



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

**TÜP BEBEK UYGULAMALARINDA ÖPLOİD EMBRİYO  
TRANSFERİ YAPILAN DONMA ÇÖZME SİKLUSLARINDA  
UYGULANAN ENDOMETRİYAL HAZIRLIK  
PROTOKOLLERİNİN GEBELİK SONUÇLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Aml ERTÜRK**

**UZMANLIK TEZİ  
olarak hazırlanmıştır**

**ANKARA  
2018**





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

**TÜP BEBEK UYGULAMALARINDA ÖPLOİD EMBRİYO  
TRANSFERİ YAPILAN DONMA ÇÖZME SIKLUSLARINDA  
UYGULANAN ENDOMETRİYAL HAZIRLIK  
PROTOKOLLERİNİN GEBELİK SONUÇLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Anıl ERTÜRK**

**UZMANLIK TEZİ**

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

**ANKARA  
2018**

## TEŞEKKÜR

Fakülte yıllarından uzmanlık sürecimin sonlarına kadar bilgi ve değerli tecrübelerinden yararlanabilme fırsatı yakaladığım, tez öğrencisi olabilme şansı ve onuruna nail olduğum, tez oluşturma aşamasında desteğini esirgemeyen, tez sürecimin başlangıcından itibaren yol aldığım her adımda en ince ayrıntıyla bile en disiplinli şekilde ilgilenen kıymetli hocam, sayın Prof. Dr. Hakan Yaralı'ya;

Uzmanlık eğitimim boyunca emeği geçen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarıma; Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı' mız Prof. Dr. G. Serdar Günalp, Prof. Dr. Kunter Yüce, Prof. Dr. Sinan Beksaç, Prof. Selçuk Tuncer, Prof. Dr. Özgür Deren, Prof. Dr. Coşkun Salman, tez aşamasında tecrübelerine başvurduğum Prof. Dr. Gürkan Bozdağ, Doç.Dr. İbrahim Esinler, Doç. Dr. Özgür Özyüncü, Doç. Dr. Murat Gültekin, fikirleri ve yaklaşımları ile bana yol gösteren Doç. Dr. Nejat Özgül'e;

Gerek eğitim gerekse tez oluşturma dönemimde deneyimlerini benimle paylaşan, içtenlikle yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Sezcan Mümüşoğlu'na;

Doç. Dr. Mehtap Polat ve Dr. Zuhal Yapıcı başta olmak üzere tüm Anatolia Tüp Bebek Merkezi ailesine;

Asistanlık hayatım boyunca doğumhane, poliklinik , ameliyathane, servisler, tüp bebek, onkoloji ve perinatoloji ünitelerinde birlikte çalıştığım , uzman doktorlara; araştırma görevlisi, hemşire ve personel arkadaşlarıma;

Her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen, eğitim hayatımın her döneminde sabır ve sonsuz anlayış gösteren sevgili annem ve babam Dr. Şayegan Şule Önal ve Dr. Hüseyin Can ERTÜRK' e ve canım kardeşim Selen ERTÜRK'e;

Fakültenin ilk gününden bu yana birlikte yürüdüğüm en kıymetli meslektaşım, hayatımın her anını paylaştığım en yakın dostum, sevgili eşim Dr. Nergis ERTÜRK'e

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Anıl ERTÜRK

Ankara, 2018

## ÖZET

**AMAC:** Son yıllarda dondurulmuş embriyo transfer (DET) sikluslarının kullanımında artış eğilimi görülmektedir. DET siklusları sırasında endometriyumu hazırlamak için çeşitli protokoller uygulanmaktadır. Buna rağmen; özellikle trofektoderm biyopsi yapıldıktan sonra test edilen blastokistlerin transferinde kullanılan en iyi endometriyal hazırlık protokol seçimi için veri yetersizliği mevcuttur . Mevcut çalışmada, donma çözme sikluslarında anöploidi için pre-implantasyon genetik tarama (PGT-A) sonrasında endometriyal hazırlık için en iyi protokolün belirlenmesi amaçlandı.

**METOT:** Mayıs 2015 ile Haziran 2017 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Ünitesi, Anatolia Kadın Sağlığı ve Tüp Bebek Merkezi'nde PGT-A uygulandıktan sonra DET siklusuna giren tüm hastalar incelendi Çalışmaya, yalnızca ileri maternal yaş ( $\geq 35$  yıl) nedeniyle 5. veya 6. günde trofektoderm biyopsi ile test edilen hastalar dahil edildi. Çalışmada monogenetik hastalıklar ve translokasyon için PGT yapılan olgular hariç tutulmuştur. Sonuçta toplam 155 ilk DET döngüsü retrospektif olarak tanımlandı ve analiz edildi. Anöploidi tanısı için yeni nesil dizileme (NGS) ve dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) tercih edildi. Hastalar endometriyal hazırlık protokolüne göre aşağıdaki şekilde gruplandırıldı; gonadotropin salgılatıcı hormonu agonisti (GnRHa) supresyonu olan artifisiyel siklus (AS) (n = 113), doğal siklus (DS) (n = 19) GnRHa supresyonu olmayan artifisiyel siklus (n = 15) ve oral kontraseptifli (OK) GnRHa supresyonu olan AS (n = 8). Tüm sikluslarda tek öploid embriyo transferi gerçekleştirildi.

Primer çıktı; embriyo transferi başına devam eden/canlı gebelik sayısı. İkincil çıktılar; implantasyon oranı, embriyo transferi başına klinik gebelik oranı, düşük oranıdır.

**BULGULAR:** Demografik özellikler değerlendirildiğinde, ortalama kadın / erkek yaş, kadın vücut kütle indeksi, önceki siklus sayısı, infertilite süresi ve antral folikül sayısı karşılaştırılabilir düzeydedi. Yumurtalık uyarımı sırasında kullanılan toplam FSH dozu, toplanan oosit sayısı ve 2-pronukleus embriyo sayısı da tüm gruplar arasında benzerdi. İmplantasyon, klinik gebelik, biyokimyasal gebelik oranları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. GnRHa supresyonlu AS, DS, GnRHa

supresyonu olmayan AS ve OK ile GnRHa supresyonlu AS'de devam eden gebelik / canlı doğum oranları sırasıyla % 46.9, % 52.6, % 49 ve % 62.5 idi ( $p = 0.821$ ).

**SONUÇ:** PGT-A sonrası DET yapılan hastalarda herhangi bir endometriyal hazırlık protokolünün birbirine üstünlüğü yoktur.

**ANAHTAR KELİMELER:** İN VİTRO FERTİLİZASYON, DONMUŞ EMBRİYO TRANSFERİ, ENDOMETRİYAL HAZIRLIK, PREİMLANTASYON GENETİK TARAMA

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** There has been increasing trend in the use of frozen embryo replacement (FER) cycles in recent years. Although various protocols have been used to prepare the endometrium during FER cycles, there is paucity of data for the best protocol particularly when tested blastocysts were transferred after trophoctoderm biopsy. In the current study, we aimed to determine the best protocol after pre-implantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) in frozen-thawed cycles.

**METHOD:** All patients undergoing FER cycle after PGT-A were scrutinized in Reproductive Endocrinology and Infertility Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Hacettepe University and Anatolia Women's Health and In-Vitro Fertilization Center between May-2015 and June-2017. Only patients tested via trophoctoderm biopsy due to advanced maternal age ( $\geq 35$  years) either on Day 5 or 6 were included. Nevertheless, cases for PGT due to monogenetic diseases and translocation were excluded. Of them, a total of 155 initial FER cycles were retrospectively identified and finally analyzed. Next generation sequencing (NGS) and array comparative genomic hybridization (aCGH) had been preferred for the detection of aneuploidy. The patients were stratified according to the protocol of FER as follows; artificial endometrial preparation (AC) with gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) suppression (n = 113), natural cycle (NC) (n = 19), AC without GnRHa suppression (n = 15) and oral contraceptive pill plus AC with GnRHa suppression (n = 8). Single euploid embryo transfer was performed in all cycles. Primary outcome was ongoing pregnancy/live birth rate per embryo transfer (ET). Secondary outcomes were implantation rate, clinical pregnancy rate per ET and miscarriage rate.

**RESULTS:** In the context of demographic features, mean female/male age, female body mass index, number of previous cycles, duration of infertility and number of antral follicles were comparable. The total FSH dose used during ovarian stimulation, number of oocytes collected and number of 2-pronucleus embryos were also similar among all groups. Implantation, clinical pregnancy, biochemical pregnancy rates did not differ significantly between groups at all. The ongoing pregnancy/live birth rates were 46.9%, 52.6%, 49% and 62.5% in AC with GnRHa suppression, NC, AC without GnRHa suppression and OC plus AC with GnRHa suppression arms, respectively (p= 0.821).

**CONCLUSION:** In patients undergoing FER cycle particularly after PGT-A, any of endometrial preparation protocol was superior in terms of ongoing pregnancy/live birth rate. However, those results should be confirmed with a randomized controlled trial with a larger sample size.

**KEYWORDS:** IVF, FROZEN EMBRYO TRANSFER, ENDOMETRIAL PREPARATION, PREIMPLANTATION GENETIC TESTING FOR ANEUPLOIDY



## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>viii</b>
<b>KISALTMALAR .....</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>xi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>xii</b>
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. PREİMLANTASYON GENETİK TESTLER ve SONUÇLARI.....	5
2.2. BİYOPSİ ÇEŞİTLERİ ve ZAMANLAMA .....	7
2.2.1. KLİVAJ EVRE BİYOPSİSİ .....	8
2.2.2. POLAR CİSİM BİYOPSİSİ .....	9
2.2.3. TROFEKTODERM BİYOPSİSİ.....	10
2.3. EMBRİYO KRİYOPREZERVASYONU .....	11
2.4. DONMA-ÇÖZME SİKLUSLARI İÇİN ENDOMETRİYAL HAZIRLIK PROTOKOLLERİ .....	13
2.4.1. DOĞAL SİKLUS.....	14
2.4.2. ARTİFİSİYEL SİKLUS.....	17
2.4.3. DİĞER SİKLUSLAR .....	24
2.5. LUTEAL FAZ DESTEĞİ .....	24
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>26</b>
3.1. HASTA SEÇİMİ ve VERİ TOPLANMASI .....	26
3.2. OVARYAN STİMULASYON PROTOKOLLERİ.....	26
3.3. BLASTOKİST BİYOPSİSİ VE DONMA-ÇÖZME YÖNTEMLERİ .....	27
3.4. GENETİK ANALİZ.....	29
3.5. ENDOMETRİYAL HAZIRLIK PROTOKOLLERİ.....	29
3.6 İSTATİKSEL ANALİZ .....	30
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>35</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERANSLAR.....</b>	<b>41</b>

## KISALTMALAR

<b>aCGH</b>	:	Microassay Genomik Hibridizasyon
<b>ark.</b>	:	arkadaşları
<b>AS</b>	:	Artifisiyel Siklus
<b>aSNP</b>	:	Tek Nükleotit Polimorfizm
<b>ASRM</b>	:	Amerikan Reprodüktif Tıp Cemiyeti
<b>CDC</b>	:	Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
<b>CI</b>	:	Güven Aralığı
<b>DET</b>	:	Dondurulmuş Embriyo Transferi
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>DS</b>	:	Doğal Siklus
<b>E<sub>2</sub></b>	:	Östradiol
<b>ESHRE</b>	:	Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği
<b>FISH</b>	:	Floresan in Situ Hibridizasyon
<b>FSH</b>	:	Folikül stimüle edici hormon
<b>GnRH</b>	:	Gonadotropin
<b>hCG</b>	:	İnsan Koryonik Gonadotropin
<b>HLA</b>	:	İnsan Lökosit Antijen
<b>hMG</b>	:	İnsan Menapozal Gonadotropin
<b>HRT</b>	:	Hormon Replasman Tedavisi
<b>İHT</b>	:	İç Hücre Tabakası
<b>İM</b>	:	İntramuskuler
<b>İVF</b>	:	İn vitro Fertilizasyon
<b>KKT</b>	:	Karşılaştırmalı Kromozom Taraması
<b>KP</b>	:	Kriyoprotektan
<b>LFD</b>	:	Luteal Faz Desteği
<b>LH</b>	:	Lüteinleştirici Hormon
<b>mDS</b>	:	modifiye Doğal Siklus
<b>n</b>	:	sayı

<b>NGS</b>	:	Yeni Nesil Dizileme ( New Generation Sequencing)
<b>OHSS</b>	:	Ovaryan Hiperstimulasyon Sendromu
<b>OK</b>	:	Oral Kontraseptif
<b>OR</b>	:	Olasılık Oranı
<b>OS</b>	:	Ovaryan Stimülasyon
<b>PB</b>	:	Polar Cisimcik
<b>PGT</b>	:	Preimplantasyon Genetik Tanı
<b>PGT-A</b>	:	Anöploidi için Preimplantasyon Genetik Tarama
<b>PGT-M</b>	:	Tek Gen Hastalığı için Preimplantasyon Genetik Tarama
<b>PGT-TRANSLOKASYON</b>	:	Translokasyon taraması için yapılan PGT
<b>PPD</b>	:	Pozitif Prediktif Değer
<b>qPCR</b>	:	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RKÇ</b>	:	Randomize Kontrollü Çalışma
<b>ROC</b>	:	Alıcı İşletim Karakteristiği
<b>SART</b>	:	Yardımcı Üreme Teknolojileri Derneği
<b>TE</b>	:	Trofektoderm Biyopsi
<b>USG</b>	:	Ultrasonografi
<b>WGA</b>	:	Tam Genomik Amplifikasyon
<b>YÜT</b>	:	Yardımcı Üreme Teknikler

## ŞEKİL DİZİNİ

<b>ŞEKİL 1.</b> Birleşik Devletler’ de 2007-2015 yıllarına ait YÜT siklus sayısı, YÜT ile oluşan canlı doğum ve infant sayıları(ASRM - SART verisi) .....	3
<b>ŞEKİL 2.</b> Birleşik Devletler’ de 2007-2015 yılları arasında yıllara göre non-donör taze embriyo-dondurulmuş embriyo siklus sayıları dağılımı. (ASRM - SART verisi).....	3
<b>ŞEKİL 3.</b> Avrupa’ da 2007-2015 yıllarına ait YÜT siklus sayısı, YÜT ile oluşan canlı doğum ve infant sayıları yapılan (ESHRE verisi).....	4
<b>ŞEKİL 4.</b> Avrupa’ da 2007-2013 yılları arasında yapılan taze embriyo- donmuş embriyo siklus sayılarının dağılımı (ESHRE verisi).....	4
<b>Şekil 5.</b> 2009-2010 ve 2012-2013 yılları arasında biyopsi yöntemlerinin kullanım oranları. ESHRE PGTKonsorsiyum .....	11
<b>Şekil 6.</b> Soğutma yöntemlerinin şematik gösterimi. Kasai et al. 2004 .....	12

## TABLO DİZİNİ

<b>TABLO 1.</b> İnsan blastokist skorlama sistemi, Gardner & Schoolcraft, 1999 .....	28
<b>TABLO 2.</b> Farklı endometriyal hazırlık protokollü hastaların temel demografik özelliklerinin, ovaryan stimülasyon protokollerinin ve embriyolojik verilerin karşılaştırılması .....	32
<b>TABLO 3.</b> Endometriyal hazırlık protokolleri için öplid blastokist transferinin gebelik sonuçları .....	33
<b>TABLO 4.</b> Devam eden gebelik tahmininde lojistik regresyon analizi .....	34

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, kadın yaşı 35'in altındaysa en az bir yıl, 35'in üstündeyse 6 ay düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememesi olarak tanımlanır (1). İnfertilite tüm dünyada sıkça karşılaşılan klinik bir problem olup, çiftlerin %13-15' ini etkilemektedir.

İnfertilite tedavisinde yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır. In vitro fertilizasyon (IVF), infertilitenin tedavisinde kullanılan, gebelik oluşturmak için tasarlanmış bir prosedürdür. Genel olarak, overler fertilite ilaçlarının bir kombinasyonu ile uyarıldıktan sonra bir veya daha fazla oosit over foliküllerinden aspire edilir. Bunlar laboratuvar koşullarında (in vitro) döllenir ve bundan sonra bir veya daha fazla embriyo uterin boşluğa aktarılır. Bu adımlar, IVF döngüsü olarak adlandırılan iki haftalık bir zaman aralığında gerçekleşir.

Son yıllarda dondurulmuş embriyo transferleri (DET) oranı giderek artmaktadır. Avrupa Üreme Cemiyeti (European Society of Human Reproduction and Embryology; ESHRE) tarafından yayınlanan verilere göre DET siklus oranı 2007'de %24.2 iken, 2013'te bu oran giderek artarak %38.3 olarak raporlanmıştır (2,3). Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) verilerine göre de DET siklus oranlarında artış izlenmektedir (4). Preimplantasyon genetik tarama sıklığının artması nedeniyle, ovaryan hiperstimulasyon sendromu (OHSS) riskinden ve ovaryan stimülasyonun endometriyum üzerine zararlı etkisinden kaçınmak amacıyla da embriyoların dondurulması tercih edilebilmektedir. Ayrıca laboratuvar koşullarının ve vitrifikasyon tekniğinin gelişiminin de bu durumda etkisi büyüktür (5-7).

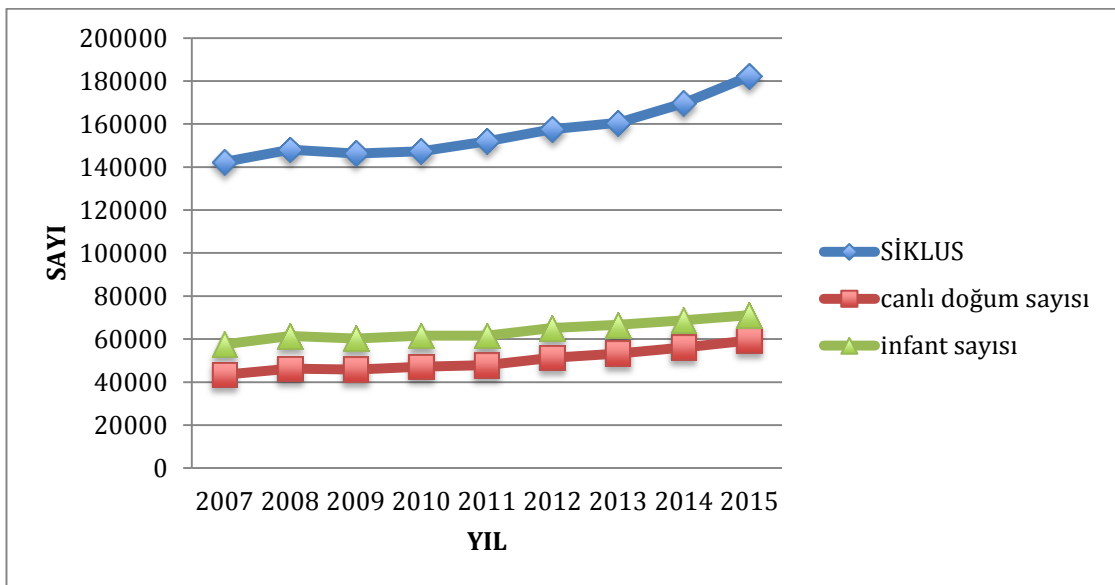
DET sikluslarının uygulanmasının artmasına rağmen standart bir endometriyum hazırlık protokolü henüz tanımlanmamıştır. Kullanılan protokoller artifisyel ve doğal siklus olarak kabaca ikiye ayrılabilir. Artifisyel (yapay) siklusta endometriyal proliferasyon ve foliküler supresyon östrojen desteği ile sağlanır bu

nedenle hormon replasman tedavi (HRT) siklusu olarak da adlandırılabilir. Doğal siklus ise farmakolojik bir ajan kullanılmadan sadece doğal menstrüel siklusun monitorize edilmesidir. Yapılan kısıtlı sayıda çalışmada endometriyal hazırlık protokollerinin birbirlerine, implantasyon veya canlı doğum oranları açısından üstünlüğü olmadığı saptanmıştır. Ancak bu çalışmaların metotları incelendiğinde iki tanesi haricinde transfer öncesi embriyoların kromozom sayısı açısından incelenmediği görülmektedir. Halbuki implantasyon başarısızlığı ve düşükler için en önemli etyolojik faktör embriyo anöploidisi olarak tanımlanmıştır (8). Embriyo morfolojisi ve diğer non-invaziv laboratuvar değerlendirme metodları gibi standart embriyo takip stratejileri kapsamında embriyoların kromozomal açıdan değerlendirilmesi yoktur. Embriyo morfolojisinin ve gelişme hızının mikroskop altında ya da time-lapse incelenmesi, öploid embriyoları anöploid embriyolardan ayırt edememektedir. Teorik olarak, preimplantasyon dönemde embriyoların genetik durumunun belirlenmesinin ve embriyo transferi için sadece öploid embriyoların seçilmesinin, YÜT sikluslarında aktarılan embriyo başına implantasyon oranını arttırması ve muhtemelen düşük olasılığını azaltması beklenmektedir. Kısacası embriyo bağımlı implantasyon faktörünü minimize edebilmek için öploid embriyo transfer edilmesi gerekmektedir. Embriyo bağımlı implantasyon faktörü ortadan kaldırıldığında endometriyumu hazırlamak için en iyi protokol daha iyi bir şekilde tanımlanacaktır.

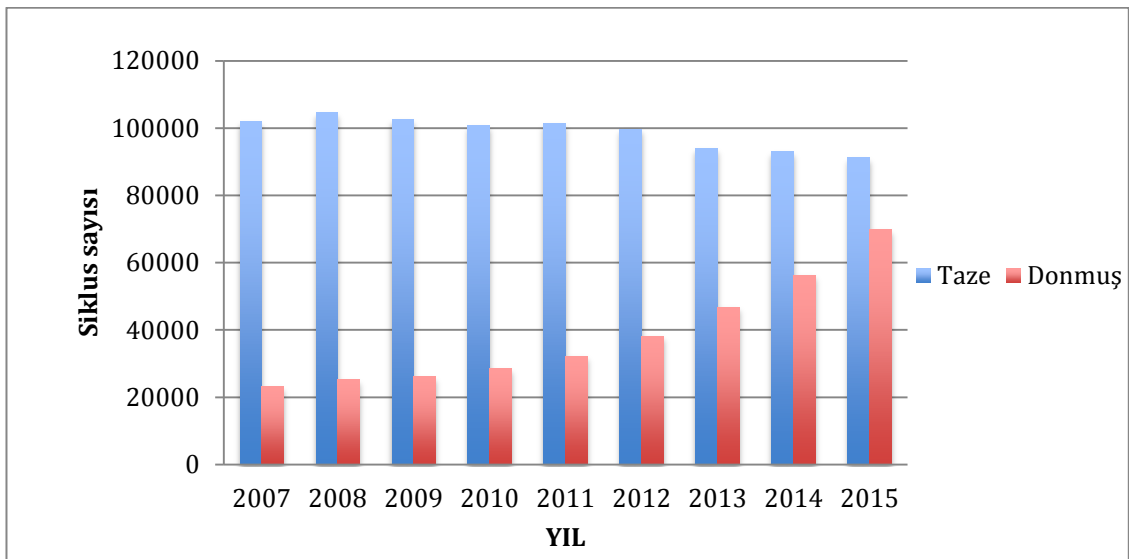
Çalışmamızın amacı; öploid tek embriyo transferi yapılmış, böylece embriyo bağımlı implantasyon faktörü ortadan kaldırılmış olan, donma-çözme sikluslarında kullanılan endometriyal hazırlık protokollerini implantasyon başarısı ve gebelik sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıp, en uygun protokolü belirlemek adına literatüre katkıda bulunmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde infertilite kliniklerine başvuran ve YÜT ile tedavi verilen hasta sayıları gittikçe artmaktadır. ABD CDC verilerine göre siklus sayılarında yıllar içinde artan bir trend izlenmektedir. YÜT siklus sayısı 2007 yılında 142.435 iken %27.8'lik bir artışla 2015'te 182.154 siklus olarak görülmektedir. Buna bağlı olarak canlı doğum sayıları ve yenidoğan sayıları (infant) artmaktadır. Bir doğum sırasında birden fazla bebek doğabildiğinden (örneğin ikizler), yenidoğan sayısı canlı doğum sayısından daha fazladır (Şekil 1) (4).

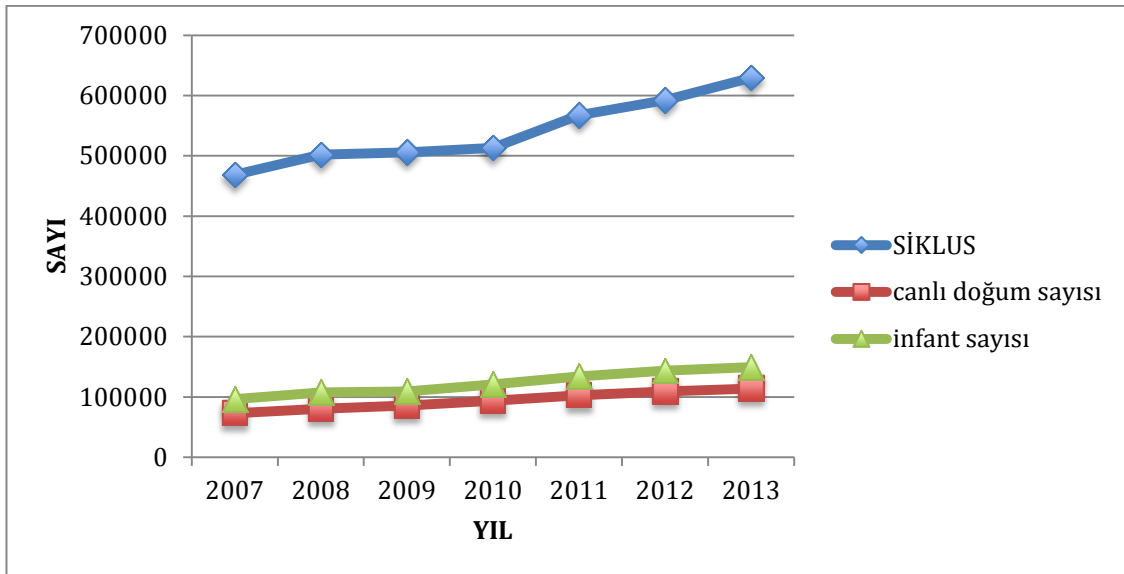


Şekil 1. Birleşik Devletler' de 2007-2015 yıllarına ait YÜT siklus sayısı, YÜT ile oluşan canlı doğum ve infant sayıları (ASRM - SART verisi)

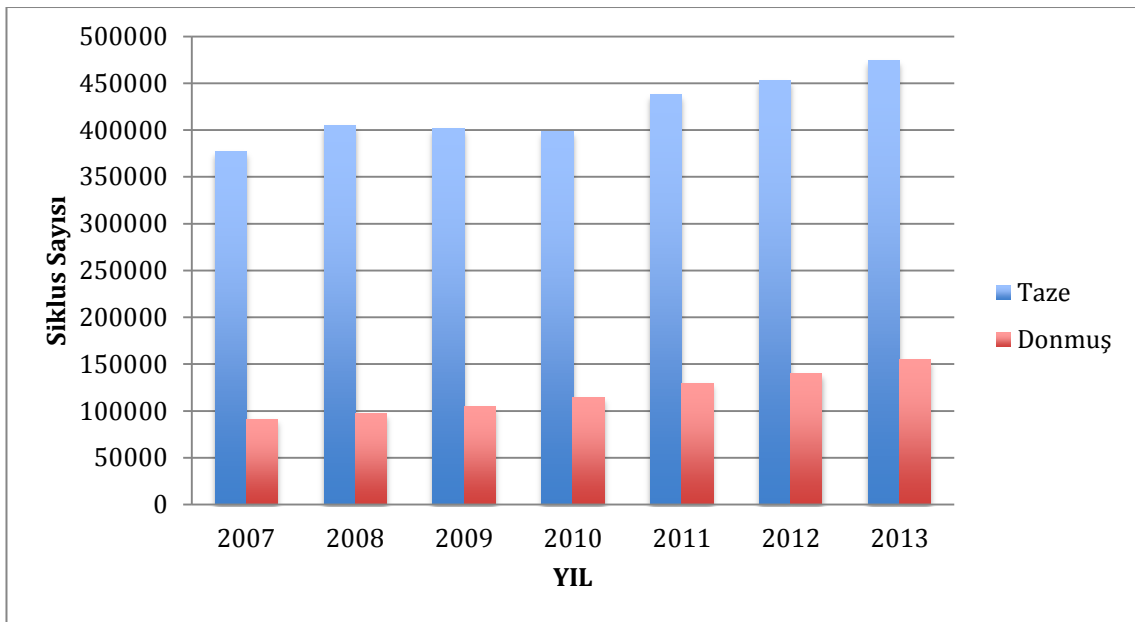


Şekil 2. Birleşik Devletler'de 2007-2015 yılları arasında yıllara göre non-donör taze embriyo-dondurulmuş embriyo siklus sayıları dağılımı. (ASRM - SART verisi)





Şekil 3. Avrupa' da 2007-2013 yıllarına ait YÜT siklus sayısı, YÜT ile oluşan canlı doğum ve infant sayıları (ESHRE verisi)



Şekil 4. Avrupa' da 2007-2013 yılları arasında yapılan taze embryo- donmuş embiryo siklus sayılarının dağılımı (ESHRE verisi)

Avrupa verilerine bakıldığında da yıllar içinde benzer artış paterni görülmektedir. ESHRE 2013 verileri 2012 yılı ile karşılaştırıldığında %7.2'lik bir artış saptandığı belirtilmiştir (3).

YÜT artışına bağlı olarak taze siklulardan transfer edilemeyerek kalan kaliteli embriyoların varlığı, preimplantasyon genetik tanı uygulamalarındaki gelişmeler, OHSS riskinden kaçınma isteği, ovaryan stimülasyonun yol açtığı yüksek progesteron ve östrojen seviyelerinin endometriyum üzerinde neden olduğu embriyo gelişimine uygun olmayan asenkron durum gibi sebepler dolayısıyla son yıllarda DET siklusları da giderek artmaktadır (5–7,9).

ESHRE tarafından yayınlanan verilere göre DET siklus oranı 2007’de %24.2 iken, 2013’te bu oran giderek artarak %38.3 olarak raporlanmıştır (2,3). Amerikan Reprodüktif Tıp Cemiyeti (American Society for Reproductive Medicine; ASRM) YÜT Topluluğu (Society for Assisted Reproductive Technology; SART)’na üye kliniklerin verilerini içeren 2014 yılı klinik özet raporunda non-donör DET siklusu sayısı 56.259 ile non-donör siklusların yaklaşık %37.7’ si olarak raporlanmış iken, 2015 yılı hazırlık raporunda bu sayı 69.882 olarak non- donör IVF sikluslarının yaklaşık %43.4’ ü şeklinde verilmiştir (10).

Günümüzde kullanımı artan DET sikluslarında başarılı olabilmek için ;

- i) Dondurulmaya ve transfere uygun kalitedeki embriyonun seçimi,
- ii) Endometriyum ve embriyo gelişimi arasında senkronizasyonun yakalanması,
- iii) Yeterli luteal faz desteğinin yapılması gereklidir.

## **2. 1. PREİMLANTASYON GENETİK TESTLER VE SONUÇLARI**

Embriyonun in vitro biyopsisi ile 24 kromozomu içeren anöploidi analizlerinin (karşılaştırmalı kromozom taraması – KKT) yanısıra tek gen hastalıkları, mitokondriyal DNA içeriği, mosaizm gibi spesifik genetik bölgelerin de analizi mümkündür.

İki çeşit genetik test vardır: Preimplantasyon genetik tarama (PGT-A) ve preimplantasyon genetik tanı (PGT).

PGT' nin amacı, ebeveynlerden biri veya ikisinin spesifik bir gen mutasyonunun bilinen bir taşıyıcısı olması durumunda spesifik bir gen mutasyonundan etkilenmeyen bir gebelik oluşturmaktır. Ek olarak PGT; bir ebeveyn dengeli translokasyon veya kromozomal yeniden düzenlenme için taşıyıcı olduğunda dengesiz bir kromozom komplemanını tanımlamak için kullanılabilir. Aynı zamanda belirli cinsiyet kromozomu veya insan lökosit antijeni (HLA) türü gibi spesifik bir genetik komplemana sahip olan embriyoları seçmek için kullanılır. Örneğin, bir çocuk Fanconi anemisine sahipse, uyumlu bir HLA tipi olan ve Fanconi anemisinin bulunmadığı bir kardeş, hematopoietik hücre nakli için bir bağışçı olabilir.

PGT-A ise de-novo kromozomal anormallikleri tanımlamayı amaçlar. Başka bir deyişle PGT-A öploid olduğu bilinen çiftin embriyolarındaki subkromozomal delesyonları ve eklemeleri içeren de-novo anöploidiyi tanımlamaktadır.

İnsan üremesindeki majör engel anöploidiler olarak düşünülebilir. Çünkü anöploidi; implantasyon başarısızlığında tek başına en önemli faktördür, yenidoğanlarda anöploidi insidansı düşük olması nedeniyle abortusun ana sebebi olarak düşünülmektedir (11).

PGT-A ile öploid embriyolar belirlenip transfer edildiklerinde implantasyon başarısızlığı ve düşük oranları teorik olarak azalacaktır. Ancak Mastenbroek ve ark. tarafından yapılan metaanalizde ileri maternal yaşta PGT-A'nın faydası olmadığı hatta kümülatif gebelik şansını azalttığı gösterilmiştir (12). Bu sonuçlar ışığında PGT-A otoritelerce uzun süreli kuşkulara yol açmıştır. Ancak bakıldığında Mastenbroek ve ark.'nın çalışmasında ele alınan randomize kontrollü çalışmalar (RKÇ) döneminde PGT-A için standart yaklaşım blastomer biyopsisi ile floresan in situ hibridizasyon (FISH) analiziydi. Teknoloji ilerledikçe daha etkili KKT yöntemleri - kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), mikroassay kompetitif genomik hibridizasyon (aCGH), tek nükleotit polimorfizm (aSNP), yeni nesil dizileme (next generation sequencing; NGS)- tanımlanmıştır. Ayrıca ilerleyen zamanlarda farklı embriyo evrelerinde biyopsi yaklaşımları gündeme gelmiştir.

aCGH metodu kullanılabilirliğini değerlendirilmesi açısından Yang ve ark. tarafından 2012 yılında yayınlanan RKÇ' ye bakıldığında blastokist biyopsisi ve

aCGH yapılan öploid embriyoları, sadece morfoloji ile değerlendirilen embriyolarla klinik gebelik ve devam eden gebelik açısından karşılaştırıldıkları görülmekte, aCGH grubunda sonuçların anlamlı olarak yüksek bulunduğu anlaşılmaktadır (%70.9 vs %45.8  $p=0.017$ ; %69.1 vs %41.7,  $p=0.009$ ; sırasıyla) (13).

2013 yılında yayınlanan başka bir RKÇ’de Scott ve ark. 21-42 yaş arası kadınlarda blastokist biyopsisi ile kromozom taraması yapılmasının implantasyon ve doğum oranlarına etkisini araştırmak için qPCR kullanmışlardır (14). Tarama yapılmayan grupta implantasyon oranları % 47.9 olarak saptanmış, kromozom taraması yapılan grupta ise bu oran %66.4 olarak raporlanmıştır ( $p=0.001$ ). Doğum oranları da sırasıyla %67.5 ve %84.7 olarak verilmiştir ( $p=0.03$ ).

2014 yılında Forman ve ark. yayınladıkları RKÇ’de (BEST çalışması) blastokist biyopsisi yapılmış qPCR uygulanmış öploid tek embriyo transferi ile random (rastgele) iki embriyo transferini karşılaştırmışlardır. Sonuçlara bakıldığında doğum oranları açısından fark saptanmadığı; ancak iki embriyo transferi yapılan grupta çoğul gebelik, preterm doğum, düşük doğum ağırlıklı infant riskinin arttığı görülmektedir. İki embriyo transfer edilen gruptan doğan bebeklerde yoğun bakımda kalma süresi daha uzun olarak hesaplanmıştır (15). Anöploidi taraması yapılarak tek öploid embriyo transfer edilmesiyle gebelik sonuçlarında iyileşme sağlanabilir.

Tüm bunların PGT-A uygulaması üzerinde etkilerini değerlendirmek ve geliştirmek amacıyla hali hazırda yapılmaya devam eden çalışmalar gelecekteki yaklaşımlar açısından yardımcı olacaktır.

## **2. 2. BİYOPSİ ÇEŞİTLERİ VE ZAMANLAMA**

PGT-A uygulaması için kullanılacak hücre, belirli kriterler göz önüne alınarak 3 şekilde elde edilebilir:

1. Klivaj evre biyopsisi
2. Polar cisim biyopsisi
3. Trofektoderm biyopsisi

Optimal yaklaşım için tercih edilen biyopsi şeklinin embriyo gelişimini ve implantasyon potansiyelini engellememesi, embriyonun genetik yapısını direkt yansıtması, klinik geçerliliğinin olması ve maliyet-etkinliğinin kabul edilebilir olması gibi kriterler göz önüne alınması uygun olacaktır.

### **2. 2. 1. Klivaj Evre Biyopsisi**

Klivaj evre biyopsisi; ESHRE rehberine göre en az 6 blastomer içeren 3. Gün embriyodan hücre alınması olarak tanımlanır (16). Klivaj evre biyopsisi için zona pellusidanın lazer, tirod asit veya mekanik yollar ile delinmesi gereklidir. Bu yöntemlerin klinik sonuçlar açısından birbirlerine benzer oldukları yapılan RKÇ'ler ile raporlanmıştır (17,18). Bunların sonuçlarında zonaya müdahale edilmesi blastokiste bir zarar vermiyor gibi duruyor olsa da bu durumun aksini gösteren çalışmalar da vardır. Kirkegard ve ark. klivaj evre biyopsisi yapılan ve işlem uygulanmayan grupları time-lapse ile inceleme sonucu karşılaştırdıkları bir çalışmada blastomer biyopsisinin hatchingi bozduğunu ve blastokist gelişimini yavaşlattığını raporlamışlardır (19). Bunun üzerine Scott ve ark. yaptıkları bir RKÇ'de 116 hastadan transfer için en iyi iki embriyoyu seçip bu hastaların 46'sında embriyolardan birine klivaj biyopsi, 70'inde ise embriyolardan birine blastokist biyopsisi uygulamış, diğer embriyoya her iki grupta da işlem uygulamayıp kontrol grubu oluşturmuşlardır. Kontrol ve biyopsi yapılmış embriyoların ikisi de transfer edilmiş ve gebelik düşükle sonlandığında konseptus materyali veya doğumla sonlandığında yenidoğan bukkal mukozasından alınan DNA örneği ile, implante olan materyalin biyopsi yapılmış veya yapılmamış embriyonun hangisine ait olduğuna bakılmıştır. Bunun sonucunda klivaj evre biyopsisi yapılan grupta implante olan embriyoların %50'sinin kontrol embriyo olduğu, %30.4'ünün biyopsi yapılan embriyolar olduğu saptanmış, biyopsi yapılmış grupta implantasyon ihtimalinde belirgin azalma saptanmıştır (p=0.02). Blastokist biyopsisi uygulanan grupta ise implantasyon oranları %51 ve kontrolde %54 olarak benzer raporlanmıştır. Sonuçta klivaj evre biyopsisi yapılan embriyoların implantasyon oranlarında relatif %39 azalma olduğu saptanmış ve bu nedenle klivaj evre biyopsisinin embriyonun reproduktif potansiyelini azalttığı raporlanmıştır (20).

### 2. 2. 2. Polar Cisim Biyopsisi

Klivaj evre biyopsisinin başarısız olması dünya genelinde yeni yöntemler bulunmasına neden olmuştur. Blastomer biyopsisine alternatif olarak polar cisim (PB) biyopsisi tanımlanmıştır. Ayrıca PB biyopsi, preimplantasyon gelişimin herhangi bir evresinde, embriyo biyopsisinin yasak olduğu ülkelerde kullanılabilir bir yöntemdir.

Erkek genomuna ait bilgileri içermediği için monogenik hastalıkların tanısından faydası kısıtlıdır. 2013'te yapılan bir çalışmada anöploidi için de kısıtlı fayda sağladığı gösterilmiştir (21). Bu çalışmada aynı embriyodan ardışık olarak PB, blastomer ve trofektoderm biyopsisi alınmış ve aCGH ile analiz edilmiştir. Analizler ileri yaş hastalarda preimplantasyon gelişimin kromozomal paternlerini inceleme fırsatı doğurmuştur. Anöploidilerin çoğu mayoz-2 safhasında saptanmıştır. Bu durum PB'lerin ikisinin de incelenmesi gerekliliğine yol açmaktadır; bu durum maliyeti ve emeği iki katına çıkarmaktadır.

Ayrıca PB biyopsisi kullanılırsa paternal, mitoz kaynaklı anöploidiler ve /veya gelişimin ileri basamaklarında olası düzeltilecek olan mayotik hatalar gözden kaçmış olacaktır. Mayoz-1'de oluşan kardeş kromatitlerin erken ayrılması durumu, mayoz-2'de dengelenebilmektedir. PB biyopsisi böyle vakalarda yanlış tanıya sebep olarak reproduktif olarak sağlam olan embriyoların transferini engellemiş olur (22).

Kısacası PB biyopsisi yaklaşımı tanısal kesinliği olmaması ve maliyet etkin bir strateji olmaması nedeniyle değer kaybeden bir yaklaşımdır. Ancak konu ile ilgili RKÇ' lere halen ihtiyaç vardır. Bu konuda ESHRE tarafından yürütülen ve yakın zamanda sonuçlarının beklendiği ESTEEM (The Eshre Study Into The Evaluation of Oocyte Euploidy by Microarray Analysis) çalışmasının yeni bilgiler sağlaması beklenmektedir.

### 2. 2. 3. Trofektoderm Biyopsisi

İlk olarak 2004'te Boer ve ark. tarafından tanımlanmıştır (23). Embriyolar, preimplantasyon gelişim sırasında blastokist evreye geldiklerinde heterojen morfoloji gösterebilirler. Embriyoların morfolojik olarak değerlendirilmeleri veya gelişimsel oranları ile anöploidi oranları arasında korelasyon olmadığı gösterilmiştir (24). Bu nedenle bu evreyi yakalayan embriyodan, kalite kriterlerine bakılmaksızın biyopsi alınması gerekmektedir.

TE biyopsisi için tanımlanmış farklı yöntemler vardır. Zona pellusida klivaj dönemde açılıp blastokist evrede fizyolojik olmayan bir hatching oluşturarak TE hücreleri alınabilir (25) ya da zona pellusida açılması ve TE örneği alınması blastokist evrede eş zamanlı yapılabilir (24). İkinci yöntem blastokist ekspansiyonuna ve zona pellucida incelmeye izin verdiği için daha avantajlı bir yöntem olarak değerlendirilebilir.

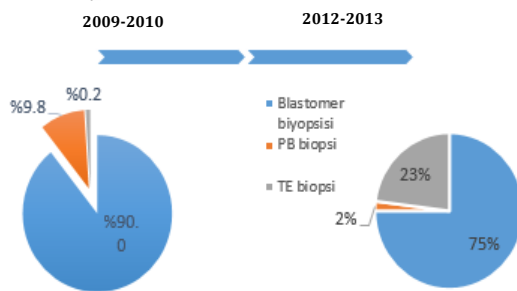
Scott ve ark. yaptıkları klivaj evre biyopsisinin implantasyon oranlarında relatif %39 azalmaya sebep olduğunu gösteren daha önce bahsedilen çalışma sayesinde TE biyopsi uygulaması dünya genelinde tercih edilir hale gelmiştir (20). Yine Scott ve ark. tarafından prospektif, selektif olmayan yöntemle yapılan bir çalışmada blastomer ve TE biyopsi yöntemleri klinik sonuçlar açısından karşılaştırılmıştır (26). Biyopsi sonucunda karşılaştırmalı kromozom tanısı ile öploidi saptanan ve implante olan embriyoda devam eden gebelik veya canlı doğum oranlarına yani yöntemin pozitif prediktif değerine (PPD) bakıldığında blastokist evrede TE biyopsinin PPD'nin, klivaj evredeki blastomer biyopsisinden anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (%48.2 vs %29.2, p=0.0016).

Bunun yanında klinik pratikte blastokist evrede biyopsi yapılması ekonomik açıdan da faydalı olabilmektedir. Çünkü gelişimsel olarak yetersiz olan embriyolar zaten gelişim basamaklarını tamamlayamadıkları için blastokist evreye ulaşmamaktadır. Bu durum sonucunda biyopsi yapılan embriyo sayısı azalmış olacak, zaman ve maliyetten kazanım da artmış olacaktır.

Blastokist evrede kriyoprezervasyonla ilgili sonuçlara bakıldığında ise sağ kalımın yüksek olduğu görülmektedir. Cobo ve ark.nın 3150 çözüme siklusunu doğum oranı açısından inceledikleri vitrifikasyon yöntemi kullanılmış olan bir çalışmada 5.ve 6. gün transferlerde sağ kalım oranları sırasıyla %95.7 ve %97.6 olarak raporlanmıştır (27).

Forman ve ark.nın RKÇ' lerinde; blastokist evrede karşılaştırılmalı kromozom analizi yapılmış frozen tek öploid embriyo transferinin, gebelik oranı açısından analizi yapılmayan iki blastokist transferi ile eşit olduğu gösterilmiştir (28). Böylece tek öploid embriyo transferi ile çoğul gebelik riskinden kaçınılmış olunacaktır.

Blastokist evre biyopsisi stratejilerinin klinik etkinlikleri ile ilgili yapılacak RKÇ' lerin; tekrarlayan gebelik kaybı, ileri anne yaşı ve benzeri infertilite yaratan alt gruplara yönelik olması gelecekteki yaklaşımlar açısından daha fazla yarar sağlayacaktır.



**Şekil 5. 2009-2010 ve 2012-2013 yılları arasında biyopsi yöntemlerinin kullanım oranları. ESHRE PGT konsorsiyum.**

ESHRE PGT konsorsiyum verilerine göre, yukarıda tanımlanan üç biyopsi metodunun uygulama sıklığının değişimi görülmektedir. (Şekil 5)(29).

Sonuç olarak, TE biyopsisi prosedürü sayıları hızla artmaktadır. 2009-2010 yıllarında %0.2 iken 2013'e gelindiğinde bu oran % 23'e çıkmıştır. PB kullanımını ise çok azalmıştır (%9.8'den %2'ye). Bakıldığında bahsedilen dezavantajlar nedeni ile blastomer biyopsisi kullanım oranları azalmıştır ancak halen en sık kullanılan yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

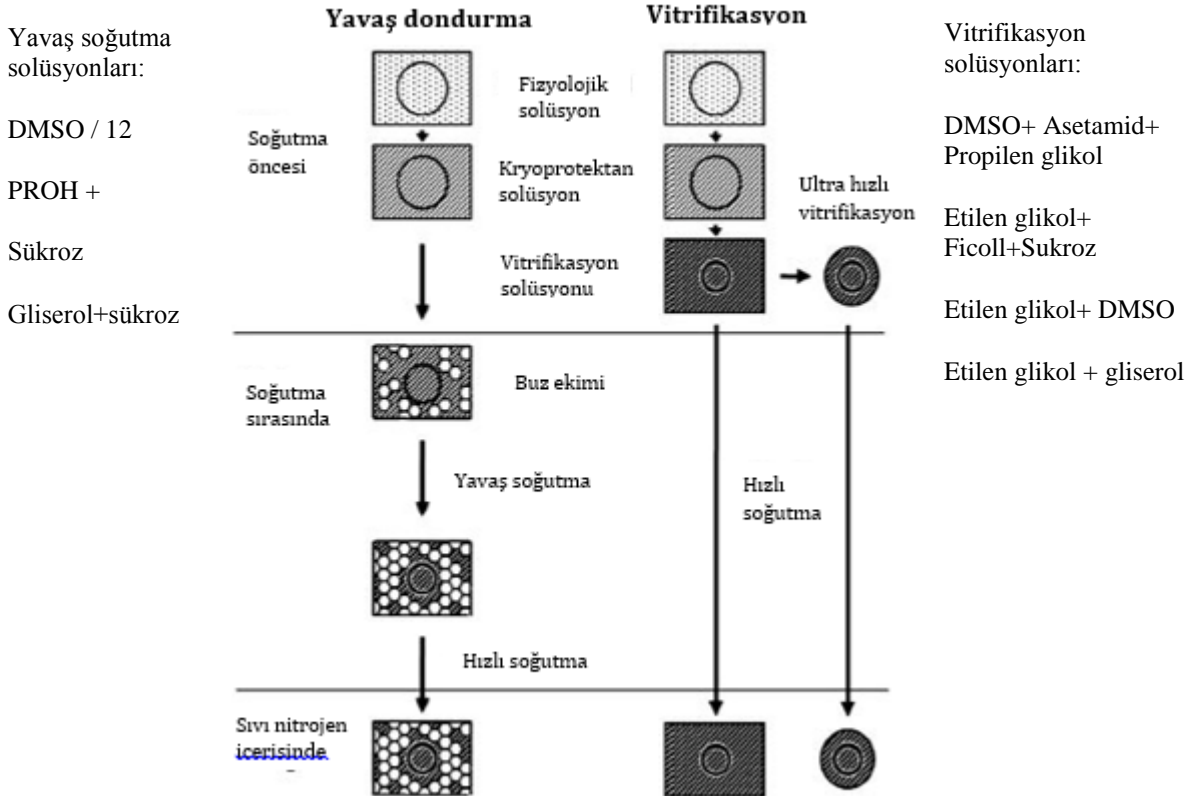
### 2. 3. EMBRİYO KRİYOPREZERVASYONU

Günümüzde YÜT'ün bir parçası da embriyo kriyoprezervasyonudur. Kriyoprezervasyon IVF sikluslarını kademeli olarak yapılmasına imkan vermektedir.



Daha önce de bahsedilen YÜT artışına bağlı olarak taze siklulardan transfer edilemeyerek kalan kaliteli embriyoların varlığı, preimplantasyon genetik tanı uygulamalarındaki gelişmeler, OHSS riskinden kaçınma isteği, ovaryan stimülasyonun yol açtığı yüksek progesteron ve östrojen seviyelerinin endometriyum üzerinde neden olduğu embriyo gelişimine uygun olmayan asenkron durum gibi sebepler dolayısıyla son yıllarda embriyo kriyoprezervasyonu ve sonrasında başka bir zamanda embriyo transferi yani DET sikluslarına yaklaşım artmaktadır (5–7,9).

Kriyoprezervasyonun iki evresi vardır: Dondurma ve çözme. Embriyo kriyoprezervasyonu için kullanılan protokol yaklaşık 20 yıl önce tanımlanmış ve minimal değişikliklerle günümüze kadar gelmiştir (30). 2 ana metot tanımlanmıştır: Yavaş dondurma ve vitrifikasyon. Yavaş prosedürde embriyolar toksisite ve osmotik hasardan kaçınmak amacıyla düşük dozda kriyoprotektanlar (KP) ile yavaş bir şekilde soğutulurlar. Vitrifikasyon metodunda ise embriyolar ani bir şekilde camsılaştırılarak soğutulurlar.



Şekil 6. Soğutma yöntemlerinin şematik gösterimi. Kasai et al. 2004 (31).

2008 yılında yayınlanan bir metaanalizde vitrifikasyon metodunun yavaş soğutmaya daha üstün olduğu gösterilmiştir(32).

Embriyolar zigottan blastokiste kadar herhangi bir dönemde dondurulabilir. Cobo ve ark. 'ın farklı dönemlerde vitrifiye edilmiş embriyoları inceledikleri, daha önce de bahsedilen 3150 sikluluk bir çalışmada, donmuş/çözölmüş herhangi bir gün blastokistlerin sağkalım oranları yüksek ve benzer olarak raporlanmıştır (27).

#### **2. 4. DONMA - ÇÖZME SIKLUSLARI İÇİN ENDOMETRİYAL HAZIRLIK PROTOKOLLERİ**

Son yıllarda DET siklus oranları giderek artmaktadır (4,33) (Şekil 2). Tüm embriyoların dondurulması yaklaşımında i) OHSS'den kaçınma isteği, ii) genetik tarama yöntemlerinin kullanımının artması, iii) endometriyal sıvı veya patoloji olmayacak şekilde embriyo endometriyum senkronizasyonun sağlanabilmesi ve iv) implantasyon oranlarının arttırılabilmesi gibi durumların potansiyel bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, taze siklulardan artakalan embriyoları daha sonra kullanılması için de dondurulma işlemi gündeme gelebilmektedir (34).

Taze ve frozen (donmuş) siklularda implantasyon oranlarını karşılaştıran Shapiro ve ark. nın RKÇ'lerinde, endometriyumun ovaryan stimülasyonun (OS) etkisine maruz kaldığı taze siklularda, implantasyon ve gebelik oranları DET siklulardan daha düşük bulunmuştur (35,36)

DET sikluslarının başarılı olabilmesi için uygun endometriyal hazırlık ve luteal faz desteği yani ekzojen östrojen ve progesteron gerekmektedir. Halbuki taze embriyo kullanılan siklularda endometriyum, endojen üretilen hormonlar ile hazırlanmaktadır.

Ekzojen östrojen ve progesteron desteği için farklı endometriyal hazırlık protokolleri tanımlanmıştır. İmplantasyon oranları arttırabilmek adına birçok farklı ilaç ve farklı uygulama şekilleri denenmiştir. Uzun yıllar DET ve oosit donasyon

sikluslarında endometriyal hazırlık protokolleri kullanılmasına rağmen bu protokoller ile ilgili tanımlanmış optimal bir yaklaşım bulunmamaktadır (37).

Farklı endometriyal hazırlık protokollerine bakıldığında, sınıflandırma ve tanımlama açısından bu protokoller doğal siklus (DS) ve artifisiyel siklus (AS) olarak kabaca ikiye ayrılabilir. Doğal sikluslar; ovulatuvar menstrüel sikluslara sahip kişilerde, endometriyumun implantasyona en uygun olduğu zamanının sadece siklus monitorizasyonu ile saptandığı protokollerdir. Artifisiyel sikluslar ise endometriyal proliferasyon ve foliküler supresyonun östrojen desteği ile sağlandığı bu nedenle HRT siklusu olarak da adlandırılabilen protokollerdir.

#### **2. 4. 1. Doğal Siklus**

DS ile DET uygulamaları sadece düzenli adet gören, ovulatuvar hastalarda kullanılabilir. Spontan ovulatuvar sikluslarda foliküler gelişim, ovulasyon ve luteal fonksiyon; endometriyal proliferasyon ve sekresyon maturasyonunun koordine olmasını, dolayısıyla embriyo gelişimi ve endometriyum arasında senkronizasyon olmasını sağlamaktadır.

İnsanda, endometriyumun trofoblast ve endometriyal etkileşimlerinin en iyi olduğu dönem ‘implantasyon penceresi’ olarak tanımlanmaktadır (38). Noyes ve ark. tarafından tanımlandığı üzere endometriyum menstrüel siklus sırasında östrojen etkisi ile proliferatif, progesteron etkisi ile de sekretuar değişikliklere uğramaktadır (39). Ovulasyondan sonra glandlarda ve vaskularizasyonda artış olması endometriyumun yoğunluğunu arttırmaktadır; böylece olası implantasyon için uygun bir dönem yaşanmaktadır.

DS’ de endometriyumun embriyo ile senkron olduğu yani embriyo transferi için hazır olduğu dönemin saptanabilmesi spontan ovulasyonun takibi ile sağlanır. Ovulasyon takibi için seri endokrin ve ultrasonografik monitorizasyon gereklidir. Endokrin monitorizasyon serum veya üriner luteinleştirici hormon (LH) takibi şeklinde uygulanabilir. LH piki serumda saptandıktan 36-40 saat sonra ovülasyonun

olacağı öngörülmektedir (40). Üriner LH monitorizasyonunda, idrar LH pikinin, serumdaki yükselmeden yaklaşık 21 saat sonra gerçekleşeceği akılda tutulmasında fayda vardır (41).

DS' de LH monitorizasyonundan kaçınmak adına ultrasonografi ile dominant folikül takibi yapıp ovulasyonun ekzojen insan koryonik gonadotropin (hCG) ile tetiklendiği uygulamalara 'modifiye doğal siklus (mDS)' adı verilmektedir. Andersen ve ark.na göre dominant folikül 17-18 mm olduğunda endojen LH yerine hCG uygulanması 36-38 saat içinde oosit maturasyonunu ve ovulasyonu tetiklemektedir (40). Tanımlanan her iki siklusta da, embriyo donma günü göz önüne alınarak embriyonun çözülmesi ve transferi işlemi ovulasyondan sonraki 3-5 gün içinde yapılması uygun bulunmaktadır (42).

DS planlanmasında folikülogenezde oluşabilecek sapmalar nedeniyle beklenmeyen ovulasyon oluşması dolayısıyla embriyo çözme ve transferi günü zamanlamasında zorluklar yaşanabilir. Ayrıca bu sikluslarda kullanılan endokrin monitorizasyon hasta tarafından uygulanabilir bulunmayabilir. Bu durumda mDS'ler ovulasyon kontrolünün sağlanabilmesi nedeniyle daha az monitorizasyon gerektirdiğinden hasta dostu olarak değerlendirilebilir.

Literatüre bakıldığında DS protokolü ve mDS uygulanmasını karşılaştıran iki RKÇ görülmektedir (43,44). Fatemi ve ark. hCG uygulanan hasta grubunda gebelik oranlarının DS'ye göre daha düşük olduğunu raporlarken (%14.3 vs %31.4,  $p=0.025$ ), Weissman ve ark. iki protokol arasında gebelik oranları açısından istatistiksel anlamlı bir farka rastlamamıştır. Fatemi ve ark., hCG planlanan grupta, ilaç öncesi LH piki saptanmış olmasına rağmen hastalara trigger (tetikleme) uygulamasından kaçınmamıştır. Bu durum embriyo ve endometriyum arasında asenkronizasyona yol açarak implantasyon oranlarını azaltmış olabilir. Halbuki Weissman ve ark. hCG uygulanması planlanan ancak ovulasyonun olası belirtilerini taşıyan hastaları çalışma dışı bırakmışlardır. Ayrıca Weissman ve ark. her iki gruba da luteal faz desteği (LFD) verirken, Fatemi ve ark. çalışmasında LFD kullanılmadığı görülmektedir.

2016 yılında mDS ve DS protokollerini karşılaştıran 2353 hasta sayısı olan retrospektif bir çalışmada DS'lerde klinik gebelik oranlarının mDS'ye göre daha fazla olduğu raporlanmıştır (45). Bu çalışmada, Fatemi ve ark. çalışmasının sonuçlarına benzer sonuçlar raporlanmasına rağmen çalışmaların metotlarında farklılıklar olduğu görülmektedir. Detaylı bakıldığında Montagut ve ark. nin embriyo transfer zamanlaması farklıdır; DS'de 3. gün ve 5-6. gün embriyoların transferlerini LH yükselmesinden sonraki 5. ve 6. günlerde; mDS'de ise hCG uygulanmasından sonraki 6. ve 7. günlerde gerçekleştirmişlerdir. Bu durum embriyo-endometriyum senkronizasyonunun daha iyi sağlanmasına yardımcı olmuş olabilir. Halbuki Fatemi ve ark. çalışmasında böyle bir ayrıma gidilmeyip iki grupta da embriyoların, LH yükselmesi ve hCG uygulanmasından sonraki 5. günlerde transfer edildikleri, transfer edilen embriyoların çoğunun 3. gün embriyolar oldukları görülmektedir. Yine Montagut ve ark. Fatemi'den farklı olarak her iki grupta da LFD kullanmışlardır. İki çalışma arasında paralel sonuçlar raporlanmış olsa da Montagut ve ark. çalışmasında klinik gebelik oranlarının daha yüksek olması tüm bu sebeplere bağlanabilir.

mDS' de hCG enjeksiyonu öncesi progesteron seviyesinin yükselmesinin endometriyumla embriyo arasında desenkronizasyona yol açarak gebelik oranlarını azaltabilmesi ile ilişkili olarak 2017 yılında Groenewoud ve ark. tarafından, bir RKÇ olan ANTARCTICA çalışmasının verilerinin bu konuda tekrar incelenmesi sonucunda bir çalışma yayınlanmıştır (46). Bu çalışmaya ANTARCTICA çalışması sırasında serum progesteron ve LH seviyeleri için kan örnekleme yapılan, LFD uygulanmamış 271 hasta dahil edilmiştir. En iyi canlı doğum oranı ile ilişkili progesteron sınırını belirleyebilmek adına ROC eğrisi oluşturulmuş, %51.3 sensitivite ve %63.2 spesifite ile 4.6 nmol/l ve üzerindeki değerlerin doğum oranında düşmeye sebep olabileceği hesaplanmıştır. Aynı zamanda LH seviyesi >10 IU/l olanlar da 'prematür lüteinizasyon' olarak tanımlanmıştır. Buna göre prematür lüteinizasyon %40 hastada saptanmış ve canlı doğum üzerinde etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca sadece progesteron yüksekliği olanlar ile hem progesteron hem de LH yüksekliği olanlar arasında klinik gebelik açısından fark olmadığı raporlanmıştır (%23.2 vs %23.3). Çalışmanın örneklem sayısı yeterli olmaması

nedeniyle progesteron ve gebelik oranları arasında istatistiksel bir bağlantı kurulamamış olabilir. Aralarında ilişki bulunmasa da artmış progesteron, endokrin ve parakrin bozukluğa yol açarak endometriyal reseptivitede değişikliklere ve dolayısıyla azalmış gebelik oranlarına yol açabilir. Ayrıca bu çalışmadaki devam eden gebelik oranları daha önce yapılmış olan diğer çalışmalara göre düşük saptanmıştır. Bunun nedeni ise; çalışma grubunda klivaj evre embriyoları ve yavaş dondurma yöntemi kullanılması olabilir.

DS ve mDS'nin klinik gebelik oranları açısından karşılaştırıldığı 2016 yılında yayınlanan geniş retrospektif bir analizde ise (n=2353), DS kolunda, mDS'ye göre gebelik oranlarının daha yüksek saptandığı raporlanmıştır (%46.9 vs %29.7,  $p<0.001$ ) (45).

#### **2. 4. 2. Artifiyel Siklus**

AS' ler DS'den farklı olarak ovulatuvar veya anovulatuvar hastalarda yanıtım hasta gruplarında uygulanabilir. Bu durumun tedavide esneklik ve kolaylık sağladığı düşünülmektedir.

AS' lerde endometriyumun proliferasyonu ve foliküler gelişimin supresyonu daha önce de bahsedildiği gibi ekzojen östrojen replasmanı ile sağlanmaktadır. Östrojen replasmanı oral, vajinal veya parenteral-transdermal yollarla uygulanabilir. Uygulama metotlarının siklus başarısı üzerindeki etkilerine bakıldığında Glujovski ve ark. tarafından yayınlanan Cochrane veritabanlı metaanalizde bu metotların birbirlerine üstünlüğü olmadığı gösterilmiştir (37).

AS' lerde östrojen verilmesi ile proliferasyonun uyarılmasının yanısıra implantasyona hazırlığın göstergesi olan sekretuar değişikliklerin oluşabilmesi için progesteron desteği yapılması da gerekmektedir. Östrojen replasmanı siklusun ilk günlerinde başlanıp ultrasonografik monitorizasyon ile endometriyal proliferasyon takibinde endometriyal kalınlık 7-9 mm olduğunda progesteron desteği eklenmesi ile, fizyolojik mid-siklus östrojen-progesteron değişimi taklit edilmeye çalışılır (47).

Östrojen ve progesteronun kullanımı tam bir pitüiter supresyonu garanti edemediğinden dominant folikül oluşma riski bulunabilir. Oluşabilen dominant folikül spontan luteinizasyon ile endometriyumun erken dönemde progesteron etkisi altında bırakabilir, dolayısıyla embriyo ve endometriyum arasında senkronizasyon bozulabilir. Bu nedenle AS' lerde pitüiter supresyonu sağlamak, spontan ovulasyonu engellemek amacıyla siklus protokolüne bir gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonist eklenebilir. Bu durumda AS' ler supresyonlu ve supresyonsuz AS olarak iki alt grubu ayrılmaktadır.

AS' ler ekzojen hormon replasmanı ile takip edilen sikluslar olmaları nedeniyle non-fizyolojik olarak değerlendirilebilirler. Ancak bu durum siklus kontrolünün daha kolay yapılmasına imkan verebilir, böylece AS' ler hasta dostu protokoller olarak değerlendirilebilir. Diğer taraftan supresyonlu AS' de ovulasyon inhibisyonu için eklenen GnRH agonist nedeni ile siklus maaliyetinin artacağı aşıkardır.

Supresyonlu ve supresyonsuz AS, gebelik sonuçları açısından incelendiğinde literatüre bakıldığında farklı sonuçlarla karşılaşılmaktadır. 2002 yılında Dal Prato ve ark. tarafından yayınlanan randomize prospektif bir çalışmada ovulatuvar sikluslara sahip hastalarda intramüsküler (im) depo GnRH agonist ile supresyonlu ve supresyonsuz protokoller karşılaştırılmıştır (48). Bu çalışmada; supresyonlu gruba midluteal dönemde tek doz depo im GnRH agonist uygulanmış, menstrasyonun birinci gününde transdermal 17- $\beta$  östradiol 100 mcg başlanıp aralıklı olarak 300 mcg'a çıkmıştır. Supresyonsuz gruba ise siklusun ilk gününde transdermal 17- $\beta$  östradiol, 200 mcg başlanıp 7 gün sonra 300 mcg a çıkılarak uygulanmıştır. Siklus takibinde ultrasonografik olarak; endometriyal kalınlığın 8 mm ve üzerinde olduğunda, preovulatuvar folikül, korpus luteum veya hiperekojen endometriyum görünümü olmadığında yani ovulasyonun olmadığı kanıtlandığında ise progesteron 100 mg/gün im olarak eklenmiştir. ET, progesteron başlanmasından 48 saat sonra uygulanmıştır. Hormonal tedaviye transferden 15 gün sonrasına kadar devam edilmiştir. Sonuçta klinik gebelik oranlarında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (supresyonlu grupta %19.7, supresyonsuz grupta %24.1).

Diğer bir RKÇ'de El-Toukhy ve ark. yine ovulatuvar siklusa sahip hastalarda supresyonlu ve supresyonsuz protokolleri karşılaştırma amacıyla bir grup hastaya mid-luteal fazda (21.gün) nazal GnRH agonist (buserelin) sprey başlayarak supresyonlu grubu oluşturmuşlar, iki gruba da siklusun ilk günü oral 6 mg dozda östradiol valerat başlamışlar, seri ultrasonografi takiplerinde ovulasyon takibi yapmayarak sadece endometriyal kalınlık 8 mm ve üzeri olduğunda günde 800 mg progesteron pesser uygulamaya başlayıp, supresyonlu grupta buserelini kesmişlerdir. ET, progesteron başlanmasının üçüncü gününde gerçekleştirilmiştir. Hormon replasmanına (östrojen + progesteron) transferin 14.gününe kadar, gebelik testi pozitif gelirse gebeliğin 12. haftasına kadar devam edilmiştir. Sonuçta klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının supresyonlu grupta daha yüksek olduğu raporlanmıştır (%24 vs %11.3, p=0.01; %20 vs %8.5, p=0.01) (49).

Bahsedilen çalışmalarda hasta sayıları benzer olmasına rağmen çalışma sonuçları arasında farklılık saptanmasının nedeni Dal Prato ve ark. nın çalışmalarında gruplar arasında farklı östrojen dozları uygulamaları ve ovulasyon takibi yapmaları, spontan ovulasyon ihtimali olan hastaları siklus dışı bırakmaları olabilir. Dal Prato ve ark.nın çalışmasında supresyonsuz grupta siklus iptal oranı %4 olarak bildirilmiştir (48).

Ayrıca 2016 yılında bir metaanalizde Yaralı ve ark.tarafından AS alt grupları arasında klinik gebelik ve canlı doğum oranları açısından anlamlı bir fark olmadığı raporlanmıştır (50).

DS takibi sırasında ultrasonografik ve biyokimyasal monitorizasyon sıklığı, AS protokolünden daha sık yapılmaktadır. Bu durum da hasta uyumu açısından zorluğa yol açabilir. AS hasta açısından daha iyi tolere edilebilir bir protokol olarak düşünülebilir. İki protokol arasında gebelik oranı açısından başarıyı inceleyebilmek adına literatüre bakıldığında, iki siklustan birini kuvvetle önerebilmeyi destekleyen yeterli güçlü veriler görülmemektedir. Özellikle DS ve supresyonsuz AS'un karşılaştırıldığı çalışmaların birçoğunun retrospektif veriler kullanılarak hazırlandığı görülmektedir.



Morozov ve ark. DS ve supresyonsuz AS'yi klinik gebelik açısından karşılaştırdıkları retrospektif bir çalışmada klinik gebelik oranlarını DS uygulanmasında daha yüksek saptamışlardır (%36.76 vs %22.9,  $p=0.0298$ ) (51). Bu çalışmadaki tedavi protokollerine bakıldığında iki grup için de transfer edilen embriyo sayısı benzer olmakla birlikte, DS'de monitorizasyon için serum LH ve USG takibi kullanılmış, transfer gününden bir gün sonra 4x200 mg vajinal progesteron başlanmış olduğu görülmektedir. AS için ise oral mikronize östradiol 2x2 mg verilmiş, USG'de 8 mm ve üzeri endometriyal kalınlık saptandığında 50 mg progesteron im olarak başlanmış, transfer ise bundan üç gün sonra yapılmıştır. Çalışmada ayrıca grupların transfer öncesi ortalama östradiol seviyelerine ve endometriyum kalınlığına bakıldığında DS grubunda östradiol seviyeleri düşük, endometriyumsa kalın olarak görülmüştür (103.8 vs 526.1 pg/ml,  $p<0.001$ ; 9.95 vs 8.89 mm,  $p<0.001$ ). Bu durum AS'de östradiol seviyelerinin yüksekliğinin implantasyon penceresini etkileyebildiğini gösterebilir. Ayrıca bu çalışmada her iki gruba uygulanan progesteron şeklinin farklı olması sonuçları etkilemiş olabilir.

Benzer şekilde 2014 yılında yayınlanmış retrospektif bir çalışmada Levron ve ark. yine klinik gebelik oranlarının DS protokolü uygulanan hastalarda supresyonsuz AS'ye göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır (%12.9 vs %8.47,  $p<0.02$ ) (52). Bu çalışmada da Morozov'un çalışmasında olduğu gibi transfer edilen embriyo sayısının gruplar arası benzer ve DS'de östradiol seviyelerinin düşük, endometriyum kalınlığının fazla olduğu dikkat çekmektedir. AS protokolü için siklusun 3.günü başlanan en az 10 gün devam eden günlük 2 mg östradiol valerat kullanılmış ve endometriyum kalınlığı 8 mm ve üzeri olduğunda vajinal 300 mg mikronize progesteron eklenmiştir.

Literatür incelendiğinde 2011 yılında iki protokolü embriyo faktörünü ortadan kaldırarak karşılaştırabilmek için tasarlanan yine retrospektif bir çalışmada Xiao ve ark. hastaları transfer edilen embriyonun morfolojisine göre üç gruba ayırarak subgrup analizi yapmışlardır. İyi kalitede çözünmüş embriyolar varlığında (üç adet sekiz hücreli embriyonun transfer edildiği hastalarda) DS kullanılan grubun klinik gebelik oranlarının yüksek olduğunu göstermişlerdir (%48.8 vs %30.9,

$p=0.006$ ) (53). Ancak hastalar total olarak değerlendirildiğinde DS ve supresyonsuz AS arasında klinik gebelikler açısından fark olmadığı belirtilmiştir.

2015 yılında yayınlanan ve incelenen DET siklus sayısının 3160 olduğu retrospektif bir çalışmada ise Zheng ve ark.tarafından blastokist transferlerde supresyonsuz AS'nin klinik gebelik ve canlı doğum oranları açısından DS'ye daha üstün olduğu raporlanmıştır (%67.3 vs %57,  $p<0.01$ ; %58.8 vs %49.7,  $p<0.01$ ) (54). Bu çalışmada gruplar arasındaki demografik ve klinik veriler incelendiğinde AS grubundaki hastaların DS'ye göre daha genç, antral folikül sayılarının daha yüksek ve infertilite sürelerinin daha kısa olduğu istatistiksel olarak görülmektedir. Bu durumda AS grubundaki başarının endometriyal hazırlık protokolünden bağımsız olabileceği düşünülebilir. Aynı çalışmada klivaj evrede transfer edilen embriyolar açısından klinik gebelik ve canlı doğum oranlarına bakıldığında AS lehine bir oran yüksekliği olsa da iki grup arasında anlamlı fark saptanmadığı görülmektedir. Klivaj evre transferlerinin blastokist evreden sayıca az olması nedeniyle gruplar arasında fark yakalanamamış olabilir (844 vs 2316).

DS ve AS karşılaştıran yakın zamanda yapılmış RKÇ'lere bakıldığında ise geniş hasta popülasyonuna sahip Groenewoud ve ark. tarafından yapılmış olan ANTARCTICA çalışması göze çarpmaktadır. Bu çalışmada mDS ve supresyonsuz AS protokollerinin benzer klinik gebelik ve canlı doğum oranlarına sahip oldukları raporlanmıştır (55). Çalışmanın detaylarına bakıldığında embriyo dondurulması için vitrifikasyon yerine yavaş soğutma metodu kullanıldığı; dondurulan ve transfer edilen embriyoların çoğunun klivaj evrede olduğu görülmektedir. Halbuki 2008'de yapılan bir metaanalizde yavaş soğutmaya göre vitrifikasyon metodunda canlı doğum oranlarının daha fazla olduğu saptanmıştır (32). Bu durumda ANTARCTICA çalışmasının canlı doğum oranları klivaj evre embriyo varlığından ve soğutma metodundan etkilenmiş olabilir. Ek olarak siklus iptali oranlarına bakıldığında embriyonun yetersiz survival sebebi dışlandığında AS'de daha fazla iptal olduğu saptanmıştır (124/464 vs 101/495,  $p=0.02$ ). İptallerin çoğunun DS'de prematür ovulasyon nedeni, AS'de ise endometriyumun yeterli kalınlığa ulaşamaması nedeni olduğu görülmektedir. Ayrıca AS'de iptallerin %4'ünün yan etkilerden (başağrısı,

bulantı, kilo alımı) dolayı olduğu görülmektedir. DS kolunda yan etki bildirilmemiştir. Çalışma sırasında tromboembolik yan etki de raporlanmamıştır.

Siklus iptal oranları göz önünde bulundurulursa; iptal oranları az olması nedeniyle GnRH agonist ile supresyonlu AS'lerin tercih edilebileceğinden ancak bu tercihin de yan etkiler ve maliyet oranlarını arttırabileceğinden yine Groenewoud ve ark. tarafından yapılan bir metaanalizde bahsedilmiştir (56).

2015 yılında yayınlanan daha az hasta sayılı bir RKÇ'de Mounce ve ark. tarafından; DS ve supresyonlu AS arasında klinik gebelik ve canlı doğum oranları açısından fark saptanmamıştır (57). Transfer edilen blastokist embriyo sayısının gruplar arasında benzer olması çalışmanın sonuçlarını güçlendirmektedir. Ancak incelendiğinde, hastaların sözel olarak sikluslarının düzenli olduğunu ifade etmelerinin 'ovulatuvar siklus' tanımı ile DS grubuna hasta alımı için yeterli sayıldığı, ovulasyon testlerinin yapılmadığı görülmektedir; bu hastalar DS için ideal aday olmayabilirler. Bu durumda da ideal sonuçlara ulaşabilmek mümkün olmayabilir.

Yaralı ve ark. en iyi endometriyal hazırlık protokolünü belirleyebilmek amacıyla yaptıkları 2016 yılına ait bir metaanalizde DS'de supresyonsuz AS'ye göre klinik gebelik oranları, supresyonlu AS'de DS'ye göre canlı doğum oranları yüksek hesaplanmış olsa da; sonuç olarak DET sikluslarında kullanılan hiçbir endometriyal hazırlık protokolünün birbirine üstünlüğü saptanmamıştır. Ancak mDS hasta dostu olması, diğer protokoller ile benzer gebelik oranlarına sahip olması ve luteal faz desteği gerektirmemesi nedenleri ile kullanımı avantajlı bir protokol olarak raporlanmaktadır (50).

Literatür detaylı incelendiğinde görüldüğü ve bahsedildiği üzere DET sikluslarda ideal bir endometriyal hazırlık protokolü henüz tanımlanabilmiş değildir. Yapılmış olan çalışmalara bakıldığında retropsektif çalışmaların çoğunlukta olduğu güçlü RKÇ'lere ihtiyaç olduğu görülmektedir. Endometriyal hazırlık protokollerinin klinik gebelik ve canlı doğum oranları gibi sonuçlarını etkileyen, birçok demografik,

klirik faktör bulunmaktadır. Bunların yanısıra embriyo donma-çözme yöntemlerinin, transfer edilen embriyonun kalitesinin, luteal faz desteği verilip verilmemesinin protokoller ile ilgili sonuçları etkileyebileceği öngörülebilmektedir. İdeal protokolü tanımlayabilmek adına en azından embriyoya ait etkenlerin ortadan kaldırılması düşüncesiyle; implantasyon oranlarının düşük olduğu bilinen anöplid embriyolar yerine öplid embriyoların transfer edildiği sikluslarda protokol karşılaştırılması yapılması daha yararlı olabilir.

Bahsedilen şekilde dizayn edilmiş, 2016 yılında yapılmış, öplid blastokist evre embriyolarının transfer edildiği DET sikluslarında mDS ve supreyonlu AS protokollerin karşılaştırıldığı bir RKÇ’de klinik gebelik oranları açısından herhangi bir fark saptanmamıştır (58). Bahsedilen çalışmada öplid embriyo tayini için trofektoderm biyopsisi ve aCGH ile PGT-A uygulandığı görülmektedir. Elde olan veriler ışığında bu yöntemlerin başarılı oldukları ve kullanımlarının literatür tarafından desteklendiği söylenebilir (13,20). Embriyo dondurma için bu çalışmada vitrifikasyon yöntemi tercih edildiğinden embriyonun negatif etkilenmesi riskinin de en aza indirilmeye çalışıldığı anlaşılabilir (32). Greco ve ark.tarafından bu çalışmada ayrıca hastaların psikolojik durumlarını da incelemek için bir anksiyete anketi yapılmış, ankete göre gruplar arasında anksiyete açısından fark saptanmamıştır (58).

Melnick ve ark. da trofektoderm biyopsisi sonrası SNP-array ile PGT-A uygulanıp öplid saptanan blastokist embriyoların transfer edildiği sikluslarda, endometriyal hazırlık prokollerini retrospektif olarak karşılaştırdıklarında; klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının DS’de AS’ye göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır (%66.2 vs %43.8,  $p=0.018$ ; %63.1 vs %37.5,  $p=0.007$ , sırasıyla) (59). Her ne kadar bu çalışmada DS üstünlüğü gösterilmiş olsa da uygulanan protokollerin standartlarının net bir şekilde belirlenmemiş olması, çalışmanın retrospektif olması, siklus iptal oranlarının hesaplanmaması gibi durumlar güçlü bir kanıt seviyesi olmadığını göstermektedir. Ayrıca data; tek gen hastalıkları, tekrarlayan gebelik kayıpları ve yaşa bağlı anöplidi riski nedeniyle PGT-A yapılan hastaları kapsadığı için tüm infertil popülasyona genellenemeyebilir.

### 2. 4. 3. Diğer Sikluslar

DS ve AS yanısıra endometriyal hazırlık için kullanılan tanımlanmış ‘hafif ovaryan stimülasyon’ olarak adlandırılan bir protokolden de bahsedilebilir. Bu protokolda de AS’de olduğu gibi yine ekzojen ajanlar kullanılmaktadır. Ekzojen gonadotropinler veya klomifen sitrat – letrozol gibi oral hafif ovaryan stimülasyon için kullanılarak dolaylı endometriyal hazırlanma oluşturulmaya çalışılabilir. Bu protokol ovulatuvar olan veya olmayan hasta gruplarının ikisinde de kullanılabilir.

Bu protokolle ilgili literatürdeki veriler oldukça kısıtlıdır. 2015’te bir RKÇ’de DS ve gonadotropin ile stimüle edilmiş siklus protokolleri karşılaştırıldığında klinik gebelik ve canlı doğum açısından fark olmadığı saptanmıştır (60). 2017’de ise Aleyasin ve ark. supresyonlu AS ve letrozol+ insan menopozal gonadotropin (hMG) verilen siklus protokollerini karşılaştıran bir RKÇ yayınladılar. Bu çalışmanın ovaryan stimülasyon protokolünde siklusun 2. günü başlanan letrozol 5 mg /gün 5 gün boyunca devam edilmiş sonrasında 75 IU hMG enjeksiyonu yapılmış, USG’de 18 mm folikül saptandığında ise hCG ile ovulasyon indüksiyonu sağlanmıştır. Sonuçta protokoller arasında klinik gebelik ve canlı doğum oranları açısından fark saptanmamıştır (61). Bahsedilen protokolle ilgili geniş kapsamlı RKÇ’lere ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Bahsedilen tüm çalışmalardan ve sonuçlardan anlaşılacağı üzere en iyi protokolü bulmaya yönelik çalışmalar ve araştırmalar halen devam etmektedir.

### 2. 5. LUTEAL FAZ DESTEĞİ

DET siklusları, fonksiyonel korpus luteum yokluğu dolayısıyla endojen progesteron üretiminin olmaması nedeniyle taze sikluslardan farklılık gösterebilmektedirler. 2013 yılındaki metaanalizde endometriyal hazırlık protokollerinde luteal faz desteği kullanılmasının etkisine bakıldığında, canlı doğum

ve klinik gebelik oranları açısından DS, mDS, AS arasında farklılık saptanmamıştır (56). Luteal faz desteği im veya vajinal yollarla uygulanabilir.

DS uygulamalarında luteal faz desteğine ihtiyacın olup olmadığı tartışmalıdır. Bu konuda Bjuresten ve ark tarafından yayınlanan 435 kadını içeren bir RKÇ'de; DS uygulanan hastalar 2x400 mg vajinal mikronize progesteron ile luteal destek verilip verilmemesi şeklinde randomize edilmiş ve luteal destek alan grupta canlı doğum oranlarının istatistiksel olarak yüksek olduğu raporlanmıştır (%30 vs %20, p=0.027) (62). Eftekhar ve ark.mDS'de luteal faz desteği ile ilgili yayınladıkları hasta sayısı daha az olan bir RKÇ'de ise bir gruba progesteron im 100mg/gün uygulayıp diğer gruba herhangi bir tedavi vermeyerek sonuçları karşılaştırmışlardır (63). Gruplar arasında gebelik oranları açısından anlamlı bir fark saptanmamış; ancak progesteron verilmeyen grupta klinik gebelik oranı %6 daha düşük hesaplanmıştır. Çalışmanın örneklem sayısının (n=102) azlığına bağlı olarak gruplar arası istatistiksel bir fark yakalanamamış olabilir.

DS'de luteal faz desteği tartışmalı iken AS'de luteal faz desteği kesinlikle gerekmektedir.

### 3. MATERİYAL VE METOT

#### 3.1. Hasta Seçimi ve Veri Toplanması

Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite Kliniği ve Anatolia Tüp Bebek Merkezi'nde Mayıs 2015 ve Haziran 2017 tarihleri arasında uygulanan sikluslar retrospektif olarak tarandı. DET sikluslarında endometriyal hazırlık için uygulanan DS, supresyonlu AS, supresyonsuz AS, oral kontraseptif (OK) sonrasında supresyonlu AS protokollerinin karşılaştırılması planlandı.

Dahil edilme kriterleri: 35 yaş ve üzerinde ( $\geq 35$  y) olup 5. ve 6. gün trofektoderm biyopsileri yapılmış ve PGT-A gerçekleştirilmiş olan kadınların ilk siklusları

Dışlama kriterleri: 35 yaş altında ( $< 35$  y) olup PGT-A yapılanlar, 35 yaşından büyük ( $\geq 35$  y) olup PGT-M , PGT-Translokasyon yapılan hastalar

Toplamda 155 hasta dosyası değerlendirildi. Dosyalardan hastaya ait demografik veriler, gebelik hikayesi, infertilite sebepleri, özgeçmiş, boy ve kilo ölçümü, infertilite süresi, başlangıç antral folikül sayısı, biyokimyasal değerler, uygulanan ovaryan stimülasyon protokolü, toplanan oosit sayısı, donma çözme siklus protokol türü, transfer sonrası 14. gün beta hCG değeri incelenerek kaydedildi. Primer çıktı ET başına devam eden gebelik/canlı doğum oranı; ikincil çıktılar implantasyon oranı, ET başına klinik gebelik oranı, pozitif beta hCG başına biyokimyasal gebelik oranı ve düşük oranı olarak belirlendi. Power analizi yapılmadı.

#### 3.2. Ovaryan Stimülasyon (OS) protokolleri

Hastalara uygulanan OS protokollerine bakıldığında farklı sikluslar uygulandığı görülmektedir. Uygulanan protokoller; önceki siklusun 21. gününde östrojenin başlanıp menstürasyonun 3.günü folikül stimülasyonunun başlandığı ve

önde giden folikül 11-14 mm olduğunda günlük oral antagonist ajan eklendiği, triggerin hCG ile yapıldığı '*luteal östrojen hazırlama antagonist protokolü*', klomifen sitrat veya letrozolün kullanıldığı, hMG'nin eklendiği ve folikül çapı 11-14 mm olduğunda antagonist enjeksiyonun başlandığı, agonist ile trigger uygulanan '*mini IVF protokolü*', önceki siklustan OK başlanıp devamında GnRH analog kullanılan ve hCG ile trigger uygulanan '*OK mikrodoz protokolü*', adet 2-3. Günlerinden itibaren letrozolün 5 günlük kullanıldığı, önde giden folikül 11-14 mm olduğunda antagonist eklendiği ve hCG ile tetiklenen '*Letrozol protokolü*', rutin stimülasyon takibinde önde giden folikül 11-14 mm olduğunda antagonist eklenen ve hCG ile tetiklenen '*Antagonist Protokolü*', önceki siklusun 21. Günü GnRH analog başlanıp devam edilen yine triggerin hCG ile yapıldığı '*Luteal long Löprolid asetat protokolü*' şeklinde tanımlanabilir. Protokollerin hepsinde folikül takibinde transvajinal ultrasonografi ve serum östradiol seviyeleri kullanılmıştır.

### **3.3. Blastokist Biyopsisi ve Donma- Çözme Yöntemleri**

İncelenen dosyalarda ovaryan stimülasyon siklusları yukarıda bahsedilen şekilde uygulanmıştı. Siklusların hepsinde inseminasyondan 120-160 saat (5-6 gün) sonra embriyolar morfolojik olarak analiz edilip sonrasında embriyo biyopsisi uygulanmıştı. Embriyoların morfolojik değerlendirilmesi için Gardner ve Schoolcraft blastokist skorlama sistemi kullanılmıştır (Tablo 1) (64). Blastokist evrede morfolojiyi değerlendirmek için iki hücre tipi vardır: İç hücre tabakası (İHT), trofektoderm (TE). Gardner ve Schoolcraft implantasyon ve gebelik ile ilgili parametreleri değerlendirmek açısından oluşturmuşlardır. Bu sistemde blastokistler numerik olarak ekspansiyon ve hatching durumlarına göre skorlanır. Grade 3-6 olarak gelişen blastokistler İHT ve TE hücrelere göre değerlendirilir. Gardner ve ark. göre AA fenotipine sahip bir blastokist en yüksek implantasyon potansiyeline sahiptir (65).



<b>Blastokist</b>	<b>Grade</b>
Erken blastokist; Blastosel < embriyo yarı volümü	1
Blastokist; Blastosel $\geq$ embriyo yarı volume	2
Tam Blastokist; Blastosel neredeyse embriyoyu kaplamış	3
Genişlemiş blastokist; blastosel > erken embriyo volümü	4
Hatching blastokist; trofektoderm herniasyonu başlamış	5
Hatched blastokist; blastokist zonadan tamamen çıkmış	6
<b>İç hücre tabakası</b>	<b>Grade</b>
Birçok hücre, sıkıca bağlı	A
Birkaç hücre, gevşek gruplaşmış	B
Çok az hücre	C
<b>Trofektoderm</b>	<b>Grade</b>
Birçok hücre	A
Biraz hücre	B
Çok az hücre	C

*Tablo 1. İnsan blastokist skorlama sistemi, Gardner & Schoolcraft, 1999*

Gardner skorlama sistemine göre değerlendirilen (64) blastokistler mükemmel (3AA, 4AA, 5AA), iyi (3,4,5,6 ab veya BA), orta (3, 4, 5, 6, BB veya AC veya CA) ve kötü (3, 4, 5, 6, BC veya CC) olarak kategorize edilmiştir.

Morfolojik değerlendirme sonrasında embriyo biyopsisi; büyüyen, gelişen, belirli bir iç hücre tabakası ve en az birkaç trofektoderm epiteli içeren blastokistlere trofektoderm biyopsisi şeklinde uygulanmıştır. Tüm biyopsiler; 3 damla 6 mL'lik G-MOPS-Plus ile tamponlanmış, mineral yağı ile kaplı vasat (Vitrolife) içeren kapta, ısıtılmış bir zemin üzerinde bulunan embriyodan, zona pellucida üzerine diod lazer yardımıyla 10-15 mmlik bir açıklık oluşturulması sonrasında pipet yardımıyla 5-10 trofektoderm hücresi aspire edilmesi şeklinde uygulanmıştır. Trofektoderm biyopsisi sonrası, donma çözme için kullanılan vitrifikasyon ve ısıtma teknikleri Cobo ve ark. tanımları doğrultusunda Kryotop aleti ve solüsyonları kullanılarak yapılmıştır (66). Çözülme için uygun birden fazla öploid embriyo varlığında, vitrifikasyon öncesi en iyi morfolojik dereceye sahip olanı çözülme ve transfer edilmek için seçilmiştir. Embriyonun morfolojik değerlendirilmesi, biyopsi öncesinde yapılmasının yanı sıra

çözülme sonrasındaki inkübasyondan 4-5 saat sonra ve embriyo transferinden hemen önce tanımlanan kriterlere göre tekrarlanmıştır. Embriyolar transfer sabahı çözülerek, bir kateter yardımıyla transfer edilmiştir.

### **3.4. Genetik Analiz**

Tanımlanan şekilde alınan trofektoderm biyopsileri, PGT-A genetik analizi için referans bir genetik laboratuvara gönderilmiştir. Tüm örnekler laboratuvar tarafından, tam genomik amplifikasyon (WGA) ve array komperatif genomik hibridizasyon (aCGH), yeni nesil dizilimleme (NGS) uygulanmıştır.

### **3.5. Endometriyal Hazırlık Protokolleri**

DET için kullanılan endometriyal hazırlık protokolleri DS, supresyonlu AS, supresyonsuz AS, OK sonrasında supresyonlu AS idi.

DS'de, ovulatuvar olan hastalarda spontan menstrüel sıklusta ovulasyon varlığının dokümentasyonu için ultrasonografik olarak dominant folikül büyümesinin ve rüptürünün takibi ve laboratuvar olarak serum progesteron seviyesinin  $>1.5$  ng/mL değerine yükselmesi kullanılmıştır. Ultrasonografik takiplerde endometriyal kalınlığın  $>7$  mm olması transfer için uygun görülmüştür. DS'de luteal faz desteği uygulanmamıştır.

AS protokollerinde supresyonsuz grupta; folikül gelişimini baskılamak ve endometriyal proliferasyonu uyarmak amacıyla siklusun 1.-2.-3. günlerinde oral östrojen valerat (günlük 6 mg) başlanmış, 12-14 gün sonra vajinal ultrasonografi ile endometriyal kalınlık  $>7$  mm olduğunda ve overlerde dominant folikül olmaması ve serum progesteron seviyesinin  $<1.5$  ng/mL olması ile ovulasyonun yokluğu kanıtlandığında vajinal yolla günde 2 kere progesteron tedavisi (2x1, Crinone %8 jel, Merck Serono, USA) eklenmiştir. Östrojen ve progesteron desteği ET'den sonraki 14. güne kadar devam etmiş ve gebelik testi pozitif saptanan hastalarda ise progesteron desteği gebeliğin 10-12. haftalarına kadar uygulanmıştır.

Supresyonlu AS protokolde ise HRT'den önceki siklusun mid luteal döneminde (21. Gün) bir GnRH analog (im) başlanmış, devamında yine

supresyonsuz siklustaki gibi menstürasyonun 1.-2.-3. günlerinde oral östrojen valerat (günlük 6 mg) başlanmış, 12-14 gün sonra vajinal ultrasonografi ile endometriyal kalınlık  $>7$  mm olduğunda ve overlerde dominant folikül olmaması ve serum progesteron seviyesinin  $<1.5$  ng/mL olması ile ovulasyonun yokluğu kanıtlandığında GnRH agonist kesilmiş ve vajinal yolla günde 2 kere progesteron desteği (2x1, Crinone %8 jel, Merck Serono, USA) eklenmişti. Östrojen ve progesteron desteği ET'den sonraki 14. güne kadar devam etmiş ve gebelik testi pozitif saptanan hastalarda ise progesteron desteği gebeliğin 10-12. haftalarına kadar uygulanmıştı.

OK - supresyonlu AS'lerde ise protokol öncesi bir ay süre boyunca hastaya OK verilmiş ve OK kullanırken mid luteal dönemde GnRH analog eklenerek devamında supresyonlu AS için tanımlanan hormon desteği protokolü uygulanmıştı.

### 3.6. İstatistiksel Analiz

Hasta dosyaları ve elektronik kayıt sisteminden elde edilen veriler SPSS (Statistical Analyses for Social Sciences, Chicago, IL) version 22.0 programı kullanılarak kaydedildi. Değişkenlerin ve testlerin değerlendirilmesi, istatistiksel analizler aynı program kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenlerden normal dağılım gösterenler ortalama $\pm$ standart sapma olarak, normal dağılım göstermeyenler ise ortanca (median) ile yanında minimum ve maksimum değerler olarak ve kategorik değişkenler yüzde olarak belirtildi. Normal dağılım sergileyen sayısal değişkenlerde ortalama değerlerin karşılaştırılması için bağımsız gruplarda *t* testi, normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenlerin karşılaştırılması için Mann-Whitney *U* Testi, ikiden fazla grup varlığında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde bağımlı değişken iki durumlu olduğunda Binary lojistik regresyon, ikiden fazla kategoride olduğunda multinominal lojistik regression kullanıldı. P değerinin 0.05 altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Hacettepe Üniversitesi Grişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından bu tez çalışması gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş olup tıbbi etik açıdan uygun bulunarak onay verilmiştir (Proje no: GO 17/462 Karar no: GO 17/462-36)

#### 4. BULGULAR

DET siklusu uygulanmış 35 yaş ve üzeri olan 155 hasta belirlendi. Bu hastalardan 19'u DS, 113'ü supresyonlu AS, 8'i OK-supresyonlu AS, 15'i de supresyonsuz AS protokolleri grubundaydı. (Tablo 2).

OS olarak agonist protokol uygulanan hastaların 11'i DS, 68'i supresyonlu AS, 5'i OK ve supresyonlu AS, 7'si ise supresyonsuz AS gruplarında yer almaktaydı. Antagonist protokol uygulanan hastalarinsa 8'i DS, 45'i supresyonlu AS, 3'ü OK- supresyonlu AS, 8'i supresyonsuz AS gruplarındaydı. Stimulasyon sonrası hCG günündeki serum östradiol (E<sub>2</sub>) seviyelerine bakıldığında gruplar arasında farklılık saptanmadı (Tablo 2). Blastulasyon oranlarına bakıldığında DS'de %65.6, supresyonlu AS'de %74.6, OK-supresyonlu AS'de % 73.1 ve supresyonsuz AS'de %70.8 olduğu görüldü. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı (p =0.43

	DS (n=19)	Supresyonlu AS (n=113)	OK - supresyonlu AS (n=8)	Supresyonsuz AS (n=15)	P değeri
Kadın yaşı (yıl)	39.58 ± 2.4	39.24 ± 2.1	39.50 ± 2.3	38.93 ± 2.7	0.847
Erkek yaşı (yıl)	41.89 ± 4.5	42.03 ± 5.8	41.1 ± 4.1	43.93 ± 9.6	0.563
Kadın vücut kitle indeksi (kg/m <sup>2</sup> )	24.19 ± 3.0	25.12 ± 4.2	27.8 ± 6.4	26.59 ± 5.2	0.095
Önceki siklus sayısı*	2.1 (0; 7)	1.2 (0; 8)	1.0 (0; 3)	2.3 (0; 9)	0.304
Antral folikül sayısı*	10.2 (4; 42)	9.85 (1; 65)	7.75 (3; 27)	11.4 (3; 24)	0.513
İnfertilite süresi (ay)	50.3 ± 54.1	55.5 ± 47.2	53.0 ± 70.5	61.3 ± 55.0	0.927
Toplam FSH dozu (IU)	3412.5 ± 1575.0	2992.5 ± 1327.5	3615.0 ± 2190.0	2647.5 ± 1279.5	0.227
Ovaryan uyarılma protokolü					0.489
Uzun GnRH agonist protokol n (%)	11 (57.8)	68 (60.1)	5 (62.5)	7 (46.6)	
GnRH antagonist protokol n (%)	8 (42.2)	45 (39.9)	3 (37.5)	8 (53.3)	
HCG günü E2 seviyesi (pg/mL)	2589.6 ± 1473.3	2271.0 ± 1418.6	2159.1 ± 3040.3	2525.8 ± 2000.0	0.874
Toplanan oosit sayısı	8.4 ± 5.8	8.6 ± 4.6	6.5 ± 5.3	9.5 ± 4.6	0.293
2-pronukleuslu embriyo sayısı	5.8 ± 3.1	5.7 ± 5.6	4.3 ± 3.5	4.7 ± 3.4	0.182
Blastulasyon oranı (%)	65.6 ± 18.8	74.6 ± 22.8	73.1 ± 22.8	70.8 ± 23.3	0.433
Utilizasyon oranı (%)	47.5 ± 18.4	61.9 ± 24.5	56.0 ± 19.4	56.0 ± 22.4	0.094

DS: Doğal siklus, AS: Artifişyel siklus, OK: oral kontraseptif, FSH: folikül stimüle edici hormon, GnRH: gonadotropin salgılatıcı hormon, HCG: human koryonik gonadotropin, E2: östradiol. Aksi belirtilmedikçe değerler, ortalama ± SS VEYA medyan (25<sup>th</sup> – 75<sup>th</sup> persentiller) olarak verilmiştir.

\*normal dağılmamıştır.

**Tablo 2. Farklı endometriyal hazırlık protokollü hastaların temel demografik özelliklerinin, ovaryan stimulasyon protokollerinin ve embriyolojik verilerin karşılaştırılması**

Dört DET siklus protokolünde tek öploid embriyo transferi sonrası gebelik testi sonuçlarına bakıldığında DS'de 12, supresyonlu AS'de 82, OK-supresyonlu AS'de 7, supresyonsuz siklusta ise 10 hastada pozitiflik saptandı. Transfer başına gebelik testi pozitifliği oranı en yüksek grup OK - supresyonlu AS (%87.5), en düşük grup ise supresyonsuz AS idi (%66.7). Klinik gebelik oranlarına bakıldığında da anlamlı bir fark bulunmadı ancak klinik gebelik oranının OK-supresyonlu AS'de (%87.5) en yüksek olduğu görüldü. Ayrıca OK-supresyonlu AS'de pozitif gelen hCG sonuçlarından hiçbiri (0/7) biyokimyasal gebelik değildi. İmplantasyon oranı doğal siklusta %58, supresyonlu AS için %63, OK ve supresyonlu AS için %87.5, supresyonsuz AS için ise %66.6 olarak hesaplandı. Klinik gebeliklerde düşük oranına bakıldığında; DS'de 11 gebelikten birinin (%9), supresyonlu AS'de 69 gebelikten 16'sının (%23.1), OK-supresyonlu AS'de 7 gebelikten ikisinin (%28.5), supresyonsuz AS'de 9 gebelikten ikisinin (%22.2) düşük ile sonuçlandığı görüldü. Düşük oranı açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Bu durumda DS grubunda 10 (%52.6), supresyonlu AS grubunda 53 (%46.9), OK-supresyonlu AS grubunda 5 (%62.5), supresyonsuz AS grubunda 7 (%49) gebeliğin devam ettiği saptandı. Ancak tek öploid embriyo transferi başına devam eden gebelik/canlı doğum oranlarında da gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı (p=0.945) (Tablo 3).

	DS (n=19)	Supresyonlu AS (n=113)	OK-supresyonlu AS (n=8)	Supresyonsuz AS (n=15)	P değeri*
Transfer edilen ortalama embriyo sayısı	1±0	1±0	1±0	1±0	NS
ET başına pozitif gebelik testi, n (%)	12/19 (63.2)	82/113(72.6)	7/8(87.5)	10/15(66.7)	NS
ET başına klinik gebelik, n (%)	11/19 (57.9)	69/113(61.1)	7/8(87.5)	9/15(60)	NS
İmplantasyon oranı (%)	58	63	87.5	66.6	NS
Pozitif HCG başına biyokimyasal gebelik oranı, n (%)	1/12 (8)	13/82 (15.8)	0/7(0)	1/10(10)	NS
Düşük oranı, n (%)	1/11(9)	16/69 (23.1)	2/7 (28.5)	2/9 (22.2)	NS
ET başına devam eden gebelik/canlı doğum n (%)	10/19 (52.6)	53/113(46.9)	5/8 (62.5)	7/15 (49)	NS

DS: Doğal siklus, AS: Artifişyel siklus, OK: oral kontraseptif, ET: Embriyo transferi, HCG: human koryonik gonadotropin.

\*NS: p değeri istatistiksel olarak anlamlı değildir.

**Tablo 3. Endometriyal hazırlık protokolleri için öploid blastokist transferinin gebelik sonuçları**

Değişkenler	Odds Ratio	95% CI	P value
Kadın yaşı, yıl	0.839	0.702; 1.003	0.054
Vücut kitle indeksi (kg/m <sup>2</sup> )	0.915	0.830; 1.009	0.075
İnfertilite süresi(ay)	0.998	0.990; 1.007	0.671
Antral follikül sayısı	1.022	0.961; 1.088	0.486
Başarısız siklus sayısı	1.123	0.922; 1.368	0.248
Ovaryan stimülasyon protokolü	0.297	0.029; 3.019	0.305
Donmuş embriyo transfer protokolü			0.628
DS	1*		
Supresyonlu AS	0.042	0; 29.5	0.344
OK – Supresyonlu AS	-	-	NS
Supresyonsuz AS	0.127	0.002; 8.408	0.344
Toplanan oosit sayısı	1.039	0.946; 1.140	0.424
Embriyo biyopsi günü(5./6. gün)	0.697	0.277; 1.754	0.444
Blastokist morfolojisi			0.210
Mükemmel	4.423	0.605; 32.332	0.143
İyi	4.039	1.007; 16.195	0.049
Orta	2.332	0.644; 8.448	0.197
Kötü	1*		

DS: Doğal siklus, AS: artifisyel siklus NS: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

\*Referans Kategori

**Tablo 4. Devam eden gebelik tahmininde lojistik regresyon analizi**

Devam eden gebeliklerin etkilendiği değişkenler olarak; kadın yaşı, vücut kitle indeksi, antral folikül sayısı, infertilite süresi, başarısız siklus sayısı, ovaryan stimülasyon protokolü, toplanan oosit sayısı, embriyo biyopsi günü gibi faktörler değerlendirildiğinde bunların hiçbirinin devam eden gebelik üzerine etkisi olmadığı saptandı. DET sikluslarında kullanılan, tanımlanan dört endometriyal hazırlık protokolünün herhangi birinin de devam eden gebelik ihtimaline anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü. Blastokist morfolojisine göre yapılan karşılaştırmada; kötü blastokist morfolojisi baz alınarak değerlendirme yapılmıştır. Blastokist morfolojisinin de mükemmel veya ortalama olmasının devam eden gebelikler üzerine bir etkisi yoktu ancak morfoloji mükemmel olduğunda gebeliğin devam etme olasılığı yaklaşık 4 kat daha fazlaydı. Sonuç olarak tablodan da görüldüğü üzere yapılan lojistik regresyon analizinde istatistiksel olarak anlamlı olan tek değer iyi blastokist morfolojisi olduğu görülmüştür. Ancak bununla birlikte kadın yaşının da istatistiksel değerinin devam eden gebelik için sınırda olduğu görülmektedir (p=0.054) (Tablo 4).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada DET sikluslarında uygulanan dört endometriyal hazırlık protokolünün gebelik sonuçları açısından birbirlerine üstünlük yaratıp yaratmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu dört protokolün endometriyal hazırlığa etkilerini daha net bir şekilde ortaya koyabilmek adına çalışmamıza, anöploidinin ET sonuçlarına negatif etkisinin ortadan kaldırıldığı sadece öploid embriyoların transfer edildiği siklusları dahil ettik. Bu şekilde bakıldığında hiçbir protokolün birbirine üstünlüğü olmadığını saptadık.

Donma - çözme embriyo transferi, IVF- ICSI siklusları sırasında artan embriyoları saklamak ve sonrasında transfer etmek için kullanılan bir prosedürdür. Son yıllarda laboratuvar koşullarının gelişmesinin ve vitrifikasyon tekniğinin gelişiminin de etkisiyle, transfer edilen embriyo sayısının kısıtlanmasına bağlı DET sikluslarının sayısı progresif olarak artmıştır. PGT-A uygulamalarının sıklığının artması nedeniyle, taze sikluslarda oluşabilen OHSS riskinden kaçınmak amacıyla, yine taze sikluslarda kullanılan ovaryan stimülasyonun endometriyum üzerine zararlı etkisinden kaçınmak amacıyla da embriyoların dondurulması tercih edilebilmektedir (5-7). DET siklusları ile embriyo israfı önlenmiş olup aynı zamanda gebelik ihtimali arttırılmaktadır. DET siklusları sonrasında gebelik oranlarının taze embriyo transfer sikluslarından daha fazla olduğu saptanmıştır (36).

Tüm bu faydalarından dolayı günümüzde DET uygulanmasının tercih edilmesi yönünde bir eğilim oluşmaktadır. Bu nedenle, bu sikluslar için optimal endometriyal hazırlık yönteminin tanımlanması önem arz etmektedir. Endometriyal hazırlık protokolleri, OS protokollerinden daha basittir ancak en iyi endometriyal hazırlık protokolü hakkında henüz bir konsensus oluşmamıştır (67). DET sikluslarında optimal endometriyal hazırlık için uygun çözüm halen tartışmalıdır.

DET sikluslarında en uygun endometriyal hazırlık protokolünü en doğru şekilde belirleyebilmek amacıyla biz çalışmamıza öploid tek embriyo transfer edilen donma çözme siklusuna sahip popülasyonu dahil ettik. Öploid olduğu bilinen



embriyoların transferi ile embriyo bağımlı implantasyon faktörü ortadan kaldırıldığında, implantasyon başarısı daha iyi olan protokolün belirlenebilmesi optimize edilmiş olmaktadır. Literatüre bakıldığında endometriyal hazırlık protokollerini inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar raporlanmakla birlikte, bu çalışmaların sadece iki tanesinin embriyo bağımlı implantasyon faktörünün ortadan kaldırılarak dizayn edildiği görülmektedir.

Çalışmamızda karşılaştırılan dört protokol için hasta gruplarının temel demografik özelliklerinin, OS protokollerinin ve embriyolojik verilerinin her grup için birbirine benzer olması, protokoller arasında birbirlerine üstünlük varlığının araştırılmasının optimize edilmesine yarar sağlayan diğer bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gruplar, gebelik sonuçları açısından incelendiğinde farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Çalışmamızda toplam hasta sayısı 155 olmasına rağmen, hastaların çoğunun (n=113) supresyonlu AS grubunda olduğu ve bu durumun gruplar arasında örneklem farkının yüksek olmasına yol açtığı görülmektedir. Örneklem farklılığının oluşmasının istatistiksel sonuçları etkileyebilmiş olduğu düşünülmektedir. Örneğin; DS grubunda hasta sayısı 19 iken ET başına devam eden gebelik oranı %52.6'dır. Bu oran supresyonlu AS grubunda (n=113) daha düşük (%46.9) olarak saptanmıştır; ancak istatistiksel bir fark elde edilememiştir. Ancak yine de bu sonucun daha önce yapılan bir metaanalizin sonuçları ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Bahsedilen metaanalizde DS ve supresyonlu AS protokollerinin ET başına devam eden gebelik ve canlı doğum açısından benzer olduğu saptanmıştır (56). Ancak bu metaanalize bakıldığında, bu iki grubu karşılaştıran çalışmaların retrospektif olduğu görülmektedir, içerik ve raporlama ile ilgili bias tam olarak dışlanamamış olabilir.

Yakın zamanda yapılan DS ve AS grupları ile ilgili geniş hasta popülasyonuna sahip RKC olan ANTARCTICA çalışmasına bakıldığında ise ET başına klinik gebelik oranları mDS'de %23.9, AS'de %22.1 ile benzer olarak bulunmuştur (55). Çalışmamızın verilerine bakıldığında ise klinik gebelik oranlarının

bahsedilen çalışmadan daha yüksek (DS %57.9, supresyonsuz AS'de %60) olduğu ve ancak yine gruplar arasında farklılık olmadığı görülmektedir. ANTARTICA çalışmasından farklı olarak çalışmamızda tüm siklularda vitrifikasyon yönteminin kullanılmış olması, tüm embriyoların blastokist evrede transfer edilmiş olması çalışmalar arası klinik gebelik oranlarının farkını açıklayabilir.

Başka bir metaanalizde supresyonsuz AS ile karşılaştırıldığında, DS lehine istatistiksel anlamlı derecede artmış klinik gebelik oranları raporlanmıştır, diğer taraftan supresyonlu AS ile DS arasında klinik gebelik açısından fark saptanmamıştır (50). 2015 yılında yapılan hasta sayısı yüksek olan retrospektif bir çalışmada DS'de klinik gebelik oranları %49.4 ve supresyonsuz AS'de %58.6 olarak saptanmıştır. Yüzdeler bizim sonuçlarımıza benzer olsa da bu çalışmada supresyonsuz AS protokolü klinik gebelik açısından istatistiksel olarak daha üstün bulunmuştur (54). Bahsedilen çalışmada, AS grubundaki başarının endometriyal hazırlık protokolünden bağımsız olabileceği düşünülebilir çünkü hastaların demografik ve klinik verileri incelendiğinde - bizim çalışmamızdan farklı olarak - gruplar arasında benzerlik olmadığı, AS grubundaki hastaların daha genç, antral folikül sayılarının daha yüksek ve infertilite sürelerinin daha kısa olduğu istatistiksel olarak görülmektedir.

Gebelik çıktıları dışında bakıldığında DS takibi sırasında ultrasonografik ve biyokimyasal monitorizasyon sıklığının AS'den daha fazla olması nedeniyle hasta uyumu açısından AS daha iyi tolere edilebilir bir protokol olarak düşünülebilir. Ancak diğer taraftan supresyonlu AS'de kullanılan GnRH agonist, yan etkilere sebep olarak hasta memnuniyetinin bozulmasına yol açabilir ve bunun yanısıra siklus maliyetini arttırabilir.

Bahsedilen çalışmaların hiçbirinde ET öncesi embriyolar, kromozom sayısı açısından incelenmemiştir. Oysa implantasyon başarısızlığı ve düşükler için gösterilmiş en önemli etyolojik faktör olan embriyo anöploidisinin dışlanması ve sadece öploid embriyoların transferi ile ideal endometriyal hazırlık protokolü daha iyi anlaşılacaktır (8). PGT-A için blastokist aşamasında, çalışmamızda da kullanılmış olan aCGH yöntemi ile kromozomal olarak sağlıklı embriyo seçimi

yüksek canlı doğum oranları için güçlü bir yöntemdir (68). PGT-A için blastokist kriyoprezervasyonu gereklidir, bunun için de bizim hastalarımızda da kullanılmış olan vitrifikasyon yöntemi embriyo için güvenli ve etkili bir tercihtir (69).

Benzer şekilde dizayn edilmiş, Greco ve ark.tarafından 2016 yılında yapılan bir RKÇ’de mDS ve supresyonlu AS protokolleri karşılaştırılmıştır. İki grupta klinik gebelik oranları sırayla %54.1 ve %50.4 olmak üzere benzer saptanmıştır (p=0.677). Canlı doğum oranları da gruplar arasında benzer olarak bulunmuştur (% 45.8 vs % 41.5, p=0.612). Gruplar düşük, implantasyon ve biyokimyasal gebelik oranları yönünden incelendiğinde de istatistiksel bir fark saptanmamıştır (58) . Bu sonuçlara bakıldığında bizim sonuçlarımızla paralellik gösterdiği görülmektedir. Bahsedilen çalışmada da bizimkine benzer olarak öploid embriyo tayini için trofektoderm biyopsisi ve aCGH ile PGT-A uygulandığı görülmektedir. Yine embriyo dondurma için bu çalışmada da bizim tercih ettiğimiz gibi vitrifikasyon yöntemi tercih edilmiştir. Ancak bizim popülasyonumuz içinde mDS uygulanan bir grup bulunmamaktadır. Diğer taraftan, bahsedilen çalışmanın supresyonlu AS protokolü bizim çalışmamızdan daha farklıdır. Greco ve ark. supresyon için mid luetal fazda oral olarak günde 2 kez 0.2 mg GnRH agonist başlamışlar, sonrasında günde iki kez 2 mg oral östradiol valerat başlayarak takibe göre doz arttırımı yapmışlar ve endometriyal kalınlık > 7mm olduğunda, serum progesteron seviyesi <1.5 ng/mL olduğunda günlük 50 mg im olarak progesteron tedavisi eklemişlerdir.

2017 yılında çalışmamıza benzer şekilde retrospektif olan, 113 siklus ile yapılmış, öploid embriyoların transfer edildiği bir çalışmada ise ovulatuvar kadınlarda DS’nin, anovulatuvar kadınlara uygulanan supresyonlu AS’den implantasyon başarısı ve canlı doğum oranları açısından daha üstün olduğu gösterilmiştir. Canlı doğum oranları DS’de %63.1, AS’de %37.5 olarak hesaplanmıştır (p=0.007) (59). Çalışmada bize benzer olarak trofektoderm biyopsisi ve vitrifikasyon uygulandığı ancak bizden farklı olarak PGT-A için SNP array methodu kullanılmış olduğu görülmektedir. Bu çalışmada DS üstünlüğü gösterilmiştir; ancak bakıldığında hastalara uygulanan supresyonlu AS hazırlık protokollerinde bir standardizasyon olmadığı, östradiol dozlarının transdermal olarak, progesteron dozlarının ise İM

olarak verildiği görülmekte. Halbuki bizim çalışmamızda bahsedilen dört hazırlık protokolü de daha önce tanımlanan şekilde her hastaya standart bir biçimde uygulanmıştır. Retrospektif alışmalar olması nedeniyle Melnick ve ark. alışmasında ve bizim çalışmamızda da siklus iptal oranları hesaplanamamış olması da protokoller arasında karşılaştırmayı etkileyen faktörlerden olabilir.

Özetle bakıldığında preimplantasyon genetik tarama sonrası elde edilen tek ploid embriyo transferi için donma çözme siklusu hazırlığında kullanılan farklı endometriyal hazırlık protokolleri arasında devam eden canlı gebelikler açısından herhangi bir fark izlenmemiştir. Literatürde nc çalışma olmakla birlikte, denek sayısı kısıtlı olması ve retrospektif olması nedeniyle sonuçların güçlü RKÇ'ler ile desteklenmesi gerekmektedir.

## 6. SONUÇ

Sonuç olarak donma çözme sikluslarında kullanılan endometriyal hazırlık protokollerinin birbirlerine anlamlı bir üstünlüğü olmamakla birlikte bu konuda embriyo faktörünün minimize edildiği, öploid embriyoların transfer edildiği siklusları içeren randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Donma-çözme sikluslarında optimal endometriyum hazırlık protokolü varolan bilgiler ışığında henüz belirlenmemektedir.

## 7. REFERANSLAR

1. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;99(1):63.
2. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2012 Apr;27(4):954–66.
3. Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, De Mouzon J, Erb K, Mocanu E, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2017;32(10):1957–73.
4. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2015 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2017. 2017.
5. Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Michael Wilson J, Crain JL, Griffin DK. Outcomes of blastocysts biopsied and vitrified once versus those cryopreserved twice for euploid blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online*. 2014;29(1):59–64.
6. D'Angelo A. Ovarian hyperstimulation syndrome prevention strategies: Cryopreservation of all embryos. Vol. 28, *Seminars in Reproductive Medicine*. 2010. p. 513–8.
7. Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. Vol. 9, *Human Reproduction Update*. 2003. p. 515–22.
8. Dahdouh EM, Balayla J, Garcia-Velasco JA. Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: A systematic review of randomized controlled trials. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(3):281–9.
9. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà 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(1):156–62.
10. ASRM. SART Data Release: 2015 Preliminary and 2014 Final May 01, 2017 ASRM Press Release and Bulletin Volume 19, Number 15. 2017;
11. Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet [Internet]*. 2012;13(7):493–504. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3245>
12. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic

- screening: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2011;17(4):454–66.
13. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* [Internet]. 2012;5(1):24. Available from: <http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8166-5-24>
  14. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013;100(3):697–703.
  15. Forman EJ, Hong KH, Franasiak JM, Scott RT. Obstetrical and neonatal outcomes from the BEST Trial: Single embryo transfer with aneuploidy screening improves outcomes after in vitro fertilization without compromising delivery rates. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(2).
  16. Harton G, Traeger-Syndinos J G V. Data from ESHRE PGD consortium. *Hum Reprod*. 2012;Suppl. 2(27).
  17. Eldar-Geva T, Srebnik N, Altarescu G, Varshaver I, Brooks B, Levy-Lahad E, et al. Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*. 2014;102(4):1016–21.
  18. De Steirteghem AVA Van. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*. 2001;21(9):767–80.
  19. Kirkegaard K, Juhl Hindkjaer J, Ingerslev HJ. Human embryonic development after blastomere removal: A time-lapse analysis. *Hum Reprod*. 2012;27(1):97–105.
  20. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: A randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*. 2013;100(3):624–30.
  21. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: Insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod*. 2013;28(2):509–18.
  22. Forman EJ, Treff NR, Stevens JM, Garnsey HM, Katz-Jaffe MG, Scott RT, et al. Embryos whose polar bodies contain isolated reciprocal chromosome aneuploidy are almost always euploid. *Hum Reprod*. 2013;28(2):502–8.

23. De Boer KA, Catt JW, Jansen RPS, Leigh D, McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. Vol. 82, *Fertility and Sterility*. 2004. p. 295–8.
24. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod*. 2014;29(6):1173–81.
25. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, De Boer KA, Jansen RPS. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. Vol. 84, *Fertility and Sterility*. 2005. p. 1628–36.
26. Scott RT, Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: A prospective, blinded, nonselection study. *Fertil Steril*. 2012;97(4):870–5.
27. Cobo A, De Los Santos MJ, Castellò D, Gámiz P, Campos P, Remohí J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: Evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril*. 2012;98(5).
28. Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013;100(1).
29. De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: Cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Hum Reprod*. 2017;32(10):1974–94.
30. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. *Fertil Steril*. 1985;44(5):645–51.
31. Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. In: *Reproductive BioMedicine Online*. 2004. p. 164–70.
32. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008;90(1):186–93.
33. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2010 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 201. 2012.
34. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Clinical rationale



- for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. Vol. 102, *Fertility and Sterility*. 2014. p. 3–9.
35. 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(2):344–8.
  36. 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 transfers in high responders. *Fertil Steril*. 2011;96(2):516–8.
  37. Glujovsky D, Pesce R, Fiszbajn G, Sueldo C, Hart RJ, Ciapponi A. Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes. In: Glujovsky D, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2010 [cited 2017 Sep 27]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006359.pub2>
  38. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* [Internet]. 1992;58(3):537–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1521649>
  39. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil Steril* [Internet]. 1950;1(1):3–25. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028216300620>
  40. Andersen AG, Als-Nielsen B, Hornnes P, Franch Andersen L. Time interval from human chorionic gonadotrophin (HCG) injection to follicular rupture. *Hum Reprod*. 1995;10(12):32–2.
  41. Miller PB, Soules MR. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. *Obstet Gynecol*. 1996;87(1):13–7.
  42. Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity. Vol. 96, *Fertility and Sterility*. 2011. p. 530–5.
  43. Fatemi HM, Kyrrou D, Bourgain C, Van Den Abbeel E, Griesinger G, Devroey P. Cryopreserved-thawed human embryo transfer: Spontaneous natural cycle is superior to human chorionic gonadotropin-induced natural cycle. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2054–8.
  44. Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, Steinfeld Z, Mutzafi R, Golan A, et al. Spontaneous ovulation versus HCG triggering for timing natural-cycle frozen-thawed

- embryo transfer: A randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(4):484–9.
45. Montagut M, Santos-Ribeiro S, De Vos M, Polyzos NP, Drakopoulos P, Mackens S, et al. Frozen-Thawed embryo transfers in natural cycles with spontaneous or induced ovulation: The search for the best protocol continues. *Hum Reprod*. 2016;31(12):2803–10.
  46. Groenewoud ER, Macklon NS, Cohlen BJ, Al-Oraiby A, Brinkhuis EA, Broekmans FJM, et al. The effect of elevated progesterone levels before HCG triggering in modified natural cycle frozen-thawed embryo transfer cycles. *Reprod Biomed Online*. 2017;34(5):546–54.
  47. El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khairy M, Sunkara K, Seed P, Khalaf Y, et al. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril*. 2008;89(4):832–9.
  48. Dal Prato LD, Borini A, Cattoli M, Bonu MA, Sciajno R, Flamigni C. Endometrial preparation for frozen-thawed embryo transfer with or without pretreatment with gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril*. 2002;77(5):956–60.
  49. El-Toukhy T, Taylor A, Khalaf Y, Al-Darazi K, Rowell P, Seed P, et al. Pituitary suppression in ultrasound-monitored frozen embryo replacement cycles. A randomised study. *Hum Reprod*. 2004;19(4):874–9.
  50. Yarali H, Polat M, Mumusoglu S, Yarali I, Bozdog G. Preparation of endometrium for frozen embryo replacement cycles: a systematic review and meta-analysis. Vol. 33, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016. p. 1287–304.
  51. Morozov V, Ruman J, Kenigsberg D, Moodie G, Brenner S. Natural cycle cryo-thaw transfer may improve pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24(4):119–23.
  52. Levron J, Yerushalmi GM, Brengauz M, Gat I, Katorza E. Comparison between two protocols for thawed embryo transfer: natural cycle versus exogenous hormone replacement. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2014;30(7):494–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09513590.2014.900032>
  53. Xiao Z, Zhou X, Xu W, Yang J, Xie Q. Natural cycle is superior to hormone replacement therapy cycle for vitrified-preserved frozen-thawed embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med* [Internet]. 2012;58(2):107–12. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19396368.2011.646047>
  54. Zheng Y, Dong X, Huang B, Zhang H, Ai J. The artificial cycle method improves the pregnancy outcome in frozen-thawed embryo transfer: a retrospective cohort study. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2015;31(1):70–4. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25223893>

55. Groenewoud ER, Cohlen BJ, Al-Oraiby A, Brinkhuis EA, Broekmans FJ, de Bruin JP, et al. A randomized controlled, non-inferiority trial of modified natural versus artificial cycle for cryo-thawed embryo transfer. *Hum Reprod.* 2016;31(7):1483–92.
56. Groenewoud ER, Cantineau AEP, Kollen BJ, Macklon NS, Cohlen BJ. What is the optimal means of preparing the endometrium in frozen-thawed embryo transfer cycles? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013;19(5):458–70.
57. Mounce G, McVeigh E, Turner K, Child TJ. Randomized, controlled pilot trial of natural versus hormone replacement therapy cycles in frozen embryo replacement in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2015;104(4):915–920e1.
58. Greco E, Litwicka K, Arrivi C, Varricchio MT, Caragia A, Greco A, et al. The endometrial preparation for frozen-thawed euploid blastocyst transfer: a prospective randomized trial comparing clinical results from natural modified cycle and exogenous hormone stimulation with GnRH agonist. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(7):873–84.
59. Melnick AP, Setton R, Stone LD, Pereira N, Xu K, Rosenwaks Z, et al. Replacing single frozen-thawed euploid embryos in a natural cycle in ovulatory women may increase live birth rates compared to medicated cycles in anovulatory women. *J Assist Reprod Genet.* 2017 Jun;
60. Peeraer K, Couck I, Debrock S, De Neubourg D, De Loecker P, Tomassetti C, et al. Frozen-thawed embryo transfer in a natural or mildly hormonally stimulated cycle in women with regular ovulatory cycles: A RCT. *Hum Reprod.* 2015;30(11):2552–62.
61. Aleyasin A, Aghahosseini M, Safdarian L, Noorzadeh M, Fallahi P, Rezaeian Z, et al. Can letrozole plus HMG protocol improve pregnancy outcomes in frozen-thawed embryo transfer? An RCT. *Int J Reprod Biomed (Yazd, Iran) [Internet].* 2017;15(2 PG-83-86):83–6. Available from: NS -
62. Bjuresten K, Landgren BM, Hovatta O, Stavreus-Evers A. Luteal phase progesterone increases live birth rate after frozen embryo transfer. *Fertil Steril.* 2011;95(2):534–7.
63. Eftekhari M, Rahsepar M, Rahmani E. Effect of progesterone supplementation on natural frozen-thawed embryo transfer cycles: A randomized controlled trial. *Int J Fertil Steril.* 2013;7(1):13–20.
64. Gardner D, Schoolcraft W. In-vitro culture of human blastocysts. Towards reproductive certainty: fertility and genetics. 1999. 378-388 p.
65. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score

- affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000;73(6):1155–8.
66. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1657–64.
  67. Weissman A, Levin D, Ravhon A, Eran H, Golan A, Levran D. What is the preferred method for timing natural cycle frozen-thawed embryo transfer? *Reprod Biomed Online*. 2009;19(1):66–71.
  68. Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2008;17(6):841–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60413-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60413-0)
  69. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67(1):73–80.