

**T.C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**EMBRYO MORFOLOJİK SEÇİM KRİTERLERİNİN  
PREİMLANTASYON GENETİK TANI SONUÇLARIYLA  
KARŞILAŞTIRILMASI VE 5.GÜN EMBRİYOLARINDAKİ  
BLASTOMER FRAGMENTASYONUNUN İNCELENMESİ**

**Biyolog Şadiye Gülçin KUNAÇAF**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2014**

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**EMBRYO MORFOLOJİK SEÇİM KRİTERLERİNİN  
PREİMLANTASYON GENETİK TANI SONUÇLARIYLA  
KARŞILAŞTIRILMASI VE 5.GÜN EMBRİYOLARINDAKİ  
BLASTOMER FRAGMENTASYONUNUN İNCELENMESİ**

**Biyolog Şadiye Gülçin KUNAÇAF**

**Tez Danışmanı  
Yard. Doç. Dr. Şule Beyhan ÖZDAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2014**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Şadiye Gülçin KUNAÇAF



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. ERKEN SEÇİM KRİTERLERİ.....	7
4.1.1. Pronuklear Evre.....	7
4.1.2. Erken Bölünme.....	8
4.1.3. Bölünme Hızı.....	9
4.2. PREİMLANTASYON GENETİK TANI (PGT).....	10
4.2.1. Kromozomal Hastalıklar.....	10
4.2.1.1. Kromozomlardaki Sayısal Anomaliler.....	10
4.2.1.1.1. Öploidi.....	11
4.2.1.1.2. Anöploidi.....	11
4.2.1.2. Kromozomlardaki Yapısal Anomaliler.....	12
4.2.1.2.1. Delesyon.....	12
4.2.1.2.2. Duplikasyon.....	13
4.2.1.2.3. İnversiyon.....	13
4.2.1.2.4. Translokasyon.....	13
4.2.2. Embriyo Biyopsisi.....	13
4.2.3. FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) Yöntemi.....	16
4.3. APOPTOZ.....	16
4.3.1.TUNEL (TdT-Aracılı dUTP-FITC Uç İşaretleme) Test.....	18
5. MATERYAL VE YÖNTEM .....	19
5.1.MATERYAL.....	19
5.1.1. Sarf malzemeler.....	19
5.1.2. Kullanılan Kitler.....	20
5.1.3. Cihazlar.....	20
5.2. YÖNTEM.....	21

5.2.1. Yumurta Toplanması.....	21
5.2.2. Embriyo skorlaması.....	24
5.2.3. Embriyo Biyopsisi.....	24
5.2.4. Blastomer Fiksasyonu.....	26
5.2.5. FISH Yöntemi.....	26
5.2.5.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu.....	27
5.2.5.2. Prob Denatürasyonu.....	28
5.2.5.3. Hibridizasyon.....	28
5.2.5.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar.....	28
5.2.5.5. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	28
5.2.5.6. Mikroskopik Değerlendirme.....	29
5.2.6. Embriyo Fiksasyonu.....	29
5.2.7. Hücre Apoptozunun Belirlenmesi (TUNEL).....	29
5.2.7.1. TUNEL Testi Boyama Protokolü.....	29
5.2.7.1.1. Ön Yıkama.....	29
5.2.7.1.2. Dengeleme Tamponu.....	30
5.2.7.1.3. Tdt Enzim Uygulaması.....	30
5.2.7.1.4. Durdurma/Yıkama.....	30
5.2.7.1.5. Anti-Digoksinin-Peroksidaz.....	30
5.2.7.1.6. Renk Reaksiyonu.....	30
5.2.7.1.7. Zıt Boya Uygulama.....	31
5.2.7.1.8. Kapatma.....	31
5.2.7.1.9. Mikroskopik Değerlendirme.....	31
6. BULGULAR.....	32
7. TARTIŞMA.....	41
8. SONUÇ.....	45
9. TEŞEKKÜR.....	46
10. KAYNAKLAR.....	47

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>DAB</b>	: Diamino benzidin
<b>DAPI</b>	: 4',6'- diamino-2-fenilindol
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile Su
<b>dk</b>	: Dakika
<b>EC</b>	: Erken Bölünme (Early Cleavage)
<b>FISH</b>	: Floresan İn Sitü Hibridizasyon
<b>Gr</b>	: Gram
<b>hCg</b>	: İnsan koryonik gonadotropin (Human Choryonic Gonadotropin)
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>ICM</b>	: İç Hücre Kitlesi (Inner Cell Mass)
<b>ICSI</b>	: Sitoplazma İçi Sperm Enjeksiyonu (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)
<b>IVF</b>	: In Vitro Fertilizasyon
<b>M</b>	: Molar
<b>MHz</b>	: Megahertz
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mmHG</b>	: Milimetre civa
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>OPU</b>	: Yumurta Toplanması (Oosit Pick-up)
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen

<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Çözeltisi
<b>PGT</b>	: Preimplantasyon Genetik Tanı
<b>PN</b>	: Pronükleus
<b>PVP</b>	: Polivinilpirolidan
<b>Rpm</b>	: Dakikadaki Dönme Sayısı (Revolutions Per Minute)
<b>SSC</b>	: NaCl <sub>7</sub> Trisodyum Sitrata
<b>Sn</b>	: Saniye
<b>TE</b>	: Trofoektoderm
<b>TdT</b>	: Terminal deoksinukleotidil transferaz
<b>TUNEL</b>	: TdT-Aracılı dUTP-FITC Uç İşaretleme (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling)
<b>UV ışını</b>	: Ultraviyole ışını
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ZP</b>	: Zona pellucida

İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 14.03.2013 tarih 14.03.2013/03-14 numaralı karar ile onaylanmıştır.

**Araştırma Proje No** : TBG / 1092012

**BAPKO Karar No** : 2013-01-10

## 1. ÖZET

Yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan embriyo erken seçim parametreleri, iyi kalitede embriyo transferinde önemli bir yer tutmaktadır. Biz de bu çalışmamızda embriyo morfolojik seçim kriterleri ile genetik analizlerden elde edilen sonuçların karşılaştırmasını yapmayı amaçladık. Aynı zamanda geç dönem embriyolarda 5. günde blastomerlerdeki fragmentasyonu göstermeyi hedefledik.

Çalışmamızda erkek faktörü bulunmamasına rağmen çocuk sahibi olamayan çiftlere, yardımcı üreme tedavi yöntemlerinden in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi uygulandı. Ultrason ile yapılan yumurta takibinin ardından, yumurta hücreleri istenen büyüklüğe eriştiğinde, folikül sıvıları içinde bulunan yumurta hücreleri, anestezi eşliğinde sıvı ile beraber çekilip mikroskop altından yumurtalar toplandı. Eş zamanlı olarak erkekten semen örneği alındıktan sonra motiliteli olan sperm hücrelerini seçebilmek adına bir seri işlem den geçirildi. Yumurta hücreleri de etraflarındaki granüloza hücrelerinden mekanik ve kimyasal olarak ayıklanarak sperm hücreleri ile birleştirildi.

Mikroenjeksiyonun ardından oluşan embriyolar erken seçim kriterlerine göre biyopsi gününe kadar gruplara ayrıldı.

Embriyolardan 3.günü 5 ve daha az blastomere sahip olanlar yavaş gelişen embriyo olarak değerlendirilerek çalışmamıza katıldı. Bu embriyoların zona pellusidalarına lazer ile atış yapılarak birer blastomerlerinin alınması sağlandı. Alınan bu blastomerlere genetik analiz için 5 problu Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulandı. Biyopsi sonrası embriyolar 5.güne kadar kültüre edildi. FISH yöntemi sonucu normal çıkan embriyolar kontrol grubumuzu oluşturdu.

FISH yöntemi sonrası normal ve anormal çıkan embriyoların her biri lamlara yapıştırıldı ve apoptozu göstermek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) testi uygulandı.

Erken seçim kriterlerine göre kaliteli embriyo olarak değerlendirdiğimiz 149 embriyonun genetik analiz sonrasında %42 oranında anöploidili olduğu bulundu. Aynı zamanda, yavaş gelişen ve genetik analiz sonucu anöploidi tespit edilen embriyolardaki apoptoz oranlarının, yavaş gelişen ancak anöploidi olmayan embriyolardaki apoptoza göre daha fazla olduğu gözlemlendi.



## 2. SUMMARY

Early embryo selection criterias which used in the assisted reproductive techniques that is very important technics for embryo transfer. In our study we aimed to compare morphological criteria for embryo selection with genetic analys results. At the same time we aimed to show in the slow cleavage embryos day 5 ratio of fragmentation in blastomeres.

In our study, in couples who could not have a baby in depite of there was not male factor it was applied in vitro fertilization on the methods assisted reproductive techniques. After the ovulation induction with ultrasound, when the oocyte came to desired size, they aspirated with the follicle liquids under anesthesia and these liquids was checked with microscope. At the same time same processes had done for selecting the active sperms of the sperm samples which had taken from the male. Oocyte cells extracted from surrounding granulosa cells by mechanical and chemical techniques and conjoined with sperm cells by microinjection methods.

The embryos which had five or less blastomeres on the thirth day partipicated to our study. For taking one of the blastomeres it had shot with laser to the zones of embryos which were developing slowly. It had applied FISH method with 5 probes to able to make aneuploidy analysis. After biopsy embryos were cultured until 5 th day. The embryos with the normal FISH method results created the control group.

Each normal and abnormal embryos after FISH method fixed on the stage and TUNEL (Terminal dxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling ) technics was applied for showing the apoptosis in these slow developing embryos .

As a result, it was investigated that if it was possible to select normal embryos with early selection parameters without requirement of PGD process. It was examined that, the reason of slow development and anomalies of embryos whether the apoptosis or not.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocuk sahibi olamama yani infertilite günümüzde azımsanamayacak kadar önemlidir. İnfertilite nedenleri; %40 erkek, %40 kadın, %10 her iki cinsiyetten kaynaklanan ve %10'da nedeni açıklanamayanlar olarak ayrılabilir. Yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan embriyo erken seçim parametreleri, iyi kalitede embriyo transfer etmede çok önemli bir yöntemdir.

1984 yılında embriyoların morfolojik özellikleri ve bölünme hızları Edwards ve arkadaşları tarafından implantasyon potansiyelleriyle ilişkili bulunmuş ve ilerleyen yıllarda embriyoların kalitesini belirlemede dikkate alınmaya başlanmıştır.

Bu sistemlerin kullanılmasıyla azalan çoğul gebelik oranlarına implantasyon ve gebelik oranlarında gözlenen anlamlı artışlar eşlik edince araştırmacılar embriyo kalitesinin belirlenmesinde kullanılacak daha yeni ve kesin kriterler belirleme yoluna gitmişlerdir.

Embriyo seçiminin laboratuvar koşullarında girişimsel olmadan, zaman almadan ve hastaya olabilecek en az maliyetle yapılması amaçlanmıştır.

Biz de bu çalışmamızda, erken embriyo seçim kriterlerinin, embriyolardaki anöplöidi ve apoptozla ilişkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Çalışmamız Taksim Alman Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'nde tedavi gören 20 hasta üzerinde yapılmıştır. Rutin tedavi sürecinde, gelişimini durdurmuş ya da yavaş gelişen ve hiçbir şekilde hastaya transfer edilmeyecek embriyolara genetik yapılarının analizi açısından Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) uygulanmıştır. Sonuçları normal ve anormal çıkan bu embriyoların her birinde apoptoz bakılmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

İnfertilite; çiftlerin en az bir yıl süreyle hiçbir korunma yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen, çocuk sahibi olamamalarıdır. İnfertilite, üreme çağındaki çiftlerin %10-15'inde görülür (1). Ancak 30'lu yaşların sonlarında olan kadınlarda, infertilite görülme oranı %25'e ulaşırken, 40 yaşından sonra fertilitate azalması daha hızlı olur (2).

Günümüzde infertilite kliniklerine başvuran hasta sayısında, ileri derecede artış bulunmaktadır. Bu durumun en önemli nedenleri, toplumların genelinde fertilitenin gün geçtikçe azalması ve infertilite tedavisindeki yeniliklerin, kitle iletişim araçlarıyla aktarılması sonucu toplumun bu konuda bilgilendirilmesidir.

İnfertilite 80'li yıllardan itibaren, ciddi bir üreme sağlığı sorunu olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan çalışmalarda, dünyada 60-80 milyon infertil çift olduğu tahmin edilmektedir. Kadınların çalışma hayatında daha fazla yer almaya başlamaları, doğum kontrol yöntemlerinin gelişmesi ve toplum genelinde yaygın kullanımı sonucu, çocuk doğurma yaşı giderek artmaktadır. Doğal ya da üremeye yardımcı tekniklerin kullanıldığı sikluslarda, başarının en önemli belirteci, kadın yaşıdır. Yapılan çalışmalarda, fertilitenin 25 yaşında en yüksek değere ulaştığı, 35 yaşından sonra giderek azaldığı ve 40 yaşına doğru ise her 3 kadından birinin infertil olduğu gözlenmiştir (3).

<b>İnfertilite nedenleri</b>	<b>Oranlar</b>
<b>Kadına ait nedenler</b>	
Ovulatuvar	%40-45
Tubal/Peritoneal Faktör	%30-40
Servikal ve İmmünolojik Faktörler	%20-40
Diğer	%1-2
<b>Erkeğe ait nedenler</b>	%30-40
<b>Açıklanamayan</b>	%10-15

**Tablo 1:** İnfertilite nedenleri (4).

Erkek infertilitesinde, ilk ve temel tetkik spermiyogramdır (5). Semen örneği, 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası alınmalı ve verildikten yarım saat sonra değerlendirme yapılmalıdır. 10 günü aşan cinsel perhiz, motiliteyi değiştirmektedir (6).

İnsanda spermatogenez, yaklaşık 70 gün içinde olmaktadır. Epididimde spermin olgunlaşması ve taşınması 12-21 gün içinde olmaktadır. Yakın zamanda geçirilen ateşli bir hastalık, semen kalitesinde 3 aya kadar süren bozukluğa neden olabilir. Bu nedenle tek bir spermiyogram ile tanı konmamalıdır. 2-3 haftalık aralarla 2 veya 3 spermiyogram ile tanı konulmalıdır. Bazal semen analizinde, spermilerin volüm, konsantrasyon, motilite ve morfolojisine bakılır. Semen analizindeki normal değerler Tablo 2’de gösterilmiştir (7).

<b>Parametre</b>	<b>WHO 1999</b>	<b>WHO 2010</b>
<b>Miktar (volüm)</b>	2.0 ml	1.5
<b>pH</b>	≥7.2	≥7.2
<b>ml’de sperm sayısı (konsantrasyon)</b>	≥20 milyon/ml	≥15 milyon/ml
<b>Total sperm sayısı</b>	≥40 milyon/ml	≥39 milyon/ml
<b>Motilite (hareketlilik)</b>	%50 (a+b)	%40 (PR+NP**) %32 PR*
<b>Şekil (morfoloji)</b>	≥%14	≥%4
<b>Canlılık (viability)</b>	≥%50	≥58
<b>Lökosit (iltihap hücresi)</b>	≤1 milyon/ml	≤1 milyon/ml


\*İlerleyici motilite, \*\* yerinde motilite

**Tablo 2.** Standart semen analizinde normal parametreler.

Yardımcı üreme tedavi yöntemlerinden en yaygın kullanılan IVF (In Vitro Fertilizasyon) uygulamasında ilk hedef, yeterli sayıda fertilizasyon yeteneğine sahip yumurta hücresi elde edebilmektir. Doğal sikluslarda bir yumurta hücresi elde edilir ve siklus iptal oranları yüksektir (8, 9). Bu nedenle IVF sikluslarında, kontrollü yumurta uyarımı yapılmaktadır. Tüp bebek uygulamalarında, her yumurta hücresine birer sperm hücresi enjekte edildikten sonra transfer gününe kadar embriyoların takibi yapılır ve o güne kadar gelişimini en iyi şekilde sürdürmüş olan embriyo anneye transfer edilir.

Embriyonun implantasyonunu arttırmak üzerine, pek çok araştırma yapılmıştır (16-19). Bunlardan laboratuvar ortamında, girişimsel olmadan, zaman almadan ve hastaya hiçbir maliyet oluşturmadan yapılanı embriyo erken seçim kriterleridir. Bu kriterler

yumurta toplandıği günden itibaren laboratuvar embriyoloji formuna kayıt edilir (Form-1). Formda yer alan bu kriterler sayesinde, implantasyon oranı yüksek embriyo seçilebilmektedir.

 <b>ALMAN HASTANESİ</b> Deutsches Krankenhaus Universal Hospitals Group IVF-ET (Tıp, Bebek) ve Jinekolojik Endoskopi Merkezi		<b>EMBRYOLOJİ LABORATUVARI</b>																																		
PK	♀	♂	Sıvı	mm OPU	mm ET	Polip	Trifazik/Mono	İŞLEM NO	OPU NO	İNK																										
<b>ENDİKASYON:</b>			<b>1. GÜN</b>			<b>2. GÜN</b>			<b>3. GÜN</b>			<b>4. GÜN</b>			<b>5. GÜN</b>			<b>6. GÜN</b>																		
OPU TARİHİ:	EVB:			2FN			EVB:			Saat:			EVB:			Saat:			EVB:																	
HASTA İSİM, YAŞ:	M:			Saat:			Saat:			HÜCRE/MORF			Saat:			HÜCRE/MORF			Saat:																	
ESİNİN ADI:	Trh:			Trh:			Trh:			HÜCRE/MORF			Trh:			HÜCRE/MORF			Trh:																	
T.C KİMLİK NO:	PN			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF																	
OPU DOKTOR	OO-SIT-KALİTE			PN			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF			HÜCRE/MORF																	
İNŞ SÜRESİ:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
COS PROT.:																																				
<b>İŞLEM</b>			<b>EMB</b>			<b>SAAT</b>			<b>EMBRYO DONDURMA</b>			<b>SPERM DONDURMA</b>			<b>NOT</b>																					
OPU	SAYI			ADRES			SAYI			ADRES			SAYI			ADRES			SAYI			ADRES			SAYI			ADRES			SAYI			ADRES		
AYIKLAMA																																				
İCSİ																																				
IVF																																				
ETİYOLOJİ																																				
ET TARİHİ																																				
<b>SPERM ÖRNEĞİ</b>			<b>EJAKULAT</b>			<b>MESA</b>			<b>TESE</b>			<b>ÇÖZDÜRME</b>																								
vol:																																				
Kons:																																				
Mot:																																				
4%																																				
3%																																				
2%																																				
<b>ET DOKTORU</b>			<b>ETİMB.</b>			<b>ET TARİHİ</b>			<b>KATATER TİPİ</b>			<b>ZOR ET</b>			<b>KATATER DEĞİŞTİ</b>			<b>KAN</b>			<b>MUKUS</b>															
Marka/Lot.No			Kül. Medium			Protein			İCSİ Pipet																											
Doküman No: IVF-F01-T04/P02																																				
Rev. No/Tarih: 00/...																																				

Form 1: Embriyoloji Formu.

## 4.1. ERKEN SEÇİM KRİTERLERİ

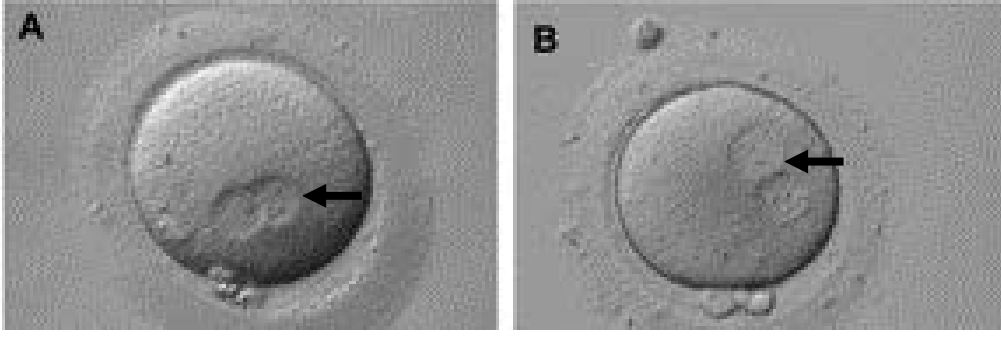
### 4.1.1. Pronuklear Evre

Döleme yani intrasitoplazmik sperm enjeksiyonundan (ICSI) 14-18 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapılır (10, 11). Yumurta hücresinin sitoplazmasında iki pronükleusun (PN) görülmesi fertilizasyonun gerçekleştiğini göstermesi açısından çok önemlidir. PN'ların morfolojik özelliklerinin embriyonun kalitesinin belirlenmesindeki önemi sebebiyle pronuklear morfoloji embriyo seçim kriterleri arasında ilk sırayı almıştır.

PN'lar sitoplazmanın ortasında, eşit büyüklükte ve birbirlerine yakın ya da yaslanmış pozisyonda olmalıdır (Resim 1), (12, 13). Periferde yerleşik PN'lar fertilizasyonun yeni gerçekleşmiş olduğunu, diğer bir deyişle fertilizasyon kontrolünün erken yapıldığını, fertilizasyonun geciktiğini veya PN'ların merkeze göçünü sağlayan mikrotübüler sistemin yetersizliğini gösterir (Resim 2) (12). PN'lar arasında büyüklük farkının fazla olması, bu zigotlardan gelişecek embriyolarda yavaş gelişim ya da duraksama olabileceğini belirtmesi nedeniyle önemlidir (14). PN'ların zigot sitoplazmasının merkezinde olmakla birlikte birbirlerine yaslanmadığı durumlar da gözlenebilir ki bu pronükleusların motiliteini sağlayan hücre iskelet sisteminin yetersizliği veya işlevsizliğini düşündürmelidir (15).



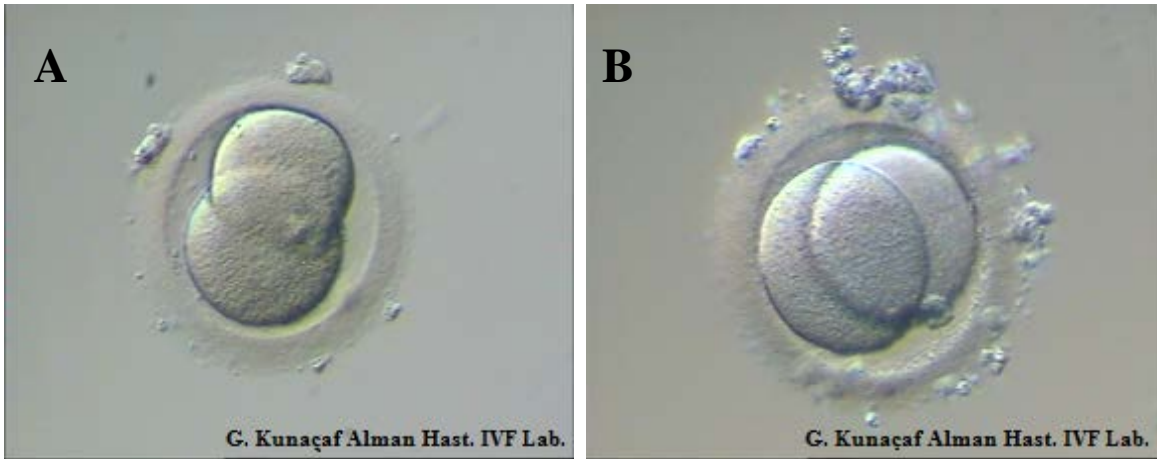
**Resim 1:** Fertilize olmuş bir yumurta hücresinde PN'ların eşit ve merkezde yerleşmiş olduğu gözlenmektedir.



**Resim 2:** ICSI sonrası gelişen her iki zigotta PN'lar periferde gözlenmektedir (12).

#### 4.1.2. Erken Bölünme

ICSI sonrasında fertilize olan embriyoların bir bölümünün 23-28. saatlerde ilk mitoz bölünmeyi gerçekleştirerek iki hücreye sahip embriyoya dönüştüğü gözlenmiştir (Resim3) ve bu embriyoların gelişim ve implantasyon oranlarının yüksek olduğu belirtilmiştir (16, 17). Ziebe S ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, rutin olarak 25-26. saat gözlemlerinde zigotların iki hücreli evreye geçmesi kadar, PN'ların görülmediği dönemde de (pronükleer breakdown) zigotun gelişim potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmiştir (18).



**Resim 3:** ICSI'den sonra 25. saatte bölünmekte olan (A) ve bölünen 2 hücreli (B) bir embriyo gözlenmektedir.

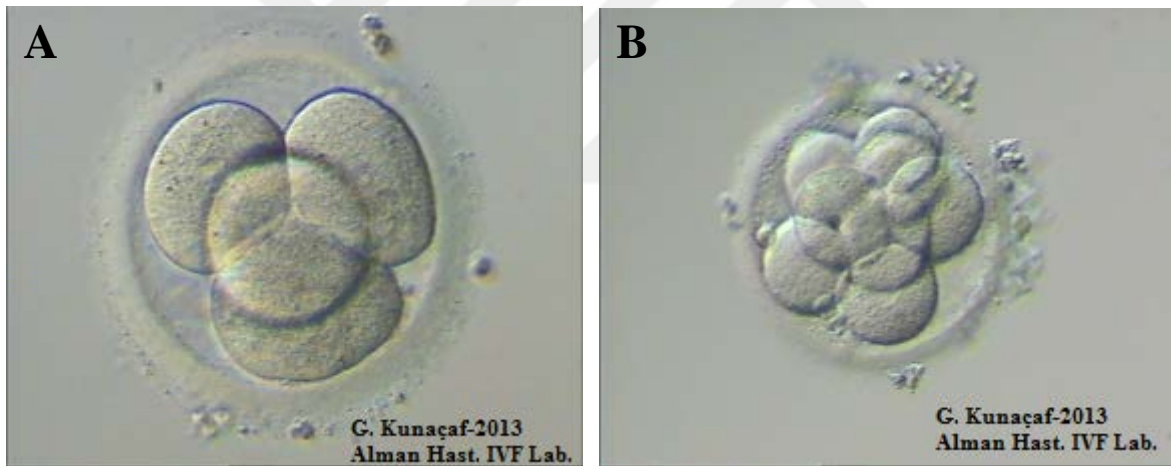
Eşit olmayan hücresel bölünme de embriyo kalitesi ve embriyonel gelişim hakkında bilgi vericidir. Blastomerleri eşit olmayan embriyoların transferiyle elde edilen implantasyon ve gebelik oranlarının düşük olması, iki kardeş hücre arasında hayati önemi olan mRNA, mitokondri, protein ve hücre organellerinin eşit paylaşamadığını gösterir.

Ayrıca eşit bölünmeyen blastomerler arasında sayısal kromozomal anomali ve multinükleasyon oranları da artmaktadır (19).

Bu dönemde gelişen iki hücreli embriyoların blastomerlerinin eşit büyüklükte olması ve fragman içermemesi de istenen özelliklerdendir.

#### 4.1.3. Bölünme Hızı

İyi kalitedeki embriyoların 2. günde (42- 44. saatler) 4 ya da 5 blastomere, 3. günde de ise (66-68. saatler) 6-8 blastomere sahip olması gerekir (Resim 4) (20, 21).



**Resim 4:** 4 blastomerli 2. gün embriyosu (A) ve 8 blastomerli 3. gün embriyosu (B).

Embriyoların bölünme hızları kromozomal yapıları hakkında da bilgi verir. Yavaş veya hızlı bölünen embriyolarda mozaikizm ve anöploidi gibi kromozomal anomali oranlarının yüksek olabileceği bilinmektedir (22). Bu embriyoların blastosist geliştirme oranları da düşüktür ve hücre sikluslarının zamanında çalışmadığı düşünülerek transfer edilmemeleri önerilmektedir (23).



## **4.2. PREİMLANTASYON GENETİK TANI (PGT)**

Genetik bilimindeki son gelişmeler sayesinde birçok kalıtsal hastalığın henüz embriyo düzeyinde iken tanısı konulabilmektedir. Sadece, anneye transfer edilecek sağlıklı embriyoların seçilmesini sağlayan bu tekniğe Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) denilmektedir (23). Bu teknik, genetik hastalıklı çocuk dünyaya getirme riski bulunan hamileliğin ilerleyen dönemlerinde amniyosentez neticesinde hastalıklı bir gebeliği sonlandırma durumunda kalmak istemeyen çiftler için yeni bir alternatif haline gelmiştir (24).

İlk PGT, Handyside ve arkadaşları tarafından cinsiyete bağlı hastalıklar için risk taşıyan embriyoların implantasyon öncesinde cinsiyet belirlenmesinde kullanılmıştır (25). Birkaç yıl sonra FISH yönteminin tanımlanması sayesinde, embriyolarda cinsiyet belirlenmesi ve anöploidi taramasına olanak sağlanmıştır.

PGT'nin birinci kullanım alanı kromozom anöploidileridir. Bu yöntem ile ilerlemiş anne yaşına bağlı tekrarlayan düşüklerde anöploidi oranının yüksek olduğu gösterilmiştir (23).

Ciddi erkek faktörünün mevcut olması, tekrarlayan gebelik kayıpları, cinsiyete bağlı geçiş gösteren hastalıkların görülmesi PGT endikasyonları olarak sayılabilir.

### **4.2.1. Kromozomal Hastalıklar**

Kromozomal hastalıklar, sayısal ve yapısal anomaliler olarak ayrılmaktadır (26).

#### **4.2.1.1. Kromozomlardaki Sayısal Anomaliler**

Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar ortamında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir. Kromozomlar bazen mitoz ve mayoz bölünmeler sırasında düzenli olarak ayrılamayabilir ve farklı kromozom sayısına sahip hücreler oluşabilir. Bu şekilde birçok genin oranı değişeceği için kalıtsal açıdan pek çok sorun (Mongolizm, Turner Sendromu, Klinefelter Sendromu vb.) ortaya çıkabilir (27, 28). Bu olayda kromozomun bir parçası değil tümü yok olur ya da sayıca artar.

Normalde hücrenin içinde haploid ( $n:23$ , eşey hücresindeki kromozom sayısıdır) sayının iki katı yani diploid ( $2n:46$ ) sayıda kromozom bulunmaktadır. Sayısal anomalilerde ise kromozom sayısı öploidi veya anöploidi oluşturacak şekilde değişir (28).

#### **4.2.1.1.1. Öploidi**

Kromozom sayısı takımındaki değişimlerdir. Bir takımındaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katlar halinde yükselmesi veya organizmada sadece tek takım kromozom bulunması biçiminde olabilir. Monoploidi ve poliploidi olarak iki kısımda incelenmektedir.

Monoploidilerde her kromozomdan sadece bir tane taşındığı için bütün genler de tek kopya halinde bulunmaktadır. Mayoz bölünme sırasında monoploidilerde kromozom eşleşmesi olmadığından kromozomların kutuplara çekilmeleri düzensizdir, sonuçta da dengesiz eşey hücreleri meydana gelmektedir.

Poliploidi ise bir genomdaki kromozom sayısının hepsinin birden, haploid sayının katları şeklinde yükselmesidir ( $3n, 4n$  vb). Bu olay; mayoz bölünmede kromozom sayısının yarıya inmesinin önlenmesi ile somatik hücrelerdeki kadar genoma sahip gametlerin ( $2n$ ) oluşumuyla (yüksek veya düşük sıcaklık ya da bazı kimyasal maddeler kullanıldığında sıklıkla meydana gelmektedir) meydana gelebilmektedir. Aynı zamanda, zigotun ilk mitoz bölünmeleri sırasında kromatidlerin farklı kutuplara çekilmesinin veya enine çeper oluşumunun engellenmesiyle ve son olarak da bir yumurta hücresinin birden fazla sperm hücresi tarafından döllenmesi sonucunda meydana gelebilmektedir.

Bir poliploidin sahip olduğu takımların hepsi aynı türe ait ise olaya otopoliploidi, farklı türe ait ise allopoliploidi denir (28).

#### **4.2.1.1.2. Anöploidi**

Bir takımındaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının değişmesine anöploidi denir. Anöploidi nedenleri 3 şekilde açıklanabilmektedir;

1- Kromozomların hücre bölünmeleri sırasında ayrılamaması (nondisjunction). Bu durumda bir hücre trizomik, diğeri monozomik olmaktadır.

2- Hücrelerin yaşlanması ve dolayısı ile kromozomların kutuplara çekilmesini sağlayan iğ iplikçiklerinin de yaşlanmasına bağlı çekme işlemi tam olarak yapamamalarıdır.

3- Anafaz aşamasında geri kalmadır (anafaz lagging). Anafaz aşamasında kutuplara göç sırasında hata olunca kromozomlardan bir tanesi yeni oluşan yavru hücrenin dışında kalmakta veya diğer grup kromozomlar ile beraber diğer hücrelere gidememektedir. Geri kalan kromozom hiçbir hücreye gitmeden ortadan kaybolmakta, bu durumda bir normal, bir de monozomik hücre oluşmaktadır.

Anöploidinin çeşitleri tipleri vardır;

Monosomi, diploid bir bireyde tek bir kromozomun eksik olma durumudur (Turner sendromu) (28).

Nullisomi, bir organizmada bir kromozomun homoloğu ile birlikte eksik olması durumudur. Bu bireyler aynı çeşit kromozomu kaybetmiş iki anöploid ( $n - 1$ ) gametin birleşmesiyle meydana gelmektedir (28). Bir takımdaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının artması olayıdır. Kromozom sayısına göre; trisomi (Down ve Patau sendromları), tetrasomi gibi isimler almaktadır (28).

#### **4.2.1.2. Kromozomlardaki Yapısal Anomaliler**

Genomda değişikliğe yol açan olaylar kromozomların yapılarındaki değişimler sonucunda da meydana gelebilir. Bu olaylarda kromozom sayısı aynı kalır fakat kromozomlarda bazı parçaların kaybolması, artması veya yer değiştirmesi yoluyla kalıtsal materyal değişime uğramaktadır. Yapı değişimlerinin hepsinde önce kromozomda veya kromozomu oluşturan kromatidlerden birinde bir veya birden fazla noktada kırılmalar olur. Kırılma kendiliğinden meydana gelebildiği gibi çeşitli dış etkenler (X, gama ışınları, UV ışık, çeşitli kimyasal maddeler vb.) tarafından da meydana gelebilmektedir (28).

##### **4.2.1.2.1. Delesyon**

Kromozomların, parça kaybetmesi olayına delesyon adı verilir. Delesyon meydana gelirken oluşan kromozom parçası ve onun meydana getirdiği delesyon halkası sentromerli ise hücrede varlığını devam ettirir, fakat sentromersiz kısım kaybolur. Delesyon

sentromerli bölgede meydana gelirse halka kromozom oluşur. İnsanda kromozom delesyonu sonucu oluşmuş hastalıklara örnek olarak Philadelphia kromozomunu ve “Cri du Chat” sendromunu verebiliriz (28).

#### **4.2.1.2.2. Duplikasyon**

Bir diğer yapısal kromozom anomalisi ise kromozomun herhangi bir parçayı fazla sayıda taşıması olarak bilinen duplikasyondur (Drosophila’da Bar duplikasyonu) (28). Delesyonun tersine, bir parça çoğalması vardır ve sonuçta dölde, duplikasyonlu kromozom taşıyan hücrelerde bazı genler fazla sayıda bulunmaktadır.

#### **4.2.1.2.3. İnversiyon**

Bir kromozomun içinden çıkan bir parçanın dönerek koştığı yere ters yönde yeniden yapışmasına inversiyon denir. Bunun sonucunda kromozomdaki genlerin diziliş sırasında değişim olmaktadır. Koştığı yere ters dönerek yapışan kromozom parçası sentromer içeriyorsa perisentrik, içermiyorsa parasentrik inversiyon denir (28)

#### **4.2.1.2.4. Translokasyon**

Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozomların yer değiştirmesine translokasyon denir. İnsanda görülen Down Sendromu’nun nedenlerinden biri 21. kromozomun D grubundan bir kromozoma (özellikle 14. kromozoma ) eklenmesidir (28).

#### **4.2.2. Embriyo Biyopsisi**

PGT uygulamalarında çeşitli biyopsi teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar; kutup cisimciği biyopsisi, erken bölünme dönemindeki embriyolardan blastomer biyopsisi veya blastosist evresinde trofoektoderm hücre biyopsisidir. Bu yöntemlerin her biri avantaj ve dezavantajlarıyla irdelenmiştir. Bugün genellikle blastomer biyopsisi tercih edilmektedir (29).

IVF tedavisinde, anneden alınan yumurta hücreleri ile babadan alınan sperm hücreleri laboratuvar ortamında döllenmektedir. Döllenmeyi takiben normal gelişim gösteren embriyolar 7-8 hücreli aşamaya ulaştığında, birer hücreleri biyopsi yapılarak alınmaktadır. Biyopsi işlemi; kimyasal (Asit Tyrode solüsyonu ile,PH 2.35), mekanik ve lazer yöntemleri olmak üzere üç şekilde yapılabilmektedir. Uygulama  $Ca^{++2}$ ,  $Mg^{++2}$  içermeyen tamponlarda gerçekleştirilir.

Asit tyrode uygulamasında, solüsyon çok yavaşça verilir, zona pellusidanın incilmesi görüldüğünde hemen tyrode solüsyonu geri çekilip embriyo başka bir alana alınmalıdır. Hızlı uygulama hava kabarcıklarının oluşmasına neden olabilir ve embriyo net görülmez. Bu durum embriyo hasarına da neden olabileceğinden çok dikkatle yapılmalıdır. Mekanik uygulama veya lazer uygulamasında ise böyle bir problem yoktur (30,31,32).

Lazer ile blastomer biyopsisi günümüzde kolay uygulanabilmesi sebebiyle tercih edilen bir yöntemdir. Mikroskop altında gerçekleştirilen bu yöntemde embriyo zarına (Zona Pellucida) lazer ile birkaç atış yapılarak zarda açıklık oluşturulur ve bu açıklıktan bir blastomerin ayrılması sağlanır.

Genetik analize gönderilecek blastomerlerin takibi için, biyopsisi gerçekleştirilen her hastaya ait olmak üzere aşağıdaki biyopsi formu doldurulur (Form 2).



### 4.2.3. FISH (Floresan In Sitü Hibridizasyon) Yöntemi

İn Situ Hibridizasyon (ISH) tekniği spesifik DNA ve RNA sekanslarının doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin doğal hücresel ortamlarında incelenmesini sağlayan, doku/hücre yapısının bozulmadığı bir tekniktir (29).

FISH yöntemi ise probun haptenlerle ya da florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenmesinden oluşan, floresan veren sinyaller ile değerlendirilmenin yapıldığı bir ISH tekniğidir. Denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizileri (prob) uygun koşullarda birleştirilerek gözlemlenmektedir. FISH yönteminin avantajı kromozomlar elde edilmeden direk hücre çekirdeğine uygulanabilmesidir (31).

Özel bir DNA dizisinin varlığını veya yokluğunu incelemek için, yada bir kromozomun veya kromozom bölgesinin sayısını/organizasyonunu değerlendirmek için FISH yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntem ile klinik materyaldeki anormal bir kromozomun varlığını hızlıca teşhis etmek veya kromozomların belirli yeniden düzenlenimlerini saptamak amacıyla kromozomlar için, kromozom bölgeleri için veya genler için spesifik DNA probları kullanılabilir (32).

### 4.3. APOPTOZ

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (33, 34). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (35).

Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından gösterilmiştir. Ancak “Programlanmış Hücre Ölümü” terim olarak ilk kez 1965 yılında Richard A. Lockshine tarafından kullanılmış, Apoptozis terimi ise 1972 yılında tanımlanmıştır (36). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (37).

Apo-ptoe-sis'den köken alır ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (38). Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (38, 39). Apoptoz ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı veya fizyolojik hücre ölümü, apoptoz ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (40, 41, 42).

İmplantasyondan önce embriyoda hücre ölümü ve apoptozun işareti olabilecek morfolojik belirtiler saptanmıştır. Son yıllarda kaydedilen çeşitli değerler şöyledir; normal gelişiminde apoptoz ilk olarak blastosist evrede, baskın olarak da İç Hücre Kitlesi (ICM) hücrelerinde görülür. Fare blastosistlerinde in vivo ya da in vitro gelişimde apoptoz görülme sıklığı ICM hücrelerinde %5-10, Trofoektoderm'de (TE) ise <%1'dir. İn vitro fertilizasyon ile elde edilmiş embriyolarda ise TE hücrelerinde apoptoz sıklığı artar (%7-8). Erken bölünme aşamasında türe özgü zamanlarda apoptoz dalgası şekillenir (43).

İlk büyük apoptoz dalgası, blastosistlerde ve özellikle ICM hücrelerinde görülür. Apoptozun ICM hücreleri üzerindeki bu seçici etkisi canlı oluşum aşamasında genetik yapının korunmasını sağlamaya yöneliktir (44). Çünkü fetustaki organ oluşumu bu hücreleri köken alarak meydana gelir. Apoptoz hasarlı, fonksiyonunu yitirmiş ya da bozuk fenotipteki hücreleri de eler. Deoksiribonükleik asit zincirindeki (DNA) kırılmalar uyarım yolu ile 2 saat içerisinde ICM hücreleri apoptozuna yol açar (45, 46). Embriyoda apoptoz sıklıkla meydana gelmesine rağmen çok sınırlı kesimlerde oluşur ve ancak birkaç hücre ölürken gözlemlenebilir. Bu sebeple en verimli yöntem in situ tespittir (47).

Günümüzde kullanılan IVF tedavilerinde fertilize olmuş yumurta hücrelerinin (insan-sığır) yarısından daha az oranı blastosist aşamasına ulaşırken, elde edilen bu blastosistlerin de %50'den fazlasında düzgün bir implantasyon şekillenmez (48, 49). Bu kayıplar, embriyonun gelişimi süresince devam eder ve genellikle morula aşamasında şekillenir (50, 51).

Anöploidi ve poliploidi gibi kromozom anormalileri embriyonun gelişiminde önemli rol oynar. Ölü hücrelerin büyük çoğunluğu blastosist evrede fagositozla temizlenirken bazı hücreler buna direnir. Bu hücreler blastosol boşlukta ya da TE ile zona pellusida arasında izole edilmiş olup, büyük çoğunluğunda hücreler arası sinyaller kaybolmuş, mitokondrileri farklılaşmış ve endoplazmik retikulumları kıvrımlarını yitirmiştir. Hücrelerdeki bu durum bize erken gelişim döneminde oluştuklarını gösterir ve bunların apoptoz ile ya



blastomerlerin fagositoz yeteneğinden ya da preimplantasyon aşamasında ölen hücrelerin fagositozu mümkün kılacak yüzey moleküllerinden yoksun olduğu varsayılmaktadır (52).

Embriyonik gelişimde apoptozun doğru düzenlenmesi de çok önemlidir. Hasarlı hücrelerin elenmesindeki eksiklik, kanser gibi hastalıkların oluşmasına neden olabilirken, apoptozun aşırı artışı normal hücrelerin ölmesine, nörodejeneratif hastalıklara yol açabilmektedir. Kritik eşiğin altına gerileyen ICM sayısı, embriyonik gelişimi durdurabilir. Aynı şekilde toplam blastosist hücre sayısı da implantasyon potansiyeli ile orantılıdır (52).

#### **4.3.1. TUNEL ( Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) TESTİ**

Apoptotik hücreleri saptamaya yarayan, en duyarlı ve en hızlı yöntem olup, nükleer DNA fragmentasyonunu saptamaya dayanan biyokimsyal bir yöntemdir. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanır, apoptoza giden hücrelerin görüntülenmesini sağlar. Kromojen DAB (Di Amino Benzidine) ile görünür hale getirilir (52).

DNA kırıklarının dolayısıyla apoptozun in situ olarak tanınmasını sağlayan bu yöntemde oluşan DNA fragmentlerinin serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir ve DAB ile işaretlenmiş örneklerin tepkimeye girmesiyle DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşur. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak işlem sonlandırılır ve in situ olarak DNA kırıkları gösterilebilir (53).

## 5. MATERYAL VE YÖNTEM

### 5.1. MATERYAL

#### 5.1.1. Sarf Malzemeler

15ml. kapaklı tüp	(Falcon)
Konik tüp	(Falcon)
Petri (küçük, orta, büyük)	(Nunc)
Fourwell	(Nunc/Thermo Scientific)
Cam paster pipet	(Boga)
Holding	(Origio MPH-MED-30)
ICSI	(Origio MICC017-30-B1.5)
Biyopsi pipeti	(Origio MBB-FP-L-30)
Mikropipet ucu	(Axygen Scientific)
Serolojik pipet	(5ml,10ml,1ml) (Falcon)
Lam	(Super Frost Pozitif Şarjlı )
Absolüt Alkol	(Merck)
DAPI	(Sigma)
Distile Su	
HC1	(Merck)
İmmersiyon yağı	(Merck)
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(Carlo Erba)
NaCl	(Merck)
NaOH	( Merck )
Rubber Cement	(Marabu Fixo gum)
Tween 20	(Sigma)
Kültür ortamı	(Single Step Medium/ Irvine Scientific)
Hepes Tampon	(Modified HTF Medium/Irvine Scientific)
Hiyaluronidaz	(ICSI Cumulase/Origio)
PVP	(PVP Clinical Grade/Origio)

Biyopsi kültür sıvısı	(Quinn's Advantage, Ca <sup>++2</sup> , Mg <sup>++2</sup> Free/Sage)
Kültür Ortam Yağı	(Liquid Paraffin/Origio)

### 5.1.2. Kullanılan Kitler

Vysis PGT prob	(LSI 13,21, CEP 18,X,Y)
Apoptag Plus Peroxidase Kit,	Chemicon, S7101 millipore

### 5.1.3. Cihazlar

Aspirasyon cihazı	(Labotect)
Isıtıcı tüplük	(Teknosem)
Laminar flow	(IVF Tech)
Etüv	(Nüve)
İnkübatör	(Thermo, Hepa Class 100, Water Jacked CO <sub>2</sub> Incubator)
Mikroskop	(Olympus IX71)
Mikroskop	(ZEISS)
Lazer	(OCTAX)
Santrifüj	(Allegra X-22)
Buzdolabı	(Beko)
Pipetör	(Thermo Scientific)
Sperm Sayma Kamerası	(Makler)
Sensys kamera	(Sensys)
Elektronik terazi	(Seuter, Ainworth-AA-250, Setra-M2000L)
Floresan mikroskop	(Olympus BX-51)
Image Analyser	(Applied Imaging)
Su banyosu	(Nüve)
Mikropipet	(Eppendorf)
Mikrosantrifüj	(Eppendorf Centrifuge 5415)
Vortex	(Janke and Kunkel, UF-2)
pH Metre	(Jenco)
Pipet uçları	(Axygen)

Beher (500 ml, 1000 ml)

Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)

Yatay ve dikey şale

Kronometre

Ependorf tüpü (1,5 ml lik)

Termometre

## 5.2. YÖNTEM

Bu araştırma Taksim Alman Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmaya yaşları 22-41 arasında değişen 20 hasta katıldı. Hastalardan toplam 182 embriyo elde edildi. Çalışma grubumuz yavaş gelişim gösteren 33 embriyodan oluştu (Şema 1). Etik kurulun onayı ile İn vitro fertilizasyon tedavisi için merkezimize gelen hastalardan yavaş gelişen ve transfer edilmeyecek embriyolarında çalışılabilmesi için gönüllü olur formu doldurularak imzalı onay alındı.

İstanbul Bilim Üniversitesi Multidisipliner Araştırma Laboratuvarı'nda ise apoptoz tayini için TUNEL testi çalışması yapıldı.

### 5.2.1. Yumurta Toplanması

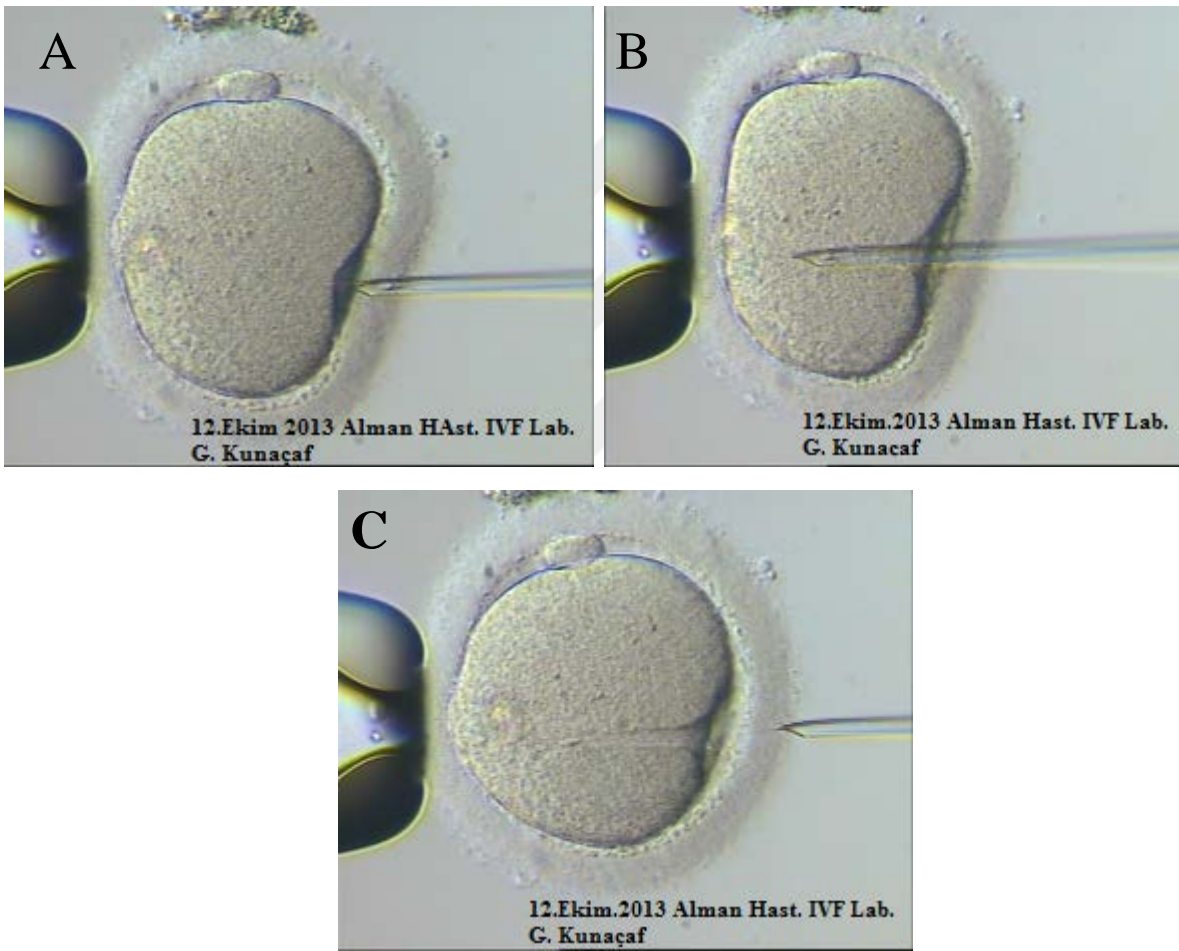
Ovulasyon indüksiyonu sonrası, yumurta toplama işlemi (Oosit Pick-up-OPU) hCG dozundan itibaren 35-36. saatte gerçekleştirildi. OPU yapılacağı günün sabahı çalışma kabininin ısıtıcı tablası çalıştırıldı. Kabinin tablasına, toplanan folikül sıvılarının biriktirileceği, yeterli sayıda petri kabı konuldu. Folikül sıvısını barındıran tüplerin konulacağı ısıtıcı blok 37°C'de çalıştırıldı. OPU esnasında, yumurtaların toplanacağı, bir gece önceden ısıtılmış hepes tampon içeren medyum (Modified HTF Medium/Irvine Scientific) küçük petrilere hazırlandı. OPU işlemi sırasında yumurtaların zarar görmemesi için laboratuvar ve çalışma kabinin ışıklandırılması düşürüldü. OPU işlemi, hemen embriyoloji laboratuvarına bağlı olan müdahale odasında yapıldı. Steril örtüler örtüldü. Anestezi ekibi tarafından hastaya anestezisi uygulandı. Steril spekulum uygulanarak vajen serum fizyolojik ile yıkandı.

6.5 MHz'lik vajinal proba (Medison Digital Sonoace 5500) steril jel uygulandıktan sonra steril prezervatif giydirildi ve metal rehber proba takılarak sabitlendi. İğne (COOK) aspiratöre (Labotect Aspirator ) bağlandı ve prob vajene yerleştirilip overin lokalizasyonu belirlendi. Aspire edilecek folikül ultrasonografi cihazının ekranındaki rehber çizgi üzerine getirilerek iğne ile delindi ve ortalama 180 mmHg negatif basınçla aspire edildi. Aspire edilen folikül sıvısı daha önceden ısıtılmış olan tüplerde alınarak hemen bitişikteki embriyoloji laboratuvarına teslim edildi. Kanama kontrolünü takiben hasta yatak istirahatine alındı. Aspire edilen folikül sıvısının içeriği, laminar hava akım kabini içerisinde alttan aydınlatmalı stereo disseksiyon mikroskobu kullanılarak incelendi ve oosit-kumulus kompleksi ayıklandı.

Tespit edilen yumurta hücreleri steril bir pastör pipeti yardımıyla hepesli tampon içeren medyum içerisinde birkaç defa yıkanarak temizlendi. Çalışılan bu medyumun üzeri yağ (Liquid Paraffin/Origio) ile kapatılmıştı. Toplanan yumurta hücreleri, bir gece önceden gazlanmış kültür ortamına (Single Step Medium/ Irvine Scientific) aktarıldı. Yumurta hücreleri %5,8CO<sub>2</sub>, %5.0O<sub>2</sub> ve 37°C'deki inkübatörde bekletildi. Yumurta hücresi çevresindeki kumulus-korona kompleksi, 2-4 saat sonra, işlem sabahı hazırlanmış hepes tamponlu, hiyalüronidaz (ICSI Cumulasae/Origio) içeren medyum kullanılarak mekanik ve enzimatik yolla uzaklaştırıldı. Böylece yumurta hücresi sadece zona pellusida kalacak şekilde çıplak hale getirildi. Yumurta hücrelerinin olgun olanları ICSI için hazırlandı. Bu arada eşinden alınan semen, Makler kamerasında sayıldıktan sonra işlemde geçirilerek yüzdürüldü. Hastalar 2-3 günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyon yaparak semen verdiler. Semen örneği alındıktan sonra 25 dakika likefiye edildi. Üzerlerine 4 ml. sperm hücresi yıkama medyumunu (Sperm Preparation Medium/Irvine Scientific) eklendi ve konik tüplere paylaştırılarak 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüm süpernatant atıldı, ancak pipetle negatif basınç uygulanırken türbülans oluşmamasına dikkat edildi. Pellete 0,5 ml medyum eklenerek yeni bir pipetle homojenize edildi ve ikinci kez santrifüj yapıldı. Pelletin üzerine 0,2 ml medyum konuldu. Sperm hücreleri 45°'lik açı ile 60 dakika bekletildi.

İşlem günü sabahı hazırlanmış olduğumuz hepes tamponlu medyumdan damlacıklar yaparak ICSI (Falcon) petrisi hazırlandı. Yumurta hücrelerinin konulacağı damlacıkların diğer yanına ise sperm hücresi havuzu yapıldı. Sperm hücrelerinin konulacağı PVP (polyvinlypyrrolidone) (PVP Clinical Grade/Origio) damlacığı da bunların kenarına

konularak hepsinin üzeri yağ ile kapatıldı. Tutucu (Holding) (Origio MPH-MED-30) ve ICSI (Origio MICC017-30-B1.5) pipetleri tutuculara takıldıktan sonra uygun pozisyon almaları sağlandı. Hazırlanan ICSI petrisi yerleştirildi. ICSI pipeti ile semen havuzundan alınan sperm hücrelerinin PVP’de kuyrukları kırılıp motilitesiz hale getirilerek tekrar pipet içerisine çekildi. Yumurta hücresinin kutup cisimciği (polar body) saat 6 veya 12 hizasına getirildi. ICSI pipeti ile saat 3 hizasından yumurta hücresinin içersine girilip biraz sitoplazma aspire edildi ve ardından sperm hücresi ile beraber bu sitoplazma bırakıldı. Böylece ICSI tamamlanmış oldu (Resim 5).



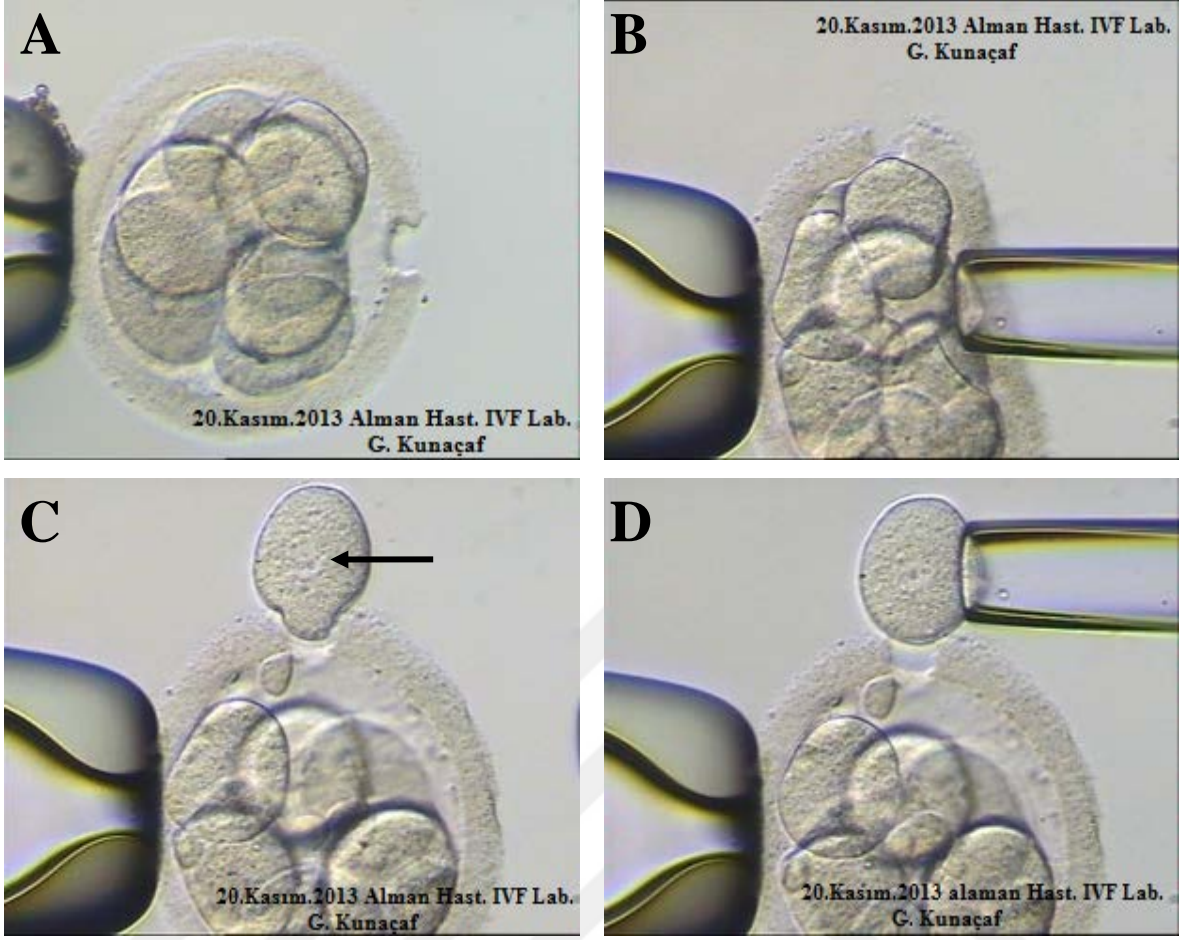
**Resim 5:** Sperm hücresinin yumurta hücreğine enjeksiyonu sırasıyla gösterilmiştir (A, B ve C)

### 5.2.2. Embriyo skorlaması

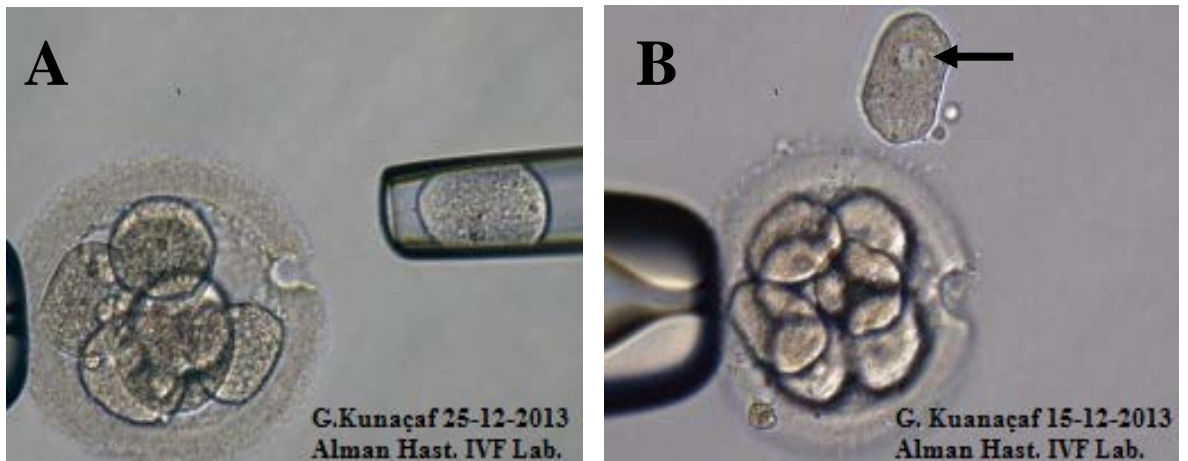
ICSI'den 16-18 saat sonra PN skorlaması yapıldı. PN'lar eşit olup olmamalarına göre 2 gruba (A ve B) ayrılarak, bir gece önceden ısıtılıp gazlanmış yeni bir kültür ortamına alındı. Aynı gün içerisinde, yani ICSI'den 25-28 saat sonra erken bölünme (Early Cleavage-EC) kontrolü yapıldı. Bölünmenin varlığı ve eşit olup olmaması durumuna göre her bir grup kendi içinde 3'e (A1, A2, A0 ve B1, B2, B0) ayrıldı. Embriyoların değerlendirilmesi Form 1 üzerinde yapıldı.

### 5.2.3. Embriyo Biyopsisi

ICSI'den sonra 64-65 saatler aralığında yani 3. günde tekrar embriyo kontrolü yapılarak embriyolar blastomer sayılarına ve fragmentasyon oranlarına göre sınıflandırıldı. Embriyolar, bir gece önceden gazlanmış ve ısıtılmış olan yeni bir kültür ortamına alındı. Embriyo seçim kriterlerine göre 3. günü yavaş gelişen ya da gelişimini durdurmuş, 5 ve altındaki blastomer sayısına sahip embriyolar çalışma grubumuza alındı. Embriyolar kalsiyum ve magnezyumdan yoksun medyum (Quinn's Advantage, Ca<sup>++2</sup>, Mg<sup>++2</sup> Free/Sage) ile ICSI petrisine embriyoların konacağı damlacıklar yapıldı, 37°C'de yarım saat inkübe edildi. Manipülatörlere embriyoyu tutmak için tutucu ve biyopsi işlemini gerçekleştirebilmek için ise biyopsi pipeti (Origio MBB-FP-L-30) takıldı. Embriyolar biyopsi yapılmak üzere petriye aktarıldı. Zona pellusidaya lazer yardımıyla birkaç atış yapılarak (OCTAX Laser Shot, OCTAX Microscience GmbH, Germany), pipetin geçebileceği kadar delik açılması sağlandı (Resim 6-A). Biyopsi işlemi iki şekilde gerçekleştirilebilir; embriyoya baskı uygulamak suretiyle blastomerin çentikten dışarı çıkması (Resim 6 B-C-D) veya pipet ile blastomer hücresinin çekilmesi (Resim 7). İşlem bitiminde embriyolar yeniden kültür ortamına alınırken, blastomerler ise FISH yöntemi ile anöploidi bakılabilmesi için lam üzerine yapıştırıldı. Embriyolar ise kültür ortamlarına alınarak 5.güne kadar gelişimleri takip edildi.



**Resim 6:** Embriyo biyopsi işleminde ilk adım embriyo zarına lazer ile atış yapmaktır (A), nükleus gözlenen blastomerin alınması için resimdeki yol izlenir (B, C, D). Hücre içindeki nükleus ok ile gösterilmiştir.



**Resim 7:** Embriyo biyopsi işleminde lazer ile atış yapıldıktan sonra nükleus gözlenen blastomerin pipet vasıtası ile çekilmesi (A-B). Hücre içindeki nükleus ok ile gösterilmiştir.



#### 5.2.4. Blastomer Fiksasyonu

Fiksasyon sırasında kullanılacak Tween 20 ve fiksatif solüsyonları için 3 farklı pipet ile işlem yapıldı. İşlem öncesinde ikisine bir miktar T-20 diğerine de fiksatif çekildi. Blastomer petriden lam üzerine taşınırken içerisinde T-20 bulunan pipet kullanıldı. Her taşımada kullanılan pipet aynıydı ve her taşıma sonrasında pipet petrideki yağdan kurtulmak için hafifçe silindi. İkinci T-20 içeren pipet ile lam üzerindeki blastomere T-20 damlatıldı. Her damladan sonra blastomer gözlendi. T-20 sitoplazmayı eritip nükleusu ortaya çıkarana kadar bu işlem uygulandı. Blastomerin sitoplazması çözülüp nükleus açığa çıktıktan sonra T-20'nin kuruması beklendi. İçinde fiksatif ihtiva eden 3. pipet kullanılarak fiksatiften bir damla nükleusun üzerine damlatılarak blastomer gözlendi. Fiksatif işlemi tamamlandıktan sonra nükleusun bulunduğu bölgenin altı çizilip numaralandırıldı.

#### 5.2.5. FISH Yöntemi

<b><u>20X SSC Solüsyonu</u></b>	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
<b><u>2X SSC Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	40 ml
Distile su	360 ml
<b><u>0,1X SSC Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0'a ayarlanır.	

**Tablo 3:** Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

<b><u>0,07 M NaOH</u></b>	
1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

**Tablo 4:** Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

<b><u>1X SSC Solüsyonu</u></b>	
20X SSC	10 ml
Distile su	190 ml
<b><u>2X SSC Solüsyonu</u></b>	
20X SSC	20 ml
Distile su	180 ml
<b><u>2X SSC/Tween-20 Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 'a ayarlanır.	

**Tablo 5:** Hibridizasyon Sonrası Solüsyonları

### 5.2.5.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu

- Preparatlar 1'er dakika olmak üzere sırasıyla %100-%70-%50-%30'luk alkol serisinden ve 0.1X SSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edildi.

- Dehidratasyon sonrası preparatlar 70°C'deki 2X SSC solüsyonunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

- İçerisinde preparatların bulunduğu 2X SSC solüsyonu içeren şale soğuk su içerisine konuldu ve solüsyon ısısının 37°C'ye gelmesi sağlandı.

- Sıcaklığı 37°C'ye düşen 2X SSC içerisindeki preparatlar oda sıcaklığında bulunan 0.07 M'lık NaOH solüsyonuna alınıp denatüre edildi.

- Denatürasyonu takiben oda sıcaklığında bulunan 0,1X SSC ve ardından +4 °C'de olan 0,1X SSC ve 2X SSC solüsyonlarında 1'er dakika bekletilerek dehidratasyon ile ön yıkama tamamlandı. Dehidratasyon, preparatların sırasıyla %30-%50-%70-%100'lük alkollerde 1'er dakika tutularak gerçekleştirildi.

### **5.2.5.2. Prob Denatürasyonu**

- Problar 5 dakika 74 °C' de bekletilerek denatüre edildi.

### **5.2.5.3. Hibridizasyon**

- Çalışmada kullanılan problemler santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlandı.

-Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (5 µl) eklendi ve üzerilerine 24mm'lik lamel kapatıldı.

- Lamel çevresi su girmemesi için rubber sement ile yalıtıldı.
- Preparatlar 37 °C' de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakıldı.

### **5.2.5.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar**

-Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlendi.

- Preparatlar, oda ısısındaki 2X SSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırıldı.

- Preparatlar 1X SSCsolüsyonu ile 74 °C 'de 2 dakika yıkandı.
- Sonrasında 2X SSC/Tween 20 solüsyonunda 2 dakika yıkandı.
- Preperatların üzerine 15 µl DAPI damlatılarak lamel ile kapatıldı.
- İnceleme aşamasına kadar -20 °C' de saklandı.

### **5.2.5.5. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi**

Preparatlar Olympus BX-51 Floresan mikroskobunda uygun filtreler kullanılarak incelendi. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi (Applied Imaging) ile sinyaller değerlendirilerek Sensys kamera aracılığıyla FISH yönteminin sinyallerini içeren nükleuslar analiz edildi ve fotoğraflandı.

### **5.2.5.6. Mikroskopik Değerlendirme**

Yavaş gelişim gösteren 3. gün embriyosundan alınan blastomer örneklerine yapılan FISH yöntemi analizinde her hücre için analiz edilecek kromozomlara ait sinyaller sayıldı. Değerlendirme sonucunda olgular, FISH normal ve FISH anormal olarak 2 gruba ayrıldı. Her probun 2 sinyal vermesi normal, 2 sinyalden fazla ya da az olması ise anormal olarak değerlendirildi (Tablo 2).

### **5.2.6. Embriyo Fiksasyonu**

FISH yöntemi sonrası normal ve anormal çıkan embriyolar lam üzerine yapıştırıldı. Embriyoda TUNEL testi bakılacağından T-20 ile hücreyi patlatmaya gerek duyulmadan, embriyonun üzerine sadece bir damla yapıştırıcı damlatılarak lam yüzeyine yapışması sağlandı.

### **5.2.7. Hücre Apoptozunun Belirlenmesi (TUNEL)**

#### **5.2.7.1. TUNEL Testi Boyama Protokolü**

Embriyolarda apoptozun DNA düzeyinde gösterilebilmesi için İn situ DNA uç işaretleme yöntemi kullanıldı. Kit (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Peroksidase kit, S7101-KIT, Chemicon) içerisindeki protokolda önerilen işlemler aşağıda belirtildiği şekilde sırasıyla uygulandı.

##### **5.2.7.1.1. Ön Yıkama**

-Örneklerimiz (100 µl.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 900 µl. PBS) hazırladığımız 1000 µl.'lik W/S Hidrojen Perksidaz ile kaplanarak 5 dakika oda ısısında muamele edildi.

-PBS ile 2x5 dakika yıkandı.

#### **5.2.7.1.2. Dengeleme Tamponu**

-Lamların etrafı dikkatlice kurulanıp, kesitlerin üzerine 75µl. 1 x Dengeleyici Tampon konulup en az 10 saniye bekletildi.

#### **5.2.7.1.3. Tdt Enzim uygulaması**

- Her lam üzerine 55µl Tdt enzimi konulacak ve plastik lameller ile kapatıldı.
- Nemli ortamda ve 37 °C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi.

#### **5.2.7.1.4. Durdurma/Yıkama**

-Plastik lameller kaldırıldı ve kesitler Durdurma/Yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dakika bekletildi ve PBS ile 3x1 dakika yıkandı.

#### **5.2.7.1.5. Anti-Digoksinin-Peroksidaz**

- Her kesit üzerine 65µl Anti-Digoksinin-Peroksidaz konuldu ve üzerilerine plastik lameller tekrar kapatılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi.
- Plastik lameller kaldırıldı kesitler PBS ile 4x2 dakika yıkandı.

#### **5.2.7.1.6. Renk Reaksiyonu**

- Kesitlerin çevresi kurulandıktan sonra her kesit üzerine 75µl. DAB substrat solüsyonu damlatıldı.
- 3-6 dakika arasında pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında tespit edildi.
- Renk reaksiyonunun oluşmasından sonra kesitler distile su ile 3x1 dakika yıkandı.
- Kesitler distile su ile 5 dakika tekrar yıkandı.

#### **5.2.7.1.7. Zıt Boya Uygulaması**

-Kesitler Metil yeşili ile 5 dakika boyandı ve distile suda boyama durduruldu.

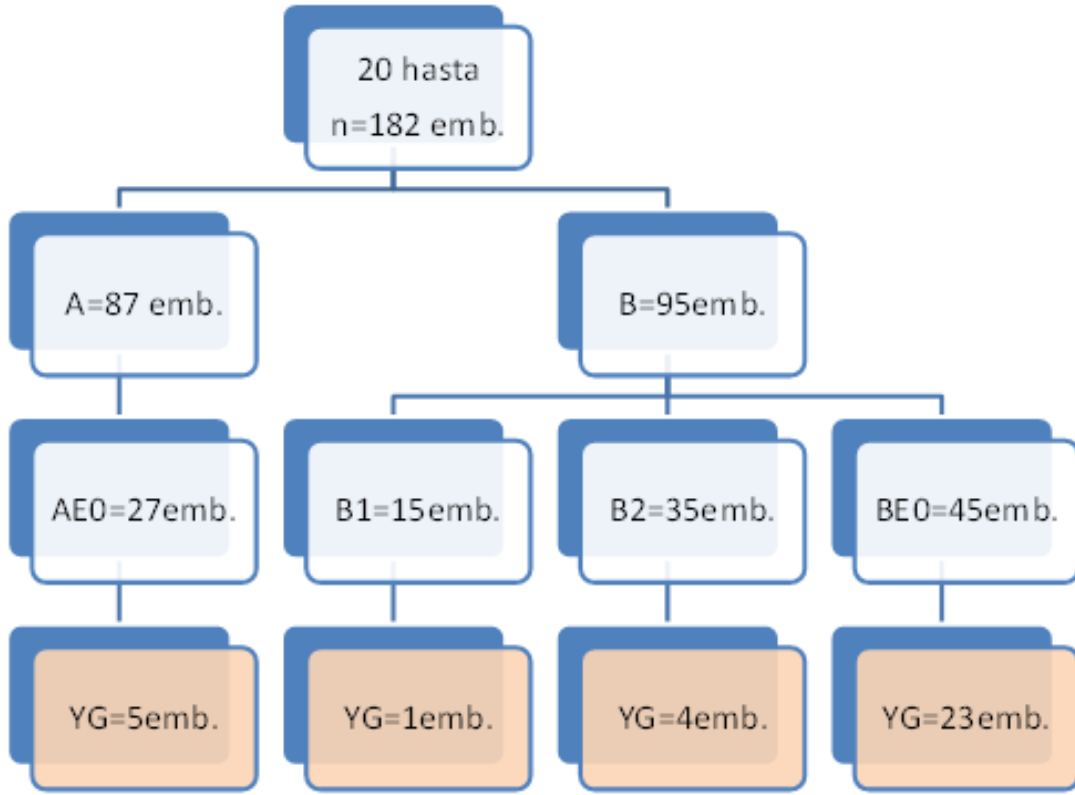
#### **5.2.7.1.8. Kapatma**

-Kesitlere kapatıcı medyum eklendi ve üzerileri lamelle kapıtıldı.

#### **5.2.7.1.9. Mikroskobik Değerlendirme**

Hazırlanan TUNEL preparatları ışık mikroskobunda analiz edildi. Örnekler DAB boyasının görünürlüğüne göre TUNEL (+) (10, 11, 12) ve TUNEL (-) (Resim8, 9) olarak değerlendirildi.

## 6. BULGULAR



**Şema 1:** Çalışma grubu akış şeması

 : Yavaş Gelişen Embriyo (YG)

Yaş aralığı 22 ile 41 arasında olan, erkek faktörü bulunmayan ve yumurta hücresi sayısı 7 ile 28 arasında değişen 20 hastadan toplam 196 yumurta hücresi elde edildi. Olgun olmayan yumurta hücreleri işlem dışı bırakıldı. OPU'nun ertesi günü yani 1. gün (16-18. saat) 182 embriyo elde edildi (Şema 1).

Bu embriyolardan 87 tanesinin PN'ları eşitken (Grup A), 95 tanesinin farklı PN boyutlarına sahip olduğu gözlemlendi (Grup B).

A ve B gruplarına aynı gün içerisinde (25-28. saat) EC kontrolü yapıldığında, PN'ları eşit olan A grubunda 22 adet eşit bölünme (A1), 38 adet farklı boyutlarda bölünme (A2) ve embriyoların 27 tanesinde ise hiç bölünme gözlenmedi (A0).

Farklı PN boyutlarına sahip B grubunda ise 15 adet eşit bölünme (B1), 35 adet farklı bölünme (B2) ve embriyoların 45 tanesinde hiç bölünme gözlenmedi (B0).

PN' ları eşit olan A grubunun EC gösteren grupları hiç duraksama olmaz iken, EC göstermeyen (A0) grubunda 5 adet embriyo yavaş gelişim (YG) gösterdi.

PN'ları eşit olmayan B grubunun EC gruplarından B1'de 1adet yavaş gelişen embriyo (YG), B2'de 4 adet yavaş gelişen embriyo (YG) ve EC göstermeyen B0'da ise 23 adet yavaş gelişen embriyo (YG) kayıt edildi.

Yavaş gelişen bu embriyoların birer blastomerleri alındı ve FISH yöntemi uygulandı.

Embriyoların gelişimleri kendi kültür ortamlarında 5. günü FISH sonucu çıkana kadar takip edildi.

FISH yöntemi sonucuna göre; yavaş gelişen AE0 grubundaki 5 embriyodan 1 tanesinin normal, 4 tanesinin anöploidi olduğu görülürken yine yavaş gelişen B1 grubundaki 1 embriyo anöploidi, B2 grubundaki 4 embriyo anöploidi, BE0' da 7 adet normal ve 16 adet anöploidili embriyo görüldü (Resim 7 FISH Normal, Resim 8, 9-FISH Anormal).

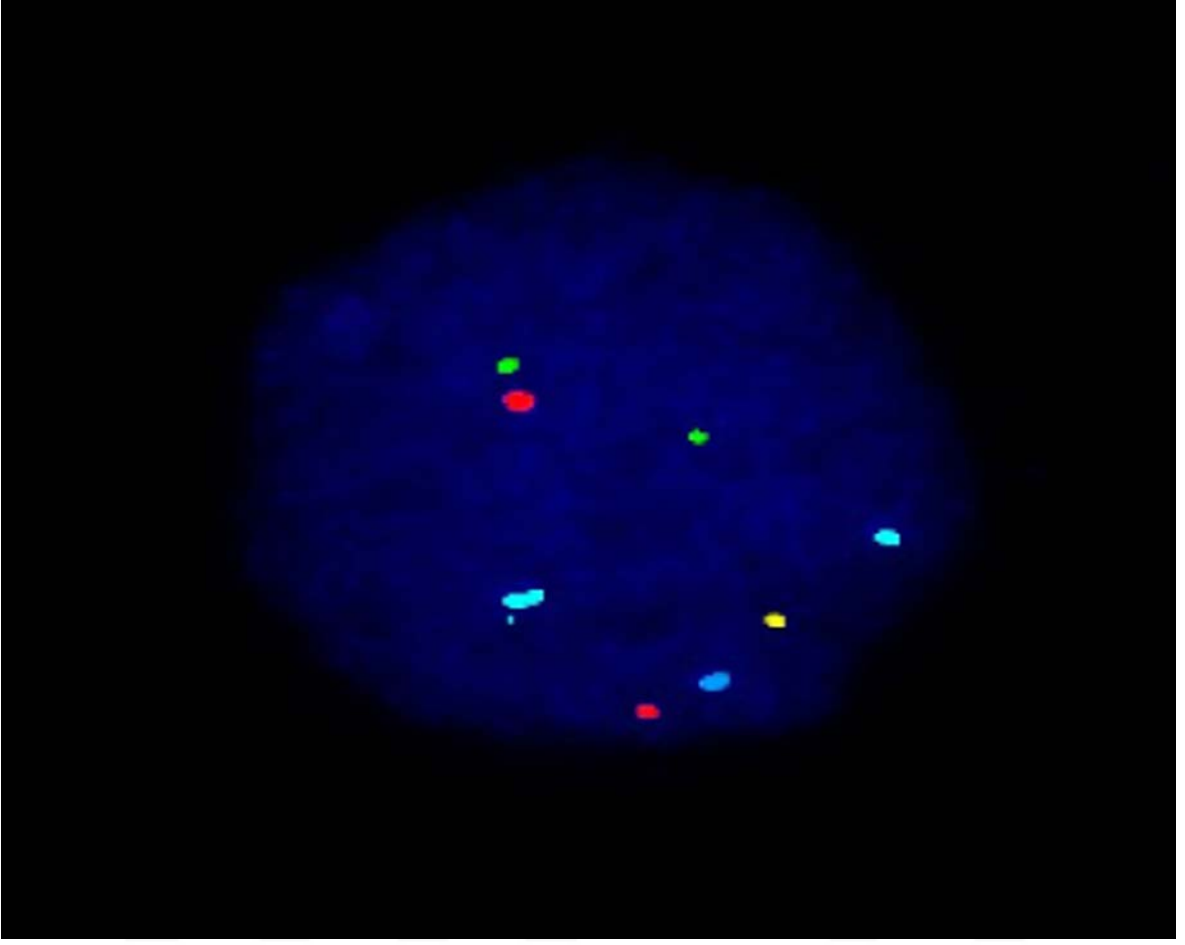
Bu sonuçlar doğrultusunda 25 adet anöploid embriyoda ve 8 adet normal embriyoda (kontrol grubu) apoptoz bakıldı.

TUNEL testi sonuçlarına göre 25 adet FISH anormal embriyonun 14 tanesi TUNEL (+) çıkarken 11 tanesi TUNEL (-) olarak değerlendirildi. 8 adet FISH normal embriyonun ise 4 tanesi TUNEL (+) iken 4 tanesi TUNEL (-) olarak analiz edildi (Resim 10, 11 TUNEL (-), Resim 12, 13, 14 TUNEL (+))

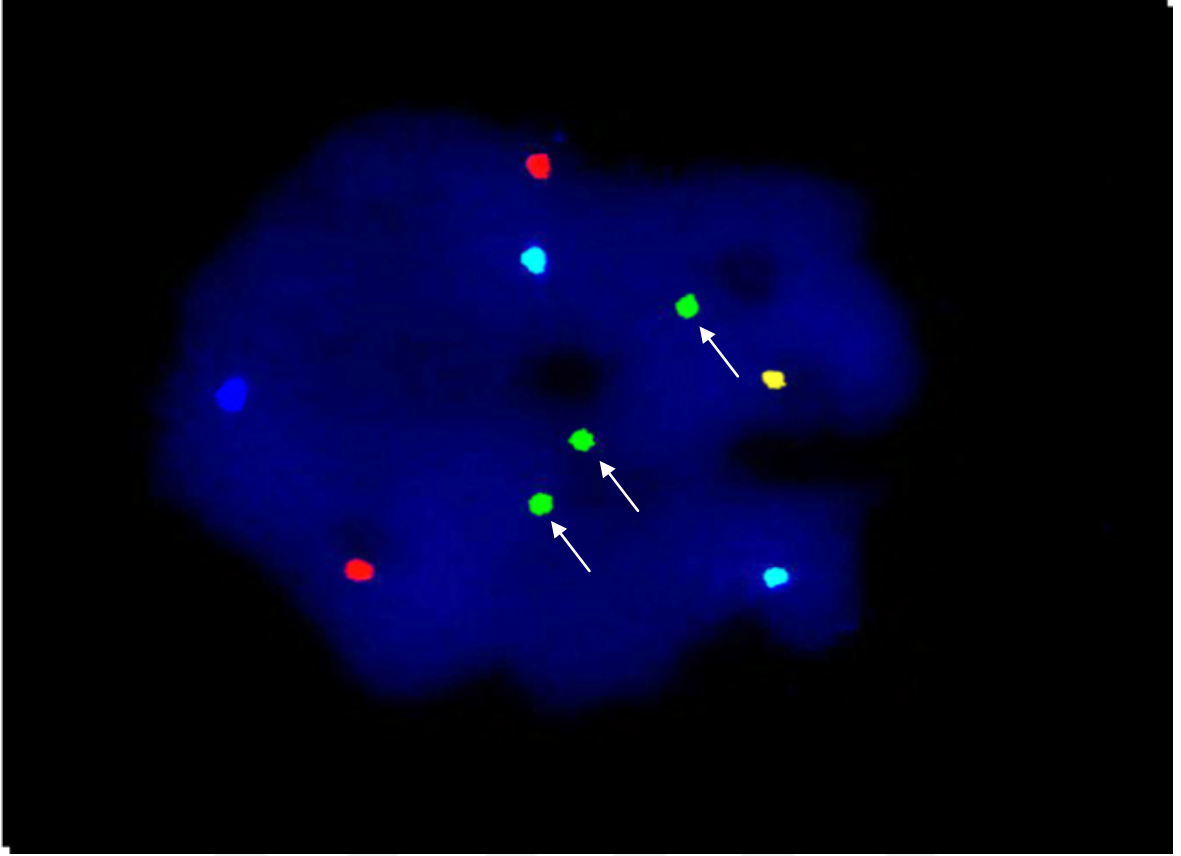


	Hasta Grupları	FISH Anormal	FISH Normal	TUNEL (+)	TUNEL (-)
1	AEO		+	+	
2	AEO	+		+	
3	AEO	+		+	
4	AEO	+		+	
5	AEO	+			+
6	B1	+			+
7	B2	+		+	
8	B2	+		+	
9	B2	+			+
10	B2	+			+
11	BEO		+	+	
12	BEO		+	+	
13	BEO		+	+	
14	BEO		+		+
15	BEO		+		+
16	BEO		+		+
17	BEO		+		+
18	BEO	+		+	
19	BEO	+		+	
20	BEO	+		+	
21	BEO	+		+	
22	BEO	+		+	
23	BEO	+		+	
24	BEO	+		+	
25	BEO	+		+	
26	BEO	+		+	
27	BEO	+			+
28	BEO	+			+
29	BEO	+			+
30	BEO	+			+
31	BEO	+			+
32	BEO	+			+
33	BEO	+			+

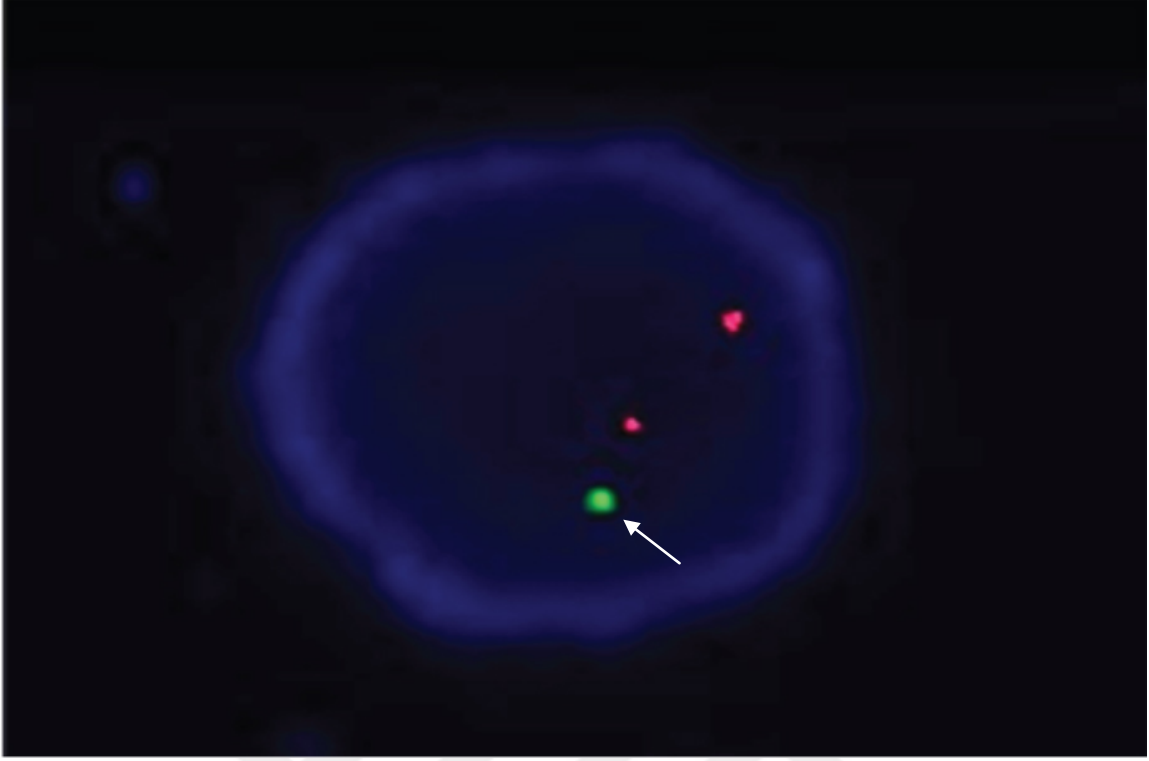
**Tablo 6:** Hasta gruplarında FISH yöntemi ve Apoptoz Sonuçlarının Dağılımı. **AEO:** PN'ları Eşit, Erken Bölünme Göstermeyen, Yavaş Gelişen Embriyolar, **B1** : PN'ları Farklı, Erken Bölünmeleri Eşit, Yavaş Gelişen Embriyolar **B2:** PN'ları Farklı, Erken Bölünmeleri Farklı, Yavaş Gelişen Embriyolar **BEO:** PN'ları Farklı, Erken Bölünme Göstermeyen, Yavaş Gelişen Embriyolar.



**Resim 7:** Yavaş gelişen embriyodan elde edilen blastomere uygulanan 13, 18, 21, X ve Y problemlerinin FISH analizindeki normal (2'li-Dizomik) görünümü.



**Resim 8:** Yavaş gelişen embriyodan elde edilen blastomere uygulanan 13, 18, 21, X ve Y problemlerinin FISH analizindeki anormal (3'lü-Trizomik) görünümü.



**Resim 9:** Yavaş gelişen embriyodan elde edilen blastomere uygulanan 13, 18, 21, X ve Y problemlerinin FISH analizindeki anormal (Tek-Monozomik) görünümü.



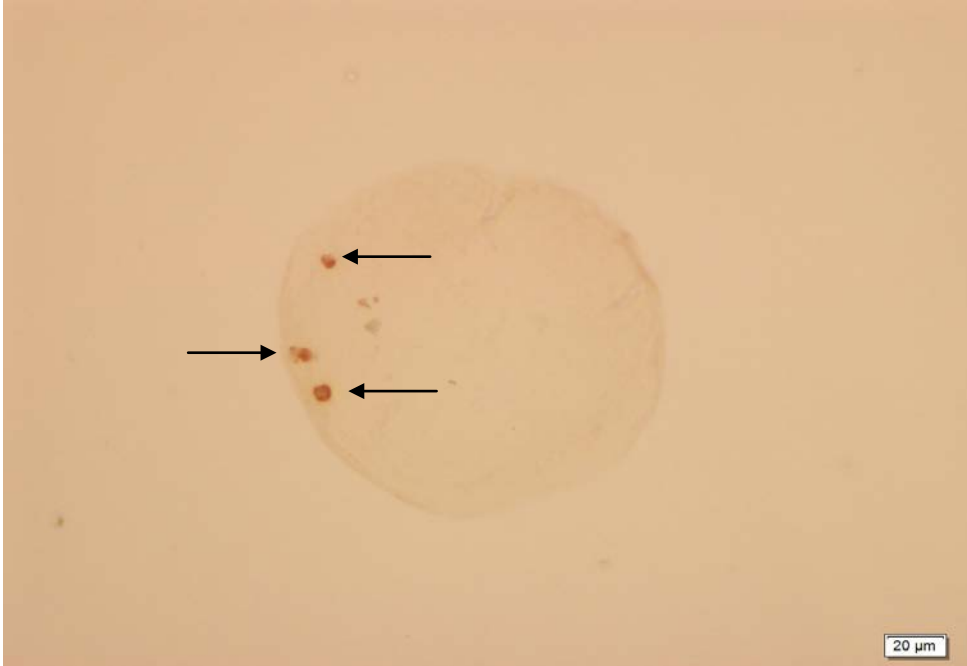
**Resim 10:** Apoptoz tespiti için TUNEL testi yapılan embriyoda boyanma gözlenmemiştir TUNEL (-).



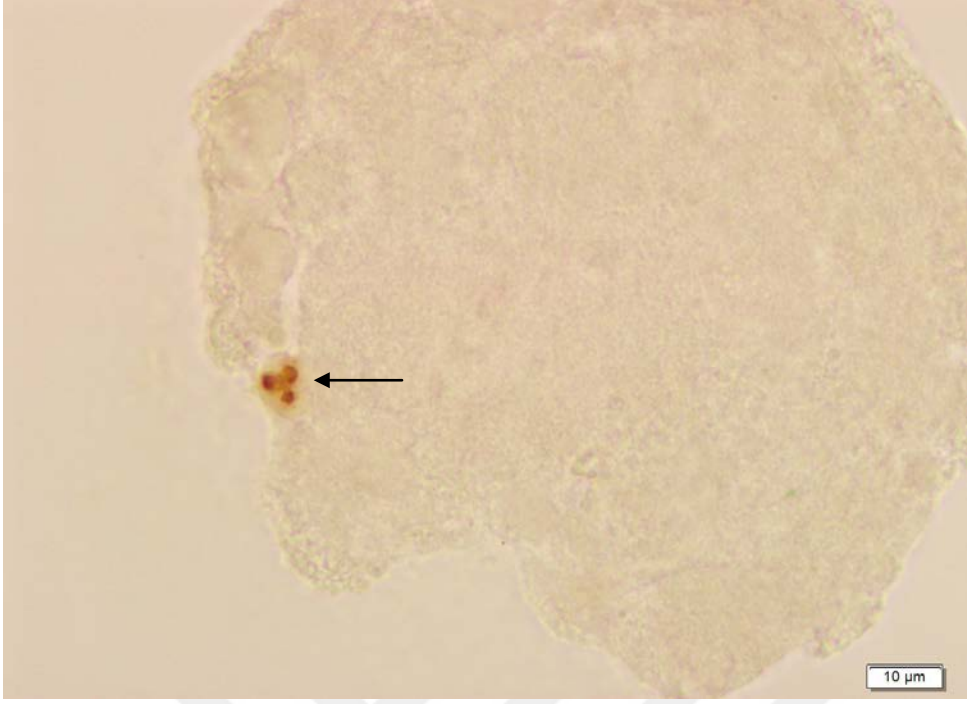
**Resim 11:** Apoptoz tespiti için TUNEL testi yapılan embriyoda boyanma gözlenmemiştir TUNEL (-).



**Resim 12:** Apoptoz tespiti için TUNEL testi yapılan embriyoda boyanma ok ile işaretlenmiştir TUNEL (+).



**Resim 13:** Apoptoz tespiti için TUNEL testi yapılan embriyoda boyanma ok ile işaretlenmiştir TUNEL(+).



**Resim 14:** Apoptoz tespiti için TUNEL testi yapılan embriyoda boyanma ok ile işaretlenmiştir TUNEL (+).

## 7. TARTIŞMA

IVF merkezleri, tüp bebek tedavilerinde anne adayına verilecek en iyi embriyonun seçimi için çeşitli yöntemler uygulamaktadır. Burada amaç gebelik şansı yüksek en sağlıklı embriyonun seçilerek anne adayının çoklu ve anormal gebeliklerden korunmasıdır (9).

Seçim yapılabilecek embriyo grubu ne kadar fazla olursa seçilebilecek embriyolarında aynı oranda daha fazla olacağı bilinmektedir. Bu amaçla tüp bebek merkezleri elde ettikleri embriyolarda canlılık oranlarının artırılması amacıyla kültür ortamlarından inkübasyon koşullarına kadar her şeyi ayarlayan düzenlemeler yapmaktadır (9).

Yapılan daha önceki çalışmalarda embriyolarda PN ve erken bölünmenin izlenmesi embriyonun gelişiminde, implantasyon başarısı üzerinde ve gebelikte çok önemli olduğu ifade edilmiştir (16, 17, 8).

Ülkemizde de 2010 yılında “Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Hakkında Yönetmelik” ile uygulanan zorunlu tek embriyo transferi ile merkezler laboratuvar ortamında, gebelik şansı en yüksek olan embriyoyu seçebilmek adına, yumurta toplamadan transfer gününe kadar çeşitli parametreleri incelemektedirler.

Scott L ile Ziebe S. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda PN skorlaması, erken bölünme ve bölünme hızının embriyonun morfolojik açıdan iyi kalitede olmasıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (18, 21). Biz de çalışmamızda 182 embriyoyu erken seçim kriterlerine göre ayırdığımızda 149 embriyonun morfolojik olarak iyi kalitede geliştiğini gözlemledik.

Embriyonun iyi morfolojide gelişmesi kadar genetik olarak da sağlıklı olması çok önemlidir. Ancak embriyonun kaliteli olması onun sağlıklı olduğu anlamına gelmez.

IVF de başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisi embriyolardaki anöploididir (55). Bu nedenle diğer erken seçim kriterlerine göre daha maliyetli olan PGT yöntemi, embriyo seçim kriterlerinden biri haline gelmiştir.

Munne S ve Cohen J nin yaptıkları 5-12 kromozomda bakılan FISH yöntemi çalışmalarında embriyoların yaklaşık yarısının anöploid olduğunu gösterilmişlerdir (54, 56). Yine Munné S, Cohen J, Delhanty JD. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda embriyoların %23-80 oranında anöploidi içerdiğini göstermektedir (65- 68).



Bizim çalışmamızda da rutin IVF tedavisi içinde bulunan ancak çalışma grubumuza dahil etmediğimiz, iyi kalitede gelişen 149 embriyoya FISH yöntemi uygulandığımızda 63 tanesinin (%42) anöpoidi içerdiğini gördük.

PGT ve FISH yöntemi sonrasında analizleri normal çıkan embriyoların transferi yapılmış olsa dahi implantasyon oranlarının artmadığı gösteren çalışmalarda vardır. Bunun nedeni sınırlı sayıda proba FISH yöntemi bakılması ya da embriyonun mozaik olması olabilir (54, 55, 69, 70).

Bizim çalışma grubumuz etik kurul kurallarına uygun olarak elde edilen 182 embriyodan seçilen ve hastaya transferi yapılmayacak olan yavaş gelişim gösteren embriyolardan oluşturuldu (n=33). Bu sebeple seçilen embriyoların implantasyon oranları gözlenemedi. Ancak bu embriyolarda FISH yöntemi baktığımızda yavaş gelişmesine rağmen 8 tane (%24) embriyonun normal çıktığını gördük. Bunun nedeni embriyolardan bir blastomer alınıp onun analizine göre sonuç verildiği için embriyonun geri kalan hücreleri mozaik olabilir ya da Baart EB. ile Hardarson T. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda olduğu gibi sınırlı sayıda probda analiz yapılmış olduğu olabilir (59, 71).

Van der J. ve arkadaşları PGT yapılması planlanan bir siklusta en az 6 embriyonun olmasını önermektedirler (58). Bizim incelediğimiz grupta en az 10 embriyo sayısına sahipti.

PGT ve prenatal tanıda anöploidi taraması için ileri anne yaşı genel olarak 35-39 yaş arası sınır değer olarak kabul edilmekte ve bu yaş üstünde IVF uygulaması yaptıranlara PGT işlemi önerilmektedir (55, 56). İleri anne yaşının mayotik ayrılmama “non-disjunction” ile olan ilişkisi iyi bilinmektedir (57-61). Bu nedenle ileri anne yaşı endikasyonlarında embriyonun kromozomal açıdan herhangi bir anomaliye sahip olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla PGT yöntemlerinin uygulanması önem kazanmaktadır. Ülkemizde genel olarak ileri anne yaşı 35 sonrası olarak kabul edilmektedir. Çalıştığımız grupta annelerin yaşları 22 ile 41 arasında idi ve bu grubun yaş ortalaması  $30.80 \pm 6.24$  olması nedeniyle grup genç adaylarından oluşmaktaydı.

Benkhalifa M. ve arkadaşları yavaş gelişen embriyolar için en önemli nedenin kromozom bozukluğu olduğunu belirtmişlerdir (62). Yaptığımız çalışmada FISH yöntemi sonuçlarına göre yavaş gelişim gösteren 33 embriyonun 25 tanesi (% 75) anormal çıkmıştır.

Gelişimin duraksamasındaki bir diğer neden ise apoptoz ile açıklanabilir. Normal süreçte apoptoz ilk olarak blastosist evrede, baskın olarak da ICM hücrelerinde görülür. Apoptozun ICM hücreleri üzerindeki bu seçici etkisi canlı oluşum aşamasında genetik yapının korunmasını sağlamaya yöneliktir (43). Çünkü fetustaki organ oluşumu bu hücreleri köken olarak meydana gelir. Embriyoda apoptoz sıklıkla meydana gelmesine rağmen çok sınırlı kesimlerde oluşur ve ancak birkaç hücre ölürken gözlemlenebilir (43). Embriyodaki apoptozun işlevi bu kadar önemli iken blastomerlerdeki kontrolsüz apoptozun embriyolarda yavaş gelişime ya da gelişimde duraksamaya yol açabileceği konusunda düşünebilir. Bizim çalışmamızda da yavaş gelişen 33 embriyoda % 54 oranında TUNEL (+) embriyo gözlenmiştir.

PGT, normal embriyoyu seçebilmek adına çok etkili bir yöntemdir ancak hasta açısından oldukça maliyetli olduğundan erken seçim kriterleriyle ilişkisi incelenmiştir (29). Baart BE ve arkadaşları yaptıkları çalışmada embriyo gelişim süreci ile embriyonun anomalitesi arasında bir ilişki bulunmadığını göstermişlerdir. Yumurta hücresi toplandığı günden biyopsi gününe yani 3. güne kadar embriyoların gelişimi takip edildiğinde, embriyo her ne kadar 1. günden itibaren yüksek kalitede gelişim gösterse de biyopsi sonuçları anormal çıkmış ya da yavaş gelişim gösteren, gelişimi duraksayan embriyolar normal çıkmıştır. Bu çalışmada 4. gün embriyosuna yapılan biyopsilerle, aynı embriyoların 5. ve 8. günlerinde yapılan biyopsilerinde, 8. güne gidildikçe embriyonun normal çıkma şansı artmıştır. Ancak embriyo 4. gün 1. kalitede olsa dahi biyopsi sonrası 5. gün duraksayan embriyolarda anormal çıkma yüzdesi oldukça fazladır (71). Bizim çalışma grubumuz yavaş gelişen ve aynı zamanda biyopsi yapılan embriyolardan oluştuğu için 3. günden 5. güne iyi bir embriyo gelişimi izlenememiştir.

Tüm bunlara öneri olarak; erken seçim kriterlerinden ziyade, maddi olanaklar yüzünden PGT yapılamayacaksa 5. gün transferine gidilebilir.

Kromozomal açıdan anormal hücrelerin varlığı blastosist gelişimini engellemese de 4.günden 5.güne geçişlerde gelişimi duraksayan embriyolar olabilir. Evsikov, Verlinsky ve arkadaşları bu durumu, eğer morula aşamasında anöploid hücre sayısı belli bir kritik değere ulaşırsa bütün embriyo kendi kendine elenerek duraksadığı şeklinde açıklamışlardır. Ancak kritik değerın altında anöploid hücreye sahip embriyoların ileri aşamalara ve blastosiste gidebileceklerini belirten araştırmacılar, 4. günden 5. güne geçişlerdeki duraksayan embriyoların dışlanabileceği yönünde görüş belirtmişlerdir (68).

Voullaire L. Vanneste E. ve Wells D., Delhanty JD. yaptıkları çalışmalarda tüm kromozomların taranmasına imkan tanıyan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (comparative genomic hybridization, CGH) yöntemini kullanarak, yarıklanma dönemi embriolarında yüksek oranda yapısal anomalilerin varlığını göstermişlerdir (63, 64, 65, 67). Erken seçim kriterlerinin yerine kullanılacak bir diğer seçenek olarak önerilen CGH yöntemi ile tüm kromozomların analizinin sağlanması mümkün olabilir.



## 8. SONUÇ

Çalışmamızda, 20 hastadan elde edilen 182 embriyo erken seçim kriterleri açısından değerlendirildiğinde 149 embriyo kaliteli embriyo olarak kabul edilmiştir. Bu embriyolara yapılan PGT sonuçlarına göre %42 oranında anöploid embriyo tespit edilmiştir. Çalışma grubumuza dahil edilen yavaş gelişen embriyo sayısı ise 33 olarak belirlenmiştir (Şema 1).

TUNEL testi kullanılarak 33 embriyo üzerinde yaptığımız apoptoz analizinde 18 embriyoda (%54) apoptoz tespit edilmiştir. FISH yöntemi ve TUNEL testleri açısından kıyasladığımızda yöntemler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. FISH yöntemi sonucu anormal çıkan 25 örnekte TUNEL testi sonuçları 14 embriyoda (+) iken 11 embriyoda (-) olarak tespit edilmiştir (Tablo 6). Buna karşılık FISH yöntemi sonucu normal çıkan 8 embriyonun 4'ünde TUNEL (+) iken diğer 4'ünde TUNEL (-) bulunmuştur (Tablo 6).

Bu sonuçlara göre yavaş gelişen ve anöploidi gösteren embriyolardaki apoptozun, yavaş gelişen ancak anöploidik olmayan embriyolardaki apoptoza göre trend olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Ancak gruplara ait değerlerin sayısal azlığı sebebiyle istatistiksel değerlendirmeler anlamlılık düzeyine ulaşamamıştır. Bu sebeple ileriki çalışmalarda, yavaş gelişen embriyoların sayısının artırılması planlanmaktadır. Bunun yanısıra aynı embriyoya gelişimin farklı günlerinde yapılacak ardışık biyopsiler ile genetik tanının doğruluğu kesinleştirilebilir.

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi sunarken, eğitimimde önemli yeri olan ve tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, sonsuz desteği olan, tez danışmanım Yard. Doç. Dr. Şule Beyhan Özdaş'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yetişmemde emeği olan başta saygı ile andığım Prof. Dr. Tuncay Altuğ'a, Prof. Dr. Volkan Baltacı'ya, Doç. Dr. Veysel Sabri Hançer'e, Doç. Dr. Yalçın Seyhun'a,

Eğitim ve iş hayatım boyunca bana tuttuğu ışık ile ilerlediğim bu yolda deneyimlerini, bilgi birikimini esirgemeyen Prof. Dr. Tülay İrez'e,

Birlikte çalıştığımız ilk günden itibaren yüksek lisans eğitimimde beni destekleyen Dr. Aytuğ Kolankaya'ya,

Tezimin oluşturulması sırasında emeği geçen embriyolog arkadaşlarım Semra Sertyel'e, Abdullah Yiğit'e, Hayriye Karakaya'ya, Ferhat Cengiz'e,

Genetik bilgi ve tecrübesini seve seve paylaşan, tezim boyunca dostluğuyla her anımda yanımda olan Pınar Uludağ'a,

Tezimde gönüllü olan hastalarımıza,

Yüksek lisans eğitimi gördüğüm süre içerisinde desteklerini hiç esirgemeyen sevgili İpek Yaşa'ya, Reyhan Yaşar'a, Merve Tecer'e,

Ağabeyim Cem Kunaçaf'a, kardeşim Ezgi Kunaçaf'a, anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

## 10. KAYNAKLAR

1. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril*. 1991, 56:192.
2. Soules MR. Prevention of infertility. *Fertil Steril*. 1988, 49:582-584.
3. Tietze C. Reproductive span and role of reproduction among Hutterite women. *Fertil Steril*. 1957, 8:89-97.
4. Speroff L, Fritz MA. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. Ed: A. Erk, S. Günalp. Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, 2007.
5. Burrows PJ, Schrepferman CG, Lipshultz LI. Comprehensive office evaluation in the new millennium. *Urol Clin Worth Am*. 2002, 29:873-894.
6. Comhoire F, Vermeulen L . Human semen analysis. *Hum Reprod Update*. 1995, 4:343-362.
7. World Health Organization Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva, WHO Press, 2010.
8. Ng EH, Chui DK, Tang OS, Lau EY, Yeung WS, Chung HP. In vitro fertilization and embryo transfer during natural cycles. *J Reprod Med*. 2001, 46:95.
9. Claman P, Domingo M, Garner P, Leader A, Spence JEH. Natural cycle in vitro fertilization-embryo transfer at the University of Ottawa: an inefficient therapy for tubal infertility. *Fertil Steril*. 1993, 60:298.
10. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Human Reprod Update*. 2003, 9:251-262.
11. Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Human Reprod*. 1999, 14:2588-2595.
12. Senn A, Urner F, Chanson A, Primi MP, Wirthner D, Germond M. Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Human Reprod*. 2006, 21 234-239.

13. Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *RBMonline*. 2003, 6:201-214.
14. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reprod*. 1999, 14:1318-1323.
15. James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Human Reprod*. 2006, 21:1599-1604.
16. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Human Reprod*. 2001, 16:313-318.
17. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmänn J, Roulier R. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod*. 1995, 10:2427-2431.
18. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1997, 12:1545-1549.
19. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*. 2001, 16:313-318.
20. Paternot G, Spiessens M, Verstreken D, Van Bauwel J, Debrock S, D'Hooghe T. Is there a link between blastomere contact surfaces of day 3 embryos and live birth rate? *Reprod Biol Endocrinol*. 2012, 10:78.
21. Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Zygote*. 2011, 19:339-344.
22. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reprod*. 1999, 14:1318-1323.
23. Fragouli E, Wells D. Aneuploidy screening for embryo selection. *Semin Reprod Med*. 2012, 30:289-301.

24. Traeger-Synodinos J. An evaluation of PGD in clinical genetic services through 3 years application for prevention of  $\beta$ -thalassaemia major and sickle cell thalassaemia. *Molecular Human Reproduction*. 2003, 9:301-307.
25. Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod*. 1998, 13:3169-3176.
26. Demirsoy A. Yaşamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji. Ankara, Meteksan Yayınları, 1992.
27. Şahin Y. Genel Biyoloji II. Eskişehir, Bilim Teknik Yayınevi, 1995.
28. Temizkan G. Genetik II. Moleküler Genetik. İstanbul, İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, 1999.
29. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod*. 2007, 22:241-249.
30. Pagidas K, Ying Y, Keefe D. Predictive value of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated IVF-ET cycles among women with recurrent implantation failure. *J Assist Reprod Genet*. 2008, 25:103-106.
31. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*. 2001, 16:313-318.
32. Robert LN, Roderick RM. Tıbbi Genetik. Ankara, Güneş Kitabevi, 2005.
33. Hardy K. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction*. 1999, 4:125-134.
34. Ameisen J S. The origin of programmed cell death. *Science*. 1996, 272: 1278.
35. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995, 267:1456-1462.
36. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin*. 1998, 18: 482-491.
37. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972, 26: 239-245.
38. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH*. 1991, 3:75.



39. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology*. 1995, 6:3-16.
40. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997, 21:88-101.
41. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*. 1995, 146:3-15.
42. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 1993, 14:133-144.
43. Brison RD. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. *Hum Fert*. 2000, 3:36-47.
44. Brison RD, Metcalfe DA, Bloor JD, Hunter RH, Brady G, Kimber JS. Analysis of apoptosis in the preimplantation embryo. In: *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo*. New York, Oxford University Press, 2004.
45. Erhardt P, Toth A. Apoptosis methods and protocols. Watertown, MA, USA, Humana Press, 2009.
46. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocysts. *Mol Hum Reprod*. 1997, 3:919-925.
47. Kolle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone inhibits apoptosis in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod*. 2002, 61:180-186.
48. Antunes G, Chaveiro A, Santos P, Marquez A, Jin HS, Silva MF. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod Domest Anim*. 2010, 45:26-32.
49. Brad MA, Hendricks MEK, Hansen JP. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. *Reproduction*. 2007, 134:789-797.
50. Knijnen MH, Gyorret OJ, Vos MAL, Hendriksen MJP, Weijden CB, Hyttel MP, Dieleman JS. Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number and blastocyst formation in bovine embryos. *Biol Reprod*. 2003, 69:1371-1378.
51. Matwee C, Betts HD, King AW. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*. 2000, 8:57-68.
52. Renvoize C, Biola A, Pallardy M, Breard J. Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol*. 1998, 14:111-20.
53. Li X, Darzynkiewicz Z. Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif*. 1995, 28:571-9.

- 54.** Cools P, Goodell N, Zheng N, Munne S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy by testing 12 chromosomes. *Reprod Biomed Online*. 2009, 19:532-538.
- 55.** Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCheney A, Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosis with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril*. 2005, 84:1395-1400.
- 56.** Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online*. 2002, 4:223-232.
- 57.** Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. *Fertil Steril*. 2005, 84: 319-324.
- 58.** Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod*. 2008, 23:2818-2815.
- 59.** Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilson L, Stevic JR, Reisman E, Borg K, Wikland M, Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2008, 23:2806-2812.
- 60.** Masternbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007, 357:9-17.
- 61.** Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 2006, 21:223-233.
- 62.** Benkhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh MB. Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet*. 1996, 13(2):140-148.

- 63.** Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009, 15:577–583.
- 64.** Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000, 106:210–217.
- 65.** 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, 6:1055–1062.
- 66.** Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000, 1:17-26.
- 67.** Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GH, Pieters MH, et al. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Hum Mol Genet* 1993, 2:1183-5.
- 68.** Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993, 8:2185-91.
- 69.** Pellestor F, Girardet A, Andréo B, Arnal F, Humeau C. Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 1994, 39:141-6.
- 70.** Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998, 13:3151–3155.
- 71.** Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van Opstal D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ, de Vreeden-Elbertse J, Fauser BC, Baart EB. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. *Human Reproduction*. 2010, 8:1916–1926.