

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONİNVAZİV PREİMLANTASYON GENETİK TARAMA
YÖNTEMLERİ:
UMUDA YOLCULUK**

Begüm ALYÜRÜK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2020

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONİNVAZİV PREİMLANTASYON GENETİK TARAMA
YÖNTEMLERİ: UMUDA YOLCULUK**

Begüm ALYÜRÜK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Serdar FİLİZ

Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.

KOÜ BAP Proje Numarası: 2018/025

Etik Kurul Onay Numarası: KOÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu KİA 2017/275

KOCAELİ

2020

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Noninvaziv preimplantasyon genetik tarama yöntemleri: Umuda yolculuk

Tez yazarı: Begüm ALYÜRÜK

Tez savunma tarihi: 06.03.2020

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar FİLİZ

Bu çalışma, sınav kurumumuz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURUL ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN (ÜYE)	Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN	
DANIŞMAN	Prof. Dr. Serdar FİLİZ	
ÜYE	Prof. Dr. Melda Yardımoğlu YILMAZ	
ÜYE	Doç. Dr. Emek DOĞER	
ÜYE	Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK	
ÜYE	Dr. Öğr. Ü. Hakan SOYLU	

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

06/03/2020

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Noninvaziv Preimplantasyon Genetik Tarama Yöntemleri: Umuda Yolculuk

Amaç: Preimplantasyon genetik tanı (PGT), embriyoların uterusu yerleştirilmeden önce genetik anomalileri embriyo aşamasında tespit etmek için gerçekleştirilen bir uygulamadır. Çalışmamızın amacı, genetik analiz için invaziv bir yöntem olan biyopsi işleminin yerine noninvaziv yöntemlerin uygulanabilirliğini ve rutinde kullanılabilirliğini araştırmaktır.

Yöntem: Araştırmamızda Kocaeli Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Ünitesinde infertilite nedeniyle tedaviye başlayıp PGT önerilen ve bu işlemi kabul eden hastalarımızın embriyoları kullanılmıştır. Dölleme ve embriyo gelişimlerini takiben 3.gün PGT işlemine tabi tutulabilecek embriyolar seçilerek DNA analizi için blastomer biyopsisi yapılmış, embriyoların 5. gün sonunda arta kalan atık kültür medyumları da alınarak, bu 2 materyal DNA eldesi için genetik analize yollanmıştır. Aynı embriyoya ait blastomer biyopsisi ve atık medyuma ait DNA analizleri NGS yöntemi ile 24 (22+X+Y) kromozomun taranmasıyla karşılaştırılmış, genetik analiz sonuçlarının korelasyonuna bakılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda toplam 49 adet örnek analize alınmıştır. Bunlardan 48 tanesinde blastomer biyopsisi (%97.9) ve atık kültür medyumundan (%97.9) DNA elde edilebilmiştir. Amplifikasyon sonrası ortalama DNA oranı 21.9 ng/ μ l' dir. 47 adet amplifiye edilmiş örneğin 38 tanesi (%80.8) genel ploidi durumu bakımından (öplid/anöplid) uyum göstermektedir. 45 adet anöplidik blastomerin atık medyumunun 37 tanesinde (%82.2) anöplidi bakımından uyum gözlenmiştir. 45 adet anöplidik blastomerin 16'sının atık medyumunda en az 1 adet aynı kromozomal anormallik gözlenmiştir (%35.5). Çalışmamızda 5.gün atık kültür medyum duyarlılığı 0.82, özgüllüğü 0.5, pozitif prediktif değer 0.97, negatif prediktif değer 0.11, tanısal doğruluk değeri 0.81 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Bulgularımız çoğu araştırmayı destekler niteliktedir. Örnekler arası ploidi korelasyonları yüksek oranda uyum gösterse de aynı kromozoma ait anormallik oranı düşük bulunmuştur. Yapılacak birçok ek çalışma ile materyal ve analiz yöntemlerinin geliştirilerek uygulanabilirliğin artacağını düşünmekle birlikte, bu yöntemin gelecekte rutin olarak kullanılmasını ümit etmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Preimplantasyon Genetik Tanı, Blastomer Biyopsisi, Atık Kültür Medyumu, NGS

ABSTRACT

Noninvasive Preimplantation Genetic Screening Methods: A Journey to Hope

Objective: PGS is a process for examining the genetic structures of embryos developed during placement into the uterus. The aim of this study to investigate the applicability and routine use of noninvasive methods instead of biopsy which is an invasive method for genetic analysis.

Method: In our research, we will use the embryos of our PGS recommended patients at Kocaeli University Hospital IVF Unit who started treatment due to infertility and accepted this procedure. After fertilization and embryo development, the embryos that could be subjected to PGS treatment were selected on the 3rd day and blastomer biopsy was performed for DNA analysis. At the end of the 5th day of the embryos, the spent embryo culture media were taken and these two materials were sent to genetic analysis for DNA extraction. Genetic analysis of the same embryos derived from blastomer biopsy and spent embryo culture media will be compared with the NGS method using a 24 (22 + X + Y) chromosome scanning.

Results: A total of 49 samples were analyzed. In 48 of these, DNA was obtained from blastomer biopsy (%97.9) and spent culture media (%97.9). The average DNA ratio after amplification was 21.9 ng / μ l. Of the 47 amplified samples, 38 were consistent in general ploidy status (euploid / aneuploid). In 37 out of 45 cases of blastomer aneuploidy (%82.2), the spent culture medium concordantly was evaluated as aneuploid. At least one chromosomal aberration was found concordant in 16 out of 45 embryos (%35.5) found to be aneuploid by both blastomer and culture media analysis. Day 5 cell free DNA in spent culture media sensitivity and specificity were 0.50 and 0.82 respectively. Positive predictive value and negative predictive value were 0.97 and 0.11, respectively. The diagnostic accuracy value is 0.81.

Conclusions: Our findings support most of the research. The ploidy correlations between samples were highly consistent, but the same chromosome abnormality rate was low. Many additional studies will improve the applicability of materials and analysis methods and we hope that this method will be used routinely in the future.

Keywords: Preimplantation Genetic Screening, Blastomer Biopsy, Spent Embryo Culture Medium, NGS.

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, ilgi, sabır ve katkıları nedeniyle çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serdar FİLİZ' e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan değerli Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin genetik analiz ve NGS ile ilgili deney ve değerlendirmelerinde büyük emeği olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan İstanbul GENETİKS Sağlık Hizmetleri' ne özellikle Dr. Y. Hakan ÖZÖN' e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin istatistik çalışmalarında her türlü yardım ve desteği sağlayan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Canan BAYDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde fikir ve önerileriyle bana destek olan, plan ve kurgu aşamasından yazım aşamasına kadar her basamakta sonsuz desteği ve emeği geçen değerli çalışma arkadaşım Uzm. Embriyolog Gözde KAYA' ya, ayrıca plan ve yazım aşamasında fikrini aldığım değerli arkadaşım Uzm. Embriyolog Ender YALÇINKAYA KALYAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen, hayat boyu yanımda olan, önüme çıkan her zorlukta bana yol gösteren aileme çok teşekkür ederim.

Begüm ALYÜRÜK

KOCAELİ, Mart 2020

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

06/03/2020

Begüm ALYÜRÜK



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÇİZİMLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 İnfertilite Nedir?	1
1.2. İnfertilite Nedenleri	1
1.2.1. Kadın İnfertilitesi ve Nedenleri	2
1.2.1.1. Ovulatuvar bozukluklar:.....	2
1.2.1.2. Uterin faktörler	3
1.2.1.3. Tubal-peritoneal faktörler	4
1.2.1.4. Servikal ve immunolojik infertilite	5
1.2.1.5. Genetik nedenler	5
1.2.2. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri.....	5
1.2.2.1. Testiküler nedenler:.....	6
1.2.2.2. Post testiküler nedenler (sperm transport problemleri) :.....	8
1.2.2.3. Hipotalamik-hipofizer hastalıklar:	9
1.2.3. Açıklanamayan İnfertilite.....	12
1.3. Preimplantasyon Genetik Test Nedir?.....	12
1.3.1. Tarihçe	13
1.4. Embriyonal Analiz Yöntemleri ve Genetik Materyalin Kaynağı.....	13
1.4.1. Polar Cisim Biyopsisi	13
1.4.2. Klivaj Evre Blastomer Biyopsisi	14
1.4.3. Trofektoderm Biyopsisi	15
1.5. Kromozomal Anomaliler.....	17
1.5.1. Sayısal Kromozomal Anomaliler:.....	17
1.5.1.1. Öploidi.....	17
1.5.1.2. Anöploidi.....	17
1.5.1.3. Miksoploidi (Mozaisizm, Kimerizm).....	18
1.5.2. Yapısal Kromozomal Anomaliler.....	18
1.5.2.1. Translokasyonlar	18
1.5.2.2. İnversiyonlar	18
1.5.2.3. Delesyonlar.....	18

1.5.2.4. Duplikasyonlar	18
1.6. PGT İşleminde Kullanılan Yöntemler	19
1.6.1. Tek Hücre Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	19
1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	19
1.6.3. HLA (Human Lökosit Antijeni) Doku Tayini	20
1.6.4. FISH Tekniği	20
1.6.5. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon(CGH)ve array-CGH(aCGH)Yöntemi ...	20
1.6.6. Yeni Nesil Dizileme (NGS)	22
1.7. PGT Endikasyonları	22
1.7.1. Genetik Geçişli Hastalıklar	22
1.7.2. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlıkları (TİB)	23
1.7.3. İleri Maternal Yaş	23
1.7.4. Erkek İnfertilitesi	23
1.7.5. Açıklanamayan İnfertilite	23
1.8. Non-invaziv Preimplantasyon Genetik Tanı Yöntemleri	23
2. AMAÇ	25
3. YÖNTEM	26
3.1. Hasta Seçimi ve Veri Toplanması	26
3.2. IVF Protokolü	26
3.2.1. Sperm Toplanması	26
3.2.1.1. Swim-up (yukarı yüzdürme) yöntemi	26
3.2.1.2. Gradient yöntemi	27
3.2.2. Oosit Toplanması ve Embriyo Kültürü	27
3.3. Biyopsi İşlemi	28
3.4. Genetik Analiz	29
3.5. Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve İstatistik	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	76
EKLER	78
EK 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu	78
EK 2. Tez Denetleme Listesi	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ l: Mikrolitre

aCGH: Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

ADO: Allel Drop Out

AMH: Antimüllerian Hormon

AZF: Azospermik Faktör

°C: Santigrat Derece

CFTR: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör Gen

CGH: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

DNA: Deoksiribonükleik Asit

diğ.: Diğerleri

ESHRE: Avrupa Üreme Tıbbı ve Embriyoloji Derneği

FISH: Floresan in Situ Hibridizasyon

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

gb: Gigabayt

HLA: Human Lökosit Antijeni

HSA: İnsan Serum Albümininin

HSG: Histerosalpingografi

ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IVF: In-Vitro Fertilizasyon

İHK: İç Hücre Kitlesi

LH: Lüteinize Edici Hormon (LH)

ml: Mililitre

ng: Nanogram

NGS: Yeni Nesil Dizileme

NOA: Non-Obstrüktif Azoospermi

NPV: Negatif Prediktif Değer

OAT: Oligoastenoteratozoospermi
OPU: Oosit Toplama İşlemi
PB: Polar Cisimler
PBS: Fosfatla Tamponlanmış Tuz Solüsyonu
PCOS: Polikistik Over Sendromu
PGT: Preimplantasyon Genetik Tanı
PPV: Pozitif Prediktif Değer
PSG: Preimplantasyon Genetik Tarama
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm: Dakika Başına Devir
TE: Trofoektoderm
TİB: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlıkları
TSPY: Testis Spesifik Protein Y
TVUSG: Transvajinal Ultrasonografi
WGA: Tüm Genom Amplifikasyonu
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
YÜT: Yardımcı Üreme Yöntemleri

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Polar cisim biyopsisi (A), 8-10 hücreli bölünme aşamasında embriyoya uygulanan blastomer biyopsisi (B), blastokist aşamasında embriyoya uygulanan trofektoderm biyopsisi (C).....	16
Çizim 1.2. Yapısal kromozom anomalilerin gösterimi.....	19
Çizim 1.3. CCH ve array CGH yöntemlerinin karşılaştırılması.....	21
Çizim 3.1. Zigottan blastosiste kadar embriyo gelişim embriyoları.....	28
Çizim 4.1. Blastomerde saptanmış Monozomi 2 ve Monozomi X (44.embriyo).....	35
Çizim 4.2. Atık kültür medyumunda saptanmış Monozomi 2 ve Monozomi X.....	35
Çizim 4.3. Blastomerde saptanmış Monozomi 19 (47.embriyo).....	36
Çizim 4.4. Atık kültür medyumunda saptanmış Monozomi 19 (47.embriyo).....	36
Çizim 4.5. Blastomerde saptanmış Trizomi 21 (49.embriyo).....	36
Çizim 4.6. Atık kültür medyumunda saptanmış Trizomi 21 (49.embriyo).....	37
Çizim 4.7. Monozomi 8 saptanmış blastomer (45.embriyo).....	37
Çizim 4.8. Monozomi 6 saptanmış atık kültür medyumunu (45.embriyo).....	37
Çizim 4.9. Öploidik blastomer (4. embriyo)	38
Çizim 4.10. Atık kültür medyumunda saptanmış öploid (4. embriyo).....	38
Çizim 4.11. Trizomi 21 saptanmış anöploidik blastomer (21.Embriyo).....	38
Çizim 4.12. Öploidik atık kültür medyumunu (21.embriyo).....	39
Çizim 4.13. Monozomi 16 ve Trizomi 8 saptanmış blastomer (24.embriyo).....	39
Çizim 4.14. Öploidik atık kültür medyumunu (24.embriyo).....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnfertilite Nedenleri.....	2
Çizelge 1.2. Kadın İnfertilitesi Nedenleri.....	2
Çizelge 1.3. İnfertiliteye neden olan testiküler hastalıklar.....	8
Çizelge 1.4. Biyopsi seçenekleri ve bunların PGT için karşılaştırmaları.....	16-17
Çizelge 4.1. Blastomer ve atık kültür medyumundan amplifiye edilen DNA ve analiz sonuçları.....	32-33-34-35



1. GİRİŞ

1.1 İnfertilite Nedir?

İnfertilite, çiftlerin haftada iki gün düzenli cinsel ilişkide bulunmasına rağmen bir yıl süre ile korunmaksızın gebe kalamaması durumudur (Kişnişçi ve ark. 1996). Gün geçtikçe infertilite oranlarında artış gözlenmektedir. Günümüzde üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 15'inde infertiliteye rastlanır. Nedenleri ve sıklığı toplumdan topluma farklılık gösterir. Çiftlerde infertilitenin %40-50'sinden kadın, %30-40'ından erkek sorumludur. %10-15'inde ise açıklanamayan faktör olarak bilinen günümüzdeki mevcut standart tanısal testler ile açıklanamayan infertilite gözlenir (Kişnişçi ve diğ. 1996, Shoham ve diğ. 1991).

Overlerdeki oosit sayısı ilk oluştuğu andan itibaren atrezi sürecine girerek progresif olarak azalma eğilimi gösterir. Dişi fetuslarda gebeliğin 20. haftasında oosit sayısı 5-7 milyon iken, doğumda 1-2 milyona, puberte döneminde 300.000-500.000'e, 35-37 yaşından sonra 25.000'e, menopoz döneminde ise yaklaşık 1.000'e düşer (Committee on Gynecologic Practice of American College, 2008).

Hem erkeklerde hem kadınlarda fertilite yaşla beraber azalır. Fertilitenin yaşa bağlı düşmesi kadınlarda daha belirgindir. 30'lu yaşlardan sonra kadınlarda fertilite belirgin derecede düşüş gösterir. Erkeklerde ise semen parametrelerinde bozulma 35 yaşından sonra saptanabilir. Fakat 50 yaşından önce belirgin bir düşüş gözlenmemektedir (Dunson ve diğ. 2004).

Beslenme tarzı ve yaşam biçimi fertilite üzerine etkilidir. Çok zayıf veya çok şişman kadınlarda fertilite belirgin olarak azalır. Sigara, aşırı alkol ve kafein tüketimi, medikal ve çevresel toksinler fertiliteyi olumsuz etkilemektedir (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008).

İnfertilitenin artış göstermesiyle oluşan talebe bağlı olarak yardımcı üreme tekniklerinde son 20 yılda önemli gelişmeler olmuştur. Teknolojinin ilerlemesiyle analiz imkanları artmış, araştırmacıların da bu konuya yönelmesine yol açmıştır.

1.2. İnfertilite Nedenleri

Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı çok merkezli bir çalışmada, infertil çiftlerin %38'sinde kadın faktörü, %20'sinde erkek faktörü, %27'sinde hem erkek hem kadın faktörü, %15'inde ise açıklanamayan infertilite gözlenmektedir (Comhaire ve diğ. 1987).

Çizelge 1.1. İnfertilite Nedenleri

İnfertilite Nedenleri

Kadın Faktörü	% 38
Erkek Faktörü	% 20
Erkek ve Kadın Faktörü	% 27
Açıklanamayan İnfertilite	% 15

1.2.1. Kadın İnfertilitesi ve Nedenleri

Ovulatuvar bozukluklar en sık görülen kadın infertilitesi nedenidir. Diğer nedenleri de Çizelge 1.2’de belirtilmiştir. Bunlar tüm nedenlerin %81’ini oluştururlar (Boyras 2013).

Çizelge 1.2. Kadın İnfertilitesi Nedenleri

Kadın İnfertilitesi Nedenleri

Ovulatuvar Bozukluklar	% 25
Endometriyozis	% 15
Tubal Tıkanıklıklar	% 11
Tubal Patolojiler	% 11
Pelvik Adezyonlar	% 12
Hiperprolaktinemi	% 7

1.2.1.1. Ovulatuvar bozukluklar:

Kadına bağlı infertilitenin en çok görülen nedenidir. Ovulasyon; hipofiz hipotalamus, ve over döngüsünün dengesiyle çalışır. Bu aksın herhangi bir aşamasındaki bozukluk sonucu ovulatuvar bozukluklar oluşabilir. Anovulasyon, amenore ve adet düzensizlikleriyle kendini gösterir (Hoff ve diğ. 1983, WHO 1980). Her ay düzenli oosit atılamadığı için anovulasyon infertilite veya oligoovulasyon ile sonuçlanır. Her ay düzenli adet gören, bulantı, memede hassasiyet ve dismenore gibi menstrual semptomları olan kadınlar tipik olarak ovulatuvardır. Endokrin hastalıklar ovulatuvar bozukluğa yol açarak infertiliteye neden olur (Boyras 2013).

Prolaktinoma en sık görülen hipofizer tümördür. Kanda prolaktin seviyesinin artmasına neden olur. Gebelikte, laktasyon sırasında ve stres ile konsantrasyonu fizyolojik olarak yükselir. Ayrıca renal hastalıklarda, hipotiroidizm ve dopamin antagonisti gibi ilaçlarla patolojik olarak yükselebilir. Hiperprolaktinemi, gonadotropin salgılatıcı hormon salınımını bozarak ovulatuvar disfonksiyona neden olur (Melmed ve diğ. 2011).

İnfertil hastalarda en sık görülen nedenlerden biri de tiroid hastalıklarıdır. Hipotiroidi ve hipertiroidi şeklinde kendini gösterir. Hipotiroidili kadınlarda primer veya sekonder infertilite sıklığı %6.2 olarak bulunmuştur. Hipertiroidili kadınlarda ise prevalans %5.8'dir (Joshi ve diğ. 1993).

Polikistik over sendromu (PCOS), ovulatuvar fonksiyon bozukluğu ile ilgili bir diğer hastalıktır. Tanısında Rotterdam kriterleri kullanılır. Klinik özellikler açısından geniş bir spektruma sahip heterojen bir hastalıktır (Rotterdam 2004). Buna göre hiperandrojenizmin klinik veya biyokimyasal bulguları, oligo-anovulasyon ve ultrasonografi ile overlerdeki polikistik over görünümü bulgularından en az 2 tanesinin bulunması ile PCOS tanısı konulur. Bu hastalığı tanımlayan ultrasonografi kriteri; çapı 10 mm'den küçük 12 veya daha fazla subkapsüler yerleşimli overyan kistlerin olmasıdır (Balen ve diğ. 2003). PCOS prevalansı yeni Rotterdam kriterlerinin kullanımı ile %18 olarak bulunmuştur. Bu hastaların %60'ı fertildir (March ve diğ. 2010, Brassard ve diğ. 2008).

Prematür overyan yetmezlik, over nedenli infertilitenin diğer bir nedenidir. Normal over fonksiyonlarının 40 yaşından önce bozulmasıdır. 35 yaşında kadınların 1/250'sini etkiler. En sık görülen semptomlar; adet düzensizliği, vajinal kuruluk ve sıcak basmasıdır. Düşük östradiol seviyesi, tanısı artmış folikül uyarıcı hormon (FSH) ve düşük antimüllerian hormon (AMH) seviyesi ile konulabilir. Hereditör ve otoimmün nedenlerden dolayı etyolojide rol oynayabilir. Fakat çoğu kadında nedeni bilinmemektedir (Unuane 2011).

1.2.1.2. Uterin faktörler

Uterin nedenlerin temelini mekanik veya endometrial reseptivitede azalmaya bağlı implantasyon başarısızlığı oluşturur. Konjenital malformasyonlar, intrauterin adezyonlar, miyomlar ve endometrial polipler uterin anormalliklerdendir. Monoklonal tümörlerden olan miyomlar, uterusun düz kasından köken alırlar.

İnfertilite ile miyomlar arasındaki ilişki tartışmalıdır. Miyomların fertilitiyi etkileme mekanizmaları; ovum ve sperm transportunu engelleyen bozulmuş uterin kontraktilete, tüplerin interstisyel kısmını tutan kornual tıkanma ve fokal endometrial ülserasyona neden olan bölgesel kan akımında azalmadır (Vollenhoven ve diğ. 1990). Uterin anomaliler genellikle gebe kalabilme potansiyelini etkilememektedir. Gebelik kayıpları ve obstetrik komplikasyonlarla ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda fertil ve infertil kadınlarda uterin septum sıklığının benzer ve yaklaşık %1 olduğu fakat tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda daha yüksek olduğu (%3-5) bulunmuştur. Uterin septum, tüm konjenital uterin anomaliler içerisinde en sık görülen obstetrik komplikasyonlarla ve reproduktif yetersizlik ile ilişkili olan anomalidir (Homer ve diğ. 2000).

İntrauterin adezyonlarda en sık görülen semptomlar; amenore, hipomenore, dismenore gibi menstrüel bozukluklar ve infertilitedir. Patofizyolojisi travma sonrası endometrium fonksiyonunda bozulma ve damarlanmadır (Al-Inany 2001). Etyolojide gebelik kaybı, postpartum veya istemli gebelik sonlandırması nedeniyle yapılan küretaj işlemleri önemli yer tutmaktadır. Diğer nedenler arasında enfeksiyöz veya kronik inflamatuvar durumlar, submüköz miyomlar için yapılan miyomektomi işlemi sayılabilir (Westendorp ve diğ. 1998). İnfertil kadınlar arasında endometrial polip sıklığı %3-5'dir (La Torre ve diğ. 1999). Endometriozisi veya anormal uterin kanaması olan kadınlarda prevalansı daha yüksektir. HSG (histerosalpingografi) veya TVUSG (transvajinal ultrasonografi) ile tanınabilirler (Kim ve diğ. 2003).

Endometriozis; endometrial bez ve stromanın endometrium dışında ektopik olarak bulunmasıdır. İnfertil kadınların %20-40'ında görülen, infertilitenin ve pelvik ağrının eşlik ettiği benign bir hastalıktır. İnfertilite ile güçlü bir ilişki gösterir. Endometriozis ile ilişkili infertilitede, ovulasyon sonrası ovum yakalanmasını engelleyen ya da inhibe eden, pelvik adezyonlara bağlı bozulmuş adneksiyel anatomi, oosit gelişimi veya erken embriyogenezin engellenmesi, salgılamış olduğu sitokinlerle azalmış endometrial reseptiviteye yol açması sorumlu mekanizmalar olarak açıklanmaktadır (Cramer ve Missmer 2002, D'Hooghe, 2003).

1.2.1.3. Tubal-peritoneal faktörler

Tubalarda veya peritoneal bölgede hasar veya tıkanıklık sonucu meydana gelen sık görülen infertilite anomalilerindedir. Kadın infertilitesinin %30-35 oranından tubal ve peritoneal faktörler sorumludur (Miller ve diğ. 1999).

Tuba uterina'ların içindeki sıvının aktivitesi, motilitesi ve tüp içindeki epitel hücrelerinin silier aktivitesindeki hasar infertiliteye zemin hazırlamaktadır (Kavlak ve Saruhan 2002).

Tubal faktörlerin etkisiyle sperm ve oositin transportu bozularak infertiliteye neden olur. Bu infertilitenin en sık nedeni; pelvik inflamatuvar hastalıktır (Westrom 1995). Diğer sık nedenler ise; daha önce geçirilmiş ameliyatlara bağlı yapışıklıklar ve ciddi endometriozistir. Tüpün distal kısmının obstrüksiyonu hidrosalpinkis ile sonuçlanabilir. Hidrosalpinkis sperm ve oositin transportunda bozulma oluşturur. Bu duruma ek tubal içeriğin endometrial kaviteye retrograd akımı sonucu embriyonun implantasyonunda bozulmaya neden olur. IVF (in vitro fertilizasyon) başarısı hidrosalpinkisin çıkarılması ile artar (Strandell ve diğ. 2001). Bu nedenle IVF'den önce salpenjektomi yapılması hidrosalpinkisi olan tüm kadınlara önerilir (Johnson ve diğ. 2010).

1.2.1.4. Servikal ve immunolojik infertilite

Servikal mukus ejakülden spermeleri yakalayarak anormal morfolojili spermeleri filtre eder, diğer seminal proteinleri ayırır ve sperm için rezervuar görevi yapar. Bu şekilde sperm canlı kalma süresini uzatır (Eggert-Kruse ve diğ. 1995). Servikte ve servikal mukusta meydana gelen bozukluk, sperm geçişini etkileyeceğinden infertiliteye neden olmaktadır.

Menstrüel siklus boyunca steroid hormon seviyelerinde değişikliklere bağlı olarak servikal mukusun yapısında değişim olmaktadır. Östrojen, foliküler faz boyunca servikal mukus üretimini, akışkanlığını ve miktarını artırarak sperm geçişine olanak sağlar. Progesteron ise servikal mukus akışkanlığını ve üretimini azaltarak sperm geçişine engel olur. Servikal mukustaki siklik değişiklikler, gebelik olasılığının ovulasyona yaklaştıkça artmasını açıklar (Chretien 2003, Katz ve diğ. 1997, Katz 1991). Ovulasyona yakın dönemlerde incilir ve 12-72 saatlik zaman diliminde sperm iletimi kolaylaşır (Akyüz 2003, Kavlak 2002).

Serviks enfeksiyonunda ya da inflamasyonunda spermelerin yapısı değişebilir ve penetrasyonu zorlaşabilir. İmmünolojik infertilite yönünden değerlendirmek için, sperm kompleman bağımlı immobilizasyon, antisperm antikörlerin tanısında sperm aglütinasyon, miks aglütinasyon testleri gibi çok çeşitli testler mevcuttur. Bu testler, fertilizasyon başarısı düşük olan çiftlerde IVF yerine doğrudan intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılması için yol gösterici olabilir (Forti ve Krausz 1998). İnfertilite üzerine servikal faktörün etkisi post koidal test adlı klasik bir yöntemle değerlendirilebilir. Test servikal kanaldan alınan, 3-4 günlük cinsel perhiz sonrası yapılan, servikal mukus ve spermelerin incelenmesidir (Aksu 2006).

1.2.1.5. Genetik nedenler

İnfertil çiftlerde anormal karyotip analizi bulunma ihtimali genel popülasyondan daha yüksektir. Kadınlarda infertilite ile ilişkili en sık görülen anöploidi 45, X (Turner sendromu), erkeklerde 47, XXY (Klinefelter sendromu)'dur (Clementini ve diğ. 2005).

1.2.2. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri

Erkek infertilitesi nedenleri dört ana grupta incelenebilir:

- Testiküler hastalıklar (Y kromozomu mikrodelsyonlarını da içeren primer testiküler defektler): %30-40
- Post testiküler nedenler (sperm transport problemleri): %10-20
- Hipotalamik hipofizer hastalıklar: %1-2

• İdiopatik (belirlenebilir bir nedenin bulunamadığı ve normal semen analizine sahip erkekler): %40-50

1.2.2.1. Testiküler nedenler:

Gelişimsel ve konjenital hastalıklar infertil erkeklerin önemli bir kısmından sorumludur. Klinefelter sendromu primer hipogonadizmin ve erkek infertilitesinin en sık nedenlerinden biridir. Bu hastalarda genellikle küçük testisler ve hemen her zaman azospermi bulunur. 1/500-700 sıklıkta görülür.

Y kromozomu mikrolezyonları, azospermi ve ciddi oligosperminin genetik nedenlerindedir (Ferlin ve diğ. 2007). % 20 kadar infertil erkekte Y kromozomunun uzun kolunda mikrolezyon vardır ve bunların çoğu azospermik faktör (AZF) olarak isimlendirilen Yq11 bölgesindedir. AZF bölgesi 3 bölüme ayrılır: AZFa, AZFb ve AZFc. AZFa ve AZFb bölgelerinin delesiyonu azospermiye ve ciddi spermatogenez defektine neden olur. Bu erkeklerin germinal hücre matürasyonunda arrest görülebilir. AZFc bölgesinin delesiyonu azospermiden oligospermiye değişen fenotipe neden olarak infertiliteye neden olur (Krausz ve Degl'Innocenti 2006, Kuroda-Kawaguchi ve diğ. 2001). Y kromozomu delesiyonları sadece azospermide veya idiyopatik oligospermide değil vas deferensin obstrüktif lezyonları, kriptorşidizm ve varikosel gibi testiküler disfonksiyonun belirlenebilir diğer nedenleri olan hastalarda da saptanabilir (Foresta ve diğ. 1999).

Kriptorşidizm, fetal gelişim sürecinde testislerin skrotuma inemeyişinden kaynaklı anomali olarak tanımlanır. Bunun sonucunda testis inguinal kanalda, abdomende veya diğer ektopik lokasyonlarda olabilir. Bilateral veya unilateral kriptorşidizm testiküler tümör riskinde artış ve spermatogenezde bozulma ile ilişkilidir (Rajfer ve diğ. 1986). Testiküler inme süreci testosteron aktivitesindeki veya sekresyon konjenital bozukluklarda daha sık görülür, androjen bağımlı bir süreçtir.

Varikosel, skrotumda panpiniform pleksus venlerindeki dilatasyon olarak tanımlanır. Sol spermatik venlerde daha düşük kan akımına bağlı olarak sol tarafta sağa göre 10 kat daha yüksek oranda varikosel görülür (Howards 1992). Varikosel ameliyatı sonrası infertilitenin düzelmesi ve hangi mekanizma ile infertiliteye neden olduğu tartışmalıdır. Sağlıklı erkek bireylerde bile %10-15 oranında bulunan varikosel, infertil erkeklerde daha yüksek oranda bulunur (Pryor ve Howards 1987).

Postreseptör anomalilere bağlı konjenital androjen insensitivitesi veya androjen insensitivitesi olan erkekler neredeyse her zaman infertildir (Griffin 1992). Normal seksüel diferansiyasyon ve spermatogenez için androjen ve normal fonksiyonel reseptör gerekir. Androjen reseptör geninde polimorfizm erkek infertilitesi ile ilişkili olabilir. Normal fertil

erkeklerde kısa trinükleotid CAG tekrarı yüksek sperm üretimi ile ilişkilidir (von Eckardstein ve diğ. 2001).

Psödohermafroditizm, 5-alfa redüktaz eksikliğine sahip erkeklerde görülen, ciddi hipospadias, küçük fallus, zayıf prostatik sekresyon ve kriptorşidizm gibi mekanik problemlere bağlı olarak görülür (Johnson ve diğ. 1986).

Nadir görülen erkek infertilitesi nedenlerinden biri de FSH reseptör gen mutasyonlarıdır. Bu hastalarda düşük serum inhibin B konsantrasyonu ve sperm sayısı, yüksek serum FSH konsantrasyonu vardır (Tapanainen ve diğ. 1997).

Östrojenin alfa reseptöründe inaktivasyona neden olan mutasyonu olan erkeklerde sperm motilitesi düşüktür; ancak sperm sayısı normaldir (Smith ve diğ. 1994).

Edinsel testiküler hastalıklar infertiliteye neden olabilir. Viral orşit, özellikle kabakulak, infertilitenin iyi tanımlanmış nedenlerindedir. Kabakulak orşiti yetişkin erkeklerin % 15-20'sinde görülürken prepubertal erkeklerde nadir görülür. Bu erkeklerin bazılarında iskemi, germinal hücre hasarı veya enfeksiyona bağlı olarak infertilite görülür. Klamidya ve gonore ve gibi seksüel geçişli hastalıklar da orşite neden olabilir. HIV (insan immün yetmezlik virüsü) ile enfekte erkeklerde normal sperm parametreleri olabildiği gibi düşük sperm motilitesi ve infertilite de olabilir (Umapathy 2005).

Birçok ilaç Leydig hücre disfonksiyonuna veya spermatogenezde bozulmaya neden olarak infertiliteye neden olabilir. Bunlar arasında en önemlisi klorambusil ve siklofosfamid gibi alkilleyici ilaçlardır. Antiandrojenler de testiküler aktiviteyi veya androjen üretimini bozarak testiküler disfonksiyona neden olabilir. İyonize radyasyon spermatogenezini bozar (Rowley ve diğ. 1974).

Sigara içmenin sperm sayısı üzerine etkisi ile ilgili çalışmaların meta analizinde, sigara içen erkeklerde düşük sperm sayısı olma ihtimalinin daha fazla olduğu, sperm DNA kırıklıklarına neden olarak infertilitenin artabileceği görülmüştür (Vine ve diğ. 1994). Yüksek testiküler ısı uzun sürdüğünde germ hücrelerinde apoptozisi artırarak infertilite ile ilişkili olabilir. Spinal kord yaralanması, varikosel ve uzun süreli sauna kullanımı yüksek testiküler ısıya neden olarak infertilite ile ilişkili olabilir (Kandeel ve Swerdloff 1988, Lue ve diğ. 1999).

Normal fertil bir erkekte günde 120 milyon adet sperm yapılmaktadır. Erkeklerin infertilite olgularına bakıldığında üreme çağındaki yaklaşık %90 kadar erkeğin infertilite nedeninde bozulmuş spermatogenez vardır (Bernard ve diğ. 2002).

Çizelge 1.3. İnfertiliteye neden olan testiküler hastalıklar

Konjenital Hastalıklar

Klinefelter sendromu (XXY)
Y kromozom delesyonları
Varikosel
Kriptorşidizm
Konjenital anorşi
Myotonik distrofi
5a Redüktaz eksikliği
Androjen insensitive sendromu

Edinsel Nedenler

Viral orşit (kabakulak, arbovirus)
Epididimo-orşit (gonore, klamidya)
Granülamatöz orşit (lepra ve tüberküloz)
İlaçlar (alkilleyici ajanlar, alkol, antiandrojenler, ketokonazol, spironolakton, histamin 2 reseptör antagonistleri)
Travma hipertermi
İyonize radyasyon
Çevresel toksinler (Karbon disülfid kadmiyum, fitoötrojenler)
İmmünolojik hastalıklar (Poliglandüler otoimmün hastalıkları içeren)
Torsiyon
Sistemik Hastalıklar (Renal yetmezlik, hepatik siroz, kanser, serkoidoz, orak hücreli anemi, vaskülit, çölyak hastalığı)

1.2.2.2. Post testiküler nedenler (sperm transport problemleri) :

Sperm transportunda ve maturasyonunda epididimisin çok önemli rolü vardır. Matür spermelerin epididimisten uretraya transportunda vas deferens görevlidir. Vas deferenste ve epididimde meydana gelen problemler infertiliteye neden olabilir. Bunlar posttestiküler nedenlerdir. Epididim obstrüksiyonu, yokluğu ve disfonksiyonu testiküler sperm üretimi normal olmasına rağmen infertiliteye neden olur (Stillman 1982). Vas deferensin bilateral ligasyonu, obstrüksiyonu infertiliteye neden olabilir. Obstrüksiyon klamidya, tüberküloz, gonore gibi enfeksiyonlardan kaynaklanabilir. Vas deferensin konjenital yokluğu infertil erkeklerin % 1-2'sinde görülür. Çoğunda kistik fibrozis transmembran regülatör gen (CFTR) mutasyonu vardır (Patrizio ve diğ. 1993). Siliya fonksiyonunu ve yapısını etkileyen primer siliyer diskinezi, heterojen genetik bir hastalıktır (Munro ve diğ. 1994, Zariwala ve diğ. 2007).

1.2.2.3. Hipotalamik-hipofizer hastalıklar:

Gonadotropin veya GnRH eksikliğine yol açan tüm hipofizer veya hipotalamik hastalıklar infertiliteye neden olabilir. Bu hastalıklar konjenital, sistemik ve edinsel hastalıklar olarak 3 grupta incelenir.

- **Konjenital idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm:** İzole gonadotropin eksikliği ile karakterize klinik durumdur. İlave olarak çoğu hastada renk körlüğü, orta hat yüz defektleri, renal malformasyonlar, işitme problemleri ve kriptorşidizm bulunur. Hipogonadizmin altında yatan neden GnRH salınımındaki defektidir (Spratt ve diğ. 1987).
- **Gonadotropin sekresyonunda anormalliğe yol açan diğer genetik nedenler:** Prader-Willi sendromu, Laurence-Moon-Biedl sendromu, Familial Serebellar Ataksi sendromu ve Lowe (Oküloserebral distrofi) sendromunu içeren multiorgan genetik sendromlardır (52).

Hipogonadotropik hipogonadizm, gonadotropin alt ünitesinde mutasyon sonucu görülen bir hastalıktır. FSH beta geni promotör bölgesinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmi sonucu daha düşük sperm konsantrasyonu, küçük testis volümü ve daha düşük FSH düzeyi saptanmıştır (Castro-Magana ve Angulo 1990, Grigorova ve diğ. 2010).

GnRH analogları ve psikotrop ilaçlar, GnRH veya gonadotropin salınımını inhibe ederek sekonder hipogonadizme ve infertiliteye neden olabilir.

Testiküler tümörden veya östrojen tedavisinden dolayı östrojen artışı gözlemlenebilir (Veldhuis ve Dufau 1987). Androjen artışı, anabolik steroidlerin kullanımına, testosteron veya diğer konjenital adrenal hiperplazi, adrenal veya testis bezdeki tümöre bağlı aşırı androjen üretimine bağlı olabilir (Griffin ve diğ. 1996, Freeman 1991).

Obezite erkeklerde total testosteron, düşük serum gonadotropin, hipogonadotropik hipogonadizm ve serbest testosteron düzeyleri ile ilişkilidir. Obezite serum total testosteron konsantrasyonunda azalmaya neden olur (Hammoud ve diğ. 2006). Vücut kitle indeksi ve sperm kalitesi ters ilişkili olabilir (Kort ve diğ. 2006).

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi hikaye-anamnez, fiziksel muayene, semen analizi, genetik testler ve endokrin testler basamaklarını içermektedir.

Değerlendirme ayrıntılı bir öykü alınarak başlanır. Vücut kıllanması, pubertal gelişim, kabakulak orşiti, kronik hastalıklar, testis veya skrotal ameliyatlar, infeksiyonlar, seksüel geçişli hastalıklar, ilişki sıklığı ve ilaç kullanımı sorgulanmalıdır.

Fizik muayenede klinik bulgularına odaklanılmalıdır. Bunların infertilite ile ilişkisi sorgulanmalı, androjen eksikliğinin olup olmaması tespit edilmelidir. Olabilecek androjen

eksikliğinin klinik bulguları yaşı bağlı olarak değişir. Erken gebelikte androjen eksikliği cinsiyet belirsizliğine, gebeliğin ilerleyen haftalarında eksikliği mikropenise, çocukluk çağında pubertede gecikmeye, erişkin yaşıta ise seksüel fonksiyonda azalmaya ve seks karakterlerinde deformasyona sebep olur.

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde en önemli parametre olan semen analizi, semen volümü, pH ölçümü, aglütinasyonun değerlendirilmesi, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisinin değerlendirilmesi, sperm lökosit sayısının ve immatür germ hücrelerin değerlendirilmesini içerir.

-**pH**; 7.2 - 8.0 arası dağılım normal kabul edilir.

-**Aglütinasyon**; 10 sperm/agglutinat altında olmalıdır.

-**Koagülasyon**: Semen sıvı halden semisolid hale geçmesidir. Koagülasyon olmadığında vas deferensin ve seminal vezikül yokluğundan şüphelenilir.

-**Likefaksiyon**: 5-20 dakika içinde koagüle olan semen prostatdan yapılan proteolitik bir enzim olan fibrinolizinle likefiye olur. Bu nedenle likefaksiyon normal prostat işlevinin bir göstergesidir.

-**Viskozite**: Likefiye olan semenden bir pipet ile damla yöntemiyle ölçülür. Pipete çekilen semen damlatılarak oluşan iplikçiğin boyu ölçülür. 20 mm'ye kadar normal, 20-40 mm arası hafifçe artmış, 40-80 mm arası oldukça artmış ve 80 mm üstü ise çok artmıştır. Artmış viskozite prostatta, genital traktusda veya seminal vezikülde olan bir enfeksiyonu gösterir.

-**Koku**: Prostat sekresyonu olan sperminin oksidasyonu ile olur. At kestanesi ağacı çiçeği kokusuna benzetilir. Normalden sapması enfeksiyon göstergesidir.

Semen örneği 2-7 günlük bir cinsel perhiz sonrası alınmalıdır. Analizin güvenilirliği açısından farklı zamanlarda en az 2 sperm örneği alınmalıdır.

Dünya Sağlık Örgütünün (WHO 2010) belirlediği standart semen analizinin değerlendirilmesinde en düşük sınır değerler şu şekildedir;

• En az 3-7 günlük cinsel perhiz sonrası semen volümü için en düşük referans limit değer 1.5 ml' dir.

• Sperm konsantrasyonu: 15 milyon spermatozoa/ml

• Total sperm sayısı: 39 milyon spermatozoa/ejakülat

• İleri hareketli sperm oranı: %32

• Total hareketli sperm oranı: %40

• Morfoloji: %4 normal morfoloji (Cooper ve diğ. 2010).

Düşük semen volümüyle birlikte azospermi ve oligozoospermi genital trakt obstrüksiyonunu gösterir. Sperm motilitesi mikroskopik olarak değerlendirilir ve progresif motil, nonprogresif motil ve immotil olarak sınıflandırılır.

Semen anormalliklerinin tanımları;

- Aspermia: Hiç ejakülatın olmaması
- Lökositospermia: Ejakülatta beyaz küre olması
- Hematospermia: Ejakülatta kan olması
- Hiperspermia; Ejakülat volümünün 6 ml' den yüksek olması
- Hipospermia: Ejakülat volümünün 1 ml' den düşük olması.
- Azoospermia: Ejakülatta hiç sperm olmaması
- Oligozoospermia: 1 ml' deki sperm sayısının 15 milyondan düşük olması
- Asthenozoospermia: Zayıf motilite ve/veya ileri doğru hareketlilik olması.
- Teratozoospermia: Normal şekilli sperm yüzdesinin azalmış olması
- Nekrozoospermia: Supravital boyama ile tüm spermlerin ölü olması.
- Globozoospermia: Yuvarlak başlı akrozomsuz sperm olması.

Genetik Testler Genetik Mutasyonlar ve Seks Kromozomu: Yaklaşık %10-18 infertil erkekte Y kromozomu mikrolelesyonu vardır. AZFa veya AZFb bölgelerinin komplet delesyonu Sertoli Cell Only Sendromuna ve azospermiye neden olur. Sperm konsantrasyonunun 5 milyon/ml nin üstündeki erkeklerde bu delesyon nadir görülür (De Kretser ve diğ. 1999). AZFa veya AZFb bölgelerinin komplet delesyonlarında genetik tanı önem arz eder. Çünkü, Y kromozomu mikrolelesyonları babadan oğula intrastoplazmik sperm enjeksiyonu ile geçebilir (Page ve diğ. 1999). Hastada ciddi oligozoospermi ve azospermi varsa o zaman Y kromozom delesyon testi önerilmektedir (McLachlan ve O'Bryan 2010).

Endokrin Testler: Endokrin değerlendirmede bakılması gereken öncelikli hormonlar FSH, lüteinize edici hormon (LH) ve serum testosteron seviyeleridir (Sokol 2009). Serum LH konsantrasyonu sperm sayısı düşük olan erkeklerde androjenik steroidlerin ve eksojen anaboliklerin kullanımı düşünülmelidir. Serum FSH ve LH konsantrasyonu yüksek, serum testosteron konsantrasyonu düşükse primer hipogonadizm tanısı konulur. Düşük serum testosteron konsantrasyonu ve normal veya düşük serum LH konsantrasyonu olan erkeklerde ise serum prolaktin düzeyi ölçülmelidir. Eğer hastada tüm bu hormonlar ve sperm hacmi normal; fakat azospermi mevcutsa obstrüktif azospermiden şüphe edilmelidir.

1.2.3. Açıklanamayan İnfertilite

Kadın ve erkeklerin fertilitate testlerinin normal olmasına rağmen gebeliğin oluşmadığı durumları ifade eder ve %15 oranında görülür.

Bu hastalarda; bilateral tubal açıklık, ovulasyonun objektif kanıtları ve normal uterin kavitenin varlığı, yeterli overyan rezervin olduğu ve semen analizinin normal olduğu gösterilmelidir. Aynı zamanda tanısı konulamayan sperm veya oosit fonksiyon anormallikleri, fertilizasyon veya implantasyon bozuklukları da açıklanamayan infertilite kapsamına girmektedir (Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2008).

Açıklanamayan infertilitenin etiyojisi tam olarak aydınlatılamamış olsa da hormonal, genetik ve çevresel parametreleri içeren multifaktöriyel bir etyojisinin olduğu düşünülmektedir. DNA fragmantasyonu ve oksidatif stresin açıklanamayan infertiliteye etkisi azımsanmayacak derecede büyüktür (Abid ve diğ. 2008, Twigg ve diğ. 1998, Tremellen 2008).

Literatürde bu hastalara ampirik medikal tedavi veya yardımcı üreme yöntemleri (YÜT) önerilmektedir (Schiff ve diğ. 2007).

Fiziksel değerlendirilmelerinin yanı sıra psikolojik açıdan da hastalar değerlendirilmeye alınmalıdır. Çünkü; psikolojik nedenler de açıklanamayan infertiliteye sebep olabilir (Kızılkaya 1992, Oğuz 2004, Orshan 2008).

1.3. Preimplantasyon Genetik Test Nedir?

Preimplantasyon genetik testler, hastalığa sebep olan kromozomal bozukluğu veya geni gebelik oluşmadan önce test ederek sağlıklı embriyoların transfer edilmesi işlemleridir. Embriyolarda ortaya çıkabilecek potansiyel kromozomal anomalileri belirlemek amacıyla in vitro fertilizasyon yöntemleri kullanılarak uygulanır. "İmplantasyon Öncesi Genetik Tanı" veya "Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT)" adı verilir (Çelik 2011).

Preimplantasyon genetik tanı (PGD) ve preimplantasyon genetik tarama (PGS) yöntemlerini kapsar. Bu yöntemler ile farklı gelişim aşamalarındaki embriyolar transfer öncesi dönemde kromozomal olarak incelenir (Brezina ve diğ. 2012, Brezina ve Kutteh 2015) ve anöploidi gösteren embriyolar elimine edilebilir (Chen ve diğ. 2015, Dahdouh ve diğ. 2015). Bu yöntem kullanılarak yapılan embriyo transferlerinde sağlıklı euploidik embriyolar bilindiği için gebelik oranları %30' a kadar artış göstermektedir (Yang ve diğ. 2012).

1.3.1. Tarihçe

Dünyada ilk defa Alan Handyside ve arkadaşları (1989) tek hücre-polimeraz zincir reaksiyonu (single cell-PCR) tekniği kullanılarak X kromozomuna bağlı bir hastalık için PGT yöntemi uygulamış olup, 1993 yılında floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği PGT yöntemleri ile kombine edilerek (Griffin ve diğ. 1994, Munne ve diğ. 1993) Verlinsky ve arkadaşları (1995) tarafından infertilite tedavilerinde başarı şansını arttırıcı bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bu çalışmaların öncülüğünde PGT, gelişen yardımcı üreme ve tanısal teknikler sayesinde dünya çapında uygulanabilirliğini her geçen gün arttırmaktadır (Simpson 2010, SenGupta ve Delhanty 2012).

1.4. Embriyonal Analiz Yöntemleri ve Genetik Materyalin Kaynağı

Preimplantasyon genetik tanı işleminde genetik analiz için embriyonun genetik materyali gereklidir. Biyopsi işlemi, embriyonik deoksiribonükleik asit (DNA) elde etmenin invaziv tekniğidir.

PGT işlemi 3 farklı gelişim evresinde uygulanabilir; (Bak. Çizelge 1.1.)

- 1-Döllenme öncesi ve sonrası dönemde oositlerden polar hücre analizi, (Bak. Çizim 1.1.A)
- 2-Bölünme aşamasında blastomer analizi, (Bak. Çizim 1.1.B)
- 3-Blastokist dönemde trofektoderm dokusu (trofoblast hücreleri) analizi (Bak. Çizim 1.1.C) (Milachich 2014).

1.4.1. Polar Cisim Biyopsisi

Polar cisimler (PB), oosit hücresinin olgunlaşması ve fertilizasyonu sonrasında atılan yan ürünlerdir (Gardner 2007). Polar cisim biyopsisi (Bak. Çizim 1.1. A) diğer biyopsi çeşitlerine göre daha az invazivdir. Zona pellusida üzerinde delik açılması genellikle temassız olarak lazer yöntemi ile gerçekleştirilirken, mekanik olarak klasik kısmi zona diseksiyonu (Cieslak ve diğ. 1999) veya kimyasal asit Tyrodes solüsyonu kullanılarak da gerçekleştirilmektedir (Grifo ve diğ. 1994). Polar cisim hücrelerinin biyopsisinde lazer ile diseksiyon için en uygun zaman aralığı enjeksiyondan 4 ila 6 saat sonrasındır. Çünkü birincil polar cisim zamanla dejenerasyona gider ve düşük hibridizasyon gözlemlenir. Aynı zamanda bu evrede kortikal granül reaksiyonu da dengelenmiş olur. İkincil polar cisim hücresinin ideal biyopsi zamanı enjeksiyondan 8-16 saat sonra olmalıdır. 6 saatte kadar bu hücrede mayotik içcik kalıntısı kalabilir bu sebeple biyopsi oositin enükleasyonu ile sonuçlanabilir (Montag ve Ven 2010).

Polar cisim biyopsisi sadece maternal kaynaklı anöploidi ve mutasyonların teşhisinde uygulanabildiğinden dolayı dezavantajlıdır (Salvaggio ve diğ. 2014). Avantajlı yönü ise; embriyonal gelişime katkıda bulunmayan hücreler olmasından ötürü embriyoya zarar

vermemesi, diğ er iki yöntemde karşılaşılabilecek mozaizizm probleminin dışlanabilmesi ve de embriyo transferi öncesi genetik analizler için zaman kazandırmasıdır.

Ayrıca PB biyopsisinde mitoz kaynaklı anöploidiler ve/veya gelişimin ileri basamaklarında olası düzeltilecek olan mayotik hatalar ve paternal faktörler gözden kaçmış olacaktır. Mayoz-1'de meydana gelen kardeş kromatitlerin erken ayrılması durumu, mayoz-2'de dengelenebilmektedir. Böyle vakalarda PB biyopsisi yanlış tanıya neden olur ve reproduktif olarak sağlam olan embriyoların transferini engellemiş olur (Forman ve diğ. 2013).

Bu sebepten ötürü PB biyopsisi, diğ er biyopsilere göre tanısal kesinliğinin olmaması ve maliyetinden ötürü daha az tercih edilmektedir.

1.4.2. Klivaj Evre Blastomer Biyopsisi

Pratik bir yöntem olup, tüm endikasyonlar için uygulanabilir olmasından dolayı tercih edilir.

Fertilizasyondan yaklaşık 68-72 saat sonra altı ile sekiz hücre arasındaki embriyolardan bir veya iki hücrenin çıkarılmasıyla (Bak. Çizim 1.1. B) hem paternal ve hem maternal kaynaklı genetik değerlendirmeler elde edilebildiğ inden yaygın olarak kullanılır (ESHRE PGD Consortium, 2002). Klivaj evre biyopsisi için zona pellusidanın tirod asit, lazer veya mekanik yollar ile delinmesi gereklidir (Eldar-Geva ve diğ. 2014).

Biyopsi ile iki hücrenin embriyodan çıkarılması embriyoyu negatif yönde etkileyebilir (Dahdouh ve diğ. 2015). Fakat blastomerler totipotent olduğ undan kütle korunur ve fetusu bozmaz. Embriyo bu durumu rahatlıkla tolere edebilir (ESHRE PGD Consortium 2016). Diğ er bir problem ise; klivaj dönemi embriyoların %50'sine yakın bir kısmında görülen mozaizizmdir (Otani ve diğ. 2006).

Bunun yanı sıra, kullanılan biyopsi teknikleri ve laboratuvar çalışanlarının tecrübesi, biyopsi sonrası embriyo gelişiminde çok önemli rol oynar (Kahraman ve diğ. 2000).

Klivaj aşaması embriyolarında segmental anöploidi görülme sıklığ ının klinik yaygınlığı henüz net değildir. Embriyonik hücreler hücre döngüsünün G1, G2 veya G0 fazından ziyade direk olarak mitozdan sentez fazına geçer (Ramos ve diğ. 2014). Bu durumla birlikte replikasyon ile asenkronizasyon gerçekleştiğ inde çok düşük de olsa FISH, aCGH ve PCR bazlı yöntemlerde yanlış pozitif anöploidik sonuç verebilir (Werner ve diğ. 2014, Gutierrez-Mateo 2011, Capalbo ve diğ. 2015).

Blastomer biyopsisi sırasında bazı zorluklarla karşılaşılabılır. Bunlar; embriyonun erken kompaktlaşması, embriyo içeriğ inde yüksek düzeyde fragmantasyon olması ve membranın aşırı kırılğan olması şeklinde olabilir.

Blastomer biyopsisi, ileri maternal yaş, tekrarlayan düşükler, maternal/paternal otozomal resesif/dominant tek gen hastalıklarında, HLA doku tiplleme, translokasyon taşıyıcılığı, tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları ve şiddetli erkek faktörü gibi geniş bir endikasyon grubuna uygulanabilir (Çelik 2011).

1.4.3. Trofektoderm Biyopsisi

Embriyo gelişiminin 4. gününden itibaren integrin, kaderin ve selektin gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu edilmesiyse kompaktlaşma sonrası kavitasyon başlar. Embriyonun içi sıvı dolmaya başlayarak blastosist formasyonu oluşur (Montag diğ. 2010). Blastosist formasyonunda iç hücre kitlesi (İHK) ve trofektoderm (TE) hücreleri adı verilen iki yapılanma mevcuttur. Bu hücreler blastosist gelişimini ilerlettikçe belirginleşir.

Laboratuvar kültür ortamlarının ve kullanılan medyumların embriyonun ihtiyacını karşılayabilecek şekilde geliştirilmesi, 5. gün blastokist evresi transferlerinin artmasına olanak vermiştir.

Bir seferde birkaç trofoblast hücresinin alınabilmesi ve analiz edilebilmesi bakımından PGT işlemlerinde en yaygın olarak kullanılan biyopsi çeşididir (Bak. Çizim 1.1. C) (Stern ve diğ. 1999). Kısıtlayıcı faktörü; genetik analiz sonucu bakımından dar bir zaman aralığı olmasıdır. Fakat dondurma/çözdürme yöntemlerinin güvenilir bir şekilde uygulanabilmesi, bu sorunu çözümlenmiştir.

Aynı şekilde 5. güne giden embriyoların sayıca sınırlılığı da analiz yapılacak embriyo sayısını kısıtlamaktadır. Bu durum anormal veya gelişimi duracak embriyoların biyopsi işlemi yapılmadan elenmesi açısından avantaj oluşturur (Çelik 2011).

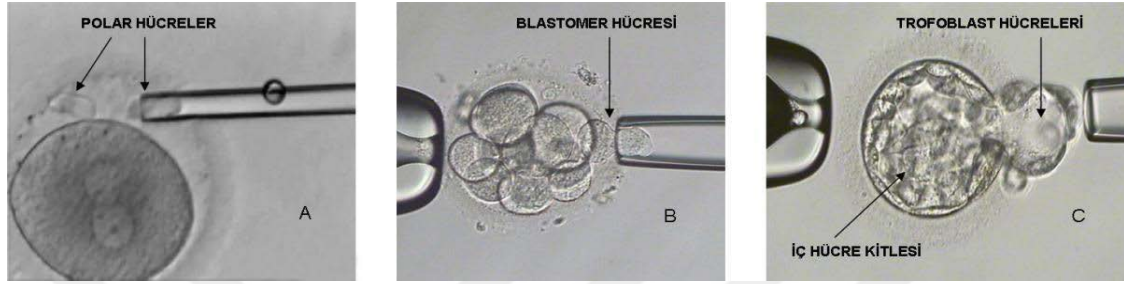
Trofektoderm dokusunun biyopsisi ile kritik olmayan hücreler alınması blastokistin İHK'ne zarar vermemesi bu yöntemin diğeri bir avantajıdır. İç hücre kitlesinin fetal dokulara dönüşmesinden dolayı işlem sırasında mümkün oldukça bu bölgenin karşı tarafından biyopsi işlemi uygulanmalıdır (Yang ve diğ. 2012).

Preimplantasyonel gelişim sırasında blastokist aşamasına gelen embriyolar heterojen morfoloji gösterebilirler. Trofektoderm hücrelerinin fetusu oluşturacak İHK'deki hücrelerle aynı genetik yapıyı taşımayabilir (mozaik embriyo). Bu durumda biyopsi yapılan hücreler embriyo hakkında doğru bilgiyi vermeyebilir.

Mozaik embriyoların kendi normalizasyonlarını sağladığı "self correction" (kendini düzeltme) mekanizması mevcuttur. Bu mekanizma ile normal hücrelerin İHK'sini oluşturmak üzere embriyonun iç tarafında tutulması, anormal hücrelerin ise; plasentayı oluşturacak trofektoderm bölgesine yönlendirilmesi gerçekleştirilebilir (Magli ve diğ. 2009).

Bu embriyoların morfolojik olarak değerlendirilmeleri veya gelişimsel oranları ile anöploidi oranları arasında korelasyon olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu evreyi yakalayan embriyodan, kalite kriterlerine bakılmaksızın biyopsi alınması gerekmektedir (Capalbo ve diğ. 2014).

Polar cisim biyopsisinin aksine klivaj dönemi ve trofoektoderm biyopsisinde hem maternal hem paternal kaynaklı genetik bilgi analizi yapılabilmektedir (Stern ve diğ. 1999).



Çizim 1.1: Polar cisim biyopsisi (A), 8-10 hücreli bölünme aşamasında embriyoya uygulanan blastomer biyopsisi (B), blastokist aşamasında embriyoya uygulanan trofoektoderm biyopsisi (C).

Çizelge 1.4. Biyopsi seçenekleri ve bunların PGT için karşılaştırmaları

	0. - 1. GÜN POLAR CİSİM	3. GÜN BLASTOMER	5. - 6. GÜN TROFOEKTODERM
ENDİKASYONLAR	Sadece maternal kaynaklı -Dengeli translokasyonlar -Tek gen hastalıkları -Mayotik hatalar	-Cinsiyet tayinleri -Dengeli translokasyonlar -Tek gen hastalıkları -Mayotik ve mitotik hatalar -HLA doku tayini	-Cinsiyet tayinleri -Dengeli translokasyonlar -Tek gen hastalıkları -Mayotik ve mitotik hatalar -HLA doku tayini -Tek embriyo transferi -Başarısızlıkla sonuçlanmış PB ve blastomer biyopsileri
ZAMANLAMA	-Oosit toplanmadan hemen sonra -1.ci PB için ICSI sonrası 2-6 saat -2.ci PB için ICSI sonrası 8-16 saat -Her iki PB için ICSI sonrası 8-12 saat	-3. Gün ICSI sonrası 66-72 saat -3. Gün evresine geçtiğinde -Nadiren 4. Gün	-5. Gün -Yavaş gelişen embriyolarda 6. Gün -Nadiren 7. Gün
AVANTAJLAR	-Embriyo gelişimi etkilenmez -Genetik analiz için geniş zaman aralığı sağlanır -Maternal geçişli hastalıklarda	-Tüm endikasyonlarda -Taze embriyo transferi için yeterli zaman aralığı sağlanır	-Daha fazla sayıda hücre alınabilir ve test edilebilir -Tüm endikasyonlarda -Mozaisizm görülme sıklığı azalır

	-Normal ve dengeli kromozom ayrımında		
DEZAVANTAJLAR	-İkinci bir biyopsiye ihtiyaç duyulabilir -Sadece mayotik hatalar tespit edilebilir, mitotik hatalar tespit edilemez -Sadece maternal geçişli mutasyonlarda kullanılabilir -PB' lerin küçük olmasından kaynaklı dejenerasyon ihtimali olabilir	-Mozaisizmden kaynaklı tanı hatası olabilir	-Genetik analizin 24 saatten fazla sürme ihtimalinden kaynaklı kriyoprezervasyon gerekliliği doğabilir -6. Gün embriyo transferine gidilmesi gerekebilir -Yavaş gelişimden kaynaklı biyopsi 6. Güne ertelenebilir - gelişim bozukluğundan kaynaklı iptal olabilir -Kriyoprezervasyon gerekliliği

HLA: İnsan Lökosit Antijeni, PB: Polar Cisimcik, ICSI: Intrazitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Xu ve Montag 2012).

1.5. Kromozomal Anomaliler

Sayısal ve yapısal anomalileri veya her ikisinin de birlikte olduğu durumları kapsamaktadır. Yenidoğanda yaklaşık olarak 1/200 olarak gözlenir. Kromozomal anomaliler iki ana grup altında incelenir:

1.5.1. Sayısal Kromozomal Anomaliler:

1.5.1.1. Öploidi

23 kromozom çifti içeren diploid hücreler ($2n=46$) normal hücreler olup, 23 kromozomun katlarının bulunması durumuna öploidi adı verilir. 23 kromozoma haploid (n), üç katına triploid ($3n$), dört katına ise tetraploid ($4n$), daha fazla n kromozom katının bulunmasına poliploidi adı verilmektedir (Yirmibeş 2007, Nussbaum ve diğ. 2005).

1.5.1.2. Anöploidi

“ n ” katı kadar olmaksızın, daha az veya fazla kromozom bulunması durumuna anöploidi adı verilir. Anöploidinin hücre bölünmesi esnasında homolog kromozomların ayrılabilmesi (non-disjunction) veya ‘anafazda geri kalma’ nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Tek bir kromozom fazlalığına ‘trizomi’, kaybına ise ‘monozomi’ adı verilmektedir (Yirmibeş 2007).

1.5.1.3. Miksoplöidi (Mozaisizm, Kimerizm)

İki şekilde açığa çıkmaktadır:

Mozaisizm; Bir dokuda genetik olarak farklı ancak tek bir zigottan meydana gelen en az iki farklı hücre dizisinin varlığına denir.

Kimerizm; Dölllenmiş olan iki adet yumurtanın birleşmesi ve iki zigot arasında hücre değişimi sonucunda meydana gelmesine denir (Nussbaum ve diğ. 2005, Tobias ve diğ. 2014).

1.5.2. Yapısal Kromozomal Anomaliler

Kromozomların kırılıp anormal biçimde tekrar yapışmasından kaynaklanmaktadır. Translokasyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar, insersiyon gibi birçok alt gruba ayrılır (Bak. Çizim 1.2) (Yirmibeş 2007, Nussbaum ve diğ. 2005, Tobias ve diğ. 2014, Alqallaf ve diğ. 2013).

1.5.2.1. Translokasyonlar

Kromozom materyalinin kromozomlar arasında transferidir. Resiprokal ve Robertsonian translokasyon adında iki tipi vardır:

A. Resiprokal translokasyon: Kromozomlarda meydana gelen kırılmalar sonucunda oluşan kromozom materyalinin karşılıklı değişimine denir. Bu değişimler sırasında kromozomun materyal kaybı olmadığından dolayı translokasyon dengeli bir şekilde olur.

B. Robertsonian translokasyon: İki akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21 ve 22) sentromere yakın bölgeden ya da sentromeri üzerinden kırılıp birbiri ile birleşme durumuna denir.

1.5.2.2. İversiyonlar

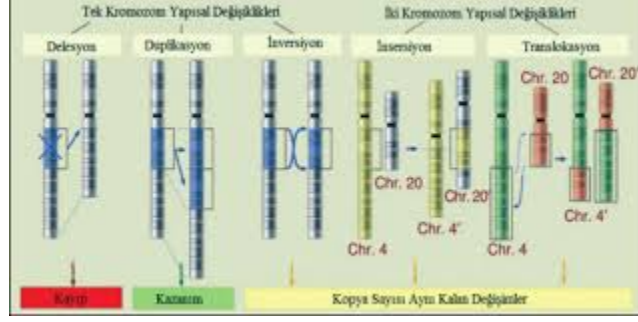
İki bölgeden kırılan bir kromozomun kırılan parçasının 180 derece dönerek yapışması sonucu oluşur. Eğer kırılmalar sentromerin iki yanında olmuş ise “perisentrik inversiyon”, ters dönen segment kromozomun bir kolunda oluşuyor ise “parasentrik inversiyon” denir.

1.5.2.3. Delesyonlar

Kromozom herhangi bir bölümünün kaybına “delesyon” adı verilir.

1.5.2.4. Duplikasyonlar

Kromozomun ek bir kopyasının bulunmasına verilen isimdir (Karkucak 2016).



Çizim 1.2. Yapısal kromozom anomalilerin gösterimi. Alqallaf ve diğ. (2013)'den alınmıştır.

1.6. PGT İşleminde Kullanılan Yöntemler

1.6.1. Tek Hücre Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz enzimi kullanılarak DNA molekülünü birbirini takip eden zincir reaksiyonlarla çoğaltmaya yarayan yöntemin tek hücrede uygulanmasına "tek hücre- PCR" yöntemi adı verilir. Amplifikasyon başarısızlığı denilen ilgili gen bölgelerinde çoğaltmanın gerçekleşmemesi ve alellerden birinin çoğaltılmamasından kaynaklanan Allel Drop Out (ADO) tanıda hataya sebep olabilir. ADO oranı polar hücrelerde yaklaşık %10, blastomerlerde %10-20 arasında bildirilmektedir (Fiorentino ve diğ. 2005).

1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz enzimi kullanılarak DNA molekülünü logaritmik çoğaltmaya yarayan yöntemdir. "Denaturasyon" adı verilen DNA molekülü zincirlerinin birbirinden yüksek ısıda ayrılması, eşleşen bölgelere primerlerin bağlanması (annealing), polimeraz enziminin baz dizileri ekleyerek ilgili bölgeyi sentezlemesi (synthesis) ve sentezlenen molekülün uzaması (extension) aşamalarından oluşur. Sentezlenen DNA fragmanı bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve her döngüde molekül sayısı ikiye katlanır.

PCR tekniğinde karşılaşılabilen amplifikasyon başarısızlığı, allel drop out (ADO) ve kontaminasyon gibi sorunlar analizin hatalı gerçekleşmesine neden olabilir. Amplifikasyon başarısızlığıyla karşılaşma oranı bu teknikte %10'lara kadar çıkabilir (Fiorentino ve diğ. 2006). ESHRE PGD raporlarına göre ADO oranı kontrol altında tutulmalı ve oranı %10'dan düşük olmalıdır (Harton ve diğ. 2011). ADO heterozigot embriyolarda sorun yaratmaktadır. Genetik hastalık dominant olduğunda, ADO'dan etkilenen allel tanı bozukluğuna neden olur. Genetik hastalık resesif olduğunda ADO'dan etkilenen normal allel de tanıda hataya neden olabilir. Bu durumlar PCR tabanlı moleküler tekniklerin kullanımını etkiler.

1.6.3. HLA (Human Lökosit Antijeni) Doku Tayini

Tek gen hastalıkları için yapılan PGT işlemi tanı yöntemi olmasının yanı sıra, HLA uyumlu embriyo seçimi ile beraber yapıldığında bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. HLA uyumlu bir embriyo bulma şansının oldukça düşük olması (%25) ve mutasyon analiziyle de birlikte bu ihtimalinin yaklaşık %18'e kadar düşmesi tedavideki başarıyı sınırlayan en büyük etmendir (Çelik 2011). HLA tiplemesi yapılan hastalarda HLA uyumlu bir embriyo bulunduğu ve de transfer edilebilecek kalitede sağlıklı embriyo geliştiğinde iyi oranda gebelik ve implantasyon başarısı elde edilmiştir (Kokkali ve diğ. 2005).

1.6.4. FISH Tekniği

Kromozomlar üzerindeki spesifik DNA sekanslarını tanımlamak, anöploidi, X kromozomu geçişli hastalıklarda ve translokasyonlar için PGT'de en çok kullanılan tekniklerin başında gelmektedir. Kromozomlarda meydana gelen anormallikleri saptamaya yarar (Wu ve diğ. 2004). Aynı anda bir çok kromozom değerlendirmesi yapılabilir. Özellikle 15 kromozom çiftine kadar tek gen analizinde kullanılır (Mackie ve Scriven 2002).

Biyopsi uygulanan materyalin cam lama fiksasyonu, floresan işaretli prob aplikasyonu sonrası denatürasyon, hibridizasyon, hibridizasyon sonrası bağlanmayan problemlerin uzaklaştırılması için yıkama, kontrast madde (counterstain) uygulaması ve analiz aşamalarından oluşur.

Fiksasyon ve analiz aşamaları FISH yönteminde kritik öneme sahiptir. Analiz sırasında iyi görüntü elde etmek, uygun hibridizasyon tekniklerinin uygulanmasına, iyi bir fiksasyona ve de hücrenin durumuna bağlıdır. Aksi takdirde hibridizasyon sorunu ve sinyal alamama ile sonuçlanabilir (Wilton ve diğ. 2009). FISH tekniğiyle kromozomlardaki translokasyon sonucunun hatalı çıkma oranı yaklaşık %6 civarında tespit edilmiştir (Li ve diğ. 2005).

1.6.5. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) ve array-CGH (aCGH) Yöntemi

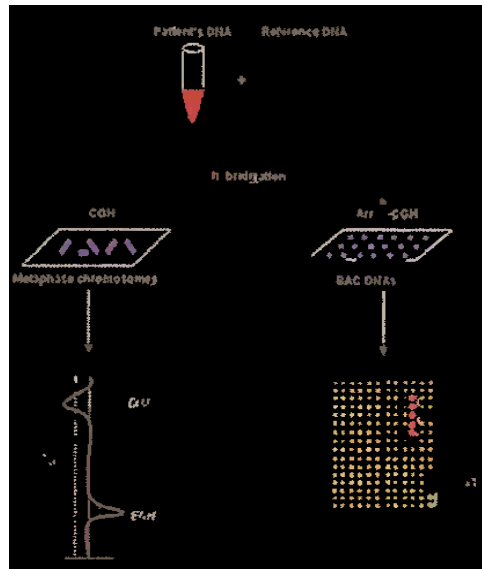
Sınırlı sayıda kromozomun incelendiği FISH yöntemine alternatif olarak karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) yöntemi (Bak. Çizim 1.3) PGT' de uygulanmıştır. Bu yöntem embriyolarda tüm kromozomların incelenmesini mümkün kılmıştır (Çelik 2011). Analiz sırasında iyi bir görüntü elde etmek, iyi bir fiksasyona, hücrenin durumuna ve doğru hibridizasyon tekniğine bağlı olarak değişir. CGH' da referans DNA'lar farklı boya ile işaretlendikten sonra lama sabitlenmiş metafaz kromozomları

yürütülerek hibridizasyona bırakılır ve tüm genom aktivasyon (WGA) yöntemlerinden birinin kullanılmasıyla kromozomlar çoğaltılır.

Array tabanlı bir sistem olan, CGH ile aynı prensibe dayanan, array-CGH yönteminin geliştirilmesi ile işlem süresi CGH yöntemine göre kısalmış, 48 saate kadar indirilmiştir. CGH yönteminden farklı olarak metafaz kromozomların yerini oligonükleotidler alır. Çözünürlüğünün daha yüksek olması diğer yöntemlere göre bu tekniği avantajlı hale getirmiştir. Fakat analizi daha zor ve de daha pahalı bir yöntemdir (Sermon ve diğ. 1996).

Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yönteminde de embriyonik DNA amplifikasyonu için tüm genom amplifikasyonu (WGA) yapılarak DNA referans alınır. WGA ile serbest embriyonik DNA'nın amplifikasyonu açısından FISH ve PCR yöntemleri gibi tercih edilebilir. Aynı zamanda çoklu amplifikasyon sağlaması açısından geniş çaplı genom analizi sağlanmış olur (Zong ve diğ. 2012). WGA'yı takiben iki renk ile floresan yayması yapılır. Yaklaşık 4000 kadar DNA markerı genom boyunca yerleşir ve microarray boyunca yayılır. Hibridize olmuş DNA'nın floresan geçirgenliğine dayanarak bilgisayar bazlı analizler yapılır. Referans DNA ile embriyonik DNA'nın kopya sayısı kıyaslanır (Theisen 2008).

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında ve düşüklerde CGH yöntemi anöploidi açısından güvenilir bir yöntemdir (Traversa ve diğ. 2011). Bununla birlikte bu yöntemin dengeli translokasyon ile inversiyon ayırt etmede ve bazı ploidi durumlarını ayırt etmede yetersizlikleri mevcuttur.



Çizim 1.3. CGH ve array CGH yöntemlerinin karşılaştırılması (<http://www.implen.de> sayfasından alınmıştır).

1.6.6. Yeni Nesil Dizileme (NGS)

DNA'nın içindeki milyonlarca küçük fragmanların sekanslamasında kullanılan bir yöntemdir. Yüksek çözünürlükte inceleme yapılabilmesi sebebiyle FISH, CGH ve array CGH yöntemlerinde tespit edilmesi güç olan küçük ölçekli parsiyel veya segmental anöplidlerin tespit edilebilmesi yönünden hata oranının daha düşük olması sebebiyle diğer yöntemlere göre avantajlıdır. Embriyolarda 24 kromozomun detaylı incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Tüm genomların amplifiye edilmesiyle başlar. Ardından DNA fragmanlarına ayrılır. Fragmanlar adaptörle kaynaşır ve barkodlama sistemi oluşur. Optik bazlı sekanslama işlemini takiben MiSeq platformu için PCR aşaması uygulanır. Kalite kontrol sistemi yapıldıktan sonra data BlueFuse software (Illumina) sistemi ile analiz edilir. MiSeq platformu tüm kromozomlardaki anöplidi ve mitokondriyal kopya sayısını tanımlamak için kullanılır. MiSeq platformu üzerindeki Illumina VeriSeq genom analizi tüm kromozom anöplidlerini ve %50'nin üzerindeki mozaizizmleri tespit etmede kullanılır (Brezina ve diğ. 2016).

Bu yöntem ile embriyolardan alınan tek bir hücrede aynı anda sayısal (anöplidiler) ve yapısal (translokasyonlar) kromozomal problemlerin tespiti, HLA tiplemesi ve tek gen hastalıklarının analizi yüksek doğrulukla yapılabilir. Bu sayede anne rahmine embriyo transferi sonrası sağlıklı gebelik elde etme ihtimali yüksek oranda artmış olur.

1.7. PGT Endikasyonları

1.7.1. Genetik Geçişli Hastalıklar

Tek bir gende meydana gelen mutasyon veya hasar sonucu oluşan tek gen hastalıkları; otozomal resesif, otozomal dominant, X kromozomuna bağlı resesif ve dominant, Y kromozomuna bağlı ve mitokondriyal kalıtımla geçiş gösterebilmektedir.

Örneğin; ülkemizde akraba evliliklerinin sık olması nedeniyle beta-talasemi olarak bilinen otozomal resesif geçiş gösteren Akdeniz anemisi gibi hastalıkların daha embriyo aşamasında preimplantasyon tanısının yapılması ve ilgili kromozom bölgesinin tanımlanması büyük önem arz etmektedir.

Tüm diploid insan hücreleri 22 otozom ve 1 gonozomdan oluşan 23 çift kromozom içerir.

Kromozomlardaki sayısal bozukluğa anöplidi denir. Trizomi gibi fazla veya monozomi gibi eksik sayıda kromozom içeren, kistik fibroz, orak hücre anemisi gibi genetik

geçişli konjenital hastalıklarda PGT yöntemi uygulanması sağlıklı bireylerin oluşması açısından önemlidir (Çelik 2011).

1.7.2. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlıkları (TİB)

3 veya daha fazla denemenin ardından, iyi kalitede embriyo transferine rağmen başarısızlıkla sonuçlanan denemeler tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları (TİB) olarak adlandırılır (Harton ve diğ. 2010). Bu tanıyı gösteren çiftlere tedavideki başarıyı arttırmak ve gebelik kayıplarını azaltmak amacıyla anöploidi taraması yapılır.

Bu hasta grubuyla yapılan PGT çalışmalarında, oldukça yüksek oranda anöploidi tespit edilmiştir. Bu anöploidilerin çoğu 3 veya daha fazla kromozomu içeren kompleks ve sayısal anomalilerdir (Zhang ve diğ. 1992).

1.7.3. İleri Maternal Yaş

Elde edilen oosit sayısının azlığı maternal yaşın ilerlemesine bağlı olarak mayotik bölünme sırasında rekombinasyon mekanizmasındaki bozukluk kromozomların ayrılmamasına veya kardeş kromatidlerin erken ayrılmasına neden olmaktadır. 37 yaş ve üzeri çoğu PGT merkezinde ileri maternal yaş kapsamına girmektedir.

1.7.4. Erkek İnfertilitesi

Normozoospermi olgularına göre, oligoastenoteratozoospermi (OAT) ve non-obstrüktif azoospermi (NOA) olgularında (sırayla %62 ve %69) artmış kromozomal anomali saptanmıştır (Vrettou ve diğ. 2004). Bunun gibi ciddi erkek faktörüne sahip çiftlerin embriyolarına anöploidi gözlenme oranı oldukça yüksek olduğundan genetik analiz önerilebilir (Silber ve diğ. 2003).

1.7.5. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilitenin nedenlerinden biri de kromozomal anormalliklerdir. Erkek veya dişi bireylerin translokasyon, delesyon, insersiyon taşıma ihtimali mevcuttur. Benzer şekilde oosit veya spermde anöploidi görülme olasılığından dolayı bu endikasyonu gösteren hastalara PGT önerilebilir.

1.8. Non-invaziv Preimplantasyon Genetik Tanı Yöntemleri

Preimplantasyon dönemi embriyoların genetik içeriğinin ortaya çıkarılması için invaziv teknikler (Shamonki ve diğ. 2016) kullanılsa da embriyonun bir veya birkaç hücresinin alınmasından dolayı (biyopsi) embriyonal hasar olabilmektedir (Fragouli 2013). Bunun yanı sıra embriyo biyopsileri özel ekipman, iyi eğitilmiş personel, uygun zaman ve maddiyat gerektirir. Bu nedenle daha az invaziv teknikler geliştirilerek embriyonal hasar, maliyet ve iş yükünün en aza indirgenmesi amaçlandığından dolayı daha güvenli olacağı

düşünülen non-invaziv preimplantasyon genetik tarama yöntemleri ortaya çıkmıştır. (Farra ve diğ. 2018).

Özellikle son yıllarda artan anne yaşı ve çevresel faktörler nedeniyle genetik anomaliler artmış, sağlıklı embriyo elde etme oranı düşüşe geçmiştir (Hassold ve Hunt 2001). Bu nedenle sağlıklı ve gebelik oluşturabilecek embriyoların seçimi önem kazanmıştır. Transfer edilecek embriyoların seçiminde invaziv teknikler dışında daha az invaziv teknikler olan time-lapse analizi, polar cisim biyopsisi, proteomiks, metabolomiks yöntemleri de kullanılabilir (Feichtinger ve diğ. 2017).

DNA eldesi blastokistin içindeki blastosöl sıvısından ve embriyonun içinde bulunduğu atık medyumdan mümkün olduğundan bu iki yöntem biyopsilere göre daha az invazivdir. *In vitro*'da gerçekleşen bu yöntemler, prenatal evrede non-invaziv olarak gerçekleşen anne kanından kromozomal analizin analogudur (Handyside 2016).

Bu yöntemlerden ilki blastosentez işlemiyle blastosöl sıvısının alınarak embriyonal DNA'nın elde edilmesi işlemidir. Trofoektodermin bazolateral kısmında Na^+/K^+ adenosin trifosfat iyonlarının aktivasyonu ile ozmotik gradient oluşur (Barcroft ve diğ. 2004). Bu mekanizma ile transmembran kanalların arasından embriyo içine sıvı birikmesi gerçekleşir (Barcroft ve diğ. 2003). Blastosöl sıvısı PCR tekniği ile amplifiye edilmiş küçük miktarlarda DNA içermektedir (Palini ve diğ. 2013). Blastosöl içeriğindeki DNA ile embriyonik ploidi yüksek oranda uyum içermektedir (Magli ve diğ. 2016). Trofoektoderm biyopsisi bir kaç hücrenin alınmasına kıyasla embriyoya daha az zarar verici bir yöntemdir (Feichtinger ve diğ. 2017). Embriyo vitrifikasyonundan önce dondurmayla birlikte oluşacak kristal formasyonunun embriyo blastokist membranına zarar vermemesi adına kollaps yöntemiyle blastosöl sıvısı genellikle uzaklaştırılır (Mukaida 2016).

Blastosöl sıvısına benzer olarak embriyonun içinde bulunduğu atık medyum da embriyonun DNA içeriği hakkında bilgi verir (Palini ve diğ. 2013). Yapılan birkaç öncül çalışmada atık medyumda tespit edilen DNA'nın embriyonun bölünmeye başladığı erken bölünme evresinde (2.-5. gün arası) sekrete edildiği düşünülmektedir. Bu nedenle, erken bölünme evresi DNA analizlerinde atık kültür sıvısı ile trofoektoderm biyopsisi sonuçlarının korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (Wu ve diğ. 2015).

2. AMAÇ

PGT; tekrarlayan tedavi başarısızlıkları, tekrarlayan düşükler, ileri anne yaşı olgularında ve genetik bozukluk taşıyan bir embriyo nedeni ile oluşmuş bir hamileliğin sonlandırılması durumunu önlemek amacıyla tüp bebek ünitelerinde sıklıkla başvuru olan bir yöntem olup kromozomal hastalık taşıyan (sayısal ve yapısal kromozom anomalileri, tek gen hastalıkları, X'e bağlı geçiş gösteren hastalıklar vb.) bir çocuğun dünyaya gelmesi sonrasında karşılaşılabilecek fiziksel ve psikolojik problemlerin önüne geçilmesine yardımcı olmaktadır.

Genetik tarama için gerekli DNA eldesi preimplantasyon dönemi embriyolarında biyopsi işlemi ile yapılır. Fakat, biyopsi invaziv bir işlemdir. İnvaziv bir işlemin meydana getirebileceği risklerden kaçınmak genetik analizi daha anlamlı kılacaktır. Bu durumu göz önünde bulundurarak çalışmamızda, blastomer biyopsisi yapılacak olan embriyoların non-invaziv yöntem olan embriyonun kültüre edildiği atık medyumundan serbest embriyonik DNA elde ederek NGS (Yeni Nesil Dizileme, Next Generation Sequencing) yöntemiyle kromozom analizi yapmayı ve biyopsi sonucuyla karşılaştırarak korelasyon olup olmadığını görmeyi amaçladık.

Böylece invaziv tekniklere ihtiyaç duyulmadan non-invaziv yöntemler kullanarak olası embriyo hasarının önlenebileceğini umut etmekteyiz. Hedefimiz bu konuda başarıya ulaşarak non-invaziv yöntemleri rutinde de uygulanabilir hale getirmektir. Araştırmamızın sonunda elde edeceğimiz bilgiler hem bir doktora tezinin oluşturulmasına katkıda bulunacak hem de etki gücü yüksek bilimsel dergilerde makale olarak yayınlanacaktır.

3. YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi ve Veri Toplanması

Bu çalışmanın Etik Kurul Onayı, Kocaeli Üniversitesi Non-invaziv Etik Kurul’undan “2017/275” nolu karar numarası ile karara bağlanmıştır.

Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi’ne tedavi için başvuran hastalar PGT açısından değerlendirilerek kriterleri karşılayanlara PGT işlemi anlatılarak önerilmiştir. Sadece yöntemi kabul eden hastalar araştırmaya dahil edilmiştir.

PGT önerilen hasta kriterleri;

1. İleri maternal yaş (Feichtinger ve diğ. 2017),
2. Erkekte sperm sayısının az ve sperm yapısının bozuk olması (Vrettou ve diğ. 2004),
3. İki ve daha fazla tüp bebek işlemi uygulanmasına rağmen gebelik elde edilememiş çiftler (Zhang ve diğ. 1992),
4. Erken gebelik kayıpları ve düşükleri olan çiftler (Magli ve diğ. 2016),
5. Genetik veya kalıtsal bir hastalık taşıyıcılığı bulunan çiftler (Yan ve diğ. 2014),
6. Genetik hastalığı olan çocuk veya çocuklara sahip olan çiftler (Palini ve diğ. 2013),
7. Genetik geçiş gösteren hastalıkların tanımlanması (Palini ve diğ. 2013),
8. Açıklanamayan infertilite tanısına sahip hastalar şeklinde olacaktır.

3.2. IVF Protokolü

3.2.1. Sperm Toplanması

3-5 günlük cinsel perhizle gelen hasta eşlerinden işlem günü sperm örneği alınarak yaklaşık 20 dakika beklenerek spermin likefiye olması sağlanmıştır. Semen parametreleri, Dünya Sağlık Örgütü 2010 (WHO) klavuzuna göre değerlendirilmiştir (Cooper ve diğ. 2010).

Ejakulattaki hareketli sperm sayısının tüm sayıya oranı yüksek ve sperm dışı hücre sayısı düşük ise “Swim-up” sperm yıkama tekniği, sperm dışı hücre sayısı yüksek ve sperm sayısı az ise “Gradient” sperm yıkama yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1.1. *Swim-up (yukarı yüzdürme) yöntemi*

Likefaksiyon sonrasında elde edilen 0,5 ml’lik örnek pipete edilerek homojen bir karışım elde edilmiştir. 1 ml kültür sıvısı bu karışımın üzerine yavaşça bırakılmış, 2 ayrı katman oluşumu sağlanmıştır. Spermere yüzebilecekleri maksimum yüzey sağlamak için konik dipli tüpe 45 derece eğim verilerek %5 CO₂ ihtiva eden inkübatöre (Sanyo, Panasonic Biomedical Europe) yerleştirilir ve 1 saat 37^o C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında

yaklaşık 0,7 ml sıvıdan dikkatli bir şekilde pipetle çekilerek orta boy kültür dişine (Nunc, Thermo Fisher Scientific) üzeri yağlanarak (Ovoil, Vitrolife) yayılmıştır. Dölleme işleminin yapıldığı kültür kabına aktarılmak üzere ICSI işlemine kadar bekletilmiştir (Agarwal ve diğ. 2001).

3.2.1.2. Gradient yöntemi

Bu yöntem; Nycodenz, Percoll, Ficoll, albümin ve sükröz polimerleri gibi malzemelerle gradientler oluşturup santrifüj yardımı ile sperm hücrelerinin bu sıvı kolonlardan süzdürülmesi esasına dayanır (Baker ve diğ. 1993).

Konik dipli steril 14 ml hacimli tüpe (BD, Falcon) sperm yıkama solüsyonu (SpermAir, Gynemed) ile hazırlanmış %90 konsantrasyonda toplam 1 ml gradient solüsyonu (SpermGrad, Vitrolife) konularak üzerine 1 ml %50'lik konsantrasyonundaki gradient solüsyonu tüp kenarından yavaşça akıtılarak eklenmiştir. Tabakalar oluştuktan sonra, oda ısısına getirilen tüp üzerine en fazla 2 ml semen eklenerek 1800rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılarak dipte kalan 0.5 ml örnek tekrar 1ml sperm yıkama solüsyonu ile 1800rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası dipte kalan 0.5 ml dışındaki kısım tüp dışına alınarak, dipte kalan örneğin üzerine 0.2 ml sperm yıkama solüsyonu eklenerek kültür kabına yayılmış, üzeri parafin yağıyla kaplanarak fertilizasyon işleminde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

Gradyent işleminde bol yıkama sıvısının kullanılmasındaki amaç; silika partiküllerin uzaklaştırılmasını sağlamaktır.

3.2.2. Oosit Toplanması ve Embriyo Kültürü

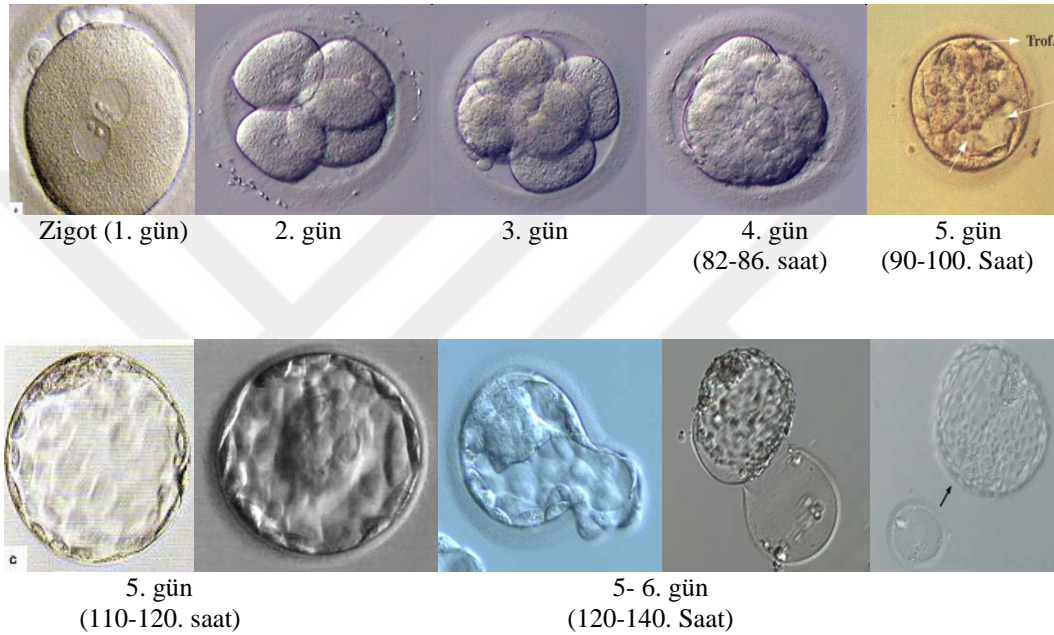
Detaylı özgeçmiş, laboratuvar ve radyolojik incelemeler sonucunda folikül gelişimlerini takiben çatlatma iğnesi vuran hastalardan 34-36 saat sonra ultrason eşliğinde transvajinal olarak oosit toplama işlemi (OPU) yapılmış ve eş zamanlı olarak eşinden sperm örneği alınarak hazırlanmıştır.

Toplanan oositler fertilizasyon medyumunda (G-IVF, Vitrolife) %5 O₂, %6 CO₂ ve 37 °C içeren inkübatörlerde (Sanyo, Panasonic Biomedical Europe) hiyaz (oosit ayıklama) işlemine kadar bekletilmiştir. Araştırma esnasında tüm kültür kapları Laminar Air Flow (IVF Tech) kabini altında parafin yağ ile kaplanarak (Ovoil, Vitrolife) hazırlanmıştır. Tampon özelliği içermeyen medyumlar (G-IVF ve GTL, Vitrolife) en az 4 saat önceden hazırlanarak inkübasyon ortamında gazlanması sağlanmıştır.

Oosit toplama işleminden 1 saat sonra 1:9 oranında Gamet Buffer (COOK) solüsyonu ile seyreltilmiş hiyalüronidaz enzimi ile (HYASE 10-X, Vitrolife) enzimatik ve

mekanik olarak oosit çevresindeki kumulus hücreleri ayıklanmış, dölleme işlemine kadar inkübatörlerde bekletilmiştir. Oosit toplama işleminden 2-3 saat sonra ICSI ile MII oositler fertilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Oositler çoklu kültür sıvısına alınarak (1 dropta 3 oosit olacak şekilde, 60µl G-TL, tek aşamalı medyum) inkübatörlere kaldırılmıştır.

Dölleme işleminden 16-18 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapılarak fertilize olan, 2 pronukleus içeren oositler (2pn) kültür ortamında takip edilmiştir. Zigottan blastosist gelişimine kadar olan embriyo gelişim evreleri Çizim 3.1’de gösterilmiştir.



Çizim 3.1. Zigottan blastosiste kadar embriyo gelişim evreleri

3.3. Biyopsi İşlemi

PGT işlemi yapılacak embriyolardan 3. günde klivaja uğrayanlar Gardner ve Schoolcraft kriterlerine göre seçilerek (Gardner ve diğ. 1999), etüvde (Shel Lab, Cornelius, USA) yaklaşık 20 dakika ısınmış olan HSA (Vitrolife) ekli PGT medyumuna (G-PGD, Vitrolife) her bir dropta 1 adet embriyo olmak üzere alınmıştır. Ardından assisted hatching işlemi ile lazer (Octax Laser Shot) kullanılarak zonada delik açılmıştır. Bu işlem biyopsi için blastomer alınmasının dışında embriyo tarafından üretilen serbest embriyonik DNA’nın da medyuma karışmasını mümkün kılmıştır.

Dölleme işlemlerinden farklı olarak biyopsi pipeti (TPC, Origio) kullanılmış, 6 hücre ve daha fazla blastomer ihtiva edenlere biyopsi işlemi uygulanmıştır. 6 blastomerli embriyolardan bir, 6 hücreden daha fazla blastomer barındıran embriyolarda çekirdekçiğin net gözlenmediği durumlarda iki, diğer durumlarda bir adet blastomer çıkarılmıştır.

Önceden hazırlanıp inkübasyonu tamamlanmış olan G2 (Vitrolife) kültür kabına biyopsi işlemi biten embriyolar 25 µl'lik tekli kültür droplarına aktararak inkübasyon ortamına geri kaldırılmıştır. Genetik analize yollanmak üzere biyopsi ile alınan blastomer hücreleri steril fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS) içeren droplarda yıkanarak 2,5µL PBS içeren 0.2 ml'lik PCR tüplerine aktarılmıştır.

Assisted hatching işlemi ile biyopsi yapılan ve 3.gün 25µl'lik tekli kültür ortamına alınan embriyolar (GTL-Vitrolife) 5.güne kadar inkübe edilmiştir. Aynı embriyolar 5.gün vitrifikasyon yöntemi ile dondurma kiti (Vitrolife) kullanılarak, her bir yükleme gereğine (McGill Cryoleaf, Origio) tek embriyo yüklenerek dondurulmuş ve -196 °C'de sıvı azot içerisinde saklanmıştır.

İçeriğindeki DNA' nın 5. güne kadar atık medyuma geçmesi beklenilerek, 5. günde embriyonun içinde geliştiği kültür medyumlarından 10µl alınarak PCR tüplerine aktarılmış, genetik analize yollanmak üzere buzdolabı +4 °C bölümünde bekletilmiştir.

3.4. Genetik Analiz

Bu çalışmada, her bir embriyoya ait iki farklı tipte DNA kaynağı kullanılmıştır. Kullanılacak besiyeri, biyopsi malzemeleri ve gerekli diğer tüm sarf malzemeler DNA kontaminasyonu açısından test edilmiş ve onaylanmış ürünlerden seçilmiştir.

Steril şartlar altında elde edilen ürünler yine steril şartlar altında hazırlanmış olan 0.2 ml'lik DNA içermeyen PCR tüpleri içerisine aktarılmıştır. Bu örnekler, soğuk zincir kurallarına uyularak merkezimizden ilgili genetik laboratuvarına (GENETİKS, İstanbul) transfer edilmiştir.

Materyal: Sekans ve kütüphane hazırlamak için çeşitli ticari kit, solüsyon ve cihazlar bulunmaktadır. Bizim NGS PGT için kullandığımız kitler, solüsyon ve cihazlar şunlardır:

1. DNA Kütüphane Hazırlığı ve NGS ekipmanları:
 - a. DNA fragmantasyonu için VWR marka sonikatör.
 - b. Kütüphanenin kantitatif validasyonunu kontrol etmek amacıyla kullanılan cihaz: İnvitrogen tarafından üretilen, Qubit florometre.
 - c. DNA amplifikasyonu için ısıtıcı kapağı bulunan standart PCR cihazları (Agilent Sureselect, Biorad, Verity, vb.).
 - d. Sekans cihazı olarak: Illumina illumina MiSeq Next Generation Sekans cihazı kullanılmaktadır.
2. Kit ve reaktifler
 - a. İllumina tarafından üretilen VeriSeq PGD kit,
 - b. AgenCourt AMPure XP; Beckman Coulter,

c. Qubit dsDNA High Sensitivity assay kiti,

3. Bilgisayar donanımı

- a. NAS (ağa bağlı dosya depolama) en az 20 terabaytlık bilgi depolamaya yönelik alanı olan,
- b. Windows işletim sistemli workstation tipi bilgisayar. (12 çekirdekli işlemci ve 128 gb minimum ram)
- c. Windows işletim sistemi.

4. Bilgisayar yazılımı:

- a. İllumina tarafından üretilen BlueFuse Workflow Manager v1.3 programı ve İllumina Blue Genome BlueFuse Multi Analiz Programı

Metod: WGA (Tüm Genom Amplifikasyonu): PicoPlex veya SurePlex WGA kitlerinden biri kullanılarak üreticinin önerdiği protokol takip edilmiştir. Embriyonik gelişimin 3. gününde tek veya iki blastomer önce 'Lysis' işlemine tabi tutulmuş, ardından tüm genom amplifikasyonu ile polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır.

Şablon Hazırlığı: Komplementer DNA'dan oluşan nükleik asitleri kullanarak kütüphanenin hazırlanması ve kütüphanenin amplifiye edilmesine dayanır. Kütüphaneler kullanılacak olan DNA'nın fragmente edilmesi ardından yapışkan uçlarının adapter moleküllerle kapatılması ile hazırlanır. Kütüphane hazırlandıktan sonra ise; klonal amplifikasyon ile sekanslanmaya hazır hale getirilir. Bunun için materyal içerisinde verilen özel tasarlanmış kitler kullanılmış olup üretici firma tarafından verilen aşamalar sırasıyla takip edilmiştir.

Sekanslama ve Görüntüleme: Amplifiye edilmiş kütüphaneden sekansların dizi bilgisini oluşturmak için İllumina MiSeq kullanılmıştır. Kütüphane fragmentleri şablon olarak kullanılarak yeni DNA sentezine katılırlar. Bu esnada sekans sırasında yıkama ve temizleme işlemleri her nükleotit sekası esnasında gerçekleştirilerek sekans sırasında bağlanan nükleotitin çeşidinin ortaya çıkarılması sağlanır. Nükleotitler yeni sekansa eklendikçe dijital olarak sekansın kaydı sağlanır. Bu amaçla genellikle nükleotitlerde bulunan floresans ışımalar kullanılmaktadır.

Data Analizi: Sekans tamamlandıktan sonra işlenmemiş veri mutlaka birden fazla programla formatlanmalıdır. Bu aşamalarda sekanslanmada okunan adaptör sekansların çıkarılmaması, düşük kaliteli okumaların düzeltilmesi, orantılanması ve sekansın uygun doğrultuda haritalandırılması gerekmektedir. Bu amaçla materyal kısmında paylaşılan programlardan yararlanılmıştır. Ardından analize uygun hale gelen data anöploidiler için

İllumina Blue Genome BlueFuse Multi Analiz Programında karşılaştırma yapılarak taranır (Nagy ve Worman 2018, Grada ve Weinbrecht 2013).

3.5. Denev Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve İstatistik

Çalışmamızda 49 adet örneğin blastomer biyopsisi ve bunların atık medyum DNA analiz sonuçları kromozomların ploidi durumuna göre ploidi ve anöploidi şeklinde değerlendirilmiştir. Aynı örneğe ait her iki DNA kaynağının genetik analiz sonucunda kromozomal ploidi durumu aynıysa uyumlu, farklıysa uyumsuz olarak değerlendirilerek oranlandırılmıştır. Analize alınan tüm atık medyum örnekleri için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPV) ve negatif prediktif değer (NPV) hesaplanarak ploidi durum tespiti yapılmıştır. Sonucu çıkmayan örnekler analiz dışı bırakılmıştır.



4. BULGULAR

Çalışmamızda toplam 49 adet örnek analize alınmıştır. Bunlardan 48 tanesinde blastomer biyopsisi (%97.9) ve atık kültür medyumundan (%97.9) DNA elde edilebilmiştir. Amplifikasyon sonrası ortalama DNA oranı 21.9 ng/µl olup en düşük DNA miktarı; 3.1 ng/µl, en yüksek DNA miktarı ise; 70 ng/µl olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). 47 adet amplifiye edilmiş örneğin 38 tanesi (%80.8) genel ploidi durumu bakımından (öplid/anöplid) uyum göstermektedir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Blastomer ve atık kültür medyumundan amplifiye edilen DNA ve analiz sonuçları

Embriyo	Atık Kültür Medyumu Miktarı (ng/µl)	Blastomer Biyopsisi Ploidi Sonuçları	Atık Medyum Sıvısı Ploidi Sonuçları
1.	6.64	MONOZOMİ 1 TRİZOMİ 3	MONOZOMİ 2 TRİZOMİ 5,7,16,18,21
2.	29.6	MONOZOMİ 1p,15p TRİZOMİ 3q,4q,5p,6q,7p,12p, 13,14	MONOZOMİ 3,5,12,13,14,21,X TRİZOMİ 2,6,8,9,15,16,18,20
3.	38.2	MONOZOMİ 1,12,16,19 TRİZOMİ 2,4,7q,8q,13q	MONOZOMİ 1 TRİZOMİ 2,5,6
4.	13.6	ÖPLOİDİ	ÖPLOİDİ
5.	19.9	MONOZOMİ 7 TRİZOMİ 13	MONOZOMİ 7
6.	21	TRİZOMİ 12, 14,15,19,20,21	TRİZOMİ 8
7.	14	TRİZOMİ 7,21	TRİZOMİ 14
8.	6	MONOZOMİ 2,7,12,15,20,X TRİZOMİ 6,9,18,22	MONOZOMİ 2,14 TRİZOMİ 5,13
9.	10.2	MONOZOMİ 18	MONOZOMİ 7
10.	8.96	MONOZOMİ 1,3,14 TRİZOMİ 5,6,9,13,20,21	TRİZOMİ 21

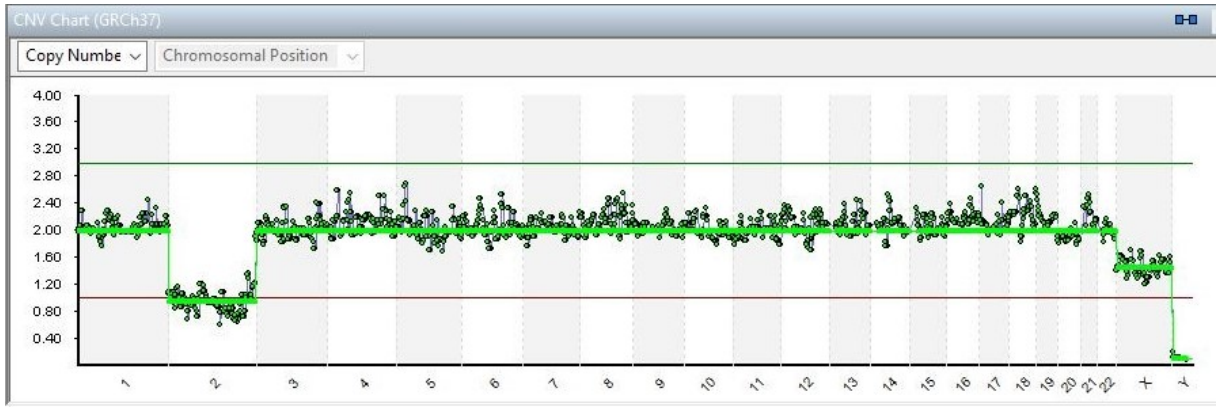
11.	5.62	MONOZOMİ X	MONOZOMİ 2,4,11,21, X TRİZOMİ 3,8,9,12,14,16,18,22
12.	16	MONOZOMİ 5 ve X	MONOZOMİ 5,7,8,9, X
13.	6.72	TRİZOMİ 22	TRİZOMİ 9
14.	3.1	TRİZOMİ 21	MONOZOMİ 5,21 TRİZOMİ 16
15.	7.78	MONOZOMİ X	MONOZOMİ 2, X
16.	6.38	MONOZOMİ X TRİZOMİ 13	MONOZOMİ 2,22, X
17.	13.8	TRİZOMİ 2,6,14,15	ÖPLOİDİ
18.	10.3	ÖPLOİDİ	TRİZOMİ 8,11,13,15,X
19.	13.7	MONOZOMİ 1 TRİZOMİ 5P	MONOZOMİ 2,7
20.	20.2	MONOZOMİ 3,12 TRİZOMİ 16,21	MONOZOMİ 10, X TRİZOMİ 3
21.	19.1	TRİZOMİ 21	ÖPLOİDİ
22.	11.7	MONOZOMİ X	ÖPLOİDİ
23.	15.9	MONOZOMİ 4 TRİZOMİ 1	ÖPLOİDİ
24.	15.6	MONOZOMİ 16 TRİZOMİ 8	ÖPLOİDİ
25.	52	TRİZOMİ 4 MONO 3,12,13,22	ÖPLOİDİ
26.	50.2	TRİZOMİ 17,12,21 MONOZOMİ 3q,8.9p,10q,18q	ÖPLOİDİ
27.	17.9	TRİZOMİ 20q	TRİZOMİ 6
28.	27.6	TRİZOMİ 3q,5q,6q,9p,18q MONOZOMİ 13	MONOZOMİ 19

30.	46	TRİZOMİ 2p,2q,7p,9q,11q,12p MONOZOMİ 19,15q	TRİZOMİ 6,12,13,20,21 MONOZOMİ 2,5,8,X
31.	29.4	TRİZOMİ 5p,7,8,9,10,12q,18,21	TRİZOMİ 3p,3q
32.	35.8	TRİZOMİ 21	MONOZOMİ 4q TRİZOMİ 2p,16
33.	44.6	TRİZOMİ 15	MONOZOMİ 3,6 TRİZOMİ 15
34.	19.6	TRİZOMİ 13,15	MONOZOMİ X
35.	27.2	TRİZOMİ 13 MONOZOMİ 19,22	MONOZOMİ 19
36.	42.8	ADOP	ÖPLOİDİ
37.	5.04	MONOZOMİ 2,8,15 TRİZOMİ 6q,12q,13q	MONOZOMİ 3,7,13,14,18,21 TRİZOMİ 2,4,5,9,20,22
38.	11.3	MONOZOMİ 9,19p,20 TRİZOMİ 2q,5q,11q,12q,4q,16	MONOZOMİ 9 TRİZOMİ 8,16
39.	67	TRİZOMİ 15	TRİZOMİ 15
40.	70	TRİZOMİ 12q MONOZOMİ X	TRİZOMİ 12q
41.	7.24	TRİZOMİ 22	TRİZOMİ 4,15 MONOZOMİ 9
42.	3.94	ÖPLOİDİ	TRİZOMİ 8,11,13,15,X
43.	4.5	MONOZOMİ 1 TRİZOMİ 5P	MONOZOMİ 2,7
44.	5.84	MONOZOMİ 2,X	MONOZOMİ 2,X
45.	41.2	MONOZOMİ 8	MONOZOMİ 6
46.	53	TRİZOMİ 14	TRİZOMİ 4

47.	38.2	MONOZOMİ 19	MONOZOMİ 19
48.	-	MONOZOMİ 1,15 TRİZOMİ 8,18	ADOP
49.	8.6	TRİZOMİ 21	TRİZOMİ 21

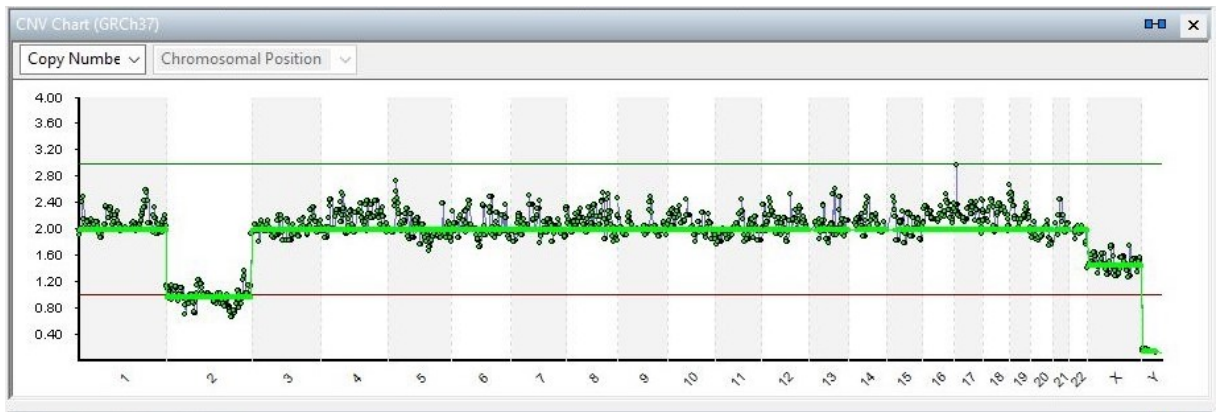
45 adet anöploidik blastomerin atık medyumununun 37 tanesinde (%82.2) anöploidi bakımından uyum gözlenmiştir (Çizim 4.1 ve Çizim 4.2, Çizim 4.3 ve Çizim 4.4, Çizim 4.5 ve Çizim 4.6, Çizim 4.7 ve Çizim 4.8).

Blastomer



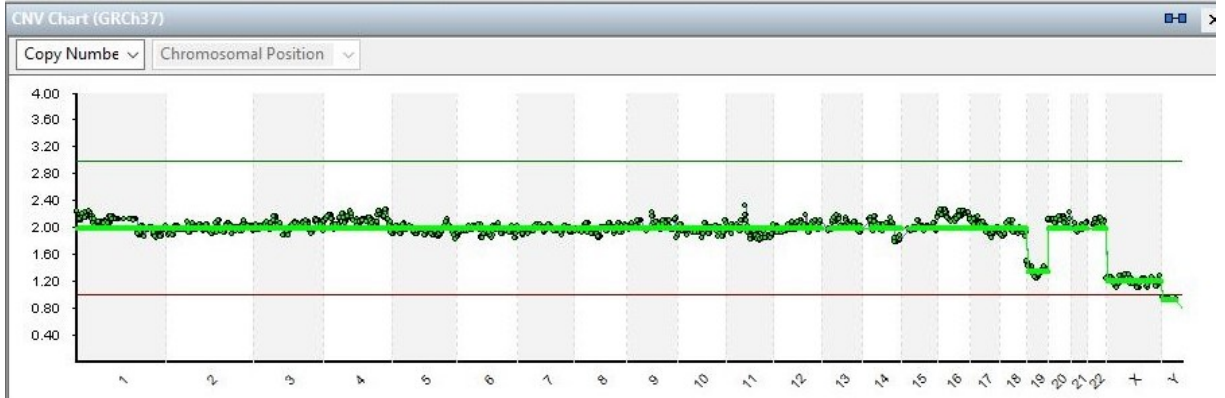
Çizim 4.1. Blastomerde saptanmış Monozomi 2 ve Monozomi X (44.embriyo).

Atık Kültür Medyumunu



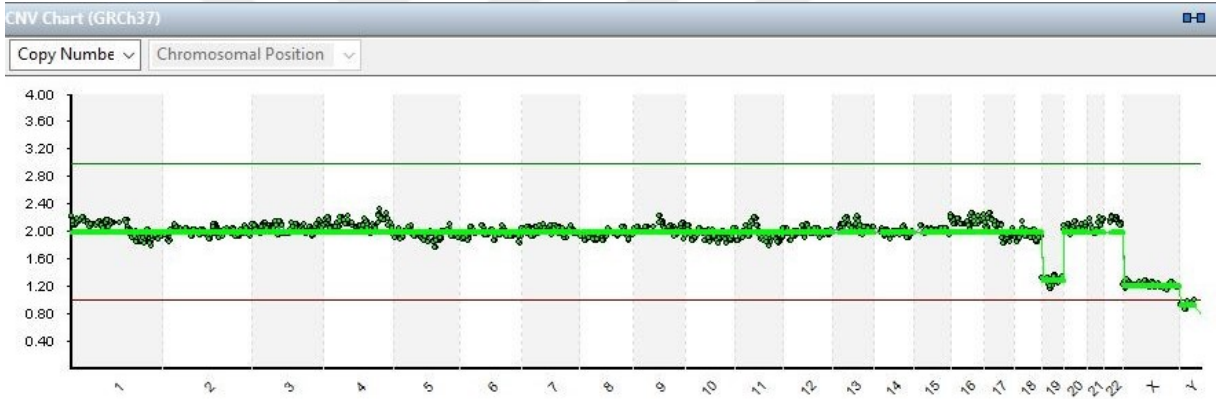
Çizim 4.2. Atık kültür medyumunda saptanmış Monozomi 2 ve Monozomi X (44.embriyo).

Blastomer



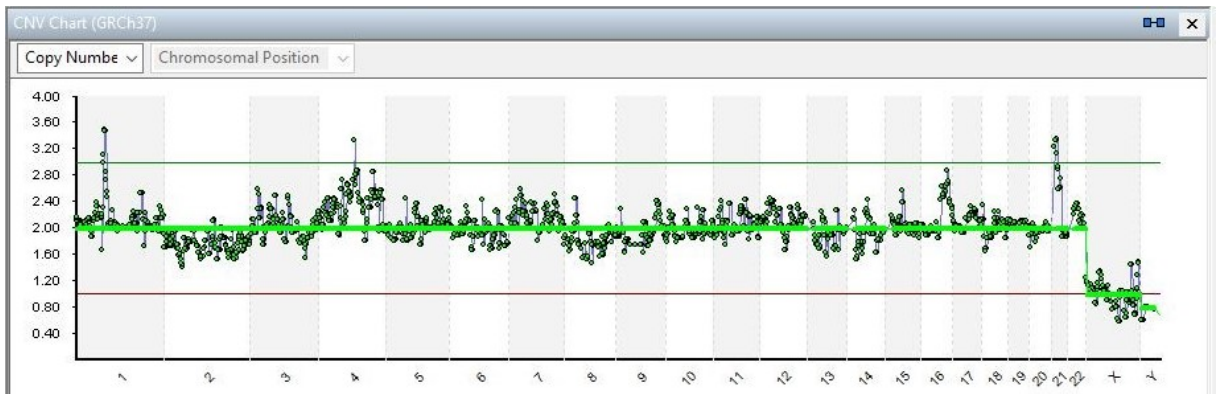
Çizim 4.3. Blastomerde saptanmış Monozomi 19 (47.embriyo).

Atık Kültür Medyumu



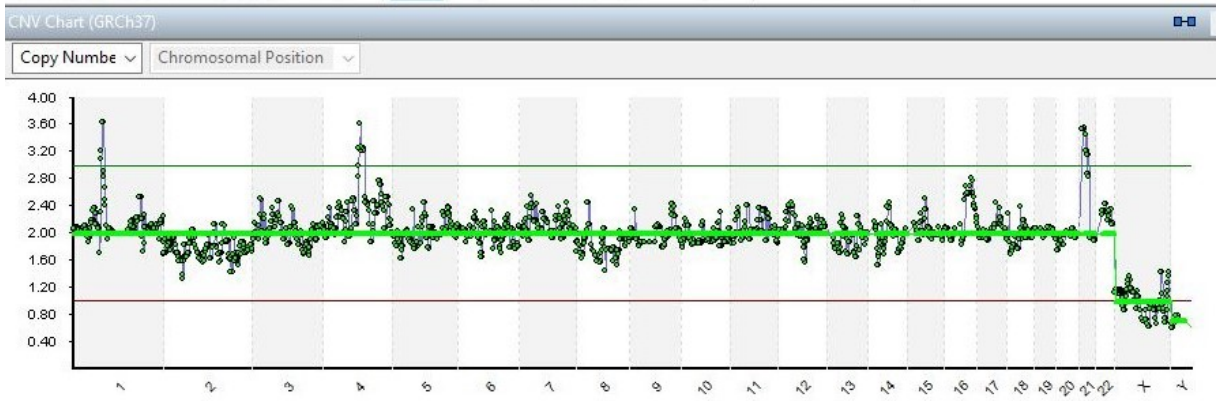
Çizim 4.4. Atık kültür medyumunda saptanmış Monozomi 19 (47.embriyo).

Blastomer



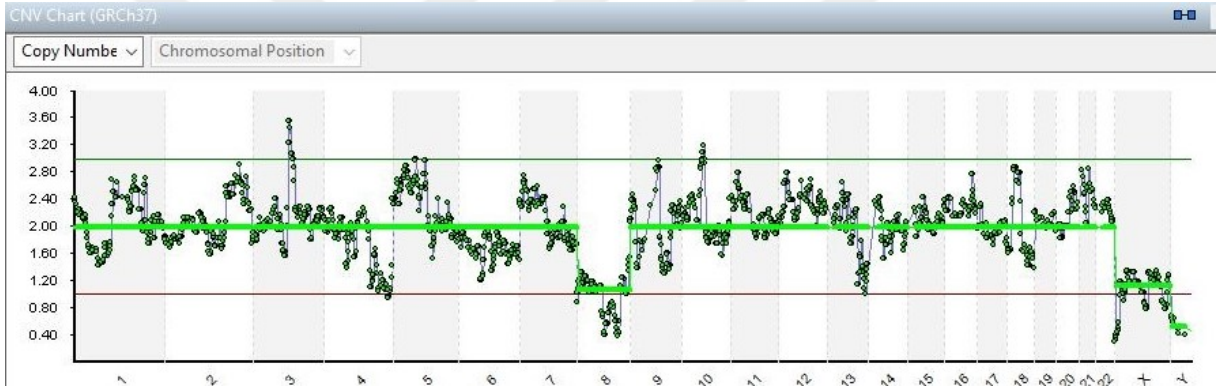
Çizim 4.5. Blastomerde saptanmış Trizomi 21 (49.embriyo).

Atık Kültür Medyumu



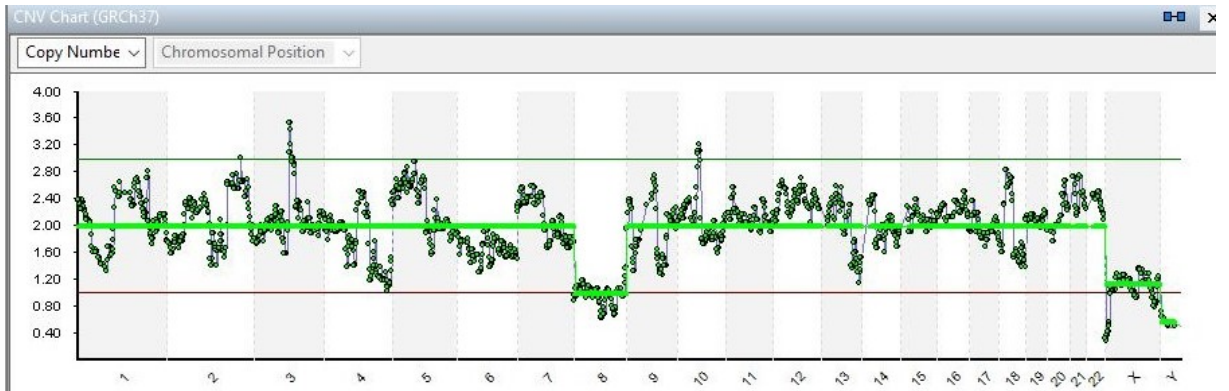
Çizim 4.6. Atık kültür medyumunda saptanmış Trizomi 21 (49.embriyo).

Blastomer



Çizim 4.7. Monozomi 8 saptanmış blastomer (45.embriyo).

Atık Kültür Medyumu



Çizim 4.8. Monozomi 6 saptanmış atık kültür medyumunu (45.embriyo).

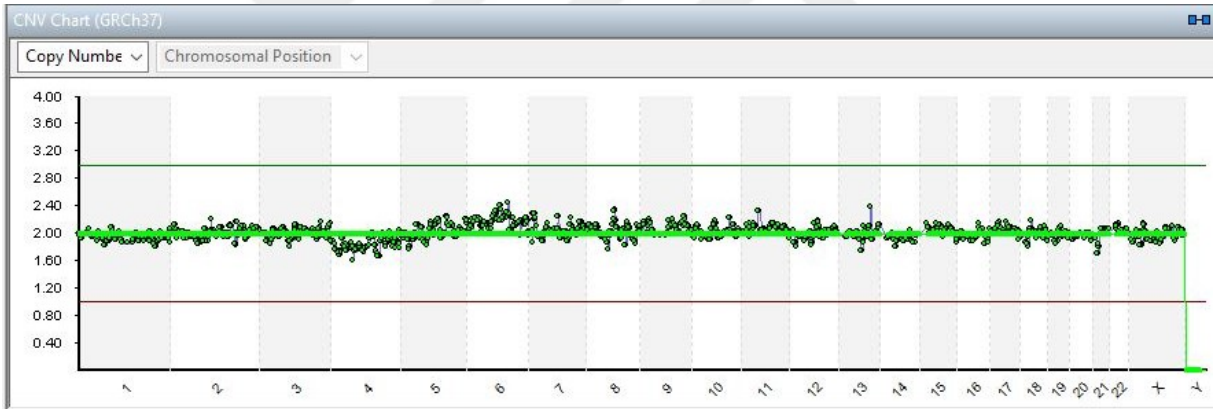
2 Adet öploidik embriyonun 1'inin atık kültür medyumunda (%50) öploidisi açısından uyum gözlenmiştir (Çizim 4.9 ve Çizim 4.10). Kalan embriyolar atık kültür medyumlarıyla ploidi bakımından uyumsuzdur (Çizim 4.11 ve Çizim 4.12, Çizim 4.13 ve Çizim 4.14).

Blastomer



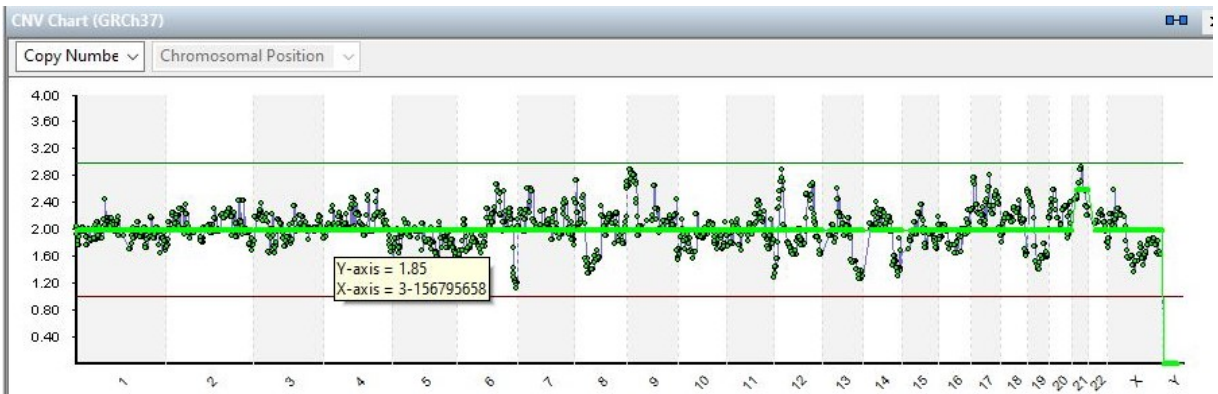
Çizim 4.9. Öploidik blastomer (4.embriyo).

Atık Kültür Medyumunu



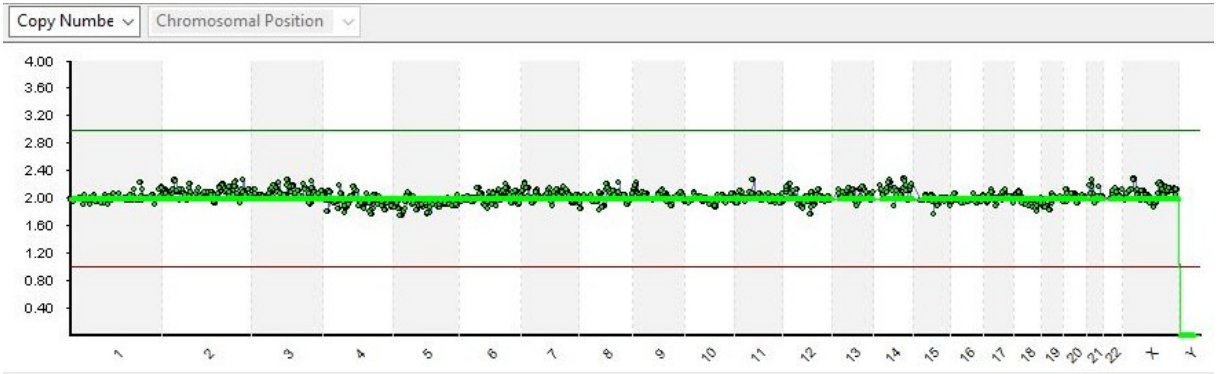
Çizim 4.10. Atık kültür medyumunda saptanmış öploidisi (4.embriyo).

Blastomer



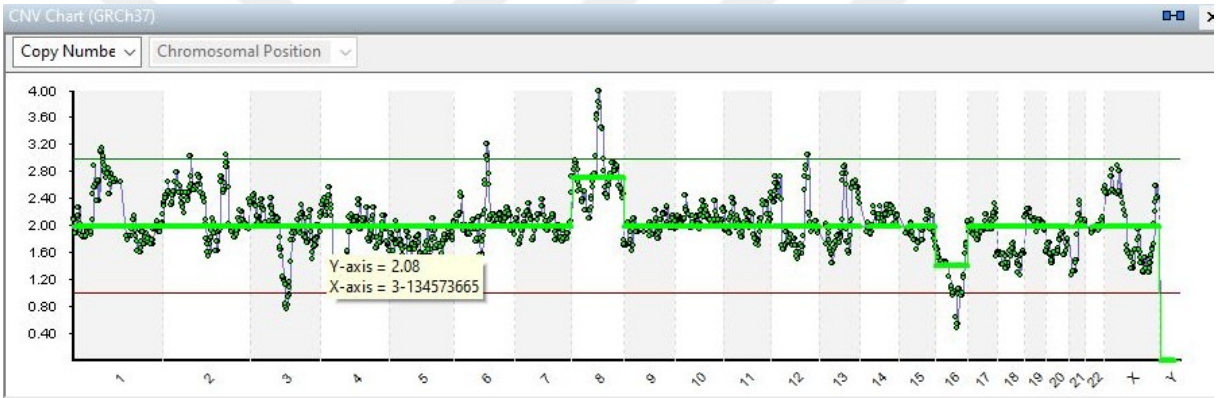
Çizim 4.11. Trizomi 21 saptanmış anöploidik blastomer (21.embriyo).

Atık Kültür Medyumu



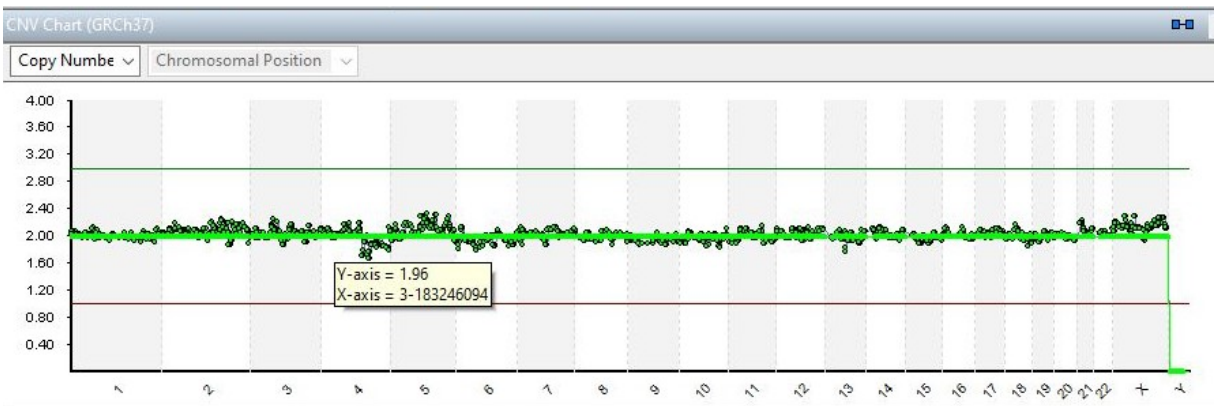
Çizim 4.12. Öplodik atık kültür medyumu (21.embriyo).

Blastomer



Çizim 4.13. Monozomi 16 ve Trizomi 8 saptanmış blastomer (24.embriyo).

Atık Medyumu



Çizim 4.14. Öplodik atık kültür medyumu (24.embriyo).

45 adet anöplöidik blastomerin 16'sının atık medyumunda en az 1 adet aynı kromozomal anormallik gözlenmiştir (%35.5). Sadece 1 adet embriyonun blastomer biyopsisi sonucu embriyo öplöidik çıkmasına rağmen, atık kültür sıvısında anöplöidi tespit edilmiştir. 8 adet embriyonun blastomeri anöplöidik olmasına rağmen atık kültür medyumunu normal saptanmıştır (Bak. Çizim 4.11 ve Çizim 4.12, Bak. Çizim 4.13 ve Çizim 4.14).

49 örnekten toplanan blastomer biyopsilerine baktığımız zaman tek kromozoma ait 40 adet farklı kromozomal bozukluk saptanmış, bunların 33 tanesi de aynı şekilde farklı atık medyum örneklerinde saptanmıştır.

Çalışmamızda 5.gün atık kültür medyum duyarlılığı 0.82, özgülüğü 0.50, pozitif prediktif değer 0.97, negatif prediktif değer 0.11, tanısal doğruluk değeri 0.81 olarak bulunmuştur. Negatif kontrol açısından bakılacak olursa, içinde embriyo bulunmayan taze kültür medyumundan elde edilen dört sıvının hiçbirinde DNA amplifikasyonu gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

PGT, in-vitro fertilizasyon (IVF) işlemleri sonucu sağlıklı embriyoların teşhisi için yaygın kullanılan bir yöntem olup (Brezina ve diğ. 2012, Brezina ve Kutteh 2015, Yan ve diğ. 2014) embriyo seçiminde anöploidi gösteren embriyoları elimine etmek için kullanılmaktadır (Yang ve diğ. 2012, Forman ve diğ. 2013, Scott ve diğ. 2013, Chen ve diğ. 2015, Dahdouh ve diğ. 2015). Bu yöntem kullanılarak yapılan embriyo transferlerinde sağlıklı öploidik embriyolar bilindiği için gebelik oranları %30' a kadar artış göstermektedir (Yang ve diğ. 2012).

Son 20 yıldır gelişen yardımcı üreme ve tanısal teknikler sayesinde PGT dünya çapında uygulanabilirliğini her geçen gün arttırmaktadır (Simpson 2010, SenGupta ve Delhanty 2012). Özellikle doğabilecek çocukları kalıtsal olarak risk altında olan çiftler için önerilmektedir (Palini ve diğ. 2013, Brezina ve diğ. 2012, Brezina ve Kutteh 2015, Yan ve diğ. 2014).

Avrupa Üreme Tıbbı ve Embriyoloji Derneği (ESHRE)'nin PGT toplantısı verileri göstermiştir ki, PGT sayesinde transfer başına gebelik oranları son on yılda %26 oranında anlamlı derecede artmıştır (Harper ve diğ. 2012).

Sağlıklı embriyonun teşhisi ve transferi gebelik başarısı için çok önemlidir. Bunun için FISH, PCR, aCGH ve NGS gibi bazı sitogenetik yöntemler uygulanmaktadır (Munne ve diğ. 1998a, Munne ve diğ. 1998b; Verlinsky ve diğ. 1999, Franssen ve diğ. 2011).

Uzun yıllar hücrelerin genetik içeriğini tespit etmek için hücre bölünmesinin interfaz aşamasında kromozomal dengesizliğini gösteren FISH tekniği kullanılmıştır. Fakat erken evre embriyoların bazen mozaik hücre yapısında olabileceği ve bu durumun embriyonun gelecekteki genetik içeriğini doğru şekilde yansıtmayabileceği öngörülmüştür. PGT başlangıçta FISH tekniği ile tek blastomer biyopsilerinde genellikle X,Y,13,18 ve 21. kromozomların tayininde kullanılsa da 9 kromozom sonrası analizlerde bu teknik sınırlı kalmıştır. Diğer yöntemlere göre eski bir yöntem olmasına karşı hala bazı translokasyon ve inversiyon olgularında tek seçenek olarak kullanılmaktadır. Üstelik delesyon büyüklüğü 15 MB'ın altında olması durumunda telomerik problemler kullanılarak uygulanan FISH tekniği PGT yöntemi için uygun olacaktır. Aksi halde normal genetiğe sahip olarak görünen embriyonun aslında normal olmadığı riski ile karşılaşmış olunabilir. Benzer şekilde yer değiştiren parçaların bir veya ikisinin telomerik bölgede olması durumunda da aCGH ve/veya NGS yöntemi yerine FISH yöntemi kullanılması gereklidir (Iwarsson ve diğ. 2000,

Malmgren ve diğ. 2002, Munne ve diğ. 1994, Munne ve diğ. 1995, Harper ve diğ. 1995, Delhanty ve diğ. 1997, Iwarsson ve diğ. 1999, Wells ve diğ. 2000).

Embriyoloji laboratuvarlarının ve genetik analiz metodlarının zaman içerisinde gelişip evrimleşmesinden dolayı FISH ve PCR gibi protokollerinin kişilerin şahsi uygulamasına bağlı olduğu protokoller, laboratuvar şartlarının bulunduğu durum, validasyonu ve de zaman kaybetmemenin önem arz etmesinden dolayı meydana gelebilecek kısıtlılıklardan korunmak amacıyla aCGH kromozom haritalandırması gibi daha güvenilir ve gelişmiş gen amplifikasyon teknikleri uygulanmaktadır (Handyside ve diğ. 2010, Treff ve diğ. 2010, Alfarawati ve diğ. 2011, Tan ve diğ. 2013, Fiorentino ve diğ. 2011, Natesan ve diğ. 2014, Wells 2014, Gutierrez-Mateo ve diğ. 2011, Alfarawati ve diğ. 2011, Munne 2012, Vanneste ve diğ. 2011, Colls ve diğ. 2012, Deleye ve diğ. 2015). Bu yöntem ile 24 kromozomun detaylı taranmasıyla klivaj aşamasındaki embriyolarda yaklaşık % 75 oranında mozaizm görülme ihtimali vardır (Wells ve Delhanty 2000). Yaklaşık %72 geni kapsayan çoklu amplifikasyon tekniği kullanılarak %36 oranında geni kapsayan PCR bazlı yöntemlere karşı daha geniş kapsam barındırmaktadır (Voet ve diğ. 2013). Ayrıca maliyeti NGS yöntemine göre daha düşüktür. Mozaizm her iki yöntemle de tespit edilebilir ve 24 kromozomun detayları belirlenebilir (Magli ve diğ. 2016). aCGH tekniği ile kromozomlarda anöploid taraması yapılabilir fakat genomdaki yapısal bozuklukları yansıtmaz (Brezina ve diğ. 2016). aCGH yöntemi ile anormal hücre oranı %50' den fazla olduğu zaman mozaizm tespit edilebilir (Mamas ve diğ. 2012). Aksine Christodoulou ve diğ. (2016) çalışmalarında yapısal anomalilerdeki sapmalarının her zaman PCR ve FISH tekniğiyle tespit edilemeyeceğini söyleyerek aCGH ile 133 anormal embriyodan 48' inde parental kaynaklı yapısal anomali gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Parental kaynaklı olmayan 78 anöploidik durum tespit ederek bu özelliği gösteren embriyoların canlı doğuma sebep olabilecek embriyolar olsa dahi mozaik olan embriyolara transfer işlemi uygulanmamıştır.

NGS yöntemi, PGT işlemlerinde yeni kullanılmaya başlayan, aCGH yöntemine göre yüksek doğruluk sağlayan, aynı anda birçok DNA yönteminin analiz edilmesini sağlayan, 13-16 saat kadar süre alan daha detaylı bir kromozom analiz yöntemidir (Kung ve diğ. 2015; Wells ve diğ. 2014). Bu sebepten ötürü birçok çalışmada olduğu gibi biz de kendi çalışmamızda DNA analizlerimizde bu yöntemi tercih ettik (Zhang ve diğ. 2016, Fiorentino ve diğ. 2014, Lukaszuk 2015, Sachdev ve diğ. 2017). Yapılan randomize kontrollü çalışmada mozaizm tespit etmek için çoklu anöploidik hücre dizilerinde NGS ve PCR karşılaştırılmış, NGS' nin % 17 kadar az bir orana sahip anöploidik hücreleri bile belirleyebildiği sonucuna varılmıştır (Sachdev ve diğ. 2016). Fakat farklı analiz kriterlerinden dolayı laboratuvarlar

arasında blastosist biyopsilerinde mozaisizm açısından farklı oranlar belirtilebilir (Sachdev ve diğ. 2017). Benzer bir çalışma ile Lukaszuk ve diğ. (2015) NGS'in klivaj aşamasında tek blastomer alınarak anöploidi taraması için uygulanabilirliğini desteklemişlerdir.

Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarla aCGH yöntemi, tek gen mikroarray analizi, PCR ve NGS yöntemleri ile DNA tarama yöntemlerinin yelpazesi bir hayli genişlemiştir. Böylelikle daha iyi kalitede daha az değişkene bağlı ve daha güvenilir genetik analiz değerlendirilmeleri yapılabilir (Zhang ve diğ. 2016, Lukaszuk ve diğ. 2015, Lam 2013). Bu tekniklerle yapılan PGT'nin canlı embriyo seçiminde faydalı olabileceği ve bu sebeple implantasyon oranını arttırarak daha yüksek gebelik oranları elde edilmiş, düşük insidansını azaltmada faydalı olabileceği belirtilmiştir (Scott ve diğ. 2013).

PGT ile ilgili kullanılan yöntemlerde hangi hücreye ait biyopsinin tercih edileceği ve bu işlemin düzgün yapılabilmesi en önemli ve kritik noktalardan biridir. Embriyologun bu konuda eğitilmiş ve yetenekli olması, mikromanüplasyon, assisted hatching, takip ve biyopsi işlemlerini en iyi şekilde yapabilmesi bununla birlikte kullanılan malzeme ve ekipmanların uygun olanlarının seçilmesi, laboratuvar şartlarının ve kalite kontrol sistemlerinin düzgün olarak ayarlanması en önemli hususlardandır.

Birincil ve ikincil polar cisim hücreleri değerlendirildiğinde bu hücreler embriyonal gelişim için gerekli değildir. Biyopsileri, blastomer veya trofoektoderm hücre biyopsilerine göre en az invaziv olan yöntem dahi olsa embriyonun genel genetik durumunu yansıtmadığından sadece maternal faktörün önem arz ettiği durumlarda tercih edilir (Salvaggio ve diğ. 2014).

Klivaj döneminde embriyolar embriyonik genom aktivasyonunu içeren dinamik bir süreçtedir. Fare embriyolarında kavitasyon aşamasına kadar embriyo totipotent özellik gösterir. 5. yarıktan sonra totipotensi özelliği kaybolmaya başlar. Bunlarla birlikte son 20 yıldır yapılan çalışmalar blastomerlerin 10 hücreye kadar farklılaşma özelliği göstermediği yönündedir. Bu sebeple blastomer biyopsisi sırasında 1 veya 2 hücrenin çıkarılması eşit gelişim potansiyeli göstererek embriyonal gelişimde herhangi bir olumsuz etkisi bulunmamaktadır (Xu ve Montag 2012). Ayrıca biyopsi esnasında 2 blastomer çıkarılması allel drop-out (ADO) oranını düşüreceğinden ve mozaisizmin daha net teşhisi açısından uygun olabilir. Bu şekilde biyopsi yapılarak sağlıklı çocuklar meydana geldiği gözlenmiştir (Mastenbroek ve diğ. 2007). Blastomer biyopsisi için en uygun zaman dilimi döllenikten 66-70 saat sonraki zaman dilimidir. Bu evrede embriyoların hücre sayısı 6 ile 10 arasındadır. Bu döngüden sonra embriyo blastomerleri arasında hücre membran proteinleri ve kalsiyum/magnezyum kaynaklı başlayan kompaktlaşma, biyopsi işlemini

zorlaştıracığından (Nikas ve diğ. 1996), çalışmamızda bu zaman dilimleri arasında biyopsi yapmaya dikkat ettik. Kalsiyum ve magnezyum ihtiva etmeyen biyopsi solüsyonunda yaklaşık beş dakika önerildiği şekilde bekleterek (Goossens ve diğ. 2008) hücreler arası kompaktlaşmayı inhibe ederek işlemi mümkün olan en kısa sürede, çevresel faktörlerden etkilenmeyecek şekilde gerçekleştirdik. Çünkü; embriyo, kültür medyumuna geri kaldırıldığında kompaktlaşma yeniden başlar.

Goossens ve diğ. (2008), Xu ve Montag (2012) çalışmasına paralel olarak, iki blastomer biyopsisinin yapılmasıyla canlı doğum oranlarında bir değişiklik olmadığını belirtmiştir. Fakat daha sonrasında yaptıkları çalışmada bu verilerin tersine bir hücrenin çıkarılmasındansa aynı anda iki hücrenin çıkarılmasının daha zayıf embriyo kalitesine zemin oluşturduğu ileri sürülmüştür. Tek hücre biyopsisinin klinik verilerinin iki hücre çıkarılmasından daha iyi sonuç verdiği başka çalışmalarla da doğrulanmış, ayrıca genetik imkanların gelişmesiyle iki hücre biyopsisinin de bir gereği kalmamıştır (Fragouli ve Wells 2012, Fiorentino 2012). Tek bir hücre alınarak mutasyon analizi ve tek gen bozukluklarına bakılabilir, yeterli sayıda kromozom kopyalanıp değerlendirilebilir. Mümkün olan en az sayıda biyopsi hücrelerinin alınmasının embriyoyu daha az hasara uğrattığı bilinmektedir. Nitekim klivaj aşamasındaki blastomer ve blastosist aşamasındaki trofoektoderm hücrelerine biyopsi uygulanmasının implantasyon oranlarını düşürdüğü gözlenmiştir (Cohen ve diğ. 2007, Zhang ve diğ. 2016).

Çalışmamızda yüzden fazla hücreye sahip 5. gün embriolarından 4 veya 5 hücre alınmasındansa, totipotent özellikte olan en az 6 hücreli 3. gün embriolarından 1 veya 2 hücre alınmasının embriyonun içeriğini daha iyi yansıttığına inanmaktayız. O sebeple 3. gün embriyo biyopsisini tercih ettik. Datalara baktığımızda blastosist biyopsisi ve verileri daha çok çalışılmış olduğundan biz de çalışmamızda 3. gün embriyo ve sonuçlarını değerlendirmek istedik. Blastomer biyopsisinin bir diğer avantajı da taze transfer tercih edileceği takdirde zaman kazancı sağlayabilmesidir. Böylelikle vitrifikasyon işlemine gerek kalmayabilir. Fakat bazı araştırmalar 5. gün embriolarında daha fazla fakat daha az hacimde hücreye biyopsi yapıldığı için iç hücre kitlesi (İHK)'nin zarara uğrama ihtimalini daha düşük görmektedir (Xu ve diğ. 1999). Lukaszuk ve diğ. (2015) çalışmalarında klivaj aşamasında normal çıkan embriyo oranını sadece %35.3 olarak bularak, klivaj aşamasında segmental anöploidi durumunun klinikle ilişkisinin henüz net olmadığını belirtmişlerdir.

Bir başka blastomer biyopsisi çalışması da Majumdar ve diğ. (2016) tarafından yapılmış, 38 yaş üstü ilerleyen maternal yaş, 2'den fazla başarısız IVF denemesi olanlar ve 2'den fazla düşük yapan hasta endikasyonları seçilerek en az 4 adet iyi kalitede embriyoya

sahip olan düşük over rezervli hastalar çalışılmıştır. 3. gün PGT yapılan hasta grubu ve PGT yapılmayan kontrol grubu şeklinde hastalar gruplandırılmış, sırasıyla implantasyon oranları %63.2 ve %26.2 (P=0.001), klinik gebelik oranları ise %73.3 ve %36.7 (P=0.006) olarak PGT yapılmayanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çoğul gebelik oranında da PGT yapılanlarda %31.9' dan %9.1' e uzanan keskin bir düşüş gözlenmiştir. Bu çalışmada embriyo morfolojisinin geleneksel seçilmesinden ziyade 24 kromozom taramasının istatistiksel olarak klinik gebelik oranlarını daha fazla arttırdığını belirtmiştir. Fakat bilinmektedir ki düşük over rezervli veya ilerleyen maternal yaşa sahip hastalarda daha az sayıda oosit elde edildiğinden döllenme ve klivaja uğrayan embriyo sayısında düşüş gözlenebilir. Bu durum da genetik analiz yapılmasını zorlaştırarak invazivite açısından az sayıda oluşan embriyoları riske atabilir.

Bir diğer çalışmada blastomer biyopsisi yapıp taze transfer gerçekleştirilen 45 hasta ve biyopsi yapılmayan 53 kontrol grubu hasta kıyaslanmış, NGS ile biyopsi yapılan grupta implantasyon oranı ve gebelik oranı daha yüksek bulunmuş, her iki grupta da NGS ile sadece 1 hastada düşük gözlenmiştir. Düşük riskinde anlamlı derecede bir fark gözlenmemiştir. Yine de NGS yöntemiyle normal genetik içerikteki embriyo tespit edildiğinden bu embriyo transferlerinin düşük oranını azalttığı bilinmektedir. Görülen düşüklüklerin nedeni olarak taze siklusta kontrollü ovaryan stimülasyonu ile uterusun etkilenmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Shapiro ve diğ. 2014, Develiolu ve diğ. 1999, Nikas ve diğ. 1999, Mirkin ve diğ. 2004).

Zamanlama olarak transfer uygulanacak güne genetik sonuçlar çıkmasına rağmen çoğu araştırmacı tarafından kabul gören, hiperstimülasyonun olumsuz etkisinin azaltılması bakımından embriyoların dondurulup endometriyumun sonraki siklusta en iyi şekilde hazırlanarak transfer edilmesi bakımından, blastosist aşamasındaki embriyolarımız dondurulmuştur (Papanikolaou ve diğ. 2019, Chen ve diğ.2015, Gorodeckaja ve diğ. 2019). Datamızda amplifikasyon başarısızlığına uğramış örnek oranı oldukça düşüktür (%2). Aksi durumda embriyonun tekrardan çözdürülüp biyopsi yapılabilmesi mümkündür. Biyopsi işlemine giden genetik materyal ihtiva eden hücre sayısı arttıkça analiz başarısı da doğru orantılı bir şekilde yükselmiş olur. Fakat tekrardan çözdürülüp biyopsi yapıp yeniden dondurma işleminin embriyoyu negatif yönde etkilemesi ihtimalini artırır (Christodoulou ve diğ. 2017).

Yenidoğan ölüm oranları ve konjenital anomaliler ele alındığında 3. gün biyopsisi yapılan embriyo dataları ile biyopsi yapılmayan embriyolardan meydana gelen çocuklar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir (Nekkebroeck ve diğ. 2008, Harper ve diğ. 2012).

Embriyo kültür ortamlarının gelişmesiyle blastomer biyopsisinin akabinde trofoektoderm biyopsisi de mümkün hale gelmiştir. Alınabilecek trofoektoderm hücre sayısının daha fazla olması ve daha az hasar oluşturmasından dolayı diğer biyopsilerden daha avantajlı olarak kabul edilir. 6. gün blastosist transferinin 5. gün transferinden daha düşük klinik gebelik oranına sahip olduğu ve de 5. gün biyopsinin allel drop out ve amplifikasyon başarısızlığını düşürdüğü bilinmektedir. (Kokkali ve diğ. 2007). Bu görüşe paralel bir diğer çalışmada, trofoektoderm biyopsisinde amplifikasyon başarısızlığına uğrama oranı yaklaşık %1 veya %2 olarak belirtilmiştir. Sonuç alınamaması durumunda dondurulmuş blastosistin çözme işlemini takiben tekrar biyopsi yapılabilmesi yönünden de olumsuz bir yönü bulunmamaktadır (Handyside 2016).

Randomize kontrollü çalışmalar trofoektoderm biyopsisi yapılmamış gruptan iki embriyo transferi yapılmasındansa, biyopsi yapıp analize gitmiş bir embriyo transferi arasında benzer gebelik sonuçları olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenden ötürü biyopsi işlemi aynı zamanda tek embriyo transferi ile çoğul gebelik komplikasyonlarını önlemektedir (Forman ve diğ. 2012).

Kuznyetsov ve arkadaşları (2018) NGS yöntemi ile 35 hastadan elde edilen 47 embriyonun tüm kromozom kopya sayısı ve tek gen açısından değerlendirdiklerinde trofoektoderm ve tüm blastosist uyumunu %87.5 ve %96.4 olarak bulmuş, benzer bir çalışmada Li ve diğ. (2018) tarafından yapılarak bu oran Kuznyetsov ve diğ. (2018)'nin çalışmasından daha düşük olarak %45 ve %50 oranında bulunmuştur.

Bazı prospektif çalışmalar 3. gün blastomer biyopsisi ile trofoektoderm biyopsisini FISH tekniği ile kıyaslayarak canlı doğum oranları arasında anlamlı bir fark gözlemlememiştir (Shamonki ve diğ. 2016). Bu verilere zıt olarak 9 adet prospektif kontrollü randomize çalışma bu yaklaşımı yalanlamış, FISH tekniğinin zayıf güvenilirlik ve doğruluk payı olduğunu ve 3. gün iki hücre biyopsisinin ayrıca zararlı olabileceğini belirtmiştir (Forman ve diğ. 2013).

Son birkaç yılda araştırmacılar embriyonik genom değerlendirmeleri için noninvaziv PGT teknikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır (Cohen ve diğ. 2013, Hammond ve diğ. 2016, Lu ve diğ. 2016, Assou ve diğ. 2014, Wu ve diğ. 2015). Bu teknikler düşük maliyetli, yüksek çözünürlüğe sahip, etkili ve noninvaziv olmalıdır ki invaziv tekniklerin yerini alabilsin (Handyside 2016). Yardımlı üreme tekniklerinde invaziv tekniklerden kaçınmak başarıyı arttıracak ve muhtemel riskleri azaltacaktır. Bu zamana kadar time lapse (Adamson ve diğ. 2016, Liu ve diğ. 2016, Motato ve diğ. 2016), atık kültür medyumundaki metabolitler (Uyar

ve Seli 2014, Sakkas 2014 Bellver ve diğ. 2015, Rodgaard ve diğ. 2015), proteomiksler (Katz-Jaffe ve diğ. 2009, Nyalwidhe ve diğ. 2013, Benkhalifa ve diğ. 2015) ve mikro RNA (Cuman ve diğ. 2015, Kropp ve Khatib 2015, Rosenbluth ve diğ. 2013) gibi embriyonun canlılığı adına yapılan bazı çalışmalar tam olarak başarıya ulaşamamıştır. Son 5 yılda noninvaziv prenatal genetik tarama ile özellikle geç 1. ve erken 2. trimester dönemi gebeliklerinde yaygın olarak gözükten kromozomal anormallikler teşhis edilebilmektedir (Chiu ve diğ. 2011, Ehrich ve diğ. 2011, Sehnert ve diğ. 2011, Palomaki ve diğ. 2011, Sparks ve diğ. 2012, Palomaki ve diğ. 2012, Bianchi ve diğ. 2012, Norton ve diğ. 2012, Dan ve diğ. 2012, Bianchi ve diğ. 2014).

Bu konuyla ilgili ön plana çıkan DNA kaynakları embriyonun içinde bulunduğu atık kültür sıvısı (Stigliani ve diğ. 2013, Stigliani ve diğ. 2014, Assou ve diğ. 2014, Wu ve diğ. 2015) ve de blastosist formasyonunun içinde bulunan blastosöl sıvısıdır (Palini ve diğ. 2013, Gianaroli ve diğ. 2014, Tobler ve diğ. 2015, Magli ve diğ. 2016). Böylelikle biyopsi işleminin olası invaziv riskleri elimine olabilir.

Yapılan birkaç öncü çalışmada atık medyumda tespit edilen DNA'nın embriyonun bölünmeye başladığı erken bölünme evresinde (2.-5.gün arası) sekrete edildiği düşünülmektedir. Shamonki ve diğ. (2016) çalışmasının gözlemleri sonucunda serbest embriyonik DNA embriyonik gelişimin erken evrelerinde salınmaya başlar. 5. günde bu miktar 3. günden önce olan miktarla hemen hemen aynıdır ve 5. günde azalmaya başlar. Bu nedenle çalışmamızda 3. gün ve 5. gün dahil, bu günler arasında atık medyum sıvısına geçen DNA ile blastomer biyopsisi sonuçlarının ploidi durumu bakımından korelasyon gösterip göstermeyeceğine baktık. Çalışmamızın kısıtlılıklarından biri Feichtinger ve diğ. (2017)'nin gözlemlendiği gibi yaklaşık %20 kadar embriyo içeriğini atık medyumuna yansıtamamış olabileceğidir. Bu durum da analiz sayısını azaltabilmektedir.

Assou ve diğ (2014)'te yaptığı çalışmada, 3. 5. ve 6. gün embriyolarında PCR tekniği uygulanarak atık medyumda DNA elde edilebilmiş fakat bunların kıyaslaması yapılmamıştır. Ayrıca atık medyumda Y kromozomunda bulunan bir gen olan Testis spesifik protein Y (TSPY) 1 genine bakılmış, böylelikle cinsiyete bağlı taşıyıcı hastalıklarda PGT'nin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sınırlılığında medyumun kontaminasyon açısından değerlendirilmeyişi, fertilizasyon yöntemi olarak ICSI mi, IVF mi tercih edildiği, eğer IVF ise spermlerin herhangi bir kontaminasyon oluşturup oluşturmadığının, bu sebeple Y kromozomunun tespit edilip edilmediğinin bilinmemesidir. PCR bazlı amplifikasyon tekniğinin daha dar kapsamlı genomların analizlerinde tercih edilebilir olduğu belirtilmiştir (Voet ve diğ. 2013). Stigliani ve diğ. (2013) önceki çalışma

ile benzer olarak Y kromozomuna bakmış, aCGH yöntemi ile kültür sıvısında sadece iki örnekte kromozomu tespit edebilmiş fakat toplam örnek sayısı belirtilmemiştir. ICSI yöntemi uygulanmış embriyoların atık medyumunda Y kromozomu bulunup bulunmadığına dair geniş çaplı bir araştırma yapılmalıdır.

Wu ve diğ. (2015) çalışmalarında 3. gün biyopsisi yaparak kan hastalığı olan talasemi genine bakmış, 413 embriyoya yapılan blastomer biyopsisi ile bu örneklerin atık medyumları karşılaştırılmıştır. Bu iki veri arasında %82.1 oranında uyumluluk gözlenmiştir. Diğer taraftan bu biyopsi yapılan embriyoların 128 tanesi 6. güne kadar takip edilerek 6. gün atık medyumları tekrar toplanmış talasemi geninde %88 oranında, daha önceden tanısı yapılmamış 74 embriyoda ise % 91 oranında atık medyumunda uyumluluk gözlenmiştir. Allel drop out oranı her iki grup için yaklaşık %12 oranında benzer bulunmuştur. Bunun yanı sıra blastomer biyopsisi yapılmayan 61 blastosistin kültür medyumları değerlendirilerek 4. ve 6. günlere nazaran gen açısından en yüksek uyumluluk 5. günde tespit edilmiştir. 5.gün atık medyum uyumluluğunun 3.günden yüksek çıkmasının nedeni muhtemelen kümülatif DNA oranının 5.gün daha yüksek olmasıdır. Bu sebeple biz de çalışmamızda 5.gün atık medyumundan DNA analizi gerçekleştirdik. Fakat çalışmanın otörleri tespit edilen DNA'ların salt embriyonal kaynaklı olup olmadığını, medyum tazelenmeden kumulus hücrelerini uzaklaştırmak gibi ekstra önlem alsalar dahi bilememektedirler. Benzer olarak Xu ve diğerlerinin (2016) çalışmasında, assisted hatching işlemi ile 5. güne kadar kültüre edilmiş atık medyum ile blastosist biyopsisi kıyaslanmış, sonuçlar arasında yüksek oranda korelasyon bulunmuştur. Konuyla ilgili bir diğer çalışma Liu ve diğ. (2017) tarafından yapılmış, anöploidi taraması için beta talasemi IVSII654 mutasyonuna bakılarak atık kültür ve embriyo biyopsileri kıyaslanmıştır. Atık kültür medyumları örnekleriyle, öploidi uyumu %90, anöploidi uyumu ise %72.7 oranında gözlenmiştir. Bu çalışmaların sonucu olarak embriyo kültür medyumlarının PGT analizleri için potansiyel kaynağa sahip olduğu, noninvaziv olmasından kaynaklı faydalı bir şekilde kullanılabilmesi fakat genetik materyalin salt embriyoya dair olup olmadığını belirlemek ve klinikte de kullanımını sağlamak amacıyla daha fazla araştırma yapılması gerekliliği belirtilmiştir.

Benzer olarak Shamonki ve diğ. (2016) 25-42 yaşları arasındaki 7 hastadan elde edilen 57 embriyonun trofoektoderm hücreleriyle, bunların atık medyumunu toplayarak DNA elde etmiş ve karşılaştırmıştır. Atık medyuma embriyolar konulmadan önce saf medyum analiz edilerek herhangi bir hücreye veya embriyoya maruz bırakılıp bırakılmadığına bakılmış, kontaminasyon var mı diye DNA analizi yapılmış ve herhangi bir

DNA kaynağı bulunamamıştır. 57 atık medyum örneğinin 55 inde 2-642 ng/μl miktarında DNA tespit edilmiştir. En yüksek 6 örneğin DNA miktarı 52 ile 642 ng/μl arasında bulmuşlardır. Araştırmanın sonucu olarak trofoektoderm hücre biyopsisiyle atık medyumdan DNA analiz sonuçları benzerlik göstermiştir. Bu teknik güvenilir olsa bile, PGT'nin canlı doğum oranını arttırdığına dair bir data yoktur (Mastenbroek ve diğ. 2014). Bununla ilgili test edilen örnek sayısı azdır. Fakat yine de atık medyumun DNA eldesi için kullanılabilmesi ve trofoektoderm biyopsisiyle benzer sonuç verebileceği, sonuç olarak DNA eldesiyle, amplifikasyonun ve testlerinin gelişmesine bağlı olarak biyopsiye gerek duymadan genetik tarama yapılabileceği yönünde umut vaat ettiği kanısına varılmıştır.

Ho ve diğ. (2018) çalışmalarında 3.gün ve 5.gün embriyolarının atık medyumlarındaki DNA miktarlarına bakarak ploidi durumuna, cinsiyet kromozomuna, assisted hatching sonrası oluşan DNA miktarına ve morfolojiye göre DNA miktarını kıyaslamışlardır. 3. günde 41 embriyodan 40'ının atık kültür medyumundan DNA elde edilebilmiş (%97.6), sadece 16 (%39) örnekte kromozomal analiz için yeterli kopya sayısı elde edilebilmiştir. 5. günde 41 embriyonun 40'ının atık medyumundan DNA elde edilebilmiş, bunların 33'ü (%80.4) okunabilmiştir. Ploidi ve cinsiyet kromozomu uyumu da sırasıyla 3. günde %56.3 ve %81.2, 5. günde ise %65 ve %70 olarak bulunmuştur. En yüksek DNA miktarına embriyonun 3. günü ulaşılsa da (ortalama 111ng/μl), en yüksek korelasyona 5. günü (ortalama 105ng/μl) ulaşılabilmektedir. 40 adet örneğin 5.gün atık medyum anöploidi uyumluluğu için duyarlılık 0.80, özgüllük 0.61, pozitif prediktif değer 0.47, negatif prediktif değer ise 0.88 olarak bulunmuştur. Asisted hatching zamanı ve embriyo morfolojisi arasında DNA miktarı ile herhangi bir uyum gözlenmemiştir. Çalışma sonucunda atık medyumlarındaki DNA eldesinin invaziv teknik kullanılmamak adına optimize edilerek kullanılmasının bir seçenek olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda maksimum DNA eldesi için assisted hatching işlemi ile 3.gün biyopsisi yaparak embriyolarımızı 5.güne takip ettik. 5.günde 49 embriyonun 48'inin atık medyumundan ve aynı şekilde 48'inin biyopsi örneğinden DNA elde edilebildik (%97.9). Analizi gerçekleştirilmemiş örnek oranı oldukça düşük olmakla birlikte blastomer ve bunların 5.gün atık medyumları arasında ploidi uyumluluğu %80.8 olarak tespit edilmiştir. Atık medyum anöploidi uyumluluğu için duyarlılık 0.82, özgüllük 0.50, pozitif prediktif değer 0.97, negatif prediktif değer ise 0.11 olarak bulunmuştur. Bu yönleriyle çalışmamız bahsedilen diğer araştırmalarla paralel sonuç vermektedir. Ploidik durum uyumluluğu bakımından atık kültür medyum sıvısı, embriyonun durumu bakımından tahmin edilebilir sonuç verse de, çalışmamızda 45 adet anöploidik blastomerin sadece 16'sının atık kültür

medyumunda en az 1 adet aynı kromozomal anormallik gözlenmiştir (%35.5). Bu çalışma bize blastomer biyopsisi ile noninvaziv atık kültür sıvısı arasında ploidik uyumluluğun yüksek oranda belirlenebilir olmasına karşı, blastomer ile atık kültür sıvısı arasında aynı kromozomal anormallik bulunup bulunmadığını belirleyemeyeceğimizi göstermiştir. Bunun için daha detaylı yöntemler ve analiz metodları geliştirilmeli, biyopsi olmadan sadece bu noninvaziv yöntemin şu an için uygulanmasının yeterli olmadığını düşünmekteyiz. Fakat ileride atık kültür medyumu gibi noninvaziv tekniklerin tek başına kullanılabilmesinin umut vaad ettiği açıktır.

Feichtinger ve diğ. (2017) tarafından da çalışmamıza benzer olarak atık kültür medyumunda ploidi uyumluluğuna bakılmış, farklı olarak polar cisim biyopsisi ile atık kültür medyumu karşılaştırılmıştır. 22 adet atık kültür medyum örneğinden 18 tanesinin DNA'sı amplifiye edilebilmiş, bunların 13 tanesinin (%72.2) genel ploidi durumunda (öplid/anöplid) uyum gözlenmiştir. Polar cisim biyopsisi sonucu anöplidi çıkan 15 örneğin 11'inde, kalan 3 öplidik polar cisim örneğinin 2' sinde sırasıyla %73.3 ve %66.7 olmak üzere atık medyum uyumluluğu gözlenmiştir. Polar cisim ile atık medyumları arasında 15 embriyonun 10 tanesinde en az bir adet aynı kromozomal anormallik gözlenmiştir (%66.6). Çalışmada en düşük elde edilen DNA miktarını, 6.7 ng/μl, en yüksek DNA miktarını da 41 ng/μl bularak ortalama DNA miktarı 17.4 ng/μl olarak tespit etmişlerdir. Hem iyi hem kötü kalitedeki embriyolardan DNA elde edilebilmiştir. Kültür sıvısına atılan embriyonik hücrelerin embriyonun içeriğini genel olarak yansıtabileceğine işaret eder. Çünkü embriyonun anöplidik içeriğini genellikle dışarı attığı, embriyonun bu anormal hücreleri elimine etmeye çalıştığı düşünülmektedir. Bu çalışmaya göre hem bizim çalışmamız gibi hem de Shamonki ve diğ. (2016) gibi noninvaziv teknik olarak atık kültür sıvısından DNA elde edilebileceği fakat özellikle invaziv biyopsi yöntemleriyle birlikte uygulanması gerekliliği belirtilmiştir.

Bir önceki araştırmaya benzer olarak çalışmamızda amplifikasyon sonrası ortalama DNA oranını 21.9 ng/μl olmak üzere en düşük DNA miktarını 3.1 ng/μl, en yüksek DNA miktarını ise 70 ng/μl olarak belirledik (Bak. Çizelge 4.1). Assou ve diğ. (2014) ise her bir örnekte 27 ng/ml ve üzerindeki DNA miktarını atık kültür medyumunda okuyabilmişlerdir. Kuznyetsov ve diğ. (2018) ile Liu ve diğ. (2018) embriyo atık kültür medyumu ile blastosöl sıvısını kombine etmiş, sonuç olarak tüm genom amplifikasyonu bakılarak atık kültür medyumunda %97.5, blastosölde ise %100 oranında DNA verimi elde etmiştir. Bu ve bizim çalışmalarımızdaki gibi genetik içeriği az olan örneklerden DNA analizi yapılabilecek

yöntemler geliştirildiği takdirde noninvaziv yöntemlerin başarısı da artacaktır (Hammond ve diğ. 2016).

Son araştırmalar noninvaziv yolla atık medyumdan nükleer ve mitokondriyal DNA elde edilebileceği yönündedir (Stigliani ve diğ. 2013, Assou ve diğ. 2014, Wu ve diğ. 2015). Kültür medyumundaki DNA kaynağı bilinmemekle birlikte embriyo kalitesi hakkında yararlı bilgi vereceği düşünülmektedir (Stigliani ve diğ. 2013, 2014). Medyum içerisindeki genetik materyalin embriyonun canlılığına dair bir marker olarak sayılamayacağından bunların belki de maternal veya paternal kontaminasyondan kaynaklı hücrelerden gelmiş olabileceğinden dolayı PGT açısından bu durum tartışmalıdır. Eğer daha çok araştırma yapıp genetik içeriğin kaynağı bilinirse, belki de bu veriler klinik açıdan kullanıma geçmede fayda sağlar.

Stigliani ve diğ. (2013) 2. gününde olan 166 embriyonun, 3. gününde 634 klivaj aşamasındaki embriyonun atık medyumunun DNA ihtiva edip etmediğine bakmış ve %99 oranında DNA tespit ettiklerini belirtmişlerdir. 326 örnekte nükleer DNA %63, mitokondriyal DNA ise %99 oranında tespit edilmiştir. Böylelikle atık medyumda nükleer DNA'dan çok mitokondriyal DNA içeriğinin olduğunu görülmektedir. Bu durumun nedeni preimplantasyon dönemi embriyolarında mitokondriyal DNA'nın kopya sayısının fazla olması olabilir. Kumulus hücre kontaminasyonu etkisi olabilse de bilinir ki preimplantasyon dönemi embriyoların kumulus hücrelerinde mitokondriyal DNA kopya sayısı ciddi derecede düşüktür (Cree ve diğ. 2015). Bu çalışmada aynı zamanda mitokondriyal DNA'nın kopya sayısının yüksek olmasının embriyonun fragmentasyon düzeyinin yüksek olmasından olabileceğini belirtmişlerdir. 35 yaş üstü hastalarda fragmentasyon düzeyi arttığından mitokondriyal DNA görülme olasılığının da arttığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar 3. günden blastosist aşamasına giden 605 adet atık kültür sıvısında mitokondriyal ve nükleer DNA oranına bakmışlar, bunları blastosist kalitesine göre değerlendirmişlerdir. Bulguları ilk çalışmaya zıt olarak, mitokondriyal DNA oranının nükleer DNA'dan yüksek olması, klivaj aşamasındaki embriyoların blastosist aşamasına daha iyi ilerlediğine yöneliktir. Fakat yine de atık medyumdaki mitokondriyal DNA seviyesi ile embriyo kalitesi arasındaki ilişki belirsizdir. Buna ek olarak 94 embriyoya 3. gün transferi uygulamışlar, mitokondriyal DNA oranının nükleer DNA oranından daha yüksek olanlarda implantasyon oranının arttığını belirtmişlerdir (Stigliani ve diğ. 2014). Lane ve diğ. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada, 3. güne göre 4. ve 5. günlerde atık medyumdaki anöploidi oranının arttığını, bunu da embriyodaki maternal DNA oranı ve hücre sayısının artmasıyla gerçekleştirebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmalar değerlendirildiğinde mitokondriyal DNA düzeyinin embriyo

fragmentasyonu, yarıklanması ve implantasyonu ile ilgili olabileceğine değinilmiştir. Bunun için kültür medyumunun embriyo barındırmayan halinin nükleik asit kontaminasyonu açısından iyi değerlendirilmesi gerekliliğine dikkat çekilmiştir. Şu an için 3. gün ve 5. gün embriyosunda bulunan mitokondriyal ve nükleer DNA miktarı herhangi bir çalışmada kıyaslanmamıştır. Böyle bir çalışma preimplantasyon dönemi embriyoların durumunu belirlemek adına faydalı olabilir (Stigliani ve diğ. 2013 ve 2014). Nükleer ve mitokondriyal DNA dışında aynı zamanda miRNA çeşitleri de atık kültür medyumunda tespit edilmiştir. Bunlardan 2 çeşit miRNA'nın trofoektoderm orijinli oldukları ve öplodik embriyoların implantasyonunda görev aldıkları düşünülmektedir (Capalbo ve diğ. 2015).

Embriyoların içinde bulunduğu kültür ortamlarının gelişmesi ve çeşitlenmesiyle kullanılan medyumlar da laboratuvarların tercihine göre değişkenlik göstermektedir. Bazı laboratuvarlar fertilizasyon işleminden transfer işlemine kadar embriyoları tek aşamalı kültür ortamında muhafaza edebilecek kültür medyumlarını tercih ederken, bazı laboratuvarlar ise ikinci günden sonra kültür ortamını tazelemeleri gereken medyumları tercih ederler. Ayrıca defektif embriyonik hücreler kültür medyumunda aktif tamir mekanizması sayesinde elimine edilebilir. Bu durum da embriyonun ploidik durumunu dengede tutmaya yardımcıdır (Farra ve diğ. 2018). Bu konuyla ilgili Feichtinger ve diğ. (2017) tek aşamalı kültür ortamında blastosiste giderek DNA verimine bakmış, kültür medyumunu değişiminin maternal kontaminasyonu engellediğini fakat tek aşamalı medyumlarda daha çok serbest DNA elde edileceğine dikkat çekmişlerdir.

Atık medyumdan DNA taraması yapabilmek hastalara büyük bir avantaj sağlayacaktır. Embriyoların çoklu kültür yerine tekli kültüre edilmeleri gerekliliği daha fazla kültür kabı, malzeme, yer kullanılmasına ve daha fazla iş yüküne sebep olabilecek olsa da bunlar küçük düzeyde dezavantajlardır.

Atık medyum ve blastosöl sıvısı gibi az invaziv yöntemler ele alındığında araştırmacıların ortak düşüncesi DNA eldesi için potansiyele sahip oldukları fakat DNA'nın asıl orjininin dikkate alınıp belirlenmesi gerektiği yönündedir. Atık medyumdan DNA analizi işleminin güvenilebilirliği için DNA toplama yöntemi, DNA amplifikasyonu ve tarama yöntemleri gibi birçok önemli basamak optimize edilmelidir. Gelecekteki araştırmalar potansiyel kontaminasyon kaynağını belirlemeye yönelik olmalıdır. Çünkü DNA kaynağını belirlemek, yanlış pozitif amplifikasyon ortaya çıkmaması açısından önemlidir. İkincil esas soru da eğer DNA tamamen embriyodan köken alıyorsa, bunun embriyonun içeriğini tamamen yansıtıp yansıtmadığı yönünde olmalıdır. Bunlara yanıt

olarak DNA salınımının mekanizması aydınlatılmalı, blastosöl sıvısıyla atık medyumun korelasyonuna da bakılmalıdır.

Hammond ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmanın sonucu olarak kontrol gruplarında bile dişi ve erkeğe ait nükleik asit içeriğinden kaynaklanan DNA kontaminasyonu varlığına dikkat çekmiştir. Denudasyon yöntemi ile kumulus hücrelerinin ayrılması maternal DNA kontaminasyonunu en aza indirmiş olur. Feichtinger ve diğ. (2017) ICSI işlemi yapılmış 22 blastosistten maternal kontaminasyon sebebiyle amplifiye edilebilir DNA elde edememiştir. Üstelik maternal kontaminasyon yanlış öploid sonuçlarına neden olmaktadır. Kontaminasyon faktörü değerlendirildiğinde Hammond ve diğ. (2016) atık medyunda kontamine olmuş DNA bulunma riskinin blastosöl sıvısından daha yüksek olarak gözlemlendiğini belirtmiştir. Bu durumun nedenleri olarak medyum içindeki insan serum albümininin (HSA) nükleik asit kontaminasyonu, kumulus hücrelerinin maternal veya paternal kaynaklı kontaminasyonu ve sperm veya polar cisim kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda tüm oositlerimize en yaygın ve garanti fertilizasyon yöntemi olan ICSI işlemi uygulanmıştır. Bazı araştırmalar belki de spermin inseminasyonu sırasında paternal kaynaklı bir kontaminasyon meydana gelebileceğini ileri sürmüştür (Stigliani ve diğ. 2013, 2014, Wu ve diğ. 2015). Aynı şekilde her ne kadar ICSI yöntemi öncesi kumulus hücrelerini enzimatik ve mekanik yolla temizlese bile az miktarda da olsa zonaya yapışmış kumulus hücreleri kalabilir. Bunlar da kültür medyumunda maternal kontaminasyona neden olabilir (Hammond ve diğ. 2016). O sebeple ayıklama işlemi yaparken mümkün oldukça kumulus hücrelerinden arındırmaya özen gösterdik. Üstelik üçüncü gün medyumlarını tazeleyerek bu durumun oluşturabileceği dezavantajları da böylelikle en aza indirmeye çalıştık. Bir gün önceden hazırlanıp gazlanmış olan sıvıyla değiştirdik. Bunu yapmamızdaki amaç; embriyoların ihtiyacını daha iyi karşılamak, oksidatif strese uğrama olasılığını azaltmaktır. Bu işlemden sonra tazelenmiş sıvı içerisinde embriyolara lazer yardımıyla assisted hatching işlemi uygulandı. Assisted hatching yapmamızdaki amaç; blastomer biyopsisini gerçekleştirmektir. Bunun dışında özellikle kalın zona pellusida özelliğine sahip hastalarda zonayı incelterek embriyonun blastosist aşamasına gelmesini kolaylaştırmak zaten embriyoloji laboratuvarlarının rutininde de uygulanmaktadır (Wang ve diğ. 2016, Chimote ve diğ. 2013). Ho ve diğ. (2018) assisted hatching yapılarak medyumdaki DNA miktarında artışın katalizlenmediğini belirtmiştir. Çalışmamızda tüm embriyolara biyopsiden ötürü hatching işlemi yapıldığından yapılmayanla arasında karşılaştırma yapamamış, bu faktör değerlendirilmemiştir.

Magli ve diğ. (2016) bahsedilen önceki çalışmalardan farklı olarak noninvaziv yöntem olarak blastosöl sıvısını kullanmış, bununla polar cisim ve trofoektoderm hücrelerinin analiz sonuçlarını kıyaslamıştır. Blastosöl ile trofoektoderm arasındaki genetik uyumluluğu %97.1, tek gen uyumluluğunu da %98.4 olarak bulmuşlardır. Polar cisim ile blastosöl karşılaştırıldığında ploidi durumunu ve kromozom uyumluluğunu sırasıyla %94 ve %97.9 olarak, aynı şekilde blastomer ile blastosöl karşılaştırıldığında bu uyumlulukların sırasıyla %95 ve %97.7 olarak bulmuştur. Bu araştırmanın sonucu olarak tıpkı daha az invaziv olan atık medyundan DNA eldesi gibi blastosölden DNA eldesi, blastosistin ploidi ve kromozom durumunu yansıtması açısından trofoektoderm hücre biyopsisi ile kıyaslandığında anlamlı veri vermesi açısından önem arz eder. Sonuç olarak bu çalışmada eğer klinik uygulamalarda blastosöl biyopsisi geliştirilirse kromozomal analizlerde DNA eldesinde atık medyum gibi blastosentez yöntemi de tercih edilebilecek bir DNA kaynağı haline gelebileceği kanısına varılmıştır.

Blastosöl eldesinin zor olması ve az miktarda DNA elde edilmesi nedeniyle analizin gerçekleşmemesi blastosentez çalışmalarının başarısını düşüren nedenlerdir (Hammond ve diğ. 2016). Blastosöldeki fragmantasyondan ötürü kontaminasyon gerçekleşebilir, düşük miktarda DNA elde edilebilir bu da analizi olumsuz yönde etkileyebilmekle amplifikasyon başarısızlığına neden olabilir (Gianaroli ve diğ. 2014, Tobler ve diğ. 2015). İlerlemiş fragmantasyon istenmeyen morfolojik bir görüntüdür. Bu durum aynı zamanda embriyo kalitesini düşürerek IVF başarısızlığına da neden olur (Chavez ve diğ. 2012). Zhang ve diğ. de (2016) blastosöldeki DNA miktarı ile embriyo morfolojisi arasında herhangi bir korelasyon gözlemlenmemişlerdir. Ayrıca blastosölde iç hücre kitlesi ve trofoektoderm hücre apoptozları yüksek oranda olabilir (Gianaroli ve diğ. 2014). Blastosöl ile trofoektoderm hücrelerinin uyum göstermesi değerlidir. Gelecekte de çalışmamızı bu şekilde genişletebiliriz. Blastosölün embriyo içeriğiyle yüksek oranda ploidi uyumu gösterdiği birçok çalışmada belirtilmiştir (Magli ve diğ. 2016, Gianaroli ve diğ. 2014, Tobler ve diğ. 2015). Bu sebeple bu tekniğin daha ön planda tutulması faydalı olacaktır. Zira hali hazırda ekspanse veya hatching olmuş blastosistlerden blastosöl aspire edilerek yapılan kollaps işlemi vitrifikasyon öncesi embriyolarına rutin olarak uygulanmaktadır (Mukaida ve diğ. 2006). Blastosöl kavitesinin kollapsıyla dondurma sonrası sağ kalım oranını arttırdığı fikrini destekleyen başka araştırmalar da mevcuttur. Taze siklus transferlerine göre dondurulup çözülen embriyo transferlerinin implantasyon başarısı daha yüksektir (Yousry ve diğ. 2008, Zhu ve diğ. 2011). Blastosist içindeki serbest DNA' nın kaynağı henüz bilinmemekle birlikte

muhtemelen gelişen embriyonun ölü hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Handyside 2016).

Gianaroli ve diğ. (2014) 51 blastosistten blastosöl ve trofoektoderm hücrelerini alarak ikisini karşılaştırmış, blastosölün yüksek oranda embriyonun ploidik durumunu yansıttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada 39 blastosölde DNA tespit edilmiştir. Bunların 38'inde bu iki yapı ploidi durumu bakımından benzerlik gösterir (%97.4). Karşılaştırılan 39 blastosöl ve trofoektoderm biyopsisinin 32'inin tamamında, 6'sında kısmi, 1'inde de hiç uyumluluk gözlenmemiştir. Tek gen açısından da değerlendirildiğinde bu çalışmada %96.6 oranında (904/936) uyum gözlenmiştir. Kromozom başına blastosöl; polar cisim ile %93.5, blastomer ile %94 oranında uyum göstermiştir. Aynı şekilde yine bu çalışmada blastosölü alınan 51 blastosistin 37'sine polar cisim biyopsisi, 14'üne de blastomer biyopsisi işlemi uygulanmıştır. Blastosöl analizi yapılan 30 blastosistin polar cisimlerinin 21'inin hepsinde, 7'sinde kısmi, 2'sinde ise hiç uyumluluk gözlenmemiştir. 9 adet embriyonun yapılan blastomer biyopsisinde 8 blastosöl sıvısının tamamında, 1'inde ise kısmi uyumluluk tespit edilmiştir.

Blastosöl sıvısı PCR ile çoğaltılabilen az miktarda serbest embriyonik DNA miktarına sahiptir (Palini ve diğ. 2013). Yapılan üç çalışmada polar cisim veya trofoektoderm biyopsisi ile blastosöl sıvısı karşılaştırıldığında blastosöl sıvısından elde edilen DNA'nın embriyo kromozom sayısını yansıtabileceği belirtmiştir (Magli ve diğ. 2016, Tobler ve diğ. 2015). Fakat atık medyumdaki gibi blastosöldeki DNA kaynağı da henüz tam olarak açıklanamamıştır (Assou ve diğ. 2014, Wu ve diğ. 2015). Tobler ve diğ. (2015) bu konuyla ilgili çalışmasında mozaik embriyoların anormal yapıdaki hücrelerini blastosöl kavitesine dökerek ploidi profilini belirleyebileceğinden bahsetmişlerdir. Öploidik blastosistlerin blastosöllerinde anöploidik nükleus bulunduğunu bunun da klivaj evresinde blastomerin dejenerasyonuna bağlı meydana gelebileceğini belirtmişlerdir. Blastosöldeki DNA atıkları belki de hücre iletişimde görevlidir. Bazı araştırmacılar da apoptoz kaynaklı olduğunu düşünmektedir. Farklılaşmakta olan trofoektoderm ve iç hücrelerin çekirdeklerinin boyanmasıyla hücre içeriğindeki DNA miktarının aynı zamanda bu hücrelerin apoptoza uğraması sonucu olduğu tespit edilmiştir (Handyside 1986). Blastosöl kavitesindeki ölü hücreler komşu trofoektoderm veya iç hücre kitlesi tarafından fagositoz yoluyla sindirilebilir. Kollaps ve takiben geri ekspansiyonla birlikte ölü hücreler veya onların DNA'sı medyuma karışabilir. Eğer bu hücreler dominant olarak iç hücre kitlesinden köken alıyorsa, fetusun içeriğini de yansıtmış olacaktır. Buna rağmen mozaik embriyodaki anöploidik hücrelerin elimine edilip edilmediği hala bir tartışma konusudur (Handyside

2016). Embriyo öploidik halde olursa genetik içeriği de biliniyorsa gebelik oluşturma ihtimalini %30 oranında arttırabiliriz (Yang ve diğ. 2012).

Mozaisizm, embriyoda iki veya daha fazla hücre popülasyonunun farklı genotiplerde olması anlamına gelir. Embriyonik mozaisizm; fertilizasyon sonrası genellikle ikinci veya üçüncü bazen ise ilk yarıklanmadan sonra mitotik hatadan dolayı meydana gelir. Mozaik embriyolardan anöploidik mozaik: iki farklı anöploidik genotip barındıran, hücrelerinin %100'ünün anormal olduğu mozaisizm türüdür. Diploid-anöploidi: bir popülasyona sahip hücreler öploidik, diğer popülasyona sahip hücreler anöploidiktir. Diploidi-anöploidi durumu klivaj aşamasında kromozomal ayrılmada meydana gelen hatadan dolayı oluşur. İkinci yarıklanmada meydana gelen anormal hücre oranı üçüncü yarıklanmada meydana gelen anormal hücre oranından büyüktür (Munne ve diğ. 1994). Erken embriyo dönemi hataları genellikle mitozdan, fertilizasyon inaktivasyonundan kaynaklanır. Mozaisizm diploid embriyoda anafaz safhasında gecikme, mitotik ayrılmamadan, kromozom yıkımından ve DNA duplikasyonundan önce hücre bölünmesinden dolayı gelişebilir (Mantzouratou ve Delhanty 2011, Mantikou ve diğ. 2012). Bu sebeplerden klivaj aşamasında mozaisizm görülme ihtimali daha fazladır (Wells ve Delhanty 2000). Embriyonik genom aktivasyonu üçüncü yarıklanmadan sonra meydana gelmiyorsa hücre bölünmesi gerçekleşmez ve embriyo blastosist aşamasına ulaşamaz. Yaklaşık %50 oranında embriyo klivaj evresinden sonra kendini tamir etme mekanizmasıyla “self-correction” blastosist aşamasında öploidik halde gelir (Santos ve diğ. 2010). Bu durum bazı mekanizmalarla açıklanabilir. Bunlar; anöploidik hücrelerin apoptoza uğraması, anöploidik hücrelerin diploidik hücrelere göre bölünmeyi yavaşlatması veya öploidik hücrelerin iç hücre kitlesinde gelişmesi olabilir (Delhanty 2013). Çalışmamızda blastomeri anöploidik fakat atık medyumunu öploidik çıkan örneklerin nedeni belki de erken fazda gerçekleşen mitotik hasar veya kontaminasyon kaynaklıdır (Magli ve diğ. 2016).

Anormal embriyo transferleri tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarına, düşüklere, fiziksel veya mental doğumsal anomalilere neden olmaktadır (Franssen ve diğ. 2011, De Krom ve diğ. 2015). Sachdev ve diğ. (2017) 9 farklı IVF merkezinin 192 adet donör oositi üzerinde yaptığı çalışmada NGS yöntemi ile mozaisizm oranı %17 ile %47 arasında tespit edilmiştir. Ayrıca tanımlanamayan laboratuvar koşullarının blastosistlerde mozaisizmi arttırabileceği yönündedir. Mozaisizmin embriyoların implantasyon oranlarını düşürürken (Maxwell ve diğ. 2016) düşük oranlarını da yükselttiği bilinmektedir (Fragouli ve diğ. 2011). Mozaisizme embriyonun ilerleyen evrelerinde erken evre embriyoya göre daha seyrek rastlandığı belirtilmiştir (Xu ve Montag 2012). Otozomal monozomiler genellikle yaşam

evresine ulaşmazlarken, bazı trizomiler ulaşabilirler fakat bunlarda da fiziksel ve bilişsel anormallikler görülme ihtimali çok yüksektir. Mozaisizmin başlıca nedenlerinden olan kromozomal ayrılmamadan kaynaklanan embriyonik mozaisizm; monozomik ve trizomik hücre popülasyonları şeklinde kendini gösterebilir. NGS yönteminde bunlar tespit edilerek bu iki hücre popülasyonuna aynı oranda (50:50) rastlanmıştır (Scott ve diğ. 2016).

Trofoektoderm hücreleri embriyonun içeriğini kısmi olarak yansıtır. Çünkü iç hücre kitlesi değişik kromozomal yapıda olabilir. Anöplodik hücrede metafaz esnasında hizalanma bozukluğu veya anafaz esnasında ki kutuplara ayrılmada ki aksaklığın mozaisizmi tetiklediği bilinir. Bunun sonucunda da DNA rekombinasyonu yanlış yönde tetiklenir ve DNA'nın kendini tamir edebilme mekanizmasında düşüş gözlenir (Sheltzer ve diğ. 2011). Yine de mozaik embriyolar implante olabilsede düşüklere neden olma ihtimali yüksektir (Lightfoot ve diğ. 2008). Mozaisizm belirlemek adına NGS yönteminin kullanılması bir soruyu da beraberinde getirmiştir; bir adet trofoektoderm hücre biyopsisi yapıldığı takdirde embriyonun kalan bölümü için de bu analiz belirteç olabilecek midir? Garrisi ve diğ. (2016) 43 embriyodan çoklu hücre biyopsisi ile NGS yöntemiyle analiz yapmıştır. Çoklu biyopsiler ile 5 embriyonun trofoektoderm ve iç hücre kitlesi (İHK) aynı ve tamamen normal çıkmıştır (%11.6). İç hücre kitlesi 18 embriyoda normal çıkmıştır (%41.8). Kompleks mozaisizm gösteren trofoektoderm hücrelerinin iç hücre kitlesiyle arasındaki uyumu %83, trofoektoderm hücrelerinin tüm çalışmadaki mozaisizm oranını belirleme yetisi de %58.2 olarak bulunmuştur.

Benzer olarak Maxwell ve diğ. (2016) NGS yöntemiyle trofoektoderm hücrelerine çoklu biyopsi yapmış, 14 anöplodik/mozaik embriyodaki mozaisizm oranını gerçekte sadece %48.3 olarak belirlemişlerdir. Düşük düzeydeki mozaisizmlerin örnek hatasına sebep olabileceği belirtilmiştir. Tüm genom analizi yapılan retrospektif çalışmada aCGH ile belirlenen öplodik 76 blastosisten öploidi çıkanlardan 38' i transfer edilmiş bunlardan 12'si düşükle sonuçlanmış (%31.6), buna karşılık NGS ile mozaik olarak belirlenen 38 blastosistin transferi sonucu 6 adet (%15.8) canlı doğum meydana geldiği gözlenmiştir. Greco ve diğ. (2015) da bir önceki çalışmaya paralel olarak mozaik embriyo transferlerinin normal gebeliklere ve sağlıklı canlı doğumlara neden olabileceğini belirtmiştir. IVF yapılmış 18 adet mozaik anöplodik yapıdaki blastosist transferinden 6'sından normal karyotipte sağlıklı gebelik elde edilmiştir (Greco ve diğ. 2015). Bu oran azımsanamayacak boyuttadır. Bu da demek oluyor ki bazı mozaik embriyolar canlı doğumla sonuçlanabilir fakat bu özellikteki embriyolarda erken gebelik kaybı ihtimali artar. Mozaik embriyoların

implantasyon oranı potansiyeli henüz net tayin edilememiş olsa da datalar normal embriyolara göre daha düşük olduğunu belirtmektedir (Fragouli ve diğ. 2015).

Kadınlarda en sık gözlenen, fertilizasyon ve implantasyon oranını azaltan infertilite nedenlerinden biri ileri maternal yaştır. İleri maternal yaş embriyoların anöploidi oranını arttırmaktadır (Hassold ve Hunt 2011). Anöploidi, 30'lu yaşlardaki kadınların klivaj aşaması embriyoların neredeyse yarısından fazlasında görülen, 42 yaş üstü kadınlarda da % 90 oranına kadar çıkarak iyice yaygınlaşan, yüksek düzeyi ölümcül olabilen genetik anomalidir. Bazı araştırmacılar da ilerleyen maternal yaşla mozaisizm arasında bir korelasyon tespit edememiştir (Daphnis ve diğ. 2005, Turner ve diğ. 2016). Bununla birlikte başka bir çalışmanın geniş data analizinde, ilerleyen maternal yaş olmamasına rağmen 21-30 yaş arası oosit donörlerinden oluşturulan embriyolarda % 33 oranında mozaisizm tespit etmiştir (Sachdev ve diğ. 2016). İleri maternal yaş hakkında yapılan bir diğer çalışmada embriyo morfolojisi irdelenmiştir. Bilindiği üzere fragmentasyon, düşük implantasyon potansiyelini yansıması açısından embriyo morfoloji kriterlerinden biri olmuştur. İleri maternal yaş ve embriyo morfolojisi korele edilerek embriyo atık medyumundaki mitokondriyal ve genomik DNA incelenmiş, 2. ve 3. günden sonra embriyoların DNA içeriğinin amplifiye edilebilecek kadar yüksek oranda kültür sıvısına geçtiği tespit edilmiştir.

Toplam 800 örnekten 166'sı 2. gün, 634'ü 3. gün analizinde kullanılmış, çok miktarda DNA elde edilen örneklerin kötü kalitede embriyoya sahip olduğu ve belki de ileri maternal yaşla birlikte fragmentasyon oranının arttığından dolayı olabileceği bildirilmiştir (Stigliani ve diğ. 2013). Ayrıca PGT ile 40 yaş üstü hastaların devam eden gebelik oranı PGT yapılmayan hastalara göre iki kat arttığı öne sürülmüştür (Milan ve diğ. 2010). Aksine, ilerleyen maternal yaş ve tekrarlayan gebelik kaybı endikasyonlarına sahip başka bir randomize kontrollü çalışmanın meta-analizine göre PGT ile hastalarda klinik gebelik oranları ve canlı doğum oranları artmamıştır (Masterbroek ve diğ. 2011). Embriyonun morfolojik gelişimi ve anöploidi durumu arasında bazı araştırmacılar morfoloji ile anöploidi arasında ilişki kurmuş olsalar dahi bilinen verilere göre morfoloji analizlerinin embriyonun öploidik durumu hakkındaki ilişkisi çok zayıftır (Alfarawati ve diğ. 2011, Capalbo ve diğ. 2014, Kroener ve diğ. 2012). Bu düşünce ilerleyen maternal yaşa bağlı elde edilen oosit ve dolayısıyla embriyo sayısı düştüğünden, invaziv biyopsi işlemi ile embriyo sayısını daha da azaltmış olunabileceği ihtimalinden kaynaklı olabilir.

Çalışmamız sonucu ileri maternal yaşa sahip hastalarda düşük over rezervi görülmesinden dolayı az sayıda hastaya PGT önerebildik. Çünkü yeterli sayıda biyopsi yapılabilecek embriyo sayısı nadirdir, uygun olanların da verimliliğini aza indirmemek

yerinde olacaktır. Fakat yaş ilerledikçe anöplöidi ve düşük oranı arttığından iyi yanıtli ileri yaş hastalara PGT önerilmesi gerekmektedir (Majumdar ve diğ. 2016). Paralel olarak bazı araştırmalar da detaylı genetik analizin ilerleyen maternal yaş hastalarında implantasyon oranını arttırdığını belirtmiştir (Harton ve diğ. 2013). Bu görüşe zıt olarak Handyside (2010), sadece genetik geçişli hastalık gösteren bireylerde PGT tercih edilmesinin doğru olduğunu söylemiştir. Bu konuda araştırmacıların genel kanısı PGT'nin düşük over rezervli hastalarda implantasyon oranı ve klinik gebelik oranını arttırdığına yöneliktir.

Başka bir PGT endikasyonu da tekrarlayan implantasyon başarısızlığıdır. Bu özelliğe sahip yaklaşık 200 hastada yapılan randomize kontrollü çalışmada intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonucu implantasyon ve gebelik oranında PGT ile artış gözlenmemiştir (Gianaroli ve diğ. 1999). Fakat bazı retrospektif klinik araştırmalar, tekrarlayan düşüklerde genetik taramalar ile bu oranların arttığını gözlemlemiştir (Munne ve diğ. 1999, Munne ve diğ. 2005). aCGH yöntemi ile düşük prognozlu ve tekrarlayan IVF başarısızlığına sahip hastalarda PGT, klinik gebelik oranlarını arttırmıştır (Majumdar ve diğ. 2016). Bunlarla paralel olarak idiyopatik tekrarlayan düşüklerde (Hodes-Wertz ve diğ. 2012) ve translokasyon taşıyıcılarında da (Otani ve diğ. 2006, Fisher ve diğ. 2010) faydalı etkileri vardır.

Lukaszuk 2015'te tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan, ikiden fazla IVF denemesi yapılan 45 hasta üzerinden 3. gün blastomer biyopsisi alınarak PGT işlemi uygulamış ve 5. gün taze embriyo transferi gerçekleştirerek 53 kontrol grubu PGT yapılmamış hasta ile kıyaslamıştır. İki grup yaşa, AMH seviyesine, antral folikül sayısına ve infertilite durumuna bakılarak eşleştirilmiştir. Her iki gruptan da normal olan 89 adet embriyo transfer edilmiştir. Çalışmanın ana teması, embriyo başına klinik gebelik oranını ikincil olarak da implantasyon ve düşük oranını tespit etmektir. Çalışmada hasta başına çıkan oosit sayısı yaklaşık 13.2'dir. Bu 45 hastanın hepsinden en az 1 adet normal embriyo çıkması yeterlidir. 252 adet biyopsi yapılan embriyodan 142'si anormal, 21'i tanımlanamamış, 89'u da normal olarak tespit edilmiştir. 89 normal embriyonun 65'i transfer edilmiştir. Kontrol grubunda da 53 hastadan yaklaşık 12.5 adet oosit toplanmış ve 89 embriyo transfer edilmiştir. Hasta başına uygun olduğunda iki embriyo verilmesi uygun görülmüş, PGT yapılan hastalara yaklaşık 1.4 embriyo verilmiştir. En az bir adet genetik olarak normal embriyo tespit edilen hastalar bu çalışmaya dahil edilmiştir. Çıkan sonuçta NGS tabanlı hasta grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında implantasyon oranı ve gebelik oranı daha yüksek bulunmuştur. Çalışma yazıldığında 13 adet devam eden gebelik ve 18 adet canlı doğum PGT

hastalarında tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise 8 adet devam eden gebelik 11 adet canlı doğum tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda NGS yapılan deney grubunda kontrol grubuna göre gebelik oranı sırayla % 84.4'e % 41.5 oranında yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada blastomer biyopsisinde NGS bazlı genetik taramanın uygulanabilirliği gözlemlenerek güncel anöploidi taramalarına katkı sağlanabilir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuç olarak genetik analiz yöntem ve teknolojilerinin gelişmesiyle preimplantasyon dönemi embriyolardan noninvaziv yöntem olan embriyonun içinde bulunduğu atık kültür medyumundan DNA elde edilebildiğini çalışmamızda gösterdik. Biyopsi işlemi invaziv işlemdir. Uzman ve tecrübeli embriyologlar tarafından yapıldığında bile %1 oranında embriyoya zarar verme riski vardır. Olası zararlar embriyonun gelişiminin durması ve embriyo dejenerasyonudur. Ayrıca, yapılan bu işlemlerin yüksek maliyeti bulunmaktadır. Bu nedenle, başka bir noninvaziv yöntem olan blastosölden DNA eldesini çalışmamızda kombine edemedik. Bu faktör çalışmamızın kısıtlılıklarındandı. Çalışmamızda non-invaziv bir yöntem olan embriyonun içinde bulunduğu atık kültür sıvısından DNA elde ederek aynı örneğin biyopsisi ile genetik sonucunu karşılaştırdık ve PGT testlerinin klinik olarak yapılabilirliğini araştırdık. Bulgularımız çoğu araştırmayı destekler niteliktedir. Çalışmamızda, örnekler arası ploidi korelasyonları yüksek oranda uyum göstermiş olsa dahi aynı kromozoma ait anormallik oranı düşük bulunmuştur. Dolayısıyla analizini gerçekleştirdiğimiz her bir embriyo örneğinin iki sonucu arasında tam uyum gözlenmediği için, sadece atık kültür medyumunu kullanarak tanı koymak risk olacaktır. Çünkü düşük bir yüzde olsa dahi, anormal embriyo transfer etmek veya genetik olarak sağlıklı embriyoyu elimine etme ihtimali hem maddi hem psikolojik hem de fizyolojik olarak istenmeyen sonuçlar doğuracaktır. Çalışmamız, konuyla ilgili gelecekteki araştırmalara yol göstermiş öncü araştırma niteliğindedir. Atık kültür medyumunu ya da blastosöl sıvısından elde edilen serbest embriyonik DNA'nın genetik analizi ile alınacak sonuçlar embriyonun genetik içeriğini tam olarak yansıttığı gösterilebildiği zaman embriyoya zarar verebilecek invaziv yöntemlerden vazgeçmek son derece yararlı olacak ve genetik tarama alanında çığır açacaktır. Bu nedenden dolayı, noninvaziv yöntemlerin klinik uygulamalarda yerini alabilmesi için yapılacak birçok ek çalışma ile materyal ve analiz yöntemlerinin geliştirilerek uygulanabilirliğin artacağını düşünmekle birlikte gelecekte rutin olarak kullanılmasını ümit etmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abid S, Maitra A, Meherji P ve diğ. Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in India. *J Clin Lab Anal.* 2008; 22(29-38): 6.
- Adamson GD, Abusief ME, Palao L ve diğ. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in the embryo selection. *Fertility and Sterility.* 2016; 105: 369-75.
- Agarwal A, Ranganathan P. Higher rates of recovery with PureSperm density gradient compared to Isolate. *Human Reproduction.* 2001; 16: 053.
- Akyüz A. İnfertil Çiftin Araştırılması. S32-35, 3. Uluslararası Üreme ve Aile Planlaması Kongresi, Ankara, 20-23 Nisan 2003.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P ve diğ. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Human Reproduction.* 2011; 26: 1560-74.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P ve diğ. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Human Reproduction.* 2011; 26: 1560-74.
- Al-Inany H. Intrauterine adhesions. An update. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001; 80(11): 986-93.
- Alqallaf AK, Alkoot FM, Aldabbous MS. Recent Advances in Autism Spectrum Disorders. *InTech.* 2013; 341-358.
- Assou S, Ait-Ahmed O, El Messaoudi S ve diğ. Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Medical Hypotheses.* 2014; 83: 506-8.
- Baker HWG, Ng FLH, Liu DY. Preparation and analysis of semen for ivf/gift. In Trounson A, Gardner DK (ed). Handbook of in Vitro Fertilization, CRS Press. 1993; USA, pp. 33-56.
- Balen AH, Laven JS, Tan SL ve diğ. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update.* 2003; 9(6): 505-14.
- Barcroft LC, Offenbergh H, Thomsen P ve diğ.. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev Biol.* 2003; 256: 342-54.
- Barcroft LC, Moseley AE, Lingrel JB ve diğ. Deletion of the Na/K-ATPase alpha1-subunit gene (Atp1a1) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. *Mech Dev.* 2004; 121: 417-26.
- Beksaç MS (Ed) Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji. Medikal Network, Ankara 2006.
- Bellver J, de Los Santos, MJ ve diğ. Day-3 embryo metabolomics in the spent culture media is altered in obese women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility.* 2015; 103: 1407-15.
- Benkhalifa M, Madkour A, Louanjli N ve diğ. From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: contribution to embryo development and IVF outcome. *Expert Review of Proteomics.* 2015; 12: 407-23.
- Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J ve diğ. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *The New England Journal of Medicine.* 2014; 370: 799-808.
- Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD ve diğ. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstetrics and Gynecology.* 2012; 119: 890-901.

Boyras G. Açıklanamayan infertilite nedeniyle intrauterin inseminasyon uygulanan hastalarda ejakülattaki preapoptik sperm oranının intrauterin inseminasyon başarısındaki etkisinin araştırılması. Uzmanlık tezi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2013.

Brassard M, AinMelk Y, Baillargeon JP. Basic infertility including polycystic ovary syndrome. *Med Clin North Am.* 2008; 92(5): 1163-92, xi.

Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J. Assist Reprod Genet.* 2016; 33: 823-32.

Brezina PR, Brezina DS, Kearns WG. Preimplantation genetic testing. *BMJ.* 2012; 345: e5908, (doi:10.1136/bmj.e5908).

Brezina PR, Kutteh WH. Clinical applications of preimplantation genetic testing. *BMJ.* 2015; 350: g7611, (doi:10.1136/bmj.g7611).

Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D ve diğ. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod.* 2014; 29(6): 1173-81.

Capalbo A, Treff N-R, Cimadomo D ve diğ. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative realtime PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies. *Eur J Hum Genet.* 2015; 23(7):901-6.

Castro-Magana M, Bronsther B, Angulo MA. Genetic forms of male hypogonadism. *Urology.* 1990; 35(3): 195-204.

Chavez SL, Loewke KE, Han J ve diğ. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat. Commun.* 2012; 3: 1251.

Chen CK, Yu HT, Dennis Wu ve diğ. Pre-implantation genetic diagnosis for reciprocal and translocations with fluorescence in situ hybridization. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2014; 53: 48-52.

Chen H, Lv JQ, Wu XM ve diğ. Blastocyst-stage versus cleavage-stage embryo transfer in the first frozen cycles of OHSS-risk patients who deferred from fresh embryo transfer. *Gynecol Endocrinol.* 2015; 31(9): 698-701.

Chen M, Wei S, Hu J ve diğ. Can comprehensive chromosome screening technology improve IVF/ICSI outcomes? A meta-analysis. *PLoS One.* 2015; 10: e0140779.

Chimote NM, Chimote NN, Nath NM ve diğ. Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer. *J Hum Reprod Sci.* 2013; 6(3): 183-8.

Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW ve diğ. Noninvasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *British Medical Journal-BMJ.* 2011; 342: 740.

Chretien FC. Involvement of the glycoproteic meshwork of cervical mucus in the mechanism of sperm orientation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003; 82(5): 449-61.

Christodoulou C, Dheedene A, Heindryckx B ve diğ. Preimplantation genetic diagnosis for chromosomal rearrangements with the use of array comparative genomic hybridization at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility.* 2016; 107(1): 212-19.

Cieslak I, Ivakhnenko V, Wolf G ve diğ. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril.* 1999; 71: 308-13.

Clementini E, Palka C, Iezzi I ve diğ. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2005; 20(2): 437-42.

Cohen J, Grudzinskas G, Johnson MH. Embryonic DNA sampling without biopsy: the beginnings of non-invasive pgd? *Reproductive Biomedicine Online.* 2013; 26: 520-1.

- Committee on Gynecologic Practice of American College of, O., Gynecologists, and M. Practice Committee of American Society for Reproductive, Age-related fertility decline: a committee opinion". *Fertil Steril*. 2008; 90(5): 154-5.
- Colls P, Escudero T, Fischer J ve diğ. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reproductive Biomedicine Online*. 2012; 24: 621-9.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S ve diğ. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010; 16(3): 231-45.
- Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 955: 11-22.
- Cree LM, Hammond ER, Shelling AN ve diğ. Maternal age and ovarian stimulation independently affect oocyte mtDNA copynumber and cumulus cell gene expression in bovine clones. *Hum Reprod*. 2015; 30: 1410-20.
- Cuman C, Van Sinderen M, Gantier MP ve diğ. Human blastocyst secreted microRNA regulate endometrial epithelial cell adhesion. *EBioMedicine*. 2015; 11: 1528-35.
- Çelik Ö (Ed) Yardımcı Üreme Teknikleri, Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Nobel Kitabevi, Adana, 2011.
- Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F ve diğ. Technical update: preimplantation genetic diagnosis and screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 2015; 37(5): 451-63.
- Dan S, Wang W, Ren J ve diğ. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenatal Diagnosis*. 2012; 32: 1225-32.
- Daphnis DD, Delhanty JD, Jerkovic S ve diğ. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Hum Reprod*. 2005; 20: 129-37.
- De Kretser DM, Baker HW. Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84(10): 3443-50.
- De Krom G, Arens YH, Coonen E ve diğ. Recurrent miscarriage in translocation carriers: no differences in clinical characteristics between couples who accept and couples who decline PGD. *Hum Reprod*. 2015; 30: 484-9.
- Deleye L, Dheedene A, De Coninck D ve diğ. Shallow whole genome sequencing is well suited for the detection of chromosomal aberrations in human blastocysts. *Fertility and Sterility*. 2015; 104: 1276-85.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A ve diğ. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Human Genetics*. 1997; 99: 755-60.
- Delhanty JD. The origins of genetic variation between individual human oocytes and embryos: implications for infertility. *Hum Fertil (Camb)*. 2013; 16: 241-5.
- Develioglu OH, Hsiu J-G, Nikas G ve diğ. Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors. *Fertil Steril*. 1999; 71: 1040-7.
- D'Hooghe TM, Debroch S, Hill JA ve diğ. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med*. 2003; 21(2): 243-54.
- Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol*. 2004; 103(1): 51-6.
- Eggert-Kruse W, Reimann-Andersen J, Rohn G ve diğ. Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. *Fertil Steril*. 1995; 63(3): 612-24.

- Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T ve diğ. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 204, 205: 11.
- Eldar-Geva T, Srebnik N, Altarescu G ve diğ. Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*. 2014; 102(4): 1016-21.
- ESHRE PGD Consortium. *Hum Reprod*. 2002; 20: 35-48.
- Farra C, Choucair F, Awwad J. Non-invasive pre-implantation genetic testing of human embryos: an emerging concept. *Human Reproduction*, 2018; 33(12): 2162-67.
- Feichtinger M, Vaccari E, Carli E ve diğ. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reproductive Biomedicine Online*. 2017; 34: 583-89.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E ve diğ. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(3): 762-70.
- Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A ve diğ. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod*. 2006; 21: 670-84.
- Fiorentino F, Bono S, Biricik A ve diğ. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod*. 2014; 29(12): 2802-13.
- Fiorentino F, Kahraman S, Karadayi H ve diğ. Short tandem repeats haplotyping of the HLA region in preimplantation HLA matching. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(8): 953-8.
- Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S ve diğ. PGD for reciprocal and robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Human Reproduction*. 2011; 26: 1925-35.
- Fiorentino F. Molecular genetic analysis of single cells. *Semin Reprod Med*. 2012; 30(4): 268-283.
- Fischer J, Colls P, Escudero T ve diğ. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. *Fertil Steril*. 2010; 94: 283-9.
- Foresta C, Moro E, Garolla A ve diğ. Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84(10): 3660-5.
- Forman EJ, Treff NR, Stevens JM ve diğ. Embryos whose polar bodies contain isolated reciprocal chromosome aneuploidy are almost always euploid. *Hum Reprod*. 2013; 28(2): 502-8.
- Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998; 83(129): 4177-4188.
- Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD ve diğ. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod*. 2011; 26: 480-90.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K ve diğ. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Human Genetics*. 2013; 132: 1001-13.
- Fragouli E, Wells D. Aneuploidy screening for embryo selection. *Semin Reprod Med*. 2012; 30(4): 293-305.
- Franssen MT, Musters AM, van der V ve diğ. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 2011; 17: 467-75.
- Freeman, DA. Steroid hormone-producing tumors of the adrenal, ovary, and testes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1991; 20(4): 751-66.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In: Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond. s.378, 88. Plenary Proceedings of the 11th World Congress, Boca Raton, 1999.

Gardner DK. In Vitro Fertilizasyon, Pratik Yaklaşım. Colorado Center for Reproductive Medicine Englewood, Colorado U.S.A. 2007. Çev. Hasan Serdaroglu, Doğan Tıp Kitabevi Yayınları-3, Antalya, 2009.

Garrisi G, Walmsley RH, Bauckman K ve diğ. Discordance among serial biopsies of mosaic embryos. *Fertil Steril.* 2016; 106: 151.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP ve diğ. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with poor prognosis: identification of the categories to which it should be proposed. *Fertil Steril.* 1999; 72: 837-44.

Gianaroli L, Magli MC, Pomante A ve diğ. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril.* 2014; 102: 1692-9.

Goossens V, De Rycke M, De Vos A. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 2008; 23(3): 481-92.

Gorodeckaja J, Neumann S, McCollin A ve diğ. High implantation and clinical pregnancy rates with single vitrified-warmed blastocyst transfer and optional aneuploidy testing for all patients. *Hum Fertil (Camb).* 2019; 7: 1-12.

Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application Ayman. *Journal of Investigative Dermatology.* 2013; 133: e11, (doi:10.1038/jid.2013.248).

Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med.* 2015; 373: 2089-90.

Griffin JE. Androgen resistance--the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med.* 1992; 326(9): 611-8.

Griffin OK, Handyside AH, Harper JC ve diğ. Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet.* 1994; 11(3): 132-43.

Griffin PD, Aribarg A, Gui-Juan Z. ve diğ. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril.* 1996; 65(4): 821-9.

Grifo JA, Tang YX, Munne S ve diğ. Healthy babies from biopsied human embryos. *Hum Reprod.* 1994; 9: 912-6.

Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-García J ve diğ. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and Sterility.* 2011; 9(3): 953-8.

Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM ve diğ. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil Steril.* 2017; 107: 220-8.

Hammond ER, Shelling AN, Cree LM. Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use. *Human Reproduction.* 2016; 31: 1653-61.

Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM ve diğ. Obesity and male reproductive potential. *J Androl.* 2006; 27(5): 619-26.

Handyside AH, Harton GL, Mariani B ve diğ. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of Medicine Genetics.* 2010; 47: 651-8.

Handyside AH, Hunter S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux Arch Dev Biol.* 1986; 195: 519-26.

Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ ve diğ. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet.* 1989; 18(8634): 347-9.

- Handyside AH. Noninvasive preimplantation genetic testing: dream or reality? *Fertility and Sterility*. 2016; 16(6): 1324-25.
- Harper JC, Coonen E, Handyside AH ve diğ. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenatal Diagnosis*. 1995; 15: 41-9.
- Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J ve diğ. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 2012; 18: 234-47.
- Harton G, Braude P, Lashwood A ve diğ. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21: 649-57.
- Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F ve diğ. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod*. 2011; 26: 33-40.
- Harton GL, Munné S, Surrey M ve diğ. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril*. 2013; 100: 1695-703.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet*. 2001; 2: 280-91.
- Ho J.R, Arrach N, Rhodes-Long K ve diğ. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertility and Sterility*. 2018; (110): 3.
- Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S ve diğ. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril*. 2012; 98: 675-80.
- Hoff JD, Quigley ME, Yen SSC. Hormonal dynamics at midcycle: A reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983; 57(4): 792-6.
- Homer HA, Li TC, Cooke ID. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril*. 2000; 73(1): 1-14.
- Hou Y, Fan W, Yan L ve diğ. Genome analyses of single human oocytes. *Cell*. 2013; 155(7): 1492-506.
- Howards SS. Subclinical varicocele. *Fertil Steril*. 1992. 57(4): 725-6.
- Iwarsson E, Lundqvist M, Inzunza J ve diğ. A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Human Genetics*. 1999; 104: 376.
- Iwarsson E, Malmgren H, Inzunza J ve diğ. Highly abnormal cleavage divisions in preimplantation embryos from translocation carriers. *Prenatal Diagnosis*. 2000; 20: 1038-47.
- Jegou B, Pineau C, Toppari J. (2002) Spermatogenesis in vitro in mammals. In Assisted Reproductive Technology. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- Johnson L, George FW, Neaves WB ve diğ. Characterization of the testicular abnormality in 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 63(5): 1091-9.
- Johnson N, Mak W, Sowter MC. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; (1): CD002125.
- Joshi JV, Bhandarkar SD, Chadha M ve diğ. Menstrual irregularities and lactation failure may precede thyroid dysfunction or goitre. *J Postgrad Med*. 1993; 39(3): 137-41.
- Kahraman S, Bohce M, Samli H ve diğ. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod*. 2000; 15(9): 2003-7.

- Kandeel FR, Swerdloff RS. Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. *Fertil Steril*. 1988; 49(1): 1-23.
- Karkucak M. Kromozom anomalileri ve fertilite problemleri. *Androloji Bülteni*. 2016; 18(64): 33-9.
- Katz DF, Slade DA, Nakajima ST. Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracept*. 1997; 13(2-3): 143-51.
- Katz DF. Human cervical mucus: research update. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165(6): 1984-6.
- Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK ve diğ. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Molecular Human Reproduction*. 2009; 15: 271-7.
- Kavlak O, Saruhan A. İnfertil kadınlarda yalnızlık düzeyi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi*. 2002; 41(4): 229-32.
- Kızılkaya N. İnfertil çiftlerin ilgileri, uygulamaları ve infertilitenin psikososyal değerlendirilmesi. *Hemşirelik Bülteni*. 1992; 6(25-26): 44-5.
- Kim MR, Kim YA, Jo MY ve diğ. High frequency of endometrial polyps in endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 2003; 10(1): 46-8.
- Kişniçi HA, Gökşin E, Durukan T ve diğ. Erkeğe Bağlı İnfertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Güneş Kitabevi, Ankara, 1996.
- Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C ve diğ. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod*. 2007; 22(5): 1443-9.
- Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J ve diğ. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major: case report. *Hum Reprod*. 2005; 20: 1855-1859.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW ve diğ. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*. 2006; 27(3): 450-2.
- Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: update, 2006. *Front Biosci*. 2006; 11: 3049-61.
- Kroener L, Ambartsumyan G, Briton-Jones C ve diğ. The effect of timing of embryonic progression on chromosomal abnormality. *Fertil Steril*. 2012; 4: 876-80.
- Kropp J, Khatib H. mRNA fragments in in vitro culture media are associated with bovine preimplantation embryonic development. *Frontiers in Genetics*. 2015; 24: 273.
- Kung A, Munne S, Bankowski B ve diğ. Validation of nextgeneration sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos. *Reprod Biomed Online*. 2015; 31: 760-9.
- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG ve diğ. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet*. 2001; 29(3): 279-86.
- La Torre R, De Felice C, De Angelis C ve diğ. Transvaginal sonographic evaluation of endometrial polyps: a comparison with two dimensional and three dimensional contrast sonography. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 1999; 26(3-4): 171-3.
- Lam CW, Mak CM. Allele dropout caused by a non-primer-site SNV affecting PCR amplification—a call for next-generation primer design algorithm. *Clinica Chimica Acta. Int J Clin Chem*. 2013; 421: 208-12, (doi:10.1016/j.cca.2013.03.014).
- Lane M, Zander-Fox D, Hamilton H, Jasper MJ, Hodgson BL, Fraser M, Bell F. Ability to detect aneuploidy from cell free DNA collected from media is dependent on the stage of development of the embryo. *Fertil Steril*. 2017;108: 61.

- Li M, Marin DeUgarte C, Surry M ve diğ. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril*. 2005; 84: 1395-400.
- Lightfoot DA, Kouznetsova A, Mahdy E ve diğ. The fate of mosaic aneuploid embryos during mouse development. *Dev Biol*. 2006; 289: 384-94.
- Liu W, Liu J, Du H, Ling J, Sun X, Chen D. Non-invasive pre-implantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium. *Ann Med*. 2017; 49(4):319-328.
- Lu L, Lv B, Huang K ve diğ. Recent advances in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*. 33: 1129-34.
- Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS ve diğ. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*. 1999; 140(4): 1709-17.
- Lukaszuk K, Pukszta S, Wells D ve diğ. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2015; 103(4): 1031-6, (doi:10.1016/j.fertnstert.2014.12.123).
- Luquaszuk K, Pukszta S, Wells D ve diğ. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*. 2015; 103: 4.
- Mackie Ogilvie C, Scriven PN. Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10: 801-6.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP ve diğ. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online*. 2009; 18(4): 536-42.
- Magli MC, Pomante A, Cafueri G ve diğ. 2016. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertility and Sterility*. 2016; 105: 676-83.
- Majumdar G, Majumdar A, Lall M ve diğ. Preimplantation genetic screening for all 24 chromosomes by microarray comparative genomic hybridization significantly increases implantation rates and clinical pregnancy rates in patients undergoing *in vitro* fertilization with poor prognosis. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2016; 9(2): 94-100.
- Malmgren H, Sahlen S, Inzunza J ve diğ. Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations. *Molecular Human Reproduction*. 2002; 8: 502-10.
- Mamas T, Gordon A, Brown A ve diğ. Detection of aneuploidy by array comparative genomic hybridization using cell lines to mimic a mosaic trophoctoderm biopsy. *Fertil Steril*. 2012; 97: 943-7.
- Mantikou E, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822: 1921-30.
- Mantzouratou A, Delhanty JD. Aneuploidy in the human cleavage stage embryo. *Cytogenet Genome Res*. 2011; 133: 141-8.
- March WA, Moore VM, Willson KJ ve diğ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010; 25(2): 544-51.
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F ve diğ. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2011; 17: 454-66.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007; 357(1): 9-17.

- Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B ve diğ. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertil Steril*. 2016; 106: 1414-9.
- McLachlan RI, O'Bryan MK, Clinical Review: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(3): 1013-24.
- Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR ve diğ. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(2): 273-88.
- Milachich T. New advances of preimplantation and prenatal genetic screening and noninvasive testing as a potential predictor of health status of babies. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 306-505, (doi:10.1155/2014/306505).
- Milán M, Cobo AC, Rodrigo L ve diğ. Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21: 649-57.
- Miller JH, Weinberg RK, Canino NL ve diğ. The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 181(4): 952-7.
- Mirkin S, Nikas G, Hsiu J-G ve diğ. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 5742-52.
- Montag M, VL, van der Ven K, van der Ven H. Polar body diagnosis. In: Harper J, ed. Preimplantation Genetic Diagnosis (2. Baskı). Cambridge University Press; Cambridge, UK, 2010.
- Motato Y, de Los Santos MJ, Escriba MJ ve diğ. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertility and Sterility*. 2016; 105: 376-84.
- Mukaida T, Oka C, Goto T ve diğ. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*. 2006; 21(12): 3246-52, (doi:10.1093/humrep/del285).
- Munne S, Alikani M, Tomkin G ve diğ. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility*. 1995; 64: 382-91.
- Munné S, Chen S, Fischer J ve diğ. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005; 84: 331-5.
- Munné S, Magli C, Cohen J ve diğ. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod*. 1999; 14: 2191-9.
- Munne S, Morrison L, Fung J. Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. *Journal Assisted Reproduction Genetics*. 1998; 15: 290-6.
- Munne S, Scott R, Sable D ve diğ. First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertility and Sterility*. 1998; 69: 675-81.
- Munne S, Weier HU, Grifo J ve diğ. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biology of Reproduction*. 1994; 51: 373-9.
- Munne S, Weier HU, Stein J. Fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J Assist Reprod Genet*. 1993; 10(1): 82-90.
- Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Current Genomics*. 2012; 13: 463-70.
- Munro NC, Currie DC, Lindsay KS ve diğ. Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax*. 1994; 49(7): 684-7.

- Nagy PL, Worman HJ. Next-Generation Sequencing and Mutational Analysis: Implications for Genes Encoding LINC Complex Proteins. *Methods Mol Biol.* 2018; 1840: 321-36.
- Natesan SA, Handyside AH, Thornhill AR ve diğ. Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders. *Reproductive Biomedicine Online.* 2014; 29: 600-5.
- Nekkebroeck J, Bonduelle M, Desmyttere S ve diğ. Socio-emotional and language development of 2-yearold children born after PGD/PGS, and parental well-being. *Hum Reprod.* 2008; 23: 1849-57.
- Nikas G, Ao A, Winston RM ve diğ. Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol Reprod.* 1996; 55(1): 32-7.
- Nikas G, Develioglu OH, Toner JP ve diğ. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod.* 1999; 14: 787-92.
- Norton ME, Brar H, Weiss J ve diğ. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2012; 207: 137-8
- Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington F ve diğ. Thompson ve Thompson Tıbbi Genetik (6. Baskı). Güneş Kitabevi, Ankara, 2005.
- Nyalwidhe J, Burch T, Bocca S ve diğ. 2013. The search for biomarkers of human embryo developmental potential in IVF: a comprehensive proteomic approach. *Molecular Human Reproduction.* 2013; 19: 250-63.
- Oğuz Deniz H. İnfertilite Tedavisi Gören Kadınlarda İnfertilitenin Ruh Sağlığına, Evlilik İlişkileri ve Cinsel Yaşama Etkileri. Uzmanlık Tezi. Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 12. Psikiyatri Birimi, 2004.
- Orshan S. A. 2008. Maternity, Newborn And Women's Health Nursing, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins a Wolters Kluwer business.
- Otani T, Roche M, Mizuike M ve diğ. Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and unsuccessful pregnancies. *Reprod Biomed Online.* 2006; 13(6): 869-74.
- Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Reprod.* 1999; 14(7): 1722-6.
- Palini S, Galluzzi L, De Stefani S ve diğ. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive Biomedicine Online,* 2013; 26(6): 603-10, (doi:10.1016/j.rbmo.2013.02.012).
- Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM ve diğ. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genetics in Medicine.* 2012; 14: 296-305.
- Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM ve diğ. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genetics in Medicine.* 2011; 13: 913-20.
- Papanikolaou E, Chartomatsidou T, Timotheou E ve diğ. 2019. In Freeze-All Strategy, Cumulative Live Birth Rate (CLBR) Is Increasing According to the Number of Blastocysts Formed in Women <40 Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 427.
- Patrizio P, Asch RH, Handelin B ve diğ. Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Hum Reprod;* 1993; 8(2): 215-20.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive, E. and Infertility, Optimizing natural fertility". *Fertil Steril.* 2008; 90(5): 1-6.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss". *Fertil Steril.* 2008; 89(6): 1603.

- Pryor JL, Howards SS. Varicocele. *Urol Clin North Am*. 1987; 14(3): 499-513.
- Rajfer J, Handelsman DJ, Swerdloff RS ve diğ. Hormonal therapy of cryptorchidism. A randomized, double-blind study comparing human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone. *N Engl J Med*. 1986; 314(8): 466-70.
- Ramos L, Del Rey J, Daina G ve diğ. Does the S phase have an impact on the accuracy of comparative genomic hybridization profiles in single fibroblasts and human blastomeres? *Fertil Steril*. 2014; 101: 488-95.
- Rodgaard T, Heegaard PM, Callesen H. Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015; 31: 585-92.
- Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AE ve diğ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertility and Sterility*. 2013; 99: 855-61.
- Rotterdam EA. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004; 19(1): 41-7.
- Rowley MJ, Leach DR, Warner GA ve diğ. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res*. 1974; 59(3): 665-78.
- Sachdev NM, Maxwell SM, Besser AG ve diğ. Diagnosis and clinical management of embryonic mosaicism. *Fertility and Sterility*. 2017; 107(1): 6-11.
- Sachdev NM, Ribustello L, Liu E ve diğ. The rate of mosaic embryos from donor eggs as detected by next generation sequencing (NGS) varies by IVF laboratory. *Fertil Steril*. 2016; 106: 156-7.
- Sakkas D. Embryo selection using metabolomics. *Methods in Molecular Biology*. 2014; 1154: 533-40.
- Salvaggio CN, Forman EJ, Garnsey HM ve diğ. Polar body based aneuploidy screening is poorly predictive of embryo ploidy and reproductive potential. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31(9): 1221-6, (doi:10.1007/s10815-014-0293-1).
- Schiff JD, Ramirez ML and Bar-Chama N: Medical and surgical management male infertility. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2007; 36: 313.
- Scott RT Jr, Galliano D. The challenge of embryonic mosaicism in preimplantation genetic screening. *Fertil Steril*. 2016; 105: 1150-2.
- Scott RT, Upham KM, Forman EJ ve diğ. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013;100: 697-703.
- Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D ve diğ. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clinical Chemistry*. 2011; 57: 1042-9.
- SenGupta SB, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis: recent triumphs and remaining challenges. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012; 12(6): 585-92, (doi:10.1586/erm.12.61).
- Sermon K, Lissens W, Joris H ve diğ. Adaptation of the primer extension preamplification (PEP) reaction for preimplantation diagnosis: single blastomere analysis using short PEP protocols. *Mol Hum Reprod*. 1996; 2: 209-12.
- Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z ve diğ. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertility and Sterility*. 2016; 106: 6.
- Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z ve diğ. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertility and Sterility*. 2016; 106(6): 1312-18.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC ve diğ. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril*. 2014; 102: 3-9.

- Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ ve diğ. Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science*. 2011; 333: 1026-30.
- Shoham Z, Di Carlo C, Patel A ve diğ. Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial of endometrial measurements. *Fertil Steril*. 1991; 56: 836-841.
- Silber S, Escudero T, Lenahan K ve diğ. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertility and Sterility*. 2003; 79: 30-8.
- Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn*. 2010; 30(7): 682-95, (doi:10.1002/pd.2552).
- Smith EP, Boyd J, Frank GR ve diğ. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*. 1994; 331(16): 1056-61.
- Sokol RZ. Endocrinology of male infertility: evaluation and treatment. *Semin Reprod Med*. 2009; 27(2): 149-58.
- Sparks AB, Wang ET, Struble CA ve diğ. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenatal Diagnosis*. 2012; 32: 3-9.
- Spratt DI, Carr DB, Merriam GR ve diğ. The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 64(2): 283-91.
- Stern C, Pertile M, Norris H ve diğ. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod*. 1999; 14(8): 2097 -101.
- Stigliani S, Anserini P, Venturini PL ve diğ. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction*. 2013; 28: 2652-60.
- Stigliani S, Persico L, Lagazio C ve diğ. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Molecular Human Reproduction*. 2014; 20: 1238-46.
- Stillman RJ. In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring. *Am J Obstet Gynecol*. 1982; 142(7): 905-21.
- Strandell A, Linhard A, Waldenström U ve diğ. Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2001; 16(11): 2403-10.
- Tan YQ, Tan K, Zhang SP ve diğ. Single-nucleotide polymorphism microarray-based preimplantation genetic diagnosis is likely to improve the clinical outcome for translocation carriers. *Human Reproduction*. 2013; 28: 2581-92.
- Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J ve diğ. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet*. 1997; 15(2): 205-6.
- Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nat Educ*. 2008;1: 45.
- Tobias ES, Connor M, Smith MF. Tıbbi Genetiğin Esasları. Çev. Ed. Prof. Dr. Uğur Özbek (1. Baskı). İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2014.
- Tobler KJ, Zhao Y, Ross R ve diğ. Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril*. 2015;104(2): 418-25.
- Traversa MV, Marshall J, McArthur S ve diğ. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridization. *Reprod Biol*. 2011; 11: 51-60.

- Treff NR, Tao X, Schillings WJ ve diğ. Use of single nucleotide polymorphism microarrays to distinguish between balanced and normal chromosomes in embryos from a translocation carrier. *Fertility and Sterility*. 2011; 96: 58-65.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008; 14: 243–58.
- Turner K, Fowler K, Fonseka G ve diğ. Multicolor detection of every chromosome as a means of detecting mosaicism and nuclear organization in human embryonic nuclei. *Panminerva Med*. 2016; 58: 175-90.
- Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998; 13:1864-71.
- Umopathy E. STD/HIV association: effects on semen characteristics. *Arch Androl*. 2005. 51(5): 361-5.
- Unuane D, Tournaye H, Velkeniers B ve diğ. Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011; 25(6): 861-73.
- Uyar A, Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med*. 2014; 32: 141-52.
- Vanneste E, Melotte C, Voet T ve diğ. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Human Reproduction*. 2011; 26: 941-9.
- Veldhuis JD, Dufau ML. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest*. 1987; 80(3): 631-8.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M ve diğ. Pregnancies following preconception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Human Reproduction*. 1995; 10(7): 1923-7.
- Verlinsky Y, Evsikov S. Karyotyping of human oocytes by chromosomal analysis of the second polar bodies. *Molecular Human Reproduction*. 1999; 5: 89-95.
- Vine MF, Margolin BH, Morrison HI ve diğ. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 1994; 61(1): 35-43
- Voet T, Kumar P, van Loo P ve diğ. Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 6119-38.
- Vollenhoven BJ, Lawrence AS, Healy DL. Uterine fibroids: a clinical review. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990. 97(4): 285-98.
- von Eckardstein S, Syska A, Gromoll J ve diğ. Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(6): 2585-90.
- Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetzis M ve diğ. Real-time PCR for single-cell genotyping in sickle cell and thalassemia syndromes as a rapid, accurate, reliable, and widely applicable protocol for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Mutat*. 2004; 23: 513-21.
- Wang EH, Wang AC, Wang BS ve diğ. Outcomes of vitrified-warmed cleavage- stage embryo hatching after in vitro laser-assisted zone pellucida thinning in patients. *Biomed Rep*. 2016; 5(3): 376-82.
- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction*. 2000; 6: 1055–62.
- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*. 2000; 6: 1055-62.
- Wells D, Kaur K, Grifo J ve diğ. Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J Med Genet*. 2014; 51: 553-62.

- Wells D. Next-generation sequencing: The dawn of a new era for preimplantation genetic diagnostics. *Fertility and Sterility*. 2014; 101: 1250-1.
- Werner MD, Leondires MP, Schoolcraft WB ve diğ. Clinically recognizable error rate after the transfer of comprehensive chromosomal screened euploid embryos is low. *Fertil Steril*. 2014; 102: 1613-8.
- Westendorp IC, Ankum WM, Mol BW ve diğ. Prevalence of Asherman's syndrome after secondary removal of placental remnants or a repeat curettage for incomplete abortion. *Hum Reprod*. 1998. 13(12): 3347-50.
- Westrom L. Effect of pelvic inflammatory disease on fertility. *Venereology*. 1995; 8(4): 219-22.
- World Health Organization. Temporal relationships between ovulation and defined changes in the concentration of plasma estradiol 17 β luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and progesterone". *Am J Obstetrics and Gynecology*. 1980; 138: 383-390.
- Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J ve diğ. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod*. 2009; 24: 1221-8.
- Wu H, Ding C, Shen X ve diğ. Medium-based noninvasive preimplantation genetic diagnosis for human α -thalassemias-SEA. *Medicine*. 2015; 94(12): 669.
- Wu YC, Chen CK, Huang HY ve diğ. Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis in a female with Robertsonian translocation. *J Formos Med Assoc*. 2004; 103: 637-9.
- Xu J, Fang R, Chen L ve diğ. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2016; 113: 11907-12.
- Xu K, Montag M. New Perspectives on Embryo Biopsy: Not How, But When and Why? *Seminars in Reproductive Medicine*. 2012; 30: 4.
- Xu KP, Shi ZM, Veeck LL ve diğ. unaffected pregnancy using preimplantation genetic diagnosis for sickle cell anemia. *JAMA*. 1999; 281(18): 1701-6.
- Yan L, Wei Y, Huang J ve diğ. Advances in preimplantation genetic diagnosis/screening. *Sci Chin Life Sci*. 2014; 57(7): 665-71, (doi:10.1007/s11427-014-4683-5).
- Yang Z, Liu J, Collins GS ve diğ. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular Cytogenetics*. 2012; 5: 24.
- Yirmibeş Karaoğuz M. İnsandaki genetik hastalıklar. *MİSED (Türk Eczacılar Birliği Yayını/Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi)*. 2007; 19-20: 5-15.
- Youssry M, Ozmen B, Zohni K ve diğ. Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16, 311-20.
- Zariwala, MA, Knowles MR, Omran H. Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu Rev Physiol*. 2007; 69: 423-50.
- Zhang L, Cui X, Schmitt K ve diğ. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1992; 89: 5847-51.
- Zhang Y, Li N, Wang L ve diğ. Molecular analysis of DNA in blastocoele fluid using next-generation sequencing. *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33: 637-45.
- Zhu D, Zhang J, Cao S ve diğ. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles – time for a new embryo transfer strategy? *Fertil Steril*. 2011; 95: 1691-95.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı : Begüm ALYÜRÜK
- Doğum Yeri ve Tarihi : İZMİT – KOCAELİ / 26.03.1986
- Uyuşu : T.C.
- Medeni Durumu : Bekar
- Çalıştığı Kurum : Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yardımla Üreme Merkezi
- İletişim Adresi ve Telefonu : Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yardımla Üreme Merkezi İzmit / KOCAELİ - 0555 721 7393

2. Eğitimi

2012-2019	Doktora	Kocaeli Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar FİLİZ
2009-2012	Yüksek Lisans	Kocaeli Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yusufhan YAZIR
2004-2009	Lisans	Selçuk Üniversitesi –Fen Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü

3. Yabancı Dili : İngilizce

4. Unvanları : Uzman Embriyolog (2012-halen)

5. Mesleki Deneyimi

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler	
<p>1. Sequential Transfer of Day 2/3 Embryos versus Cleavage Stage Double Embryo Transfer: The Impact on Clinical Pregnancy Rates. Gozde Kaya, Begum Alyuruk, Ozge Senem Yucel Cicek, Sule Yildirim Kopuk, Ahmet Yigit Çakiroglu, Emek Doger, Serdar Filiz, Asian Pacific Journal of Reproduction.</p> <p>2. Evaluation of the Effect of STZ-Induced Diabetes on Oocyte Morphology and Subsequent Embryo Development in Superovulated Mice. Özcan BUDAK, Ender YALÇINKAYA, Eray ÇALIŞKAN, Begum Alyuruk. and Süreyya CEYLAN. Journal of Animal and Veterinary Advances. (2015). 14(11): 345-350.</p>	
Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar	
<p>1. Azalmış Over Rezervi Hastalarında Kadın Yaşının ICSI Sikluslarında Gebelik Oranları Üzerine Etkisi, Kaya G., Alyürük B., Çakıroğlu Y., Doğer E., Özdemir Özkan S., Filiz S.,</p> <p>2. Education through research projects in health sciences", 'Y. Yazır', 'M. Yardımoğlu', 'B. Alyürük', 'E. Gelenli', Congress book, 3rd International Congress of Educational Research , 65-68, (2011).</p> <p>3. Protective effect of agmatine in subarachnoid haemorrhage model in rats", 'Yazır Yusufhan', 'Ersahin Mehmet', 'Alyürük Begüm', 'Toklu Hale Zengin', 'Gümrü S', 'Ceylan Süreyya', 'Arıcıoğlu Feyza', , 24th ECNP Congress, 21, 250-251, (2011).</p> <p>4. Examining the effects of agmatine in cortex immunohistochemically in subarachnoid hemorrhage: c-Fos, GFAP, nNOS and caspase-3 expression", 'Y. Yazır', 'M. Erşahin', 'B. Alyürük', 'H.Z. Toklu', 'S. Gümrü', 'F. Arıcıoğlu', Cell and Tissue Biology Research, 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, , 120, (2010).</p>	

EKLER

EK 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Non-invaziv preimplantasyon genetik tarama yöntemleri: Umuda Yolculuk
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŐKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	PROF. DR. NERMİN ERSOY

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof.Dr. Nermin ERSOY Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	KOÜ Tıp Fak. Tıp Tarihi ve Etik AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	N. Ersoy
Prof.Dr. Zeynep CANTÜRK Başkan Yrd.	Endokrinoloji	KOÜ Tıp Fak. İç Hastalıkları AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İpek K. ÇELİKYURT Raportör	Farmakoloji	KOÜ Tıp Fak. Farmakoloji AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç. Dr. Selim ÖNCEL Üye	Pediyatri	KOÜ Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hst. AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Ayşe KARSON Üye	Fizyoloji	KOÜ Tıp Fak. Fizyoloji AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr. Berna A. ŞERİFLİ Üye	Halk Sağlığı	İzmit 1 Nolu AÇSAP	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Ersayın IŐIK Üye	Avukat	Kocaeli Barosu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yasemin ÜLSOY Üye	Hasta Hakları Temsilcisi	Ev Hanımı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Nermin Ersoy
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

EK 2. Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen şekilde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun şekilde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Romen rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde yazıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde yazıldı.
- Ana metin satır aralığı 1,5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.
- Lisansüstü eğitim sırasında yapmış olduğu yayınlar ve bildiriler eklendi.
- Teze ait intihal raporu eklendi.

Tez Yazarı
BEGÜM ALYÜZÜK



Denişman
Prof. Dr. Serdar FİLİZ





DOKTORA	2020	BEGÜM ALYÜRÜK
----------------	-------------	----------------------