

TC
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEĞİŞİK BİYOPSİ YÖNTEMLERİNİN KRYOSURVIVAL ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

DR. CENK ÖZCAN

DANIŞMAN
PROF. DR. SERHAT PABUCCUOĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DÖLERME VE SUN'I
TOHURLAMA ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Bu çalışma 24/02/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı Başkanlığı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emine KÖKOĞLU

Enstitü Müdürü

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Dölerme ve Sun'i Tohumlama AD.

Tez İzleme Komite Üyesi

Prof. Dr. Ragıp KILIÇARSLAN

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Doğum ve Jinekoloji AD.

Tez İzleme Komite Üyesi

Prof. Dr. Sema BİRLER

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Dölerme ve Sun'i Tohumlama AD.

Üye

Prof. Dr. Kemal SOYLU

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Dölerme ve Sun'i Tohumlama AD

Üye

Prof. Dr. Bülent BAYSAL

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Kadın Hastalıkları ve Doğum AD:

BEYAN

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

Cenk ÖZCAN

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bilgi birikimini ve pozitif enerjisini büyük bir sabır göstererek esirgemeyen, tanımaktan zevk aldığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU'na; bilimsel ve sosyal olarak desteğini her aşamada gösteren Sayın Prof. Dr.Sema BİRLER'e,

Mesleğimi icra ettiğim alanda akademik çalışma yapabileceğim tek çatıyı bulmakta bana ilk yol gösteren İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Erman OR'a, bu amacımı hoşgörü ve cesaretle kabul eden ve doktora çalışmam süresinde manevi desteğini sürekli hissettiren Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İ. Kamuran İLERİ'ye,

Çalışmam boyunca beni içlerinden biri gibi gören ve değerli katkılarda bulunan tüm Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üye, eleman ve idari personeline,

Tez çalışmasını gerçekleştirdiğim Özel İstanbul Cerrahi Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi Embriyoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma,

Beni yetiştiren ve hayatım boyunca yaptığım her işte yanımda olan sevgili anne, baba ve kardeşime, büyük sabır ve özveri gösteren hayat arkadaşım eşime en içten dileklerle ve minnetle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
BEYAN	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
GİRİŞ VE AMAÇ (BÖLÜM 1)	1
GENEL BİLGİLER (BÖLÜM 2)	4
2.1. İNSANDA IVF UYGULAMALARI	4
2.2. PREİMLANTASYON GENETİK TANI	5
2.2.1. NORMAL VE ANORMAL PREİMLANTASYON GELİŞİM	5
2.2.1.1. BİRİNCİ MAYOZ BÖLÜNMENİN DEĞİŞİK EVRELERİNDE OOSİTLER	5
2.2.1.2. İKİNCİ METAFAZ EVRESİNDE OOSİTLER VE BİRİNCİ POLAR CİSMİN OLUŞUMUNDAKİ VARYASYONLAR	5
2.2.1.3. FERTİLİZASYONDAN SONRA OOSİTLER VE İKİNCİ POLAR CİSMİN OLUŞUMU ..	6
2.2.1.4. NORMAL VE ANORMAL GELİŞEN EMBRİYOLAR	6
2.2.1.5. NORMAL VE ANORMAL BLASTOSİST GELİŞİMİ	7
2.2.2. PGT'NİN KLİNİK KULLANIMI	7
2.2.3. ZONA PELLUSİDA BARIYERİ	8
2.2.3.1. MEKANİK YÖNTEMLE BİYOPSİ	9
2.2.3.2. ASİT TİROT KULLANILARAK KİMYASAL YOLLA BİYOPSİ	10
2.2.3.3. LAZER İLE BİYOPSİ	10
2.2.4. BİYOPSİ ALINMA EVRELERİ	12
2.2.4.1. POLAR CİSİM BİYOPSİSİ	12
2.2.4.2. EMBRİYO BİYOPSİSİ	13
2.2.4.3. TROFEKTODERM BİYOPSİSİ	14
2.2.5. GENETİK ANALİZ	14
2.3. KRYOPREZERVASYON	16
2.3.1 KRYOBİYOLOJİK İLKELER	17
2.3.1.1. DONDURMA ESNASINDA HÜCRESEL DEĞİŞİKLİKLER	17
2.3.1.2. EMBRİYO DONDURMADA KORUYUCU PROSEDÜRLER	18

2.3.1.2.1. DONDURMA VE ÇÖZDÜRME HIZLARININ KONTROLÜ	18
2.3.1.2.2. KİMYASAL KORUMA	19
2.3.2. İNSAN EMBRİYOLARININ DONDURULMASINDA DEĞİŞİK PROTOKOLLER.....	20
2.3.2.1. YAVAŞ SOĞUTMA	20
2.3.2.1.1. BUZ KRİSTALLERİNİN OLUŞUMU – SEEDİNG	21
2.3.2.2. ULTRA-RAPİD SOĞUTMA.....	21
2.3.2.3. VİTRİFİKASYON.....	22
2.3.3. EMBRİYO DEPOLAMA VE ÇÖZDÜRME	22
2.3.4. BAŞARIYI ETKİLEYEN FAKTÖRLER	23
2.3.5. BİYOPSİ YAPILMIŞ EMBRİYOLARI DONDURMA	24
GEREÇ VE YÖNTEM (BÖLÜM 3)	29
3.1. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN OLANAKLAR.....	29
3.2. EMBRİYO SEÇİMİ.....	31
3.3. MİKROMANİPÜLASYON.....	32
3.4. EMBRİYO DONDURMA	34
3.5. EMBRİYO ÇÖZDÜRME.....	38
3.6. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	39
BULGULAR (BÖLÜM 4)	40
TARTIŞMA (BÖLÜM 5)	43
KAYNAKLAR	51
ETİK KURUL KARARI	66
ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

Özcan, C., Değişik Biyopsi Yöntemlerinin Kryosurvival Üzerine Etkisi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul, 2006

Çalışmada, üç değişik biyopsi metodunun, biyopsi yapılmış ve dondurulup çözdürülmüş embrioların kryosurvival oranlarına etkisini değerlendirmek amaçlanmaktadır. Çalışma transfer edilmeyecek durumda olan insan embriolarında yapılmıştır. Embriolar dondurulmadan önce biyopsi metotlarına göre dört gruba ayrılmışlardır: lazer ($n = 122$); asit tirot ($n = 123$); mekanik yöntem ($n = 126$) ve kontrol grubu ($n = 124$).

Tüm biyopsiler, eğer varsa, kompaktlaşmayı önleyen Ca^{2+} - Mg^{2+} içermeyen ortamlarda yapıldı. Tüm gruplarda, zona pellusida üzerindeki delik, blastomerin dışarıya çıkmasına izin verecek genişlikte ($\sim 30-40 \mu m$) açıldı. Embriolar, 1,2-propanediol (PROH) ve sukroz kullanılarak, standart yavaş dondurma prosedürü ve programlanabilir bir dondurma cihazıyla donduruldu ve hızlı prosedür ile çözdürüldü. Sonuçlar, SPSS 10.0 istatistik programında ki-kare (χ^2) yöntemi, ANOVA ve korelasyon analizleri ile değerlendirildi.

Embriyo survival oranı kontrol grubunda %71 (88/124), lazer ile biyopsi yapılan grupta %23,8 (29/122), asit tirot grubunda %27,6 (34/123) ve mekanik kesi grubunda %54,8 (69/126) olarak gerçekleşti. Mekanik yöntemle biyopsi yapılan gruba diğer biyopsi grupları arasındaki survival oranlarındaki fark, istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$). Zona pellusidanın delinmesinin kryosurvival oranını belirgin olarak olumsuz etkilediği görüldü ($p < 0.001$).

Çalışma sonucunda blastomer biyopsisinin ardından embriyo dondurulması ile, kryosurvival oranlarının belirgin olarak azaldığı sonucuna varılmaktadır. Ancak diğer metotlarla kıyaslandığında, mekanik yöntemle zona pellusidanın delinmesinin embriyonun kryosurvival şansını belirgin olarak arttırdığı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: insan, preimplantasyon genetik tanı (PGT), embriyo biyopsisi, kryosurvival

ABSTRACT

Ozcan, C., The Effect of Different Biopsy Methods on Cryosurvival, Istanbul University, Institute of Health Science, Faculty of Veterinary Medicine Reproduction and Artificial Insemination Department Doctoral Dissertation, Istanbul, 2006

The aim of this study was to evaluate the effect of the three different biopsy methods on the survival of biopsied embryos after freezing–thawing procedure. The analysis was performed on human embryos which were not considered for transfer. The embryos were divided into four groups before cryopreservation according to the drilling method: laser ($n = 122$); Acid Tyrode ($n = 123$); mechanical ($n = 126$) and the control group ($n = 124$).

Embryo biopsies were performed in Ca^{2+} – Mg^{2+} -free medium in order to allow decompaction, if exists. The size of the hole on ZP was large enough (~ 30 – $40 \mu\text{m}$) to allow aspiration of blastomeres in all biopsy groups. Embryos were cryopreserved by the standard slow freezing method using 1,2-propanediol (PROH) and sucrose as the cryoprotectants in a programmable freezer. Embryos were thawed by rapid procedure. Results were evaluated by Chi-square (χ^2), ANOVA and correlation analyze techniques of SPSS 10.0 statistic program for MS Windows.

Embryo survival rate was 71% (88/124) in the control group, 23.8% (29/122) in the laser drilling group, 27.6% (34/123) in the Acid Tyrode group and 54.8% (69/126) in the mechanical zona drilling group. Difference of the survival rates was statistically significant between mechanical drilling and other biopsy groups 1-2 ($p < 0.001$). It was obvious that all of the zona drilling methods effected cryosurvival ($p < 0.001$).

From the present study it can be concluded that, survival of human embryos after blastomere removal and subsequent cryopreservation is severely reduced. Compared with other methods, the mechanical zona drilling procedure gives the embryos the best opportunity to survive after cryopreservation.

Key words: human, preimplantation genetic diagnosis, embryo biopsy, cryosurvival

GİRİŞ VE AMAÇ (BÖLÜM 1)

Oosit kültürlerinin yapılabilme ihtimali 19. yüzyılın sonlarında düşünülse de hayvan modelleri üzerine ilk çalışmaların yapılıp yayınlanması 1930'lu yılları bulmuştur. Bu çalışmalarla elde edilen deneysel sonuçlar ve tecrübe modern in-vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarının temelini oluşturmuştur (10, 86, 138). Yardımcı üreme tekniklerinin gelişimi, 1978 yılında IVF ile elde edilmiş ilk insanın doğumuyla başlamıştır (102). Bu andan itibaren bu teknolojinin daha kolay uygulanabilmesini ve başarısının artırılmasını hedefleyen gelişmeler başlamıştır.

Fazla sayıda embriyo transfer etmenin gebelik oranını çok arttırmadığı fakat buna karşın çoğul gebelik ihtimalini arttırdığı ve bunun tedavi sonunda elde edilen sağlıklı doğum oranını etkilediği bilinen bir gerçektir (108). Çoğul gebeliklerin prognozu tabii olarak daha kötüdür ve birçok komplikasyonla birlikte seyretmektedir. Bu gerçekten yola çıkarak embriyoların dondurulması çalışmaları, hayvan çalışmalarıyla edinilen tecrübe sonrasında (130), 1983 yılında ilk insan embriyosunun başarıyla dondurulması ile devam etmiş (112) ve günümüzde yardımcı üreme tekniklerinin vazgeçilmez bir parçası olmuştur.

Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) fikri, doğan ilk IVF bebeği Louise Brown'dan bile eskiye dayanır. 1960'lı yıllarda ilk prenatal tanının yapılmasına (53) ve Gardner ve Edwards'ın (34) blastosist evresindeki tavşan embriyolarında cinsiyet tanımlaması yapmayı denemelerine kadar gider. Ne var ki PGT ancak IVF (102) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nun tanımlanmasından (92) sonra gelişmek için uygun ortamı bulabilmiştir.

İlk PGT olguları Handyside ve ark. (44) ile Verlinsky ve ark. (123) tarafından ayrı ayrı rapor edilmiştir. Handyside ve ark. (44), embriyo biyopsisini gelişme evresinde yapmışlar ve Y kromozomu geçişli genetik bozukluk riski taşıyan bir olguda y-spesifik DNA amplifikasyonu ile cinsiyet tanımlaması yapmışlardır. Verlinsky ve ark. (123) ise otozomal resesif bir hastalıkta birinci polar cisim biyopsisi yapmak suretiyle prekonsepsiyon tanı gerçekleştirmişlerdir. Bu olgular ilk kez 1990 yılında 1. Uluslararası Preimplantasyon Genetik Sempozyumunda açıklandığında PGT artık yardımcı üreme tekniklerinde yeni

bir dal halini almıştır. Geçen zaman içinde tüm dünyada değişik infertilite ve araştırma laboratuvarlarında binlerce PGT prosedürü uygulanmıştır. İlerlemiş anne yaşı ve genetik risk altında olan olgularda Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği uygulanarak PGT yapılması ve bu sayede embriyo seçimi yapılarak anöploidi ve translokasyon açısından taranmış embriyoların transfer edilebilmesiyle daha da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Embriyo biyopsisi, gelecek için oldukça umut vadeden yeni bir prosedürdür. Biyopsinin ardındaki teori, fertilizasyon gerçekleşikten ve embriyo bölünmeye başladıktan sonra embriyonun içerdiği bütün blastomerlerin aynı genetik bilgiyi içermeleridir. Bütün blastomerler aynı özellikte olduğuna göre araştırmacılar, bir blastomerin embriyodan dışarı alınıp DNA'sının incelenmesinin, gelecekte fetüs hakkında çok değerli veriler içereceğini düşünmüşlerdir.

Teknolojinin mükemmelleşmesi ve şu an uygulandığından daha ucuz hale gelmesi hayvan çalışmalarında da bir çığır açacaktır. Hayvanlarda embriyo biyopsileri gerçekleştirmek için in-vitro fertilizasyon teknikleri kullanmak gerekecektir. Embriyo biyopsileri en başarılı şekilde 6–8 hücreli aşamada kullanıldığından, uterusun yıkanmasıyla elde edilecek blastosistler, genetik tanı için uygun materyal olamayabilir. Hayvancılık endüstrisinde PGT'nin olası uygulamaları arasında: embriyoda cinsiyet tanımlanması, transgenik çalışmalar, et ve süt üretimi için tespit edilen bazı genlerin taranması sayılabilir.

Embriyo biyopsi prosedürünün tek başına embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkisi yoktur. Fare (57), maymun (104) ve insan (46) embriyolarında yapılan biyopsi çalışmalarında bu durum gösterilmiştir.

Uygulanan biyopsi yöntemleri ve implantasyon kapasitelerinin karşılaştırılması üzerine yapılan bir çalışmada, mekanik yöntemin lazer ile biyopsiye oranla daha başarılı sonuçlar verdiği vurgulanmıştır (6).

Bazı klinikler, tekrarlayan başarısız IVF denemeleri olan çiftlerde transfer edilen embriyoların kromozomal olarak normal olması için, tüm embriyoları taramaktadırlar (37). Bazı durumlarda biyopsi prosedürü ile embriyo dondurma prosedürünün birlikte kullanılması zorunludur. Dolayısı ile, transfer fazlası

embriyoların daha sonra kullanılabilmeleri için, biyopsi yapılmış embriyoların dondurulması daha da önem kazanmıştır.

Ne yazık ki biyopsi yapılmış embriyoların biyopsi yapılmadan dondurulan embriyolara oranla çok daha düşük kryosurvival oranlarına sahip olduğu bildirilmiştir (12, 56, 68). Standart yavaş dondurma metotlarının modifiye edilmesi (55), vitrifikasyonun giderek gelişen bir yöntem olarak (64) biyopsi yapılan embriyolarda da kullanılması ve başarının yükselebileceğine dair yeni çalışmalar (141) olsa da, yavaş dondurma protokolü kullanılarak insan embriyolarında değişik biyopsi yöntemlerinin kryosurvival üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmamıştır.

Etik açıdan metodolojik araştırma yapabilmek için implantasyon kapasitesi bulunan normal insan embriyoları kullanılamayacağı için, bu tür bir çalışmada ancak klinik IVF-ICSI ile elde edilmiş embriyoların transfer edilecek kalitede olmayanları kullanılabilir (141). Bu nitelikte insan embriyoları kullanılarak planlanan bu çalışmada, asit tiroz, lazer ışını ve mekanik kesi teknikleri kullanılarak yapılan biyopsi yöntemlerinin kryosurvival üzerine etkisi, herhangi bir yöntemle biyopsi yapılmamış embriyolarla karşılaştırılarak araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER (BÖLÜM 2)

2.1.İnsanda IVF Uygulamaları

İnsan IVF uygulamalarında fazla sayıda oosit elde etmek için FSH kullanılması bilinen en klasik yöntemdir. Bunun için kullanılacak superfollikülasyon protokolleri farklı olabilir. Spontan LH yükselmesine bağlı ovulasyonu engellemek için GnRH agonistleri kullanılması ile birlikte ovulasyon indüksiyonları ve FSH'ın güvenli kullanımı belli bir standarda ulaşmıştır (65). GnRH kullanımına bir önceki menstrüel siklusun 21. gününde (uzun protokol) veya aynı siklusun 3. gününde (kısa protokol) başlanabilir (100). Hastanın klinik durumuna uygun GnRH ve FSH dozu belirlendikten sonra tedavi başlatılır.

Foliküler gelişimin takibi ultrason kontrolleri ile yapılır (30). Gelişen ve ortalama olarak 16–18 mm çapa ulaşan folliküller HCG enjeksiyonunu takiben (97) 34–36. saatte yine ultrason yardımıyla aspire edilerek kumulus ooforus kompleksleri in-vitro koşullara alınır (63). Konvansiyonel IVF (102) veya ağır erkek infertilitesi olguları için geliştirilen, tek bir spermin oositin sitoplazması içine bırakılması işlemi olan Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) yöntemi ile (84) fertilizasyon sağlanır.

Oositlerin in-vitro koşullarda tutulması ve fertilizasyonu hakkındaki bilgiler uzun yıllar önceye dayanmaktadır (10, 86). Bunun için kullanılan kültür ortamları ve fiziksel şartlar bu öncü çalışmalar ışığında gelişmektedir. Günümüzde in-vitro embriyo gelişimi ve bu süreçte kültür ortamlarında bulunması gereken bileşenler iyi tanımlanmış haldedir (33). Birçok IVF merkezi bu ihtiyaçlara uygun hazırlanmış ticari solüsyonları kullanmaktadır. Bu solüsyonlar, embriyonal gelişimin değişik dönemleri ve bu dönemlerdeki farklı metabolik ihtiyaçlar göz önüne alınarak hazırlanmış çok aşamalı özelliktedir. IVF merkezinin embriyo transfer politikalarına bağlı olarak transferin gerçekleşeceği güne (3. veya 5. gün) kadar, bu standart embriyo kültür prosedürlerine bağlı kalınır (10, 138).

Transfer edilecek embriyolar, genellikle 3. gün sabah embriyo morfolojileri değerlendirilerek belirlendikten sonra 20–30 µl kültür vasatı ile birlikte transvajinal yolla fundusun yaklaşık 10 mm uzağına olmak üzere uterus lümenine yerleştirilir (98). Blastosist transferi planlanıyorsa embriyo transferi 5. veya 6. güne sarkıtılabilir.

Transferin ardından 12. günde kanda β HCG seviyesi kontrol edilerek gebelik tayini yapılır ve 3–4 hafta sonra yapılan ilk ultrasonda uterusda gebelik kesesi görüldüğünde ve fetal kalp atımı belirlendiğinde klinik olarak da gebelik onaylanır (97).

2.2.Preimplantasyon Genetik Tanı

2.2.1.Normal ve Anormal Preimplantasyon Gelişim

Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT), birinci veya ikinci polar cisimlerden veya embriyo biyopsisi yapılarak alınan blastomerlerden yapılabilir. Bu nedenle, sırasıyla oositin blastosiste kadar tüm evrelerdeki özellikleri bilmek, genetik analiz için materyal seçiminde önemlidir.

2.2.1.1.Birinci Mayoz Bölünmenin Değişik Evrelerinde Oositler

Mevcut kontrollü ovaryen hiperstimülasyon yöntemleri, eşzamanlı olmayan birçok oositin beraber gelişmesine yol açar. Yumurta olgunlaşması için enjekte edilen İnsan Koryonik Gonadotropini (HCG), Germinal Vezikül Kırılması (GVBD)'na yol açar. Böylece oositin sitoplazmik maturasyonu normal embriyonik gelişim için uygun olmayabilir (116).

Oosit maturasyonu için tanımlama, germinal vezikülün kaybolması ve birinci polar cismin (PB1) varlığı ile yapılabilir. Tipik Metafaz I (intermediate) oosit ise herhangi bir polar cisim veya germinal vezikül içermez (122).

2.2.1.2.İkinci Metafaz Evresinde Oositler ve Birinci Polar Cismin Oluşumundaki Varyasyonlar

HCG enjeksiyonunu takiben 36–40. saatlerde genelde düzgün morfolojide, perivitelin fragmanları olmayan PB1 içeren metafaz II oositler çoğunluktadır.

PB1 olgunlaşmayı takiben oositin genotipi hakkında bilgi verecek bir materyal olmanın yanı sıra, aslında birinci mayotik bölünmenin bir yan ürünüdür. İkinci mayotik bölünmeden sonra ortaya çıkan ikinci polar cisim (PB2) ile birlikte analiz edildiğinde maternal genetik özellikler taranabilir. Böylece teorik olarak anormal oositlerden gelişen maternal kökenli kromozomal anomalili embriyoların transferi önlenmiş olur (122).

Polar cisimlerin alınmasının preimplantasyon ve postimplantasyon embriyo gelişimi üzerine hiçbir etkisi yoktur.

2.2.1.3.Fertilizasyondan Sonra Oositler ve İkinci Polar Cismin Atılması

Normal fertilizasyon oluşumu, inseminasyondan 12–18 saat sonra ooplazma içinde iki pronükleus oluşması ve perivitelin boşlukta PB2'nin görülmesi ile anlaşılır. PB2 oluşması konvansiyonel IVF veya ICSI'yi takiben oositin spermle karşılaşmasının işaretidir (60).

PB2'yi analiz etmeden oositin genotipi kesin olarak tespit edilemez. PB2 inseminasyon veya ICSI' den sonra ilk iki saat içinde ortaya çıkar. Pronükleuslar ise 4. saatten itibaren oluşur ve 20. saate kadar gözlenebilir (60).

2.2.1.4.Normal veya Anormal Gelişen Embriyolar

PB1 ve PB2'nin analizi sadece maternal kökenli tek gen ve kromozomal hastalıklar hakkında bilgi verirken, blastomer analizleri paternal kökenli bozuklukları da tespit eder. Zigotun ilk bölünmesi inseminasyondan yaklaşık 20 saat sonra gerçekleşir ve daha sonraki her bir bölünme 12–18 saat ara ile meydana gelir (15).

Bölünme evresinde, sitoplazmada eşit olmayan dağılıma neden olabilen asimetrik ve asenkron bölünmeler, nükleus içermeyen blastomerler, fragmentasyon veya yavaş gelişen embriyolar gözlenebilir (79).

Genelde 6 veya 8 hücreli aşamada bir veya iki blastomer alınır. Yavaş gelişen embriyolarda biyopsi prosedürü ertelenebilir.

Blastomer biyopsisi ile PGT'nin yüksek mozaisizm oranı (19, 78, 79) ve allele özel amplifikasyon bozukluğu (88) gibi bazı durumlarda ancak sınırlı değeri olabilir. Anükleer blastomer alındığında amplifikasyon komplet bozukluğu da gözlenebilir. Polar cisim biyopsisinde olduğu gibi, uygun teknikle yapılan embriyo biyopsi prosedürlerinde embriyonun daha sonraki gelişiminde bir sorunla karşılaşılmamaktadır.

Sonuç olarak, blastomer biyopsisi dünyadaki birçok klinikte PGT için en önemli materyal olmaya devam etmektedir.

2.2.1.5.Normal ve Anormal Blastosist Gelişimi

IVF uygulamalarında embriyo kültür ortamlarının blastosist gelişimine uygun hale gelecek şekilde aşama kaydetmesi ve gebelik şansının daha yüksek

olduğu öngörüsüyle birçok merkez blastosist transferlerine yönelmektedir. Bu gelişime bağlı olarak PGT'nin blastosist biyopsisi ile yapılması gündeme gelmiştir. Bu sayede bir iki hücre yerine düzinelerce hücre üzerinde analiz yapmak olası görünmektedir (75). Teorik olarak embriyonun uterusu transferinde biyopsi ile kaybedilmiş hücrelerin oranı da düşük olacaktır. Bu iyimserliğe rağmen, henüz klinik anlamda blastomer biyopsisinin yerini alamamıştır.

2.2.2.PGT'nin Klinik Kullanımı

Preimplantasyon genetik tanı 1990'ların başında, cinsiyet geçişli hastalık riski taşıyan çiftlerde gebeliğin sonlandırılmasına gerek kalmadan implantasyon öncesi genetik bozukluğun tanınması ile diğer doğum öncesi tanı yöntemlerine bir alternatif olarak sunulmuştur. Böylelikle, diğer prenatal tanı yöntemleri sonucu ebeveynlerde oluşacak olumsuz psikolojik etkilerin ve muhtemel bir bozukluk veya hastalığın ancak bu dönemde yakalanabilmesinin yaratacağı yıkımın da önüne geçilmektedir.

Önceleri Y kromozomu ile aktarılan cinsiyet geçişli hastalıkların taşıyıcısı ebeveynlerden in-vitro tekniklerle elde edilmiş embriyolar cinsiyet kromozomları açısından incelenerek, sadece dişi embriyolar transfer ediliyordu. Daha sonra oositlerin birinci ve ikinci polar cisimciklerinin incelenmesini de içeren tek hücre seviyesinde veya gelişme evresindeki embriyoların blastomerlerinin genetik analizleri ile ilgili teknikler gelişmiştir. Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH) kromozomların analiz edilmesi amacıyla, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ise tek gen hastalığına yol açan genin analizi için geliştirilmiştir.

PGT, iyi tanımlanmış bazı genetik hastalıklar açısından araştırılıp sadece etkilenmemiş olan embriyoların anne rahmine transferini amaçlayan erken dönem bir prenatal tanı yöntemi olarak değerlendirilebilir (96). Birkaç yıl öncesinde ilk laboratuvar çalışmaları yayınlanmış (17, 49) olmasına rağmen PGT, 1990 yılında ilk klinik çalışmada kullanıldığında büyük yankı yaratmış ve embriyo araştırmaları için bir çığır açmıştır. İlk klinik uygulama, normalde her dört çocuğundan birinde hastalık çıkabilecek olan X-bağımlı hastalık taşıyıcısı olan bir çiftte yapılmıştır (44). Bu uygulamada Y kromozomundaki diziler PCR ile incelenerek erkek embriyolar dişi olanlardan ayrılmış ve sadece dişi embriyolar

anne adayına transfer edilmiştir. Daha sonraları PCR tekniği sık görülen bazı tek gen hastalıklarının marker'larının üretilmesi sayesinde kullanılmıştır (28). Yine 1990'ların başında, tek hücrede kromozomal seviyede genetik analize imkan veren FISH; cinsiyet tanımlaması (41, 101), anöploid taraması ve diğer kromozomal dizilim dengesizliklerini tespit etmede PCR'ın yerini almıştır (16, 80, 137).

2.2.3.Zona Pellusida Bariyeri

Memeli yumurtası ve embriyosundaki zona pellusida, fertilizasyon ve embriyo gelişimi sırasında pek çok fonksiyonu olan aselüler, sülfatlanmış glikoprotein bir bileşimdir (18). Fertilizasyondan sonra zona pellusidanın ana görevi, embriyonun bütünlüğünün korunmasıdır (15). Embriyonik gelişimin ilk dönemlerinde blastomerler birbirine zayıf şekilde bağlıdır. Zona pellusidanın, üreme kanalındaki normal fizyolojik göçü sırasında embriyonun hücrelerinin bir arada tutularak bütünlüğünün korunmasında ve dış etkilere karşı kimyasal ve mekanik bariyer olma görevinin sürdürülmesi önemlidir.

Oositin ve embriyonun içine yapılacak her türlü girişim için bu glikoprotein yapının delinmesi kaçınılmazdır. Hedef hücrelere zarar vermeden yapılacak bu girişim, neticede gelişmiş bir mikromanipülasyon gerektirmektedir.

Zona pellusida üzerine yapılan ilk manipülasyon çalışmaları, sperma özellikleri nedeniyle kendiliğinden gerçekleşemeyen fertilizasyonun, zona pellusida üzerinde açılan bir delik yardımıyla gerçekleştirilmeye çalışılmasıdır. Bu olay fare ve insanlarda defalarca rapor edilmiştir (35, 39, 129).

İlerlemiş yaşta ve kalın zona pellusida varlığında ilk defa Cohen ve arkadaşları (14) tarafından rapor edilen Yardımlı Zonadan Çıkış (AH-Assisted Hatching) uygulamasında ise ana amaç, kalın zona pellusida'sı olan ve yeterince hatching faktör salgılayamayan trofektoderimli embriyoların implantasyonunu kolaylaştırmaktır.

1992 yılında ilk kez tanımlanan ICSI (Mikroenjeksiyon-Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) ise fertilizasyon oranları üzerine olumlu etki yapan devrimsel bir tekniktir (84). Tek bir sperm hücresi ICSI pipeti yardımıyla sitoplazma içine direkt olarak bırakılmış ve fertilizasyon sağlanmıştır. Özellikle

erkek infertilitesinin tedavisinde bir ıgır açmış ve mikromaniplasyon tekniklerinin gelişmesinde nc olmuştur.

İlk PGT olguları Handyside ve ark. (44) ile Verlinsky ve ark. (123) tarafından aynı yıl içinde rapor edilmiştir. Preimplantasyon genetik tanı için biyopsi alınma gerekliliği ile birlikte polar cisim biyopsisinden blastosist evresinde trofektoderm hücre biyopsisine kadar çok çeşitli yöntem taraftar bulmuş, ancak her yöntemin kendine göre avantajları ve dezavantajları sürekli tartışılmıştır (107).

2.2.3.1.Mekanik Yöntemle Biyopsi

Zona pellusida üzerine yapılan ilk manipülasyon olan Kısmi Zona Kesisi (PZD-Partial Zona Dissection) bu yöntemin öncüsü olmuştur (69). Çok sivri uçlu bir pipet saat 1 hizasından perivitelin boşluğa sokulmuş, biyopsi yapılacak olan oosite (polar cisim biyopsisi) veya embriyoya (embriyo biyopsisi) değip zarar vermeden saat 11 hizasından çıkarılmıştır. Sonra, oositi tutan tutucu pipet gevşek bırakılmış ve içinden pipet geirilmış olan oositin zona pellusidası, delici pipet ile tutucu pipet arasına sıkıştırılıp bir makas gibi kullanılarak ileri-geri hareketlerle kesi gerekleştirilmıştir. Açılan delik ne kadar büyük olursa olsun, bu teknik deliğin her iki yakası arasındaki gerilim nedeniyle içeriye ancak küçük çaplı bir mikropipetin geçmesine izin verebilmektedir. Bu nedenle polar cisim biyopsilerinde etkin olarak kullanılabilen bu metot, embriyo biyopsilerinde mikropipetle aspire edilip çekilse bile blastomerin dar aralıkta ezilmesine ve parçalanmasına neden olabilmektedir. Bir diğer dezavantajı da istenilen blastomerin rahatça alınması üzerindeki pozisyonel engeldir.

Cieslak ve ark. (11)'nın ilk kez tanımladığı üç boyutlu PZD'de ise yine aynı mekanik manipülasyonla iki kesi açılmıştır. İlk kesi tamamlandıktan sonra kesinin ekseni saat 12 hizasına getirilip bu kesiye tam dik açıda aynı büyüklükte bir ikinci kesi açılmaktadır. Böylece zona pellusida üzerinde ha şeklinde 4 ayrı kapakığa sahip bir açıklık yaratmak mümkün olmuştur. Kesileri, istenilen büyüklükte blastomer biyopsi pipetinin girebileceği kadar genişletmek mümkündür. Oluşan açıklıklar biyopsi yapıldıktan sonra kapanmakta ve fiziksel olarak embriyo bütünlüğü zarar görmemektedir. Araştırmacılar gelişimin ileriki dönemlerinde bu yöntemin etkisini ve implantasyon oranlarını inceleyerek,

özellikle polar cisim biyopsisi ile kombine blastomer biyopsilerinde etkin şekilde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Yöntemin dezavantajı olarak uzun zaman alması ve tecrübeli bir uygulayıcı tarafından yapılması gereği vurgulanmıştır.

2.2.3.2.Asit Tirot Kullanılarak Kimyasal Yolla Biyopsi

İnsan embriyolarında gelişme döneminde perivitelin boşluklar oluşması ve zona pellusida sertleşmesi nedeniyle asit tirot ile zona pellusida üzerinde delik açmanın, oositlere uygulanmasına oranla daha kolay ve güvenli olabileceği bildirilmiştir (122). Ancak uygulanacak alanın ve açılacak deliğin büyüklüğüne bağlı olarak, asidik bir solüsyonun bu derece hassas hücrelerde zarar verme potansiyeli de dikkate alınmalıdır. Hızlı bir manipülasyonla embriyonun asitle karşılaşmasının azaltılması embriyo gelişimi üzerine olabilecek zararlı birçok etkinin önüne geçer.

Asit tirot solüsyonu Hogan ve ark.'nın (48) protokolüne göre laboratuarda hazırlanabileceği gibi (PH 2,2 – 2,4) ticari olarak da firmalardan temin edilebilir.

Embriyo bir tutucu pipet yardımıyla tutulup, 7–10 µm çapında bir asit pipeti saat 3 hizasına getirilerek daha önceden içeriye çekilmiş Asit tirot istenilen zona pellusida yüzeyine püskürtülür. Püskürtülen yüzey, alınması hedeflenen blastomere yakın perivitelin boşluğun hemen komşuluğundaki kısım olmalıdır. Delik açılır açılmaz, ortama fazla asit vermemek için hemen negatif basınç uygulanarak, embriyonun damlacık içindeki yeri değiştirilir (68).

Delik açıldıktan sonra biyopsi pipeti içeriye sokularak istenilen blastomer dışarıya alınır ve prosedür sona erer. Embriyoyu pH değişikliklerinin zararlı etkisinden korumak için işlem bittikten sonra defalarca yıkamak gereklidir.

2.2.3.3.Lazer ile Biyopsi

Lazer teknolojisinin yardımcı üreme tekniklerinde gametler ve embriyolar üzerindeki uygulamalarla kullanılması ilk kez Tadir ve ark. (105, 106) tarafından rapor edilmiştir. Bu tekniğin hızlı ve etkili klinik kullanımı için termal ve mutajenik etkileri önlenerek doğru ve kontrollü bir şekilde zona pellusidada deliklerin açılması gereklidir.

Zona pellusida üzerine ilk lazer uygulamasını Palanker ve ark. (83) ArF excimer lazer (193 nm UV) ile gerçekleştirmişlerdir. Kontakt modlu bir lazer sistemi olması nedeniyle bu yöntemde lazer taşıyıcı bir pipetin zona pellusida'ya temas ettirilmesi gerekir. Erbium: YAG lazerin (Er: YAG 2940 nm.) çalışma prensibi de kontakt modlu olmakla birlikte, Assisted Hatching amaçlı olarak klinik kullanımının güvenli olduğu bildirilmiştir (103).

Genel olarak yukarıda sözü edilen kontakt lazer sistemleriyle çalışmak için ekipmanda steril mikroskop uzantılarını ve optik kılcal kabloları gerektirmesi, tekniğin en büyük dezavantajlarıdır (90). Diğer taraftan non-kontakt lazer sistemleri ise bir mikroskop objektifinden lazer ışığının direkt hedefe gönderilmesi prensibiyle çalışmaktadır (7). Bu teknikte lazer yayılımı sıvının içinde olur ve DNA'nın UV'yi emmesinin önüne geçildiğinden yöntemin mutajenik etkileri de en az seviyededir. Blanchet ve ark. (7), non-kontakt lazer sistemini (248 nm KrF) ilk kez fare embriyolarında zona pellusida manipülasyonunda kullanmıştır.

Neev ve ark. (81), fare embriyolarında Assisted Hatching amaçlı olarak Ho: YSGG (2,1 nm) non-kontakt lazer kullanımını tanımlamışlardır. Bu çalışmada uygulama sonrası embriyoların blastosist aşamasına kadar ilerlediği ve yöntemin embriyotoksik etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır. Benzer sonuçlar Schiewe ve ark. (93) tarafından da bildirilmiştir.

Rink ve ark. (90) mikroskop objektifi ile aktarılan ve 1.48 µm diode kızılötesi ile çalışan non-kontakt bir lazer sistemi geliştirmişlerdir. Lazer ışığının delme özelliği, odaklanan noktada lazer enerjisinin su ve zona pellusida içerisindeki makromoleküllerde termal etki yapması ve zona pellusida matriksinde termolizise yol açmasıyla açıklanmıştır. Bu teknikte, petri kabı ve kültür ortamı içindeki lazer emisyonu ise minimaldir. Lazer ışığının zona pellusida üzerindeki etkisi çok kesin ve açılan delik silindirik şekillidir. Uygulanma süresi ayarlanabilir. Tekniğin fare ve insanda kullanılmasının güvenli ve polar cisim ile blastomer biyopsisini kolaylaştırıcı olduğuna dair yayınlar mevcuttur (73, 121). Sistem çok kompakttır ve her tip mikroskoba çok rahat uygulanabilir.

Bir tutucu pipet ile tutulan embriyonun zonasına, perivitelin aralığının daha geniş olduğu bir bölge saat 3 hizasına getirilerek ve alınması hedeflenen

blastomere yakın bir bölgede, lazer atışları uygulanır. İstenilen büyüklükte bir delik açana kadar defalarca atış yapmanın, blastomerlerin üzerine gelmedikçe bir zararının olmadığı ve açılan delikten biyopsi pipeti ile blastomerin rahatça alınabildiği bildirilmiştir (74).

2.2.4.Biyopsi Alınma Evreleri

2.2.4.1.Polar Cisim Biyopsisi

Polar cisimler temel morfolojik özelliklerine göre ayırt edilebilir. Birinci polar cisim girintili çıkıntılı bir yüzeye sahip olup fragman içerebilir. Oysa ikinci polar cisim düzgün bir yüzeye ve kontrast mikroskopta bile görülebilen bir interfaz çekirdeğe sahiptir.

Genetik analiz amacıyla gerçekleştirilen polar cisim biyopsisinin, uygulandıktan sonra transfer zamanına kadar analiz için geniş bir zaman dilimi vermesi gibi bir avantajı vardır. Maternal kökenli problemler için bile kısıtlı bir endikasyonu olmasına ve bu nedenle diğer gruplar tarafından öncelikli bir yöntem olmamasına rağmen, Verlinsky ve ark. (125) polar cisim analizinin en azından embriyo biyopsisi ile kombine olarak yapılmasını savunmaktadırlar.

Polar cisimlerin biyopsi edilip incelenmeleri oositin maternal genotipini ortaya çıkarır. Biyopsi yapılması fertilizasyon oranını ve embriyo gelişimini etkilemez. Zona pellusida üzerinde açılan bir delikten polar cisim, bir biyopsi pipeti ile alınır. Verlinsky ve ark. (124) bu tekniğin öncüsü olmuşlardır.

Araştırmacılar anne kökenli tek gene bağlı hastalıkların belirlenmesinde önce birinci polar cismi, daha sonra da fertilizasyon sonrası ikinci mayotik bölünmeyle atılan ikinci polar cismi alarak tekniğin güvenilirliğini arttırmışlardır. Araştırmacılar zona pellusidada oluşturulan mekanik bir kesi ile perivitelin boşluğa sokulan ince bir biyopsi pipeti yardımıyla birinci ve ikinci polar cisimleri ayrı ayrı almışlardır (11).

2.2.4.2.Embriyo Biyopsisi

Gelişme döneminde embriyodan bir parçanın alınıp genetik inceleme yapılabilmesi, memeli embriyolarının diğer canlılardan farklı olarak, totipotent hücreler olarak eksik hücrelerden etkilenmeden gelişimini devam ettirebilme özellikleri sayesinde gerçekleştirilebilmiştir. Fare embriyolarında, 2 hücreli aşamadayken bir hücrenin alınması durumunda dahi normal büyüklükte ve

genetik yapıda yavrular doğabilmektedir (114). Ancak hücre yoğunluğu azalırsa implantasyon oranı ve fetal gelişim oranı da azalır (91). Bu nedenle, biyopsiyi gerçekleştirirken hücresel yoğunluğun kaybını minimize etmek önemlidir. Biyopsi prosedürünü embriyo bölünmesi 6–10 hücreli aşamadayken yapmak, ama intraselüler yapışıklık ve hücreler arası bağ oluşumunun şekillenmeye başladığı kompaktlaşma evresinden önce bitirmek gerekir. Teorik olarak bu aşamada bir hücre alınması, hücresel yoğunluğun sadece 1/8 oranında azalmasına sebep olacaktır (27).

Değişik yöntemler kullanılarak zona pellusida üzerinde bir delik açılır. Bir biyopsi pipeti delikten içeriye sokularak bir veya iki blastomer nazik bir şekilde aspire edilerek dışarı alınır. Alternatif olarak, alınacak blastomerin pipetler yardımıyla sıkıştırılarak zona pellusida dışına çıkartılması ve ince iğne biyopsisine benzeyen bir yöntem de denenmiş, ancak çok seyrek uygulanan yöntemler olarak rapor edilmiştir (51).

İnsan yardımcı üreme tekniklerinde, biyopsi prosedürünün ve hücre kaybının fetal malformasyon veya konjenital anomali riskini minimal oranda bile arttırmaması çok önemlidir. Biyopsi tekniklerinin yanı sıra dondurma prosedürlerinde de hücrelerin bir kısmının zarar görmesi bilinen bir olasılık, hatta bir gerçektir (24, 26, 42). IVF yöntemini takiben dondurulmuş embriyo transferi sonucu doğanlarda yapılan incelemeler, dondurma prosedürü sonucu embriyonun birkaç hücresi bozulsam bile bunun herhangi bir probleme yol açmadığını göstermektedir. Aynı yaklaşımla, biyopsi sonucu oluşan hücre kaybının etkileri ESHRE PGT konsorsiyum raporlarında belirtilmiş ve biyopsi uygulanan IVF bebekleriyle spontan gebelikler arasında bir fark bulunmadığı açıklanmıştır (28).

Embriyo kültür vasatlarının son yıllarda gelişmesi 3. gün embriyo kalitesini oldukça arttırmıştır. Elde edilen embriyolar erken dönem kompaktlaşma eğilimine girmekte ve bu da biyopsi prosedürünü zorlaştırmaktadır. O nedenle kalsiyuma bağlı olan yapışmanın önüne geçmek için kalsiyum ve magnezyum içermeyen özel biyopsi vasatları geliştirilmiştir (23). Bu özel biyopsi sıvısı içinde 5–10 dakika bekletilen embriyoda, istenilen

blastomer, yapışma ve buna bağlı diğer blastomerlerin zarar görme riski olmadan rahatlıkla alınabilmektedir.

2.2.4.3.Trofektoderm Biyopsisi

Blastosistlerin küresel epitelyal dokusunu oluşturan trofektoderm hücrelerinin (TE) biyopsisinin en önemli avantajı, fetüsün geliştiği ICM (Inner Cell Mass)'i hiç etkilemeden analiz yapabilme kolaylığıdır. Farede TE biyopsisi, erken embriyo döneminde yapılan PZK-Parsiyel zona kesisi'nin yapılması ve gelişen blastosel kavitenin basıncı ile bu kesiden fıtıklaşan TE hücrelerinin alınması ile yapılmıştır (82). Benzer bir yöntem insan embriyoları için de denenmiştir (22). Lazer yardımıyla TE biyopsisinin yapılması da mümkün olmuştur. Non-kontakt lazer sadece zona pellusida'da bir delik yapmakla kalmaz, aynı zamanda fıtıklaşan TE hücrelerinin kesilmesini de sağlar (121).

Blastosist evresindeki embriyoların transferinden gebelik elde edilebilmesi açısından klinik başarının artması gerçeğine karşın, bu embriyolarda gerçekleştirilen TE biyopsisi tekniğinin bazı dezavantajları vardır. Tüm blastosistlerin aynı zamanda gelişmemesi, TE hücrelerinin alınmasının implantasyonu azaltabileceği hakkında endişeler ve genetik olarak normal bir 3. gün embriyonun kültür şartları nedeniyle blastosist evresine ulaşamama ihtimali TE biyopsisinin önünde duran engellerdir (45).

2.2.5.Genetik Analiz

Polimeraz Zincir Reaksiyonu-PCR:

İnsan haploit genomu yaklaşık 3×10^9 çift baz DNA taşır. Genetik bozukluklar bu DNA'daki sayısız değişikliklerle oluşur. Bunlar tek nokta mutasyonuyla olabileceği gibi, birkaç çiftin delesyonu veya fazladan katılımı şeklinde de olabilir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR-Polimerase Chain Reaction)'nun basit prensibi, mitoz bölünme sırasında DNA replikasyonuna dayanır. Her bölünmüş iki hücre, önceki hücreyle aynı sayı ve özellikte DNA taşır. Yani bu, diğerinin birebir kopyasıdır. PCR ilk kez 1985'de tanımlanmıştır (92).

Bir PCR siklusu 3 aşamadan oluşur:

1) 94 C°'ye ısıtılarak hedef DNA'nın denatürasyonu yoluyla tek-dal bir DNA zinciri elde edilir,

2) Isıyı 50–60 C°'ye düşürüp hibridize edilerek hedef DNA'daki primerler bağlanır,

3) Bir termofilik bakteri enzimi olan Taq Polimeraz yardımıyla 72 C°'de, yeni DNA sentezi sağlanır.

Her PCR siklusunda, iki primer arasında sınırlandırılmış DNA parçası ikiye katlanır. 30 siklus sonra 10^9 kopya, 50 siklus sonra 10^{15} kopya elde edilir. Günümüzde gelişmiş aletler yardımıyla 5–6 saat içinde milyonlarca DNA parçacığı kopyası yaratılabilir. PCR yardımıyla genomdaki her DNA parçacığına uygulama yapılabilir. Teorik olarak PCR moleküler düzeyi bilinen her genetik bozukluğun preimplantasyon tanısına imkan verir. Günümüzde aşağıdaki hastalıklar başta olmak üzere pek çok hastalığın tanısında kullanılmaktadır:

Kistik Fibrozis, Tay-Sachs hastalığı, Hemofili A ve B, Retinitis pigmentosa, Orak Hücreli Anemi, Talasemi, Alport hastalığı, α 1- Antitripsin eksikliği, Gaucher hastalığı, Frajil X sendromu, Myotonik Distrofi, Fanconi Anemisi ve HLA genotipleme (126).

Floresan In-Situ Hibridizasyon-FISH:

Son yıllarda her kromozoma özel nükleik asit - DNA problrı geliştirilmiştir (41, 77). FISH, fikse edilmiş kromatin/kromozomdaki nükleik asit bölgelerine bu problrın bağlanmasına dayanan bir prosedürdür. Bir gen, bir gen parçası veya bir DNA bölgesi gibi her kromozom için farklı özellikteki bir bölgeye bağlanır. Bu bölgeler genelde sentromerik bölgededir.

Çalışma prensibi:

a) 68–73 °C'de, hem probun, hem örnek nükleik asitlerin eş zamanlı denatürasyonu,

b) 37 °C'de bunların birleşmeleri ve hibridlerin oluşması,

c) 73 °C'de tuz solüsyonları ve non-iyonik deterjanlarla yıkanarak bağlanmamış protein ve non-spesifik hibridizasyonun ayrıştırılması,

d) Antifade uygulanarak, yeni hibridlerin floresan mikroskopta incelenmesidir.

Ticari olarak sağlanabilen PB probu ile 13, 16, 18, 21 ve 22; PGT probu ile 13, 18, 21, X ve Y kromozomları taranabilmektedir. Ayrıca diğer kromozomlara ait özel proplar da bulunabilir. Ancak uygulanmaları re-hibridizasyonla mümkündür (80).

FISH, ilerlemiş maternal veya paternal yaş, tekrarlayan spontan düşüklere, tekrarlayan IVF başarısızlıkları, cinsiyet tanımlaması (özellikle X-resesif hastalıklarda), translokasyon tespit edilmiş ebeveynler, anöploidiye bağlı genetik bozukluğu olan aile hikayeleri (Turner Sendromu, Down Sendromu) ve ağır oligospermi-azospermi olgularında başarıyla kullanılmaktadır (20).

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon–CGH (Comparative Genomic Hybridization):

PCR'in tek gen hastalıkları hariç kullanım alanının kısıtlı oluşu, FISH'de ise sınırlı sayıda kromozomun değerlendirilmesi nedeniyle gündeme gelen yeni bir teknolojidir (127). Amplifiye edilen tüm kromozomların analizi bugünkü teknoloji ile üç gün sürebilmektedir. Bu nedenle, klinik uygulamada biyopsiden sonra embriyolar dondurulmakta ve embriyo transferi hastanın endometrial senkronizasyonunun yapıldığı sonraki sikluslarında planlanmaktadır (136). Bu yöntemle kromozom kırıkları da dahil pek çok detay ayrıntılı olarak değerlendirilebilmektedir.

2.3.Kryoprezervasyon

Superoovulasyon tekniklerinin kullanımı ile IVF'in gelişmesi ve kolaylaşması fazla sayıda oosit, dolayısıyla bir seferde transfer edilebilecek sayının çok üzerinde embriyo gelişimini de beraberinde getirmiştir. Ovulasyon indüksiyonu uygulanmadan hCG kullanarak doğal IVF siklusları oluşturmak bir alternatiftir, ancak sonuçları pek başarılı değildir (31). Diğer çözümler toplanan oositleri sınırlandırmak, bir kısmını fertilize etmemek veya çoğul gebelik riski almamak için gelişen bazı embriyoları atmaktır ki, bunların hiçbiri etik değildir. Bu koşullar embriyo dondurmaya zorunlu hale getirmiştir.

Memeli embriyolarının dondurulması için çalışmalar 1950'li yıllara dayanmaktadır. Smith (99), in-vivo fertilize olmuş pronükleer tavşan embriyolarını dondurmuştur. Birçok gelişmiş teknik bu temel çalışmadan köken almaktadır. Whittingham ve ark. (130)'nın 1972'de dondurulup çözdürülen moruların transferi sonrası canlı fareler elde etmesinden beri memeli embriyoları başarıyla saklanmaktadır. Kemirgenlerde edinilen tecrübeyle, kryoteknoloji endüstriyel kullanıma girmiş ve büyükbaş hayvanlara da uygulanmıştır. Dünyada 1980'den beri, her yıl 100 000 den fazla dondurulmuş hayvan embriyosu transfer edile gelmektedir (122).

İnsanlarda ilk dondurulmuş embriyo gebeliği Trounson ve Mohr (112) tarafından 1983'de elde edilmiştir. İnsan embriyosu dondurma işlemleri, propanediol ve sukroz gibi kryoprotektanların kullanımı ve prosedürlerin optimizasyonu ve kolaylaşmasıyla, IVF uygulamalarında vazgeçilmez olmuştur.

Öteki türlerde, örneğin kemirgenlerde başarıyla uygulanan oositlerde dondurma çözdürme teknolojisi, insanda düşük survival oranı ve konvansiyonel IVF sonrası düşük fertilizasyon oranı nedeniyle pek başarılı değildir (1).

2.3.1.Kryobiyolojik İlkeler

Sıvı nitrojen içerisinde (-196°C) dokularda hücreler zaman ve birçok kimyasal reaksiyon durmuştur, su sadece kristal veya camsı bir şekildedir. Sadece atmosferdeki radyasyonun DNA yapısına potansiyel zararı söz konusudur. Farelerde yapılan bir çalışmada (38) deneysel olarak oluşturulan 2000 yıllık radyasyona eşdeğer enerji verilerek embriyo survival ve gelişimsel kapasitesi araştırılmış ve bunun bile önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bu yüzden embriyolar teorik olarak sonsuza dek sıvı nitrojende kalabilir.

2.3.1.1.Dondurma Esnasında Hücresel Değişiklikler

Isı düşüşü hücre biyokimyasında etkili olup; 37°C 'den -7°C 'ye düşüş, tüm enzim reaksiyonlarında duraklamaya yol açar. Isı düşerken, hücredeki sıvı bileşenler bazı fiziksel ve kimyasal değişime uğrarlar:

- Dağılan gazların çözünürlüğü azalır. Kullanılan dondurma solüsyonları %5 CO_2 'de gazlanmış sodyum bikarbonat içerdiğinde dev gaz baloncuklarının oluşması hücrenin bozulmasına yol açar (4).

- Saf buz kristalleri oluşarak su, sıvıdan katı faza döner, ancak çözücü ve tuz solüsyonu hala sıvı olarak durmaktadır. Bu kristaller ısının düşüşü ile büyür ve birleşerek hücre bütünlüğünü koruyan hücre membranına direkt etki ederek zarar verebilir.
- Isının düşüşü ile su kristaller oluşturur ve ekstraselüler bölümdaki tuzlar için daha az sıvı kalmış olur. Aslında, tuz bileşenlerinin ötektik noktaları (su-tuz-buz karışımından kristalize oldukları an) suyun kristalizasyonundan daha düşük sıcaklıklardadır ve normal kültür vasatları için -10°C , -17°C , sodyum klorür için $-21,5^{\circ}\text{C}$ civarında olabilir. Bu yüzden kryoprotektan ajanların yokluğunda molarite yükselir ve hücre pH'sı ve ekstraselüler tuz yoğunluğu büyük değişiklikler gösterir. Bu durum 'solüsyon etkileri' olarak adlandırılır ve lipoprotein denatürasyonuna yol açar (66).
- Rezidüel sıvı tuz konsantrasyonlarının artmasıyla oluşan ozmotik değişiklik suyun hücreden çekilmesiyle sonuçlanır, pasif dehidrasyon ve büzülme oluşur. Hücre hacminde azalmadaki aşırılık, geri dönüşümsüz hasarlara yol açar ve hücre ölür.

Hücreler, özellikle oosit ve embriyo gibi büyük miktarda su içerenler, başarılı dondurma için yukarıda belirtilen tüm faktörlerden korunmalıdır (61).

2.3.1.2.Embriyo Dondurmada Koruyucu Prosedürler

Üç ana teknik nokta embriyoyu saran solüsyondaki ve embriyodaki istikrarsız faz değişikliklerini kontrol etmek için kullanılabilir.

2.3.1.2.1.Dondurma ve Çözdürme Hızlarının Kontrolü

Isının düşme oranı arttıkça hücre içi buz oluşumuna yatkınlık artar. Her hücrenin ideal soğuma oranı vardır ki bu, hücre hacmine ve membran bileşimine bağlıdır. Bu iki faktör suyun, iyonların ve metabolitlerinin difüzyon oranını etkiler. Eritrositlerde $1000^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$, zigot ve embriyolarda $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ soğutma hızları ile yüksek survival oranları elde edilebilmektedir (71).

2.3.1.2.2.Kimyasal Koruma

Sadece ısı düşüşünün kontrolü, optimal hücre survival'ini sağlamak için yeterli değildir.

1949'da gliserolün spermelerde kryoprotektif etkisi Polge ve ark. (87) tarafından bulunmuştur. Daha sonra, birçok başka kimyasalın da hücreleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruduğu ispatlamıştır. Bu kimyasallara 'kryoprotektan' adı verilir.

Embriyo dondururken başlangıç aşaması, dondurulacak embriyoları bikarbonat tamponlu büyüme medyumlarından, bir kryoprotektan solüsyon olan fosfat tampon sistemine almaktır (134). Embriyolar burada ekulibre edildikten sonra yüksek ozmolaritedeki kryoprotektan solüsyonlara alınır.

Oosit ve embriyolarda en çok kullanılan dört kryoprotektan; gliserol, 1,2-propanediol (PROH), etilen glikol (EG) ve dimetil sulfoksit (DMSO)'dir. Bunlar suda çözünebilir, su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilir, hücrelere girebilir. Bunların kryoprotektif aktiviteleri solüsyonların dondurma noktalarını düşürmelerine ve solüsyonun donma noktasının altında, tuzların ötektik noktalarının üzerindeki sıcaklıkta yani sıvı fazda kalan tuz ve elektrolitlerin oranlarını azaltmalarına bağlıdır. Bu sayede lipoprotein denatürasyonu önlenmiş olur. Ayrıca kryoprotektanlar, kristal oluşumunu yavaşlatırlar. Hücre membranıyla direkt birleşirler (109).

Gliserol, erken evrelerde embriyo içerisine DMSO ve PROH'dan daha yavaş girip çıkar ama morula ve blastosistte başarılı olduğu ispatlanmıştır (13). PROH'un yüksek konsantrasyondaki toksisitesi gliserol ve DMSO'ya oranla daha azdır (89). En iyi kryoprotektanları seçmek için hücredeki toksisiteyi, hücre içi geçirgenlikleri ve biyolojik etkinlikleri değerlendirilmelidir.

Çözdürme sonrasında embriyonun ilerideki gelişiminin zarar görmesini engellemek için kryoprotektan, hücreden hızlıca uzaklaştırılmalıdır. Dekstran, PVP ve serumun çeşitli protein bileşenleri gibi bazı polimerler de tek başına veya kryoprotektiflerle kullanıldığında, kryoprotektif etki gösterebilirler. Bu mantıkla hasta veya fetal kord serumu, dondurma ve çözdürme solüsyonları içerisinde kullanılabilir (13).

Bazı şekerler; mono, di- veya trisakkaritler hücreye girmez ama ozmotik basıncı yükselterek kryoprotektan gibi rol oynar. Bu durum dondurma sırasında oluşan internal buz oluşma riskini azaltır. Suyun hücre içi-dışı devinimi, çözünenlerin deviniminden hızlıdır. Embriyolar önce geçirgen, sonra geçirgen

olmayan kryoprotektana maruz bırakılınca, hücre içinde parsiyel dehidrasyon kryoprotektanların konsantrasyonlarının artışıyla olacaktır. Çözdürme prosedürü esnasında geçirgen olmayan kryoprotektanların bu ozmotik özelliği suyun girişini sınırlamada kullanılır. Bu da embriyoyu aşırı ve çok hızlı rehidrasyondan kurtarır.

2.3.2.İnsan Embriolarının Dondurulmasında Değişik Protokoller

2.3.2.1.Yavaş Soğutma

İnsan embrioları, PROH (61), DMSO (112) veya gliserol (13) kullanılan protokollerle başarılı olarak dondurulabilir. Embrioların belirli gelişme evrelerinde, bu kryoprotektanların her biri blastomer membranlarının geçirgenliğine bağlı olarak optimal etkidedir.

PROH zigotlar veya erken dönem embriolar için, DMSO ileri gelişim aşamalarında, gliserol blastosistte daha iyi sonuçlar verir.

Pronükleer, 2. gün veya 3. gün embriolarda yavaş dondurma protokolleriyle (0,3°C/dakika) PROH (1,5 mol/l) ve sukroz (0,1 mol/l) kullanılan çalışmalar daha başarılı olmuştur (32, 109). IVF merkezlerinde yaygın uygulanan prosedürdür. Ancak en uygun survival oranları, ortama sukroz eklenince elde edilmiştir (70).

DMSO insanda ilk kullanılan kryoprotektif ajandır (112) ve çoğunlukla ileri gelişim evresinde ve 3. gün embriolarda kullanılmıştır. Yavaş dondurmanın – 80°C' ye kadar sürmesi, dolayısıyla yavaş çözdürme gerektirmesi dezavantajdır. Van der Elst ve ark. (117), 2220 embriyoda DMSO kullanmış ve yüksek oranda survival ve implantasyon rapor etmiştir. Ancak bu veriler diğer araştırmacılar tarafından desteklenmemiştir.

Gliserol preimplantasyon gelişimde en geç evrede yani blastosist dondurmada kullanılmış ve iyi sonuçlar elde edilmiştir (13, 72).

2.3.2.1.1.Buz Kristallerinin Oluşumu - Seeding

Kryoprotektif solüsyonlar genellikle buz oluşmadan –15°C'ye kadar ulaşır. Buna 'supercooling' adı verilir ve bu fenomen latent sıcaklık üretir. Başarılı embriyo dondurmak için supercooling'ten kaçınmak gereklidir.

Whittingham (132), fare embriyolarını dondururken -12°C 'ye kadar supercooling, ardından internal buz oluşumu meydana geldiğinde, hiç survival alamadığını rapor etmiştir.

Supercooling'i önlemenin yolu, kryovial'in veya kryostraw'ın yüzeyine sıvı nitrojenle soğutulmuş bir metali temas ettirerek -7°C 'de buz oluşumunu indüklemektir. Metal, hücre dışı solüsyonlarda beyaz bir nokta görüldükten, yani ilk kristalden sonra kaldırılmalıdır ve programlı ısı düşüşü başlamalıdır. Bu indüklemeye 'seeding' adı verilir (109).

Bu kryobiyolojik prensipleri izleyerek ve yapılan deneysel çalışmaların ışığında, çeşitli hayvan türlerinin embriyoları başarıyla dondurulup çözdürülmüştür. Kemirgenlerde deneysel olarak (130, 131), sığır ve koyunlarda iyi besi ırklarının yayılmasını sağlamak için (111, 133) ve insanlarda yardımcı üreme tekniklerinde uygulanan süperovulasyon protokollerinde gelişebilen Hiperstimulasyon Sendromlarının yan etkilerini dengelemek amaçlı olarak (112, 140) başarılı yayınlar vardır.

Yavaş dondurmada seeding tekniğinin nasıl uygulandığı son derece önemlidir. Bazı programlanabilir dondurma aletlerinde otomatik seeding yapabilme özelliği olsa da manuel yapılması, oluşacak ilk buz kristallerinin yeri ve şeklinin kontrolü açısından tercih sebebidir (109).

2.3.2.2.Ultra-rapid Soğutma

Ultra-rapid dondurma metodu Trounson ve Sjoblom (113) tarafından geliştirilmiştir. Embriyoların 2–3 dakika kadar 2,0–3,0 M DMSO ve 0,25–0,5 M sukroz içeren medyumda ekulibre edilmesinden sonra hemen sıvı nitrojene batırılmasına izin veren bu yöntemde yüksek oranda survival ve in-vitro gelişim rapor edilmiştir. Ultra-rapid dondurma yöntemi kullanılarak elde edilen gebelikler vardır (29, 40, 50), ancak sayıca küçük ve sıra dışı kalmaktadır. Ayrıca transfer başına gebelik oranı düşük olduğu için, IVF programlarında sadece ayrıcalıklı vakalarda kullanılır.

2.3.2.3.Vitrifikasyon

İnternal ve eksternal buz oluşumunun embriyo survival'i için olumsuz etkisi nedeniyle, buz oluşumu olmadan örneklerin dondurulması denenmiş ve çeşitli kimyasalların bir arada kullanılmasıyla sağlanabilmiştir. Bu karışımlar, su

ve çözünenlerin oda ısısından -196°C 'ye, camsı doku fazındayken hızlı bir şekilde geçmesine izin verebilirler. Ortamda buz oluşumu yoksa ölümcül intraselüler buz ve tuz konsantrasyonu artışı da olmayacaktır (94).

Vitrifikasyon işlemi yüksek molar konsantrasyonlarda DMSO, asetamit, propanediol, polietilen glikol karışımları ile elde edilebilir. Burada sorun, vitrifikasyon solüsyonlarının kromozom entegrasyonunu bozabilecek yüksek toksisitesidir. Bu durum, aslında embriyolar çözdürüldükten sonra survival oranları ve in-vitro gelişimi oldukça başarılı iken canlı doğum oranının düşük olmasını da açıklamaktadır (141).

Yine de farelerde, tavşanlarda, kemirgenlerde, koyunlarda iki hücreli embriyolardan blastosiste kadar tüm embriyo aşamalarında canlı doğumlar elde edilmiştir (85). Burada başarı, kullanılan kryoprotektan tipine, ekleme ve dilüsyon metoduna, dondurmada önceki kryoprotektan içinde geçen zamana bağlıdır. Isıtma ve soğutma oranları, aşırı devitrifikasyondan ve rekristalizasyondan kaçınmak için yeterince hızlı olmalıdır.

İnsan embriyolarının vitrifikasyonunda, kryoprotektan olarak %40 etilen glikol kullanılarak yapılan bir çalışmada gelişim evresi (8 hücreli) embriyolarda sonuçların cesaret kırıcı çıkmasına karşın (76) morula ve blastosist evresindeki embriyolarda daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir (119). Tekniğin gelişmesiyle vitrifikasyon ile blastosist evresinde daha fazla başarılı çalışmalar yapılmış (120, 139) ve son zamanlarda daha erken evredeki 3. gün embriyolarda (25) ve hatta pronükleer evrede de gebelikler elde edilmiştir (54, 94).

Günümüzde vitrifikasyon, yavaş dondurma prosedürlerine ciddi bir alternatif olarak gelişimini sürdürmektedir.

2.3.3.Embriyo Depolama ve Çözdürme

Embriyolar plastik straw, ampüller veya kryovial'lerde dondurma solüsyonları içerisinde yıllarca saklanabilir. Çözdürme teknolojisi direkt olarak dondurma prosedürü, dolayısıyla internal buzun miktarı ile ilişkilidir. Aslında hücre dehidrasyonu yetersiz ise buz-su-camsı oluşum karışımı düşük derecede bile devam edebilir. Çözdürme esnasında buz kristalleri erimeden değişir, su molekülleri küçük kristallerden büyük yüzeyli olanlara dönüşür, bunların boyutu

büyür ve kabalaşır; sonuçta hücre bütünlüğünü bozabilir. Bu yüzden çözündürme çok hızlı olmalı, su fazının değişmesi periyodu sınırlandırılmalıdır.

Isının düşüşü, -80°C ' ye kadar yavaş programlanırsa ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$), çok yüksek oranda hücre dehidrasyonu sağlanır. Hücrelerin ilerleyen rehidrasyona izin vermesini sağlamak için çözündürme de yavaş yapılmalıdır ($4-8^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$). Bu yöntemle tüm prosedür 6 saat kadar sürer. Straw veya kryovial'ı -30°C 'den sonra sıvı nitrojene atarak soğutma süresi kısaltılabilir; dehidrasyon da sınırlandırılabilir (89). Bu aşamada küçük buz kristalleri oluşur, ama bu kristaller parsiyel hücre dehidrasyonu olarak kalır. Dondurmaya başlamadan önce ortama sukroz eklenmesi de dehidrasyonu uygun hale getirir. Rekrystalizasyonu önlemek için çözündürme çok hızlı olmalıdır ($300^{\circ}\text{C}-400^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$). Bu yüksek çözündürme hızı, kryovial veya straw'lar elle tutularak 37°C 'de su banyosu veya başka bir ısıtıcıyla oluşturulabilir.

Çözündürme sonrası kryoprotektanlar hemen uzaklaştırılmalı, konsantrasyonları aşamalı olarak azaltılmalı, hücreden ayrılmaları aşırı rehidrasyon veya ozmotik stres olmadan sağlanmalıdır. Sukroz, kryoprotektanların uzaklaştırılması periyoduna bu aşamada da yardımcı olmaktadır.

2.3.4.Başarıyı Etkileyen Faktörler

Dondurma programının başarısı, aşağıda her gelişim dönemi için ayrı ayrı ifade edildiği gibi öncelikle çözdürdükten sonraki morfolojik bütünlüğüne, sonra in-vitro ve in-vivo gelişimine göre değerlendirilir (58).

Erken dönem embriolar çözdürüldükten ve kryoprotektan solüsyonlardan arandıktan sonra en az dondurmadan önceki blastomer sayısının yarısını koruyabiliyorsa survival olduğu düşünülür (Survival Endeks=%50) (8).

Zigotlar dondurma çözündürme prosedürü sonrası bütünlüğü bozulmadan çözülürse, düzenli bir sitoplazma ve intakt bir zona pellusidaya sahipse ve sonraki 24 saatte kültürde gelişmeye devam ederse survive olduğu düşünülür.

Blastosist survival değerlendirmesi hücre sayısı ve özellikleri nedeniyle daha zordur. Çözündürme sonrası uterusu sadece morfolojisi normal embrioların

verilmesi tavsiye edilir. Bu embriyoların çözdürme sonrası 3–4 saat içinde kültür medyumunda tekrar genişlemesi gerekmektedir. Bu durumda transfere uygun olan blastosistler survive olarak değerlendirilmelidir.

Zigot veya çok hücreli embriyoların dondurma veya çözdürme solüsyonları hazırlanırken içerisine serum veya serum albumini eklenmesi alışlagelmiştir. Serumun kaynağı çok çeşitli olabilir: insan fetal kordu veya maternal kan örnekleri, fetal buzağı serumu ve insan serum albumini (HSA). Özellikle kord ve toplanmış kan örneklerinden alınan HSA'nın virüs aktarımı bakımından güvenlikle ilgili dezavantajları vardır. HSA'nın, dondurulan embriyolarda serum yerine kullanıldığında gebelik oranını ve implantasyon oranını düşürdüğü belirtilmiştir (128). Rekombinant serum örnekleri alternatif olarak kullanılmıştır ama karşılaştırmalı etkileri üzerine hiç çalışma yoktur.

Tyler ve ark. (115) tarafından yapılan çalışmada yer değişikliği sırasında dondurulmuş embriyoların sıvı nitrojen dışında kaldığı zamanın önemli olduğu ortaya konulmuştur. Potansiyel olarak oda ısısında zararlı etki 40 saniyede başlar ve bir dakikada 0.25 ml straw -7°C 'ye ulaşır. Bu, ötektik noktadır. Saklama koşulları dikkatlice yerine getirildiğinde, sekiz yıl sonra bile saklanan embriyolarda survival ve yaşama yeteneğinde hiç bozulma olmadığı belirlenmiştir (5).

2.3.5. Biyopsi Yapılmış Embriyoları Dondurma

Zona pellusida manipülasyonu yapılmış embriyoların kryosurvival oranları üzerine sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Erkek infertilitesi ve oositlerin konvansiyonel metotla fertilizasyonunun riske atılmayacağı durumlarda ICSI uygulamalarının tercih edilmesi kaçınılmaz olmaktadır. Elde edilen transfer edilebilir, sağlıklı embriyoların sayıları bazen oldukça fazla olabilmektedir. Transfer fazlası embriyolarda mecburen dondurma prosedürünün uygulanması gerekir. Bu şekilde ICSI ile elde edilmiş embriyoların zona pellusidaları üzerinde işlem sırasında ICSI mikropipeti ile açılmış olan deliğin kryosurvival üzerine etkisinin olmadığı bilinmektedir (2, 118).

Kung ve ark. (59) lazer ile Assisted Hatching yapılmış insan blastosistlerini gliserol kullanarak yavaş soğutma yöntemiyle dondurmuşlar ve

gebelikler elde etmişlerdir. Ancak kryosurvival oranının zona pellusidası delinmemiş embriyolara göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Birçok PGT vakasında kromozomal veya genetik anormallikler veya morfolojik ve gelişimsel uygunsuzluk nedeniyle transfer etmek için sınırlı sayıda embriyo kalabilir (62). Ancak bazı durumlarda biyopsi prosedüründen sonra embriyoların dondurulması zorunludur. Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS), hastanın akut hastalıkları gibi durumlarda embriyolar dondurulup, transfer işlemi daha sonra gerçekleştirilir. Elde edilen tüm embriyolara PGT yapıldığı durumlarda, normal genetik yapıda embriyo sayısı transfer edilmesi gereken sayıdan fazla ise, daha sonra transfer edilmek üzere dondurma işlemine tabi tutulurlar. Çünkü bazen gerçekleştirilen transferlerden, farklı nedenlerden dolayı gebelik şekillenemeyebileceği gibi bazen de ebeveynler, gebelik şekillense bile daha sonra çocuk sahibi olmayı istemektedirler. Bunların yanı sıra, karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon-CGH gibi tüm karyotipin çıkarılabileceği detaylı bir analizin yapılması için zamana ihtiyaç olan durumlarda da embriyolar daha sonra transfer edilmek üzere dondurulmaktadır.

Biyopsi yapılmış embriyoların dondurulmasının konvansiyonel IVF sikluslarında uygulanan embriyo dondurma prosedürlerinden en önemli farkı biyopsi yapıldıktan sonra artık intakt bir zona pellusida'nın olmayışı ve zona pellusidanın embriyo için koruyucu özelliğinin bozulmuş olmasıdır.

Fare embriyolarında kryoprezervasyon ile kombine ilk başarılı biyopsi, Wilton ve ark. (135) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar, ultrarapid dondurma metodu kullanarak biyopsi yapılmış ve dondurulmuş, biyopsi yapılmadan dondurulmuş ve taze fare embriyoların transferinden sırasıyla %81,1; %74,3 ve %74,1 implantasyon oranları rapor etmişlerdir.

Krzyminska ve O'Neill (58), asit tirot kullanılarak biyopsi yapılmış 8 hücreli fare embriyolarını yavaş dondurma protokolü ile dondurmuş ve çözdükten sonra gelişimsel potansiyellerini inceleyerek, yöntemin tatmin edici bir sonuç verdiğini ancak arada biyopsi yapılmış embriyolar aleyhine istatistik olarak fark olduğunu bildirmişlerdir.

Garrisi ve ark. (36), fare oositlerinde asit tirot ile bir delik açarak in vitro fertilizasyona bırakıp, oluşan embriyoları dondurduklarında kryosurvival ve

blastosist oluşumu açısından zona intakt embriyolarla arasında fark bulamadıklarını rapor etmişlerdir.

Liu ve ark. (52), fare embriyolarına 8 hücreli aşamada biyopsi yapmışlar ve alınan blastomer sayısı ile kryosurvival arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmalarında alınan blastomer sayısı ile kryosurvival ve blastosist oluşumu arasında çok önemli bir ilişki olduğunu, ancak özellikle 3 blastomere kadar yapılan biyopsi prosedürünün kryosurvival üzerine olumsuz etkisinin az olduğunu bildirmişlerdir.

Gustafsson ve ark. (43), sığır embriyolarında yaptıkları çalışmada biyopsinin ardından kryoprotektan olarak gliserol kullanarak embriyoları dondurup, kryosurvival oranını biyopsi yapılmadan dondurulan kontrol grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulmuşlardır.

Thompson ve ark. (110), fare embriyolarında yaptıkları çalışmada zona pellusidayı keserek (PZK) ve delerek biyopsi yapmışlar, kryosurvival ve blastosist gelişimini incelemişlerdir. Kryosurvival oranları açısından, her iki yöntemin kendi arasında ve biyopsi yapılmayan kontrol grubuna göre farkı olmadığını; ancak biyopsi yapılan grupların blastosiste gelişim oranlarının, biyopsi yöntemi ayırt etmeden prosedürden olumsuz yönde etkilendiğini bildirmişlerdir.

İnsan embriyolarında ise ilk olgu 1997 yılında Harper (47) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacı, dokuz hastada PGT yapılmış dondurma-çözme prosedürü sonrası sağlıklı kalan embriyoların transferi sonucu bir hastada gebelik elde etmiş, ancak gebelik düşükle sonuçlanmıştır.

Dondurma öncesi biyopsi yapılan embriyolardan elde edilen ilk canlı doğum Carson ve ark. (9) tarafından bildirilmiştir. Uygulamada, kistik fibrozis nedeniyle tüm mutasyonları araştırılmak üzere biyopsi yapıldıktan sonra dondurulan embriyolar, analiz neticelerine göre bir sonraki uygun siklusta hastalara transfer edilmek üzere çözdürülmüş ve transferlerden gebelik elde edilmiştir.

Ludwig ve ark. (67), değişik evrelerde biyopsi yapıp dondurdukları embriyolarda hatching blastosist oranlarını araştırmış ve biyopsi prosedürünün olumsuz etkilerini vurgulamışlardır.

Lee ve Munne (62), translokasyon taşıyıcısı bir vakada tüm oositleri PZK ile polar cisim biyopsisi yaparak taramışlar ve transferden sonra elde kalan normal embriyoları dondurmuşlardır. Taze embriyo transferindeki başarısızlığın ardından 5 ay sonra dondurulmuş embriyo transferi uygulanmış ve sağlıklı bir kız çocuk dünyaya gelmiştir.

Magli ve ark. (68), asit tirot kullanarak biyopsi yaptıkları insan embriyoları üzerinde yaptıkları çalışmada, PROH ile yavaş dondurma protokolü uygulandığında, kryosurvival oranının biyopsi yapılmamış embriyolara oranla çok daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Survival endeks kullanıldığında (çözdürmeden sonraki intakt blastomer sayısı/dondurmadan önceki blastomer sayısı x 100) (8), kryosurvival oranının %61'den %38'e düştüğü belirtilmiştir. Bu umut kırıcı durum nedeniyle biyopsi sonrası dondurma prosedürlerinin ancak biyopsi veya dondurmada daha güvenli bir metot geliştirilirse başarılı olabileceğini savunmuşlardır.

Joris ve ark. (56), anormal fertilize olmuş iyi kalitede insan embriyoları üzerine yaptıkları çalışmada embriyoları kontrol, biyopsi almadan ve biyopsi alarak zona pellusidası asit tirot kullanılarak delinen diye üç gruba ayırmış ve kryosurvival oranlarını karşılaştırmışlardır. Sırasıyla %55, %37,5 ve %33,3 oranında embriyo survival tespit etmiş ve biyopsi amacıyla zona pellusida manipölasyonu yapılan embriyoların dondurma prosedüründen çok fazla etkilenmekle birlikte yine de sağlam çıkan embriyoların blastosist evresine kadar ilerleyebileceğini bildirmişlerdir.

Ciotti ve ark. (12), çalışmalarında üç ayrı grup oluşturup: 1) biyopsi yapılan embriyolarda kryosurvival oranını, 2) dondurulup çözdürülmüş embriyolarda biyopsi sonuçlarını, 3) dondurulup çözdürülen oositlerden gelişen embriyolarda biyopsi sonuçlarını incelemişlerdir. Çalışmalarının birinci bölümünde inceledikleri biyopsi yapılan embriyolarda dondurma sonuçları açısından diğer araştırmacılarla benzer sonuçlar elde edip, biyopsi yapılmış

embriyolarda dondurma prosedürlerinin veya biyopsi metotlarının sorgulanması gerektiğini belirtmişlerdir.

Jericho ve ark. (55) ise, daha önceki çalışmalarda vurgulanan dondurma protokollerinin modifikasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, asit tirot ile biyopsi yaptıkları embriyoları dondururken kullanılan 0,1 mol/l sukroz solüsyonunun konsantrasyonunu iki katına çıkararak standart dondurma protokolündeki %43 kryosurvival oranının %75'e yükseltilebileceğini bildirmişlerdir.

Zheng ve ark. (141), mekanik yöntemle biyopsi yapılmış insan embriyolarında dört değişik dondurma çözündürme prosedürünün etkilerini araştırmıştır. Araştırmacılar standart dondurma, modifiye dondurma ve modifiye çözündürme ve vitrifikasyon ile dondurma tekniklerinde kryosurvival oranlarını sırasıyla: %16, %75 ve %76 olarak elde ederlerken, vitrifikasyon sonucu bu oranı %94 olarak bildirmişlerdir.

Gelinen noktada, klinikte standart embriyo dondurma yöntemi olarak vitrifikasyonun yıldızı parlarsa da, dondurmada uygulanan metot ne olursa olsun tüm biyopsi metotlarının insan embriyolarının kryosurvivalı üzerine etkilerinin aynı anda karşılaştırıldığı bir çalışma henüz yoktur.

GEREÇ VE YÖNTEM (BÖLÜM 3)

Çalışma, PGT amacıyla uygulanan biyopsi yöntemlerinin dondurma işlemi sonrasında embriyo-survival değerine etkisini ortaya koyabilmek için, konvansiyonel IVF/ICSI yöntemleri ile elde edilmiş transfer için uygun olmadığı belirlenmiş insan embriyoları üzerinde gerçekleştirildi.

Tez çalışması, Özel İstanbul Cerrahi Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi Embriyoloji Laboratuvarında Temmuz 2002- Haziran 2004 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışma yapılabilmesi için gerekli izin, ilgili kurum yönetimi tarafından alınmıştır.

Çalışmada kullanılacak embriyolar için gerekli onay formları ilgili merkeze tedavi için başvuran ve kriterlere uyan embriyoları olan hastalardan alınmıştır. Çalışmanın yürütülebilmesi için gerekli etik kurul kararı, hastane etik kurulundan alınmıştır.

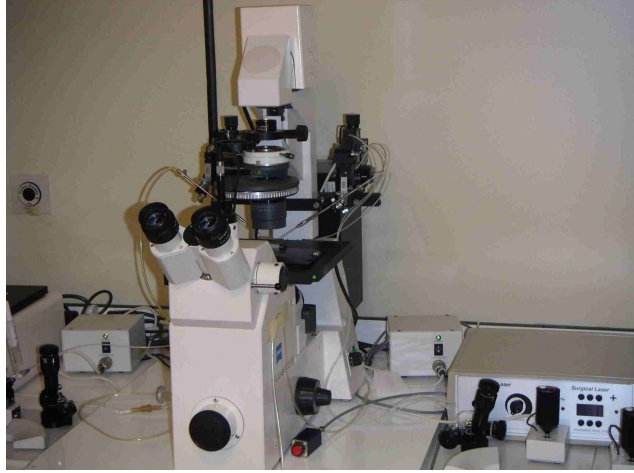
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Olanaklar

MALZEMELER:

- 1) Embriyo toksisite testi yapılmış polietilen ve cam malzemeler
- 2) Embriyo kültürü ve biyopsisi için kullanılan kültür vasatları (EB 10 ve G-PGD, G2–20 ve G3 series G2–30 Medium – Vitrolife®, Sweden) ve kimyasallar
- 3) Embriyo dondurmak için kullanılan ticari solüsyonlar (Freeze Kit 1 – Vitrolife®, Sweden)
- 4) Sıvı azot
- 5) Gerekli mikropipetlerin yapılması için kapiller cam pipetler

CİHAZLAR:

- 1) Zeiss Axiovert 135M Inverted Mikroskop (Resim 3.1)
- 2) Mikromanipülatör
- 3) %5 CO₂ ve %95 nem ayarlı inkübatör
- 4) Stereo mikroskop
- 5) Otomatik pipetler
- 6) Planner Kryo Series III bilgisayar programlı embriyo dondurma cihazı (Resim 3.2)



Resim 3.1-Inverted Mikroskop



Resim 3.2-Planner Kryo Series III bilgisayar programlı embriyo dondurma cihazı

- 7) Sıvı azot tankları
- 8) Kuru hava sterilizatörü
- 9) Buzdolabı
- 10) Mikropipetlerin yapımında kullanılan Mikropuller, Microgrinder, microforge ve mikroskop seti

3.2.Embriyo Seçimi

Çalışmada materyal olarak vital kontrollerde transfer etmek veya daha sonra transfer etmek amaçlı dondurmak için uygun bulunmayan konvansiyonel IVF/ICSI tekniği ile oluşturulmuş insan embriyoları kullanılmıştır.

Kontrollü ovaryen hiperstimülasyon ile elde edilmiş, fertilizasyon sonrası gelişimlerinin 3. günündeki embriyolardan transfer kriterlerine uymayanlar bu çalışma için kullanıldı.

Çalışmaya dahil edilecek embriyolar, konvansiyonel IVF/ICSI'den 62–68. saat sonra değerlendirilerek ayrıldı. Bu değerlendirme kriterleri: blastomer sayısı, anükleer fragmantasyon oranı, kompaktlaşma olup olmadığı, eşit büyüklükte blastomerler olup olmadığı ve vakuollerin olup olmamasına göre yapıldı (21).

Hastalardan elde edilen, transfer kriterlerine uygun olan fazla sayıdaki embriyolar daha sonra transfer edilmek üzere donduruldu ve çalışmaya dahil edilmediler.

Transfer için ayrılacak embriyolarda uygulanacak kriterler ve aranan özellikler şunlardı:

- 1) 6 hücre ve üzeri Grade 1 embriyolar,
- 2) 8 hücre Grade 2 embriyolar,
- 3) Elde edilen embriyolar arasında transfer edilebilecek durumda kriterlere uyan 6–8 hücreli embriyo yok ise, kazanılan tüm embriyolar hastaya transfer için değerlendirildi.

Çalışmada kullanılan embriyolar ise, yukarıdaki kriterlere uymayan embriyolar arasından şu kriterlere göre seçildi:

- 1) Çalışmada kullanılan teknikler kullanılarak, biyopsi sonrası PGT yapılmış ve kromozom anomalisi belirlenmiş embriyolar,
- 2) İntakt bir zona pellusida olması ve anükleer sitoplazmik fragmantasyonların elimine edilmesi amacıyla tüm blastomerlerin en az 4'ünde nükleus gözlenmesi,

- 3) Fertilizasyon kontrollerinde 14–20. saatte normal dışı fertilizasyon gösteren (1 pronükleus, 3 veya daha fazla pronükleus gözlenen) oositler, eğer çalışma kriterine uygun iseler çalışmaya dahil edildiler.

3.3.Mikromanipülasyon

Tüm embriyo değerlendirmeleri ve biyopsi prosedürleri Narishige® Mikromanipülatör (Narishige, Japan) monte edilmiş Zeiss® Axiovert 100M İverted Mikroskop (Karl Zeiss GmbH, Germany) altında gerçekleştirildi. Kullanılan tutucu, biyopsi, kesici ve asit püskürtmek için kullanılan tüm mikropipetler Drummond® kapiller pipetlerden (Drummond Scientific, Richmond, USA), Narishige® Micropuller, Microgrinder, Microforj ve mikroskop seti (Narishige, Japan) kullanılarak hazırlandı. Tüm pipetler, grinder ile 30° açı verilerek kullanıma hazır hale getirildi.

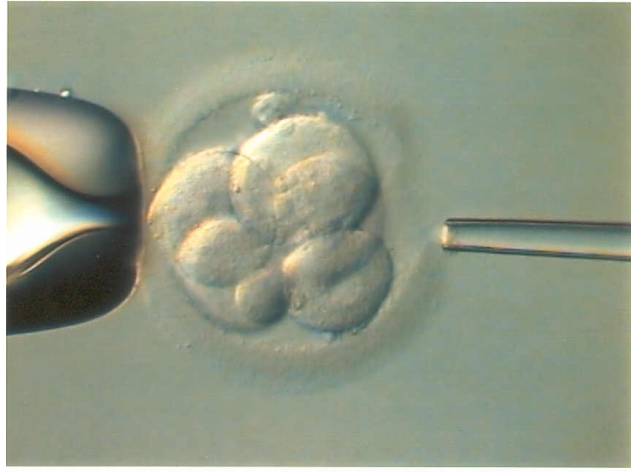
Tüm prosedürlerde pipetler pipet tutucuya monte edildi ve plastik hortumlarla bağlantı yapılarak Tutucu pipeti 10 ml.' lik enjektör yardımıyla, diğer biyopsi ve asit için kullanılan pipetler ise uygulayıcının ağız pipeti yardımıyla nefes ile kontrol edildi.

Tüm biyopsi prosedürleri mineral yağ (Sigma®, St. Louis, USA) altında Falcon 3004 (Becton Dickenson, USA) petri kaplarında ve 10 µl'lik Ca² ve Mg² içermeyen EB10 (Vitrolife, Sweden) damlacıklar içinde gerçekleştirildi. Hazırlanan petri kapları biyopsi yapılmadan önce 2–4 saat süreyle %5'lik CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Tüm biyopsi işlemlerinden önce, olası kompaktlaşmanın dağılması ve hedeflenen blastomerin embriyodan kolaylıkla ayrılması için embriyolar 5 dakika süreyle EB10 içinde bekletildi.

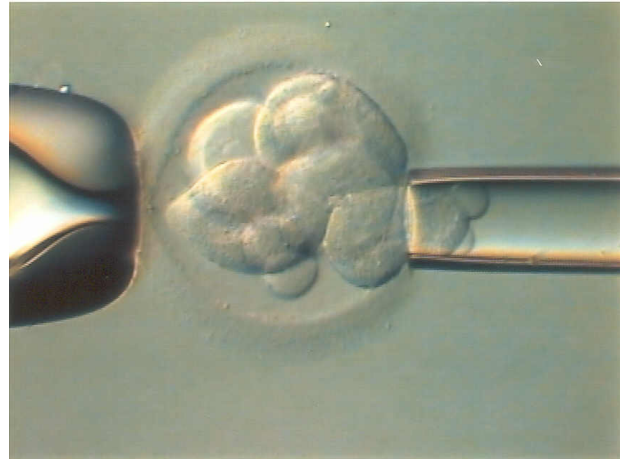
Çalışmaya dahil edilen tüm embriyolar dört gruba ayrıldı: (i) Kontrol grubu; (ii) Asit tirot ile kimyasal yolla zona pellusidalarında delik açılarak biyopsi alınan embriyolar; (iii) 1480 nm Diode Lazer ile zona pellusidalarında delik açılarak biyopsi alınan embriyolar, (iv) Mekanik yolla cross-hatch yöntemi ile zona pellusidaları açılarak biyopsi yapılan embriyolar.

(i) Kontrol grubundaki embriyolar, zona pellusidaya hiçbir işlem yapılmadan ve biyopsi yapılmadan sadece 5 dakika süreyle EB10 içinde bekletildi ve donduruldu.

(ii) Asit tirot ile kimyasal yolla biyopsi yapılacak embriyo, bir tutucu pipet yardımıyla, anükleer fragmantasyon veya blastomerlerin uzak olduğu bir bölge saat 3 pozisyonunda olacak şekilde fikse edildi. İç çapı 7–10 μm olan bir mikropipet yardımıyla bu pozisyon korunarak, daha önceden pipet içine aspire edilmiş asit tirot istenilen bölgede 20–25 μm büyüklüğünde bir delik açacak şekilde püskürtüldü (Resim 3.3). Zona pellusida delinir delinmez, ortama fazla asit vermemek için asit pipetine hemen negatif basınç uygulanıp, embriyonun damlacık içindeki yeri değiştirildi. Bu işlem her embriyo için yaklaşık 10–15 saniye kadar sürdü (68).



Resim 3.3-Asit tirot ile delik açılması



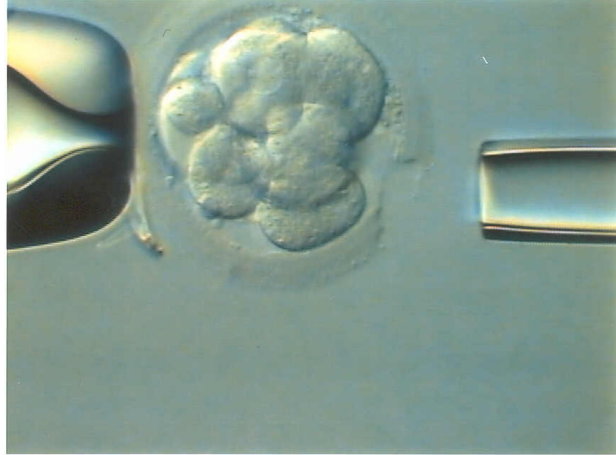
Resim 3.4-Asit tirot ile açılan delikten biyopsi alınması

Ardından 25–30 μm çapındaki bir biyopsi pipeti zona pellusidada açılan delikten içeriye sokularak, hafif bir aspirasyonla dışarıya alınacak blastomerin

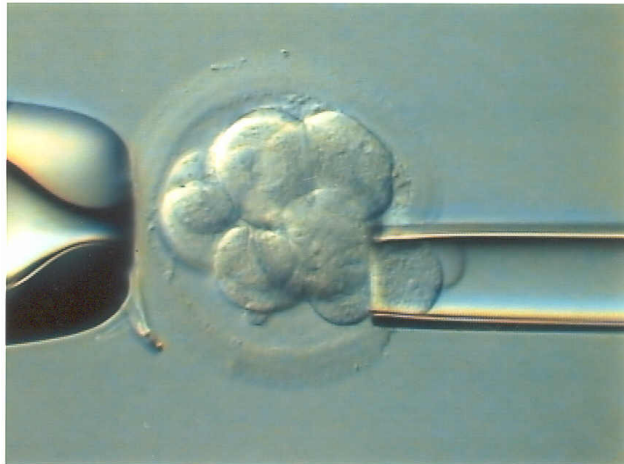
%20-30'unun pipete girmesi sağlandı (Resim 3.4). Blastomer dikkatlice zona pellusida dışına çekildikten sonra aspirasyon bitirilip, tam tersi hareketle blastomer itilerek biyopsi tamamlandı (95).

(iii) Lazer ile biyopsi grubunda, inverted mikroskop üzerine monte edilmiş lazer güç ünitesi ve özel objektifi, yine inverted mikroskoba monte edilmiş bir kamera sistemi aracılığıyla ekrana aktarılan görüntü yardımıyla zona pellusida hedeflenerek lazer ışını gönderildi.

Çalışmada, yaklaşık 30 μm 'lik delikler açmak için 2,5 ms. sürede 1480 nm Diode Lazer ile yaklaşık 3–4 atış yapıldı (Resim 3.5). Açılan delikten 25–30 μm çapındaki bir biyopsi pipeti içeriye sokularak, hafif bir aspirasyonla blastomer dışarıya çıkarıldı ve biyopsi tamamlandı (3, 74, 103) (Resim 3.6).

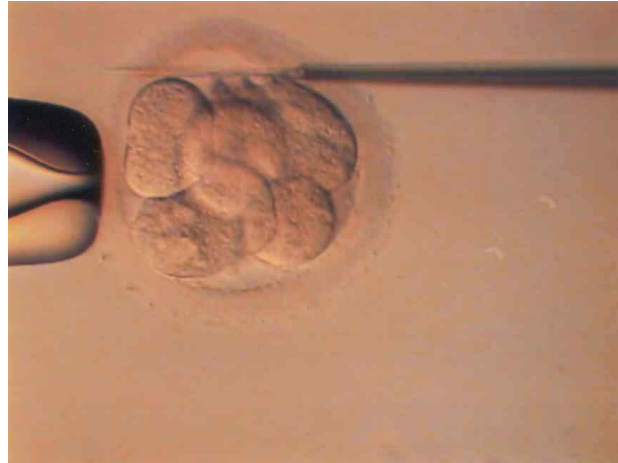


Resim 3.5-Lazer ile delik açılması



Resim 3.6-Lazer ile açılan delikten biyopsi alınması

(iv) Mekanik yolla cross-hatch yöntemi kullanılarak biyopsi yapılacak embriyo tutucu pipet ile tutuldu. Ucu çok sivri özel bir mikropipet ile zona pellusida delinip, blastomerlere zarar vermeyecek şekilde perivitelin boşlukta ilerletildi (Resim 3.7). Tutucu pipetinin aspirasyonu bitirilip, zona pellusidanın tutucu pipetin alt dış kısmıyla perivitelin boşluktaki pipet arasına sıkıştırılması sağlandı. İleri geri hareketlerle iki cam pipetin, bir makasın iki metal keskin parçası gibi zona pellusidayı kesmesi sağlandı (Resim 3.8). Daha sonra embriyoya tekrar tutucu pipet yardımıyla, ilk kesiye dik ikinci bir kesi yapılması için pozisyon verildi. Aynı işlem tekrarlandı. Her iki kesinin 30 µm uzunluğunda ve birbirine dik olmasına özen gösterildi. Sonuçta zona pellusida üzerinde 4 adet flep oluşturuldu. Bu sayede oluşturulan boşluklardan 25–30 µm çapındaki bir biyopsi pipeti içeriye sokularak (Resim 3.9), hafif bir aspirasyonla istenilen blastomer dışarıya çıkarıldı ve biyopsi tamamlandı (11) (Resim 3.10 ve 3.11).



Resim 3.7-Mekanik yöntemle kesi yapılması

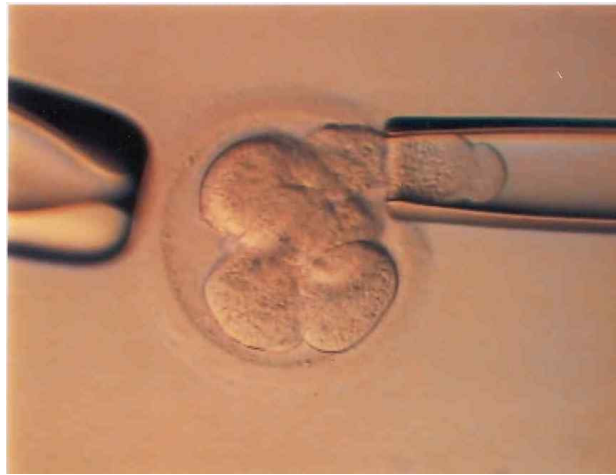
Çalışmanın amacı değişik biyopsi yöntemlerinin kryosurvival üzerine etkisini araştırmak olduğu için, alınan blastomer genetik analiz yapılmadan atıldı. Kontrol grubundaki embriyolar ile deneme gruplarında biyopsi uygulanmış embriyolar dondurma işlemine tabi tutuldu.



Resim 3.8-Mekanik yöntemle kesi yapılması



Resim 3.9-Mekanik yöntem sonucu biyopsi alınması



Resim 3.10-Mekanik yöntem sonucu biyopsi alınması



Resim 3.11-Mekanik yöntem sonucu biyopsi alınması

3.4.Embriyo Dondurma

Çalışmada, dondurulmak üzere hazırlanan embriyolar her çalışma grubu kendi içinde 4–7 embriyoluk gruplar olacak şekilde donduruldu. Örneğin lazer yardımıyla biyopsi yapılmış 5 embriyo aynı kryovial içinde (1 ml cryovial, Nunclon, Denmark) donduruldu.

Dondurma protokolü olarak bilgisayar kontrollü dondurma cihazı ile (Planner Kryo Series III, GB) gerçekleştirilen yavaş dondurma protokolü seçildi. Kryoprotektan olarak yüksek konsantrasyonda daha az toksik etkiye sahip olan 1–2 propanediol (PROH) tercih edildi.

Embriyolar kültür ortamından alınarak önce PBS (Phosphate Buffered Saline) + HSA (25 mg/ml) içinde 2–5 dakika inkübe edildi. Bu sayede embriyolar hem bir kez daha kayıtlar için kontrol edilmiş, hem de kryoprotektanı tolere edebilmeleri için hazırlanmış oldular. Daha sonra sırayla 1,0 M PrOH içinde 5 dakika, 1,5 M PrOH içinde 10 dakika ve 1,5 M PrOH + 0,1 M sukroz içinde yıkanıp hızlıca kryovial içine mikroskop altında kontrollü bir şekilde yerleştirildiler. Tüm bu işlemler laminair-flow kabin içinde ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Kryovial daha önceden programlandığı üzere 25 °C ısıda hazır bekleyen dondurma cihazına yerleştirildi ve dondurma prosedürü başlatıldı. Önce –2°C / dakika soğumayla –7°C'ye gelip buz kristali oluşumunun manuel olarak

indüklenmesi (seeding) işlemi gerçekleştirildi. Seeding, kryovial'in dondurma aletinin azot buharı taşıyan bakır borusuna sıvı-azot seviyesinden temas ettirilmesi yoluyla gerçekleştirildi. Seeding, ilk buz kristalizasyonu görülür görülmez tamamlandı. Daha sonra -0.3°C / dakika değişimle -30°C 'ye soğutma ve en son -50°C / dakika hızla -150°C 'ye soğutma ile program sona erdi. Donmuş olan embriyolar çözündürme işlemine kadar sıvı azot içinde (-196°C) saklandılar.

3.5.Embriyo Çözdürme

Çalışma için dondurulan embriyolar hızlı çözündürme protokolü ile PrOH-sukroz kullanılarak çözdürüldü. Sıvı azottan çıkarılan kryovial hemen 37°C sıcaklığında su dolu bir kabın içine batırıldı. Yaklaşık 2 dakika süre ile içindeki buz kristallerinin de erimesi gözlendikten sonra stereo mikroskop altında içindeki sıvı çekilerek kuru bir petri kabına aktarıldı.

Embriyolar vakit kaybetmeden dondurma sıvısından alınarak önceden oda sıcaklığında inkübe edilmiş $1.0\text{ M PrOH} + 0.2\text{ M sukroz}$ içine bırakıldı ve 5 dakika inkübe edildi. Embriyolar daha sonra sırayla, oda sıcaklığındaki $0.5\text{ M PrOH} + 0.2\text{ M sukroz}$ içinde 5 dakika ve 0.2 M sukroz içinde 5–10 dakika bekletilerek PBS (Phosphate Buffered Saline) + HSA 25 mg/ml içinde 10–15 dakika inkübe edildi. Son aşamanın en son 10 dakikası ısıtıcı tabla üzerinde ve 37°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Tüm bu işlemler laminair-flow kabin içinde, oda sıcaklığında ve atmosfer CO_2 konsantrasyonu altında gerçekleştirildi.

Çözündürme ve kryoprotektan maddeleri uzaklaştırılma işlemi tamamlanan embriyolar, bir gece önceden hazırlanan ve $\%5\text{ CO}_2$ ve 37°C ortamda inkübe edilmiş G2-20 (Vitrolife®, Sweden) ile hazırlanan petri kaplarına alındı. Embriyoların kryosurvival açısından değerlendirilmesi, çözündürme işlemi bittikten 1 saat sonra yapıldı.

Değerlendirme, embriyo survival indeks (çözdürmeden sonraki intakt blastomer sayısı/dondurmadan önceki blastomer sayısı $\times 100$ formülü) ile yapıldı ve indeks 50'den büyük çıkan embriyolar normal olarak değerlendirilip kayıtları tutuldu (8).

3.6.Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma verilerinin istatistiksel analizleri, MS Windows için geliştirilen SPSS 10.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farkın önem kontrolü amacıyla ki-kare (χ^2) yöntemi, ANOVA ve korelasyon analizleri uygulandı.

BULGULAR (BÖLÜM 4)

Çalışmada lazer ile biyopsi grubunda 122, asit tirot ile biyopsi grubunda 123, mekanik yolla biyopsi grubunda 126 ve kontrol grubu olarak da biyopsi yapılmadan 124 embriyo donduruldu ve çözdürüldü.

Çözdürme sonrası toplam 7 embriyo hariç hepsi kryovial'lerden geriye kazanıldı. Bu embriyolardan biri kontrol grubunda ve diğerleri de biyopsi yapılan gruplardaydı (3 asit tirot, 3 Lazer ve 1 mekanik yöntem). Geriye kazanılamayan embriyolar survival açısından olumsuz olarak değerlendirildi ve 0 blastomer survival varsayıldı.

Kontrol grubunda 20 embriyo (20/124) intakt (hiçbir blastomer zarar görmeden) çıkarken, mekanik keside 13 (13/126), asit tirot grubunda 6 (6/123) ve lazer ile biyopsi yapılan grupta ise sadece 2 (2/122) embriyo intakt çıktı.

Çözdürme işlemi sonucunda Survival Endeks kullanılarak yapılan değerlendirmede, özellikle lazer ile biyopsi yapılan grupta (%23,8) ve asit tirot ile biyopsi yapılan grupta (%27,6) survival oranları mekanik yolla biyopsi yapılan gruba (%54,8) oranla önemli oranda düşük çıktı ($p<0.001$). Tüm biyopsi prosedürlerinin kryosurvival oranını etkilediği de kontrol grubu embriyoların survival oranları (%71,0) ile yapılan karşılaştırmalarda ortaya çıktı (Tablo 4.1; $p<0.001$).

Tablo 4.1-Biyopsi yöntemlerine göre dondurulan ve çözdürme sonrasında survival olan embriyoların dağılımları.

Gruplar	Dondurulan Embriyo Sayısı	Çözdürme Sonrası Survival Embriyo Sayısı	Survival Oranı
Lazer ile Biyopsi	122	29 ^c	%23,8 ^c
Asit Tirot ile Biyopsi	123	34 ^c	%27,6 ^c
Mekanik Yolla Biyopsi	126	69 ^b	%54,8 ^b
Kontrol	124	88 ^a	%71,0 ^a

^{abc} aynı kolonda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0.005$)

Çözdürme işlemi sonrası biyopsi yapılan embriyoların intakt blastomer sayıları incelendiğinde, lazer ile biyopsi yapılan grupta 55, asit tirot ile biyopsi yapılan grupta 44 ve mekanik yolla biyopsi yapılan grupta ise 28 embriyoda hiçbir blastomerin intakt olmadığı, dejenere olduğu veya zona pellusida içerisinde hiçbir blastomerin kalmadığı, hepsinin dağılıp kaybolmuş olduğu belirlendi. Bu sayı kontrol grubu için sadece 5 embriyo olarak tespit edildi. Tablo 4.2'de intakt blastomer sayıları ve dondurmadan önceki blastomer sayılarına oranları görülmektedir. Buna göre mekanik yöntemle biyopsi yapılan grupta intakt blastomer oranının (%51,6), lazer (%26) ve asit tirot ile (%34,2) biyopsi yapılan embriyolara göre önemli derecede yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.001$). Bunun yanı sıra, asit ve lazer kullanılarak yapılan biyopsi grupları arasında intakt blastomer sayıları açısından önemli bir farkın olmadığı, bu iki grubun değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlemlendi ($p=0.059$). Ancak, tüm biyopsi prosedürlerinde kontrol grubuna oranla (%65,4) ortalama intakt blastomer sayısı olumsuz yönde etkilenmiştir ($p\leq 0.001$).

Tablo 4.2-Dondurma öncesi ve sonrası biyopsi yöntemlerine göre intakt blastomer sayıları ve donma sonrası sağlam kalan blastomer oranı.

Gruplar	İntakt Blastomer Sayısı		Oran %
	Dondurma Öncesi	Çözdürme Sonrası	
Lazer ile Biyopsi	5,83±1,32	1,52±1,80 ^c	%26
Asit Tirot ile Biyopsi	5,85±1,31	2,00±2,08 ^c	%34,2
Mekanik Yolla Biyopsi	5,60±1,27	2,89±2,18 ^b	%51,6
Kontrol	5,73±1,20	3,75±1,76 ^a	%65,4

^{abc} aynı kolonda farklı harflerle belirtilen değerler arasında farklar önemlidir ($p\leq 0.001$)



Resim 4.1-Çözdürülen embriyolarda intakt ve dejenere blastomerler

TARTIŞMA (BÖLÜM 5)

Birçok farklı özel durumda PGT amacıyla biyopsi yapılan embriyoların dondurulması gerekebilir: Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) geliştiğinde veya akut bir başka hastalık varlığında, oluşacak gebeliğin anne adayının genel sağlık durumunu olumsuz etkilemesi nedeniyle, embriyolar dondurulup, transfer işlemi daha sonra gerçekleştirilir. Elde edilen tüm embriyolara PGT yapıldığında da, analiz sonucu normal genetik yapıda embriyo sayısı, transfer edilmesi planlanan embriyo sayısından fazla olabilir. Bu transfer fazlası normal embriyolar, gebelik oluşmadığında veya daha sonra istenecek yeni bir gebeliği sağlamak için kullanılmak üzere dondurulur (68). Bunların yanı sıra, karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon-CGH gibi, detaylı bir analizin yapılması için zamana ihtiyaç olan durumlarda da embriyoların daha sonra transfer edilmek üzere dondurulması kaçınılmazdır (136).

Biyopsi yapılan embriyoların başarıyla dondurulup, iyi kryosurvival ve gebelik oranları elde edilebileceği ilk Wilton ve ark. (135) tarafından dört hücreli fare embriyolarına asit tirot ile blastomer biyopsisi yaptıktan sonra ultrarapid dondurma metodu uygulamalarıyla ortaya konulmuştur. Bu çalışmada biyopsi yapılmış (dondurulup çözündürülmüş), kontrol (dondurulup çözündürülmüş) ve taze embriyoların transfer edilmesiyle sırasıyla %81,1, %74,3 ve %74,1 implantasyon oranları ve %62,2, %62,9 ve %66,7 fetal gelişim oranları elde edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada, embriyo biyopsi prosedürünün embriyonun potansiyel gelişimini ve implantasyon oranını etkilemediği vurgulanmıştır.

Bazı durumlarda tek hücrede genetik tanı yapmanın uzun zaman alabileceği öngörülerek, biyopsi yapılmış embriyoların dondurulmasının önemi 1991 yılında rapor edilmiştir (58). Bu sürede genetik analizin rahatlıkla tamamlanabileceği ve daha sonraki sikluslarda endometrial hazırlığın ardından çözündürülen embriyoların transfer edilebileceği bildirilmiştir. Krzyminska ve O'Neill (58), biyopsi yapılmış fare embriyoları ile biyopsi yapılmadan dondurulan embriyolar arasında kryosurvival oranları açısından fark bulunduğunu belirtmişlerdir (%74,2 ve %88,6). Çalışmalarında 8 hücreli aşamada asit tirot kullanılarak biyopsi yapılmış, 1–2 propanediol ile yavaş dondurma ve hızlı

çözdürme yöntemi uygulanmış embriyolar değerlendirilmiştir. Ancak sağlam kalan embriyolar, blastosist oluşumu açısından incelendiğinde arada hiçbir fark bulunmamıştır (%97,2 ve %93,7). Bu sonuçlar, Garrisi ve ark. 'nın (36) 1992 yılında yaptıkları çalışmanın bulgularıyla da desteklenmiştir. Araştırmacılar, üzerinde asit tirot kullanılarak açılan küçük deliklerin, zona pellusidanın dondurma işleminin kötü etkilerine karşı koyma kabiliyetlerini azaltmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada her ne kadar embriyolarda blastomer biyopsisi yapılmamış ve zona pellusida üzerinde açılan delik Assisted Hatching amacıyla yapılmış olsa da, iki hücreli fare embriyoları dondurulup çözdürüldüğünde kontrol grubuna oranla kryosurvival (%77 ve %83,4) ve blastosiste gelişme oranları (%36,7 ve %30,6) arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Blastomer biyopsi prosedürünün, embriyonun blastosist evresine kadar gelişme potansiyeli üzerine ve bu embriyoların kryosurvival oranına etkisinin, alınan blastomer sayısı ile doğru orantılı olduğunun gösterildiği bir çalışma da Liu ve ark. (52) tarafından yapılmıştır. Sekiz hücreli embriyolarda, üç hücreye kadar yapılan biyopsilerin embriyonun gelişimsel potansiyeli ve bu embriyoların dondurulup çözdürülmeleri sonrasındaki survival oranlarını etkilemediği bulunmuştur. Bu çalışma, biyopsiler asit tirot ile yapılarak ve 1,2-propanediol ile yavaş dondurma ve hızlı çözdürme protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Thompson ve ark. (110) iki farklı biyopsi stratejisinin, embriyo gelişimi ve kryoprezervasyon sonrası survival üzerine etkisini araştırmışlardır. Sekiz hücreli fare embriyolarında zona pellusidayı asit tirot ile delerek (grup a), mekanik yöntemle keserek (grup b), ve hiçbir manipülasyon yapılmayan kontrol grubuna (grup c) göre blastosist gelişim oranlarını incelemişlerdir. Kryoprezervasyon uygulanmadan, embriyo gelişimleri karşılaştırıldığında sadece zona pellusidanın delindiği grupta, kontrol grubuna oranla blastosist gelişim oranlarının daha az olduğunu (%78,3 ve %91,9), ancak biyopsi uygulanan her iki grupta elde edilen gelişim oranları arasında istatistiksel olarak büyük bir fark bulunmadığını göstermişlerdir. Kryoprezervasyon sonrası ise survival oranları açısından gruplar arasında fark bulunmadığını (grup a: %84,2, grup b: %88,5 ve grup c: %87,2), ancak çözdürülen embriyoların blastosiste gelişme oranları (grup a: %61,4, grup b: %63,9 ve grup c: %78,7) ve hatching oranları açısından, zona

pellusida manipölasyonu yapılan embriyolarda gerileme gözleendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar tüm çalışma değerlendirildiğinde, zona pellusida üzerinde herhangi bir amaçla açılacak deliğin büyüklüğü ile kryosurvival oranları arasında negatif yönde bir ilişki bulunduğunu belirtmişlerdir.

Öncü çalışmaların gösterdiğinin aksine, zona pellusidada mikromanipölasyon yapılan sığır embriyolarında özellikle biyopsi alındığında, kryosurvival oranının çok düşük olabileceği de vurgulanmıştır (kontrol grubunda %70, biyopsi yapılan grupta %16) (43). Gustafsson ve ark. (43), bu çalışmayı gliserol kullanarak gerçekleştirmişler ve kryosurvival oranındaki bu çarpıcı gerilemenin nedenini, biyopsi ile eksilen hücre sayısı ve zona pellusidanın bütünlüğünün bozulmasına bağlamışlardır.

Ludwig ve ark. (67), fare embriyolarında yaptıkları çalışmada 8 hücreli aşamada biyopsi yapılan ve dondurulan embriyoları, pronükleer evrede dondurulan/dondurulmayan ve biyopsi yapılan/yapılmayan embriyolarla blastosist gelişme oranları ve hatching oranları açısından karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, biyopsi prosedürünün blastosist gelişimi üzerine değil, ancak, gelişen blastosistlerin hatching potansiyeli üzerine olumsuz etkisinin belirgin olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada varılan sonuç, hem biyopsi prosedürünün embriyonal gelişim üzerine, hem de kryosurvival oranı hesaplanmasında değerlendirmedeki başarı kriterinin 'hatching oranı' olabileceğidir.

Magli ve ark. (68), yaptıkları çalışmada PGT endikasyonu olan IVF hastalarının embriyolarını kullanmış ve anöploid embriyoları ≥ 7 blastomere ve ≤ 5 fragmentasyon oranına sahiplerse çalışmaya almışlardır. Biyopsi prosedürü asit tirot ile gerçekleştirilmiş ve embriyolar yavaş dondurma protokolü ile 1–2 propanediol kullanarak dondurulmuştur. Kontrol grubu ise, aynı dönem tedaviye giren IVF hastalarının ≥ 8 blastomer ve ≤ 20 fragmentasyon içeren biyopsi yapılmamış embriyolarından oluşturulmuştur. Biyopsi yapılan grupta: %9 bozulmamış, %34 tam bozulmuş ve boş zona pellusida, geriye kalan embriyolarda survival oranı ise sadece %38 iken kontrol grubunda %25 bozulmamış, %13 tam bozulmuş embriyo, kalan embriyolarda survival endeks %61 gibi yüksek bir oranda gerçekleşmiştir. Araştırmacılar, biyopsi yapılmış

embriyolarda standart PROH protokolüyle, dondurma işleminin yeterince güvenli bir yol olmadığını vurgulamış ve zona pellusida bütünlüğünün blastomer biyopsisi yapacak kadar geniş bir şekilde bozulmasının buna neden olduğunu speküle etmişlerdir.

Fertilizasyon kontrolü ile anöplid olarak belirlenen 1PN veya 3PN insan embriyoları kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, asit tirot kullanılarak yapılan biyopsinin survival üzerine etkisi araştırılmıştır (56). Çalışmada DMSO ile yavaş dondurma protokolü kullanılmış ve embriyoların bir bölümüne biyopsi yapılmış, kontrol grubu hariç diğerleri sadece zona pellusida delinerek bırakılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında, kontrol grubunda %55, sadece delik açılan grupta %37,5 ve biyopsi yapılan grupta 33% embriyo survival oranı elde edilmiştir.

Ciotti ve ark. (12) anormal fertilize olmuş insan embriyoları kullanarak, mekanik yöntemle ve asit tirot ile zona pellusida üzerine biyopsi yapmak üzere delik açmış, ayrıca mekanik kesi yapıp biyopsi yapılmayan ayrı bir grup oluşturulmuştur. Araştırmacılar bu embriyoların kryosurvival oranını incelemişlerdir. Dondurma işlemi 1-2 propanediol ile yapılmıştır. Sonuçta, biyopsi yapılan asit tirot (%52,2) ve mekanik kesi (%55,2) grubunda kryosurvival oranı biyopsi alınmayan gruba (%70,6) oranla düşük çıkmış; her üç grubun oranı ise kontrol grubunun (%85,0) çok gerisinde kalmıştır.

Biyopsi yapılmış embriyolarda zona pellusida üzerindeki delikten kryoprotektanlar ve donmuş medyum rahatlıkla perivitelin boşluğa girmektedir. Biyopsi yapılmış embriyolardaki bu zafiyetin hem zona pellusida üzerindeki hem de blastomerin alınmasıyla oluşan perivitelin boşluğun sonucu olabileceği düşünülmüştür (56). Bir diğer grup araştırmacı ise buradaki kötü etkide mikromanipülasyonun önemli neden olmayabileceğini, ICSI yapılan ve konvansiyonel IVF ile elde edilen embriyolar arasında kryosurvival oranları arasında belirgin fark olmamasını göstererek açıklamışlar ve bu teze karşı çıkmışlardır (67). Oysa ICSI ile zona pellusidada açılan delik, biyopsi prosedürlerinde açılan deliğe oranla çok daha küçüktür ve sonrasında kapanır. Embriyo biyopsi yöntemi ne olursa olsun, biyopsi amacıyla açılan deliğin büyüklüğü en az 20–30 µm olacaktır. Özellikle asit tirot ve lazer kullanılarak

gerçekleştirilen biyopsilerde zona pellusida üzerinde önemli sayılabilecek düzeyde bir maddi kayıp oluşturulmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan embriyoların çok büyük bölümü, ICSI ile elde edilen embriyolar olmasına rağmen kontrol grubundaki embriyolarda kryosurvival oranlarının yüksek olması ve buna karşın zona pellusidanın bütünlüğünün büyük oranda kaybolduğu (yaklaşık 20-30 µm) diğer gruplarda kryosurvival oranının negatif yönde çok daha fazla etkilenmesi de Ludwig ve ark.'nın (67) ICSI'nin kryosurvival oranını etkilemediği sonucunu desteklemektedir.

Standart yavaş dondurma protokolleri uygulandığında, zona pellusida üzerindeki deliğe yakın blastomerlerde daha fazla lizis gözlenmiştir (141). Bunun muhtemelen sıvı değişim hızlarının, uzak ve yakın blastomerler arasında farklı olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Zona pellusidanın çözündürme sırasında kısmi bir bariyer görevi yaparak, rehidrasyon sırasında blastomerlerin parçalanmasını önleyebildiği de düşünülmüştür. Bunu ispatlamak için Zheng ve ark. 'nın (141) yaptığı çalışmada, çözündürme sırasında kullanılan sukroz miktarı arttırılmış, rehidrasyon hızı bu sayede düşmüş ve bu embriyolarda survival oranı yükselmiştir.

Embriyo biyopsisi ve kryosurvival ilişkisini araştıran ilk yayınlarda (36, 52, 58, 67, 110), prosedürün survival üzerine etkisinin olmadığı ya da çok sınırlı olduğu bilgisine karşın, daha sonra özellikle insan embriyolarında yapılan çalışmalarda, bunun böyle olmadığı defalarca ispatlanmıştır (12, 56, 68). Bu duruma, türler arasında görülmesi muhtemel farklar neden olmuş olabilir. Örneğin, sığırlarda yapılmış tek çalışmada da kryosurvival oranının insan embriyoları ile benzer şekilde etkilendiği bildirilmiştir (43).

Hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmalarda kullanılacak embriyolar rahatlıkla temin edilebilir ve iyi kalitede embriyolarla yapılması olasıdır. İnsan embriyoları ile böyle bir çalışmanın yapılabilmesi için etik değerler açısından materyal olarak sağlıklı embriyoları kullanabilmek pek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da, transfer niteliği olmayan embriyolar kullanılmıştır.

Thompson ve ark. (110) yaptıkları çalışmada, biyopsi yapılmış embriyoların kryosurvival oranları üzerine değişik dondurma stratejilerinin farklı etkileri yanında biyopsi yöntemlerinin de önemini, karşılaştırmalı olarak vurgulamışlardır. Bu çalışmada karşılaştırmada kullanılan iki biyopsi metodu mevcuttur (asit tirot ve mekanik yöntem). Çalışma fare embriyolarında yapılmıştır. Literatürde kryosurvival-biyopsi metodu ilişkisini araştıran tek çalışma budur. İnsanlarda bu ilişkiyi araştıran hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Asit tirot kullanılarak insan embriyolarında yapılan çalışmalar (12, 56, 68), hangi biyopsi metodunun daha başarılı olduğuna ışık tutmak bir yana, biyopsi yapılan embriyoların dondurulması için yeni kryoprezervasyon protokollerine ihtiyaç olduğu sonucuna varmıştır. Nitekim Jericho ve ark. (55), dondurma protokollerinin modifikasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, kullanılan sukroz konsantrasyonunun artırılmasının kryosurvival oranını arttırabileceğini bildirmişlerdir. Bunu Zheng ve ark. (141) izlemiş, mekanik yöntemle biyopsi yaptığı embriyolarda vitrifikasyon protokollerini kullanmış ve kryosurvival oranının oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak klinik IVF uygulamalarında yavaş dondurma protokolleri, vitrifikasyon metoduna oranla daha sık uygulanmaktadır. Birçok IVF merkezinde programlı embriyo dondurma cihazı bulunmaktadır ve merkezlerde çalışan personel bu konuda daha çok deneyim sahibidir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, daha uygun bir biyopsi metodu uygulayarak yavaş dondurma protokolüyle de başarılı kryosurvival oranları elde etmenin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Sunulan bu çalışmada, özellikle mekanik yöntemle biyopsi yapılan grupta, asit tirot ve Lazer ile biyopsi yapılan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir (%54,8, %27,6, %23,8; $p < 0,001$). Diğer taraftan biyopsi yapılmasıyla zona pellusida bütünlüğünü bozmasına bağlı olarak, tüm gruplarda kryosurvival kontrol grubuna oranla (%71) düşük bulunmuştur. Çalışmada, biyopsi metotlarının kryosurvival üzerinde en az dondurma protokolleri kadar önemli olabileceği, mekanik kesi yönteminde diğer iki yöntemle göre daha iyi sonuçların alınması ile ortaya çıkmaktadır ($p < 0,001$). Biyopsi yapılan embriyoları dondurmak için kullanılan metotlar arasında yavaş dondurma protokollerinin yeri tartışılır hale gelse bile, bu sonuç oldukça

önemlidir. Kontrol grubuyla birlikte toplam 495 embriyo üzerinde yapılan bu çalışma, insan embriyoları ile yapılan en geniş seri olma özelliğini taşımaktadır.

Çalışmada, dondurma sonrası biyopsi yöntemlerine göre intakt blastomer oranı dikkate alındığında, mekanik yöntemin asit tirot ve lazer ile biyopsiye oranla istatistiksel olarak daha iyi sonuçlar verdiği de gösterilmiştir (%51,6, %34,2 ve %26; [p<0,001]). Çözdürme sonrası intakt kalan blastomer sayısı arttıkça, embriyonun gelişebilme potansiyeli de artacaktır (52). Buna göre mekanik yöntemle biyopsi yapılan embriyolarda çözdürme sonrası intakt blastomer sayısı diğer yöntemlere göre daha fazla olacağından, bu embriyoların transferi sonucu gebelik oranlarının da artacağı yüksek olasılıktır.

Bu deneysel çalışmanın etik olarak sadece transfer niteliği taşımayan veya kullanıldıkları anda canlı oldukları halde bir şekilde blastosiste gelişmesinin mümkün olamayacağı belli olan embriyolar ile yapılması, özellikle fare embriyolarında yapılan çalışmalarda olduğu gibi blastosist gelişme ve Hatching oranlarını kontrol edebilmemizi imkansızlaştırmıştır.

Birçok IVF merkezinde biyopsi yapılacak yöntem seçilirken, kısa zamanda uygulanabilmesi açısından lazer ile biyopsi, birçok uygulayıcı tarafından tercih edilmektedir. Pahalı bir donanım gerektirmesi nedeniyle lazer kullanılmadığında, asit tirot ilk alternatif olarak kabul görmektedir. Oysa kişisel tecrübemiz biyopsi yöntemleri ve implantasyon kapasitelerinin karşılaştırılması üzerine yapılan bir çalışmada da (6) gösterildiği gibi, mekanik yöntemin implantasyon oranını diğer yöntemlere oranla arttırdığı yönündedir.

Sonuç olarak klinik kullanımda FISH veya PCR yöntemiyle PGT yapılan transfer fazlası embriyoların başarıyla dondurulabilmesi veya Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon–CGH gibi analiz için fazla zaman gerektiren tanı yöntemlerinin kullanılabilmesi için başarılı bir protokol oluşturmak şarttır. Tüm biyopsi metotlarında biyopsi prosedürünün kryosurvival oranını azalttığı gerçeği, çalışmamızda da ispatlanmıştır. Uygun kryoprezervasyon yönteminin yanında, en uygun biyopsi metodu olarak mekanik yöntem ön plana çıkmaktadır. Diğer yöntemlere oranla daha uzun zaman alması ve yetişmiş personelle uygulama zorunluluğuna rağmen, özellikle fazla sayıda embriyoya biyopsi yapılacağı yani potansiyel kryoprezervasyon olasılığı olduğu zaman, mekanik kesi yönteminin

kullanılması daha uygun olabilir. Bunun yanı sıra, biyopsi yöntemleriyle dondurma protokollerinin kombine bir şekilde karşılaştırmalı olarak araştırılmasına ve kullanılabilir ideal yöntemlerin belirlenmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Al-Hasani, S., Diedrich, K., van der Ven, H., Reinecke, A., Hartje, M. ve Krebs, D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod.* 1987 Nov;**2(8)**:695–700.
2. Al-Hasani, S., Ludwig, M., Gagsteiger, F., Kupker, W., Sturm, R., Yilmaz, A. ve ark. Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1996 Mar;**11(3)**:604–7.
3. Antinori, S., Panci, C. ve Selman, H.A. Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. *Hum. Reprod.*, 1996. **11**, 590–594.
4. Ashwood-Smith, MJ. The cryopreservation of human embryos. *Hum Reprod.* 1986 Aug;**1(5)**:319–32
5. Avery, S., Marcus, S. ve Spillane, S. 'Does the length of storage time affect the outcome of frozen embryo replacement? (1995) *IXth World Congress IVF/Assisted Reproduction*, Vienna, Austria
6. Bahçe, M (2003) Effect of different biopsy procedures on implantation rates. *Proceeding fifth International symposium on PGD. Antalya, Turkey, 5–7 June 2003. O–23*
7. Blanchet, GB., Russell, JB., Fincher, CR. Jr, ve Portmann, M. Laser micromanipulation in the mouse embryo: a novel approach to zona drilling. *Fertil Steril.* 1992; **57(6)**: 1337–41.
8. Bristen, P.R., Human embryo freezing: Current considerations and concerns. *Contemp. Rev. Obstet. Gynaecol.* 1996. **8**.150–153.
9. Carson, RS., Burgess, CM. ve Glatstein, IZ. Preimplantation genetic diagnosis and cryopreservation of embryos. *Fertil Steril* 1997;**11 (Suppl. 1)**:198.
10. Chang, MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 1959;184:466–7.

11. Cieslak, J., Ivakhnenko, V. ve Wolf, G. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil. Steril.* 1999, **71(2)**: 308–313.
12. Ciotti, PM., Lagalla, C. ve Ricco, AS. (2000) Micromanipulation of cryopreserved embryos and cryopreservation of micromanipulated embryos in PGD. *Mol Cell Endocrinol* **169**, 63–67.
13. Cohen, J., Simons, RF., Edwards, RG., Fehilly, CB. ve Fishel, SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1985 Jun;**2(2)**:59–64.
14. Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., Malter, H., Massey, J., Mayer, MP., ve ark. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod.* 1990 Jan;**5(1)**: 7–13.
15. Cohen, J. Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1991 Aug;**8(4)**: 179–90.
16. Conn, C., Harper, J. ve Winston, R Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Genet* 1998; **102**: 117–23.
17. Coutelle, C., Williams, C. ve Handyside, H. Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *BMJ* 1989; **299**: 22–24.
18. Dean, J. Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest.* 1992 Apr;**89(4)**: 1055–9.
19. Delhanty, JD., Griffin, DK., Handyside, AH., Harper, J., Atkinson, GH., Pieters, MH. ve ark. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in-situ hybridisation, (FISH). *Hum Mol Genet.* 1993 Aug;**2(8)**: 1183–5.
20. Delhanty, JD. Chromosome analysis by FISH in human preimplantation genetics. *Hum Reprod* 1997;**12(suppl)**: 153–5

21. Desai, N.N., Goldstein, J. ve Rowland, D.Y. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum. Reproduction*, 2000. **15**, 2190–2196.
22. Dokras, A., Sargent, IL. Ross, C. Gardner, RL. ve Barlow, DH. Trophectoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod*. 1990 Oct;**5(7)**: 821–5.
23. Dumoulin, JC., Bras, M., Coonen, E. Dreesen, J., Geraedts, JP. ve Evers, JL. Effect of Ca²⁺/Mg²⁺-free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Hum Reprod*. 1998 Oct;**13(10)**: 2880–3.
24. Edgar DH, Bourne H. ve Jericho H. The developmental potential of cryopreserved human embryos. *Mol Cell Endocrinol*. 2000 Nov 27;**169(1-2)**:69-72.
25. El-Danasouri, I.ve Selman, H. Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 2001; **76**:400–402
26. El-Toukhy T, Khalaf Y. ve Al-Darazi K. Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril*. 2003 May;**79(5)**:1106-11.
27. ESHRE PGD Consortium ESHRE Preimplantation genetic diagnosis (PGD) Consortium: data collection II May 2000. *Hum. Reprod*. 2000. **15**, 2673–2683.
28. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002; **17**: 233–46.
29. Feichtinger, W., Hochfellner, C. ve Ferstl, U. Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryos. *Hum Reprod*. 1991 May;**6(5)**:735–6.

30. Fleischer, AC., Daniell, JF. ve Rodier, J. Sonographic monitoring of ovarian follicular development. *J Clin Ultrasound*. 1981 Jul-Aug;**9(6)**:275–80.
31. Foulot, H., Ranoux, C., Dubuisson, JB. Rambaud, D., Aubriot, FX. ve Poirot, C. In vitro fertilization without ovarian stimulation: a simplified protocol applied in 80 cycles. *Fertil Steril*. 1989 Oct;**52(4)**:617–21.
32. Fugger, EF., Bustillo, M., Katz, LP. Dorfmann, AD., Bender, SD. ve Schulman, JD. Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril*. 1988 Aug;**50(2)**:273–8.
33. Gardner, DK., Pool, TB. ve Lane, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin Reprod Med*. 2000;**18(2)**:205–18. Review.
34. Gardner, RL. ve Edwards, RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*. 1968 Apr 27;**218(139)**:346–9.
35. Garrisi, GJ., Talansky, BE., Grunfeld, L., ve ark. Clinical evaluation of three approaches to micromanipulation assisted fertilization. *Fertil. Steril*. 1990 **54**, 671±677.
36. Garrisi, GJ., Talansky, BE., Sapira, V., Gordon, JW. ve Navot D.. An intact zona pellucida is not necessary for successful mouse embryo cryopreservation. *Fertil Steril*. 1992 Mar;**57(3)**: 677–81.
37. Geraedts, J., Handyside, A., Harper, J., ve ark. ESHRE preimplantation genetic diagnosis (PGD) consortium: data collection II (May 2000). *Hum Reprod* **15**, 2673–2683.
38. Glenister, PH. ve Lyon, MF Long term storage of eight-cell mouse embryos at -196°C. *IVF (1997)*;**3**:20–7
39. Gordon, JW. ve Talansky, BE. Assisted fertilisation by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. *J. Exp. Zool*. 1986, **239**, 347±354.

40. Gordts, S., Roziers, P., Campo, R., Noto, V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril.* 1990 Mar;**53(3)**:469–72.
41. Griffin, D., Wilton, L. ve Handyside, A. Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosomespecific probes for sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 1992; **89**: 18–22.
42. Guerif F, Bidault R, Cadoret V, ve ark. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. *Hum Reprod.* 2002 May;**17(5)**:1321-6.
43. Gustafsson, H., Jaakma, U. ve Shamsuddin, M. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. *Acta Vet Scand.* 1994;**35(3)**: 217–22.
44. Handyside, A., Kontogianni, EH., Hardy, K. ve Winston, RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990 Apr 19;**344(6268)**:768–70.
45. Handyside, A. Human embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives Martin Dunitz, 2001.* 183–192.
46. Hardy, K., Martin, KL., Leese, HJ., Winston, RM. ve Handyside, AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod.* 1990 Aug;**5(6)**:708–14.
47. Harper, J. (1997) World figures of preimplantation genetic diagnosis. Abstract. *Pre-congress meeting of international working group on preimplantation genetic diagnosis.* Edinburg, June 1997.
48. Hogan, B., Constantini, F. ve Lacy, E. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Pres. New York: Cold Spring Harbour, 1986.*

49. Holding, C. ve Monk, M. Diagnosis of beta-thalassaemia by DNA amplification in single blastomeres from mouse preimplantation embryos. *Lancet* 1989; **2**: 532–35.
50. Hsieh, Y.Y., Tsai, HD., Chang, CC., Lo, HY. ve Lai AC. Ultrarapid cryopreservation of human embryos: experience with 1,582 embryos. *Fertil Steril.* 1999 Aug;**72(2)**:253–6.
51. Inzunza, J., Iwarsson, E., Fridström, M., ve ark. Application of singleneedle blastomere biopsy in human preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1998; **18**: 1381–88
52. J. Liu, Van den Abbeel, E. ve Van Steirteghem, A. The in-vitro and in-vivo developmental potential of frozen and non- frozen biopsied 8-cell mouse embryos *Hum. Reprod.* 1993 **8**: 1481–1486.
53. Jacobson, CB. ve Barter, RH. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol.* 1967 Nov 15;**99(6)**:796–807.
54. Jelinkova, L., Selman, HA., Arav, A. ve ark. Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos. *Fertil Steril* 2002; **77**:412–414.
55. Jericho, H., Wilton, L., Gook, DA., ve ark. (2003) A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod* **18**, 568–571.
56. Joris, H., Van den Abbeel, E., Vos, AD. ve ark. (1999) Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum Reprod* **14**, 2833–2837.
57. Krzyminska, U., Lutjen, J. ve O'Neill, C. Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum Reprod.* 1990 Feb;**5(2)**:203–8.
58. Krzyminska, U. ve O'Neill, C. The effects of cryopreservation and thawing on the development in vitro and in vivo of biopsied 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod.* 1991 Jul;**6(6)**: 832–5.

59. Kung, FT., Lin, YC., Tseng, YJ., Huang, FJ., Tsai, MY. ve Chang SY. Transfer of frozen-thawed blastocysts that underwent quarter laser-assisted hatching at the day 3 cleaving stage before freezing. *Fertil Steril.* 2003 Apr;**79(4)**:893–9.
60. Larsen, W. *Human Embryology.* New York: Churchill Livingstone, 1994: 18
61. Lassalle, B., Testart, J. ve Renard, JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril.* 1985 Nov;**44(5)**:645–51.
62. Lee, M. ve Munne, S. Pregnancy after polar body biopsy and freezing and thawing of human embryos. *Fertil Steril.* 2000 Mar;**73(3)**: 645–7.
63. Lenz, S., Lauritsen, JG. ve Kjellow, M. Collection of human oocytes for in vitro fertilisation by ultrasonically guided follicular puncture. *Lancet.* 1981 May **23;1(8230)**:1163–4.
64. Liebermann, J. ve Tucker, MJ. (2004) Vitriifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation. *Methods Mol Biol* **254**, 345–364.
65. Loumaye, E., de Cooman, S., Anoma, M., Psalti, I., Depreester, S., Schmit, M. ve ark. Short-term utilization of a gonadotropin-releasing hormone agonist (buserelin) for induction of ovulation in an in vitro fertilization program. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;**541**:96–102.
66. Lovelock, JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta.* 1953 May;**11(1)**:28–36.
67. Ludwig, M., Muschalla, H., Al-Hasani, S. ve Diedrich, K. The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in-vitro development of mouse embryos. *Hum Reprod.* 1998 Nov;**13(11)**: 3165–8.

68. Magli, MC., Gianaroli, L., Fortini, D., ve ark. (1999) Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum Reprod* **14**, 770–773.
69. Malter, HE. ve Cohen, J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril.* 1989 Jan;**51(1)**: 139–48.
70. Mandelbaum, J., Junca, AM., Plachot, M. ve ark. Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod.* 1987 Nov;**2(8)**:709–15.
71. Mandelbaum, J. ve Menezo, YJR. Human embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives Martin Dunitz, 2001.* 243–256
72. Menezo, Y., Nicollet, B., Herbaut, N. ve ark. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril.* 1992 Nov;**58(5)**:977–80.
73. Montag, M., van der Ven, K., Delacretaz, G. Rink, K. ve van der Ven, H. Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril.* 1998 Mar;**69(3)**: 539–42.
74. Montag, M., Rink, K., Descloux, L. ve ark. The use of a 1.48 µm diode laser system in assisted reproduction: laser-drilling of the zona pellucida and laser-assisted immobilization of spermatozoa. *Assist. Reprod. Rev.* 1999. **9**, 205–213.
75. Muggleton-Harris, AL., Glazier, AM. ve ark. Genetic diagnosis using PCR and FISH analysis of biopsied cells from both the cleavage and blastocyst stages of individual cultured human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1995; **10**: 183
76. Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, PB., An, TZ. ve Kasai, M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod.* 1998 Oct;**13(10)**:2874–9.

77. Munne, S., Weier, HU., Stein, J., Grifo, J. ve Cohen, JA. fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J Assist Reprod Genet.* 1993 Jan;**10(1)**: 82–90.
78. Munne, S., Weier, HUG., Grifo, J. ve ark. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994; **51**: 373–9
79. Munne, S., Alikani, M., Tomkin, G. ve ark. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. *Fertil Steril* 1995; **64**: 382–91
80. Munne, S., Sandalinas, M., Escudero, T. ve ark. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000; **73**: 1209–18.
81. Neev, J., Schiewe, MC., Sung, VW., Kang, D., Hezeleger, N. ve Berns, MW. Assisted hatching in mouse embryos using a noncontact Ho: YSGG laser system. *J Assist Reprod Genet.* 1995 **12(4)**: 288–93.
82. Nijs, M. ve Van Steirteghem, A. Developmental potential of biopsied mouse blastocysts. *J Exp Zool.* 1990 Nov;**256(2)**: 232–6.
83. Palanker, D., Ohad, S, Lewis, A., Simon, A., Shenkar, J. ve Penchas, S. Technique for cellular microsurgery using the 193-nm excimer laser. *Lasers Surg Med.* 1991, **11(6)**: 580–6.
84. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. ve Van Steirteghem, AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992 Jul **4;340(8810)**: 17–8.
85. Paynter, S., Cooper, A., Thomas, N. ve Fuller, B., 1997. Cryopreservation of multicellular embryos and reproductive tissues. In: *Reproductive Tissue Banking; Scientific Principles (AM Karow and JK Critser, eds. Academic Press* 1997, pp 359–397
86. Pincus, G. ve Enzmann, EV. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *J Morphol* 1937:351–83.
87. Polge, C. AV. Smith ve AS. Parkes. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (1949)*; 164:666.

88. Rechitsky, S., Strom, C., Verlinsky, O. ve ark. Allele drop out polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 1998; **15**: 253–7
89. Renard, JP., Bui-Xuan-Nguyen ve Garnier, V. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fertil.* 1984 Jul;**71(2)**:573–80.
90. Rink, K., Delacretaz, G., Salathe, RP., Senn, A., Nocera, D. ve Germond, M. Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida with an objective-delivered 1.48-microns diode laser. *Lasers Surg Med.* 1996 **18(1)**: 52–62.
91. Rossant, J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4 and 8 cell mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol.* 1976 Oct;**36(2)**: 283–90.
92. Saiki, RK., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, KB., Horn, GT. ve Erlich, HA. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20;**230(4732)**:1350–4.
93. Schiewe, MC., Neev, J., Hazeleger, Balmaceda, JP., Berns, MW. ve Tadir, Y. Developmental competence of mouse embryos following zona drilling using a non-contact holmium:yttrium scandian gallium garnet (Ho:YSGG) laser system. *Hum Reprod.* 1995 **10(7)**: 1821–4.
94. Selman, HA. ve El-Danasouri, I. Pregnancies derived from vitrified human zygotes. *Fertil Steril* 2002; **77**: 422–423
95. Sermon, K., Goossens, V. Seneca, S. ve ark. Preimplantation diagnosis of Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansions in affected embryos. 1998. *Prenat Diagn* **18**, 1427–1436.
96. Sermon, K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2002, **8**: 1–10.
97. Sills, ES. Schattman, G.L., Veeck, L.L. ve ark. (1998) Characteristics of consecutive in vitro fertilization cycles among patients treated with follicle

- stimulating hormone (FSH) and human menopausal gonadotropin versus FSH alone. *Fertil. Steril.* **69**, 831–835
98. Sills, ES., Moomjy, M., Zaninovic, N., Veeck, LL., McGee, M. ve Palermo, GD. Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF. *Hum Reprod.* 2000 Apr;**15(4)**:890–5.
99. Smith, AU. Behavior of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures. *Nature.* 1952; 170:374.
100. Smitz, J., Ron-El, R. ve Tarlatzis, BC. The use of gonadotrophin releasing hormone agonists for in vitro fertilization and other assisted procreation techniques: experience from three centres. *Hum Reprod.* 1992 Jun;**7 Suppl 1**:49–66. Review.
101. Staessen, C., Van Assche, E., Joris, H., ve ark. Clinical experience of sex determination by fluorescent in situ hybridisation for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1999; **5**: 392–99.
102. Steptoe, PC. ve Edwards, RG. Birth after reimplantation of human embryo. *Lancet* 1978;**2**:366.
103. Strohmer, H., ve Feichtinger, W. Successful clinical applications of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.* 1992. **58**, 212–214.
104. Summers, PM., Campbell, JM. ve Miller, MW. Normal in-vivo development of marmoset monkey embryos after trophectoderm biopsy. *Hum Reprod.* 1988 Apr;**3(3)**:389–93.
105. Tadir, Y., Wright, WH., Vafa, O., Ord, T., Asch, RH. ve Berns, MW. Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap. *Fertil Steril.* 1989, **52(5)**: 870–3.
106. Tadir, Y., Wright, WH., Vafa, O., Liaw, LH., Asch, R. ve Berns, MW. Micromanipulation of gametes using laser microbeams. *Hum Reprod.* 1991; **6(7)**: 1011–6. Review.

107. Tarin, JJ. ve Handyside, AH. Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril*. 1993 May;**59(5)**: 943–52.
108. Terriou, P., Sapin, C., Giorgetti, C., Hans, E., Spach, JL. ve, Roulier, R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril*. 2001 Mar;**75(3)**:525–31.
109. Testart, J., Lassalle, B., Belaisch-Allart, J., Hazout, A., Forman, R. ve Rainhorn, JD. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril*. 1986 Aug;**46(2)**:268–72.
110. Thompson, LA., Srikantharajah, A., Hamilton, MP. ve Templeton, A. A comparison of the effects of different biopsy strategies on the post-thaw survival of 8-cell-stage mouse embryos: implications for preimplantation diagnosis. *Hum Reprod*. 1995 Mar;**10(3)**: 659–63.
111. Trounson, A., Shea, BF., Ollis, GW. ve Jacobson, ME. Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J Anim Sci*. 1978 Sep;**47(3)**:677–81.
112. Trounson, A. ve Mohr, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983 Oct 20–26;**305(5936)**:707–9.
113. Trounson, A. ve Sjoblom, P. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. *Fertil Steril*. 1988 Aug;**50(2)**:373–6.
114. Tsunoda, Y. ve McLaren, A. Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *J Reprod Fertil*. 1983 Sep;**69(1)**: 315–22.
115. Tyler, JP., Kime, L., Cooke, S. ve Driscoll GL. Temperature change in cryo-containers during short exposure to ambient temperatures. *Hum Reprod*. 1996 Jul;**11(7)**:1510–2.
116. Van Blerkom, J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J Assist Reprod Genet* 1998; **15**: 226–34

117. Van der Elst, J., Camus, M., Van den Abbeel, E., Maes, R., Devroey, P. ve Van Steirteghem, AC. Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol protocols. *Fertil Steril*. 1995 Jan;**63(1)**:92–100.
118. Van Steirteghem, AC., Van der Elst, J., Van den Abbeel, E., Joris, H., Camus, M. ve Devroey, P. Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1994 Oct;**62(4)**:775–80.
119. Vanderzwalmen, P., Delval, A., Chatziparasisou, A. ve ark. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. *Hum Reprod (1997)*; **Abst. Book 1** 12:98
120. Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, Ch. ve ark. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod 2002*; **17**:744–751.
121. Veiga, A., Sandalinas, M., Benkhalifa, M. ve ark. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote*. 1997 Nov;**5(4)**: 351–4.
122. Veiga, A. ve Boiso, I., *Assisted Hatching Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives Martin Dunitz, 2001* 159-169
123. Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J. ve Strom, CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 1990 Oct;**5(7)**:826–9.
124. Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Evsikov, S. ve ark. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn 1992*; **12**: 103–10.
125. Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Cieslak, J. ve ark. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med*. 1997 Dec;**62(2)**: 182–7.
126. Verlinsky, Y., Special Issue of the Second International Symposium on Preimplantation Genetics. *J Assist Reprod Genet 1998*; **15**:215–357

127. Voullaire, L., Slater, H., Williamson, R. ve ark. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridisation. *Hum. Genet.* **106**, 210–217 (2000)
128. Warnes, GM., Payne, D., Jeffrey, Hourigan, L., Kirby, C. ve Kerin, J. Reduced pregnancy rates following the transfer of human embryos frozen or thawed in culture media supplemented with normal serum albumin. *Hum Reprod.* 1997 Jul;**12(7)**:1525–30.
129. Wazzan, WC., Gwatkin, RB. ve Thomas, AJ. Jr. Zona drilling enhances fertilisation by mouse caput epididymal sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, **27**, 332±336
130. Whittingham, DG., Leibo, SP. ve Mazur, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 1972 Oct 27;**178(59)**:411–4
131. Whittingham, DG. ve Adams, CE. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J Reprod Fertil.* 1976 Jul;**47(2)**:269–74.
132. Whittingham, DG. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. *Ciba Found Symp.* 1977 Jan 18–20;**(52)**:97–127.
133. Willadsen, SM., Polge, C., Rowson, LE. ve Moor, RM. Deep freezing of sheep embryos. *J Reprod Fertil.* 1976 Jan;**46(1)**:151–4.
134. Wilmut, I. The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 1972; **11**:1071–1079.
135. Wilton, L., Shaw, JM. ve Trounson, AO. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril.* 1989 Mar;**51(3)**: 513–7.
136. Wilton, L., Williamson, R., McBain, ve ark. (2001) Birth of a healthy infant after preimplantation conformation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1537±1541.
137. Wilton, L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 2002; **22**: 312–18.

138. Yanagimachi, R., Chang, MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 1963;**200**:281–2
139. Yokota, Y., Sato, S., Yokota, M. ve ark. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod* 2000; **15**:1802–1803.
140. Zeilmaker, GH., Alberda, AT., van Gent, Rijkmans, CM. ve Drogendijk, AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril.* 1984 Aug;**42(2)**:293–6.
141. Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, Fang, C., Ou, JP. ve Li, T. Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos. *Hum Reprod.* 2005 Jun;**20(6)**:1615-8. Epub 2005 Mar 3.

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı: Cenk
 Soyadı: ÖZCAN
 Doğum Tarihi: 21.10.1969
 Doğum Yeri: Gülnar
 Uyuşu: T.C.
 Tel: 0.532.4348959
 e-mail: cenkozcan@ttnet.net.tr

Eğitimi

Okul düzeyi	Kurum	Mezuniyet Yılı
Fakülte	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	1995
Lise	İçel Anadolu Lisesi	1987

İş Deneyimi

<u>Görevi</u>	<u>Yer</u>	<u>Süre</u>
Tabip	T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara İl Teşkilatı	1996-1997
Klinik Embriyolog	Özel Alman Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi	1997-1999
Lab. Sorumlusu	Özel İstanbul Cerrahi Hastanesi ÜYTEM	1999-

Yabancı Dilleri

İngilizce - Çok iyi derecede okuma, yazma ve konuşma

Bilgisayar Bilgisi

MS Office programları – iyi düzeyde

Yayınları

Tesarik J, Bahceci M, Ozcan C, Greco E ve Mendoza C. Restoration of fertility by in-vitro spermatogenesis. *Lancet*. 1999 Feb **13**;353(9152):555–6.

Tebliğleri

1. Bahçe, M., Budak, E., Özcan, C., Karagözoğlu, S., Yorulmaz, Ö., Akyuva, R. ve ark. Increased pregnancy rates following preimplantation genetic diagnosis

in selected patients with poor prognosis 17th Annual Meeting of ESHRE, Lausanne *Human Reproduction*, 2001, vol:**16** suppl. p.125

2. Özcan, C., Budak, E., Bahçe, M., Karagözoğlu, S., Akyuva, R., Öcal, A. ve ark. Development to the blastocyst stage of day 3 aneuploid embryos 17th Annual Meeting of ESHRE, Lausanne *Human Reproduction*, 2001, vol:**16** suppl. p.162 – 163

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Mesleki: İlerlemiş mikromanipülasyon teknikleri ve kryoprezervasyon

Özel: Müzik enstrümanları çalmak, çok sesli müzik

