

TRANSFER EDİLECEK İYİ KALİTEDE EMBRYOSU OLMAYAN HASTALARDA ASSISTED HATCHING VE DEFRAGMENTASYONUN IVF SONUÇLARINA ETKİSİ

Ahmet Zeki IŞIK, Gamze Sinem ÇAĞLAR, Eran SÖZEN, Görkem TUNCAY, Kubilay VİCDAN

Özel Ankara Tüp Bebek Merkezi, Ankara

ÖZET

Objektif: İyi kalitede transfer edilebilir embryosu olmayan hastalarda 3. günde assisted hatching işlemine ek olarak uygulanan defragmentasyonun implantasyon ve gebelik oranlarına etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve yöntemler: İyi kalitede embryosu olmayan (Veeck klasifikasyonu grade >1 ve/veya >%10 fragmentasyon) tüm yaşlardan hastalar (n=168) retrospektif olarak incelendi. Birinci grupta transfer edilen tüm embryolar grade 2 olup, mekanik assisted hatching (mAHA) uygulanmıştı. İkinci gruba ise asit Tyrodes aAHA ve defragmentasyon yapılmış ileri derecede fragmentasyonu olan (>%10-50 fragmentasyon) grade 3 embryo transferleri dahil edildi.

Sonuçlar: Birinci grupta pozitif β hCG %33, klinik gebelik (fetal kalp atımı olan) oranı %27 ve implantasyon oranı %11,28 idi. Bu oranlar aAHA ve defragmentasyon grubunda sırası ile. %37, 1, % 28, 8 ve %16,19 idi. 35 yaş üstü hastalarda aAHA ve defragmentasyon grubunda kabul edilebilir implantasyon (%14,46) ve klinik gebelik (%31,58) oranları elde edilmişti. Transfer edilecek iyi kalitede embryosu olmayan hastalarda defragmentasyon işlemi kabul edilebilir başarı oranları nedeni ile tecrübeli laboratuvar ekibi olan merkezlerde AHA işlemine ilave olarak uygulanabilir. Aksi takdirde sadece AHA daha uygun bir tercihtir.

Anahtar kelimeler: assisted hatching, defragmentasyon, embryo fragmentasyonu, embryo kalitesi, ICSI

Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Cilt: 10, Sayı: 3, Sayfa: 138- 42

THE OUTCOME OF ASSISTED HATCHING AND DEFRAGMENTATION IN PATIENTS WITH POOR QUALITY EMBRYOS OF IVF OUTCOME

SUMMARY

Objective: To evaluate the effects of assisted hatching in combination with defragmentation applied to day 3 poor quality human embryos, on implantation and pregnancy rates.

Materials and methods: A retrospective analysis was performed in patients (n=168) of all ages with no good quality transferable embryos (Veeck classification embryos >grade 1 and/or >10% fragmentation). The first group was consisted of cycles in which mAHA was performed to all transferred grade 2 embryos. The second group included transfer cycles where all the embryos were highly fragmented (between 10-50% fragmentations, grade 3) and aAHA and microsurgical fragment removal were applied to all of them.

Results: In first group positive β hCG was 33%, clinical pregnancy (fetal heart beat) rate was 27% and implantation rate was 11,28%. These rates were 37, 1%; 28, 8% and %16,19 respectively in the aAHA plus defragmentation group. In cases over 35 years of age in aAHA plus defragmentation group acceptable implantation (14,46%) and clinical pregnancy (31,58%) rates were achieved.

Yazışma adresi: Doç. Dr. Ahmet Zeki Işık. Özel İrenbe Tüp Bebek Merkez, Talatpaşa Bulvarı 1436 sok. no. 6, 35227 Alsancak, İzmir, Türkiye
Tel.: (0532) 411 81 84

e-posta: azeki@irenbe.com

Alındığı tarih:26.11.2008, revizyon sonrası alınma: 14.03.2009, kabul tarihi: 01.05.2013, online yayın tarihi: 02.05.2013

Conclusion: *In patients with no good quality transferable embryos AHA combined with defragmentation can be utilised with acceptable success rates in laboratories where there are experienced personnel available for this procedure otherwise only AHA can be the best option.*

Key words: *assisted hatching, defragmentation, embryo fragmentation, embryo quality, ICSI*

Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Vol: 10, Issue: 3, Pages: 138- 42

GİRİŞ

Yardımcı üreme tekniklerinde başarı embryo kalitesine bağlıdır. Embryo derecelendirmesinde kullanılan protokollerin çoğu embryo fragmentasyonuna ve blastomer büyüklük ve görünümüne dayanır. Embryonik hacminin %10'undan fazlasını kaplayan fragmentasyon embryo gelişiminde bozulma ile ilişkilidir⁽¹⁾. Embryo fragmentasyonunun embryo gelişiminde duraksamaya neden olduğundan bahsedilir ancak tam açıklanmamıştır. Gelişiminde duraksama olmayan ancak fragmentasyon tesbit edilen embriyoların akibeti ise halen belirsizdir.

Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda, fragmentasyonun artışı ile embryo gelişimindeki bozuklukların arttığı buna bağlı olarak da implantasyon oranlarında düştüğü bildirilmiştir⁽²⁻⁴⁾. Fragmentasyonun derecesi yanında fragmentasyon paterninin de implantasyonda önemli bir parametre olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾.

Gelişen embriyonun içindeki fragmanların alınmasının embryo üzerindeki yıkıcı etkileri ortadan kaldıracak etkin bir yöntem olduğu öne sürülmüştür⁽⁵⁾. Fragmentasyonu olan insan embriyolarına defragmentasyon işleminin uygulanması embryo gelişiminde olumlu etki göstermiş ve iyi kalitede blastosist gelişimi gözlenmiştir⁽⁶⁾. Ayrıca, defragmentasyon işlemi yapılan fragmentasyonlu embriyoların transferi sonrası klinik sonuçlar yüksek kalitede fragmentasyonu olmayan embriyolarla eşdeğer bulunmuştur⁽⁷⁾.

Bu çalışmada amaç transfer edilebilecek iyi kalitede yani grade 1 embriyosu olmayan hastalarda assisted hatching işlemine ek olarak defragmentasyon yapmanın gebelik sonuçları üzerine etkilerini değerlendirmektir.

sperm enjeksiyonu (ICSI) siklusundan oluşmaktadır. Çalışmaya siklus sonucu bilinen ve embryo transferi ile sonuçlanan sikluslar dahil edilmiştir. Tüm sikluslarda hastaların kendi gametleri ile, taze ICSI sikluslarıdır. Donör siklusları ve dondurma çözme embryo transferleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Yumurta toplama işlemi sonrası 3. günde embryo kalite değerlendirilmesinde grade >1 ve/vey >%10 fragmentasyonu olan hastalar (n=168) retrospektif olarak incelendi. Tüm yaş grupları çalışmaya dahil edildi.

Kontrollü ovaryan hiperstimulasyonda gonadotropin-releasing hormone analogu (GnRH) (Lucrin, Abbott, Switzerland) (long veya microdose flare-up protokolü) kullanılmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen hastalarda ovaryan rezervi iyi olan hastalarda long, protokol rezervi azalmış hastalarda microdose flare-up protokol tercih edilmiştir. mAHA grubunda 42(% 66) hasta long protocol, 21 hasta microdose protokol; aAHA ve defrag. grubunda da 69 (% 65,7) hasta long protocol, 36 hastada microdose protokol kullanılmıştır. mAHA grubunda 31 (% 49) hastanın birinci siklusu; aAHA ve defrag grubunda ise 53 (%51) hastanın birinci siklusudur. Long protokolde hipofizer baskılanma sağlandıktan sonra gonadotropin (rFSH) (Puregon, Organon, Netherlands) başlanmış ve gonadotropin dozu hastanın ovaryan cevabına göre(150-300 IU/gün) ayarlanmıştır. Mikrodoz flare-up protokolde 21 günlük oral kontraseptif uygulamasını takiben 3. gün günde 2 kez 40 mikrogram Lucrin başlanmış ve bu uygulamanın 3. gününde de 300-450 IU gonadotropin başlanmıştır. Üç veya daha fazla folikül 18 mm çapa ulaşıncaya ovülasyon 10,000 IU hCG (Pregnyl, Organon, Netherlands) ile tetiklenmiştir. hCG enjeksiyonundan 35 saat sonra yumurta toplama işlemi yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma grubu özel bir IVF kliniğinde Ocak 2003 - Eylül 2006 yılları arasında yapılan 168 intrasitoplasmik

Embryo kültürü ve fragmentasyonun değerlendirilmesi

Yumurta toplama işleminden sonra hyaluronidase uygulamasını takiben tüm metafaz II oositlere ICSI

uygulanmıştır. ICSI işleminde Narishige micromanipülör, Olympus IX 71 inverted mikroskop kullanılmıştır. Fertilize olan tüm oositler 25 µl micro damla vasatta kültüre edilmiş ve ayrı ayrı analiz edilmişlerdir..

Tüm embryolar 3. günde değerlendirilmiş ve embryo kalitesi Veeck klassifikasyonuna⁽⁸⁾ göre sınıflandırılmıştır. Embryo fragmantasyonunun değerlendirilmesi laboratuvar sorumlu embriyologu tarafından yapılmıştır. Transfer edilecek grade 2 embryolara parsiyel zona disseksiyon pipeti (Conseption Technologies, San Diego) ile mekanik assisted hatching (mAHA) yapılmıştır. İleri derecede fragmantasyonu (>%10-50). olan grade 3 embryolara assisted hatching (aAHA) işlemi için asidifiye Tyrode's solüsyonu (Medicult, Denmark) aha pipette (Research Instruments, United Kingdom) ile uygulanıp asidifiye solüsyon ortamdan emildikten sonra blastomerleri hasarlamadan tüm veya bazı fragmanların temizlenmesi işlemi yapılmıştır.(sure maksimum 3 dakika ile sınırlandırılmıştır) Defragmantasyon işleminden sonra embryolar ek süre olarak 2 saate kadar transfer öncesi enkübe edilerek dinlendirilmiştir. Tüm bu işlemler laboratuvar sorumlu embriyologu tarafından geliştirilmiştir. Tüm embryo transferleri yumurta toplama işlemi sonrası 3. günde yapılmıştır. .

ICSI siklusları iki grupta analiz edildi. Birinci grupta <%10 fragmantasyon mevcut olup sadece AHA yapılmıştır. İkinci gruptaki hastalarda yani defragmantasyon ve AHA yapılanlarda fragmantasyon >%10 dur.. İki grup kadın yaşı, alınan oosit sayısı, metafaz 2 oosit sayısı, fertilize olan oosit sayısı, transfer edilen embryo sayısı, pozitif βhCG, klinik gebelik ve implantasyon oranları açısından karşılaştırıldı.

Sonuçlar

168 yumurta toplama işleminde 2614 oosit elde edildi. Alınan matur (MII) oosit sayısı 2075 olup bunların 1356 'sı fertilize oldu. Toplamda 547 embryo transfer edildi.

Birinci grupta 63 hasta, ikinci grupta 105 hasta vardı. İki hasta grubu ortalama kadın yaşı, ortalama alınan oosit sayısı, metafaz II oosit ve fertilize olan oosit sayısı benzerdi (Tablo I). aAHA ve defragmantasyon grubunda (group 2) ortalama transfer edilen embryo sayısı, mAHA grubuna göre daha yüksek bulundu (sırasıyla 3,39 vs 3,09, p=0.037).

Tablo I: İki gruptaki hastaların yaş ve siklus karakteristikleri.

	mAHA n=63	aAHA+defrag. n=105	P
Yaş (yıl)	31,79 ± 5,23	31,74 ± 4,84	NS
Oosit sayısı	15,12 ± 0,35	15,81 ± 6,49	NS
MII oosit	12,55 ± 9,71	12,23 ± 5,21	NS
2PNSayı	7,15 ± 4,91	8,62 ± 4,24	NS
Transfer edilen embryo	3,09 ± 1,07	3,39 ± 0,78	0.037

Tüm değerler ortalama±standart sapma.

Birinci grupta βhCG pozitifliği %33, klinik gebelik (ultrasonda fetal kalp atımı) oranı %27 ve implantasyon oranı %11,28 idi. Bu bulgular aAHA ve defragmantasyon grubunda sırası ile %37,1; %28,8 ve %16,19 idi. Bu parametreler açısından iki grup karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo II).

Tablo II: İki grubun siklus sonuçları.

	mAHA N=63	aAHA+defrag N=105	P
Gebelik ^a	33,3%	37,1%	NS
N=	(21)	(39)	
IO	11,28%	16,19%	NS
(n=sac+)	(22)	(57)	
KG	27%	28,8%	NS
N=	(17)	(30)	
Canlı Doğum			NS
Tek	(9/12) 75%	(6/12) 50%	
İkiz	(4/5) 80%	(10/11) 90,9%	
Üçüz		(1/6) 16,6	

^aGebelik: + beta HCG; IO: implantasyon oranı; KG: Klinik gebelik.

İki grup ortalama kadın yaşları göz önüne alınıp tekrar değerlendirildi. Tablo III'de gebelik, klinik gebelik, implantasyon oranı ve canlı doğum sayıları verilmektedir. 35 yaş altında olan hastalarda, gebelik, klinik gebelik, ve implantasyon oranları iki grupta benzerdi (p>0,05). Birinci grupta 35 yaş üstünde 19 hasta, bu grupta 35 yaş üstü hastaların yaş ortalaması 39.57 +2.81 ve bu hastalara transfer edilen ortalama embryo sayısı 2.89+1.14 dir. İkinci grupta 35 yaş üstünde 38 hasta, bu grupta 35 yaş üstü hasta yaş ortalaması 39.45+3.05,ve bu hastalara transfer edilen ortalama embryo sayısı 2.23+1.52 dir. 35 yaş üstü hastalarda ise istatistiksel anlamlı değer olmasa da mAHA grubunda (n=19) implantasyon (%6,25) ve klinik gebelik (%21,04) oranlarında genel bir düşüş izlendi (Şekil 1). Ancak, aAHA ve defragmantasyon yapılan grupta, 35 yaş üstünde (n=38)ise makul

sayılabilecek implantasyon (%14,46) ve klinik gebelik (%31,58) oranları mevcuttu. 35 yaş üstü birinci grupta canlı doğum yok; ikinci grupta 2 hasta canlı doğum yapmıştır. Hasta sayıları az olduğundan istatistiksel karşılaştırma yapılamamıştır.

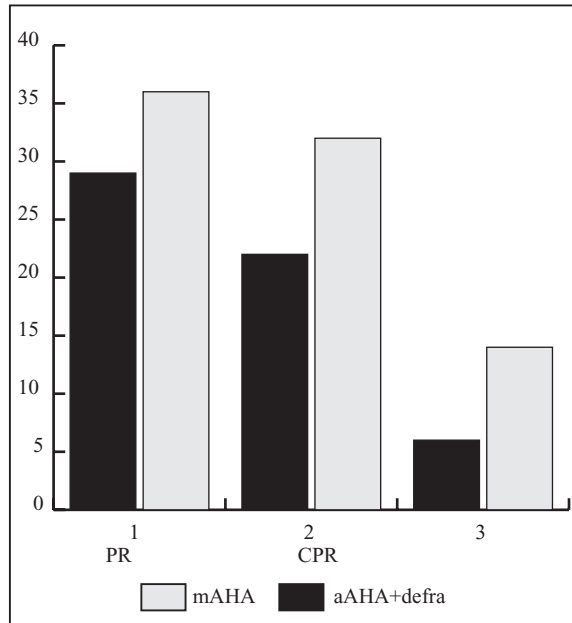
Tablo III: İki grubun siklus kadın yaş gruplarına göre sonuçları.

	GO (%)		KGO (%)		IO (%)	
	Group I	Group II	Group I	Group II	Group I	Group II
Yaş ≤ 35	35,68	37,97	29,2	29,1	13,10	16,72
Age > 35	28,57	36,36	21,04	31,58	6,25	14,46

GO: gebelik oranı (+ beta HCG); KGO: Klinik gebelik oranı, IO: implantasyon oranı.

Şekil 1: 35 yaş üstü hastalarda siklus sonuçları.

mAHA n:19 aAHA + defrag. n:38.



PR: gebelik oranı (+ beta HCG); CPR: Klinik gebelik oranı, IR: implantasyon oranı.

TARTIŞMA

Bu çalışma embryo morfolojisini bozan fragmantasyonunun siklus sonuçlarına etkisi araştırılmak üzere planlanmıştır. Literatüre göre, fragmantasyonun artışı ile embryo gelişimi bozulmaktadır^(3,9,10). In vitro çalışmalarda fragmantasyonun embryo gelişimine olumsuz etkileri çalışılmıştır. Fragmantasyon oranı ve paterni blastosist oluşumu üzerine de etkilidir⁽⁹⁾. Ek olarak, yaygın fragmantasyon olan embryolarda blastosist oluşumunun azaldığını bildirilmiştir^(6,10).

Fragmantasyon ile bozulan embryo gelişiminin

defragmantasyon işlemi ile düzeltilmesinin mümkün olup olmadığı hakkında çok az bilgi mevcuttur. Son yıllarda yapılan bir çalışma⁽⁶⁾, defragmantasyon işleminin fragmente embryoyu iyileştirmede ümit verici olduğunu bildirmiştir. Yazarlar, defragmantasyondan sonra blastosist oluşumunun artması yanında blastosist kalitesinde arttığını da bildirmişlerdir⁽⁶⁾. Bunun yanında, Eftekhari-Yazdi ve ark. çalışmasında⁽⁶⁾ fragmantasyonların temizlenmesi ile ölü ve apoptotik hücre miktarında azaldığı bildirildi.

Defragmantasyon işleminin pozitif etkileri daha önce ortaya konmuştu. Defragmantasyon yapılan kötü kalite embryolar işlem sonrası grade 1 embryolar ile benzer implantasyon ve canlı doğum oranları sahipti^(3,11). Başka bir çalışmada⁽⁷⁾ hafif fragmantasyonu olan assisted hatching ve defragmantasyon yapılan embryolar ile sadece assisted hatching yapılan grade 1 embryoların transferi sonucunda benzer implantasyon oranları elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda iyi kalitede transfer edilecek embryosu olmayan hastalarda (embryo kalitesi >grade 1 ve/veya >10% fragmantasyon) assisted hatching/defragmantasyon işlemi ile sadece assisted hatching yapılan grup arasında implantasyon ve gebelik oranları açısından fark bulunmadı.

Yaş gruplarına göre bakıldığında, 35 yaş üstünde mAHA grubunda, implantasyon (%6,25) ve klinik gebelik (%21,4) oranlarında genel bir düşüş izlendi.. Ancak, >35 yaş üstünde aAHA ve defragmantasyon grubunda kabul edilebilir implantasyon (%14,46) ve klinik gebelik (%31,58) oranları elde edildi. Saptanan bu fark ikinci grupta daha fazla sayıda embryo transferi, ile ilişkili olabilir ancak bu gruptaki hastaların embryosunun bariz daha kötü kalitede olduğu unutulmamalıdır.

Assisted hatching işlemi genel IVF popülasyonunda rutin olarak önerilmemektedir. Ancak ikiden fazla başarısız IVF denemesi olan, kötü embryo kalitesine sahip hastalarda ve ileri yaş (≥38 yaş) ta önerilmektedir⁽¹²⁾. İyi kalitede transfer edilecek embryosu olmayan hastalarda defragmantasyon işlemi deneyimli laboratuvar personeli olan merkezlerde uygulanabilir ve makul gebelik sonuçları kötü kalitedeki embryolarla elde edilebilir. Ancak deneyimsizlik durumunda embriyo hasarı olabileceği göz önünde bulundurularak yalnızca mAHA işlemine gitmek daha yerinde olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alikani M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Human Reproduction* 1999; 14: 429- 47.
2. Staessen C, Janssenswillen C, Van Den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem AC. Avoidance of triplet pregnancies by elective transfer of two good quality embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 1650- 3.
3. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al., Embryo score to predict implantation after in vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10: 2427- 31.
4. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12: 1545- 9.
5. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi J, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836- 42.
6. Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi MR, Ashtiani SK, Eslaminejad MB, Karimian L. Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos. *RBM online* 2006; 13(6): 823- 32.
7. Keltz MD, Skorupski JC, Bradley K, Stein D. Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization *Fertil Steril* 2006; 86: 321- 4.
8. Veeck LL. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology.* 1999 Parthenon Publishing, New York.
9. Alikani M, Calderon G, Tomkin G et al. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Human Reprod* 2000 15; 2634- 43.
10. Hardy K, Stark J, Winston RML. Maintenance of inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol of Reprod* 2003 68; 1165- 9.
11. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 293- 8.
12. The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. The role of assisted hatching in in vitro fertilization. A review of the literature. A Committee opinion. *Fertil Steril* 2008; 90: S196- 8.