına da 7 mikrolitrelik dikdörtgen şeklinde %10'luk Polyvinylpyrrolidone (PVP) damlacığı hazırlanır (Şekil 7). Yoğun ve visköz yapısından dolayı PVP, ICSI öncesi sperm hareketini yavaşlatarak daha sağlıklı morfolojik değerlendirme ve manipulasyon yapabilme amacı ile kullanılır. Tüm diğer kültür kapları gibi bu kabın üzeri de adı geçen damlacıkların hazırlığı tamamlanır tamamlanmaz uygun bir volümde embriyo kültür yağı ile kaplanır ve en az 30 dakikalık bir süre için ısınması için 37°C etüve kaldırılır.



Şekil 7. ICSI İçin Kullanılan Kültür Kabının Hazırlanması

Oosit toplama işlemi için gerekli olan Modifiye HTF mediumu, 25 cm²'lik flaslara bölünür, her bir OPU işlemi için bir flask olacak şekilde ısınması için 37°C 'ye ayarlanmış olan etüve konulur.

3.4.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU)

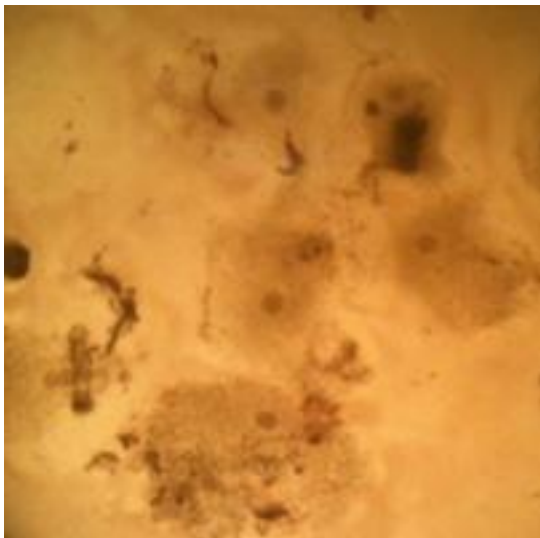
Oosit toplama işlemi steril koşullarda ve bu işlem için özenle seçilmiş bir ultrason ünitesi ve aspirasyon cihazı (Şekil 8) kullanılarak, kısa süreli anestezi altında, ultrasonografi eşliğinde ve işlem için özel olarak tasarlanmış steril oosit toplama seti ve iğnesi (18G) kullanılarak gerçekleştirilir.



Şekil 8. OPU İşleminde Kullanılan Cihazların Görşeli

İğne yardımı ile her bir overden aspire edilen folikül sıvıları ve içerdikleri kümülüs-oosit kompleksleri (KOK), bir gün önceden hazırlanıp uygun şekilde gazlanmış modifiye HTF mediumu içeren 15 ml'lik yuvarlak tabanlı tüp içerisine toplanır ve mümkün olan en hızlı şekilde laboratuvara ulaştırılır.

Tüp içerisinde laboratuvara ulaştırılan bu KOK yapıları embriyolog tarafından önce steril pastör pipeti kullanılarak ve LAF kabin içerisinde konumlandırılan bir stereo mikroskop altında gerçekleştirilir (Şekil 9). KOK yapıları sonrasında bir gün önceden hazırlanan ve gazlanarak pH değerinin 7,25-7.35 aralığında sabitlendiği kültür mediumunda toplanır.



Şekil 9. Merkezimizde Çekilen OPU İşlemi Sırasında Elde Edilen KOK Görüntüleri (10X)

3.4.3. İnseminasyon İçin Sperm Örneğinin Hazırlanması

Oositleri toplanan hastanın eşi işlem gününde üzerinde adı soyadı eş-adı yazılı hasta protokolü ve barkodu olan steril sperm toplama kabı hastayada okutularak ve kimlik kontrolü yapıldıktan sonra gerekli hasta bilgilendirmesi yapılarak örnek alımı için özel olarak tasarlanmış odaya alınır. Sperm örneği mastürbasyon yöntemiyle steril sperm kabının içerisine toplandı ve sperm verme odasını laboratuvar kısmına bağlayan ara bölme yardımı ile laboratuvara ulaştırılır.

İşlemin yapılacağı sabah 2-8 derecede bulunan sperm yıkama medumu ve PureSperm®-100 solüsyonları buzdolabından çıkartılarak oda ısısına gelmeleri sağlanır. Bu ürünler kullanılarak sırası ile %50, %70 ve %90'lık gradyenler şeklinde, Tablo 3'te belirtildiği şekilde karıştırılarak hazırlanır.

Tablo 3. Sperm hazırlığı amaçlı gradyen solüsyonların hazırlanışı

	%50	%70	%90
Sperm yıkama medumu	5 ml	3 ml	1 ml
PureSperm-100	5 ml	7 ml	9 ml

İşlem günü hastanın eşinden yukarıda bahsedildiği şekilde elde edilen sperm örneği, aşağıdaki aşamalar takip edilerek inseminasyon için hazırlanır:

Sperm örneği, 30-40 dakikalık bir likefaksiyon süresi sonrasında iyice akışkanlık kazandığı gözlemlenerek makler kamerası ve mikroskop altında sperm sayma işlemi yapıldı ve androloji kayıt defterine sperm sayısı, hareketliliği, morfoljik değerlendirmesi not edilir.

Daha önceden hazırlanmış olan gradyen solüsyonları yardımı ile sperm yıkamada kullanılacak 3'lü gradyen tabakası hazırlanır. Bu amaçla;

15 ml'lik falcon 2095 konik tüp içerisine önce %90 lık olan mediumundan 0,5 ml tübün dibine konulur,

Bu tabakanın üzerine, 0,5 ml %70 lik gradyen mediumu cam pastör pipet ve enjektör yardımıyla çok yavaş bir şekilde bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirilir, Daha sonra %50 lik olan mediumdan 0,5 ml'lik bir kısım yine pastör pipet yardımıyla tübün dibine yavaş bir şekilde konulur ve böylece üçlü bir gradiyent hazırlanır.

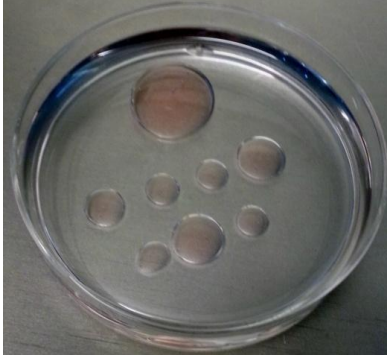
Ön incelemesi yapılmış olan sperm örneğinin 1 -1,5 ml'lik kısmı, hazırlanmış olan bu üçlü gradiyent tabakası üzerine 45 dercelik açı ile steril pastör cam pipet ve pipetör vasıtasıyla konularak en üst kısımda yeni tabaka oluşturması sağlanır.

Bu şekilde hazırlanan tüm ve örnek, 1800 rpm de 20 dakika santrifuj edilir. Santrifüj sonrası yıkanarak ayrışan ve tübün tabanında toplanan spermler, steril cam pastör pipeti ile ve enjektör yardımıyla çekilir ve ardışık olarak 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanır. Sperm yıkama amacıyla, pure sperm wash mediumu kullanılır. Yıkama sonunda elde edilen sperm hücreleri makler kamarası ve mikroskop yardımıyla değerlendirilerek androloji kayıt defterine kaydedilir.

3.4.4. Inseminasyon Öncesi Hyaluronidaz Enzim Uygulaması

Hyaluronidaz uygulaması için kullanılan kültür kabı Şekil 10'da görülmektedir. Uygulama yapılması planlanan zamandan en az 4 saat önce 15 ml'lik mavi kapaklı konik falcon tüp içerisine 9 ml mHTF ve 1 ml SSS™ ileve edilerek 37°C etüv içerisine konulup ısınması beklenir.

Ayıklama için kullanılacak kültür kapları içerisine öncelikle enzim uygulamasında kullanılmak üzere 375 ul mHTF + 125 ul Hyaluronidaz solüsyonu karıştırılarak enzim damlacığı hazırlanır. Bu damlacığın yanına/etrafına mHTF mediumu kullanılarak 20 ul'lik 6-7 adet küçük damlacıklar (enzim uygulaması sonrası elde edilen oositlerin yıkanması ve enzimin uzaklaştırılması amacıyla) hazırlanır. Tüm damlacıklar hazırlandığında üzerleri embriyo kültür yağı ile kaplanır ve etüve konarak en az 30 dakika uygun sıcaklığa gelmesi ve dengelenmesi sağlanır.



Şekil 10. Hyaluronidaz Uygulaması İçin Kullanılan Kültür Kabı Görseli

3.4.5. ICSI Uygulaması

ICSI işlemi öncesinde mikromaniplatöre oositi sabit tutma işinde kullanılan holding (Humagen MPH-SM-30) ve ICSI (Sunlight Medical SIC-50H-30) iğneleri takılarak işlem öncesi hazırlık yapılır.

Inseminasyon öncesi uygun şekilde hazırlanmış olan sperm örneği, bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan ICSI kültür kabı içerisinde yer alan PVP damlacığı içerisine pastör pipeti yardımıyla konulur ve böylece ICSI sırasında oosit içerisine enjekte edilecek spermler seçilmek üzere hazırlanır. Uygun şartlarda ve sürede spermlerin seçilmesini ve immobilizasyon sonrası hazırlıklarını müteakip, oositler sperm bulduğu kap içerisine hazırlanmış olan droplara konulur ve embriyolog tarafından her bir oosite 1 sperm enjekte edilecek şekilde mikroenjeksiyon işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem bittikten sonra oositler vakit kaybetmeden 1 gün önceden hazırlanmış ve dengelenmiş olan standart embriyo kültür kaplarına, stereo mikroskop, pastör pipeti ve ağız pipeti yardımıyla her bir damlacık (drop) içerisinde 1 oosit olacak şekilde aktarılır. Bu şekilde aktarımı yapılan kültür kabı inkübatör ortamına kaldırılır.

3.4.6. Fertilizasyon Kontrolü, Embriyo Takibi ve Taze Transfer

Inseminasyon işlemi yapıldıktan 16-20 saat sonra inverted mikroskop kullanılarak embriyoların fertilizasyon kontrolleri yapılır. Döllenen (normal fertilizasyon gözlenen) embriyolar bir gün önce hazırlanan kültür kaplarına aktarılır. Kültür kabları uygun koşullardaki inkübatörlere kaldırılır. Takibin 3. Gününde

embriyolar gelişimlerini kontrol etmek ve solüsyonlarını tazelemek amacıyla inkübatörden çıkartılır. Bilgileri not edildikten ve solüsyonları değiştirildikten sonra olabildiğince kısa sürede inkübatörlerine geri yerleştirilir. Takibin 5. Gününde embriyolar en kaliteli embriyonun seçilmesi amacıyla inkübatörden çıkarılır ve değerlendirilir. Gebelik vaadettiği düşünülen en kaliteli embriyo seçilir. Transfer gerçekleştirilir.

3.4.7. Embriyoların Değerlendirilmesi

3.4.7.1.Döllenme Sonrasi 42-46 (İdeal 44) Saat Ve 66-68 Saat:

Değerlendirmeye alınan embriyolar 5 kritere göre skorlanır.

- a) Hücre Sayısı
- b) Nukleus
- c) Fragmantasyon
- d) Blastomerlerin eşitliği (Even / Uneven)
- e) Sitoplazma

3.4.7.2.Döllenme Sonrasi 112-116 Ve 136-138 Saat:

Blastosist olarak gelişmeye bırakılan embriyoları 112-116(5.gün) ve 136-138 (6.gün) aşağıdaki kriterlere (Gardner Blastosist Skorlaması'na) göre skorlanmaktadır:

a) Erken Blastosist: Blastosöl embriyo hacminin yarısından az ise embriyo 1 olarak skorlanır.

b) Blastosist: Blastosöl embriyo hacminin en az yarısını dolduruyorsa embriyo 2 olarak skorlanır.

c) Tam Blastosist: Blastosöl erken embriyonun tamamını dolduruyorsa embriyo 3 olarak skorlanır.

d) Genişlemiş Blastosist: Blastosöl hacmi erken embriyonun tamamından büyük ve zona incelmisse embriyo 4 olarak skorlanır.

e) **Hatching Blastosist:** Trofoektoderm zonadan çıkmaya başlamışsa embriyo 5 olarak skorlanır.

f) **Hatched Blastosist:** Blastosist tamamen zonadan çıkmışsa embriyo 6 olarak skorlanır.

3.4.7.3.“3-6” Arası Olarak Değerlendirilen Blastosistlerin Icm ve Trofoektoderm Sınıflandırması:

- a) Çok ve sıkı hücre yapısı varsa
- b) Oldukça çok hücre sayısına sahip ancak gevşek yapıda ise
- c) Az hücre sayısına sahipse

Blastosistleri yukarıdaki kriterlere göre ICM ve Trofoektodermine bakarak değerlendirilmelidir.

Değerlendirmede Blastosistin ve blastosölün büyüklüğüne , zonanın inceliğine bakılarak ilk sayı(3,4,5 veya 6). Daha sonra ilk önce belirtilen harf ICM’i , ikinci yazılan harf Trofoektodermi belirtecek şekilde değerlendirilir.

Örneğin: 4BC skorlaması, blastosöl boşluğunun erken embriyonun tamamından büyük olduğunu, zonanın incelendiğini, ICM hücrelerinin yeterince çok ve sıkı yapıda olduğunu, Trofoektoderm hücrelerinin ise çok sayıda ancak gevşek yapıda olduğunu gösterir.

3.4.7.4.“3.Gün” Embriyolarının Seçilmesi

Normal fertilizasyon gözlenen ve takibe alınan embriyolar 3. Günlerinde en kaliteli olanlarının seçilmesi amacıyla inkübatörden çıkartılır. Gebelik vaadettiği düşünülen embriyolar inverted mikroskopta seçilir ve not edilir.

3.4.7.5.“3.Gün” Embriyolarının Dondurulması

Dondurulacak embriyolar planlanan işlem gününde embriyo değerlendirme uygulama talimatına göre skorlanır, dondurulması planlanan embriyo sayısı ve kullanılacak taşıyıcı çubuk sayısı belirlenir.

Dondurma işlemi öncesinde embriyoları dondurulacak çifte ve embriyolara ait bilgiler Embriyoloji Laboratuvarı Hasta Kayıt Defteri, Embriyoloji laboratuvar formu ve Embriyo Dondurma Formuna kaydedilir.

Oosit Dondurma işleminin oda sıcaklığında (20-24°C) uygulanması gerekir.

İşlemin başarı ile sonuçlanabilmesi için dondurma işlemi sırasında kullanılan ucu inceltilmiş pastör pipetin iç çapının oositlerden çok az miktarda geniş olmasına (iç çapı ~ 120 µm), bir solüsyondan diğerine geçerken pipetin değiştirilmesine ve oositlerin çok az miktarda solüsyon ile taşınmasına özen gösterilir.

Dondurma işlemi yapılacak olan laminar flow kabininin zemini soğuk olmalı ve ısıtıcısının kapalı olması gerekir.

Vit Kit-Freeze kiti içerisinde bulunan ve işlem için kullanılacak olan ES ve VS solüsyonlarının, dondurma işleminden 15 dakika önce saklandıkları ortamdan alınarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlanır.

ES ve VS solüsyonlarında dengeleme sırasında oositlerin ışığa maruz kalma süresi en düşük düzeyde tutulur. Kullanım öncesinde içeriklerin homojen dağılımı amacı ile ES ve VS tüpleri birkaç kez ters-düz edilerek karıştırılır.

3.4.7.6.“3.Gün” Embriyolarının Çözülmesi ve 5. Güne Kadar Takip Edilmesi

Embriyosu çözdürülecek çifte ait hasta dosyası incelenir. Hastanın adı, soyadı, protokol numarası ve kaç adet embriyo dondurulduğu kontrol edilerek onaylanır.

Embriyo çözdürme işlemi oda sıcaklığında ve soğuk zeminde gerçekleştirilir.

İşlemin başarı ile sonuçlanabilmesi için çözdürme işlemi sırasında kullanılan inceltilmiş pastör pipetin iç çapının embriyoların çapından çok az miktarda geniş olmasına (iç çapı ~ 120 µm), bir solüsyondan diğerine taşınırken pipetin değiştirilmesine ve embriyoların çok az miktarda solüsyon ile taşınmasına özen gösterilmelidir.

Vit Kit-Thaw kiti içerisinde bulunan ve işlem için kullanılacak olan TS, DS ve WS solüsyonlarının, dondurma işleminden 15 dakika önce saklandıkları ortamdan alınarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlanır.

4-kuyucuklu kültür kabı'nın bir kuyucuğuna 600 µl TS solüsyonu konur ve kap CO2 içermeyen etüvde veya ısıtma tablasında 30 dakika ısınması için bekletilir. Ayrıca petri kabı içerisine 50 µl'ik 4 adet DS damlacığı hazırlanır.

Çözülecek olan taşıyıcı çubuklar tank içerisinden sıvı nitrojen ile doldurulmuş olan rezervuara aktarılır.

Hızlı manüplasyon için sıvı nitrojen rezervuarı mikroskoba yakın yerleştirilir.

TS solüsyonu içeren 4-kuyucuklu kültür kabı etüv yada ısıtma tablasından alınır ve mikroskop tablasının üzerine odağın altına yerleştirilir.

Taşıyıcı çubuğun renkli kısmı penset yardımıyla kavranır ve embriyoların olduğu kısım sıvı nitrojen içerisinde kalacak şekilde tutulur. Çubuk nitrojen içerisinde tutularak şeffaf kılıfı çıkartılır.

Taşıyıcı çubuğun renkli kısmı elle sıkıca tutulup embriyoların olduğu kısım seri bir şekilde TS solüsyonu içerisine daldırılır. Timer 1 dakikaya ayarlanıp taşıma pipeti ile birkaç defa TS solüsyon içerisinde embriyoların TS solüsyonu ile dengelenmesi sağlanır.

İnkübasyon sonunda bir miktar DS solüsyonu taşıma pipetine alınır ve TS kabındaki embriyolar DS damlacığına akatarılır. 4 dakika boyunca embriyolar belirli aralıklar ile yeni bir DS damlacığına aktarılmak sureti ile dengelenir. Eğer çözülecek embriyolar 2. veya 3.gün embriyoları ise, DS ile inkübasyon sürecinde aynı kap içerisine ek olarak 2 adet 50 µl'lik WS damlacığı hazırlanır.

DS damlacığı içindeki inkübasyon süresinin bitiminde embriyolar WS1 de 4 dakika, WS2 de 4 dakika olacak şekilde toplam 8 dakika boyunca bekletilir.

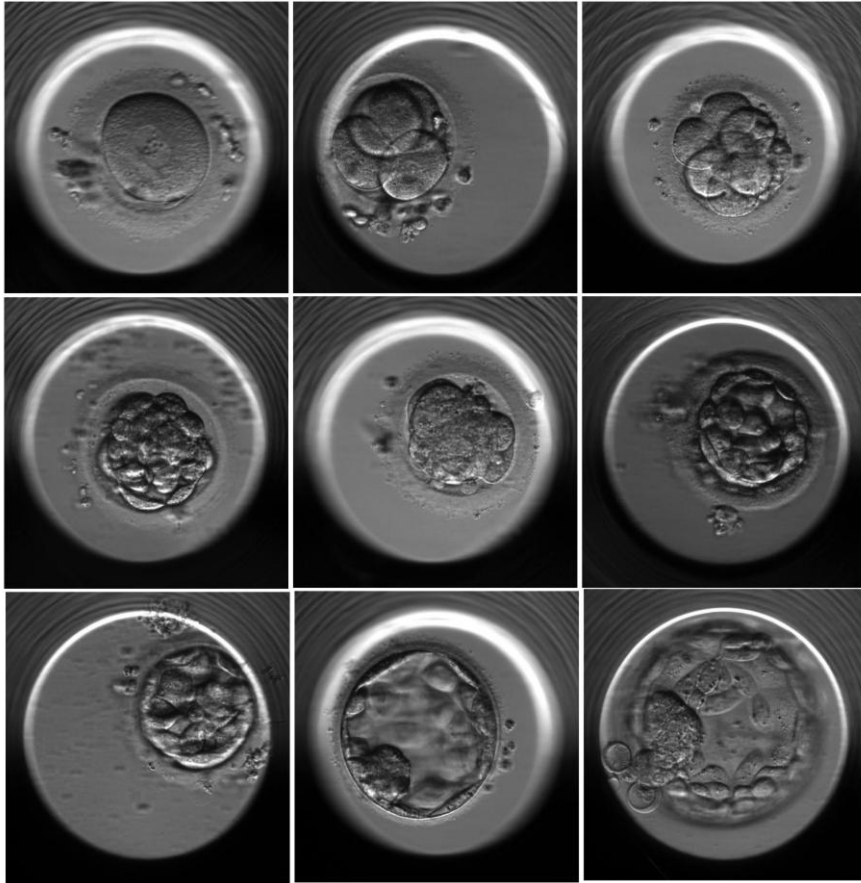
Son aşamada embriyolar bir gün önceden kültür hazırlığı talimatına göre hazırlanmış embriyo kültür kabına aktarılır.

Kabın yan yüzeyine hastanın adı soyadı ve eş adı yazılı etiketi yapıştırılır. İşlem sonrası inverted mikroskop kullanılarak çözülen embriyoların

canlılık durumları ve morfolojik özellikleri embriyo değerlendirme talimatına uygun şekilde gerçekleştirilir. Daha sonra kültür kabı inkübatörde hastaya ait ayrılmış bölüme yerleştirilir. Embriyo çözündürme formunda ilgili bölümler doldurulur ve çift bilgilendirilir.

3.4.7.7.“5.Günde” Embriyoların Değerlendirilmesi ve Transfer Edilecek Embriyonun Seçimi

“3-6” arası olarak değerlendirilen blastosistlerin içm ve trofoektoderm sınıflandırması ve döllenme sonrası 112-116 ve 136-138. saat başlığı altında açıklandığı şekli ile sınıflandırılır ve embriyo seçimi yapılır.



Şekil 11. Gelişmekte Olan Bir İnsan Embriyosuna Ait Görüntüler

Günümüze kadar insan embriyoları üzerinde gerçekleştirilen morfokinetik analizlerde, en başarılı embriyo seçim kriterlerinin belirlenmesinden ziyade gebelik oluşturma başarısı düşük embriyoların seçimi için blastomer büyüklüklerinin eşit olmaması, fragmentasyon ve multimükleasyon gibi statik kriterlerin yanında pronükleusların silinmesi [54], düzenli olmayan bölünmeler (1 → 3 hücre veya 1 → 5 hücre doğrudan bölünme) [53], [55] gibi yeni morfokinetik kriterler de anlamlı olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan erken klivaj dönemindeki 1., 2. ve 3. mitoz bölünmenin zamansal değerleri blastosist oluşturma potansiyelinin önceden belirlenebilmesi amacı ile kullanılan en önemli kriterler olarak karşımıza çıkmaktadır. [56], [57], [58]. Halen dünya genelinde pek çok çalışma embriyo gelişimi ve seçimi konularına odaklandığından [58], [59] gerçek zamanlı embriyo morfokinetik analizi kullanımının klinik gebelik ve doğum sonuçları üzerine etkisini araştıran çalışma sayısı son derece sınırlıdır [54].

3.4.8. Uygulama aşamaları:

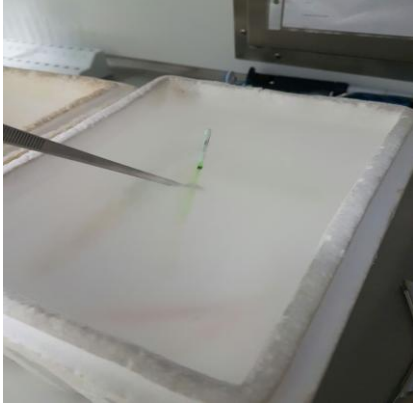
Sıvı nitrojen rezervuarı sıvı nitrojen ile doldurulur ve mikroskoba yakın bir şekilde yerleştirilir.



Şekil 12. Merkezimizde Çekilen Sıvı Nitrojen İle Dolu Rezervuar Görseli

Bir alüminyum tutucunun alt ucuna bir kriyotüp sabitlenir ve dondurulacak olan örneklerin saklanması için hazırlık olarak sıvı nitrojene batırılır.

Hasta adı, dondurma günü, dondurulan oosit sayısı, tarih ve dondurma adresi etiket üzerine yazılıp taşıma çubuğu (strow) üzerine yapıştırılır.



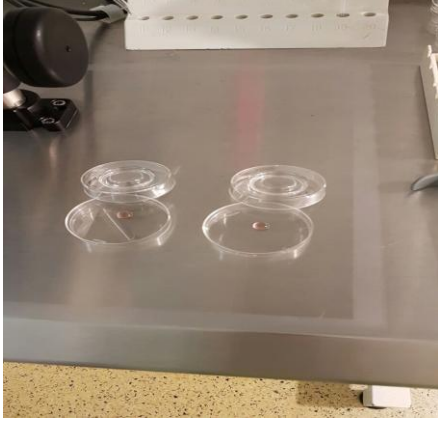
Şekil 13. Merkezimizde Çekilen Taşıma Çubuğu Görseli

5.gün veya 6.gün embriyolarının dondurma işlemine başlamadan AH talimatına uygun olarak lazer ile AH uygulanmalı ve embriyo/embriyolar kapandıktan sonra dondurma işlemine başlanmalıdır.



Şekil 14. Merkezimizde Çekilen Lazer İşlemi Sonrası Kapanmış Embriyo Görseli

İşlem öncesi, şekil 14’de görüldüğü gibi petri kabı içerisine oda sıcaklığında dengelenmiş ES solüsyonu ile 50 µl’lik damlacık hazırlanır.



Şekil 15. Merkezimizde Çekilen Solüsyon İçerikli Petri Kabı Görseli

Hazırlık sonrası dondurulacak embriyolar buldukları kültür solüsyonundan mümkün olduğu kadar az solüsyon alınacak şekilde ES damlacığı içerisine aktarılır.

Embriyolar eğer 2. ve 3.gün embriyoları ise 8-10 dakika, blastokist aşaması embriyolar ise 12 dakika ES damlacığı içerisinde bekletilir. ES içerisindeki dengeleme süresi sırasında aynı kap içerisine 50 µl'lik VS damlacığı hazırlanır.

ES damlacığında dengeleme tamamlandıktan sonra embriyolar bir miktar ES solüsyonu ile birlikte taşıma pipetine alınır, minimal hacimle VS damlacığının merkezine bırakılır ve birkaç defa pipet ile alıp verme yapılarak 30 saniye süre ile VS solüsyonu ile dengelenmeleri sağlanır. Süre sonunda embriyolar taşıma pipetine alınarak taşıyıcı çubuk üzerine yüklenir ve vakit kaybedilmeden sıvı azot içerisine batırılır.

ES damlacığından alınmaları ve sıvı azot içerisine batırılmaları aşamaları arasındaki süre 80-110 saniye olmalıdır.

Dondurma işlemi tamamlandıktan sonra taşıyıcı çubuklar tankta çifte ait adrese yerleştirilir ve çift bilgilendirilir.



Şekil 16. Merkezimizde Çekilen Dondurma İşlemi Tamamlanmış Embriyoların Taşıma Çubuğuna Yüklenmesinden Azot Dolu Tanka Yerleştirilmesi Aşamalarının Görselleri

4. İSTATİSTİK

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum olarak, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Sayısal değişkenler normal dağılım koşulunu sağlamadığından bağımsız iki grupta karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Gruplarda oranların karşılaştırılması Ki Kare Analizi ile yapıldı. Belirleyici faktörler Lojistik Regresyon Analizi ile incelendi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

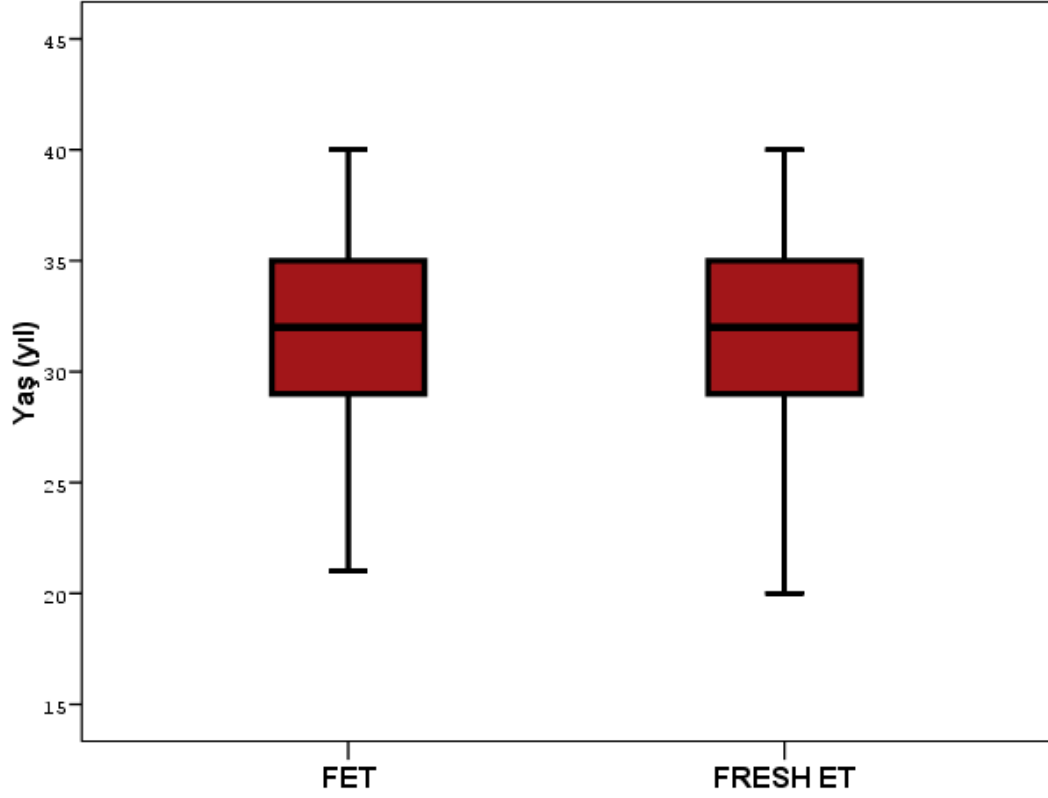
5. BULGULAR

Bölüm 3.1’de belirtilen tarih aralığında Fulya Bahçeci Tüpbebek Merkezi’nde tedavi gören uygun kriterlerdeki toplamda 337 FET, 236 FRESH-ET siklusu çalışmaya dahil edilmiştir. Grupların hasta ve sitümlasyon özellikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 2). Kadınların ortalama yaşı FET için $31,9\pm 4,1$, FRESH-ET için $31,7\pm 4,3$ dir. Endikasyonlar total gonadotrophin, HCG günü E2 değeri ve toplam deneme sayıları tablo 4’de sunulduğu gibidir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4. Çalışmaya Ait Genel Tanımlayıcı Özellikler

		FET (n=337)	FRESH ET (n=236)	p
Yaş Ort.±SD (Min-Maks)		31,9±4,1 (21-40)	31,7±4,3 (20-40)	0,553
Yaş Grup n (%)	<37	285 (84,6)	198 (83,9)	0,828
	37 ve üstü	52 (15,4)	38 (16,1)	
Endikasyon n (%)	Kadın Faktör	214 (63,5)	133 (56,4)	0,190
	Erkek Faktör	44 (13,1)	29 (12,3)	
	Miks Faktör	32 (9,5)	33 (14,0)	
	Açıklanamayan	47 (13,9)	41 (17,4)	
Total Gonadotrophin Ort.±SD (Min-Maks)		2401,3±876,7 (457-6175)	2434,4±806,7 (375-5475)	0,521
E2 day of HCG Ort.±SD (Min-Maks)		2874,6±2907,6 (149-26449)	2205,2±1124,3 (271-5622)	0,220
Toplam Deneme sayısı Ort.±SD (Min-Maks)		0,43±0,98 (0-7)	0,56±1,23 (0-11)	0,168

Aşağıdaki grafikte çalışmaya dahil edilen hastaların yaş aralıkları gösterilmektedir (Grafik 1).



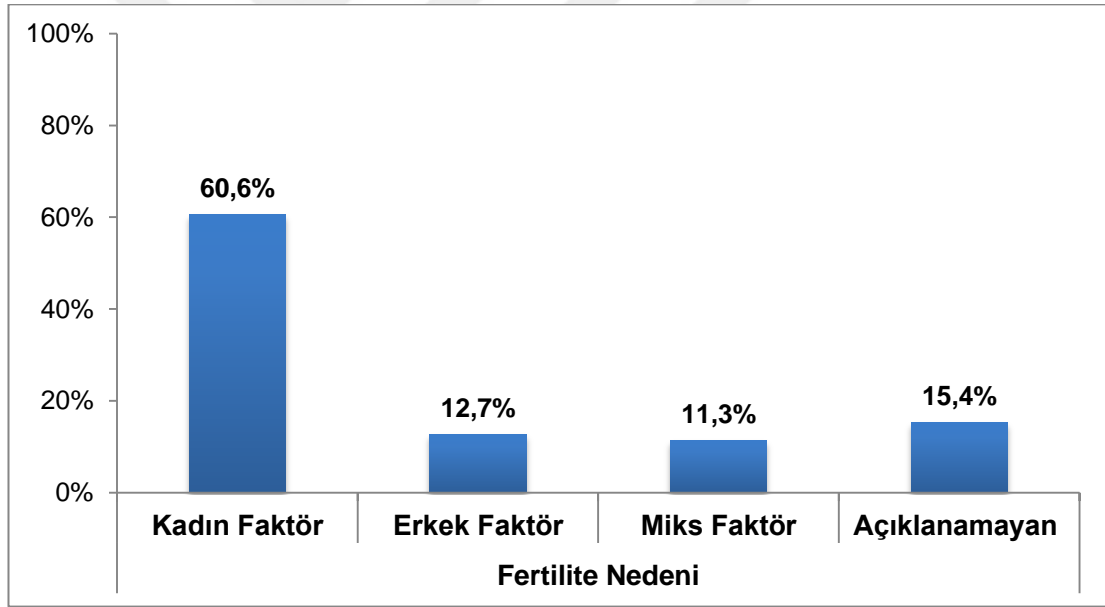
Grafik 1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Yaş Aralıkları

FET ve FRESH-ET gruplarının siklus ve özellikleri (total oosit, MII oosit, 2PN, transfer edilen embriyo sayıları ve implantasyon oranı ortalamaları) Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Siklus ve Embriyolojik Özellikler

		FET	FRESH ET	p
		Ort.±SD (Min-Maks)	Ort.±SD (Min-Maks)	
Embriyoloji	Total oosit	18,4±8,3 (5-51)	14,3±6,3 (2-38)	<0,001
	MII Oocyte	14,3±6,6 (3-42)	11,6±5,1 (2-33)	<0,001
	2PN	10,7±5,1 (3-31)	9,0±4,0 (2-25)	<0,001
	Transfer Edilen Embriyo Sayısı	1,39±0,49 (1-2)	1,35±0,48 (1-2)	0,315
	İmplantasyon oranı	0,70±0,65 (0-3)	0,59±0,61 (0-2)	0,031

Çalışmaya dahil edilen hastaların infertilite nedenlerine göre ortalamaları Grafik 2’de görüldüğü gibidir.

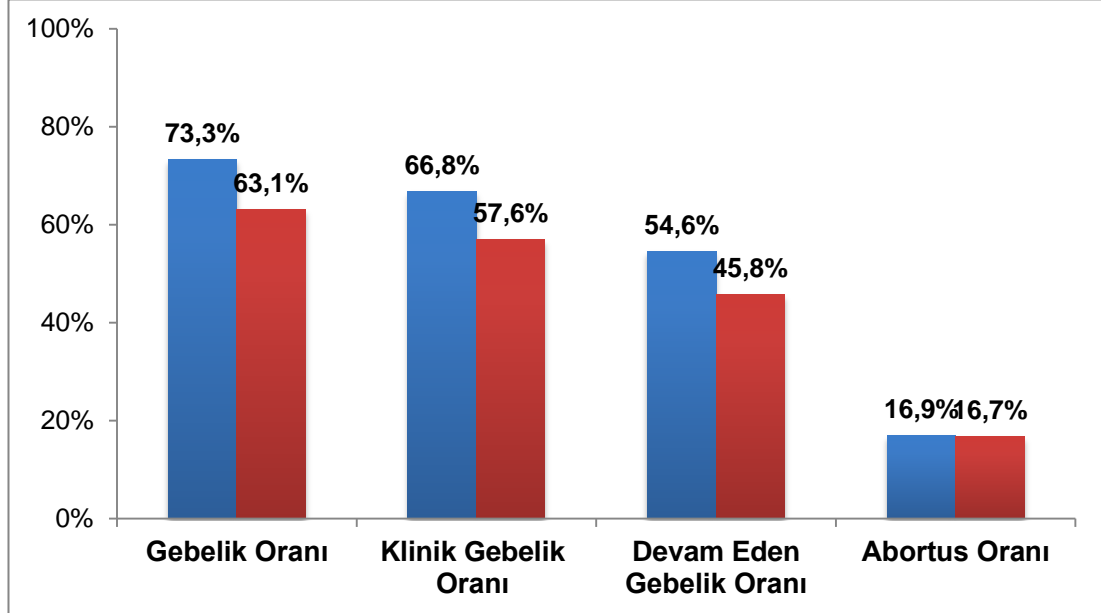
**Grafik 2.** İnfertilite Nedenleri

FET ve FRESH-ET gruplarının gebelik, klinik gebelik, devam eden gebelik ve abortus oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. FET ve FRESH-ET Transfer Sonuçları Tablosu

		FET	FRESH ET	p
		n (%)	n (%)	
Sonuç	Gebelik Oranı	247 (73,3)	149 (63,1)	0,010
	Klinik Gebelik Oranı	225 (66,8)	136 (57,6)	0,014
	Biyokimyasal Düşük	22 (6,5)	13 (5,5)	
	Devam Eden Gebelik Oranı	184 (54,6)	112 (45,8)	0,037
	Abortus Oranı	38 (16,9)	22 (16,7)	0,957
	Missed Abortus	38 (16,9)	21 (15,9)	
	Unembriyonik	0 (0,0)	1 (0,8)	
	Ektopik	3 (0,9)	2 (0,8)	

FET ve FRESH-ET gruplarının gebelik, klinik gebelik, devam eden gebelik ve abortus oranlarının tablosunun şematize edilmiş hali Grafik 3'te ki gibidir.

**Grafik 3.** FET ve FRESH-ET Transfer Sonuçları Grafiği

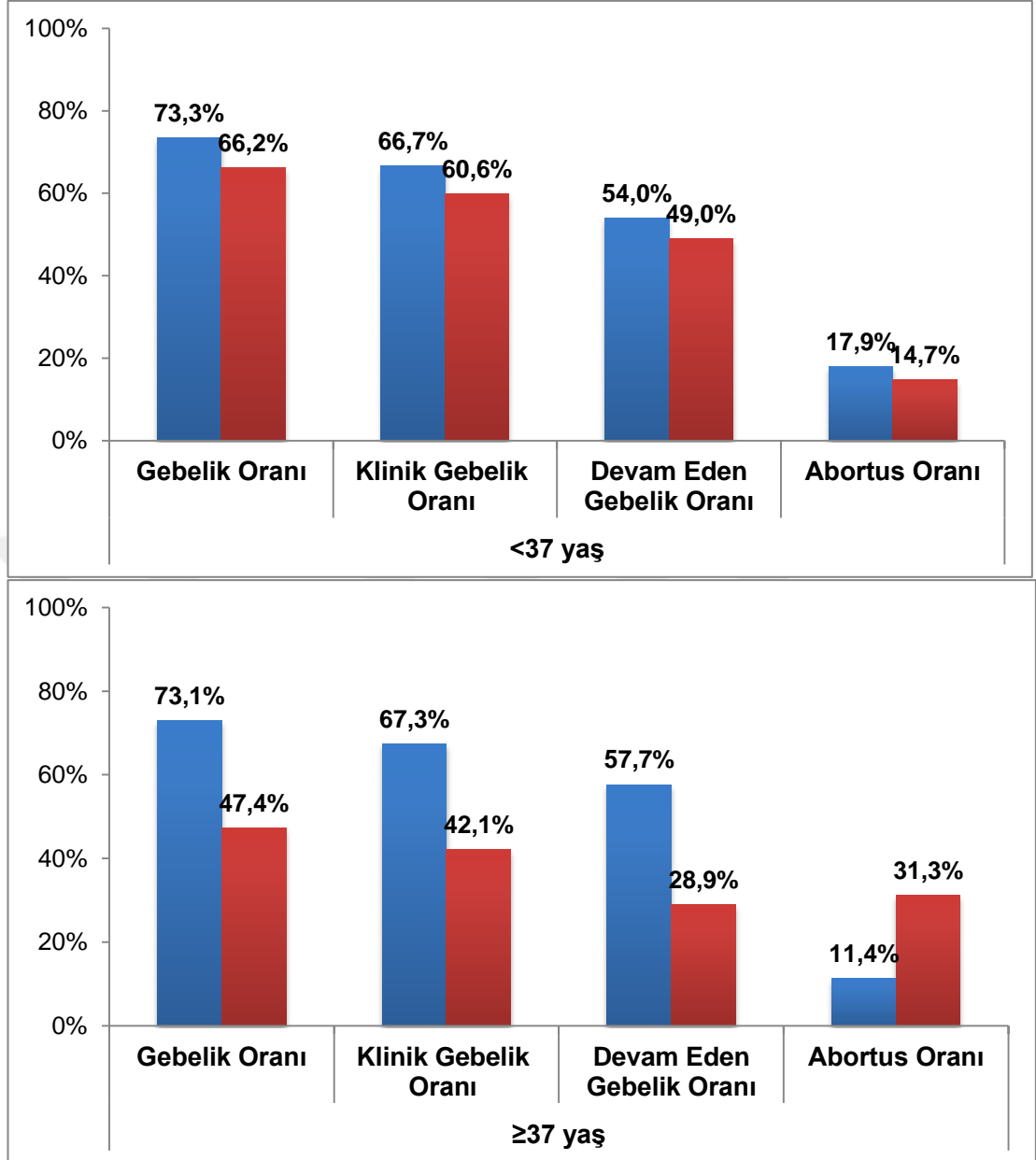
37 yaş ve üstü hastaların FET ve FRESH-ET gruplarının gebelik, klinik gebelik, devam eden gebelik ve abortus oranları ile 37 yaş altı hastaların FET ve

FRESH-ET gruplarının gebelik, klinik gebelik, devam eden gebelik ve abortus oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Anne Yaşının 37 Yaş Kriteri Baz Alınarak Verilerin Değerlendirilmesi

Anne yaşı <37 yıl		FET	FRESH ET	p
Sonuç n (%)	Gebelik Oranı	209 (73,3)	131 (66,2)	0,090
	Klinik Gebelik Oranı	190 (66,7)	120 (60,6)	0,108
	Biyokimyasal Düşük Devam Eden Gebelik Oranı	19 (6,6)	11 (5,5)	0,275
	Abortus Oranı	154 (54,0)	97 (49,0)	0,461
	Missed Abortus	34 (17,9)	17 (14,7)	
	Ektopik	2 (0,7)	2 (1,0)	
	Anne yaşı ≥37 yıl			
Sonuç n (%)	Gebelik Oranı	38 (73,1)	18 (47,4)	0,013
	Klinik Gebelik Oranı	35 (67,3)	16 (42,1)	0,017
	Biyokimyasal Düşük Devam Eden Gebelik Oranı	3 (5,7)	2 (5,2)	0,007
	Abortus Oranı	30 (57,7)	11 (28,9)	0,118
	Missed Abortus	4 (11,4)	4 (25,0)	
	Unembriyonik	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Ektopik	1 (1,9)	0 (0,0)	

37 yaş ve üstü hastaların FET ve FRESH-ET gruplarının gebelik, klinik gebelik, devam eden gebelik ve abortus oranları ile 37 yaş altı hastaların FET ve FRESH-ET gruplarının gebelik, klinik gebelik, devam eden gebelik ve abortus oranlarının grafiği aşağıda sunulduğu gibidir (Grafik 4).



Grafik 4. Anne Yaşının 37 Yaş Kriteri Baz Alınarak Verilerin Değerlendirilmesi Grafiği

6. TARTIŞMA

Yardımcı üreme teknolojilerinin sonuçlarını iyileştirmek amacıyla klinik ve embriyolojik stratejileri geliştirmek için son yirmi yılda büyük çaba gösterilmiştir. Endometriyum, blastokistlerin yeterli miktarda biyolojik açıdan alıcı molekülere bağlanmasına izin veren nihai bir hedef olarak kabul edilir. Bir adım daha ileri gitmek için endometriyal reseptiviteyi veya daha doğru olarak implantasyon penceresini saptayarak anlamak, YÜT uygulamasında büyük önem kazanmıştır [60],[61].

Kontrollü overyan stimülasyon (COS), toplanan oosit sayısına olumlu yönde etki etmesine rağmen, hatalı endometriyal reseptiviteye yol açabilir. Süperfizyolojik östrojen üretimi, COS sonrası kadınlarda başarısız reseptivitenin başlıca sebebi olabilir [62]. Uyumlu olarak, yüksek veya normal tepki veren kadınlarda HCG stimülasyonunun yapıldığı gün yüksek serum östradiol düzeylerinin endometriyal alıcılık için zararlı olduğu bildirilmiştir [63]. Bu nedenle, endokronolojik döngülerin endometrial alıcılık üzerindeki muhtemel etkisini değerlendirmek için tüm embriyoların dondurularak transferinin ötelenmesi yaklaşımının blastosist transferi planlanmış hastalarda klinik sonuçlarını retrospektif bir araştırma ile inceledik.

Çalışmaya 337 Toplam FET, 236 FRESH-ET siklusu dahil edildi. Grupların hasta ve sitümülasyon özelliklerinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Belva ve arkadaşları , gebelik oranlarının FET grubunda taze ET grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir [64]. Takeshima ve arkadaşları siklus başına gebelik oranının dört yıl içinde hemen hemen sabit kaldığını bildirmiştir: taze ICSI siklusları için % 20 ve dondurulmuş embriyo transfer siklusları için% 32 [66].

Başka bir çalışmada, implantasyon, devam eden ve klinik gebelik oranları FET grubunda anlamlı derecede yüksekti [65]. İki gruptaki farklı implantasyon oranları, dondurulmuş embriyo sikluslarında farklı endometriyal alıcılık ve embriyo ile endometrial gelişim arasındaki senkronizasyonu yansıtabilir. Buna paralel olarak çalışmamızda FET grubunun gebelik oranı, klinik gebelik oranı, devam eden gebelik oranı FRESH-ET grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p=0,010$

$p=0,014$ $p=0,037$). Grupların abortus oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,957$).

Daha yüksek gebelik oranı elde etmek için, transferde en iyi embriyoların seçimi oldukça önemlidir. Dondurup çözdükten sonra en iyi embriyonun seçiminin ardından transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer edilen embriyodan geriye kalan artık embriyolar ise gebelik oluşmadığı yada çiftin tekrar gebelik istediği zamana kadar saklanır, dolayısıyla transferden geriye kalan artık embriyoların bir servet değerine sahip oldukları düşünülmektedir. Bu noktada dondurulduktan sonra transfer için çözülen embriyonun kalitesi devreye girer. Aflatoonian ve arkadaşları, embriyoların morfolojik derecelendirmesine göre, çalışmada dondurulmuş ve taze gruplarda biyokimyasal gebelik oranının benzer olduğunu bulmuşlardır (% 27,% 22) [67]. Buna benzer olarak çalışmamızda grupların abortus oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,957$).

Bu çalışmada FET grubunun embriyolojik özelliklerinden total oosit, MII oosit, 2PN ve implantasyon oranı ortalaması FRESH-ET hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti (sırası ile $p<0,001$ $p<0,001$ $p<0,001$ $p=0,031$).

Ashrafi ve arkadaşlarının ve Aflatoonian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, kadınların yaşı taze ET ve FET protokollerinde doğurganlık hızını etkilememektedir; diğer çalışmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır [65],[67],[68],[69]. Ashrafi ve arkadaşları ve Aflatoonian ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın sonucuna karşılık bizim çalışmamızda 37 yaş ve üstü hastaların FET grubunun gebelik oranı, klinik gebelik oranı, devam eden gebelik oranı FRESH-ET grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p=0,013$ $p=0,017$ $p=0,007$). 37 yaş altı hastalarda gruplarda gebelik özelliklerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Bununla birlikte, FET döngüleri sonrası klinik gebelik oranındaki artışın, yüksek E2 seviyelerinin çıkarılmasıyla mı yoksa altta yatan hastalığa bağlı diğer faktörlerin bir sonucu ile ilişkili olup olmadığını bilmiyoruz. Serum E2 seviyelerinin aşağı düzenlenmesi gebelik oranlarının artmasının doğrudan bir nedeni olabilir. Yüksek E2 ve proesteron düzeyleri de dahil olmak üzere, COS ile indüklenen hormonal dalgalanmalarda FET ile ilişkili düzelme, klinik gebelik oranlarında bir

artıŖa neden olabilir. FET döngülerinin implantasyon oranındaki dŖuŖ yalnızca, bozuk folikül geliŖimi değil, aynı zamanda, yüksek dolaŖımdaki E2 seviyelerine bağlı olarak baŖarısız alıcılığın sonucu olduğu tartıŖılan konular arasındadır. Gebe kalmayı baŖaramayan kadınların serum E2 düzeylerinin, gebe kalanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu ErŖahin ve arkadaşlarının yaptığı alıŖmada gsterilmiŖtir [70].

FRESH-ET veya FET sikluslarından gelen kaliteli embriyolar, E2'ye bağlı bir implantasyon hatasından geçebilir. Son olarak, yüksek serum E2 veya progesteron düzeylerine sahip implantasyon baŖarısızlıęı olan kadınlar için FET'nin rutin kullanımını tavsiye etmeden önce, FET sikluslarının zamanlaması ve yüksek serum E2 ve progesteron değerleri gibi soruları yanıtlanmamız gerekir.

7. SONUÇ

Bu alıŖmada, yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında, geliŖmekte olan tüm embriyoların dondurularak transferinin ötelenmesi yaklaŖımının, blastosist transferi planlanmıŖ hastalarda klinik sonuçları bakımından incelenmesini amaçladık.

Bu amaçla Ocak 2010 – Aralık 2015 tarihleri arasında alıŖmaya katılma kriterleri bakımından uygun bulunmuŖ taze blast embriyo transferi gerekleŖtirilen hastalar ile (1.grup) tedavide tüm embriyoları dondurulmuŖ, daha sonraki bir zaman diliminde bu embriyoların çözülerek blastosist aŖamasına kadar kültürü sonrası transferi gerekleŖtirilen (2.grup) olguların embriyolojik ve klinik sonuçları karŖılaŖtırıldı.

Sonuç olarak; 1. ve 2. grup arasında hasta özellikleri açısından herhangi bir fark olmamasına rağmen klinik gebelik 1. grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı. Hastalar yaŖ gruplarına göre kategorize edildiğinde 37 yaŖ altı grupta 1. ve 2. grup arasında gebelik oranları açısından bir fark gözlenmedi. Ancak 37 yaŖ ve üstü grupta gebelik oranlarının daha yüksek oranda saptandığı gözlendi. Bu bulgular doğrultusunda dondurulmuŖ embriyo transferi (FET) yaklaŖımının hastaların tedavi yanıtını olumlu yönde etkilediği kanaatine varıldı. Taze embriyo transferine karŖılık dondurulmuŖ embriyo transferini tercih etmemize neden olacak olan bu bulgularda daha çok endometriyum reseptivitesinin etkisinin olduğu kanısına varıldı.

8. KAYNAKLAR

- [1]. Luyet BJ. Differential staining for living and dead cells. *Science* 1937;85(2195):106.
- [2]. Watson PF, Morris GJ. Cold shock injury in animal cells. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1987;41:311-40.
- [3]. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972;178(4059):411-4.
- [4]. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eightcell embryo. *Nature* 1983;305(5936):707-9.
- [5]. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010;94(5):1700-6.
- [6]. Kattera S, Chen C. Cryopreservation of embryos by vitrification: current development. *Int Surg* 2006; 91(5 Suppl):S55-62.
- [7]. Fadini R, Brambillasca F, Renzini MM, Merola M, Comi R, De Ponti E, et al. Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod Biomed Online* 2009;19(2):171-80.
- [8]. Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006;86(1):20-6.
- [9]. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev* 2001;58(3): 342-7.
- [10]. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51(1):53-8.
- [11] Ménézo YJ. Blastocyst freezing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115 Suppl 1:S12-5.

[12] Agca Y, Liu J, Peter AT, Critser ES, Critser JK. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol Reprod Dev* 1998;49(4):408-15.

[13] Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a microneedle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2006;21(12):3246-52.

[14] Guerif, F., Cadoret, V., Poindron, J., Lansac, J. and Royere, D. (2003)

Overnight incubation improves selection of frozen-thawed blastocysts for transfer: preliminary study using supernumerary embryos. *Theriogenology* 18, 1853-1857.

[15] Roque M, Lattes K, Serra S, Sola I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;99:156–162. [[PubMed](#)]

[16] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril*. 2011;96:344–348. [[PubMed](#)]

[17] Richter KS, Shipley SK, McVeary I, Tucker MJ, Widra EA. Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos. *Fertil Steril*. 2006;86:862–866. [[PubMed](#)]

[18] Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM. Clinical aspects of pregnancies established with cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 757- 768, 1980.

[19] Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1991 results from the Society for Assisted Reproductive Technology generated from the American Fertility Society Registry, *Fertil Steril* 59: 956- 62, 1993.

[20] Vayena E, Rowe P, Griffin P. Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction. Report of a meeting on Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction held at WHO Headquarters In; 2002 17-21 September 2001; Geneva, Switzerland; 2002.

[21] Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod* 2003; 18: 1959-66. [CrossRef]

[22] Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a populationbased prospective study. *Fertil Steril* 2003; 79: 577-84. [CrossRef]

[23] Gomel V, Urman B, Yarali H. Investigation of the infertile couple. In: Aksel S , Beksac S, editors. *Reproductive Endocrinology and Infertility Medical Network*, Ankara, 1993.p.143-55.

[24] Maroulis GB. Effect of aging on fertility and pregnancy. *Semin Reprod Med* 1991; 9: 165-75. [CrossRef]

[25] van der Steeg JW, Steures P, Hompes PG, Eijkemans MJ, van der

Veen F, Mol BW. Investigation of the infertile couple: a basic fertility work-up performed within 12 months of trying to conceive generates costs and complications for no particular benefit. *Hum Reprod* 2005; 20: 2672-4. [CrossRef]

[26] The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril* 2004; 82: 196-72.

[27] World Health Organization. WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Male. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

[28] Krester DM, Baker HWG. Human Infertility: The male factor in reproductive endocrinology, surgery and technology. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. Lippincott-Raven: New York. 1996; 2031-66.

[29] Brannstrom M, Zackrisson U, Hagstrom HG, et al. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril* 1998; 69: 435-42. [CrossRef]

[30] Vermesh M, Kletzky OA, Dajavan V, Israel R. Monitoring techniques to predict and detect ovulation. *Fertil Steril* 1987; 47: 259-64.

[31] Wathen NC, Perry L, Lilford RJ, Chard T. Interpretation of single progesterone

measurement in diagnosis of anovulation and defective

luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Br Med J*

(Clin Res Ed) 1984; 288: 7-9. [CrossRef]

[32] Duggan MA, Brashert P, Ostor A, Scurry J, Billson V, Kneafsey P, et al.

The accuracy and interobserver reproducibility of endometrial dating.

Pathology 2001; 33: 292-7. [CrossRef]

[33] Marcoux S, Maheux R, Berube S. Laparoscopic surgery in infertile

women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative

Group on Endometriosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 217-22. [CrossRef]

[34] Dubuisson JB, Bouquet de Joliniere J, Aubriot FX, Darai E, Foulot H,

Mandelbrot L. Terminal tuboplasties by laparoscopy: 65 consecutive

cases. *Fertil Steril* 1990; 54: 401-3.

[35] Strandell A, Lindhard A. Why does hydrosalpinx reduce fertility?

The importance of hydrosalpinx fluid. *Hum Reprod* 2002; 17: 1141-5.

[CrossRef]

[36] Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and

severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle

of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and

embryo transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 344-50. [CrossRef]

- [37] Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;95:50–60.
- [38] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006;12:731–46.
- [39] Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update* 2003;9:515–22.
- [40] Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Steirteghem AV, et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin release hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002;78:1025–9.
- [41] Simon C, Velasco JJG, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohí J, et al. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril* 1998;70:234–9.
- [42] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. High ongoing pregnancy rates after deferred transfer through bipronuclear oocyte cryopreservation and post-thaw extended culture. *Fertil Steril* 2009; 92:1594–9.
- [43] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguire M, Thomas S. Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertil Steril* 2008;90:302–9.
- [44] Richter KS, Shipley SK, McVeary I, Tucker MJ, Widra EA. Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos. *Fertil Steril* 2006;86:862–6.
- [45] Herrero L, Martínez M, Garcia-Velasco JA. Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr Opin ObstetGynecol* 2011;23:245–50.
- [46] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Similar ongoing pregnancy rates after blastocyst transfer in fresh donor cycles and

autologous cycles using cryopreserved bipronuclear oocytes suggest similar viability of transferred blastocysts. *Fertil Steril* 2010;93:319–21.

[47] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011; 96:344–8.

[48] Griesinger G, von Otte S, Schroer A, Ludwig AK, Diedrich K, Al-Hasani S, et al. Elective cryopreservation of all pronuclear oocytes after GnRH agonist triggering of final oocyte maturation in patients at risk of developing OHSS: a prospective, observational proof-of-concept study. *Hum Reprod* 2007;22: 1348–52.

[49] Griesinger G, Schultz L, Bauer T, Broessner A, Frambach T, Kissler S. Ovarian hyperstimulation syndrome prevention by gonadotropin-releasing hormone agonist triggering of final oocyte maturation in a gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in combination with “freeze-all” strategy: a prospective multicentric study. *Fertil Steril* 2011;95:2029–33

[50] Nayeri F, AghahosseiniAM , Alyasin A, Nili F. Outcome of newborns conceived through artificial reproductive techniques in Tehran Iran. *Iran JReprod Med.* 2006;4:57–62.

[51] Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet.* 1976;1:880–2. [[PubMed](#)]

[52] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978;2:366.[[PubMed](#)]

[53] Rubio, I. Kuhlmann, R. Agerholm, I. Kirk, J. Herrero, J. Escriba, M.J. Bellver, J. ve Meseguer, M., (2012). "Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study", *Fertil Steril*, 98: 1458-1463.

[54] Azzarello, A. Hoest, T. ve Mikkelsen, A.L., (2012). "The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture", *Hum Reprod*, 27: 2649-2657.

[55] Liu, Y. Chapple, V. Feenan, K. Roberts, P. ve Matson, P., (2015). "Clinical significance of intercellular contact at the four-cell stage of human embryos, and the

use of abnormal cleavage patterns to identify embryos with low implantation potential: a time-lapse study", *Fertil Steril*, 103: 1485-1491 e1481.

[56] Hlinka, D. Kalatova, B. Uhrinova, I. Dolinska, S. Rutarova, J. Rezacova, J. Lazarovska, S. ve Dudas, M., (2012). "Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability", *Physiol Res*, 61: 513-525.

[57] Kirkegaard, K. Kesmodel, U.S. Hindkjaer, J.J. ve Ingerslev, H.J., (2013). "Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study", *Hum Reprod*, 28: 2643-2651.

[58] Cruz, M. Garrido, N. Herrero, J. Perez-Cano, I. Munoz, M. ve Meseguer, M., (2012). "Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality", *Reprod Biomed Online*, 25: 371-381.

[59] Dal Canto, M. Coticchio, G. Mignini Renzini, M. De Ponti, E. Novara, P.V. Brambillasca, F. Comi, R. ve Fadini, R., (2012). "Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation", *Reprod Biomed Online*, 25: 474-480.

[60] Salamonsen LA, Edgell T, Rombauts LJ, Stephens AN, Robertson DM, Rainczuk A, et al. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertil Steril*. 2013;99:1086–92. [[PubMed](#)]

[61] Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril*. 2013;99:1078–1085. [[PubMed](#)]

[62] Valbuena D, Jasper M, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Hum Reprod*. 1999;14(Suppl 2):107–11. [[PubMed](#)]

[63] Simón C, Cano F, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod*. 1995;10:2432–7. [[PubMed](#)]

[64] Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. Canlı embriyo transferleri yardımcı üreme siklelerinde kriyoprezervasyon-çözülmüş embriyo transferleri ile

değiştirilebilir mi? Rasgele kontrollü bir deneme. J Yardımcısı Reprod Genet. 2010; 27 : 357-363. [[PMC ücretsiz makale](#)] [[PubMed](#)] [Geri çekildi](#)

[65] Belva F, Henriët S, Van den Abbeel E, Camus M, Devroey P, Van der Elst J, et al. ICSI ve IVF ile elde edilen kriyopreservasyonlu embriyoların transferi sonrasında doğan 937 çocuğun yenidoğan sonuçları ve yeni ICSI ve IVF sikluslarının sonuç verileri ile karşılaştırılması. Hum Reprod. 2008; 23 : 2227-2238. [[PubMed](#)]

[66] Takeshima K, Saito H, Nakaza A, Kuwahara A, Ishihara O, Irahara M, ve ark. Japonya'daki yardımcı üreme teknolojisinde etkinlik, güvenlik ve eğilimler-ulusal kayıt sisteminden dört yıllık verilerin analizi. J Yardımcısı Reprod Genet. 2014; 31 : 477-484. [[PMC ücretsiz makale](#)] [[PubMed](#)]

[67] Aflatoonian A, Mansoori Moghaddam K, Mashayekhy E, erken hamilelik ve sanat döngüsü içinde dondurulmuş ve taze embriyo transferi sonrası neonatal Mohamadian F. karşılaştırması. J Yardımcısı Reprod Genet. 2010; 27 : 695-700. [[PMC ücretsiz makale](#)] [[PubMed](#)]

[68] Ashrafi M, Jahangiri N, Hassani F, Akhoond MR, Madani T. Donmuş çözdürülen embriyo transfer döngüsünün sonucunu etkileyen faktörler. Tayvan J Obstet Gynecol. 2011; 50 : 159-164. [[PubMed](#)]

[69] JH, Pinto J, Liss JR, Choe JK. İn vitro fertilizasyon-embriyo transferi yapılarak yumurtalık oosit rezervi ve gelişmiş üreme yaşı olan kadınların gebelik sonuçlarının iyileştirilmesi. Clin Exp Obstet Gynecol. 2008; 35 : 167-169. [[PubMed](#)]

[70] Adeviye Erşahin A, Acet M, Erşahin SS, Dokuzeylül Güngör N. Frozen embriyo transfer prevents the detrimental effect of high estrogen on endometri umreceptivity. J Turk Ger Gynecol Assoc. 2017 Mar 15;18(1):38-42. doi: 10.4274/jtgga.2016.0186.

[71] Wong KM, van Wely M, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. Cochrane Database of Systematic Reviews 2017, Issue 3. Art. No.: CD011184. DOI: 10.1002/14651858.CD011184.pub2.