

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GELİŞİMİ DURMUŞ EMBRİYOLARDA SIK GÖRÜLEN ANÖPLOİDİLERİN
ARAŞTIRILMASI, SPERM DNA FREGMANTASYONU VE SPERM FISH
BULGULARI İLE İLİŞKİSİ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Genetik Doktora Programı

Doktora Tezi

Dr. Tufan ÇANKAYA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Cihangir ÖZKINAY

İZMİR
2006

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GELİŞİMİ DURMUŞ EMBRİYOLARDA SIK GÖRÜLEN ANÖPLOİDİLERİN
ARAŞTIRILMASI, SPERM DNA FREGMANTASYONU VE SPERM FISH
BULGULARI İLE İLİŞKİSİ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Genetik Doktora Programı

Doktora Tezi

Dr. Tufan ÇANKAYA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Cihangir ÖZKINAY

İZMİR
2006

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Cihangir ÖZKINAY

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Ferda ÖZKINAY

Üye : Prof.Dr. Erol TAVMERGEN

Üye : Prof.Dr. Derya ERÇAL

Üye : Doç.Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve bu konuda her türlü desteği veren tez danışmanım Prof. Dr. Cihangir ÖZKINAY' a teşekkürü borç bilirim. Çalışmalarım sırasında bana tüm desteğini veren Prof.Dr. Ferda ÖZKINAY' a ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Erol Tavmergen' e, tezin tamamlanması süresince her konuda yardımını aldığım Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ' e, yazım sırasında fikirlerinden yararlandığım Prof.Dr. Derya ERÇAL'a, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı diğer öğretim üyeleri ile çalışma arkadaşlarıma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışma arkadaşlarıma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Planlaması ve Kısırlık Araştırma Merkezi çalışanlarına, 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Birimi öğretim üyesi ve çalışanlarına, maddi desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığına ve her konuda bana destek olan aileme şükranlarımı sunarım.

İzmir, 2006

Dr. Tufan ÇANKAYA

RESİMLER DİZİNİ

Resim.1 Embriyo FISH görüntüleri

Resim.2 Sperm-FISH görüntüleri

Resim.3 Sperm Apoptozis Görüntüleri

TABLolar DİZİNİ

Tablo.1 Ebeveynlerin yaşları ve yaş ortalamaları

Tablo. 2 Önceki gebelik, düşük ve IVF denemeleri

Tablo. 3 Olguların IVF Merkezine Başvurma Nedenleri ve Spermogram Sonuçları

Tablo. 4 Embriyo İncelemesinin Yapıldığı Siklusta Elde Edilen Embriyo Sayıları ve Embriyo Canlılık Oranları

Tablo.5 Anne ve Baba Yaşının Canlı Embriyo Oranları ile Karşılaştırılması

Tablo.6 Spontan Abortus Sayısı ile Canlı Embriyo Oranları, Ortamlar ve Oranların Karşılaştırılması

Tablo. 7 Embriyolara Ait Anomaliler ve Anomali Sayıları ve FISH Anomali Ortalaması

Tablo.8 Embriyo FISH Anomali Sayısı ve Spermogram Sonuçları

Tablo.9 Spermogram Şiddetine Göre Embriyo FISH anomali Değerlendirmesi

Tablo. 10 Embriyo FISH Anomali Sayısının Anne ve Baba Yaşıyla Karşılaştırılması

Tablo. 11 Sperm-FISH Anomali Yüzdeleri ve Spermogram Sonuçları

Tablo. 12 Sperm FISH anomalisi ile Önceki IVF Deneme Sayısının Karşılaştırılması

Tablo. 13 Sperm FISH Anomali Oranlarının Embriyo Canlılık Oranlarına Etkisi ve Ortalamalar

Tablo. 14 Baba yaşlarının Sperm Apoptozis Sonuçları ile Karşılaştırılması

Tablo.15 Sperm FISH sonuçları ile Apoptotik Sperm Oranlarının Karşılaştırılması

Tablo. 16 Apoptotik Sperm Oranlarının Embriyo Canlılık Oranlarına etkisi ve Ortalamalar

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

GİRİŞ	1
A. Embriyolojiye giriş:	2
1. Embriyo gelişimi (aşamaları)	2
2. Embriyolarda sık görülen kromozom anomalileri	3
B. Spermatogenez basamakları	5
1. Mayoz I (Birinci Mayız Bölünme)	8
a. Profaz I	8
b. Metafaz I	9
c. Anafaz I	9
2. Sitokinezis	9
3. Mayoz II (İkinci Mayoz Bölünme)	10
C. Spermelerde görülen kromozom anöploidi insidansı	10
D. Apoptozis ve İnfertilite İlişkisi	16
1. Sperm DNA' sı ve özellikleri	17
2. DNA Parçalanmasının Nedenleri	17
3. DNA ve Oksidatif Stres	18
4. Sperm DNA Bütünlüğü ve Döllenme	18
5. Sperm DNA ve Preimplantasyon Gelişim	19
6. Sperm DNA sı ve Gebelik Kaybı Arasındaki İlişki	20
E. Preimplantasyon genetik tanı	21
F. Preimplantasyon genetik tanı uygulama yöntemleri	24
1. Ovum Stimulasyonu ve Embriyoloji	24
2. Biyopsi yöntemleri	25

a. Polar body biyopsisi	25
b. Bölünme aşaması embriyo biyopsisi	26
c. Blastokist biyopsisi	27
d. Dondurma İşlemi sonrası biyopsi	28
G. Preimplantasyon genetik tanı endikasyonları	28
1. Tek Gen Hastalıkları	28
2. Cinsiyete bağımlı hastalıklar	29
3. Kromozomal anomaliler	30
4. Anöploidi Taraması (Aneuploidy Screening)	32
H.PGT uygulamasının amaçları	33
1. Spontan abortusların azaltılması	33
2. İmplantasyon oranlarının artırılması	34
3. Çoklu gebeliklerin ve dondurulmuş embriyoların azaltılması	34
I.Kromozomal Sayı Anomalileri İçin PGT Endikasyonları	35
1. İleri anne yaşı	35
2. Tekrarlayan düşükler	35
3. Tekrarlayan IVF başarısızlıkları (TIB):	36
4. Non-Obstruktif Azospermi	37
5. Kromozomal Translokasyon Taşıyıcısı Ebeveynler	38
a. Robertsonian Translokasyonlar	38
b. Resiprokal Translokasyonlar	38

c. İntersisyonel Translokasyonlar	39
6. Gonozomal Mozaisizm	49
J. Preimplantasyon genetik tanı uygulamasında etik durumlar	40
1. Güvenlik Durumları	41
2. Özel Problemler	41
3. HLA Uygun Embriyo Amaçlı Preimplantasyon genetik tanı yapılması	43
4. Etkilenmiş embriyoların seçimi	44
5. Tıbbi Olmayan Nedenlerle Cinsiyet Seçimi	44
6. Cinsiyet Seçimi ve İnsan Hakları	44
7. Aile Dengesinin Korunması Amacıyla Cinsiyet Seçimi	44
BÖLÜM II	
GEREÇ-YÖNTEM	45
A. Olguların seçimi	45
B. Blastomer biyopsisi	45
C. Blastomer fiksasyonu	45
D. Prob uygulaması ve hibridizasyon	47
E. Yıkama ve zıt boyama	48
F. Değerlendirme	49
G. Sperm eldesi	50
H. Spermatozoidlerin analize hazırlanması	50
İ. Sperm FISH çalışması	51
J. Apoptozis analizi	53
K. İstatistik analizi	54

BÖLÜM III	
BULGULAR	55
BÖLÜM IV	
TARTIŞMA	82
BÖLÜM V	
SONUÇ	101
BÖLÜM VI	
ÖZET	103
BÖLÜM VII	
ABSTRACT	105
BÖLÜM VIII	
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	130

BÖLÜM I

GİRİŞ

Doğal yollarla çocuk sahibi olmakta zorluk çeken ailelere yardım etmek amacıyla kurulan tüp bebek merkezleri sağlıklı nesillerin doğmasını sağlamaktadır. Elde edilen embriyoların en sağlıklı olanının seçilmesi için yapılan çalışmalar tüp bebek merkezleri ile genetik merkezlerini aynı amaç için bir araya getirmiştir. Embriyoların erken dönemde kayıplarında en önemli faktörün genetik nedenli olduğu görülmüştür. Bunlardan en sık kromozom sayı anomalilerinin sorumlu olduğu bilinmekte ve kromozomları açısından sağlıklı embriyoların seçimi, gelişen teknoloji ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmada, implantasyonu yapılacak embriyolar için merkezimizde uygulamaya geçmeden önce, gelişimi durmuş embriyolarda FISH yöntemi ile sık rastlanılan anöploidi oranının saptanması, embriyolardaki kromozom anomalilerinin ebeveynlerin demografik özellikleri ile embriyo canlı kalma oranları ve baba adaylarının spermiogram özellikleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonunda, PGT yönteminin kurum bünyesindeki IVF merkezinde endikasyonu olan çiftlere uygulanması hedeflenmiştir.

Embriyolojiye giriş

1. Embriyo Gelişimi Aşamaları

Oogenezis (ovogenezis), oogonium denilen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen olaylar dizisidir. Hücrelerdeki bu olgunlaşma süreci doğumdan önce başlar, cinsel olgunluğa erişildiğinde sona erer.

- **Oositlerin doğum öncesi olgunlaşması:** Erken fetal yaşamda, oogonium mitoz bölünmeyle çoğalır. Oogonia, doğumdan önce primer oositleri oluşturmak için hacimce büyür. Primer oosit oluştuğunda, ovaryuma ait stroma hücreleri ile çevrelenir. Bu yapı, tek tabakalı düzleşmiş foliküler epitel hücrelerini oluşturur. Bu hücre tabakası ile çevrelenmiş primer oosit primer follikülü oluşturur.

Puberte boyunca primer oosit büyür, folliküler epitel hücreleri önce kübik sonra prizmatik bir görünüm kazanır, böylece primer follikül oluşur. Primer oosit kısa sürede zona pellusida adı verilen renksiz, hücre içermeyen glikoprotein örtüsüyle çevrelenir.

Primer oosit, ilk mayoz bölünmesine doğumdan önce başlar ancak profaz puberteye kadar tamamlanmaz. Primer oosit puberte boyunca cinsel olgunluğa erişinceye kadar ve üreme siklusları başlayıncaya kadar profazda bekler.

- **Oositlerin doğum sonrası olgunlaşması:** Puberte ile başlayan dönemde her ay genellikle bir follikül olgunlaşır ve ovulasyon olur. İlk mayotik bölünmenin uzun sürmesi mayotik hataların sıklığındaki yüksekliği kısmen açıklayabilmektedir. Örnek olarak, anne yaşının artması nedeniyle, eşleşmiş kromatitlerin ayrılamaması “nondisjunction” olayı arasındaki ilişki verilebilir.

Doğumdan sonra kızlarda primer oosit oluşmaz, puberteye kadar ovaryum folliküllerinde beklerler. Follikül olgunlaştıkça primer oositin boyutları artar, ovulasyondan hemen önce birinci mayoz bölünmeyi tamamlar. Sekonder oosit

hemen hemen tüm sitoplazmayı alır, birinci polar cisimciğe ise çok azı kalır. I. Polar cisimcik (PB I) küçük, işlevsel olmayan ve kısa sürede dejenere olacak bir hücredir. Ovulasyondan sonra sekonder oositin çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye başlar ama bölünme durduğunda sadece metafaza kadar ilerlemiştir. Eğer bir sperm oositin içine girerse ikinci mayotik bölünme tamamlanır ve yine sitoplazmanın çoğu bir hücreye fertilize olmuş oosite veya olgun ovuma geçer. Diğer hücre yani II. polar cisim (PB II) kısa sürede yok olur. II. Polar cisimcik atıldığında oositin olgunlaşması tamamlanır.

- **Zigotun yarıklanması:** Zigotta, tekrarlayan mitotik bölünmeler ile oluşan yarıklanmaya bağlı olarak, blastomer adı verilen hücrelerin sayısında hızla bir artış gerçekleşir. Başlangıçta iki blastomere ayrılan zigot, sırasıyla dört ve sekiz hücreli aşamalara ulaşır ve artmış yüzey adezyon glikoproteinleri sayesinde sıkı bir paketlenme dönemi başlar. On iki-on beş hücreli aşamada embriyo artık morula adını almaktadır (73).

2. Embriyolarda Sık Bulunan Kromozom Anomalileri

İnsan embriyolarından yapılmış kromozom analizleri, anöploidi sıklığının prenatal testlerde bulunanlardan daha fazla olduğunu göstermiştir (131). Bu nedenle kromozomal olarak anomalili embriyoların, gelişimin erken basamaklarında kaybolduğu düşünülmektedir. Kromozomal anomalilerin, oositler, embriyolar, spontan düşükler ve canlı doğumlarda, anne yaşıyla birlikte arttığı gösterilmiştir (64,65,101,154). Embriyonel dönemdeki kromozom anomalileri, ileri yaş anne adaylarındaki In-Vitro Fertilizasyon (IVF) başarısızlığının en önemli nedenlerinden biridir. Embriyonun uterusu yerleşmesi ise anne yaşıyla etkilenen bir diğer faktördür (101,109). Otuz yaş üstünde bayanlarda IVF uygulamasını sonrası blastokist formasyonun daha az oranda oluştuğu gösterilmiştir (75).

Sağlıklı embriyonun seçimi, implantasyon oranlarını arttırmadaki en önemli etkidir.

Embriyo seçimi direkt ve indirekt yöntemler ile yapılabilir:

Direkt yöntem: Morfolojik değerlendirme yapılarak, gelişimsel veya genetik anomalilerin kontrolü gerçekleştirilmektedir.

İndirekt yöntem: Kültürde bekleyen embriyolardan hangisinin en uzun süreyle yaşamakta olduğu kontrol edilmekte ve blastokist formasyonu oluşturması durumunda sağlıklı olduğuna karar verilmektedir (131).

Zigot ve bölünme aşamasında olan embriyodaki pek çok morfolojik anomali, kromozom bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir (99). Fakat tüm anormal morfolojiye sahip embriyolar, kromozomları açısından anormal değildir. Bu nedenle blastokist oluşumu ile morfoloji ve anöploid arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmaktadır (131).

Kromozomal anomalilerin çoğu I. Mayoz esnasında meydana gelmektedir. Sık görülen trizomiler, anne yaşı ile artmaktadır (71,136).

Geniş kapsamlı bir çalışmada, 35 yaş üstü olgulardan elde edilen 6733 oosit değerlendirilmiş ve tüm oositlerin % 52,1' i anormal; % 47,9' u normal olarak bulunmuştur (80) .

Embriyo düzeyinde 524 bölünme aşaması embriyo incelenmiş ileri anne yaşı ile anöploidi; embriyonel arrest ile poliploidi ve yavaş gelişim ile post-mayotik kromozom anomalileri arasında doğrudan ilişki gösterilmiştir (101). Olguların yaş gruplarına ayrıldığı bir başka çalışmada ise 731 arrest embriyo tetkik edilmiştir. Tüm embriyoların % 39' u anormal iken bu oran 20-34 yaş arasında % 30,6; 35-39 yaş arasında % 34 ve 40-47 yaş arasında % 52,4 olarak bulunmuştur (92) .

A. Spermatogenez Basamakları

Spermatogenezis, primitif germ hücrelerinin (spermatogonia) sperm veya spermatozoona dönüşmesi sırasındaki olayları sırasıyla açıklar. Germ hücrelerinin olgunlaşma süreci pubertede (13-16 yaş) başlar ve yaşlanıncaya kadar devam eder. Fetal hayatta spermatogonium, testis seminifer tübüllerinde inaktif durumdadır, puberte ile birlikte sayıları artmaya başlar. Birkaç mitoz bölünme sonrasında spermatogonium büyür ve aşamalı bir gelişme sonrası, seminifer tübül içindeki en büyük germ hücresi olan primer spermatosite dönüşür. Bundan sonra her primer spermatosit, indirgenme bölünmesi olan birinci mayoz bölünmeye girer ve primer spermatositin yarısı büyüklüğünde iki adet haploid kromozomlu sekonder spermatosit oluşur. Sekonder spermatosit ikinci mayoz bölünmeye geçer ve dört adet haploid kromozomlu spermatid oluşur. Sekonder spermatositlerin yarısı büyüklüğündeki spermatidlerden, aşamalı olarak dört adet olgun spermium oluşur. Geçirilen bu değişim aşamaları spermiogenezis olarak adlandırılır. Spermiogenezis dahil olmak üzere spermatogenezis yaklaşık iki ay sürer. Spermiogenezis tamamlandığında spermler, seminifer tübüllerin lümenine geçer.

Sertoli hücreleri, seminifer tübülde yerleşmiş olan germ hücrelerini besler ve destekler, ayrıca spermatogenezisin düzenlenmesine katıldıkları düşünülmektedir. Spermler, seminifer tübülden, depolanacakları ve işlevsel olarak olgun hale getirilecekleri epididimise pasif olarak taşınır. Epididimis, testisin arka kısmında yerleşmiş ve uzun kıvrıntılı kanallardan oluşur ve bu kanal spermleri üretraya taşıyan ductus deferens ile devam eder.

Olgun sperm, baş ve kuyruktan oluşan, serbest yüzebilen, aktif olarak hareketli bir hücredir. Spermin başı ile kuyruğunun birleştiği yer boyun kısmıdır, spermin başı, hücrenin en büyük kısmını oluşturur ve haploid kromozomlu nükleus içerir.

Nükleusun 2/3 ön kısmındaki akrozom yapısının içinde bulunan pek çok enzimden en önemlisi akrozindir. Fertilizasyon sırasında bu enzimler salındığı için spermin korona radiata ve zona pellusidadan geçmesi kolaylaşır. Spermin kuyruğu, orta, esas ve son parça olmak üzere üç bölümden oluşur. Kuyruk spermin hareketini sağlar ve fertilizasyonun gerçekleşeceği bölgeye gitmesine yardım eder. Kuyruğun orta parçasında bulunan mitokondriler hareket için gerekli olan adenozin trifosfatı (ATP) sağlar. Bu mitokondrial kılıfın, kuyruğun kamçı hareketlerini yaptırdığına inanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, dondurularak hazırlanmış sıçan spermatogonial kök hücrelerinin çözülüp fare testisine implante edildikten sonra, donör hücrelerinin alıcıda da yeni işlevsel spermler ürettiği gözlenmiştir. Bu nedenle, spermatogonial kök hücrelerin farklı türlere transplante edilerek, anne babadan farklı yapıda canlı elde edilmesi (ksenogenik spermatogenez) konusu tartışılmaktadır. Gelecekte, bu konuda çok sayıda biyolojik ve tıbbi uygulama olacağı düşünülmektedir.

Mayoz, germline diploid hücrelerin, haploid gamet hücrelerini vermek üzere bölünmesi olayıdır. Mayoz, bir kez DNA sentezini takiben iki kez kromozom segregasyonu ve hücre bölünmesinden oluşur. Germ hücre kuşağında, primer spermatositler veya primer oositler, mayoz öncesinde bir seri mitoz bölünmelerle çoğalmıştır. Erkek ve dişi gametlerin geçirdikleri süreç birbirinden farklı olmakla beraber olayların sırası aynıdır.

Birbirini takip eden iki mayoz bölünme Mayoz I ve Mayoz II olarak adlandırılır. I. Mayoz bölünme, aynı zamanda indirgenme bölünmesi olarak bilinir çünkü; profaz evresinde homolog kromozom sayısının profazda homologların çiftleşmesi mayoz I in anafaz evresinde farklı hücrelere ayrılması ile diploid sayıdan haploid sayıya indirgendiği bölünmedir. I. Mayoz bölünme aynı zamanda genetik rekombinasyonun

(Mayotik crossing-over) olduğu aşama olarak ta dikkati çeker. Crossing-over sırasında DNA nın homolog segmentleri homolog kromozom çiftlerinin, homolog olmayan kardeş kromotidleri arasında değiştirilerek mayozda oluşan gametlerin birbiri ile özdeş olmaması garantilenir. Rekombinasyon için I. mayoz sırasında homologların uygun noktaya gelinceye kadar kendi içinde fiziksel olarak eşleşmesi gerekir ve bu durum mayoz sırasında kromozomların doğru ayrılmasının garantilenmesi için de önemlidir. X ve Y kromozomları gerçek anlamda homolog olmasalar da kısa uçlarında homolog segmentleri vardır ve bu her iki bölge çift oluşturur.

I. Mayoz bölünmede doğru rekombine olmayanlar kromozomların ayrılamaması “Mayotik non-disjunction”, Down sendromu gibi kromozom sayı anomalilerinin temel nedenlerinden birini oluşturur.

II. Mayoz bölünme sırasında mitoz bölünmede olduğu gibi kromatidler ayrılır ve her yavru hücreye her kromozomun bir kromatidi geçer (73).

1. Mayoz I (Birinci Mayoz Bölünme)

a. Profaz I: I. Mayoz bölünmenin profazı, önemli genetik sonuçları nedeniyle mitotik profazdan birçok yönde ayrılan çeşitli evrelerle tanımlanan bir süreçtir. Tüm evreler boyunca, kromozom sürekli kondanse olur ve daha da kısalıp kalınlaşır.

- *Leptoten:* Sentez fazında replike olan kromozomlar, kondanse olarak ince iplikler şeklinde görünür hale gelir. Erken evrede kardeş kromotidlerin birbirine çok yakın olmaları nedeniyle ayrı oldukları belirgin değildir.

-*Zigoten:* Bu evrede, homolog kromozomlar tüm uzunlukları boyunca birbirine yaklaşıp çiftler oluşurmaya başlarlar. Çift oluşurma süreci veya sinapsis, normalde tüm kromozom boyunca birbirine karşı gelen uygun DNA dizilerini bir araya getiren bir süreçtir ve rekombinasyon işlemi için sinaptonemal kompleks gerekli olup kromozomların bir arada tutulmasını sağlar.

-*Pakiten*: Kromozomlar kısalmış, katlanması artmış ve sinapsis tamamlanmıştır. Her homolog kromozom çifti bivalent olarak görünür. Pakiten, mayotik crossing-over yani genetik rekombinasyonun gerçekleştiği evredir.

- *Diploten*: Bu aşamada sinaptonemal kompleks ortadan kaybolur ve her bivalentin iki komponenti birbirinden ayrılmaya başlar. Homolog kromozomlar ayrılmakla birlikte, her birinin sentromeri bütünlüğünü korur ve kardeş kromatidler birlikteliğini sürdürür. Sonuçta “kiazma” denilen bölgelerden birbirine tutunmuş olarak bulunurlar.

- *Diakinez*: Bu evrede kromozomlar maksimum kondensasyona ulaşır.

b. Metafaz I: Mitozda olduğu gibi nükleer membranın yok olması ile başlar. İğ iplikleri oluşur ve kromozom çiftleri sentromerleri farklı kutuplara doğru olacak şekilde ekvator düzlemine yerleşir.

c. Anafaz I: Her bivalentin iki üyesi birbirinden ayrılır ve sentromerlerinden tutunmuş kardeş kromatidler de ayrılarak hücrenin kutuplarına doğru çekilir. Böylece kromozom sayısı yarıya iner ve I. mayoz bölünmenin sonundaki hücreler haploid kromozom sayısına sahip olur. Farklı bivalentler birbirinden bağımsız bir araya gelir ve sonuç olarak, maternal ve paternal orijinli kromozom setleri rastgele kombinasyonlarla sıralanır. Yirmi üç kromozom çiftinin gametlerde bulunabilecek olası kombinasyon sayısı 2^{23} (> 8 milyon) tür. Aslında ebeveynlerden çocuklara geçirilen genetik materyaldeki çeşitlilik, crossing-over işlemi nedeniyle çok daha fazladır. Bu işlem sonunda tipik olarak her kromatid ebeveyn çiftlerinin üyelerine ait parçaları içerir, örneğin bu evrede, tipik bir kromozom 1 değişerek paternal ve maternal orijinli 3-5 parçadan oluşur. Hücre bölünmesi sırasında bir çok hata olabilir. I. mayoz bölünmenin anafaz evresi, homolog kromozom çiftlerinin zıt kutuplara gitmek yerine aynı kutba gitmesi ile sonuçlanan non-disjunction “ayrılama” adı verilen hataya en fazla yatkın evredir.

d. Telofaz I: İki haploid kromozom seti normalde zıt kutuplarda toplanmışlardır.

2. Sitokinezis

Telofaz I evresinden sonra, hücre iki haploid yavru hücreye bölünür ve mayozun interfaz evresine girer. Spermatogenezde, sitoplazma iki yavru hücreye hemen hemen eşit olarak bölünmektedir ancak oogenezde, ürünlerden biri (ikincil oosit) sitoplazmanın neredeyse tamamını alırken diğer ürün birinci polar cisim halini alır. Mitozdaki tersine interfaz kısadır ve II. mayoz bölünme hemen başlar. Mayoz ve mitoz bölünmelerdeki interfaz evreleri arasındaki en önemli nokta, birinci ve ikinci mayoz bölünme arasında DNA sentez fazının olmamasıdır.

3. Mayoz II (İkinci Mayoz Bölünme)

İkinci mayoz bölünme sıradan bir mitozla benzer fakat II. mayoz bölünmeye giren hücrelerin her birinden 23 çift kromozom içeren dört haploid hücre oluşur. I. mayoz bölünmedeki crossing-over nedeniyle oluşan gametlerin kromozomları da özdeş değildir (73).

C. Spermelerde görülen kromozom anöploidisi insidansı

Dekondanse sperm nükleuslarında 1960'lı yılların başından itibaren FISH yönteminin kullanılmaya başlanması, bu hücrelerin kromozomal durumları hakkında bilgiye ulaşabilmemizi sağlamıştır (39,40).

Spermelerin kromozomal yapısının gösterilmesi için yapılan ilk çalışmalarda hamster oositleri ile insan spermelerini içeren deney sistemi kullanılmış ve bu yaklaşımın FISH'e göre avantajlarının ve dezavantajlarının olduğu rapor edilmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmaların bakıldığında temelinde de FISH analizi yönteminin kullanıldığı görülmektedir. Pek çok erkek, özelliklerine ve kontrol gruplarına göre incelemeye alınmış ve sayısal kromozom anomalileri hakkında bilgi toplanmıştır. Bu özelliklere

bakılarak kromozomal anomali taşıyıcıları, infertil erkekler, yaşa göre farklılıklar veya bireysel risklere göre kromozom durumları bildirilmiştir.

Temel kromozom anomali düzeyi:

Spermlerdeki ortalama anomali miktarını tespit etmek için yapılan ilk çalışmalarda, sağlıklı donörlerden alınan örnekler kullanılarak veriler toplanmaya başlanmıştır (39,40,89).

Yapılan farklı çalışmalar ve incelenen kromozomlar sayesinde tüm kromozomlar için farklı seviyelerdeki dizomi miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmalardan çıkan farklı sonuçlar, farklı seviyelerdeki dizomi miktarlarına işaret etmekte ve kişiler arası farklılıkların aydınlatılmasında yol gösterici olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda, cinsiyet kromozomları ile 21 ve 22 nolu kromozomlara ait anomalilerinin sıklığının daha yüksek oranda bulunduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (40,89,155,156).

Daha önceki sperm çalışmalarında da belirtildiği gibi, kromozom sayı anomalilerinin tespiti ve spermlerdeki dizomi sıklığını belirlenmesi için FISH analizi en iyi yöntemdir. Yapılan çalışmalar otozomal kromozomlar için dizomi sıklığının % 0,13, cinsiyet kromozomları için 0,37 olduğunu göstermiş ve ortalama anöploid sperm oranının yaklaşık % 6,5 olduğu rapor edilmiştir (40).

Buna ek olarak, ortalama diploid sperm oranının % 0,06-0,24 arasında bulunduğu diğer çalışmalar ile de desteklenmiştir (39).

Sperm nükleuslarında herhangi bir kromozom için görülen dizomi sıklığının, paternal kaynaklı trizomik durumlara göre daha az oranda olduğu belirtilmektedir. Fakat sonuç olarak; anormal sperm sıklığı ile anöploidilere paternal katkı arasında ilişki ileri tartışılması gereken bir konu olarak önemini korumaktadır.

Mayotik bozukluk gösteren olgular incelendiğinde, sperm diploidisinin en sık rastlanan kromozom bozukluğu olduğu gösterilmiştir (41).

Spermlerdeki kromozom anomalileri ile kromozomal anomalili embriyolar arasındaki ilişkiyi saptamak için yapılan çalışmalar cinsiyet kromozom anomalileri, otozomal dizomiler ve nadir görülen diploidileri ortaya çıkarmak üzere yoğunlaşmıştır.

Yapılan çalışmalarda triploid gebelik ürünlerinde, diploid spermin oldukça önemli bir role sahip olduğu görülmüş ve bu durumun anafaz I evresinde sinaptik anomaliler nedeniyle oluşabileceği öne sürülmüştür (43).

Triploid gebeliklerin nedenini açıklamak üzere yapılan bir çalışmada, çoğunun (60/91) paternal kaynaklı olduğu görülmüştür. Bu olgularda, % 61,6 oranında diandrik triploid (dispermi), % 8,3 oranında diploid sperm ve % 1 oranında ise post mayotik bozukluk nedeniyle oluştuğu tespit edilmiştir. Diploid pronükleus oranı oligospermik olguların $\frac{1}{4}$ ünde, kriptozoospermilerin $\frac{1}{2}$ sinde ve azospermik olanların $\frac{1}{2}$ sinde görülmüştür (42).

Sperm anomalisi açısından izlenen gruplar:

- Cinsiyet kromozom sayı anomalisi taşıyıcıları
- Yapısal kromozom bozukluğu taşıyıcıları
- Normal karyotipe sahip infertil erkekler
- Cinsiyet kromozom sayı anomalisi taşıyıcıları:

Dekondanse sperm nükleusunda gerçekleştirilen FISH çalışmalarının çoğu, mozaik veya mozaik olmayan Klinefelter sendromlu olguların durumlarını ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmaların çoğu cinsiyet kromozom hiperhaploidilerini ve diploid spermlerin varlığını göstermiştir (43). Cinsiyet kromozom hiperhaploidilerinin spermlerde görülme sıklığının artması, mayotik süreç sırasındaki anormal dağılımın beklenen bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Klinefelter olgularında yapılan FISH

çalışmalarıyla; pakiten hücrelerinde % 60 oranında XXY gözlenmesi, anormal hücrelerin mayoza girebilme yetisinin olduğunu göstermiştir. Fakat bu anormal spermlerin mayotik süreci tamamlayamadıkları, sadece çok az bir kısmının (% 0,1) dizomik olduğu gösterilmiştir (156). Bu sonuçlar, Klinefelter olgularının spermlerinde görülen cinsiyet kromozom dizomilerinin, normal bireylerde görülen bölünme anomalilerinin sebebiyle aynı olduğunu düşündürmektedir (98).

Sayısal cinsiyet kromozom anomalisi taşıyan olgular çoğunlukla cinsiyet kromozomları açısından spermatozitlerinde artmış dizomi insidansı gösterir (19,156).

Mozaik olmayan XXY-Klinefelter olgularında yapılan çalışma, cinsiyet kromozom dizomisinin % 7,69 ; mozaik (XY/XXY) olgularda % 2,54 ve XYY olgularında ise % 3,97 oranında olduğunu göstermiştir (98).

Klinefelter sendromlu olguların, gerçekten mozaik olmadığını gösterilmesi, bu duruma sahip olguların ICSI (Intra cytoplasmic sperm injection) ile çocuk sahibi olmasının sağlanabilmesi açısından önem taşımaktadır. Normalde mozaik olmayan Klinefelter sendromlu olguların I. Mayoz aşamasına geçemedikleri bilinmektedir (22,114). Klinefelter olgularının germ line mozaik olması durumunda, spermatozoon üretebilmesi ve olguların ICSI ile çocuk sahibi olabilmeleri mümkün olmaktadır. Üretilen spermatozidler de, XY hücre kuşağından normal olarak köken aldığı için cinsiyet kromozom anomalilerinin gösterilmesine gerek duyulmamaktadır (59,146). Sonuç olarak, düşük dizomik sperm frekansı nedeniyle, XXY ve XYY olgularında, ICSI öncesi iyi bir genetik danışma verilmesi önerilmektedir.

- Yapısal Kromozom bozukluğu Taşıyıcıları

Translokasyon taşıyıcısı bireylerden elde edilen spermler pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (20,28,49,56,91,152). Bu translokasyon taşıyıcısı bireylerde görülen kromozomların mayoz sırasında ayrılması, içerdiği kromozom parçalarının

durumuna ve spermlerin dengeli olup olmamasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (20).

Preimplantasyon genetik Tanı (PGT) için en uygun aday olan bu bireylerde, öncelikle Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) çalışmalarının yapılması önerilmektedir (44,150,157). FISH çalışmaları, üretkenlik durumlarının belirlenerek risk yaklaşımını şekillendirecek ve sağlıklı bir genetik danışma verilebilmesini kolaylaştıracaktır.

İnversiyon taşıyıcısı olan olgularda bulunan anormal spermatozit frekansı, inversiyonun uzunluğu ve ilmek oluşturup oluşturmama durumuna göre değişiklik göstermektedir (1,29,74). Bu nedenle anormal sperm oranı % 0 ile % 54,3 arasında değişmektedir. Örnek olarak, inversion ilmeği yoksa, rekombinant sperm bulunmadığı fakat ilmek formu oluşmuşsa % 50 civarında rekombinant sperm olduğunu görülmektedir.

Robertsonian translokasyon taşıyıcıları için anormal sperm oranı % 3,4-40 arasında bulunurken, resiprokal translokasyon taşıyıcılarında bu oran % 47,5 ile % 81 arasında değişmektedir. Spermlerdeki bu dengesiz durumlar, kromozomların ve translokasyon kısmını içeren bölgelerin özelliklerine göre şekillenmektedir. Bu özelliklere, translokasyon parçasının uzunluğu, G pozitif ve negatif bantlardaki kırıklar, heterokromatin varlığı ve kiazma oluşumu sırasında bölgeye yakınlık gösterilebilir. Translokasyon taşıyıcısı olgular üretmiş oldukları anormal sperm yoğunlukları nedeniyle beklenenden daha fazla oranda anormal embriyo üretmektedirler. Bu nedenle PGD yaptırmak isteyen ailelere, çok iyi genetik danışma verilmelidir (46).

- Normal Karyotipe Sahip İnfertil Erkekler:

Yapılan çalışmalarda, infertil erkeklerin spermlerinde çocuk sahibi olanlara göre daha yüksek anöploidi oranları olduğu gösterilmiştir. Bu anomaliler daha çok cinsiyet

kromozom hiperhaploidileri ve diploid sperm nükleusları şeklinde olmaktadır (43,155). Mayoz bölünmedeki düzensizlikler, oligoastenozoospermik olgularda anormal gamet oluşumunda esas rolü oynamaktadır. Ayrıca spermatozoid hareketi ve yoğunluğundaki anomalilerin, kromozom anöploid riski ile birliktelik gösterdiği bilinmektedir (155). Bu durumun infertil olgulardaki etiyolojisi açıklayacak genetik bir neden olarak öne sürülebileceği düşünülmektedir. Ağır oligoastenozoospermik olgular, ICSI uygulamasının yapıldığı en büyük grubu oluşturdukları için, mayotik çalışmalar ve sperm kromozom FISH analizlerinin gerçekleştirilmesi için genetik danışmanlık için gerekli görülmektedir. İlk trimester düşükleri olan çiftlerden elde edilen spermatozoidler incelendiğinde daha yüksek oranda kromozom sayı anomalisine sahip oldukları görülmüştür (126).

İnfertil erkeklerde kromozom anomali normal popülasyona göre on kat artmış görünmesine rağmen, pek çok infertil erkek normal karyotipe sahiptir. Fakat bunların çoğunun spermioqramları anormaldir. Yapılan çalışmalarda, bu grup için artmış kromozom sayı anomali ve diploid sperm oranına rastlanmıştır. Bu bilgi klinik veri olarak kullanılacak olursa, spermatozoidlerdeki anöploid ve diploidin direkt olarak sayı ve motilite ile ilişkili olduğu söylenebilir (26,52,127,155). Mayotik değişiklikler anoploid ve diploid gametlerin oluşmasına neden olmaktadır. Anafaz I evresindeki düzensizlikler, diploid sperm oluşumunu, anöploid sperm oluşumuna göre daha kolaylaştırmaktadır (43).

İnfertil erkekler ICSI uygulanan en büyük grubu oluşturduğu için, planlanan işlemlerin gerçekleştirilmesinden önce çok iyi bir genetik danışma almaları önerilmektedir.

D. Apoptozis ve İnfertilite İlişkisi

İnfertilite tetkikleri arasına giren semen analizinde, günden güne gelişen teknolojik araçları kullanılmaktadır. Uygulanmaya başladığı ilk günden itibaren laboratuvarlar arası farklı yöntemlerin kullanılması, analizin subjektifliğini ortaya koymaktadır. Ölçümler arasındaki bu farklılıklar, semen analizinin erkek infertilitesinin açıklanmasındaki gücünü zayıflatırken, 1999 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yöntemler arasındaki farkları ortadan kaldırmak üzere kılavuz rehber hazırlamıştır (160). Böylece ICSI uygulanacak olguların sperm yoğunluğu, hareketi ve morfolojileri açısından incelenmesine bir standart getirilmiştir. Bu standardizasyon, tedaviye rağmen baba olamayan infertil erkeklere bu şansın ne oranda etki edeceğinin gösterilmesini sağlamıştır.

Fakat her yeni yöntemde olduğu gibi ICSI uygulamalarında da bazı sorunları görülmektedir. ICSI uygulaması yapılmış bebeklerde, normallerine göre artmış cinsiyet kromozom anomalileri saptanmaktadır (66). Ayrıca artan baba yaşıyla ilişkili olarak germ hücre kuşağında hücre hasarlanması görülmektedir (142). Erkek germ hücrelerindeki bu DNA hasarlanması, bir bakıma DNA tamir mekanizmalarındaki azalma nedeniyle karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, spermatogenezis sırasında hücresel mekanizmalar, bu hasarlanmış spermelerin tümüyle apoptozise girmesine izin verir ve eşey hücre farklılaşması böylece sorunsuz tamamlanmış olur (57,95). Sonuç olarak ejaküle edilmiş gametler hem mitotik hem de nükleer yönden genetik hasarlanmayı gösterebilmektedir (133). DNA hasarlanması, zigot içine taşınabilmekte ve ardından birinci bölünme aşamasına kadar tamir edilmesi gerekmektedir. Fertilizasyon sonrası dönemde gerçekleşen en ufak bir hata ise karşımıza mutasyon olarak çıkmakta ve doğumdaki sağlıklı çocukların bir sebebi olabilmektedir (3,5).

1. Sperm DNA' sı ve özellikleri

Sperm kromatini, somatik hücrelerdeki yapı ve kompozisyondan farklılık gösterir. Spermiogenezis sırasında, küçük boyutta temel protaminlere dönen histonlar, normaldekinin yarısına inerler. DNA ise tek süperkoil şeklindeki simitlere benzer bir yapı oluşturur ki "toroid" adını alır (53,121,158). İnsan spermatositlerinde bulunan iki tip protamin (P1 ve P2) disülfid bağları için daha düşük thiol gruplarına sahiptir ve bu durum spermi daha az stabil yapar. Sperm DNA sı epididimis boyunca protamin çapraz bağları (crosslink) ile disülfid bağlarını oluşturarak, somatik hücrelerde görülenin altıda biri boyuna kadar sıkıştırılmış olur (53). Bu yüksek düzeydeki çapraz bağlı yapı, sperm DNA sının korunmasındaki önemi gösterir. DNA hasarlanması fertil erkeklerde bile meydana gelirken, pek çok çalışmada, infertil erkeklerin sadece daha fazla DNA hasarlanması değil, aynı zamanda H₂O₂ ve X radyasyonun zararlı etkilerinden daha fazla etkilendiği görülmüştür (69,93).

2. DNA Parçalanmasının Nedenleri

Erkek eşey hücre kuşağındaki DNA hasarının kaynağı, bugüne kadar aydınlatılabilmemiş değildir. DNA hasarı, testiste, epididimiste veya ejakülasyon sonrası dönemde gerçekleşebilir. Bazı DNA çentikleri, DNA nın tersiyer yapısının oluşturulması sırasında torsion stresini azaltmak için ve spermatidlerin uzaması sırasında, protaminlerin histonların yerine geçmesi aşamasında gerekli olmaktadır (15,94,130). Fakat bu kalıcı çentikler, aşırı topoizomeraz II aktivitesi veya topoizomeraz II inhibitör eksikliği nedeniyle tamir edilemediğinde ejaküle edilmiş spermelerde DNA denatürasyonu ve fregmantasyonu meydana gelebilir. Benzer bir başka mekanizma da spermlerin epididimisten geçerken thiol gruplarının yetersiz oksidasyonu sonucu disülfid köprü formasyonu meydana gelmediğinde, DNA'nın hasarlanmaya karşı savunmasız kalması ile sonuçlanmaktadır.

3. DNA ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen radikalleri, artmış sentez ve azalmış antioksidan koruma nedeniyle erkek infertilitesinde önemli bir role sahiptir (4,45). Bu konudaki öncelikli mekanizma, plazma membranında lipid peroksidasyon kaskadının uyarılması ile sperm-oosit birleşmesi sırasında gerçekleşmektedir. Spermiler, yüksek doymamış yağ asidi ve yetersiz tamir mekanizması nedeniyle, reaktif oksijen radikalleri tarafından etkilenmektedir. Oksidatif stres ile DNA hasarı arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar (32,38,71,149). oksidatif stresin gelecekte erkek eşey hücre serisindeki DNA hasarının asıl sorumlusu olarak görüleceğini düşündürmektedir (6,10,132).

4. Sperm DNA Bütünlüğü ve Döllenme

H₂O₂ uyarımlı oksidatif stres durumlarının test edilmesi çalışmaları sırasında, düşük etkili streste, spermatositin dölleme yeteneğinin artmış olduğu görülmektedir. Burada az miktarda DNA hasarlanması olsa bile, tirozin fosforilasyon mekanizmaları bu artışa neden olmaktadır. Yüksek orandaki oksidatif streslerde ise, sperm DNA sı yoğun şekilde hasarlanmış, dölleme yeteneği de sperm plazma membranındaki peroksidatif etkiden dolayı düşmüştür (5,10). Bu durumda, DNA hasarlanması ile in-vitro fertilizasyon kliniklerindeki başarı arasında bulunan ters ilişkinin desteklendiği görülmektedir. Dölleme için kullanılan ICSI yöntemi, yüksek düzeydeki DNA hasarlanmasından etkilenmemektedir (8,48,67,84,87,145). ICSI uygulamasında kullanılan yöntem, spermın direkt oosit içine yerleştirilmesi şeklinde olduğundan ve spermın fonksiyonel yeterliliği önemli olmadığı için, DNA hasarlanmasının döllemeye etkisinin olmadığı söylenebilmektedir.

5. Sperm DNA ve Preimplantasyon Gelişim

Dölleme, sperm DNA sı ile oosit DNA sının birleşmesi temeline dayanmasına rağmen, DNA daki hasarlar dölleme sonrası gelişimde rol oynamakta ve gelişimin

erken dönemde durmasına neden olmaktadır. Embriyo gelişimindeki bu bozukluğun, baba kaynaklı genomdan kaynaklanan transkripsiyon bozukluğu nedeniyle olduğu düşünülmektedir (23,147). Preimplantasyon dönemindeki embriyo gelişiminin, DNA hasarlanması ile negatif yönde ilişkili olduğunun gösterilebilmesi için Nick Translasyon, COMET Assay, TUNEL ve SCSA gibi inceleme yöntemleri geliştirilmiştir. Kromatin yapısındaki anormallikler, azalmış embriyo bölünmesiyle sonuçlandığından ICSI uygulaması yapılan baba kaynaklı anormal genlerin bir şekilde ortadan kaldırılması gerekmektedir. Blastosist kültürü yani uzun süreli kültür, sadece canlı ve sağlıklı embriyoların yaşamasına olanak tanıdığı için başarıyı arttıracak gibi görünmektedir.

6. Sperm DNA sı ve Gebelik Kaybı Arasındaki İlişki

Normal çiftlerde görülen gebelik kaybı oranının %10-12; IVF ve ICSI uygulaması yapılan bireylerde ise % 17-18 olduğunu görmekteyiz (141). Bu kayıplar, IVF uygulamalarına umut bağlamış ailelerde % 75 gibi başarısızlık oranlarını gösterirken, psikolojik olarak streslerinin artmasına sebep olmaktadır. Spontan düşüklerin, yaklaşık % 50-70 oranının kromozom anomalilerine, % 30-50 oranının ise bilinmeyen genetik ve epigenetik faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (120,139). Pek çok DNA anomalisi (DNA fregmantasyonu dahil), açıklanamayan tekrarlayıcı gebelik kayıpları ile ilişkili bulunmuştur (27,132). Hayvan modellerinde toksik maddelerin implantasyon sonrası embriyonik kayıplara neden olduğu gösterilmiştir(63). Ayrıca ICSI yapılan olgularda, IVF yapılanlara göre daha fazla düşük riski bulunmaktadır (16). Çünkü ICSI yöntemi ile, normal koşullarda bir oositi dölleme yeteneğine sahip olmayan spermler de kullanılabilen ve spermde DNA hasarlanmasının kontrolü günümüz teknolojisinde yapılamamaktadır.

Sonuçta, embriyo gelişimi ve sağlıklı döllerin oluşturulmasında babaya ait etkinin araştırılması oldukça önemli bir konuyu oluşturmaktadır. Bu etkiler, genetik ve epigenetik olarak insan sperminde gerçekleşen DNA değişikliklerine bağlıdır. DNA hasarlanması ile, başarı oranı düşmüş döllenme ve yüksek abortus oranları arasında, doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Hatta çocukluk çağı hastalıkları (özellikle kanserler) ile baba kaynaklı DNA hasarlanması arasında da bir ilişki vardır (45). TUNEL, COMET ve SCSA gibi inceleme yöntemlerin kullanılmasına rağmen, insan sperm DNA sındaki hasarların doğası ve nereden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Bazı olgularda “ksenobioticlere” maruz kalma, sigara kullanımı, mesleki çevre faktörlerinin (ağaç, metal işleri) anormal çocuk sahibi olmaya neden olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca azalmış antioksidan koruma veya artmış serbest oksijen türevleri nedeniyle oksidatif strese maruz kalma, erkek eşey hücrelerindeki DNA hasarlanmasıyla sonuçlanmaktadır. Genetik, epigenetik ve çevresel faktörler spermatogenezde apoptozise, endojen endonükleazların aktivasyonu ile de farklılaşan hücrelerde, DNA farklılaşmasına neden olmaktadır (45).

E. Preimplantasyon genetik tanı

Preimplantasyon genetik tanı (PGT), prenatal tanının en erken şekli olup in-vitro fertilizasyon (IVF) merkezlerinde oluşturulmuş embriyoların iyi tanımlanmış genetik hastalıklar açısından analizini sağlayan bir yöntemdir (134).

PGT uygulamaları ilk olarak, 1990 yılında Alan Handyside ve ark. tarafından, X'e bağlı geçiş gösteren hastalığı taşıyan anneden elde edilmiş embriyoların, erkek cinsiyetine sahip olanlarının ayrılması ile yapılmıştır. Handyside ve ark bu çalışmalarında Y kromozomuna özgü primer dizilerini kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi tek hücrede gerçekleştirilmiştir (62). Bu çalışmanın

önderliğinde PCR, daha sonra pek çok tek gen hastalığının tanısı için düzenlenmiş ve farklı uygulamaları yapılmıştır (46).

Bin dokuz yüz doksanların başında, tek hücrenin kromozom düzeyinde analizini sağlayan Floresan in-situ Hibridizasyon (FISH) yönteminin geliştirilmesi ile, bu yöntem PGT çalışmalarında uygulamaya girmiş ve cinsiyet seçiminde PCR yerine tercih edilen bir uygulama olarak kabul edilmiştir. FISH uygulaması sadece cinsiyet kromozomu için değil, diğer kromozomal sayı anomalilerinin analizini de sağlaması nedeniyle kullanım alanı genişlemiştir (143).

PGT nin kullanımındaki en temel amaç, IVF merkezlerindeki implantasyon başarısının artırılması veya düşüklerin azaltılmasıdır (100). İleri anne yaşında görülen oosit kalitesindeki bozukluk, implantasyon başarısızlığındaki en önemli nedendir (109). Spontan abortuslarda ve canlı doğumlarda kromozomal sayı anomalileri ile anne yaşı arasındaki doğru orantı, bölünme aşamasındaki embriyolarda da gösterilmiştir (70,93,101,154). Embriyo ve oosit düzeyinde yapılan çalışmalar, kromozom anomali oranının spontan abortuslara göre çok yüksek olduğunu göstermiştir (100). Bu durumun kromozomal anomalili embriyoların klinik olarak tanı almadan ortadan kaybolduğunu göstermektedir. Anne yaşı ile kromozomal sayı anomali sıklığı arasındaki doğru orantının, kromozomal anomalili embriyoların elenmesi ile tersine döneceği düşünülmektedir (78,107). Günümüzde kromozomal anomalili embriyoların in-vitro fertilizasyonda kullanılmaması, polar body (PB) ve/veya blastomer analizini kapsayan PGT ile yapılabilmektedir (100).

Kavram olarak "genetik tanı" (diagnosis) terimi, özel bir genetik hastalığın mutasyonun veya kromozomal bozukluğun araştırılması demektir. Cinsiyete bağlı hastalıklar için bazı durumlarda, mutasyonun tanımı imkansızdır, klinik olarak zordur veya potansiyel hastalara uygulanamayabilir. Bu nedenle cinsiyet seçimi amacıyla

yapılan PGT uygulamaları da “genetik tanı” kavramı içine dahil edilebilir. Diğer yandan, tarama “screening” risk altında olan popülasyonun tüm bireylerinde bir genetik hastalığın aranmasını, “preimplantasyon genetik tarama” ise, risk altındaki embriyoların, spesifik bir bozukluk amacıyla taranmasını ifade etmektedir. Risk altındaki embriyoların değerlendirilmesi, defektin ciddiyeti ve görülme sıklığına tümüyle bağımlı olduğundan, bazı PGT uygulayıcıları PGD-Aneuploidy Screening (PGD-AS) terimini kullanmaktadır. Fakat bu tarama, ortak bir özelliğe sahip risk altındaki bir topluluk (örn: anne yaşı) ve aile hikayesi olmayan artmış genetik risk altındaki bireylere uygulansaydı gerçek anlamda bir taramadan söz edilebilirdi (137).

Günümüzde kromozom anomalilerinin tespiti için yapılan PGT uygulamalarında, endikasyonu olmadığı halde yapılanları bir kenara ayıracak olursak, tümünün PGT-AS tanımına uyacak popülasyonları içerdiğini görmekteyiz.

Etik yönden bakıldığında, PGT uygulamasının avantajları; ailenin gelecekte karşısına çıkabilecek bozuk döllerinden korunmuş olması, ailenin yaşam kalitesinde bir artışın gerçekleşmesi ve “ahlak etkisi” denilen ebeveynlerin psikolojik olarak etkilenmeden tekrarlayan hamilelik sonlandırmalarına gerek kalmamasıdır.

PGT yapılmadan önce, uygulayıcı ekibin riskleri çok iyi değerlendirmesi, hastayı bilgilendirmesi ve birlikte karar verilmesi gerekmektedir. Her grup, kendince uygunsuz bulunduğu durumları rahatça belirtebilmelidir. Sonuçta verilen karar, aday ve merkezin ortak bir kesişim kararı olması gerekmektedir. Bu yöntem “paylaşılmış ortaklık” şeklinde tanımlanabilir. Bununla birlikte, esnekliğin sorumluluğu, uygulayıcı (sağlık uzmanı) tarafında olmalıdır (137).

F. Preimplantasyon Genetik Tanı Uygulama Yöntemleri

PGT uygulaması, biyopsi işleminden sonra, yapılacak işlemlerin özelliğine göre farklılık gösterdiğinden incelemesi yapılacak olan hastalıkların kalıtsal özellikleri göz önüne alınmaktadır. Bunlar:

- Kromozom sayı anomalisi ve yapısal bozukluklar,
- Tek gen defektleri: otozomal dominant-resesif ve mutasyonu belli X' e bağlı hastalıklar için farklı algoritmeler,
- Moleküler patolojinin gösterilemediği cinsiyete bağımlı hastalıklar (24).

1. Ovum Stimulasyonu ve Embriyoloji

İnfertilite klinikleri, bilimsel teknolojik yöntemler sayesinde, giderek artan sayıda oosit veya embriyoda PGT uygulaması yapmaktadır. PGT uygulaması için öncelikle, ovum stimulasyonun yapılması ve oositlerin elde edilmesi gerekmektedir. Eksojen gonadotropinler sayesinde ovum stimulasyonu ile pek çok folikül oluşturulmakta ve bu süreç pelvik ultrasonografi (US) ile kolayca takip edilebilmektedir. Folikül sayı ve gelişimi uygun hale geldiğinde, oosit maturasyonu hormonal olarak düzenlenmekte ve 34-38. saatler arasında, oositler transvaginal US eşliğinde follüküler sıvı içerisinde aspire edilmektedir. IVF amacıyla, oositler uygun besiyeri ortamına aktararak, spermiler ile fertilize olması için gece boyu inkübe edilmekte veya tek bir spermin, olgun oosit içine yerleştirilmesini sağlayan intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemi uygulanmaktadır. ICSI yöntemi, düşük sayı, zayıf hareket yeteneği veya bozuk sperm morfoloji sorunu olan hastalar için tercih edilmesi gereken bir yöntemdir (115). Bu uygulama ile önceki IVF denemelerinde başarısızlığı olan olgular ve tüm PCR yapılması gereken PGT olguları fayda görmektedir. Fazla sayıda spermin

zona pellucida içine geçip paternal DNA' nın yanlış tanı durumlarına yol açabilmesini engellediği için ICSI tercih edilmesi en uygun yöntemdir (24).

Oositin, IVF işleminden sonraki gününde iki pronukleusun görülmesi işlemin başarılı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Bu embriyolar, ayrılarak gelişimini devam ettirmesi için kültür ortamına yeniden yerleştirilir.

Genetik test için biyopsi örneği, gelişim basamaklarının farklı zamanlarında uygulanabilir. Kromozomal sayı anomali taraması (PGT-AS) için PGT uygulamasının ilk basamağında seçilecek olan en uygun biyopsi yöntemi belirlenir.

2. Biyopsi yöntemleri:

- d. Polar body biyopsisi
- e. Bölünme aşaması embriyo biyopsisi
- f. Blastokist biyopsisi
- g. Dondurma İşlemi sonrası biyopsi

a. Polar Body (PB) Biyopsisi:

PB biyopsisi, ekstra embriyonik materyal olması ve embriyonun gelişimine etkisinin az olması nedeniyle avantajlıdır. Ayrıca etik açıdan daha kabul edilebilir bir durum olarak değerlendirilmektedir.

Olgun oosit, 23 adet bivalent maternal kromozom içeren I.PB nin görülmesiyle karakterizedir. Fertilizasyon öncesi, I. PB, oositin uzaklaştırılabilir kromozomlardaki sayısal anomalileri göstermede kullanılabilir. Fertilizasyon sırasında atılan 23 maternal kromatit içeren II. PB de oositin durumunu belirlemek amacıyla genetik testler için kullanılabilir. Fakat PB, sadece anneden kalıtılan genetik materyal hakkında bilgi vermekte, babadan kalıtılan hastalıklar için, tanı aracı olarak

kullanılmamaktadır. Buna ek olarak I.Mayoz sırasında kromatitlerin anormal ayrılmasını veya kırık noktaları tespit edilemeyen rekombinasyonlar için PB biyopsisinde PGT her zaman mümkün olmamaktadır (24).

b) Bölünme Aşaması Biyopsisi

İki veya 4 hücreli aşamada iken yapılan biyopsi, embriyoda bol miktarda hücrenin kaybına neden olmakta ve bu kayıp embriyonun gelişimsel potansiyeli üzerine negatif etki etmektedir. Bölünen embriyonun her bir hücresi, 8-16 hücreli aşamaya ve embriyonun paketlenme (sıkılaştırma) sürecine kadar kadar ne yönde gelişeceği belirgin değildir. On altı hücreli aşamadan itibaren, sıkı bağlantılar (tight junctions) şekli oluşturmaya başlar ve hücreler birbirine yapışmaya (apposition) her bir hücreyi ayırmaya başlar. Hücre sayısı 8-12 adet iken, blastomerler totipotent yeteneğe sahiptir ve sıkı bağlantılar gerçekleşse bile, biyopsi başarıyla uygulanabilmektedir. PGT merkezleri tarafından kabul edilen bu sıkı embriyonun biyopsisi, Ca-Mg içermeyen besiyerinde (hücreler arası teması azaltmak için) kısa bir süre inkübe edildikten sonra gerçekleştirilir (24).

Bölünme aşamasında yapılan biyopsi hakkında en çok tartışma, alınacak blastomer sayısının bir mi yoksa iki mi olacağına karar verme sırasında olmaktadır. İki hücrenin alınması, embriyonun hücreler arası temasını ve gelişimsel kapasitesini azaltmaktadır. Tanının doğruluğu, her iki hücreden elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu çıkması ile artırılmış olur. Gebelik oluşturulması için embriyoların sayısı ve kalitesi önemlidir. Bu embriyolardan elde edilen iki hücre arasında farklı sonuçların çıkması, transfer edilecek uygun embriyo sayısını ve hamilelik olasılığını azaltmaktadır (85,151).

Genetik tanının yapılmasından sonra, gelişimin dördüncü veya beşinci gününde (Blastokist aşaması) uygun embriyolar transfer edilmektedir (54). Bölünme aşaması

embriyo biyopsisinin etkinliği ve güvenliği ilk olarak fare embriyosunda gösterilmiş ve bu teknik günümüze kadar pek çok klinik uygulamada kullanılmıştır (33,46,86).

c) Blastokist Biyopsisi

PB veya bölünme aşamasında yapılan biyopsilerde temel sorun, elde edilen materyalin azlığı nedeniyle yetersiz ve doğru olmayan genetik tanıyla sonulanabilmesidir. Blastokist aşamasında yapılan biyopsilerde, embriyonun  yüzden fazla hücre içermesi, embriyodan herhangi bir yıkıcı etki yaratmadan daha fazla hücre alınabilmesi kolaylaşmaktadır. Ayrıca, blastokist biyopsisinde daha çok trofoektoderm hcreti alınarak fetüsü oluşturan i hücre kitlesinin (inner cell mass) hasarlanması önlenmekte ve böylece etik sorunların ortaya çıkması engellenmektedir (37).

Blastokist biyopsisi, genel olarak fertilizasyondan sonraki beşinci veya altıncı günde yapılmaktadır. Hücrelerin alınmasından önce, zona pellusida üzerinde bir delik açılmakta, hücreler ya iğnenin yavaşça kaldırmasıyla ya da trofoektodermin uyarılması ile fiziksel olarak ayrılarak biyopsi gerçekleştirilmektedir.

Blastokist biyopsisi, fare embriyolarında başarıyla uygulanarak, yüksek başarı oranları ile hamilelik gerçekleştirilmiştir(37) .

Bu çalışmadan sonra, blastokist aşamasına kadar insan embriyo kültürünün yapılmasındaki sorunlar nedeniyle, uzun bir süre insan çalışmaları yapılamamıştır.

d) Dondurma işlemi sonrası biyopsi

Günümüzde, iyi morfolojiye sahip ve düzenli bölünme gösteren fazla embriyoların dondurulması, IVF/ICSI işlemlerinin rutin bir parçasıdır. Fakat dondurulma işlemi sonrası, zona pellusidanın zayıf olması nedeniyle biyopsi işlemi daha zordur. Dondurma işlemi sırasında sık kullanılan protokol; embriyoların pronkleer, bölünme

veya blastokist aşamalarında, bütünlüğü korunmuş zona pellusidadan, koruyucu maddenin (cryoprotectant) difüzyon yoluyla embriyo içine aktarılmasıyla yapılmaktadır. Bu işlemin, biyopsi yapılmamış aynı dönemdeki embriyolarda, biyopsi yapılanlara göre daha uygun olduğu görülmüştür (77). Buna rağmen, PB biyopsisi ve bölünme aşaması biyopsisini takiben dondurulması ve ardından eritilip anne adayına yerleştirilmesiyle hamilelik gerçekleştirildiği farklı yayınlarda bildirilmiştir (83,162). Bir diğer çalışmada da, bölünme evresi biyopsisini takiben oldukça yüksek sağ-canlı kalım oranları gösterilmiş ve ardından yapılan transferlerdeki başarı oranının % 25 gibi yüksek bir değerde olduğu belirtilmiştir (82).

G. Preimplantasyon genetik tanı endikasyonları

1. Tek Gen Hastalıkları

Tek gen hastalıkları, embriyo düzeyinde tanıya yönelik ilk çalışmaları oluşturmaktadır. Tek hücreden elde edilen DNA' nın analizi için kullanılan klasik PGT biyopsi ve PCR yöntemleri, hızlı ve güvenilir sonuçlar verse de hala zahmetli ve zor uygulamalardır. Tek gen hastalıklarında, PGT uygulamaları için ilk tanımlama kistik fibrozis için yapılmıştır. Kistik fibrozis, Avrupa topluluklarında 1/2500 sıklıkta görülmekte ve hastaların çoğunluğu, homozigot $\Delta F508$ mutasyonunu taşımaktadır. Ayrıca, belirli toplumlarda sık görülen β globin gen defektleri (Orak hücre anemisi, β talasemi) ve spinal kaslar atrofi gibi otozomal resesif hastalıklar için PGT uygulamaları yapılmıştır (134).

Myotonik distrofi, Huntington hastalığı ve Marfan sendromu gibi otozomal dominant hastalıklar için de PGT uygulamaları da geliştirilmeye başlanmıştır. Otozomal dominant hastalıklara PGT uygulama sıklığı, otozomal resesif olanlara göre daha

azdır. Fakat otozomal dominant hastalığa sahip bireylerdeki % 50 defektli döl oluşturma riskinin, resesif bireylerdeki % 25 ten fazla olması nedeniyle, yakın zaman içinde PGT uygulamalarının artacağı düşünülmektedir (134).

European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGT Konsorsiyumu' nun yayınladığı üçüncü raporda, 26 farklı merkezden alınan veriler ile toplam 33 farklı tek gen hastalığının tanısının PGT ile konabildiği belirtilmiştir. Prenatal tanısı yapılan hastalıkların sayısına göre oldukça az olan bu listede, sayının artması için gelişmiş PGT merkezlerinin daha çok çabası gerektiği düşünülmektedir (46).

2. Cinsiyete bağımlı hastalıklar

X' e bağımlı hastalıklardan Duchenne Musküler Distrofi ve Hipoksantin Fosforibozil Transferaz defekti, PGT uygulamalarında ilk kez tanısı gerçekleştirilen hastalıklardır. Burada yapılan işlem basit bir cinsiyet seçimi olduğu için moleküler olarak tek hücrede tanısı konmuş hastalık olarak değerlendirilmemektedir. Yapılan bu ilk çalışmada sadece dişi embriyolar transfer edilmiştir (62). Fakat PGT uygulamalarındaki bu tarz bir yaklaşım, tüm erkek embriyoların yaklaşık yarısının sağlıklı olması nedeniyle bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca dişi embriyoların da yaklaşık yarısının taşıyıcı olduğunu unutmamak gerekir. X' e bağımlı hastalıklardan Frajil X ve Duchenne Musküler distrofi gibi kızların da etkilenebileceği hastalıklar için tek başına cinsiyet seçiminin yetmeyeceği açıktır. Her geçen gün X' e bağımlı hastalıkların moleküler genetik temeli aydınlatılabilmekte ve bunlar için gerçekleştirilen DNA tanıları PGT uygulamalarına uyarlanabilmektedir. Etik yönden bakıldığında, kabul gören düşünce şekli ise; taşıyıcı olmayan kız ve sağlıklı erkek embriyoların yerleştirilmesidir (34,46).

PGT döneminde embriyoda cinsiyet seçimi, prenatal tanıyla cinsiyet seçimine tercih edilmektedir. Ayrıca bu hastalık grubu için yapılan cinsiyet seçimi ile toplumdaki dağılım çarpıklaşmayacaktır. Çünkü PGT sayesinde, sadece çok sınırlı bir grubun çocuklarının cinsiyeti seçilebilmektedir. Aile isteği ve ailenin dengesinin sürdürülmesi amacıyla yapılan cinsiyet seçimi bu noktada ayrı olarak değerlendirilmelidir (134) .

3. Kromozomal anomaliler

Kromozomal anomali nedeniyle PGT uygulamalarının büyük bölümünü translokasyon taşıyıcısı ebeveynler oluşturmaktadır. Sağlıklı taşıyıcıların, kromozomal açıdan dengesiz döllerinin gerçekleşebilmesi nedeniyle konjenital anomalili ve/veya mental retardasyonlu çocuk sahibi olma, tekrarlayan düşük veya özellikle erkek taşıyıcılarda infertilite gibi sorunlar karşımıza çıkabilmektedir.

Translokasyon taşıyıcısı çiftler için yapılmış çalışmalardan birinde translokasyon taşıyıcısının anne olması nedeniyle I. PB kullanılmış ve oositin kromozomal açıdan sağlıklı olup olmadığına karar verilebilmiştir (102). Bu çalışmanın en fazla sorun yaratan noktası, sadece annenin taşıyıcısı olduğu translokasyonlarda kullanılabileceğidir.

Son yaklaşımlarda, bölünme aşamasındaki embriyoda blastomer biyopsisi tercih edilmektedir. Robertsonian translokasyonlar için kullanılan FISH prob seti, bir kromozomun lokus spesifik bölgesini içine alan kırılma noktasını ve diğer kromozomun telomer bölgesini içermektedir. Resiprokal translokasyonlar için ise kromozomun kırık bölgesini içeren sentromerik proplar ve diğer koldaki üçüncü bir telomerik prob şeklinde olmaktadır (30,31). Kırık noktalarına uygun sentromerik ve telomerik prob karışımları, sağlıklı olanları ayırt etmekte işe yaramakta ancak, burada embriyonun dengeli translokasyon taşıyıcısı olup olmadığı gösterilememektedir. Genellikle, her olguda farklı resiprokal translokasyonlar

görüldüğü için, her örnekte farklı prob karışımlarının test edilmesi gerekebilmektedir. Pek çok merkezde, translokasyonlu ebeveynlerden elde edilen embriyoların % 80' den fazlasında kromozomal olarak anomali bulunması nedeniyle transfer yapılamaması da siklus başına hamilelik oranını düşürmektedir. Resiprokal translokasyonlu bireylerde tekrarlayan düşükler ve infertilite nedeniyle PGT, şimdilik uygulanabilecek tek yöntem olarak görülmekte ve bunlar PGT den en fazla yararlanan grubu oluşturmaktadır (46,134).

4. Anöploidi Taraması (Aneuploidy Screening)

Embriyolarda yapılan klasik sitogenetik çalışmalar, % 23 ile % 80 oranlarında anöploidi göstermiştir (118,163). Bu kromozomal anomalilerin tipleri ve neden ortaya çıkabilecekleri konusunda, FISH yöntemi bazı bilgiler vermektedir. Munne ve ark.nın yaptıkları çalışmada, PGT sonrası embriyolar X ve Y kromozomları için FISH problemleri ile değerlendirilerek, monozomi X ve trizomi/triploidi açısından mozaik durumlar bildirilmiştir. Embriyolar, beş kromozom (X,Y,13,18,21) için spesifik FISH problemleri ile kontrol edilmiş ve anormal gelişim gösterenlerde en az bir kromozom için anomali saptanmıştır (35,107). Bölünme aşamasında canlılığını yitirmiş 1255 adet embriyonun incelendiği bir başka çalışmada ise, anne yaşının kromozomal anomali insidansı ile artmış oranda birlikteliği gösterilmiş ve poliploidi ve mozaik durumların zayıf embriyo kalitesi ile bir arada bulunduğu bildirilmiştir (92).

İleri anne yaşı ile fetal anöploidi arasındaki ilişkiye örnek olarak tariflenen düşüklerde, fetüslerin % 50-60 oranında fetal anöploidi taşıdığı bildirilmiştir (21). Embriyoda yapılan kromozom sayı anomalilerinin tespitine yönelik çalışmalar, IVF sonuçlarının daha iyi olmasını ve kromozomal defektli çocukların doğmasının engellemesini sağlamaktadır.

PGT, bireysel olarak ileri anne yaşı ile birlikte giden problemlerin aydınlatılmasında ve translokasyon taşıyıcısı olmadığı halde tekrarlayan düşükleri olan çiftlerde kullanılmaktadır (35,126,162). Anöploidi taraması (AT), diğerlerine göre kolaylıkla uygulanması nedeniyle, PGT uygulamalarında en fazla kullanılan yöntemdir ve uygulanan potansiyel hasta grubu oldukça geniştir (46). PGT-AT de yanlış tanı oranı, tek embriyo biyopsisinde yaklaşık % 7 ve embriyodaki blastomerlerdeki mozaiklik nedeniyle % 6 olarak belirtilmiştir (126). Geniş serilerin kullanıldığı retrospektif çalışmalardan elde edilen sonuçlar, PB biyopsisi sonrası implantasyon oranlarının seçim yapılmadan uygulanan transferlerdekinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, 7 ve 9 probun kullanıma dahil edilmesiyle, PGT uygulamalarında implantasyon oranlarının arttığı görülmüştür (103).

Günümüze kadar kromozom sayı anomalisi tespitine yönelik 2000' den fazla PGT uygulaması gerçekleştirilmiştir (134).

H. PGT uygulamasının amaçları

1. Spontan abortusların azaltılması

Spontan abortuslar, IVF merkezlerine başvuran çiftlerde önemli bir endikasyon grubunu oluşturmaktadır. Bu abortusların önlenmesi için, yardımcı üreme teknikleri sonucunda elde edilmiş embriyoların kontrol edilmesi tercih edilerek, sağlıklı embriyoların ayıklanması planlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kontrol grubunda gözlenen % 23 abortus oranının PGT uygulananlarda % 9 oranına indiği gösterilmiş ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. PGT amacıyla kullanılacak prob setinin planlanması için, en sık görülen kromozom bozuklukları tespit edilmeye çalışılarak, X, Y, 13, 15, 16, 18, 21 ve 22 nolu

kromozomların, karyotip açısından fetuslardaki sorunun % 83 ünü ortaya çıkardığı gözlenmiştir (104).

Bu prob karışımının güncel standart olması nedeniyle yapılan çalışmalarda PGT uygulaması, düşük riski olan anomalili tüm embriyoların yaklaşık % 80' ini ortaya çıkarmıştır. Bu prob setiyle 36 yaşından büyük 313 kadını kapsayan yapılan çalışmada düşük oranı sadece % 9 bulunmuştur (76).

2. İmplantasyon oranlarının arttırılması

IVF merkezleri, uyguladıkları yöntemler ile kendi implantasyon oranlarını arttırmayı hedeflediklerinden, yeni yöntem geliştirme çabaları yanında yeni düzenlenme çalışmaları da yapmaktadırlar. Ortalama anne yaşının 36 olduğu bir PGT çalışmasında, X, Y, 13, 18 ve 21 nolu kromozomlara 15, 16 ve 22 nin eklenmesiyle %10,2 olan implantasyon oranının , % 22,5 oranına yükseldiği gösterilmiştir (55). Yapılan ilk çalışmalardaki düşük implantasyon oranları, yeni problemlerin eklenmesiyle arttırılmıştır. Farklı kromozomlar açısından 1600 embriyonun incelenmesi sonucunda azalan sıklıkla 22, 16, 15 ve 21 no' lu kromozomların anöploidilerinin en sık; X, Y, 6, 14 ve 18 nolu kromozomların anöploidilerinin en az olduğu bildirilmiştir Bu nedenle klasik uygulamada kullanılan X, Y, 13, 18 ve 21 nolu kromozomlara 16, 22 ve 15 in eklenmesiyle implantasyon oranlarında anlamlı artış saptanmıştır (55,100).

3. Çoklu gebeliklerin ve dondurulmuş embriyoların azaltılması:

PGT, kromozom sayı anomali taraması, çoklu gebeliklerin sayısının azaltılmasına yardımcı olmaktadır. Pek çok embriyonun bu dönemde anormal olması, PGT sonrası daha az sayıda olan kromozom anomalisiz embriyonun yerleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Böylece, embriyoların sadece küçük bir kısmının dondurulması,

saklanacak embriyo sayısının azalması, depolama ve ortadan kaldırma işlemlerinde karar vermeyi kolaylaştırmaktadır (100).

I. Kromozomal Sayı Anomalileri İçin PGT Endikasyonları

1. İleri anne yaşı

İleri anne yaşı (İAY), prenatal tanının bir endikasyonu olduğundan, PGT için tartışılmaz bir uygulama nedeni olmaktadır. Yapılan çalışmalar, 39 yaş üstü anne adaylarından elde edilen embriyolarda, kromozomal anomali oranının en yüksek olduğunu göstermektedir (92,101). Ayrıca bu amaçla yapılan PGT, implantasyon oranlarını da arttırmaktadır (100).

Pek çok IVF merkezi, 36-42 yaş arasındaki anne adayları için PGT sonrası benzer implantasyon oranlarını bildirmişlerdir (55,104). Kırk yaşından sonra yüksek oranda görülen kromozomal sayı anomalisine rağmen, PGT oldukça güvenilir bir yöntem olmakta ve olgularda tek embriyo yerleştirilse bile yüksek implantasyon oranları gerçekleşmektedir (110).

2. Tekrarlayan düşükler

Tekrarlayan düşükler, normal karyotipe sahip bireylerde üç veya daha fazla sayıda ardışık spontan düşüğün 20-28 haftalıktan önce meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır. Spontan abortus olma olasılığı, bir hamilelikte % 15 ise, ardışık üç hamilelikte tekrarlayan düşük olma ihtimalinin % 0,3 olması gerekirken, gözlenen değer buna göre daha yüksek olan % 1 oranındadır (154).

Kromozomal anomaliler, düşüklerin en önemli nedenidir (159). Kromozomal olarak anomali olan hamilelikler, % 99 oranında düşükle sonuçlanırken, normal olanlarda sadece % 7 oranında düşük görülmüştür. Fakat bir diğer farklı durum olarak;

sporadik abortuslarda, anormal karyotip sıklığı tekrarlayan düşüklerde bulunan değerlere göre daha yüksek bulunmuştur [% 40; % 60] (96). Buna ek olarak 2-4 ardışık hamilelikte düşük olması durumunda, % 60 olan kromozom anomalili embriyo oranının, 4 ten fazla olan düşüklerde sadece % 29' unun anormal olduğu gözlenmiştir. Düşükler konusunda yapılmış tüm çalışmalar, klinik olarak tanımlanmış hamileliklerde gerçekleştirilmiştir (112).

Valencia In-vitro inseminasyon grubu, tekrarlayan düşükleri olanlarda kromozomal anomali sıklığının kontrollere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir [% 71; % 45, $p<0,0001$]. Fakat bu iki grup arasında, implantasyon ve hamilelik oranları ile ilgili fark bulunmamıştır (119,126,157).

3. Tekrarlayan IVF başarısızlıkları (TIB)

TIB, tanım olarak; toplam ondan fazla embriyonun yerleştirilmesini içeren 3 veya daha fazla sayıdaki IVF uygulaması sonunda bebek sahibi olunamamasıdır. Tekrarlayan IVF başarısızlığı endikasyonu ile yapılan PGT sonuçlarının yayınlandığı pek çok çalışma bulunmaktadır (3,55). Kromozom anomalilerinin, başarısız siklusların sayısını arttırması ile ilgili bir çalışmada, bu artış oranları; 2 uygulama için % 40; 3 uygulama için % 50 , 5 ve üstündeki uygulamadaki başarısızlıkta % 67 olarak bildirilmiştir (55). Başka bir çalışmada kromozom anomali sıklığının, daha genç yaştaki olguların kontrol olarak alındığı gruba göre daha yüksek olduğu (%60) bildirilmiştir (55). Anomalilerin asıl nedeninin, sadece anöploidi değil, mozaiklik, poliploidi ve haploidi olduğu belirtilmiştir (55,117). Tekrarlayan IVF başarısızlığı olan olgularda, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda kromozomal anomalinin saptandığı [%67; %32,], bir çalışmada ise, asıl sorunun mozaiklik değil, % 75 sıklıkta görülen anöploidi olduğu belirtilmiştir (117).

TIB olan olgularda, kromozomal anomalinin tespit edildiği pek çok çalışma bulunduğu için PGT bu hastalara bir alternatif olarak önerilmektedir (55,117). Yirmi beş merkezin sonuçlarını toplayıp değerlendiren ESHRE PGD Consortium tarafından, tekrarlayan IVF başarısızlıkları için bulunan % 7 hamilelik oranı, ileri anne yaşı ve tekrarlayan gebelik kayıpları için yapılan PGT uygulamalarında çıkan % 28 oranı ile karşılaştırılmıştır (46). Yapılan bir çalışmada tekrarlayan IVF başarısızlığı grubunda, % 19,8' lik implantasyon oranı bildirilmiştir (117).

Bu güne kadar olan yapılan çalışmalarda, TIB nedeniyle, olguların PGT uygulamasından büyük yarar sağlayabileceği görüşü kesin bir netlik kazanmamıştır. Bu hastalarda, implantasyon başarısızlığının kromozomal anomali nedeninden başka sebeplerle olduğu düşünülmektedir. Sınırlı sayıda çalışma olsa da, sitoplazma transferinin, tekrarlayan IVF başarısız hastalarda daha yüksek implantasyon ve hamilelik oranlarını sağladığı gösterilmiştir (25). Bunların dışında yapılan bazı çalışmalar da yapısal kromozom bozukluklarının TIB hastalarında yüksek oranda bulunduğu fakat bu bozuklukların rutin bir işlem haline gelen anöploidi taraması sırasında gösterilemediğini düşündürmektedir (122).

4. Non-Obstruktif Azospermi

Epididimal sperm aspirasyonu (MESA) veya testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) gerektiren aşırı derecede infertil erkeklerden elde edilen embriyolarda, yüksek oranda kromozomal anomali saptanmıştır (55,140).

TESE grubunda, mozaik embriyoların çoğu kaotik olmakla beraber, embriyoyu oluşturan blastomerlerin birbirinden farklı kromozom anomalilerine sahip olduğu görülmüştür (140).

Erkek sentrozomunun ilk mitotik iğ ipliklerinin organizasyonunda merkez rolüne sahip olması nedeniyle, sperm anomalisinin sonraki embriyolardaki mozaisizmin sebebi olduğu düşünülmektedir. TESE ile elde edilen spermin, tamamlanmamış veya gelişmemiş sentrozom yapısına sahip olabilmesi, embriyolardaki mozaisizmi açıklayabilir. Kaotik olarak mozaik embriyoların tümü veya tümüne yakın hücrelerinin anormalliğe sahip olması nedeniyle, TESE olgularında, sadece bir hücrenin PGT ile anöploidi tetkikinin yapılmasının yeterli olduğu belirtilmektedir (140).

5. Kromozomal Translokasyon Taşıyıcısı Ebeveynler

Kromozomal açıdan dengeli translokasyon taşıyıcıların toplumdaki sıklığı % 0,2 olarak belirtilirken, bu oran infertil çiftlerde % 0,6, IVF denemesi 10 kez başarısız olanlarda % 3,2 ve ardışık üç düşüğü olan çiftlerde % 9,2 olarak bildirilmektedir (144).

Translokasyonlar üç grup altında toplanır:

a. Robertsonian Translokasyonlar: İki akrosentrik kromozomun füzyonu şeklinde tanımlanmaktadır. En sık görülen durum 13 ile 14 nolu kromozomların birleşmesi şeklindedir. Genel olarak tüm robertsonian translokasyonların % 75' inin D-D grubu kromozomlar arasında olduğu görülmektedir (123).

b. Resiprokal Translokasyonlar: Kromozomlar arasında genetik materyalin karşılıklı olarak değişimini içeren translokasyon tipidir. En sık bildirilen resiprokal translokasyon 11 ile 22 nolu kromozomlar arasında gerçekleşmektedir (113).

c. İntersisyel Translokasyonlar: Bir kromozomda bulunan genetik materyalin başka bir kromozomun uç bölgeleri hariç, kromozom içine entegre olması ile gerçekleşmektedir. Bu translokasyon tipinin diğerlerine oranla nadir görüldüğü bilinmektedir.

Kromozomal açıdan dengeli translokasyon taşıyıcısı ebeveynler, PGT uygulaması için en uygun aday grubunu oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, oosit başına düşen hamilelik oranının % 29' dan % 38' e yükseldiği gösterilmiş ve taşıyıcı ebeveynlerin doğal hamileliklerinde görülen % 92' lik abortus oranının, PGT uygulaması sonrası % 12,5 oranına gerilediği bildirilmiştir (61,83).

Resiprokal ve robertsonian translokasyon taşıyıcısı ebeveynlerden elde edilen embriyoların incelenmesi sonucunda, robertsonian translokasyonlu bireylerin embriyolarının % 21' inin translokasyona % 31' inin sık rastlanan kromozom anomalilerine bağlı olduğu görülmüş ve % 36' sının ise her iki durumu içerdiği tespit edilmiştir (55). Resiprokal translokasyonlu bireylerde, translokasyon nedeniyle anomali saptanan olgular, toplamın % 65' ini oluştururken, sadece % 6 oranında embriyoda sık rastlanan kromozom sayı anomalileri gözlenmektedir ve % 16 oranında her iki sorun birlikte bulunmaktadır. Bu nedenle robertsonian translokasyonlu olgularda, kromozomlar arası etkileşimin önemli bir rolü olduğunu düşünülmekte ve bu çiftlerin kromozomal sayı anomalileri açısından artmış risk içinde olduklarını bildirilmektedir (55).

6. Gonozomal Mozaisizm:

Periferik kanlarında kromozomal mozaiklik bulunan hastaların, eşey hücrelerinde de mozaiklik olabileceği varsayılmaktadır (55). Buna karşıt olarak, yapılan bazı çalışmalar gonozomal mozaisizmin tekrarlayan anöploidiye neden olmadığını belirtmektedir. Annenin neden olduğu trizomi (35/37) olgularını kapsayan bir çalışmada, sonraki hamileliklerinde PGT yapıldığında önceki anomali için artmış riskli bir aile bulunmamıştır (125).

J. Preimplantasyon Genetik Tanı Uygulamasında Etik Durumlar:

European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) grubunun, etik durumlar konusunda yapmış olduğu çalışmaları 2003 yılında yayınlanmıştır. Yapılan çalışmalar, tüm Avrupa ülkelerinde PGT işlemini yapan kurumlara tavsiye niteliğini taşımaktadır. Bunun dışında her ülke PGT ile ilgili olarak, kendi koyduğu kanun ve kuralları uygulamaktadır.

Başlangıç olarak iki ana etik kural bulunmaktadır:

-Gelecek kuşakların teknolojinin zararlı etkilerinden korunması ve çocukların refahının artırılmasıdır.

- PGT uygulaması sırasında, ebeveynlerin karar mekanizmasındaki söz haklarını içermesi. Ebeveynler hem teknik seçimi hem de uygulamanın yapılması konusunda kendi kararlarını verebilmelidirler.

PGT, aileyi tekrarlayan gebelik kurtajları sonucu oluşan psikolojik çöküntüden uzak tutmakta ve etik yönden ailelerin iç huzurlarını korumalarına yardımcı olmaktadır. Aileler, PGT uygulaması ile kendinden sonra gelecek kuşaklara aktaracakları sağlıklı genetik materyalin korunmasını sağlamış olurlar.

IVF siklusu ve PGT uygulamasına karar verilmeden önce, hasta ve uygulayıcı ekip arasında mutlaka bir görüşme-anlaşma olması gerekmektedir ve anlaşamadıkları konularda birbirlerine görüş bildirme hakkına sahiptirler. Klinik yönden bakılacak olursa; PGT işlemine rağmen oluşturulacak çocuk, genetik hastalık açısından çok yüksek risk taşıyorsa uygulayıcı klinik, hastaya PGT uygulama işlemini yapmayabilir. Son karar "paylaşılmış ortaklık" denilen ve merkez ile hasta arasında olması gereken ortak bir karardır. Bu esnekliğin sorumluluğu da, hasta ile ilgilenen kişi tarafında olmalıdır.

1. Güvenlik Durumları:

Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar, embriyodan bir hücre alınmasının canlılığına etkisi olmadığını göstermektedir. Fakat iki hücre alınması ile ilgili henüz yeterli veri elde edilememiş olmasına rağmen, tanının daha doğru olması sağlanmaktadır. PGT uygulanan embriyolardan doğan bebeklerde neonatal problemler veya malformasyonlar açısından artmış risk görülmemektedir.

Ailelerin bilgilendirilmesi, PGT uygulamalarının en önemli kuralıdır. IVF, ovaryum stimülasyonu, etkilenmemiş embriyo elde edilememesi, yanlış tanı açısından PGT yönteminin sınırlılıkları, yetersiz tanı veya şu ana bilinmeyen ancak gelecekteki negatif etkilerinin neler olabileceği konularını kapsayacak şekilde bilgilendirme yapılmalıdır (137).

2. Özel Problemler:

PGT uygulamalarında, önemli bir konu da taşıyıcı embriyoların “öjenik uygulama” adı altında ortadan kaldırılma işlemidir. Diğer yandan ebeveynler, bu embriyolardan olacak çocukların gelecekte kendileri gibi zor bir karar vermek zorunda kalmalarını engellemek için, yerleştirilmelerini istememe hakkına sahip olduklarını düşünmektedir. Bu noktada hastalığın tipi, karar vermede önem teşkil etmektedir. Eğer bir çocuk otozomal resesif hastalık için taşıyıcı konumda ise (Kistik fibrozis gibi), bu çocuğun çocuklarının etkilenme ihtimali yaklaşık % 1 dir. X' e bağlı bir hastalık için (Duchenne Muskuler distrofi gibi) taşıyıcı bir kadının erkek çocukları için % 50 risk bulunmaktadır. PGT sonrası hem sağlıklı hem de taşıyıcı embriyolar varsa, önceliğin sağlıklı embriyolara verilmesi ve taşıyıcı olanların dondurularak saklanması önerilmektedir. Eğer sadece taşıyıcı embriyo elde edilmişse ebeveynler bu embriyoların karşılaşılabilecekleri riskler hakkında bilgilendirilmelidirler. Taşıyıcı embriyoların transferi konusu, özellikle X' e bağlı hastalıklar için çok önemlidir. Sonuç

olarak çiftler, taşıyıcı embriyoların yerleştirilip yerleştirilmeyeceğine kendileri karar vermelidir.

Geç başlangıçlı ve multifaktöriyel hastalıklar, PGT uygulamalarında önemli bir sorunu oluşturmaktadır. Bu hastalıklar için yeni tedavi planlarının bu çocukların doğmasından hastalıklarının ortaya çıkışına kadar olan sürede geliştirilip geliştirilemeyeceği değerlendirilerek, ailelere böyle çocuklara sahip olup olmama hakkına sahip oldukları belirtilmelidir.

PGT, meme kanseri gibi (BRCA) bazı multifaktöriyel durumlar için de kabul edilebilir. PGT uygulamasında tetkiki istenen hastalığın kabul edilmesi, hastalığın şiddeti ve gelecek kuşaklardaki yaşam kalitesine etkisi değerlendirilerek karar verilmelidir. Multifaktöriyel hastalıklar, genetik yapı zemininde gelişebilme riski olan hastalıklar grubudur ve genetik yapıyı taşıyan tüm bireylerde hastalık görülmez. Bu nedenle uygulanacak PGT, gelecekte bir hastalığı geliştirmeyecek bazı embriyoların da yok edilmesine sebep olmaktadır .Bu tarzda bir yaklaşım, daha çok X' e bağlı hastalıklardaki cinsiyet seçimine benzer sorunları akla getirmektedir (137).

Bir başka konu da, embriyolarında geç başlangıçlı bir hastalık için test yaptırmak isteyen ailelerde karşımıza çıkmaktadır. Bu bireyler, yaptırdıkları tetkik için kendilerindeki durumu kesinlikle öğrenmemek isteyebilirler. Bu gibi durumlarda ailenin düşüncesi değerlendirilmeli ve durumları hakkında bilgi kaynağı olabilecek en ufak bir ipucunun verilmesinden bile kaçınılmalıdır. Genetik danışma, PGT sürecinin her aşamasında gerekli bir rutin işlem olmalıdır (108).

3. HLA Uygun Embriyo Amaçlı Preimplantasyon genetik tanı yapılması

Pek çok hastalık için hemopoetik kök hücrelerinin transplantının tedavide tek seçenek olduğu bilinmektedir. Böyle bir hastalık için sağlıklı bir çocuğu olan ebeveynler

planladıkları sonraki çocuklarının, hasta olana hemopoetik kök hücre veya doku vererek yardımcı olmasını istemektedirler. Vericinin uygun olması için, HLA uygun olan ve aynı hastalık açısından sağlıklı olanı embriyo da seçilebilecektir.

Hasta bireyin yaşamının kurtarılması amacıyla yapılan işlem sonundaki yararlar eğer verici çocuğun hayatını tehlikeye sokacak, yenilenemeyen organ hasarı oluşturacaksa, sahip olunmaya çalışılan çocuk için tüm veriler dikkatli bir biçimde sorgulanmalıdır. Bu durum, sadece verici bir çocuk yapmak yerine, zaten bir çocuk sahibi olunmak istenmesi koşulunda kabul edilebilmektedir.

4. Etkilenmiş embriyoların seçimi:

Herhangi bir rahatsızlığı veya bir özrü olan bireyler, aynı durumu gösteren bir çocuğa sahip olmak isteyebilirler (Örnek: Sağırlık). PGT, bu amaçla kullanılabilir teknik yeterliliğe sahiptir, fakat sağlıksız veya benzer rahatsızlığa sahip bir bireyin topluma kazandırılması amacıyla PGT önerilmemektedir.

5. Tıbbi Olmayan Nedenlerle Cinsiyet Seçimi:

Bu konuda oluşturulmuş herhangi bir ortak karar bulunmamaktadır. Bu amaçla yapılan uygulamalar, iki başlık altında toplanmaktadır. Bunlardan ilki tümüyle sadece cinsiyet seçimini diğeri ise aile dengelerinin sağlanması için PGT uygulamalarını içermektedir.

6. Cinsiyet Seçimi ve İnsan Hakları:

Sosyal nedenlerle cinsiyet seçimi, insan haklarının bir konusudur ve uluslar arası kararlar ile ayrımcılığa yol açmaması için engellenmiştir (Universal Declaration of Human Rights, 1948/ European Convention of Human Rights, 1950) (68). Bu

kararlar doğrultusunda, ebeveynlere cinsiyetin kendi başına bir hastalık olmadığı söylenmelidir.

7. Aile Dengesinin Korunması Amacıyla Cinsiyet Seçimi:

Etik durumlar göz önüne alındığında, sadece ailenin bütünlüğünün korunması amacıyla cinsiyet seçimine izin verilmesi gerektiğini savunanlar da vardır. Fakat bu amaçla yaptırılmak istenen PGT, önceki çocuğunun cinsiyeti ile aynı veya her iki cins açısından eşit sayıda çocuğu olan ailelerde kabul edilmemektedir. Bu konu, etik açıdan hala tartışılmaktadır.

BÖLÜM II

GEREÇ-YÖNTEM

A. Olguların Seçimi:

Olgular, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Planlaması ve Kısırlık Araştırma Merkezi'ne 2002-2004 tarihleri arasında başvurular arasından seçilmiştir. Embriyo elde edilme aşamasında IVF veya ICSI yöntemi kullanılmıştır. Çalışma, Ege Üniversitesi Etik Kurulu' tarafından onaylanmıştır. Hazırlanan bilgilendirilmiş onam formları genetik danışmanın anlatımı sonrasında olgular tarafından imzalanmıştır.

Çalışma kapsamına, toplam 20 çiftten elde edilen canlılığını yitirmiş embriyo dahil edilmiş ve bu embriyoların oluşturulması sırasında kullanılan spermleri içeren ejakulat sıvıları incelemeye alınmıştır.

Fertilizasyon sonrası üçüncü günü ve sonrası bölünme aşamasında durmuş (arrest olarak değerlendirilen) embriyolar blastomer biyopsisi için ayrılmıştır.

B. Blastomer biyopsisi

Mekanik parçalama, lazer biyopsi veya asid tyrode's (pH: 2,4) yöntemlerinden uygun olanı ile gerçekleştirilmiştir. Embriyolar için kullanılan biyopsi ortamı, Ca-Mg içermeyen fosfat-buffer tuzu (PBS) ve % 0,4' lük serum albumin içermektedir.

C. Blastomer Fiksasyonu

Kullanılan Malzeme Listesi:

- Mikroskop lamları
- Ependorf tüpleri
- Cam pastör pipetler
- Alev kaynağı
- Ağız pipeti
- Cam işaretleyici
- Metanol (Merck)
- Glacial asetik asit (Merck)
- Steril dH₂O
- HCl (Merck)
- Tween 20 (T20) (Merck)
- Inverted Mikroskop (Olympus CK40)

Metot:

1. Fiksatif solüsyonu (Methanol:Asetik asit-3:1), kullanımdan önce hazırlandı ve -20°C' de saklandı.

2. Alev kaynağı kullanarak yaklaşık 6 ul iç çaplı pipetler yapıldı.
3. Lamlar fiksatif solüsyonu ile temizlendi.
4. Lam arka yüzüne cam işaretleyici ile daire çizildi.
5. Pipet ile aspire edilen blastomer, lam üzerine alındı.
6. HCI-T20 solüsyonu, hücre membranının parçalanması amacıyla lam üstüne damlatıldı.
7. Blastomer membranının parçalanmasıyla nukleus görülür hale geldi.
8. Görünür hale gelen nukleus üzerine, kurumaya yakın fiksatif solüsyonu eklendi.
9. Sitoplazmayı ortamdan tümüyle uzaklaştırıncaya kadar fiksatif solüsyonu damlatıldı.
10. Fikse olmuş blastomerin etrafı cam işaretleyici ile işaretlendi ve kullanımına kadar oda sıcaklığı veya +4 °C' de bekletildi.

D. Prob Uygulaması ve Hibridizasyon

Kullanılan Malzeme Listesi

- Termal Plate (HyBrite-Vysis,US)
- İnkübatör (Heraus)
- Mikrosantrfüj (Eppendorf)
- Vortex
- 1-10 ul mikropipet (Eppendorf)
- 18x18 lamel (Isolab)
- Parafilm (3M)

- Direkt İşaretli prob (MultiVysion PB, Vysis, US); Problara ait ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir:

- o LSI 13: RB1 geni, Lokalizasyon; 13q14
- o LSI 21: D21S59, D21S341ve D21S342, Lokalizasyon; 21q22.13-q22.2
- o CEP 18: D18Z, Lokalizasyon;18p11.1-q11.1
- o CEP X: DXZ1, Lokalizasyon; Xp11.1-q11.1
- o CEP Y: DYZ3, Lokalizasyon ; Yp11.1-q11.1

Metot:

1. MultiVysion PB problemleri, saklanma koşulu olan -20°C' den çıkarıldı.
2. Hybrite cihazı nemli ortam sağlamak üzere ıslak kağıt havlu ile desteklendi
3. Hybrite cihazı 37°C' ye getirildi.
4. Çalışma problemleri, 37°C' ye gelmesi için inkübatöre yerleştirildi.
5. 2-3 ul prob, lam üzerindeki işaretli bölgeye mikropipet aracılığıyla yerleştirildi.
6. Uygun boyutta kesilmiş lamel, prob üstüne kapatıldı.
7. Lam, parafilm ile kapatıldı
8. Lamlar, Hybrite cihazına yerleştirildi
9. 73°C' de 5 dakika denaturasyon ve 37°C' de üç buçuk saat hibridizasyon programı uygulandı.

E. Yıkama ve Zıt Boyama

Kullanılan Malzeme Listesi

- Su banyosu (Nüve)

- Dik şale
- Lamel (24x60, Isolab)
- 1-10 ul mikropipet (Eppendorf)
- Civalı Termometre
- 20xSSC (Vysis,US)
- NP40 (Vysis,US)
- Antifade solüsyon (Vysis,US)

Metot:

Yıkama Solüsyonu I: (0,4xSSC / % 0,3 NP40) pH:5,3 (NaOH ile ayarlandı)

Yıkama Solüsyonu II: (2xSSC / % 0,1 NP40) pH:5,3 (NaOH ile ayarlandı)

1. Yıkama solüsyonu I, dik şale içinde 73°C' ye ayarlanmış su banyosu içine yerleştirildi, ısı termometre ile kontrol edildi.
2. Lam üzerindeki parafilm uzaklaştırıldı ve lam yıkama solüsyonu içinde 5 dakika süreyle bırakıldı
3. Ardından, yıkama solüsyonu II içinde 30 saniye bekletilen lamlar, saf sudan geçirilerek kuruması için karanlık ortama bırakıldı.
4. Kuruyan lamlar üzerinde işaretli bölgeye, 3 µl Antifade solüsyon mikropipet aracılığıyla damlatıldı
5. Üstüne lamel kapatılan lam, mikroskopta izleninceye kadar +4°C' de bekletildi.

F. Değerlendirme:

1. Değerlendirme işlemi floresan mikroskopta (Olympus BX50), uygun filtre seti ile (DAPI; Spectrum Blue; Gold; Aqua; FITC; Texas Red), eş zamanlı olarak iki kişinin incelemesiyle tamamlandı.
2. Her embriyo için Image Analysis (Applied Imaging System) sistemi kullanılarak fotoğraf çekildi.

G) Sperm Eldesi:

ICSI yapılacak infertil erkeklerden masturbasyon yoluyla elde edilen spermatozoidler:

1. 37 °C etüvde çözünme (likefaksiyon) sürecini tamamlaması için bırakıldı.
2. Likefaksiyon sürecini tamamlamış spermatozoidler, 10 cc Ham's F10 ile yıkandı.
3. Canlılığını koruyan spermatozoidlerden uygun olanı, ICSI prosedürü için ayrıldı.
4. ICSI sonrası geriye kalan spermatozoidler, FISH analizi ve apoptozis incelemesi için genetik laboratuvarına iletildi.

H) Spermatozoidlerin Analize Hazırlanması:

1. Elde edilen spermatozoidler 15 ml lik Falcon Tüplere alındı.
2. Her bir tüp içinde bulunan spermatozoidler, 10 cc fosfat buffer solüsyon ile yıkandı.
3. Yıkaması yapılan spermatozoidlere, 1100 rpm de 10' santrifüj yapıldı.
4. Süpernatant, pastör pipetler yardımıyla uzaklaştırıldı
5. Pellet üzerine 10 cc 0.75 M KCl çözeltisi (hipotonik) eklendi.
6. 37 °C lik etüvde 20' bekletildi.
7. 1100 rpm de 10' santrifüj yapıldı.
8. KCl içeren süpernatant uzaklaştırıldı.

9. Pellet üzerine taze hazırlanmış 10 cc Karnoy fiksativ (3:1 metanol/asetik asit, Merck) damla damla eklendi.
10. 30' +4 °C de buzdolabında bekletildi.
11. 1100 rpm de 10' santrifüj yapılarak, süpernatant uzaklaştırıldı.
12. Pellet üzerine 10 cc taze fiksativ eklendi.
13. 1100 rpm de 10' santrifüj yapıldı, süpernatant uzaklaştırıldı.
14. Pellet üzerine 10 cc taze fiksativ eklendi, çalışması yapılacak zamana kadar -18 °C de bekletildi.

I) Sperm FISH Çalışması

Bu çalışmada X, Y ve 18 nolu kromozomlar için sayısal anomalilerin araştırılması planlandı. Bu amaçla FISH probları (Vysis Aneuvysion, IL USA) temin edildi. Problara ait ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir:

CEP 18: D18Z, Lokalizasyon;18p11.1-q11.1

CEP X: DXZ1, Lokalizasyon; Xp11.1-q11.1

CEP Y: DYZ3 Yp11.1-q11.1

Metot:

1. Fiksativte bekleyen spermatozoidler 1100 rpm de 10' santrifüj yapıldı.
2. Supernatant atıldı, pellet taze hazırlanmış fiksativ ile yıkandı.
3. 1100 rpm de 10' çevrildi, süpernatant atıldı, pellet homojenize edildi.
4. Önceden temizlenmiş ve – 18 °C de bekletilen lamalar (Superfrost) üzerine birer damla sperm süspansiyonu damlatıldı.
5. Lamaların kurumasından sonra 37 °C de, 2xSSC solüsyonunda 30' bekletildi.
6. SSC den çıkan lamalar saf su ile yıkandı.
7. 25 mmol/L dithiothreitol içeren 1 mol/L Tris-HCl (pH9,5) çözeltisi içinde 5' bekletildi.

8. Lamlar 2xSSC de 5' bekletildi.
9. Lamlar PBS te 5' bekletildi.
10. % 70, % 85 ve % 100 lük alkol serilerinde üçer dakika tutuldu.
11. Lamlar, kuruması için oda ısısında bırakıldı.
12. Kuruyan lamlar üzerine X, Y ve 18 nolu kromozomlara ait 5 µl prob karışımı kondu (Vysis Inc, Downer Groove II,USA).
13. Prob, lamel ile kapatılıp etrafı parafilm (3M,USA) ile kaplandı.
14. Lamel, Hybrite cihazına yerleştirilerek, aşağıdaki protokol uygulandı.
15. 73 °C 5' denatürasyon ; 37 °C tüm gece boyunca nemli ortamda hibridizasyona bırakıldı.
16. Ertesi gün lameller, lam üzerinden uzaklaştırılıp hibridizasyon sonrası yıkama işlemine alındı.
17. İlk olarak 73 °C de %0,3 lük NP40 ın 0,4xSSC çözeltisi içinde 5' yıkandı.
18. Oda sıcaklığında % 0,1 lik NP40 ın 2xSSC çözeltisi içinde 30'' yıkandı.
19. Saf sudan geçirilen lamlar, kuruması için karanlık alanda en az 15' bekletildi.
20. Kuruyan lamlar üzerine 10 µl DAPI (Vysis, Inc, Downer Groove II,USA) damlatılıp lamel ile kapatıldı.
21. Flüoresan eklentili mikroskopta, FITC; Red, Aqua ve DAPI filtreleri eşliğinde en az 200 hücre sayıldı (FITC: X kromozomu; Red: Y kromozomu; Aqua: kromozom 18 ve DAPI: antifade)

J) Apoptosis Analizi

Metot:

1. Pellet içindeki spermatozoidler üzerine 10 cc PBS eklendi.
2. +4 °C ve 1100 rpm de 10' santrifüjlenerek, süpernatant atıldı.

3. 1 ve 2 nolu işlemler tekrarlandı.
4. Pellet 0,5 cc PBS ile dilüe edildi.
5. Pelletten pastör pipeti yardımıyla birer damla hücre süspansiyonu alındı, bu süspansiyon lam (Superfrost) üzerine yayıldı.
6. Lamlar, cam şale içindeki % 4 lük methanolsüz formaldehidin PBS içindeki (pH 7.4) çözeltisinde +4 °C de 25' bekletildi.
7. Lamlar, PBS içinde 5' yıkandı.
8. Hücreleri geçirgen hale gelmesi için % 0,2 Triton X-100 in PBS içindeki çözeltisinde 5 ' bekletildi.
9. Ardı sıra iki kez oda sıcaklığındaki PBS içinde beşer dakika yıkama işlemi yapıldı.
10. Lamlar kurutulduktan sonra, 100 µl equilibration buffer lam üzerine eklendi ve 5-10' bekletildi.
11. Nükleotid karışımı, buz üzerinde erimeye bırakıldı ve yeterli miktarda rTdT inkübasyon tamponu her bir örnek için aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

rTdT inkübasyon tamponu:

- Equilibration buffer: 45 µl
- Nükleotid karışımı 5 µl
- rTdT enzimi 1 µl

12. 5-10' sonunda, lamlarda bulunan fazla sıvı alındı ve yerine nükleotid karışımı eklendi ve üzerine lamel kapatıldı.
13. 37 °C nemli etüvde 60' bekletildi.
14. Oda sıcaklığındaki 2xSSC içinde, reaksiyonun durması için 15' bekletildi.
15. Lamlar PBS içinde 5' yıkandı ve işlem 3 kez daha tekrar edildi.

16. Lamlar, 1 µg/ml olacak şekilde hazırlanmış propidium iodid (Sigma Cat No:P4170) solüsyonu içinde 15' bekletildi.
17. Lamlar iki kez saf su içinde yıkandı.
18. Lamların kurumasından sonra flüoresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm), kırmızı (620 nm) ve DAPI (460 nm) filtreleri ile inceleme yapıldı.

K) İstatistik analizi

Gruplar arasındaki ilişkinin gösterilmesi için non-parametrik regresyon, X^2 analizi uygulanmıştır. Çalışmada SPSS V.11 (Windows XP için) paket programı kullanılmış olup istatistiksel olarak anlamlı kabul etmek için $p < 0,05$ değeri kabul edilmiştir.

BÖLÜM III

BULGU VE SONUÇLAR

Çalışmaya, IVF ile oluşturulmuş toplam 20 adet gelişimi durmuş embriyo dahil edildi. İncelenen embriyoların anne adaylarının yaş ortalaması $30,80 \pm 6,246$ (min: 20, max:41); baba adaylarının yaş ortalaması $35,20 \pm 6,502$ (min: 20, max:47) olarak bulundu. Ebeveynlerin yaşları Tablo.1 de özetlendi.

Tablo.1 Ebeveynlerin yaşları ve yaş ortalamaları

Embriyo No	Anne yaşı	Baba yaşı
1	23	32
2	40	41
3	23	37
4	26	29
5	22	29
6	26	27
7	32	35
8	30	32
9	27	34
10	39	44
11	41	47
12	25	25
13	31	36
14	28	29
15	29	32
16	34	35
17	27	30
18	38	43
19	40	45
20	35	42
Ortalama	$30,80 \pm 6,246$	$35,20 \pm 6,502$

İncelenen embriyoların ebeveynlerinin önceki hamilelikleri sorgulandığında iki çiftin farklı eşlerinden sağlıklı çocukları olduğu, üç çiftin ikişer adet düşükleri olduğu görüldü. Çiftlerin on birinde (% 55) daha önce IVF denenmişti. Düşük ortalamasının

0,30 ± 0,733; önceki IVF deneme sayı ortalamasının 0,95 ± 1,356 olduğu görüldü.

Çalışmada incelenen ebeveyleer arasında sadece bir ailede (% 5) eşler arasında akrabalık bulunmaktaydı (16 no'lu embriyo ebeveyni). Çalışmaya alınan çiftlerin önceki gebelikleri, IVF denemeleri, düşükleri ve bunlara ait ortalamaları Tablo.2 de özetlenmiştir.

Tablo.2 Önceki gebelik, düşük ve IVF denemeleri

Embriyo No	Canlı çocuk sayısı	Önceki gebelik sayısı	Düşük sayısı	Önceki IVF sayısı
1	0	0	0	1
2	0	2	2	1
3	0	2	2	1
4	0	0	0	1
5	0	0	0	1
6	0	0	0	1
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	1
10	0	0	0	0
11	0	0	0	5
12	0	0	0	0
13	2*	2	0	0
14	0	0	0	4
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	1
18	0	2	2	2
19	0	0	0	0
20	1*	3**	0	0
Ortalama			0,30 ± 0,733	0,95 ± 1,356

* Önceki evlilik, **2 küret, 1 doğum

Gelişimi durmuş 20 embriyonun ebeveynlerin IVF merkezine başvuru nedenleri incelendiğinde toplam 24 endikasyon (bazı olgularda birden fazla endikasyon vardı) olduğu görüldü. Bu endikasyonlar görülme sıklığına göre androlojik

(13/24); düşük oogenez cevabı (4/24); nedeni belirlenemeyen infertilite (idiyopatik) (3/24); ileri anne yaşı (1/24); genital tüberküloz (1/24); tubal nedenler (1/24) ve tekrarlayan IVF denemesi (1/24) şeklinde sıralanmaktadır. Tüm olgularda spermogram yapılmıştı. Olguların, IVF merkezine başvurma nedenleri ve spermogramları Tablo.3 te verilmiştir

Tablo. 3 Olguların IVF Merkezine Başvurma Nedenleri ve Spermogram Sonuçları

Embriyo No	İnfertilite Nedeni	Spermogram Sonuçları
1	Androlojik	Oligospermi
2	Androlojik+Düşük oogenez cevabı	Azospermi
3	Tubal	Normal
4	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi (OAT)
5	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi
6	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi
7	Androlojik	Şiddetli
8	Düşük oogenez cevabı	Azospermi
9	İdiyopatik	Normal
10	İdiyopatik	Normal
11	İleri anne yaşı, Genital Tüberküloz, Tekrarlayan IVF denemesi	Normal
12	Androlojik	Oligospermi
13	İdiyopatik	Normal
14	Androlojik+Düşük oogenez cevabı	Teratospermi
15	Androlojik	Oligospermi
16	Androlojik	Teratospermi
17	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi
18	Androlojik	Oligospermi
19	Düşük oogenez cevabı	Normal
20	Androlojik	Oligoteratospermi

Olguların embriyolarının incelemesinin yapıldığı siklustaki tüm embriyolar dikkate alındığında aile başına elde edilen ortalama embriyo sayısının $6,75 \pm 3,89$ ve canlı kalan embriyo ortalamasının $3,60 \pm 2,437$ olduğu görüldü. Siklusta elde edilen embriyo sayısı ile bu embriyolarda gözlenen canlı kalma oranları arasında non-parametrik regresyon uygulanmış olup istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır ($R:0,579$; $p<0,05$). Yani bir siklusta ne kadar çok embriyo elde edildiyse, canlı kalma oranı da o kadar yüksek oluyordu. Embriyo sayı ve canlılığı ile ilgili sonuçlar ve siklusta elde edilen embriyo sayısı ile bu embriyolarda gözlenen canlı kalma oranlarının karşılaştırılması Tablo.4 te özetlenmiştir.

Tablo. 4 Embriyo İncelemesinin Yapıldığı Siklusta Elde Edilen Embriyo Sayıları ve Embriyo Canlılık Oranları

Embriyo No	Siklusta elde edilen embriyo sayısı	Canlı embriyo sayısı	Canlı embriyo oranı
1	7	6	% 85
2	2	1	% 50
3	6	0	% 0
4	4	2	% 50
5	17	6	% 35
6	9	5	% 55
7	7	5	% 71
8	5	3	% 60
9	9	7	% 78
10	6	3	% 50
11	8	7	% 87
12	5	3	% 60
13	9	3	% 33
14	4	3	% 75
15	9	4	% 44
16	1	0	% 0
17	13	7	% 54
18	2	0	% 0
19	3	1	% 33
20	10	6	% 60
Ortalama	6,75 ± 3,89	3,60 ± 2,437	% 49
R: 0, 579 (p<0,05)			

Anne ve baba yaşının embriyoların canlı kalma oranları üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmış ve sonuçlar anlamlı bulunmamıştır (R:0,261, $p>0,05$); R:0,197, $p>0,05$). Sonuçlar Tablo. 5 te verilmiştir.

Tablo.5 Anne ve Baba Yaşının Canlı Embriyo Oranları ile Karşılaştırılması

Embriyo No	Anne yaşı	Baba yaşı	Canlı embriyo oranı
1	23	32	% 85
2	40	41	% 50
3	23	37	% 0
4	26	29	% 50
5	22	29	% 35
6	26	27	% 55
7	32	35	% 71
8	30	32	% 60
9	27	34	% 78
10	39	44	% 50
11	41	47	% 87
12	25	25	% 60
13	31	36	% 33
14	28	29	% 75
15	29	32	% 44
16	34	35	% 0
17	27	30	% 54
18	38	43	% 0
19	40	45	% 33
20	35	42	% 60
Ortalama	30,80 ± 6,246 R: 0,261 (p>0,05)	35,20 ± 6,502 R: 0,197 (p>0,05)	% 49

Ebeveynlerde görülen spontan abortus oranı ile incelenen siklusta elde edilen canlı embriyo oranı karşılaştırılmış ve spontan abortus olanlarda canlı embriyo oranının anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür (R: - 0,386, p<0,05). Sonuçlar Tablo.6 da verilmiştir.

Tablo.6 Spontan Abortus Sayısı ile Canlı Embriyo Oranları, Ortamlalar ve Oranların Karşılaştırılması

Embriyo No	Spontan Abortus Sayısı	Canlı embriyo oranı
1	0	% 85
2	2	% 50
3	2	% 0
4	0	% 50
5	0	% 35
6	0	% 55
7	0	% 71
8	0	% 60
9	0	% 78
10	0	% 50
11	0	% 87
12	0	% 60
13	0	% 33
14	0	% 75
15	0	% 44
16	0	% 0
17	0	% 54
18	2	% 0
19	0	% 33
20	0	% 60
Ortalama	0,30 ± 0,733	% 49 R: - 0,386 (p<0,05)

Gelişimi durmuş embriyoların beş kromozom için 13,16,18,21 ve 22 problemleri (Vysis, US) kullanılarak FISH analizi ve anöploidi değerlendirilmesi yapıldı.

Embriyoların her birinin 0 ile 5 kromozomu ilgilendiren anomali taşıyabildiği görüldü.

Embriyo başına düşen anomali ortalaması $1.85 \pm 1,599$ olarak bulundu. Tüm

embriyolarda toplam 37 adet anomali tespit edildi. En sık rastlanan anomali grubunun monozomi olduğu (27/37) görüldü. Bunun dışında 7 embriyoda tetrazomi; 2 embriyoda trizomi ve 1 embriyoda nullizomi bulunduğu saptandı. Embriyolara ait anomaliler ve anomali sayıları ve ortalama Tablo. 7 de, embriyolardan elde edilen FISH görüntüleri Resim.1 de gösterilmiştir.

İncelenen kromozomlar açısından yapılan dağılımda en sık 18 nolu kromozoma ait anomalilerin bulunduğu (% 80) görüldü. Diğer kromozomlar için (13,16, 21, 22) anomaliler toplamın % 20 sini oluşturmaktaydı.

Tablo. 7 Embriyolara Ait Anomaliler ve Anomali Sayıları ve FISH Anomali Ortalaması

Embriyo No	Embryo FISH Anomali Sayısı	Embryo FISH Sonuç
1	1	Mon 16
2	0	Normal
3	2	Mon 18, Mon 22
4	5	Haploidi
5	0	Normal
6	5	Tetraploidi
7	1	Trizomi 21
8	1	Mon 18
9	4	Mon 16, mon 18, mon 21, mon 22
10	0	Normal
11	0	Normal
12	2	Mon 13, Mon 16
13	2	Mon 16, Trizomi 18
14	1	Nullizomi 16
15	4	Mon 13, mon 18, mon 21, mon 22
16	2	Mon 18, Mon22
17	1	Mon 16
18	2	Tetrazomi 13, tetrazomi 18
19	1	Mon 22
20	3	Mon 13, mon 18, mon 21
Ortalama	1,85 ± 1,599	Normal: % 20 ; Anomalili: % 80

Embriyo FISH anomali sayısı ile babalarda gözlenen spermogram anomalilerinin derecesine göre normalden ağıra doğru (normal, teratospermi, oligospermi, oligoastenospermi, oligoastenoteratospermi, ve azospermi) şeklinde sıralanmıştır (111). Bu sıralama ile embriyo FISH anomali sayısı arasında regresyon uygulanmış olup aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur (X^2 : 3572, $p < 0,05$). Karşılaştırmalı tablo ve değerlendirme Tablo.8 ve Tablo. 9 da verilmiştir.

Tablo.8 Embriyo FISH Anomali Sayısı ve Spermogram Sonuçları

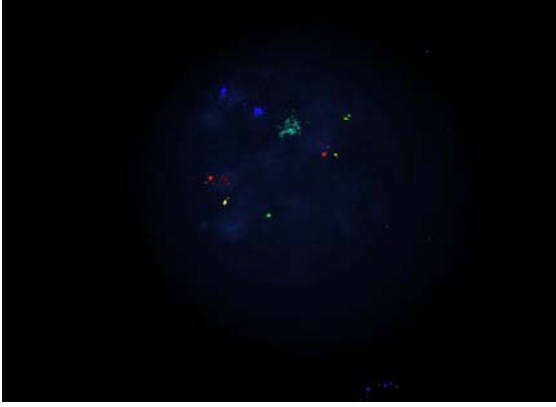
Embriyo No	Embryo FISH Anomali Sayısı	Spermogram Sonuçları
1	1	Oligospermi
2	0	Azospermi
3	2	Normal
4	5	Oligoasthenoteratospermi
5	0	Oligoasthenoteratospermi
6	5	Oligoasthenoteratospermi Şiddetli
7	1	Azospermi
8	1	Normal
9	4	Normal
10	0	Normal
11	0	Normal
12	2	Oligospermi
13	2	Normal
14	1	Teratospermi
15	4	Oligospermi
16	2	Teratospermi
17	1	Oligoasthenoteratospermi
18	2	Oligospermi
19	1	Normal
20	3	Oligoteratospermi
Ortalama	1,85 ± 1,599	

Tablo.9 Spermogram Şiddetine Göre Embriyo FISH anomali Değerlendirmesi

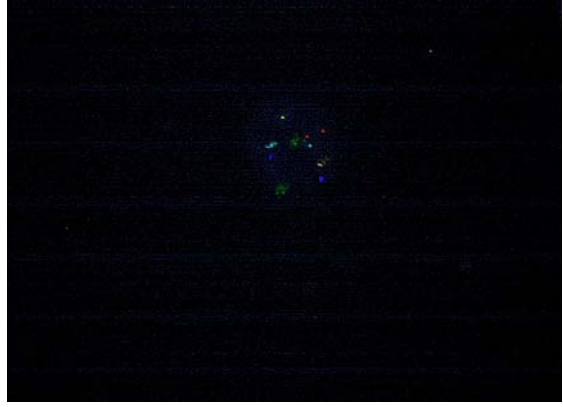
Spermogram Kod	Ortalama	N	Standart Sapma
Azospermi	4,9333	2	4,96622
Oligoasthenoteratospermi, Oligoteratospermi	18,2500	5	12,17005
Oligospermi	10,3250	4	6,16462
Teratospermi	12,0000	2	14,99066
Normal	8,1000	7	8,28895
Toplam	10,4900	20	9,24172

χ^2 : 3572, ($p < 0,05$)

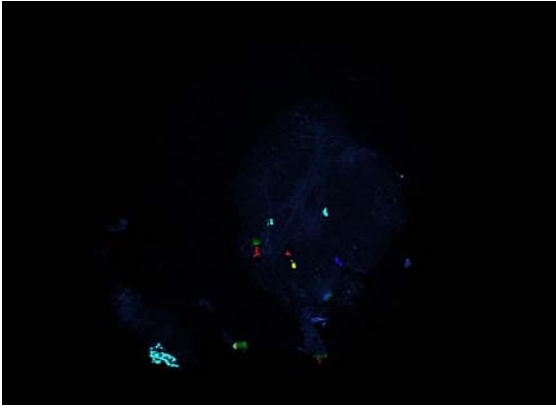
Resim.1 Embriyo FISH görüntüleri



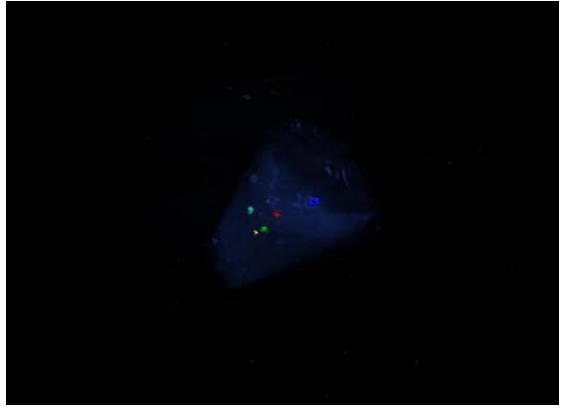
Embriyo No: 1



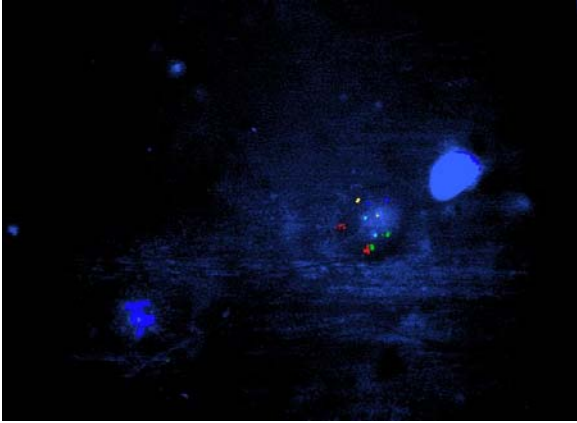
Embriyo No: 2



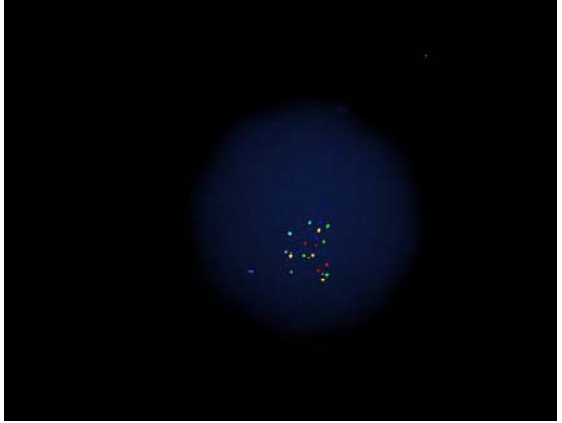
Embriyo No: 3



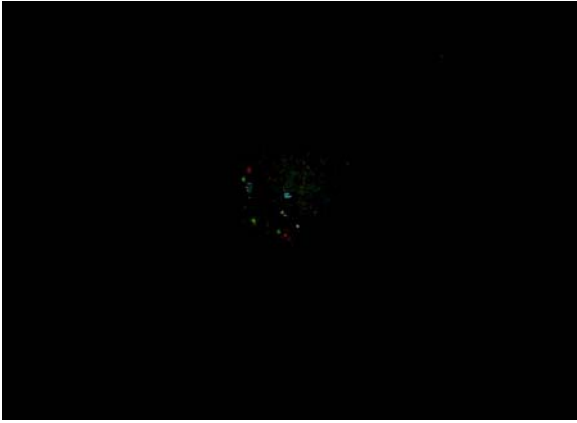
Embriyo No: 4



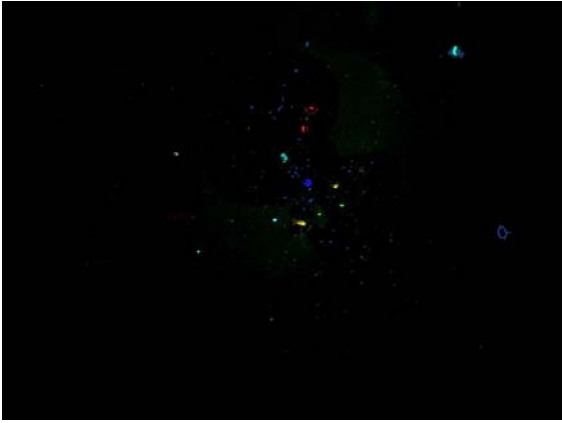
Embriyo No: 5



Embriyo No: 6



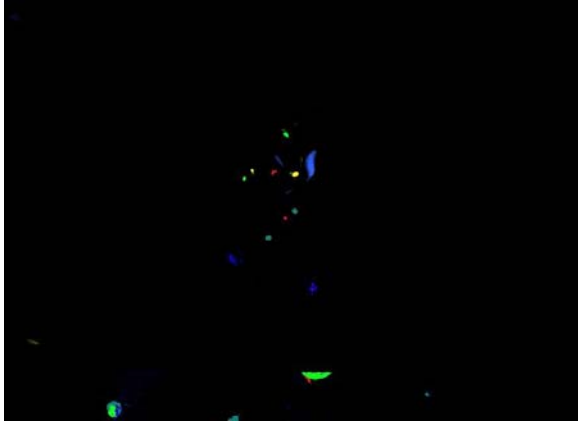
Embriyo No: 7



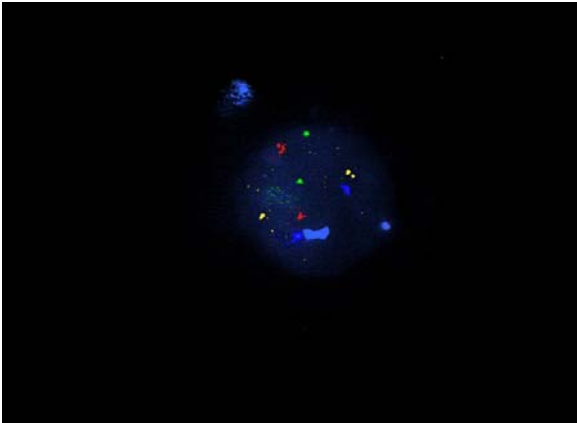
Embriyo No: 8



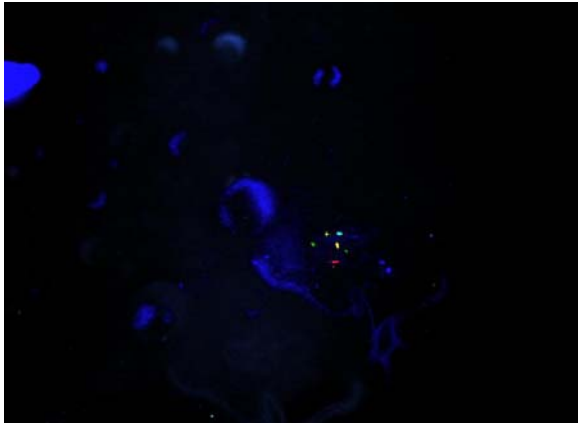
Embriyo No: 9



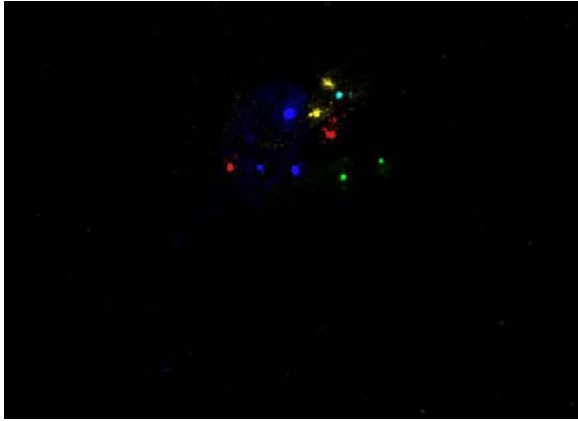
Embriyo No: 10



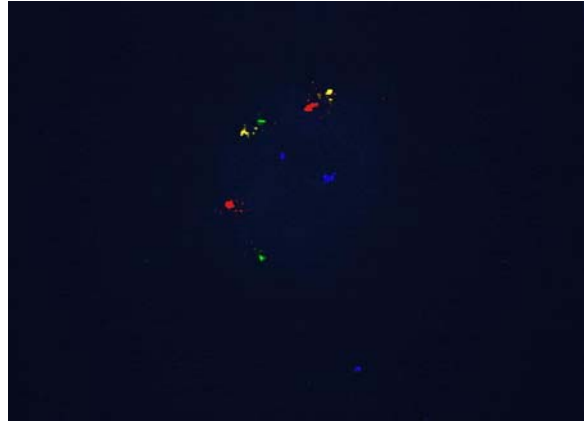
Embriyo No: 11



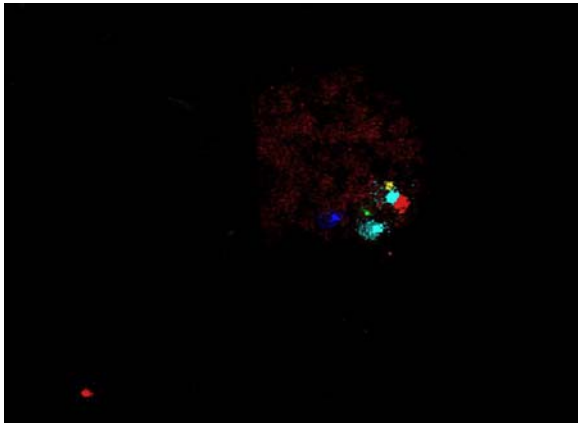
Embriyo No: 12



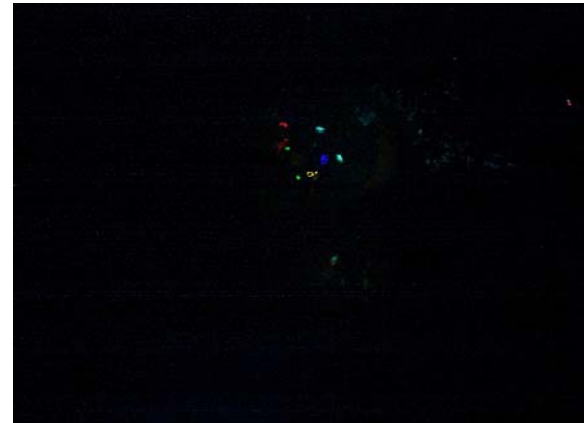
Embriyo No: 13



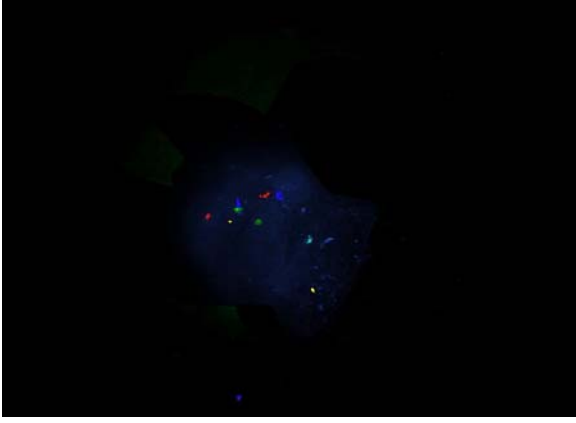
Embriyo No: 14



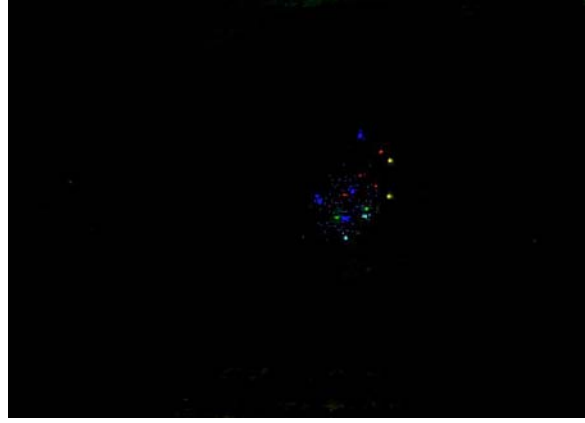
Embriyo No: 15



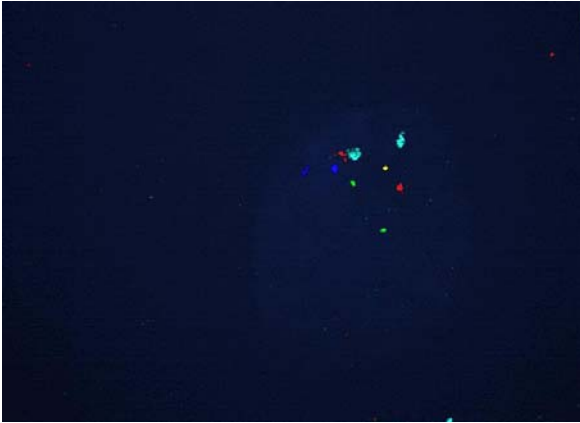
Embriyo No: 16



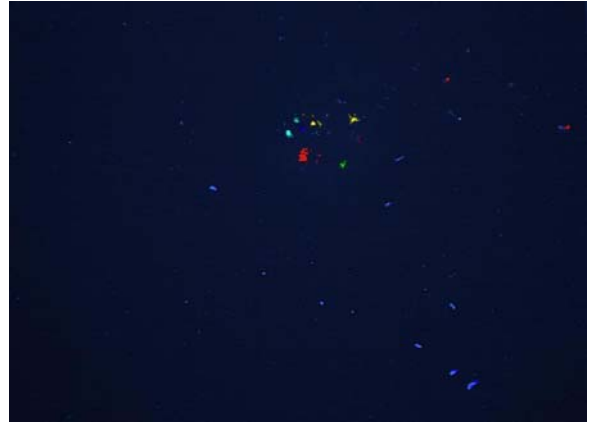
Embriyo No: 17



Embriyo No: 18



Embriyo No: 19



Embriyo No: 20

Resim Açıklaması: Kullanılan problara ait renkler, resimde aşağıda belirtildiği gibidir:

Texas Red (kırmızı): Kromozom No. 13

Aqua (Açık mavi): Kromozom No. 16

Spectrum Blue (mavi): Kromozom No. 18

FITC (yeşil): Kromozom No.21

Gold (sarı): Kromozom No. 22

Anne ve baba yaşı ile embriyo FISH anomali sayısı arasında lineer regresyon uygulanmış olup anlamlı ilişki bulunmamıştır (R: 0,362;p>0.05 / R:0.392;p>0.05) .

Sonuçlar Tablo. 10 da sunulmuştur.

Tablo. 10 Embriyo FISH Anomali Sayısının Anne ve Baba Yaşıyla Karşılaştırılması

Embriyo No	Anne yaşı	Baba yaşı	Embriyo FISH Anomali Sayısı
1	23	32	1
2	40	41	0
3	23	37	2
4	26	29	5
5	22	29	0
6	26	27	5
7	32	35	1
8	30	32	1
9	27	34	4
10	39	44	0
11	41	47	0
12	25	25	2
13	31	36	2
14	28	29	1
15	29	32	4
16	34	35	2
17	27	30	1
18	38	43	2
19	40	45	1
20	35	42	3
Ortalama	30,80 ± 6,246	35,20 ± 6,502	1,85 ± 1,599
	R: 0,362 (p>0.05)	R:0.392 (p>0.05)	

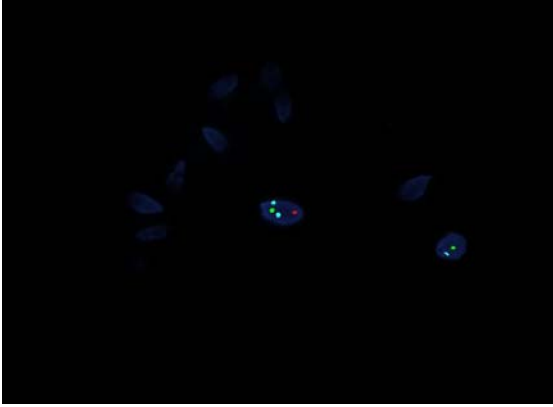
Sperm-FISH sonuçları:

İncelemesi yapılan embriyoların babalarından elde edilen spermlere X, Y, 18 nolu kromozom problemleri ile FISH analizi uygulandı. Spermlerde aynı kişide birden fazla sayıda farklı anomaliler bir arada bulunduğu için bu anomalilerin çeşidi ayrı ayrı verilmemiştir. Sadece anomalileri gösteren (anomali cinsi ne olursa olsun) spermlerin yüzdesi verilmiştir. Olgularda saptanan Sperm FISH anomali yüzdeleri ve spermiogram Tablo. 11 de özetlenmiştir. Sperm FISH örnekleri ile elde edilen bazı örnekler Resim. 2 de gösterilmiştir. Çalışma sonucuna göre ortalama sperm-FISH anomali yüzdesi $\% 10 \pm 11,965$ olarak tespit edildi.

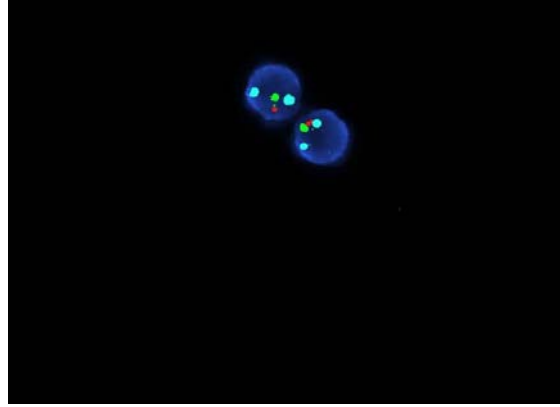
Tablo. 11 Sperm-FISH Anomali Yüzdeleri ve Spermiogram Sonuçları

Embriyo No	Sperm FISH Anomali (%)	Spermiogram Sonuçları
1	26	Oligospermi
2	2	Azospermi
3	6	Normal
4	6	Oligoasthenoteratospermi (OAT)
5	47	Oligoasthenoteratospermi
6	22	Oligoasthenoteratospermi Şiddetli
7	1	Azospermi
8	0	Normal
9	20	Normal
10	2	Normal
11	6	Normal
12	0	Oligospermi
13	1	Normal
14	7	Teratospermi
15	7	Oligospermi
16	5	Teratospermi
17	9	Oligoasthenoteratospermi
18	7	Oligospermi
19	2	Normal
20	24	Oligoteratospermi
Ortalama	10 ± 11,965	

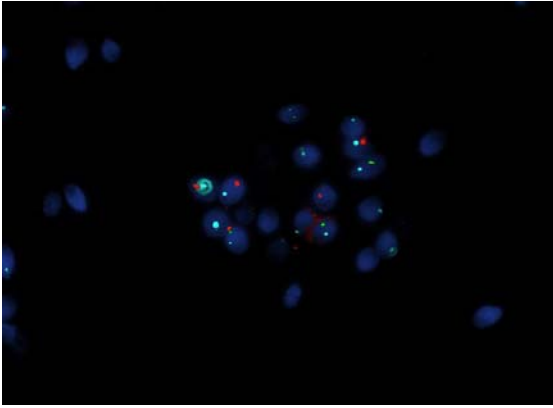
Resim.2 Sperm-FISH görüntüleri



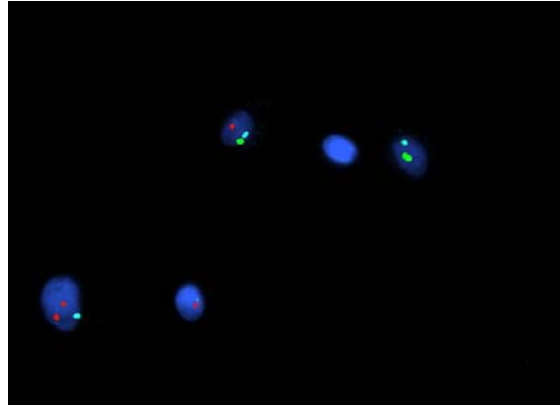
Diploid ve Normal Sperm



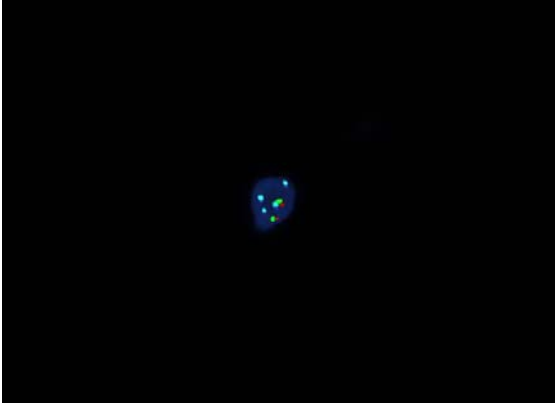
Diploid Sperm



Normal Sperm



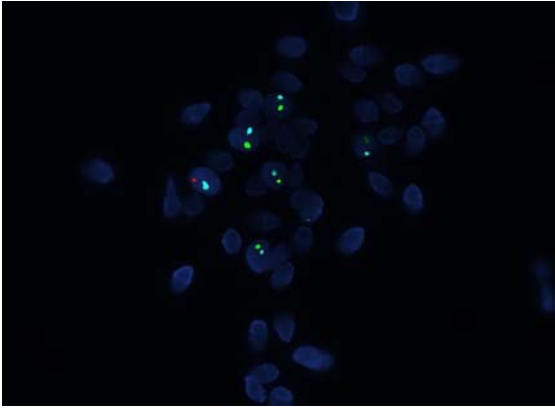
XY, YY ve Normal Sperm



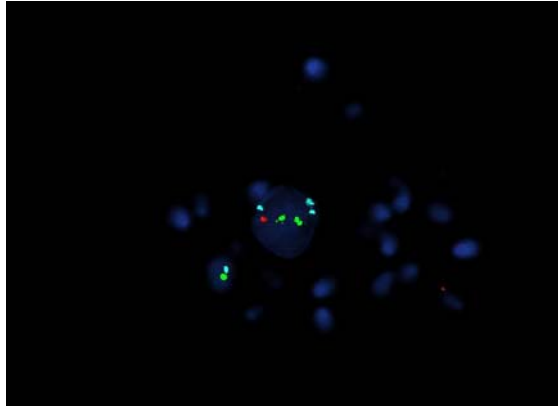
Tetraploid Sperm



XYY,+18 Sperm



Normal Spermler



Triploid ve Normal Spermler

Sperm FISH sonuçları ile önceki IVF deneme sayısı arasında non-parametrik regresyon uygulanmış olup anlamlı sonuç elde edilmiştir (R: 0,380; $p < 0,05$).

Karşılaştırma Tablo.12 de gösterilmiştir.

Tablo. 12 Sperm FISH anomalisi ile Önceki IVF Deneme Sayısının Karşılaştırılması

Embriyo No	Sperm FISH anomalisi (%)	Önceki IVF sayısı
1	26%	1
2	2%	1
3	6%	1
4	6%	1
5	47%	1
6	22%	1
7	1%	0
8	0%	0
9	20%	1
10	2%	0
11	6%	5
12	0%	0
13	1%	0
14	7%	4
15	7%	0
16	5%	0
17	9%	1
18	7%	2
19	2%	0
20	24%	0
Ortalama	10 ±11,965 R: 0,380, (p<0,05)	0,95 ± 1,356

Sperm FISH anomalisi oranlarının embriyo canlılık oranlarına olan etkisi araştırılmış olup istatistiksel anlamlı sonuç elde edilmemiştir (R: 0,132; $p>0,05$). Sonuçlar, Tablo.13 te gösterilmiştir.

Tablo. 13 Sperm FISH Anomali Oranlarının Embriyo Canlılık Oranlarına Etkisi ve Ortalamalar

Embriyo No	Baba yaşı	Sperm FISH anomali (%)	Canlı embriyo oranı
1	32	26%	% 85
2	41	2%	% 50
3	37	6%	% 0
4	29	6%	% 50
5	29	47%	% 35
6	27	22%	% 55
7	35	1%	% 71
8	32	0%	% 60
9	34	20%	% 78
10	44	2%	% 50
11	47	6%	% 87
12	25	0%	% 60
13	36	1%	% 33
14	29	7%	% 75
15	32	7%	% 44
16	35	5%	% 0
17	30	9%	% 54
18	43	7%	% 0
19	45	2%	% 33
20	42	24%	% 60
Ortalama	35,20 ± 6,502	10 ±11,965 R: 0,132 (p>0,05)	% 49

Sperm Apoptozis Sonuçları:

Baba adaylarından elde edilen spermelerde apoptozis değerlendirmesi için TUNEL testi uygulandı. Olgulardan elde edilen spermelere uygulanan TUNEL test sonucuna göre ortalama apoptozis oranı % 10,490 ± 9,2417 olarak tespit edildi.

Sperm Apoptozis sonuçlarının baba yaşları ile karşılaştırılması sonucu anlamlı ilişki saptanmamıştır (R:0,07; p>0,05) . Baba yaşları, sperm apoptozis sonuçları ve ortalamalar Tablo.14 de gösterilmiştir.

Tablo. 14 Baba yaşlarının Sperm Apoptozis Sonuçları ile Karşılaştırılması

Embriyo No	Baba yaşı	Apoptotik Sperm (%)
1	32	13,10
2	41	0,50
3	37	12,90
4	29	30
5	29	1,30
6	27	22,50
7	35	10,30
8	32	0,60
9	34	2,20
10	44	22,60
11	47	12,90
12	25	16,70
13	36	0,80
14	29	1,40
15	32	2,30
16	35	22,60
17	30	19,20
18	43	9,20
19	45	4,70
20	42	4
Ortalama	35,20 ± 6,502	10,490 ± 9,2417 R: -0,07 (p>0,05)

Sperm apoptozis sonuçları ile sperm FISH sonuçları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (R: 0,135; $p>0,05$). Spermlerde görülen apoptozis oranları, ortalama ve sperm FISH sonuçları ile karşılaştırması Tablo.15 te, apoptozis görüntü örnekleri Resim.3 te gösterilmiştir.

Tablo.15 Sperm FISH sonuçları ile Apoptotik Sperm Oranlarının Karşılaştırılması

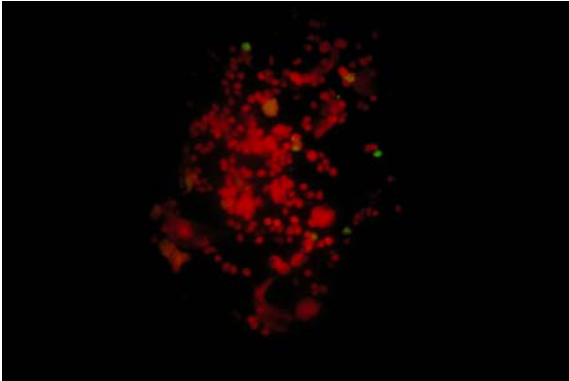
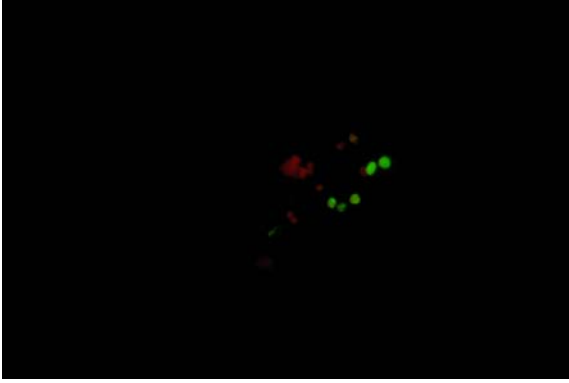
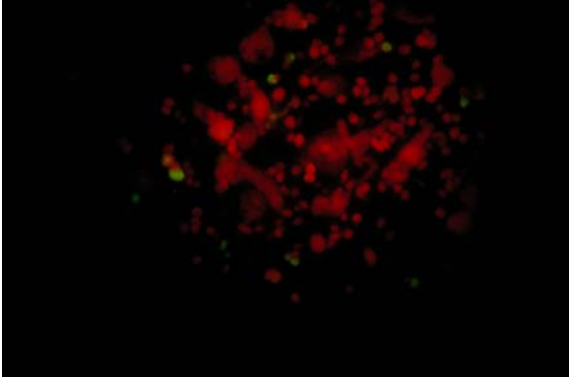
Embriyo No	Apoptotik Sperm (%)	Sperm FISH anomali (%)
1	13,10	26%
2	0,50	2%
3	12,90	6%
4	30	6%
5	1,30	47%
6	22,50	22%
7	10,30	1%
8	0,60	0%
9	2,20	20%
10	22,60	2%
11	12,90	6%
12	16,70	0%
13	0,80	1%
14	1,40	7%
15	2,30	7%
16	22,60	5%
17	19,20	9%
18	9,20	7%
19	4,70	2%
20	4	24%
Ortalama	10,490 ± 9,2417	10 ±11,965
		R: 0,135 (p>0,05)

Sperm apoptozis oranlarının embriyo canlılık oranlarına olan etkisi araştırılmış olup istatistiksel anlamlı sonuç elde edilmemiştir (R:0,109; p>0,05).
Sonuçlar, Tablo.16 da gösterilmiştir.

Tablo. 16 Apoptotik Sperm Oranlarının Embriyo Canlılık Oranlarına etkisi ve Ortalamalar

Embriyo No	Baba yaşı	Apoptotik Sperm (%)	Canlı embriyo oranı
1	32	13,10	% 85
2	41	0,50	% 50
3	37	12,90	% 0
4	29	30	% 50
5	29	1,30	% 35
6	27	22,50	% 55
7	35	10,30	% 71
8	32	0,60	% 60
9	34	2,20	% 78
10	44	22,60	% 50
11	47	12,90	% 87
12	25	16,70	% 60
13	36	0,80	% 33
14	29	1,40	% 75
15	32	2,30	% 44
16	35	22,60	% 0
17	30	19,20	% 54
18	43	9,20	% 0
19	45	4,70	% 33
20	42	4	% 60
Ortalama	35,20 ± 6,502	10,490 ± 9,2417 R: 0,109 (p>0,05)	% 49

Resim.3 Sperm Apoptozis Görüntüleri



Resim açıklaması: Yukarıda görülen sperm hücrelerinin Propidium Iodide ile boyananları (kırmızı) non-apoptotik, yeşil fluoressan ile boyananları apoptotik hücreleri göstermektedir.

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Preimplantasyon genetik tanı (PGT), genetik geçişli hastalıkları önlemede, teknolojinin insanlığa sunmuş olduğu en ileri ve en bilimsel yöntemlerden biridir. Gelişen bilimsel araştırmalar, her geçen gün sınırları zorlamakta ve hizmet alan insan sayısı bu gelişmeyle doğru orantılı olarak artmaktadır. PGT yöntemi ile sadece bireysel fayda değil aynı zamanda toplumsal faydalar da sağlanmaktadır (137). PGT, hizmet talep eden kişilere göre bireysel uygulanan bir yöntem olarak düşünülebilir. Fakat bu bireylerin oluşturduğu dalgasal etki göz önüne alındığında hizmetin tüm toplumu kapsadığı görülmektedir.

Endikasyonlarına göre PGT uygulamaları, kromozom bozuklukları ve moleküler genetik bozuklukları incelemek üzere iki ana grupta toplanmaktadır (100,134). Moleküler genetik uygulamalar bu çalışmanın kapsamı dışında bir konu olmasına rağmen üzerinde durulması gereken bir hastalık grubunu oluşturmaktadır. Çünkü bu hastalıklar, taşıyıcı ailelerde toplumda tespit edilen risklere göre oldukça yüksek oranlara ulaşmaktadır.

PGT uygulamaları, sayısal olarak her geçen gün artmaktadır. Buna paralel olarak yapıldığı ülkelerin sayısı da çoğalmaktadır. Uygulamaların çoğu kromozom sayı anomalilerinin tanısı içindir (80,99,137). Bilindiği gibi kromozom sayı anomalileri embriyonal dönemde oldukça sıktır. Bu sıklık, hamileliğin sonuna doğru azalmaktadır. İlk üç aydaki düşüklere olan çiftlerin düşük materyalleri incelendiğinde kromozom anomalisinin % 50-80 arasında olduğu görülmektedir (97,112). Embriyonel dönemde kromozom anomali sıklığı beklenenden fazla olmasına rağmen hamileliğin erken dönemlerinde düşükle sonuçlanması nedeniyle fark edilmemektedir. Embriyolar

üzerinde yapılmış çalışmalarda bu oranın % 23 ile % 80 arasına bulunduğunu, oositlerde yapılmış çalışmalarda ise bu anomali oranının % 18-63 arasında olduğu görülmektedir (118,163).

Bu çalışmada, implantasyonu yapılacak embriyolar için merkezimizde uygulamaya geçmeden önce, gelişimi durmuş embriyolarda FISH yöntemi ile sık rastlanılan anöploidi oranının saptanması, embriyolardaki kromozom anomalilerinin ebeveynlerin demografik özellikleri ile embriyo canlı kalma oranları ve baba adaylarının spermogram özellikleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonunda, PGT yönteminin kurum bünyesindeki IVF merkezinde endikasyonu olan çiftlere uygulanması hedeflenmiştir. Ayrıca arrested embriyolar üzerinde yapılmış çalışmalar, kromozom bozukluğunun düşüklerde veya sağlam embriyolarda bulunanlara göre daha yüksek oranlarda olduğunu göstermiştir (124).

İncelenen embriyoların ebeveynlerinin önceki hamileliklerinin sorgulanması sonucu üç çiftin ikişer düşüğü olduğu ve on bir çiftin daha önce IVF denediği öğrenildi. Bunun dışında iki çiftin farklı eşlerinden sağlıklı çocukları bulunmaktaydı. Bu iki ailede farklı eşlerden çocuk olmasına rağmen incelediğimiz grubun tamamını primer infertil çift olarak değerlendirebiliriz (Tablo. 2). Tekrarlayan IVF denemesi, tüp bebek merkezlerine başvuru sebeplerinden birini oluşturmaktadır. Kahraman ve ark PGT amacıyla bölümlerine başvuran olguların % 17' sinde tekrarlayan IVF denemesinin bir neden olduğunu görmüşlerdir (79). İncelediğimiz grupta, on bir aile en az bir kez IVF denemesi yapmıştı. Tekrarlayan IVF denemesi tanımı, en az üç deneme olmasına rağmen klinik olarak hamileliğinin gerçekleşmemesi şeklinde yapılmaktadır (88,117). Burada sunduğumuz olgulardan sadece iki tanesi bu tanıma uymaktaydı. Fakat tekrarlayan IVF denemesi olarak değerlendirilmese de incelenen grupta toplam dokuz çift, en az bir kez IVF denemişti.

Akraba evliliği Türkiye’ de yaklaşık olarak % 20-25 arasında olduğu görülmekte olup bölgeler arasında farklı yüzdeler karşımıza çıkmaktadır (148) . Akraba evliliğinin artmış anomalili çocuk doğurma riski ile birlikte olduğu bilinmekle birlikte bu türdeki evliliklerde daha çok otozomal resesif hastalıklar açısından yüksek risk bulunmaktadır. Kromozom anomalili çocuk doğurma riski ile akraba evliliği arasında literatürde bildirilmiş bir yayın bulunmamaktadır. Araştırmaya konu olan grubumuzda sadece bir çiftin arasında akrabalık vardı. Bu durumda grubun akraba evliliği oranı % 5 olarak bulunmuş ve topluma göre düşük bir değerde olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda PGT endikasyonları; ileri anne yaşı, tekrarlayan gebelik kayıpları, tekrarlayan IVF denemeleri, translokasyon taşıyıcısı ebeveyn varlığı, şiddetli azospermi ve önceki çocuklarında kromozom bozukluğu gibi durumlarda uygulanmaktadır (81).

Androlojik nedenli infertilite, spermilerin ya kalitatif,kantitatif problemlerinden ya da iletilen kanallardaki defekt veya tıkanıklık nedeniyle ortaya çıkmaktadır. İnfertilite nedeniyle IVF merkezlerine başvuran çiftlerin yaklaşık % 50 sinde androlojik nedenler söz konusudur (11,59). Androlojik nedenler ile başvuran olgularımızın spermogramlarında azospermi, oligoastenoteratospermi, oligospermi, oligoteratospermi ve teratospermi bulunmaktaydı (Tablo 3). Bu endikasyonlar, IVF merkezlerine başvuran çiftlerde testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulamalarını gerektirmektedir. Çalıştığımız grupta androlojik nedenli olguların sıklığını açıklamak için bir hipotez gerçekleştirecek olursak; Türkiye’ de öncelikle kadına uygulanan tedavi yöntemleri sayesinde çiftlerin bir kısmında hamilelik gerçekleşmektedir. Eğer hamilelik olmazsa ikinci seçenek olarak erkeğe bakılması planlanmaktadır. Bu da sorunun erkekte olduğu durumlar

için IVF merkezine yapılan başvurulardaki artışı açıklayabilecektir. TESE ve ICSI, IVF merkezlerinde en sık uygulanan yöntemlerdir. Bu yöntemlerin uygulamaya girmesiyle, oositlerde dölleme oranı artmıştır (114). Uygulanan yöntemin bir sorunu bazen genetik olarak matür hale gelmemiş spermiler oosit içine yerleştirilebilmekte ve sonuçta döllememiş veya arrest olmuş embriyolar oluşmaktadır. İncelediğimiz grupta gelişimi durmuş embriyoların kullanımı ile androlojik sebeplerin ilk planda olması literatür ile uyumludur.

Gelişen laboratuvar ve teknik yöntemlere karşın infertilite nedeni belli olmayan ve idiyopatik olarak adlandırılan bir grup hala bulunmaktadır. Bizim grubumuzda % 20 oranında infertilite nedeni belli olmayan olgu bulunmaktaydı. Bu oran literatürde bildirilen değerler ile uyumlu bulunmuştur (12,50,51).

IVF merkezlerine başvuran olguların çoğu primer infertil çiftlerden oluşmaktadır. Primer infertilite, canlı çocuk doğumu gerçekleşmemiş çiftler için kullanılmaktadır. İncelediğimiz grupta çiftlerin tümü primer infertildi. İki çiftin şimdiki eşlerin dışında gerçekleştirdikleri evliliklerinden olan çocukları bulunmaktaydı. Primer infertilite, aileler üzerinde sosyal baskı oluşturan bir faktör olarak konumunu korumaktadır. Konunun aile bazında incelenmesinden bir halk sağlığı sorunu olduğunu kabul etmek, toplumsal yararları açısından daha faydalıdır (50). Primer infertilite, toplumsal baskısını aileler üzerinde öncelikle yakın akraba ve çevre ile oluşturmaktadır. Bu baskı, toplumda görülen çocuk sahibi olma isteğinin yoğunluğu ile de pekiştirilmektedir.

Tüp bebek merkezleri, primer infertil çiftlere sağlıklı çocuk sahibi olmaları için yardım ederken uygulamalar, başvuran çiftlerdeki endikasyonlara göre sınıflandırılmaktadır. Başvuru nedenlerine bakılacak olursa androlojik nedenler, düşük oogenez cevabı, kadın nedenli sebepler (tubal enfeksiyon, polikistik over

sendromu) ve idiyopatik başlıklarının en sık olarak karşımıza çıktığını görürüz (36). Çalıştığımız gruptaki çiftlerin çoğunluğunun androlojik kaynaklı olduğunu görmekteyiz. Bu nedenler dışında idiyopatik, düşük oogenez cevabı, yaş ve genital tüberküloz da bulunmaktaydı.

Tüp bebek merkezleri, anne adayına yerleştirilecek embriyo seçimi için farklı değerlendirme yöntemleri uygulamaktadır. Burada en sağlıklı embriyonun seçilerek anne adayının çoklu gebeliklerden korunması amaçlanmaktadır. Seçim yapılacak grup ne kadar büyük olursa sağlıklı olan bireylerin de aynı oranda daha fazla olacağı bilinmektedir. Bu amaçla tüp bebek merkezleri elde ettikleri embriyolarda canlılık oranlarının artırılması amacıyla kültür ortamlarından etüv koşullarına kadar her şeyi ayarlayan düzenlemeler yapmaktadır (17). Bizim incelediğimiz grupta, siklus başına elde edilen embriyo sayısı ortalama $6,75 \pm 3,89$ olarak bulunmuştur (Tablo.4). Literatürde efektif bir PGT siklusunda elde edilmesi gereken minimum embriyo miktarları belirtilmiştir. Vandervorst ve ark PGT yapılması planlanan bir siklusta en az altı adet embriyonun olmasını önermektedirler (153). Bizim çalışmamızda elde edilen oranın literatürde bildirilen bu oran ile uyumlu olduğu görülmüştür. Çalıştığımız olgularda PGT yapılmamıştır. Fakat bu olgular, PGT yapılacak bir grup olarak değerlendirilseydi elde edilen ortalama embriyo sayıları literatürde belirtilen efektif PGT şartlarını sağlayabilecekti. Embriyo elde etmenin ardından ikinci önemli konu bu embriyoların canlılığını devam ettirmesinin sağlanmasıdır. Elde edilen embriyolardaki canlılık oranı, transfer edilecek embriyolar için alternatifleri arttırmaktadır. Gardner ve ark yaptıkları çalışmada elde ettikleri embriyoların sadece % 46,5 inin blastokist aşamasına ulaştığını göstermiştir (54). Çalıştığımız grupta embriyolarda canlı kalma oranı % 49 olarak bulunmuştur. Bulunan değer literatür ile uyumludur. Siklusta elde edilen embriyo oranları ile bu embriyolarda gözlenen canlılık

oranları arasındaki ilişkiyi saptamak için non-parametrik regresyon analizi uygulanmış ve gruplar arasında anlamlı sonuç elde edilmiştir. Siklusta ne kadar çok embriyo elde ediliyorsa bu embriyolardaki canlı kalma oranları da o kadar yüksek oluyordu. Bu grupta ilk başta elde edilen yaklaşık altı embriyonun yarısı işlem sırasında kaybolmuştur ve sonuç olarak her siklusta ortalama üç embriyo kalmaktaydı. İncelenen grubun gelişimi durmuş embriyolardan oluştuğu düşünülecek olursa, bu kadar az embriyonun canlı kalması beklenen bir durum olabilir.

PGT ve prenatal tanıda anöploidi taraması için İleri anne yaşının sınırı ülkeden ülkeye değişmektedir (100,134). Genel olarak 35 ile 39 yaş arasındaki bir yaş, sınır değer olarak kabul edilmektedir ve bu yaşın üstünde IVF uygulaması yaptıranlara PGT işlemi önerilmektedir. İleri anne yaşının mayotik ayrılama "non-disjunction" ile olan ilişkisi iyi bilinmektedir (73). Bu nedenle ileri anne yaşı gebeliklerinde embriyonun ve/veya fetusun kromozomal açıdan herhangi bir anomaliye sahip olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla prenatal tanı yöntemlerinin veya PGT yöntemlerinin uygulanması önem kazanmaktadır. Prenatal tanı amacıyla Türkiye'de genel olarak ileri anne yaşı için sınır otuz beş olarak kabul edilmektedir. Bu yaş grubundaki anne adaylarına bakıldığında Down sendromlu çocuk doğurma risklerinin yaklaşık 1/350 olduğunu görmekteyiz (2). Çalıştığımız grupta annelerin yaşları 22 ile 41 arasında idi ve grubun yaş ortalaması 30.80 ($\pm 6,246$) olması nedeniyle grup, ileri anne yaşına girmeyen anne adaylarından oluşmaktaydı. Bu çiftlerin on ikisi IVF kliniğine androlojik nedenler ile başvurmuştur. Çalışma grubunda androlojik veya nedeni belli olmayan (idiyopatik) olgular, toplamın % 80 ini oluşturmaktadır. Tüp bebek merkezlerine başvurularda nedeni belirlenememiş veya androlojik olgular, çoğunluğu oluşturmaktadır (135). Bu açıdan bakıldığında incelediğimiz grubun literatürde bildirilen başvuru nedenleriyle uyumlu

olduğu görülmüştür. Çalışmaya dahil edilecek arrested embriyolar için anne yaşı bir seçim kriteri değildir. Olgulardan çalışmaya alınan arrested embriyoların ebeveyelerine ait demografik veriler kayıtlardan elde edilmiştir.

Anne ve baba yaşlarının embriyo canlılıkları üzerine olan etkisinin araştırması için lineer regresyon uygulanmış olup sonuçlar arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo 5). Baba yaşının sperm kalitesi ile ilişkisi bilinmektedir. Eskenazi ve ark yaptıkları çalışmada ilerleyen baba yaşı ile sperm kalitesinde bozulma olduğunu göstermiştir(47). Fakat bu kalite bozukluğunun infertilite ile ilişkisi olmakla birlikte literatürde bu durumun elde edilen embriyolardaki canlılık oranlarına etkisini gösteren bir araştırma bulunmamıştır. Yaptığımız çalışmada, incelenen olgu sayısının az olmasına rağmen bu konuda yapılan ilk çalışma nedeniyle sonuçların önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle baba yaşının embriyo canlılık oranları üzerine etkisinin olmadığını, bu konuda ayrıntılı bilginin ise geniş serileri kapsayan çalışmaların yapılmaya başlanmasıyla kesinlik kazanacağını düşünmekteyiz. Baba yaşının fertiliteye olan etkisi için bu kadar az çalışma olmasına rağmen anne yaşının infertil olgularda sıkça araştırılmış olduğunu bilmekteyiz. Oositte meydana gelen mayotik yetersizlikler, mayoz sırasında olan ve kromozom sayı anomalilerinin yarattığı embriyo canlılığı üzerine olan negatif etki ve sitoplazmik nedenler infertiliteye direkt etki etmektedir (13).

Spontan abortus, devam eden hamileliğin yirmi haftalıktan önce kaybı şeklinde tanımlanmaktadır. Spontan abortusu olan bireylerde yapılan araştırmalar pek çok nedene işaret etmektedir. Kromozomal bozukluklar bu düşüklerin yaklaşık % 50-80 inden sorumludur (58). Tekrarlayan düşükleri olan çiftlerde kromozomal translokasyon taşıyıcısı olma riski bulunmaktadır. Translokasyon taşıyıcısı ebeveyelerden oluşan dengesiz genetik materyal düşüklere yol açabilmektedir.

Çalıştığımız grupta spontan abortusu olan bireylerden elde edilen embriyoların canlılık oranları ile karşılaştırılması sonucu ters orantı bulunmuştur (Tablo.6). Yani spontan abortus sayısı arttıkça canlı embriyo elde etmenin daha zor olduğu görülmektedir. Bu durum IVF işlemine başlamadan önce işlemin uygulayıcılarına siklusun başarısı ile ilgili ön fikir verebilecek bir bilgi olduğunu düşünmekteyiz.

En sık görülen sayısal kromozom bozukluklarının 13, 16, 18, 21 ve 22 nolu kromozomlara ait olduğu bilinmektedir. Bunları 15 ve 17 no'lu kromozomların sayısal bozuklukları izlemektedir (80). Kromozom bozukluklarının embriyo gelişimine etkisi genetik materyalin eksikliği veya fazlalığı şeklinde olması nedeniyle çok önemlidir. İncelenen kromozom sayısının arttırılmasına yönelik çalışmalar vardır. Tüm genomun taranıp bütün kromozomlarda sayı anomalisinin olup olmadığının söylenmesi ideal sonuç olmakla birlikte tüm genom taraması için hala sorunlar bulunmakta ve bunların aşılması için çalışmalar yapılmaktadır (161). Embriyolarda bulunan kromozom sayı anomalilerinin tespiti için şimdilik en geçerli, güvenilir ve hızlı sonuç veren yöntem belli kromozomlara yönelik FISH tir. Embriyoda FISH yönteminin sayısal kromozom bozukluklarının tespiti için çok kısa sürede bilgi vermesi hem genetik merkezler hem de tüp bebek merkezleri için bir avantajdır. Tüm testlerde olduğu gibi bir testin işlerlik kazanabilmesi için geçerlilik ve güvenilirliğinin yüksek olması gerekmektedir. Embriyoda FISH analizi başarıyla uygulanmaktadır. Embriyo incelemelerinin belki de en temel noktasını oluşturan zamana karşı yarış durumu nedeniyle tekniğin çok kısa sürede uygulanıp sonuçlandırılması gerekmektedir. Embriyoların büyük çoğunluğu, inceleme aşamasına döllenmenin yaklaşık üçüncü gününde ulaşmaktadır (73). Bu dönemde yapılan biyopsi işlemi, inceleme sürecini başlatmaktadır. Süre, in-vitro koşullarda bekleyen embriyonun

aleyhine işlemekte ve embriyonun bozulmasından önce transfer edilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda toplam 20 gelişimi durmuş embriyo, FISH yöntemi ile 13, 16, 18, 21 ve 22 nolu kromozomların sayısal anomalileri açısından incelendi. Bu kromozomların seçimindeki neden; embriyonel dönemde bu kromozomlara ait bozuklukların diğerlerine oranla daha sık görülmesi, ticari olarak bulunmasının ve uygulamasının daha kolay olmasıdır (131). Gelişimi durmuş embriyolar için en önemli nedenin kromozom bozukluğu olduğu belirtilmiştir (18). Yapılan çalışmalarda % 23 ile % 80 arasında kromozomal anomalinin tespit edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada anomalili embriyoların oranı % 80 olduğu görülmüş ve sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (Tablo. 7).

Çalışmamızda her embriyo, 5 kromozom açısından incelenmiş ve bu kromozomların her birine ait anomaliler ayrı ayrı kaydedilmiştir. Toplamda 0 dan 5 e kadar olan anomali sayısı için çizelge yapıldığında 0: normal olarak değerlendirilmiştir. Embriyo başına düşen anomali sayısı 1.85 olarak bulunmuştur. Toplam olarak 37 sayısal anomali saptanmıştır. Bu anomaliler: Monozomi, Trizomi, nullizomi, tetrazomi başlıkları altında incelenmiştir. Bu 37 anomalinin 27 sinde Monozomi tespit edilmiştir. Anomaliler içinde monozominin en fazla oranda olduğu tespit edilmiş ve literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (105,106). Sandalinas ve ark yaptıkları çalışmada monozomik embriyoların ancak % 9 unun blastokist aşamasına ulaştığını göstermiştir. Bunun dışında Rubio ve ark gelişimi durmuş embriyolarda anöploidi araştırmışlar ve yaptıkları çalışmada monozomik embriyoların trizomik olanlara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Önceki çalışmalar dikkate alındığında bulduğumuz sonuçlar literatür ile uyum sağlamaktadır (117,131). Genetik materyalin kaybı, canlılar için yaşamla bağdaşmayacak bir durumdur. Bu

şekilde ortaya çıkan gebelik ürünlerinin erken dönemde kaybedildiği bilinmekte olup hücresel düzeyde böyle bir embriyonun canlılığını sürdürüp fetus haline gelmesinin zor olduğu bilinmektedir (144). Bu dönemde in-vivo gerçekleşen anomalili embriyoların büyük kısmı hamile kalındığı fark edilmeden kaybedilmektedir. Tüp bebek yöntemleri, döllenmenin in-vitro koşullarda gerçekleşmesi nedeniyle embriyonun gözlenmesine olanak tanımaktadır. Bu dönemde görülen canlılık oranındaki düşüklük, hamileliğin erken dönemindeki kayıplarda bulunan yüksek oranları açıklayan bir durumdur. Tüp bebek yöntemlerinin başlangıcından itibaren tüm çabalar, canlı ve sağlıklı çocuk sahibi olma oranının artırılması yönünde yapılmaktadır. Bu dönemdeki embriyoların gelişimini niçin durdurduğunun saptanmasına yönelik çalışmalarda, ilk olarak genetik sebepler aranmıştır. Ardından FISH yönteminin kullanılmaya başlaması ile kromozomal açıdan sayısal anomalili embriyoları saptamak mümkün olmuş ve bunların oranının yüksek olduğu görülmüştür (131). Bu çalışmanın PGT için bir ön çalışma olması nedeniyle, pek çok merkezin yaptığı gibi öncelikle canlılığını yitirmiş embriyoların kullanılması tercih edilmiştir. Bu gelişimi durmuş embriyolardaki anöploidi aranması için yapılan FISH çalışmaları, daha sonra gerçekleştirdiğimiz PGT vakalarında büyük yarar sağlamıştır.

İncelenen embriyoların % 80 ini kapsayan anomalilere bakıldığında, en sık 18 nolu kromozoma ait sayısal anomali olduğu saptanmıştır. Daha sonra sırasıyla; 16, 22, 13 ve 21 nolu kromozomlara ait sayısal anomalilerin varlığı gösterilmiştir. Munne, Sandalinas ve Cohen; 22, 16, 15 ve 21 nolu kromozom bozukluklarının daha sık görüldüğünü XY, 14, 6, ve 18 nolu kromozomlara ait bozuklukların ise daha az tespit edildiğini belirtmişlerdir (100). Bizim çalışmamızda en sık görülen kromozom bozukluğunun 18 nolu kromozoma ait olması literatürde bulunan değerlerden farklı olmuştur.

Yapmış olduğumuz çalışmada spermiogramda görülen anomali şiddeti ile embriyolarda görülen kromozom anomali sıklığı arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur (Tablo. 8). Bu durum şiddetli erkek infertilitesinin en önemli PGT endikasyonu olarak kullanılmasını anlamlı kılmıştır (129). Böyle bir durumda PGT için başvuru yapmış çiftlerin incelenmesinde sperm FISH analizinin ne kadar gerekli olduğunun sorgulanması gerekmektedir. Standart tüp bebek başvurularında uygulanan spermiogram incelemesinin elde edilen embriyolarda PGT uygulaması için yeterli bir sebep olacağını düşünmekteyiz.

Embriyo FISH sonuçlarının anne ve baba yaşı ile karşılaştırılması için lineer regresyon uygulanmıştır ve aralarında anlamlı ilişki tespit edilmemiştir (Tablo 10). Embriyolarda görülen sayısal kromozom anomalilerinin anne yaşı ile bağlantısını gösteren çalışmalar mevcuttur (3,100). Bizim çalışmamızda anlamlı sonuç elde edilememiş olmasının iki nedeni olabilir. Bunlardan birincisi, incelediğimiz grupta bulunan anne adaylarının yaş ortalamasının genç anne grubunda olmasıdır. İkinci neden olarak incelediğimiz gruptaki olgu sayısının az olduğunu düşünmekteyiz. Baba yaşının ilerlemesi ile cinsiyet kromozomların artmış anöploidi riskini gösteren literatürde bildirilmiş yayınlar vardır. Martin ve ark yaptıkları çalışmada otozom kromozomlarında baba yaşı ile birlikte artmış risk göstermelerine rağmen diğer çalışmalarda anlamlı sonuç elde edilmemiştir (14,59,90). Bizim yaptığımız çalışmada, baba yaşının embriyolarda saptanan FISH anomalileri ile karşılaştırılması sonucunda anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu sonuçlar ile, baba yaşının embriyoda görülen kromozom sayı anomalilerine etki etmediğini düşünebiliriz.

Sperm hücrelerine genel olarak bakıldığında genetik materyalin oldukça iyi korunduğu görülmektedir. Korumadaki bu hassasiyet gelecek kuşaklara aktarılacak olan genetik materyalde bir sorun olmaması yönündedir. Üretilen sperm hücre

sayısının miktarına göre korumadaki bu hassasiyet spermdeki kondensasyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (73).

FISH yöntemlerinin uygulamaya başlanmasından itibaren sperm nükleuslarındaki kromozomal durumun ortaya çıkarılması için çalışmalar yapılmaktadır (39,40,89). FISH yönteminden önce sperm kromozomlarının gösterilmesi için hamster oosit-insan sperm ortak sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan işlemde tüm kromozomların görülmesi sağlanırken yöntemin zorluğu, geniş bir araştırmacı kitlesi tarafından kullanılmasını engellemiştir. Bu çalışmada sperm hücreleri X, Y ve 18 nolu kromozomlara ait FISH problemleri ile sayısal anomali var/yok şeklinde incelenmiştir. İncelemede X, Y ve 18 nolu kromozomların seçilmesinin iki nedeni bulunmaktaydı. Bunlardan ilki cinsiyet kromozom anomalilerinin spermelerde daha sık karşımıza çıkması, ikincisi prob setinin ulaşılabilirliğinin kolay olmasıydı (40,89,155). Ayrıca literatürdeki çalışmalarda çoğunlukla bu prob seti kullanılmıştır. Sperm FISH sonuçlarında anomali oranı % 0 ile % 47 arasında bulunmuş olup ortalaması %10 ($\pm 11,965$) olarak tespit edilmiştir (Tablo. 11).

Spermlerdeki ortalama kromozom anomali düzeyinin saptanması için yapılan ilk çalışmalar sağlıklı vericilerden elde edilen spermlemlerle kontrol edilmiştir. Egozcue ve ark yaptıkları çalışmada otozomal kromozomlar için dizomi sıklığının % 0,13; cinsiyet kromozom anomali sıklığının % 0,37 olduğunu göstermiş ve ortalama anöploidili sperm oranının yaklaşık % 6,5 olduğunu rapor etmiştir (40). Yapmış olduğumuz çalışmada spermiogramları açısından normal olarak değerlendirilen bireylere bakıldığında bunlarda görülen anomali oranının % 0, 1, 2, 2, 6 ve 20 olduğu görülmüştür (Tablo. 11) . Bu normal bireylerden elde edilen sonuçların ortalaması yaklaşık % 5,1 bulunmuş olup bu oranın Egozcue ve ark tarafından bulunan % 6,5 değerine yakın olduğu görülmüştür.

Spermiogramda gözlenen durumun sperm FISH ile ileri tetkik edilmesi, klinisyene PGT uygulaması sırasında ek bilgi sağlayacaktır. Bu durumda sperm FISH sonuçları gerek ve şart olmamakla birlikte PGT uygulayıcı ekip için uygulama sırasında olabileceklerin önceden fark edilmesine yardımcı olabilecektir. Ayrıca çalışmamızda tespit ettiğimiz sperm FISH anomali sıklığı ile önceki IVF denemesi sayısı arasındaki anlamlı korelasyon, tüp bebek uygulaması için ilk başvuru yapan çiftlerde uygulamanın başarısı hakkında bilgi sağlayıcı olabilecektir (Tablo.12).

Triploid gebeliklerin nedenini açıklamak üzere Egozcue ve ark ı tarafından yapılan bir çalışmada doksan bir olgunun altmışında nedenin baba kaynaklı olduğu gösterilmiştir. Bu olguların çoğu dispermi nedeniyle olmasına rağmen az bir kısmında görülen diploid sperm, triploidinin gerçekleşmesine sebep olmaktadır. Diploid sperm oranı, oligospermik olguların $\frac{1}{4}$ ünde, kriptozoospermilerin $\frac{1}{2}$ sinde ve azospermilerin $\frac{1}{2}$ sinde görülmektedir (42). Cinsiyet kromozom anomalilerinin spermelerde sık olduğu bilindiği halde inceleme sırasında bir otozom kromozomu (kromozom no;18) eklenmiştir. Bu kromozomun eklenmesindeki amaç ploidi anomalilerinin saptanmasını kolaylaştıracağını düşünmemizdi. İncelenen grupta diploid sperm oranı için tanımlayıcı bir sonuç verme şansımız, olgu sayısının az olması nedeniyle yeterli olmadığı düşünülmüştür.

Sperm FISH anomali oranları ile embriyolarda canlı kalma oranları arasında yapılan non-parametrik regresyon analizinde anlamlı sonuç tespit edilmemiştir (Tablo. 13). Sperm FISH anomalilerinin incelendiği farklı gruplarda birbiri ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalarda genel olarak infertilite nedeniyle başvuru yapan olgularda yüksek oranda kromozom sayı anomalisi görülmektedir. Myung-Geol ve ark yaptıkları çalışmada ICSI uygulanan olgularda daha yüksek oranda sperm FISH anomali oranı tespit etmişlerdir (60). Martin ve ark oligozoospermik

olgularda kromozom sayı anomalileri için artmış risk olduğunu göstermişlerdir. ICSI uygulanan veya infertilite nedeniyle IVF merkezlerine başvuran olgularda görülen bu yüksek orandaki kromozom sayı anomalisinin embriyolarda bulunabilecek kromozom sayı anomalileri için artmış riski beraberinde getirebileceğini düşünüyoruz. Ayrıca embriyoların gelişiminin durmasından en fazla genetik faktörlerin sorumlu olduğunu bilmekteyiz (124). Sperm FISH anomalileri ile embriyo canlılıkları arasında anlamlı bir sonuç elde edilememiş olması nedeniyle incelediğimiz grupta tek başına sperm FISH anomalilerinin yeterli olmadığını düşünebiliriz. Etki eden diğer faktörlerin araştırılması için planlanan çalışmaların, embriyo canlılığını arttırmak için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Sperm hücrelerinde gerçekleştirilmiş apoptozis çalışmasının az olması nedeniyle sonuçlarımızı tartışmak oldukça zor olmuştur. Erkek germ hücrelerinde oluşan DNA hasarlanması baba yaşı ile birlikte artmaktadır. Bu hasarlanmalar normal koşullarda DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilmekte ve sorunsuz olarak üreme/fertilizasyon devam etmektedir. Hasarlanmış spermler, tamir edilemeyecek ise diğer tüm hücreler gibi apoptozis sürecine girecektir. Bu şekilde ejakulat içinde inaktif edilmiş spermlerin fertilite yeteneği ortadan kalkmış ve gelecek kuşaklar bozuk genlerden korunmuş olacaktır (57). Tamir edilebilecek spermlerde bulunan minimal DNA hasarı, embriyo içine taşınabilmektedir. Bu taşınan hasarın birinci bölünme aşamasına kadar tamir edilmesi gerekmektedir (9) .

Spermlerdeki DNA hasarlanmasını göstermek için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Oksidatif DNA hasarlanmasını göstermek için en sık kullanılan bioişaretleyici 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) dir. Bu işaretleyicinin gösterilmesi için yüksek çözünürlüklü likid elektrokromatografi (HPLC-EC) veya gaz kromatografi yöntemlerinden biri tercih edilir. HPLC-EC pek çok araştırmacı tarafından

tercih edilen bir yöntemdir (138). DNA fragmantasyonun gösterilmesinde kullanılan diğer popüler yöntemler ise tek hücre jel elektroforez (SCGE veya COMET uygulaması) ve terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) nick end-labeling assay (TUNEL) dir (145). Bu kullanılan yöntemler arasında güvenilirlik ve geçerlilik farkı bulunmamaktadır. Bu sayede DNA apoptozisini göstermek isteyen gruplar istediği metodu seçme özgürlüğüne sahip olmaktadır.

Spermlerdeki DNA hasarından söz edilmesine rağmen, sperm DNA sı çift sarmalda bulunan disülfid bağları ile kondanse yapısını korur ve dıştan gelebilecek negatif uyarılara karşı bozulmalarını engeller. Fakat DNA hasarlanması üretken erkeklerde bile meydana gelmektedir. Mckelvey ve ark nın yaptıkları çalışmada H₂O₂ ve X radyasyonunun sperm DNA hasarlama etkisinin infertil erkeklerde görülenden daha fazla olduğunu göstermiştir (93). Hughes ve ark yaptıkları çalışmada, infertil ve fertil erkekler arasında DNA hasarlanma farklılıklarını test etmişlerdir. İnfertil erkeklerde ilk aşamada alınan spermlerde fertil erkeklere göre DNA hasarlanma farkı olmamasına rağmen bu sperm hücrelerinin oksidatif ajanlara daha hassas olduklarını göstermişlerdir (69).

DNA hasarı ve fragmantasyonun erkek eşey hücrelerindeki nedeni hala kesin olarak belli değildir. DNA hasarına sebep olan reaktif oksijen radikalleri, artmış sentez veya yetersiz antioksidan koruma, erkek infertilitesinde önemli bir role sahiptir. Irvine ve ark insan sperm hücrelerinde DNA hasarlanmasını göstermek için IVF merkezine başvuran erkekleri incelemişler ve bunlarda normal populasyona göre daha yüksek oranda apoptozis oranlarını tespit etmişlerdir (72). Çalışmamızda incelediğimiz sperm apoptozis oranları % 0,50 ile % 22,6 arasında (ortalama: % 10,90±9,2417) olduğu görülmüştür. Sun ve ark yaptıkları çalışmada IVF kliniğine başvuran olgularda sperm apoptozis oranını yaklaşık % 4 olarak bulmuşlardır. Sun ve ark ait bu çalışmadaki

ortalama değer bizim bulduğumuz değerden daha azdır fakat Sun ve ark nın çalışmasındaki apoptozis oranları olguların % 27 sinde % 5 ile % 40 arasındaydı (145). Zini ve ark yaptıkları çalışmada DNA fragmantasyonunu % 13,3 bulmuşlardır (164). Zini ve ark yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlar bizim sonuçlarımıza daha yakındır. Literatürden de görüldüğü gibi konu ile ilgili oldukça az sayıda çalışma mevcut olup farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bu alışmamızda elde ettiğimiz sonuçların ve literatürde bulunan farklı değerlerin daha fazla sayıda olguyu içeren araştırma projeleri ile açıklığa kavuşacağınızı düşünüyoruz.

Gorzyca ve ark yaptıkları çalışmada baba yaşının sperm apoptozisinde önemli bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir (57). Bu alışmamızda baba yaşı ile sperm apoptozis oranları arasında anlamlı korelasyon tespit edilmedi (Tablo. 14). Çalışmadaki yaş gruplarına göre olgu sayısının az olması sonucu etkilemiş olabilir. Ayrıca incelenen gruptaki erkekler, gelişmesini durdurmuş embriyoların ebeveynleri olduğu için ve IVF başvuruları nedenleri içinde en sık androlojik nedenler geldiği için böyle bir ilişkinin aranmasının bir grupta uygun olmayacağı düşünülmüştür.

Sperm FISH sonuçları ile sperm apoptozis oranları ile karşılaştırması sonucu aralarında anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo.15). Erkek infertilitesinin sebeplerini açıklamak için yapılan çalışmalarda ayrı ayrı olarak kromozom sayı anomalileri ve apoptotik hücre oranları kullanılmıştır. Literatüre bakıldığında bu iki parametrenin birlikte değerlendirildiği Carrell ve ark ait çalışma bulunmuştur (27). Bu çalışmada tekrarlayan düşükleri olan çiftlerdeki erkeklerden elde edilen sperm örneklerinde sperm FISH anomalileri ile apoptotik hücre oranları birbiri ile uyumlu bulunmuştur. DNA fragmantasyonu ile spermlerdeki kromozom sayı anomali oranı arasındaki bu uyum ilgi çekicidir. Bu durumu açıklamak için spermatogenezis sırasında gerçekleşen mekanizmalara bakabiliriz. Spermatogenezis ve mayoz, mayotik kontrol noktaları ile

düzenlenmektedir. Bunlarda gerçekleşen mayotik hatalar hücresel apoptozisi uyarabilir ve bu şekilde spermelerde sayısal kromozom anomalileri ile apoptozis oranları arasında uyum görülebilir. Bizim bulduğumuz sonucun bu çalışmada bulunan sonuçtan farklı olmasını açıklamaya çalışacak olursak incelenen grupların birbirinden farklı olduğunu görmekteyiz. Çalıştığımız grupta hiçbir çiftin üçten fazla düşüğü bulunmamaktaydı. Yani çiftler arasında tekrarlayan gebelik kaybı bir endikasyon değildi.

Apoptotik sperm hücre oranları ile embriyolarda gözlenen canlı kalma oranları arasında yapılan non-parametrik regresyon analizinde anlamlı sonuç elde edilmemiştir (Tablo. 16). Embriyo canlı kalma oranlarına embriyoya ait genetik materyal en önemli etkidir. Bunun dışında embriyo kültür koşulları, oositin sitoplazma durumu etki etmektedir (54). Yapmış olduğumuz çalışmada aynı siklusta elde edilen spermeler incelemeye alınmıştır. İncelenen spermeler ile embriyoyu dölleyen spermelerin birbirinden farklı olduğu için embriyo canlılık oranına etkisinin olmadığını düşünebiliriz.

Bu çalışmada, implantasyonu yapılacak embriyolar için merkezimizde uygulamaya geçmeden önce bir ön çalışma yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla gelişimi durmuş embriyolarda FISH yöntemi ile sık rastlanılan anöploidi oranının saptanması ilk hedef seçilmiş ve incelenen embriyolardaki kromozom durumlarının ebeveynlerin demografik özellikleri, embriyo canlı kalma oranları ve baba adaylarının spermogram özellikleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda PGT yöntemi, kurum bünyesindeki IVF merkezinde endikasyonu olan çiftlere uygulanır hale gelmiştir.

BÖLÜM V

SONUÇ

1. Çalışmada incelenen embriyoların elde edildiği anne adaylarının yaş ortalaması $30,80\pm 6,246$; baba adaylarının yaş ortalaması $35,20\pm 6,502$ olarak bulunmuştur. Anne-baba yaşının canlı embriyo oranlarına ve embriyolarda görülen kromozom anöplidilerine etki etmediği görülmüştür.
2. Her siklusta elde edilen embriyo sayısı ile canlı kalan embriyo oranları arasında anlamlı korelasyon saptanırken önceki hamileliklerde görülen spontan abortus oranları ile canlı embriyo oranları arasında ters yönde ilişki saptanmıştır.
3. Embriyolarda % 80 oranında sayısal kromozom anomalisi saptanmış olup, bu anomalilerin en sık (% 80) 18 nolu kromozoma ait olduğu görülmüştür. Embriyoların en sık (27/37) monozomik olduğu dikkati çekmiştir.
4. Spermiogramda görülen anomalilerin embriyoda görülen sayısal kromozom anomali sayısı ile uyumlu olduğu görülmüştür.
5. Aynı siklusta elde edilen spermlerde X,Y, 18 kromozomları açısından $\% 10\pm 11,965$ oranında sayısal anomali taşıdığı tespit edilmiş olup, bu oranların önceki IVF deneme sayısı ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir.
6. Sperm FISH anomali oranları ile sperm apoptozis oranlarının embriyoların canlı kalma oranlarına etkisi olmadığı saptanmıştır.

7. Sperm FISH sonuçları ile sperm apoptozis sonuçları arasında ilişki bulunmamıştır.

BÖLÜM VI

ÖZET

Giriş-Amaç: Embriyolarda görülen kromozom anomali oranının spontan abortuslarda görülen değerlere göre daha yüksek olduğu bilinmekte ve bu oran yaklaşık % 23 ile 80 arasında değişmektedir. Çalışmamızın amacı:

- Gelişimi durmuş embriyolardaki kromozomal durumun 13,16,18,21 ve 22 nolu problemler yardımı ile aydınlatılması
- Gelişimi durmuş embriyolardaki kromozom anomali oranları ile aynı siklusta bulunan embriyoların canlılık oranları arasındaki ilişkinin gösterilmesi
- Gelişimi durmuş embriyolardaki kromozom sayı anomalileri ile aynı siklusta elde edilmiş sperm hücrelerindeki kromozomal durum ile apoptozis oranlarının ilişkilendirilmesidir.

Gereç-Yöntem: Gelişimi durmuş 20 embriyo 13,16,18,21 ve 22 nolu kromozom problemleri ile analiz edildi. Gelişimi durmuş embriyoların babalarından aynı siklusta elde edilen sperm hücreleri X,Y ve 18 nolu kromozom problemleri analiz edildi. Sperm hücrelerine ayrıca TUNEL test ile apoptozis testi uygulandı.

Bulgular: Gelişimi durmuş embriyolardaki kromozom sayı anomali oranı % 80 olarak bulunmuştur. Embriyolarda görülen sayısal anomali oranı ile embriyolardaki canlılık oranları ve spermlerdeki toplam anomali oranı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Sperm apoptozisi ile embriyolarda görülen sayısal anomali oranları arasında ilişki saptanmamıştır. Spermlerde görülen kromozom anomali sayısı ile spermiogram sonuçları arasında anlamlı sonuç saptanmıştır.

Sonuç: Spermlerde görülen sayısal kromozomal anomali ve apoptozis sıklığı ile incelediğimiz embriyolarda görülen sayısal kromozomal anomaliler arasında ilişki bulunmamakta fakat baba adaylarından elde edilen spermiogram sonuçları ile gelişimi durmuş embriyolarda görülen sayısal anomaliler arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

BÖLÜM VII

ABSTRACT

Chromosomal abnormality rates in the embryos are observed more frequently than in spontaneous abortions and it has been reported that the incidence of aneuploidies varies between 23% and 89% in embryos in the literature.

In this study we investigated:

- Chromosomal aneuploidy rate for chromosome 13,16,18,21 and 22 in arrested embryos,
- The relationship between the aneuploidies found in arrested embryos and viability rate of embryos obtained in the same cycle,
- The relationship between the aneuploidy rate in arrested embryos and sperm apoptosis, sperm FISH for chromosome X,Y and 18 and spermiogram.

Materia and -Method: Twenty arrested embryos were analysed using PGD FISH probes (13,16,18,21 and 22). The sperm which was obtained from the father of the arrested embryos was analysed using FISH probes (X,Y and 18). To evaluate apoptosis, TUNEL test was performed on sperm.

Results: Chromosomal aneuploidy frequency in arrested embryos was found to be 80%. There was no relationship between the aneuploidies found in arrested embryos and the viability rate of the embryos obtained in the same cycle or total aneuploidy rate in sperm. No correlation was found between sperm apoptosis and chromosomal aneuploidy rates found in arrested embryos. There was a significant correlation between the spermiogram and the number of chromosome aneuploidies in the arrested embryos.

Conclusion: Although there is no significant correlation between the sperm FISH, the sperm apoptosis results and the number of chromosomal aneuploidies in embryos, we propose the spermiogram results are efficacious as an indication of preimplantation genetic diagnosis

BÖLÜM VIII

KAYNAKLAR

1. Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J., Vidal, F. (2002). Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei, *Cytogenet Genome Res*,;97(3-4):149-54.
2. Antonarakis SE. (1998).10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics*, 51(1): 1-16.
3. A.P., Ferraretti, Magli, M.C., Kopcow, L., Gianaroli, L. (2004). Prognostic role of preimplantation genetic aneuploidy in assisted reproductive technology. *Human Reproduction* , 19(3): 694-699.
4. Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W. (1992). Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil*, 94(2):451-62.
5. Aitken, R.J., Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*: 122(4):497-506.
6. Aitken. R.J., Ryan, A.L., Curry, B.J., Baker, M.A. (2003). Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 9(11):645-61.
7. Aitken, R.J., Sawyer, D. (2003). The human spermatozoon not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* : 518:85-98.
8. Aitken, R.J. (2004). Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev*: 16(7):655-64.

9. Aitken, R.J. (1999). The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil* : 115(1):1-7.
10. Aitken, R., Baker J., Mark, A. Sawyer, Dennis. (2003). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease, *Reproductive BioMedicine Online* :7(1), 65-70.
11. Attia, A.M., Al-Inany, H.G., Proctor, M.L. (2006). Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility, *Cochrane Database Syst Rev*, 25;(1):CD005071.
12. American Society of Reproductive Medicine. Frequently asked questions about infertility <http://www.asrm.org/Patients/faqs.html#Q2>: (02 02.2006).
13. Armstrong, D.T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence, *Theriogenology*, 1;55(6):1303-22.
14. Asada, H., Sueoka, K., Hashiba, T., Kuroshima, M., Kobayashi, N., Yoshimura, Y. (2000). The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa, *J Assist Reprod Genet*, 17(1):51-9.
15. Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm, *J Cell Biol*, 93(2):298-305.
16. Bar-Hava, I., Ashkenazi, J., Shelef, M., Schwartz, A., Brengauz, M., Feldberg, D., Orvieto, R., Ben-Rafael, Z.(1997). Morphology and clinical outcomes of embryos after in vitro fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection, *Fertil Steril*, 68(4):653-7.
17. Behr, B., Wang, H. (2004). Effects of culture conditions on IVF outcome *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* , 115, Supplement 1:72-76.

18. Benkhalifa, M., Menezo, Y., Janny, L., Pouly, J.L., Qumsiyeh, M.B. (1996). Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet.* 13(2):140-8.
19. Bielanska, M., Tan, S.L., Ao, A. (2000). Fluorescence in-situ hybridization of sex chromosomes in spermatozoa and spare preimplantation embryos of a Klinefelter 46,XY/47,XXY male. *Hum Reprod*, 15(2):440-4.
20. Blanco, J., Egozcue, J., Clusellas, N., Vidal, F. (1998). FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet.* 83(3-4):275-80.
21. Boué, A., Boué, J., Gropp, A. (1985). Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Gene,t*, 14: 1–57.
22. Bourne, H., Stern, K., Clarke, G., Pertile, M., Speirs, A., Baker, H.W. (1997). Delivery of normal twins following the intracytoplasmic injection of spermatozoa from a patient with 47,XXY Klinefelter's syndrome *Hum Reprod*, 12(11):2447-50.
23. Braude, P., Bolton, V., Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 31;332(6163):459-61.
24. Braude, P., Pickering, S., Frances Flinter, Caroline Mackie Ogilvie. (2002). Preimplantation genetic diagnosis. *Nature Reviews Genetics*, 3: 941-952.
25. Brenner, C.A., Barritt, J.A., Willadsen, S., Cohen. J, (2000) Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertil Steril*, 74:573–578.
26. Calogero, A.E., De Palma, A., Grazioso, C., Barone, N., Burrello, N., Palermo, I., Gulisano, A., Pafumi, C., D'Agata, R. (2001). High sperm aneuploidy rate in

unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod*, 16(7):1433-9

27. Carrell, D.T., Wilcox, A.L., Lowy, L., Peterson, C.M., Jones, K.P., Erickson, L., Campbell, B., Branch, D.W., Hatasaka, H.H. (2003). Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol*. 101(6):1229-35.
28. Cifuentes, P., Navarro, J., Blanco, J., Vidal, F., Miguez, L., Egozcue, J., Benet, J. (1999). Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet*. 7(2):231-8.
29. Colls, P., Blanco, J., Martinez-Pasarell, O., Vidal, F., Egozcue, J., Marquez, C., Guitart, M., Templado, C. (1997). Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei *Hum Genet*, 99(6):761-5.
30. Conn, C. M., Harper, J. C., Winston, R. M., Delhanty, J. D. (1998). Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum. Genet*. 102, 117–123.
31. Coonen, E., Martini, E., Dumoulin, J.C., Hollanders-Crombach, H.T., de Die-Smulders, C., Geraedts, J.P., Hopman, A.H., Evers. J.L. (2000). Preimplantation genetic diagnosis of a reciprocal translocation t(3;11)(q27.3;q24.3) in siblings. *Mol Hum Reprod*, 6(3):199-206.
32. Cummins, J.M., Jequier, A.M., Kan, R. (1994). Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol Reprod Dev*, 37(3):345-62.

33. De-Vos, A., Van Steirteghem, A. (2001). Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn*, 21:767–780
34. de-Wert G. (2003). Ethics of assisted reproduction. Reproductive medicine: molecular, cellular and genetic fundamentals. London: Parthenon Publishing, p: 645–65.
35. Delhanty, J., Griffin, D., Handyside, A. (1993). Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Hum Mol Genet* 2: 1183–85.
36. Devroey, P., Van Steirteghem, A. (2004). A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update*, 10(1):19-28
37. Dokras, A., Sargent, I. L., Ross, C., Gardner, R. L. and Barlow, D. H. (1990). Trophectoderm biopsy in human blastocysts. *Hum. Reprod*, 5:821–825.
38. Donnelly E.T., McClure, N., Lewis, S.E. (1999). The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, 14(5):505-12.
39. Downie S.E., Flahert, S.P., Swann, N.J., Matthews, C.D. (1997). Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod*, :3(9):815-9.
40. Egozcu, e J., Blanco, J., Vidal, F. (1997). Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update*, 3(5):441-52.

41. Egozcue, S., Blanco, J., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Bari, P.N., Vidal, F., Egozcue, J. (2000). Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*, 6(1):93-105.
42. Egozcue, S., Blanco, J., Vidal, F., Egozcue, J. (2002). Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod*, 17(1):5-7.
43. Egozcue, S., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Bari, P.N., Egozcue, J. (2000). Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 17(6):307-9.
44. Escudero, T., Lee, M., Carrel, D., Blanco, J., Munne, S. (2000). Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn*, 20(7):599-602.
45. E. S., Lewis, Aitken, R.J. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*, 322(1):33-41
46. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. (2002). ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod*, 17(1):233-46.
47. Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, Moore D. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod.* 2003 Feb;18(2):447-54.
48. Esterhuizen, A.D., Franken, D.R., Lourens, J.G., Prinsloo, E., van-Rooyen, L.H. (2000). Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum Reprod*, 15(3):657-61.

49. Estop, A.M., Cieply, K.M., Munne, S., Feingold, E. (1999). Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet*, 104(5):412-7.
50. Fidler A, Bernstein J. Infertility: From a personal to a public health problem. *Public Health Rep* 1999; 114:494-511.
51. Emily McDonald Evens, A Global Perspective on Infertility: An Under Recognized Public Health Carolina papers Internataiomal Health Issue No. 18 (Spring 2004).
52. Finkelstein, S., Mukamel, E., Yavetz, H., Paz, G., Avivi, L.(1998). Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet*, 102(2):129-37.
53. Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., Rosado, A. (2000). Sperm chromatin *Arch Androl.* 45(3):215-25.
54. Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J., Hesla, J. (1998). A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod*, 13,:3434–3440.
55. Gianaroli, L., Magli, M.C., Ferraretti, A.P., Fiorentino, A., Garrisi, J., Munne, S. (1997) Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril*, 68, 1128–1131.
56. Giltay, J.C., Kastrop, P.M., Tiemessen, C.H., van-Inzen, W.G., Scheres, J.M., Pearson, P.L. (1999). Sperm analysis in a subfertile male with a (Y;16) translocation, using four-color FISH. *Cytogenet Cell Genet*, 84(1-2):67-72.

57. Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, 207(1):202-5.
58. Griebel CP, Halvorsen J, Golemon TB, Day AA. Management of spontaneous abortion. *Am Fam Physician*. 2005 Oct 1;72(7):1243-50
59. Griffin, D.K., Hyland, P., Tempest, H.G., Homa, S.T. (2003). Safety issues in assisted reproduction technology: Should men undergoing ICSI be screened for chromosome abnormalities in their sperm?. *Hum Reprod*, 18(2):229-35.
60. Geol, M.P., Young J.K., Sang-Hoon, L., Chang-Keun, K. (2005). The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Human Reproduction*, 20(6):1688-1694.
61. Handyside, A. H. (1989). Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1:347–349.
62. Handyside A, Kontogianni E, Hardy K, Winston R. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768–70.
63. Hales, B.F., Robaire, B. (2001). Paternal exposure to drugs and environmental chemicals: effects on progeny outcome. *J Androl*, 22(6):927-36.
64. Hassold, T., Chiu, D. (1985). Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet*, 70: 11-17.
65. Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, J., Matsuyama, A., Wilson, C., Yamane, J.A., Jacobs, P.A. (1980). A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortuses. *Ann Hum Genet Lond*, 44:151–178.

66. Hewitson, L., Dominko, T., Takahashi, D., Martinovich, C., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Fanton, J., Jacob, D., Monteith, D., Neuringer, M., Battaglia, D., Simerly, C., Schatten, G. (1999). Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys *Nat Med. Apr*, 5(4):431-3.
67. Host, E., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S. (2000). The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79(7):559-63.
68. <http://www.asylumrights.net/coe/turkish.pdf> (02.02.2006). İnsan hakları ve temel özgürlüklerin korunmasına ilişkin sözleşme.
69. Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. (1998). The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod*, 13(5):1240-7.
70. Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod*, 2:613–9.
71. Hassold, T., Merrill, M., Adkins, K., Freeman, S., Sherman, S. (1995). Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet*, 57:867–874.
72. Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality, *J Androl*, 21:33–44.
73. İnsan Embriyolojisi.(2002). Moore and Persaud-Nobel yayınevi, s: 41-42.

74. Jaarola, M., Martin, R.H., Ashley, T. (1998). Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet*, 63(1):218-24.
75. Janny, L., Ménézo, Y.J.R. (1996). Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev*, 45:31-37.
76. Jobanputra, V., Sobrino, A., Kinnez, J., Warburton, D. (2002). Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod*, May, 17(5):1166-70.
77. Joris, H., Van den Abbeel, E., Vos, A. D., Van Steirteghem, A.(1999). Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum. Reprod*, 14: 2833–2837.
78. Kahraman, S., Bahce, M., Samli, H., Imirzahoglu, N., Yakisn, K., Cengiz, G., Donmez, E. (2000) Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Human Reprod*, 15:2003–2007.
79. Kahraman, S., Benkhalifa, M., Donmez, E., Biricik, A., Sertyel, S., Findikli, N., Berkil, H. (2004). The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenat Diagn*, 24(4):307-11.
80. Kuliev, A., Cieslak, J., Illkevitch, Y., Verlinsky, Y. (2003). Chromosomal Abnormalities in a Series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Bio Med Online*, 6:54–59.
81. Kuliev, A., Verlinsky, Y. (2005). Place of preimplantation diagnosis in genetic practice. *Am J Med Genet*, 1;134(1):105-10.
82. Lalic, I., Catt, J., McArthur, S. (2001). Pregnancies after cryopreservation of embryos biopsied for PGD. *Hum. Reprod*, 16: 32

83. Lee, M., Munne, S. (2000). Pregnancy after polar body biopsy and freezing and thawing of human embryos. *Fertil. Steril*, 73: 645–647.
84. Lewis S.E, O'Connell, M., Stevenson, M., Thompson-Cree, L., McClure, N. (2004). An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod*, 19(6):1385-94. (Epub 2004 Apr 29).
85. Lewis, C. M., Pinel, T., Whittaker, J. C. and Handyside, A. H. (2001). Controlling misdiagnosis errors in preimplantation genetic diagnosis: a comprehensive model encompassing extrinsic and intrinsic sources of error. *Hum. Reprod*, 16: 43–50.
86. Liu, J., Van-de Abeel, E., Van-Steirteghem, A. (1993). The in vitro and in vivo developmental potential of frozen and non frozen biopsied 8-cell mouse embryos. *Hum. Reprod*, 8:1481–1486.
87. Lopes, S., Sun, J.G., Jurisicova, A., Meriano, J., Casper, R.F.(1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 69(3):528-32.
88. Shahine L.K., Cedars, M.I. (2006). Preimplantation genetic diagnosis does not increase pregnancy rates in patients at risk for aneuploidy *Fertility and Sterility*, 85(1): 51-56.
89. Martin, R.H., Rademaker, A.W.(1999). Nondisjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 86(1):43-5.
90. Martin, R.H., Spriggs, E., Ko, E., Rademaker, A.W. (1995). The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet*, 57(6):1395-9.

91. Martini, E., von-Bergh, A.R., Coonen, E., de-DieSmulders, C.E., Hopman, A.H., Ramaekers, F.C., Geraedts, J.P. (1998). Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet*, 102(2):157-65.
92. Marquez, C., Sandalinas, M., Bahce, M., Alikani, M., Munne, S. (2000). Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online*, 1(1):17-26.
93. McKelvey-Martin, V.J., Melia, N., Walsh, I.K., Johnston, S.R., Hughes, C.M., Lewis, S.E., Thompson, W. (1997). Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res*, 29;375(2):93-104.
94. McPherson, S., Longo, F.J. (1993). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem*, 37(2):109-28.
95. McVicar, C.M., McClure, N., Williamson, K., Dalziel, I L.H., Lewis, S.E.(2004). Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril*, 81(1):767-7.
96. McFadyen, I.R., (Ed.) Rodeck, C. (1989) Early fetal loss. In *Fetal Medicine*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publishers, pp. 26–43.
97. Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K., Kardon, N.B. (2005). Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med*, 7(4):251-63.

98. Mroz, K., Hassold, T.J., Hunt, P.A. (1999). Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod*, 14(5):1151-6.
99. Munné, S., Cohen, J. (1998). Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update*, 4:842-855.
100. Munne, S. (2003). Preimplantation Genetic Diagnosis and Human Implantation- A Review. *Placenta* 24:70–76.
101. Munné, S., Alikani, M., Tomkin, G. (1995). Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*, 64:382-391.
102. Munne, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Fung, J., Gianaroli, L., Cohen, J. (2000). Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril*, 73(6):1209-18.
103. Munné, S., Cohen, J., Sable, D. (2002). Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril*, 78: 234–36.
104. Munné, S., Magli, C., Cohen, J. (1999). Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod*, 14: 2191–99.
105. Munne, S., Magli, C., Bahce, M., Fung, J., Legator, M., Morrison, L., Cohert, J., Gianaroli, L. (1998). Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn*, 18(13):1459-66.
106. Munne, S., Bahce, M., Sandalinas, M., Escudero, T., Marquez, C., Velilla, E., Colls, P., Oter, M., Alikani, M., Cohen, J. (2004). Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online*, 8(1):81-90.

107. Munne´, S., Lee, A., Rosenwaks, Z., Grifo, J., Cohen, J. (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Human Reprod*, 8:2185–2191.
108. Moutou, C., Gardes, N., Viville, S.(2004). New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. *Eur J Hum Genet*. 12(12):1007-14.
109. Navot, D., Drews, M.R., Bergh, P.A. (1994). Age related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril*, 61: 97-101 .
110. Obasaju, M., Kadam, A., Biancardi, T., Sultan, T., Fateh, M., Munné, S. (2001). Pregnancies from single normal embryo transfer in women older than 40 years. *Reprod Biomed Online*, 2(2); 98-101.
111. Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T.F., Steeno, O (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum Reprod Update*, 1(6):543-57.
112. Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S. and Suzumori, K. (2000) Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril*, 73:300-304.
113. Ogilvie, C.M., Braude, P., Scriven, P.N. (2001). Successful pregnancy outcomes after preimplantation genetic diagnosis (PGD) for carriers of chromosome translocations. *Hum Fertil*, 4(3):168-71.
114. Palermo, G.D., Schlegel, P.N., Sills, E.S., Veeck, L.L., Zaninovic, N., Menendez, S., Rosenwaks, Z. (1998). Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med*, 338(9):588-90.

115. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 4;340(8810):17-8.
116. Pang M.G., Kim, Y.J., Lee S. H., Kim C.K. (2005). The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Human Reproduction* 20(6):1688-1694.
117. Pehlivan, T., Rubio, C., Rodrigo, L., Romero, J., Remohi, J., Simon, C., Pellicer, A. (2002) Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online*, 6:232–7.
118. Pellestor, F., Girardet, A., Andréo, B., Arnal, F., Humeau, C. (1994). Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev*, 39: 141–46.
119. Pellicer, A., Rubio, C., Vidal, F., Minguez, Y., Gimenez, C., Egozcue, J., Remohi, J., Simon, C. (1999) In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril*, 71:1033–1039.
120. Philipp, T., Kalousek, D.K. (2002). Generalized abnormal embryonic development in missed abortion: embryoscopic and cytogenetic findings. *Am J Med Genet*, 22;111(1):43-7.
121. Poccia, D. (1986). Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol*, 105:1-65.
122. Raziel, A., Friedler, S., Schachter, M., Kasterstein, E., Strassburger, D., Ron-El, R. (2002) Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 78, 515–519.

123. R.J.M., Gardner, Sutherland G.R. (1996). Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (Oxford Monographs on Medical Genetics), p:115-133.
124. Ruangvutilert, P., Delhanty, J.D., Serhal, P., Simopoulou, M., Rodeck, C.H., Harper, J.C. (2000). FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn*, 20(7):552-60.
125. Robinson, W.P., McFadden, D.E., Stephenson, M,D, (2001) The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *Am J Hum Genet*, 69, 1245–1254.
126. Rubio, C., Simon, C., Blanco, J., Vidal, F., Minguez, Y., Egozcue, J., Crespo, J., Remohi, J., Pellicer, A. (1999). Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet*, 16(5):253-8.
127. Rubio, C., Gil-Salom, M., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Minguez, Y., Remohi, J., Pellicer, A.(2001). Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*, 16(10):2084-92.
128. Rubio, C., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohi, J., Pellicer, A. (2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod*, 18:182-8.
129. Rubio, C., Rodrigo, L., Perez-Cano, I., Mercader, A., Mateu, E., Buendia, P., Remohi, J., Simon, C., Pellicer, A. (2005). FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online*, 11:497-506.
130. Sakkas, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G., Bizzaro, D., Bianchi, U. (1995). Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm

chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 52:1149-55.

131. Sandalinas, M., Sadowy, S., Calderon, J. (2001). Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage, *Hum Repr Vol*, 16:9;1954-58.
132. Saleh, R.A., Agarwal, A., Nada, E.A., El-Tonsy, M.H., Sharma, R.K., Meyer, A., Nelson, D.R., Thomas, A.J. (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*, Suppl 3:1597-605.
133. Sawyer, D.E., Roman, S.D., Aitken, R.J. (2001). Relative susceptibilities of mitochondrial and nuclear DNA to damage induced by hydrogen peroxide in two mouse germ cell lines. *Redox Rep*, 6:182-4.
134. Sermon, K., Steirteghem, A.,V., Liebaers, I. (2004). Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet*, 363: 1633–41.
135. Shah, K., Sivapalan, G., Gibbons, N., Tempest, H., Griffin, DK. (2003). The genetic basis of infertility. *Reproduction*,. 126(1):13-25.
136. Sherman, S.L., Peterson, M.B., Freeman, S.B. (1994). Nondisjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal agedependent mechanism involving reduced recombination. *Hum Mol Genet* 3:1529–1535
137. Shenfield, F., Pennings, G., Devroey, P., Sureau, C., Tarlatzis, B., Cohen, J. (2003). ESHRE Ethics Task Force. Taskforce 5: preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*, 18:649-51.

138. Shen, H., Ong, C. (2000). Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med*, 28:529–36.
139. Shi, W., Haaf, T. (2002). Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev*. 63(3):329-34.
140. Silber, S., Escudero, T., Lenahan, K., Sadowy, S., Abdelhadi, I., Kilani, Z., Munne, S. (2003) Chromosomal abnormalities in embryos derived from TESE. *Fertil Steril*, 79:30–38.
141. Simpson, J.L., Lamb, D.J. (2001). Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. *Semin Reprod Med*, 19(3):239-49
142. Singh, N.P., Muller, C.H., Berger, R.E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 80(6):1420-30.
143. Staessen, C., Van-Assche, E., Joris, H. (1999). Clinical experience of sex determination by fluorescent in situ hybridisation for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod*, 5: 392–99.
144. Stern, J.J., Dorfman, A.D., Gutierrez-Najar, M.D. (1996). Frequency of abnormal karyotype among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril*, 65, 250–253.
145. Sun, J.G., Jurisicova, A., Casper, R.F. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 56(3):602-7.
146. Tachdjian, G., Frydman, N., Morichon-Delvallez, N., Du, A.L., Fanchin, R., Vekemans, M., Frydman, R. (2003). Reproductive genetic counselling in

non-mosaic 47,XXY patients: implications for preimplantation or prenatal diagnosis: Case report and review *Hum Reprod*, 18(2):271-5.

147. Tesarik, J., Mendoza, C., Greco, E. (2002). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod*, 7(1):184-9.
148. Tuncbilek, E. (2001). Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk J Pediatr*, 43(4):277-9.
149. Twigg, J.P., Irvine, D.S., Aitken, R.J. (1998). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13(7):1864-71.
150. Van-Assche, E., Staessen, C., Vegetti, W., Bonduelle, M., Vandervorst, M., Van-Steirteghem, A., Liebaers, I. (1999). Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod*, 5(7):682-90.
151. Van de Velde, H., DeVos, A. Sermon, K. (2000). Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diag*, 20:1030–1037.
152. Van Hummelen, P., Manchester, D., Lowe, X., Wyrobek, A.J. (1997). Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four-probe multicolor FISH in sperm. *Am J Hum Genet*. 61(3):651-9.
153. Vandervorst, M., Liebaers, I., Sermon, K., Staessen, C., De Vos, A., Van de Velde, H., Van Assche, E., Joris, H., Van Steirteghem, A., Devroey, P. (1998). Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod*, 13(11):3169-76.

154. Warburton, D., Kline, J., Stein, Z. (1986). Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In Porte, I, H and Wiley, A.(eds), *Perinatal Genetics:Diagnosis and treatmen*. Acedemic Pres, New York. p:133-148.
155. Vegetti, W., Van Assche, E., Frias, A., Verheyen, G., Bianchi, M.M., Bonduelle, M., Liebaers, I., Van, Steirteghem, A. (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod*, 15:351-65.
156. Vidal, F., Blanco, J., Egozcue, J. (2001). Chromosomal abnormalities in sperm. *Mol Cell Endocrinol*, 22;183 Suppl 1:51-4.
157. Vidal, F., Gimenez, C., Rubio, C., Simon, C., Pellicer, A., Santalo, J., Egozcue, J. (1998). FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet*, 15(5):310-3.
158. Ward, W.S., Coffey, D.S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, 44:569-74.
159. Warburton, D., Stein, Z., Kline, J., Susser, M. (1980) Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: data from the New York city study. In *Human Embryonic and Fetal Death* (Eds) Porter LH and Hook EB. New York: Academic Press, pp. 261–287.
160. WHO (1999) World Health Organisation. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction, 4th edn. University of Cambridge Press, Cambridge.

161. Wilton, L. (2005). Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization *Human Reproduction Update*, 1: 33–41
162. Wilton, L. J., Williamson, R., McBain, J., Edgar, D. and Voullaire, L. (2001). Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridisation. *N. Engl. J. Med*, 345, 1537–1541.
163. Zenzes, M.T., Casper, R.F. (1992). Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet*, 88: 367–75.
164. Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., Zenzes, M.T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, 75:674–7.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İzmir' de doğdum. İlköğrenimim Mürşide Akyüz ilkokulu'nda tamamladım. Karşıyaka Gazi Lisesi'nde ortaokul, Bursa Fen Lisesi'nde lise öğrenimimi tamamladıktan sonra 1992 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 1998 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2000 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Doktora programına başlayıp ardından özel öğrenci olarak derslerimi tamamladım. 2001 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik doktor programına başladım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Yabancı dilim İngilizcedir.