T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRE-EMBRİYOLARDAN ELDE EDİLEN BLASTOMER HÜCRELERİNDE ANÖPLOİDİK PATOLOJİLERİN SAPTANMASI

Tezi Hazırlayan
Betül ÖZDEMİR

Tezi Yöneten
Prof.Dr.Munis DÜNDAR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2009
KAYSERİ

T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRE-EMBRİYOLARDAN ELDE EDİLEN BLASTOMER HÜCRELERİNDE ANÖPLOİDİK PATOLOJİLERİN SAPTANMASI

Tezi Hazırlayan
Betül ÖZDEMİR

Tezi Yöneten
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSY-08-502 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ocak 2009
KAYSERİ

Prof.Dr.Munis DÜNDAR Danışmanlığında **Betül ÖZDEMİR** tarafından hazırlanan "**Pre-Embriyolardan Elde Edilen Blastomer Hücrelerinde Anöploidik Patolojilerin Saptanması**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

30/01/2009

JÜRİ : **İmza**

Başkan : Prof. Dr. Munis DÜNDAR (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Üye : Prof. Dr. Ercan AYGEN

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../…....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde bilgi, deneyim ve yardımlarıyla beni yönlendiren, sabır ve desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi tez yöneticim sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR' a,

Yakın ilgi, yardım ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı Öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ercan AYGEN ve Prof. Dr. Yılmaz ŞAHİN'e , Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Birkan YAKAN'a,

Uyumlu bir çalışma ortamı sağlayıp, manevi desteklerini her zaman hissettiğim Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL ve sayın Yrd. Doç. Dr. Çetin SAATÇİ' ye,

Çalışmamın her aşamasında manevi desteklerini ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen Tıbbı Genetik Anabilim Dalı çalışanları Hilal Akalın, Müge Gülcihan Önal, Serpil Taheri ve Tüp Bebek Ünitesi çalışma arkadaşlarıma,

Sevgi ve destekleriyle hayatımın her aşamasında her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

PRE-EMBRİYOLARDAN ELDE EDİLEN BLASTOMER HÜCRELERİNDE ANÖPLOİDİK PATOLOJİLERİN SAPTANMASI

ÖZET

IVF' de en önemli işlem transfer için en iyi kalitedeki embriyoların seçimidir. Geleneksel olarak tüp bebek merkezlerinde, çeşitli klivaj safhasında ki embriyolar morfolojik özelliklerine göre değerlendirilerek seçilmektedir. Fakat embriyo morfolojisinin, implantasyon potansiyeli veya normal kromozomal yapı hakkında bilgi verip vermediği kesin değildir.

Bu çalışmamızda; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakultesi Tüp Bebek Ünitesinde infertilite tanısı alarak tüp bebek uygulamasına alınan ve üçüncü günde embriyo transferi sonrasında arta kalan transfer edilebilir kalitede bir embriyosu bulunan ve embriyosunun dondurulmasını kabul etmeyen yaşları 22-26 arasında 20 hastadan elde edilen 20 embriyodan alınan bir blastomer hücresinde FISH yöntemi ile 13, 18, 21, X ve Y kromozomları için anöploidik patalojilerin var olup olmadığına bakıldı. Çalışmamızda embriyolarda %25 oranında kromozomal anomali bulunmuştur. Anöploidi oranı %15, poliploidi %5 , haploidi oranı %5 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda seçilen 20 hastanın 7 sinde tekrarlayan IVF başarısızlığı mevcuttur. Bu hastaların embriyolarından alınan blastomerlerin kromozom 13, 18, 21, X ve Y bakımından incelenmesi sonucu yapılan çalışmalardan çok farklı olarak herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır.

IVF kliniklerinin çoğu 3. gün embriyo transferini seçmektedirler. Her laboratuarın 3. gün embriyo skorlama sistemi farklı olabilmektedir. Yapılan çalışamalarda morfolojik olarak iyi kalitedeki embriyoların yüksek anöploidi riskine sahip olduğu gösterilmektedir ve tek başına morfolojik değerlendirmenin transfer öncesinde yeterli olmadığı öngörülmektedir.

Sonuç olarak, transfer öncesi pre-implantasyon genetik tanının erken gebelik kayıplarını azaltacağı ve devam eden gebelik oranlarını arttıracağı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: IVF, embriyo morfolojisi, anöploidik patolojiler.

ANEUPLOIDY DETECTION IN BLASTOMERES OF PREEMBRYOS

ABSTRACT

The most significant procedure in IVF is the selection of the embryos of the best quality for transfer. Traditionally at IVF centers, embryos at various cleavage phases are selected according to their assesment of the morphological characteristics. But it is not certain whether the embryo morphology informs or not about the implantation potential or normal chromosomal structure.

İn our study; it was examined if there existed aneuploidic pathologies for the Chromosomes 13, 18, 21, X and Y through the FISH method in a blastomer cell which is taken from 20 embryos obtained from 20 patients whose ages are between 22-26, being received for IVF application at Erciyes University Medical School IVF Unity and having a transferable embryo in quality remaining over on Day 3 after the embryo transfer and not accepting their embryos to be frozen. In our study, chromosomal abnormality in embyros was found to be 25%. The rate of aneuploidy is 15%, the rate of polyploid 5%, and the rate of haploid 5%.

It has been observed a repetitive IVF failure in seven (age average:27,4) of twenty patients chosen in our study. Any anomaly hasn't been encountered unlike the studies done in consequence of the analyses in terms of the Chromosomes 13, 18, 21, X and Y of the blastomers taken from these patients' embryos.

Most of the IVF clinics select an embryo transfer on Day 3. The Day 3 embryo scoring system can be different. In the studies conducted, it is being shown that embryos morphologically of the good quality possess high aneuploidy risk, and it is anticipated that the morphological analysis by itself is not sufficient before transfer.

Consequently, we thing that the pre-implantation genetic diagnosis before the transfer will decrease early miscarriages and increase contiuning rates of pregnancy.

Keywords: IVF, embryo morphology, aneuploidic pathologies.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK I
KABUL VE ONAY SAYFASI II
TEŞEKKÜR III
ÖZET IV
ABSTRACT V
İÇİNDEKİLER VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ VIII
KISALTMALAR IX

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1.İNFERTİLİTE 3
2.2.YARDIMLA ÜREME TEKNİKLERİ 4
2.2.1. Oosit Toplanması 4
2.2.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) 4
2.2.3. Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) 5
2.2.4.Embriyo Transferi 7
2.3. EMBRİYO SEÇİM KRİTERLERİ 7
2.3.1. Bölünme Evresi Değerlendirilmesi 7
2.3.1.1. Erken Bölünme 7
2.3.1.2. Bölünme Hızı 8
2.3.1.3.Blastomer Büyüklüğü 8
2.3.1.4. Fragmantasyon Derecesi 8
2.3.1.5. Blastomerlerin Nüklear Özellikleri 9
2.3.1.6. Sitoplazmik Görünüm 9
2.3.1.7. Perivitellin Alan ve Zona Pellusida Özellikleri 9
2.4. KROMOZOM SAYISINDAKİ BOZUKLUKLAR 9
2.4.1. Riploidi ve Tetraploidi 9
2.4.2. Anöploidi 9
2.4.3. Anöploidinin Oluş Nedenleri 10

Sayfa no

2.4.3.1. Kromozom Ayrılamaması (Nondisjunction) 10
2.4.3.2. Kromozomların Anafazda Geri Kalması (Anphase Lagging) 10
2.4.4. Anöploidi Türleri 10
2.4.4.1. Hiperploidi 10
2.4.4.2. Hipoploidi 11
2.5. PREİMPLANTASYON GENETİK TARAMA VE TANI 11
2.5.1. Kullanılan Teknikler 12
2.5.1.1. Embriyo Biyopsisi 12
2.5.2. Genetik Analiz 13
2.5.3. PGD Endikasyonları 13
2.5.4. PGD'den Fayda Görebilecek Hastaların Seçimi ve Danışmanlığı 17
2.6. FLUORESCENT İN SİTU HYBRİDİZATİON (FISH) 17
2.6.1. FISH'in Temel Mekanizması 18
2.6.2. Kromozomal Hastalıklarda Fish Uygulaması 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
3.1. GEREÇLER 22
3.1.1. Demirbaş Malzemeler 22
3.1.2. Sarf Malzemeler 23
3.2. YÖNTEMLER 23
3.2.1. Hasta Seçimi 23
3.2.2. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi 23
3.2.3. Embriyo Biyopsisi 25
3.2.4. Blastomer Fiksasyonu 26
3.2.4.1. Hipotonik Solüsyon Hazırlanması 26
3.2.4.2. Fiksasyon Solüsyonu 26
3.2.5. FISH Prosedürü 27
3.2.5.1. Hibridizasyon İşlemi 27
3.2.5.2. Slaytların Yıkanması 28
3.2.5.3 DEĞERLENDİRME 29
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 29
4.BULGULAR 30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 35
6. KAYNAKLAR 40
ÖZGEÇMİŞ

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 3.1. Gün embriyo skorlama tablosu 24
Tablo 3.2. Prob karışımının içeriği 27
Tablo 4.1. Hasta yaşı ile anomali varlığının karşılaştırılması 34
Şekil 2.1. Matür (0lgun) oosit 5
Şekil 2.2. Ooplazmasında 2 pronukleus izlenen fertilize olmuş bir oosit 5
Şekil 2.3. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) 6
Şekil 2.4. Yirmibeşinci saatte erken bölünen 2 hücreli bir embriyo 7
Şekil 2.5. a) İkinci günde 4 hücreli bir embriyo 8
Şekil 2.5.b) Üçüncü günde 8 hücreli bir embriyo 8
Şekil 2.6. Polar cisim biyopsisi 12
Şekil 2.7. Blastomer biyopsisi 13
Şekil 4.1. Normal kromozom yapısına sahip blastomer hücresinin FISH görüntüsü 30
Şekil 4.2. Trizomi 18 gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü 31
Şekil 4.3. Trizomi 13 gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü 31
Şekil 4.4. Haploidi gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü 32
Şekil 4.5. Triploidi gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü 32
Şekil 4.6. XO gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü 33

KISALTMALAR

PGD : Preimplantasyon genetik tanı
IVF : İn vitro fertilizasyon
ICSI : İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
ÜYT : Üremeye yardımcı teknikler
IUI : İntra uterin inseminasyon
FISH : Floresan in situ hibridizasyon
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
CGH : Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
DNA : Deoksiribonükleik asit
PZD : Parsiyel Zona Diseksiyonu
SUZI : Subzonal İnseminasyon
ET : Embriyo transferi
SSC : Sodium saline citrate
EC : Erken klivaj

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fertilizasyon, intrauterin inseminasyon (IUI)'da olduğu gibi ya rahim içerisinde (in vivo) ya da in vitro fertilizasyon / intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF / ICSI)'deki gibi laboratuvar ortamında (in vitro) gelişebilir. ÜYT Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYT)' de kadının hazırlanmasında gonadotropinler kullanılarak hormonal stimülasyon ile süperovulasyonun sağlanması, yani kontrollü ovariyan hiperstimülasyon, çoğu ÜYT' lerde kritik rol oynar.

Günümüzde üç çeşit ÜYT uygulaması yapılmaktadır: IUI**;** kısaca spermin yıkanarak iyi motilite ve morfolojideki spermatozoanın konsantre halde uterus içerisine bir kanül vasıtasıyla verilmesi işlemidir. Geleneksel IVF ise, kadından toplanan oositlerin bir petri kabı içerisinde spermatozoa ile 24-48 saat inkübe edilmesi, arkasından oluşan embriyoların uterus kavitesine transferini içerir. ICSI'nin uygulanmaya başlamasından sonra konvansiyonel IVF daha az yapılır duruma gelmiştir. ICSI; tek bir spermatozoanın oosit içerisine mikroskop altında mikroenjeksiyonudur.

Tüp bebek uygulamalarında embriyolar ikinci ve beşinci günler arasında seçilerek anne adayına transfer edilmektedir. Genellikle görünümlerine (morfoloji) göre en kaliteli üç embriyo diğerleri arasından seçilerek transfer edilmektedir. En iyi görünüme sahip embriyolar transfer edilmesine rağmen implantasyon ve klinik gebelik oranları halen istenilen düzeylere ulaşmamıştır. Gebelik oluştuktan sonra da %20-25'lere varan oranlarda düşük meydana gelmektedir.

Pre-implantasyon genetik tanı (PGD) klinik uygulamaların başladığı ilk yıllardan beri genetik düzensizliklere gebelik başlamadan önce, in vitro tanı konulması amacı ile kullanılmaktadır. PGD amacı ile yaygın olarak kullanılan iki yöntem vardır: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH). PCR genel olarak tek gen hastalıklarının, FISH ise kromozomal düzensizliklerin tanısında kullanılmaktadır.

Bu çalışma ile son dönemde IVF ünitelerinde uygulanmakta olan PGD ile tüp bebek işlemleri esnasında infertil çiftlere transfer işlemi sonrası arta kalan (imha edilecek olan) iyi kalitedeki embriyolar ile anöploidi arasındaki ilişkinin saptanması ve bu çalışmanın sonucunda elde edilecek bilimsel veriler ışığında hastaya transfer edilecek embriyoların seçiminde çözüm önerileri getirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.İNFERTİLİTE

İnfertilite, bir yıl boyunca, korunmadan ve yeterli sayıda cinsel ilişkide bulunulmasına karşın gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır (1). İnfertilite iki sınıfta değerlendirilir; daha önce gebe kalamayanlar primer infertilite, daha önce gebelik oluşmasına rağmen başka bir gebeliğin oluşmaması durumu ise sekonder infertilite olarak adlandırılır (2). Gebe kalma durumundaki imkansızlık sterilite olarak adlandırılır(3).

İnfertil çiftlerin değerlendirilmesinde etiyolojiyi ve fertilite prognozunu belirlemek çok önemlidir. Tanı ve prognozu saptarken bazı faktörler üzerinde durulmaktadır (3).

Fertiliteyi etkileyen en önemli faktörlerden biri yaş faktörüdür. Kadında fertilitede azalma 35 yaşından sonra görülür. Yaş ilerledikçe overlerdeki folliküllerin kalitesi azalmaktadır. Fertilize olan ovumun, implantasyon oranı azalmaktadır. Yaşla birlikte kromozomal anomalilerin görülme sıklığı ve spontan düşük oranı artmaktadır(3). Pelvik infeksiyon, endometriosiz gibi fertiliteyi etkileyebilecek bazı hastalıkların görülme sıklığı otuzlu yaşlardan sonra artmaktadır (3).

Diğer bir faktör, infertilite hikayesinin süresidir. İnfertilite araştırılmaya başlanırken gebeliğe maruz kalabilme süresi de belirlenmelidir. Korunulmayan cinsel ilişkinin ilk ayında yaklaşık olarak kadınların %25'i gebe kalabilir. Bir yılın sonunda gebe kalma

süreleri ilk 6 ayda %63, ilk 9 ayda %75, bir yılın sonunda %80-90 iken bunu takip eden 6 aylık bir sürede ise sadece %3-5'lik bir artış olur (3).

Sonuç olarak, korunmasız bir yıllık ilişki sonucunda gebeliğin oluşmaması araştırmanın başlaması için yeterlidir. Kadının yaşı ve infertilitenin süresi problemin ağırlığını belirleyen prognostik belirtilerdir (3).

Çiftlerde infertilite kadın, erkek veya her ikisinde birlikte bulunan problemlere bağlı olabilir. İnfertil çiftlerin %30'u kadına bağlı, %30'u erkeğe bağlı nedenlerden dolayı çocuk sahibi olamamaktadır. Çiftlerin %40'ında ise, infertilite her ikisindeki problemlere bağlı olmaktadır (4).

2.2.YARDIMLA ÜREME TEKNİKLERİ (YÜT)

Overden oosit alınmasını takiben yapılan işlemlere, YÜT adı verilir. YÜT de başarıyı etkileyen en önemli faktör, hasta seçimidir. Başlangıçta tubal faktör için kullanılan IVF, zamanla yaygınlaşarak günümüzde geleneksel tedavi yöntemleriyle başarı sağlanamamış tüm infertil çiftlerde kullanılır hale gelmiştir. YÜT'nin uygulanmasında temel kısıtlayıcı etken kadın yaşı ve buna bağlı azalan over rezervidir(5).

IVF'de ilk hedef, yeterli sayıda fertilizasyon yeteneğine sahip oosit elde edebilmektir. Doğal sikluslarda bir oosit elde edilir ve siklus iptal oranları yüksektir. Bu nedenle IVF sikluslarında, kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) yapılmaktadır. Optimal sayıda ve kalitede oosit elde etmek için, her hastanın kendi özelliklerine uygun KOH protokolü düzenlenmektedir (6-8).

2.2.1. Oosit Toplanması

Hormonal tedavi ile stimüle edilen overlerde folliküller belli büyüklüğe ulaşınca, preovulatuvar aşamada derhal oosit toplanmasına başlanır. Matürasyonunu tamamlamış foliküllerin ponksiyonu ve aspirasyonu başlangıçta ultrason yardımı ile transvajinal yolla yapılmaktadır (9).

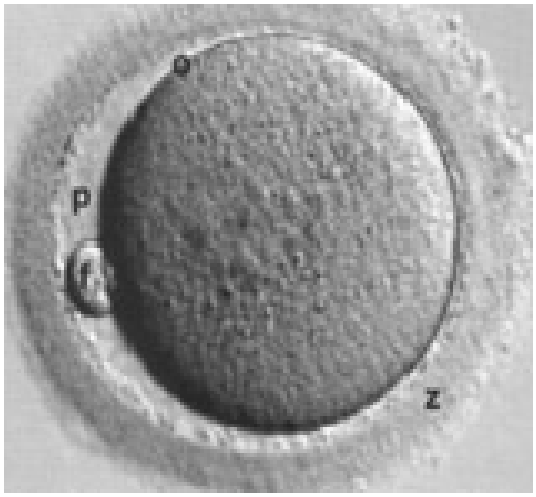
Aspire edilen oositler spesifik kültür ortamında yıkanarak embriyologlar tarafından mikroskobik olarak matürasyona göre değerlendirilerek derecelendirilirler.

2.2.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

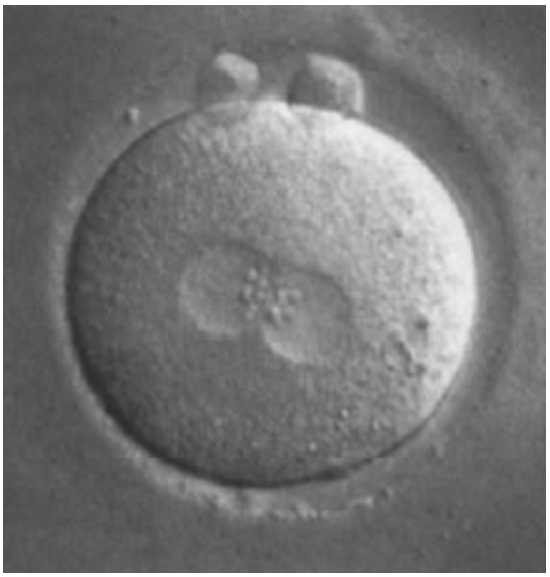
Toplanan oositler spesifik kültür ortamlarında oositlerin matürasyon durumuna göre, matür oositler (Şekil 2.1) için 4-8 saat, immatür oositler için 12-24 saat inkübasyondan

sonra semenden hazırlanmış hareketli spermatozoalarla karıştırılırlar (insemine edilirler).

İnseminasyondan takriben 16-24 saat sonra oositin fertilize olup olmadığı kontrol edilir. Fertilizasyon iki ayrı pronükleus ve iki polar cismin varlığı ile belirlenir (Şekil 2.2) (10).



Şekil 2.1. Matür (0lgun) oosit



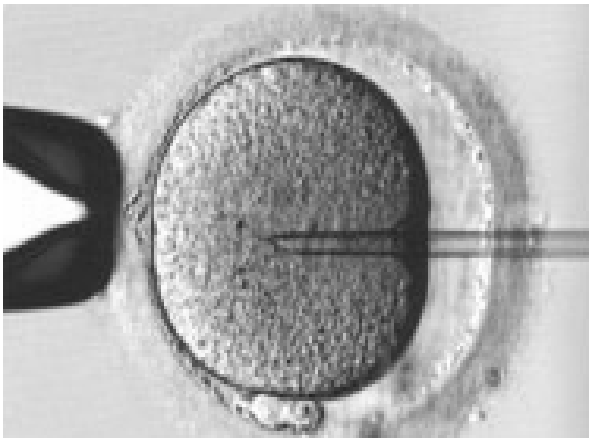
Şekil 2.2. Ooplazmasında 2 pronukleus izlenen fertilize olmuş bir oosit

2.2.3. Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

Aşırı düşük sperm konsantrasyonu, motilitede azalma ve anormal sperm morfolojisi klasik IVF'de fertilizasyonun olmayışının primer sebepleridir. Günümüzde ICSI şiddetli

erkek infertilitesi tedavisinde tek çözümdür. Tercihen iyi morfolojiye sahip tek bir canlı sperm embriyolog tarafından seçilerek oositin içine enjekte edilir (Şekil 2.3).

ICSI prosedürünün temeli oosit ve sperm manüplasyonlarına dayanmaktadır (Şekil 2.2). İlk olarak sperm penetrasyonunu kolaylaştırmak amacıyla parsiyel sperm zona diseksiyonu (PZD) geliştirilmiştir (11, 12). Zona pellucida tarafından oluşturulan fertilizasyon bariyeri mekanik olarak inceltilerek insemine edilmiş sperm hücrelerinin oositin perivitellin aralığına direkt olarak geçişi sağlanır. Bu tekniği takiben subzonal inseminasyon (SUZI) yöntemi geliştirilmiştir (13-14). SUZI işlemi yüksek sayıda motil sperm hücrelerinin bir enjeksiyon pipeti yardımıyla perivitellin aralığa direkt olarak bırakılmasını sağlamaktadır. ICSI prosedüründe SUZI işleminden farklı olarak tek bir sperm zona pellucidadan sonra sonra ikinci bir bariyeri; oolemmayı geçerek enjekte edildiği için daha invaziv bir yöntemdir (15).



Şekil 2.3. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)

ICSI yöntemi ile elde edilen insanlardaki ilk gebelikler 1992 yılında gerçekleştirilmiştir. ICSI prosedürünün ortaya çıkışından çok kısa bir süre sonra fertilizasyon oranlarının, gelişen embriyo sayısının ve implantasyon oranlarının SUZI'ye göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (16,17). Günümüzde ICSI uygulaması şiddetli oligoasteno-teratozoospermik vakalar ve testiküler disfonksiyon ya da ekskretuar kanallarda obstrüksiyon sebebiyle ortaya çıkabilen azospermik vakalarda tüm dünyada yaygın olarak uygulanan tek tedavi biçimidir (18).

2.2.4.Embriyo Transferi (ET)

Embriyo transferi inseminasyondan yaklaşık 40-48 saat sonra hücre bölünmesi sonucu embriyo 2-8 hücre aşamasında iken yapılır (19). Transfer uterus içine bir kateter yardımı ile gerçekleştirilir. İşlem için ansteziye gerek yoktur. İn vitro fertilizasyon ve embriyo transferi (IVF-ET) yardımla üreme teknikleri içinde en fazla tercih edilen yöntemdir (10).

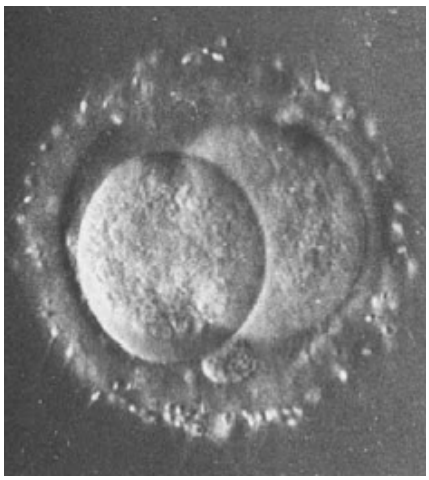
2.3. EMBRİYO SEÇİM KRİTERLERİ

2.3.1. Bölünme Evresi Değerlendirilmesi

Embriyo skorlama sistemlerinde, yüksek implantasyon potansiyeline sahip embriyoları seçebilmek için, pronüklear evre ile birlikte bölünme evresi de değerlendirilmelidir. Bölünme evresinde erken bölünmenin (early cleavage, EC) saptanması ve daha sonra bölünme hızı, blastomerlerin şekli ve boyutu, fragmantasyon oranı, blastomerlerdeki nükleus sayısı, sitoplazmik görüntü, perivitellin alan ve zona pellusida özellikleri gibi kriterler değerlendirilmektedir.

2.3.1.1. Erken Bölünme

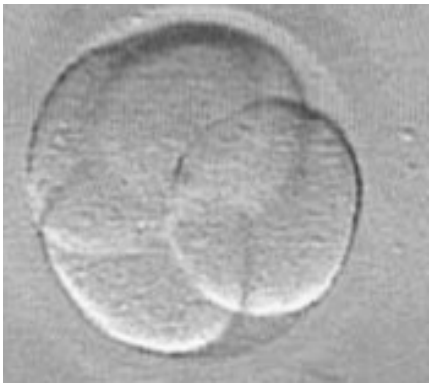
Fertilize olmuş bir oosit, yaklaşık 20 saat sonra ilk mitotik bölünmeye başlayarak 2 hücreli bir embriyo oluşturmaktadır (Şekil 2.4). Yirmibeşinci saatte fertilize olmuş oositlerin yaklaşık %20'si 2 hücreli evreye ulaşırlar. Bu embriyolar, erken bölünen embriyo olarak adlandırılır. Yapılan araştırmalar erken bölünen embriyoların daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir (20).



Şekil 2.4. Yirmibeşinci saatte erken bölünen 2 hücreli bir embriyo

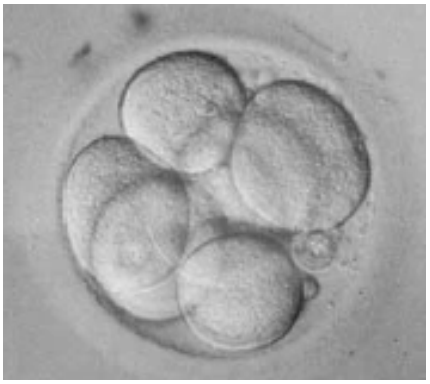
2.3.1.2. Bölünme Hızı

İyi kalitedeki bir embriyonun, ikinci günde 4-5 blastomere ve üçüncü günde en az 7 blastomere sahip olması gerekmektedir (21) (Şekil 2.5).



(a)

Şekil 2.5. a) İkinci günde 4 hücreli bir embryo,



(b)

Şekil 2.5.b) Üçüncü günde 8 hücreli bir embriyo

2.3.1.3.Blastomer Büyüklüğü

Eşit olmayan hücresel bölünme, embriyo kalitesi ve embriyonun gelişim kapasitesi ile ilgili bilgi veren bir diğer önemli parametredir. Yapılan çalışmalar, eşit bölünmeyen embriyoların transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir.

Bunun da protein, mRNA, mitokondri ve diğer hücre organellerinin iki kardeş hücreye eşit olarak aktarılamamasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (22).

2.3.1.4. Fragmantasyon Derecesi

Bölünme hızı ve blastomer boyutuyla birlikte embriyo fragmantasyonu da embriyo seçim kriterleri arasında yer almaktadır. Nükleus içermeyen fragmanların sayı ve miktarının embriyo hacmine oranı, embriyo kalitesi değerlendirilirken belirlenmelidir. Hücre fragmantasyonunun nedeni ve embriyo gelişimine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte hem embriyo hem de hastaya spesifik bir durum olarak ortaya çıkabilmektedir. Fragmantasyonun, apopitozisten (programlı hücre ölümü) kaynaklandığı görüşü yaygındır (23).

2.3.1.5. Blastomerlerin Nüklear Özellikleri

Embriyoların implantasyon potansiyelini belirleyen diğer bir morfolojik parametre ise blastomerlerde gözlenen multinükleasyondur. Blastomer multinükleasyonunu, bir blastomerin içinde iki veya daha çok sayıda ya da fragmante olmuş nükleusun bulunması ile karakterizedir (21).

2.3.1.6. Sitoplazmik Görünüm

Embriyoda blastomerlerin sitoplazması açık renkli, şeffaf ya da hafif granülasyona sahipse, normal olarak değerlendirilir (24). Yapılan çalışmalarda bazı 3. gün embriyolarının sitoplazmasında granülasyon ve küçük noktasal yapıların arttığı gösterilmiş ve bu durumun blastomerin sitoplazmik aktivitesinin yeterli olduğunun bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. Sitoplazmik görüntünün embriyo gelişim potansiyeli üzerine etkisini araştıran bir çalışmada gebelik ve implantasyon oranlarını etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır (25).

2.3.1.7. Perivitellin Alan ve Zona Pellusida Özellikleri

Embriyoların değerlendirilmesi sırasında perivitellin alandaki genişlik, darlık ve inklüzyonlar not edilmelidir. Ayrıca zona pellusida yapısı ve kalınlığı da değerlendirilmelidir (26).

2.4. KROMOZOM SAYISINDAKİ BOZUKLUKLAR

Kırkaltı dışındaki herhangi bir kromozom sayısındaki kromozom sayısına **heteroploid** adı verilir. Haploid kromozom sayısının (n) tam katlarına **öploid** denir (27).

2.4.1. Triploidi ve Tetraploidi

Normal somatik hücrelere özgü diploid (2n) sayısına ek olarak, **triploidi** (3n) ve **tetraploidi** (4n) de zaman zaman bildirilir. Hem triploidi hem tetraploidi fetuslarda görülmüştür, ancak triploid bebekler canlı doğabilseler bile uzun yaşamazlar. Triploidi en sık olarak iki spermle birden döllenmeye (dispermi) bağlı görülür. Mayoz bölünmelerden birindeki diploid yumurta veya spermle sonuçlanan hatalar da vakaların bir kısmından sorumlu olabilir (28).

2.4.2. Anöploidi

Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere **anöploidi** denir. Anöploidi insan kromozom bozuklukları arasında en sık görülen ve kilinik olarak

en önemli tipi olup klinik olarak teşhis edilen tüm gebeliklerin en az %3-4'ünde bulunur (27).

2.4.3. Anöploidinin Oluş Nedenleri

Hücrenin bölünmesi sırasında ortaya çıkan kusurlar nedeniyle anöploidiler oluşur ve başlıca iki yolu vardır:

2.4.3.1. Kromozom Ayrılamaması (Nondisjunction)

Bölünmeye hazırlık döneminde kendini iki katına çıkaran kromozomlar, metafaz evresinde ekvatoryal düzlemde toplanırlar, sentromerlerinden uzunlamasına ikiye bölünerek her yarım ayrı bir kutba gider ve bölünme tamamlanır. Kimi zaman kromozomlar uzunlamasına bölünemez ve bir kutba iki yarım birden giderken diğer kutba kromozom gitmez. Bu duruma **kromozom ayrılmaması (nondisjunction)** denir (28).

2.4.3.2. Kromozomların Anafazda Geri Kalması (Anaphase Lagging)

Anafazda geri kalma, anafaz gecikmesi gibi adlar verilen bu olay, aslında kromozom ayrılmamasına benzer. Normal olarak uzunlamasına bölünerek kutuplara çekilmekte olan kromozomlardan biri anafazda geri kalır. Hareket etmekte geç kalan bu kromozom ya özdeşinin bulunduğu kromozom grubuna katılır ya da bölünme sırasında ortadan kaybolur (29).

2.4.4. Anöploidi Türleri

Anöploidi, kromozomlardaki artma ya da eksilmeye göre ikiye ayrılır:

2.4.4.1. Hiperploidi

İnsandaki normal diploid sayıdan bir ya da daha çok sayıda fazla kromozom bulunması durumudur. Yani diploid sayı artı fazla kromozom demektir. Örneğin, 2n + 1. Sık rastlanan hiperploidi örnekleri trizomi ve tetrazomilerdir (29).

Trizomi: İnsan kromzomlarından herhangi birinin iki yerine üç tane bulunması durumudur, yani 2n + 1 = 47. Örneğin Down sendromu 47, XX, +21 ve Klinefelter sendromu 47, XXY (29).

Tetrazomi : Kromozomlarda gözlenen bu düzensizlik iki şekilde olmaktadır: ya bir homolog kromozom çiftinden iki yerine dört tane bulunmaktadır (2n+2= 48, 48, XXXX) ya da iki ayrı homolog çiftin trizomisi vardır (2n+2=48; 48, XX, (+1;+4)) (28).

2.4.4.2. Hipoploidi

Karyotipdeki diploid kromozom sayısından bir ya da daha çok kromozomun eksilmesidir (29).

Nüllizomi: Herhangi kromozom çiftlerinden birinin bulunmaması, yani karyotipden bir çift kromozomun eksik olması durumudur (2n-2=44). İnsan için nüllizomi örneği bilinmemektedir (29).

Monozomi: Diploid kromozomdan bir kromozomun eksik olmasına denir (2n-1 = 45). Yani karyotipte, bir çiftin eş iki üyesinden bir tanesi bulunmamaktadır. Örneğin, Turner sendromu (45,X) (29).

Mozaisizm: Aynı zigottan kaynaklanan bi organizmada, kromozom sayıları birbirinden farklı birden çok doku ya da hücre bulunması durumuna **mozaisizm** denir (29)

Uniparental dizomi: Fertilize ovumda iki homolog kromozomun bir parental üyeden, ya anneden ya da babadan gelmesidir (29).

2.5. PREİMPLANTASYON GENETİK TARAMA VE TANI

Preimplantasyon genetik taramassax (PGD), biyopsi ve embriyonik hücresel materyalin analizi yoluyla gelişmekte olan embriyo hakkında genetik ve kromozomal bilgi sağlayan tekniklerdir. Bu teknoloji, IVF yoluyla gebe kalmak isteyen, özellikle çocuklarına tek gen hastalıkları geçirme riski taşıdığı bilinen veya yapısal ve sayısal kromozomal anomalisi olan embriyo üretme riski olan bir çok çifte uygulanabilir ve yardımcı olabilir. PGD uygulanan çiftlerde blastomer veya polar cisimcik biyopsisi yapılarak tek gen hastalıkları, kromozom yapısı ve kromozom sayısının doğru ve güvenilir olarak tespit edilmesi transfer öncesi embriyo seçiminde rehberlik etmede kullanılır. Birçokları için bu koryon villus biyopsisi veya amniyosentez yoluyla gebeliğin birinci veya ikinci trimesterinde fetal tanı beklemekten çok daha fazla tercih edilen bir yöntemdir. PGD, bilinen tek gen hastalıklarının geçişini önlemek ve tekrarlayan IVF başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı, veya ileri maternal yaş riski olan çiftlerde gebelik ve canlı doğum şansını artırmak için rutin bir tercih haline gelmiştir (30).

2.5.1. Kullanılan Teknikler

2.5.1.1. Embriyo Biyopsisi

PGD yaparken analiz için gereken hücresel materyal üç teknikten birisi kullanılarak elde edilir: 1) fertilizasyonun tamamlamasından önce oositten polar cisimcik biyopsisi, 2) üç günlük embriyoda 6-10 hücre aşamasındayken blastomer biyopsisi, veya 3) 5. gün blastosistlerde trofoektoderm biyopsisi (31).

1- Polar Cisimcik Biyopsisi: Polar cisim biyopsisi, ovülasyon ve fertilizasyon sırasında mayozu tamamlayan oosit bölünmeleri sırasında oluşan ve dışarıya atılan polar cisimciklerin birinin veya her ikisinin çıkarılması işlemidir. Polar cisimcikler oositi çevreleyen zona pellusidanın mekanik veya kimyasal olarak açılmasını takiben oosite veya oluşacak embriyoya zarar vermeden güvenle çıkarılabilirler. Oosit polar cisimciklerinin analizi maternal (anne) kaynaklı genetik materyali belirler ve bu nedenle paternal (baba) kaynaklı genetik veya kromozomal anomaliler değerlendirilemez (Şekil 2.6) (31).



Şekil 2.6. Polar cisim biyopsisi

2- Blastomer Biyopsisi: Bölünme aşamasındaki embriyodan blastomer biyopsisi yapmak, PGD'de genetik materyal elde etmek için en çok başvurulan yöntemdir. Bu, embriyonik hücrelerin totipotent olduğu ve kompaktlaşmaya başlamadığı embriyo gelişiminin üçüncü gününde 6-10 hücre aşamasındayken uygulanmaktadır. Bir veya iki blastomer, eğer toplam embriyo hücresel materyalinin %25'inden daha az ise embriyonun daha sonraki gelişimini etkilemeden çıkarılabilir (Şekil 2.7). Biyopsi yapılmış embriyolar laboratuvarda takıp edilirken, çıkarılan blastomerler daha sonra gen mutasyonları veya kromozomal anomaliler yönünden incelenir. PGD sonuçları elde

edildikten sonra, blastosist haline gelen normal embriyolar 5.günde transfer için seçilirler. İlginçtir ki, tek bir embriyonun tüm blastomerleri aynı kromozomal yapıda değildir ve mozaisizm adı verilen bu farklılık blastomer analizi için kaçınılmaz bir sınırlama getirir. Bölünme aşamasındaki embriyolardan alman blastomerleri analiz eden ve daha sonra blastosist aşamasında blastomer takibi yapılan çalışmalar, embriyolarda %50'ye varan oranlarda mosaisizm olabileceğini göstermiştir. Ancak, genelde, blastomer mozaisizminin en fazla %5 oranında hataya neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle blastomer biyopsisi ile yapılan PGD, %95-98 tam etkinliği ile güvenilirdir ve preimplantasyon genetik analiz için şu anda en geçerli standarttır(30, 31).



Şekil 2.7. Blastomer biyopsisi

3-Trofektoderm Biyopsisi: Embriyo hücresel analizi için son başvurulan yöntem gelişimin 5. gününde blastosist embriyolardan yapılan trofektoderm biyopsisidir. Burada, kimyasal veya mekanik olarak bir açıklık oluşturularak zona geçilir ve fıtıklaşan trofektoderm hücrelerinin bir kaçı çıkarılır. Ancak, bu teknik sınırlıdır ve gelişimin bu aşamasında yapılan biyopsi sonucu transfer öncesi genetik analiz için yeterli süre kalmadığından yaygın olarak kullanılmamaktadır (31).

2.5.2. Genetik Analiz

Biyopsi yolu ile elde edilen hücresel materyalden, tek gen defektlerine tanı koymak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak spesifik gen dizileri analiz edilebilir veya floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

(CGH) yapılarak anöploidi veya yapısal kromozomal anomali taraması için kromozomlar ayrıntılı olarak incelenebilir (32).

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): PCR tekniği, pre-implantasyon embriyolarını mutasyon dizileri bilinen tek gen defektleri açısından tarama olanağı sağlar. Biyopsi yapılan hücreden DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, ilgili gen bölgesine özgü oligonükleotid primerler kullanılarak ısıya duyarlı bir polimeraz ile DNA replikasyonuna başlanır. Tekrarlayan spesifik ısı siklusları sonucunda, normal veya mutasyonlu gen dizisinin olup olmadığını belirlemek için yeterli DNA elde edecek şekilde seçilmiş gen bölgeleri amplifiye edilir. Bu tekniği optimize etmede karşılaşılan güçlükler embriyo biyopsisinden elde edilen başlangıç DNA miktarının az olması ve kontamine olan DNA'yı amplifiye etme riskidir. Nested PCR tekniği veya multiplex PCR ile farklı gen fragmanlarının simültane PCR amplifikasyonu, bu yöntemin güvenilirliğini arttırmak amacıyla rutin olarak kullanılmaktadır (30).

2. Floresan in situ Hibridizasyon: Kromozomal bütünlük ve sayıyı analiz etmek için en sık kullanılan yöntem floresan in situ hibridizasyondur (FISH). Biyopsi yapılan hücrelerde interfaz kromozomları, söz konusu kromozomların DNA'sı ile etkileşen ve hibridize olan floresanla işaretli problar kullanılarak tespit edilebilir, görünür hale getirilebilir ve sayılırlar. Çok sayıda kromozom farklı renklerde işaretleme kullanılarak ve tekrarlayan hibridizasyon basamakları ile test edilebilir.

Hibridizasyon yapıldıktan sonra her kromozom için sinyaller sayılır ve hücresel öploidi ve anöploidi belirlenir. Bu teknik aynı zamanda translokasyonları ve diğer yapısal kromozom defektlerini tanımlamak için de kullanılabilir. Uygun sinyal kaybolduğunda veya artefakt sinyal görüldüğü durumlarda, alternatif problarla selektif analiz tekrar edilerek FISH'in beklenen hata oranı azaltılabilir. Prob sinyallerle interferansa bağlı olarak bir hücrede test edilebilen kromozom sayısı kısıtlı olduğu için, FISH sonuçları da sınırlıdır. Hali hazırda, 23 kromozom çiftinin yalnız 9-12 tanesini test etmek standarttır. FISH ile test edilmek üzere seçilen kromozomlar erken dönem embriyolarda en yüksek anöploidi insidansı görülenlerdir ve X, Y, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, ve 22. kromozomları kapsar (30, 31).

3. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH): Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH), hücresel fıksasyon olmadan biyopsi yapılan tek bir hücreden kromozomların simültane ve komple incelenmesine olanak sağlayan yeni bir tekniktir.

FISH'in tersine kromozomlar direkt olarak görülmezler ama PCR amplifikasyonu sonrası test DNA'sı ve kontrol DNA arasındaki kromozom spesifik probların rölatif kopya sayısı belirlenir. Bu teknik yalnızca biyopsi yapılan hücrelerdeki anöploidi taraması için kullanılmaz, aynı zamanda, translokasyonları ve diğer yapısal kromozom defektlerini yansıtan DNA kopya sayısındaki gizli farkları da ortaya koyar. Günümüzde CGH kullanımı sınırlıdır çünkü işlem zaman gerektirmektedir. CGH, biyopsi ve taze transfer aralığında tamamlanamayacağı için, bu yöntemle taranan embriyolar diagnostik süreçte dondurulmalı ve CGH sonuçları elde edildikten sonraki bir siklusta çözülerek transfer edilmelidir. Tekniği optimize etmek ve izotermal bir polimeraz ve strand yerleştirerek tüm genom amplifikasyonu gibi alternatif metodolojiler geliştirmek sonuçta CGH için gereken işlem süresini kısaltarak onu klinik olarak daha geniş kullanılabilecek duruma getirebilir (31, 32).

2.5.3. PGD Endikasyonları

PGD teknolojisi ilerledikçe, transfer öncesinde embriyoların genetik değerlendirmesi yaygınlaşmaktadır. Günümüzde PGD, sekse bağlı hastalıkları veya otozomal tek gen defektleri olan veya bunları taşıdığı bilinen çiftlerde rutin olarak kullanılması önerilmektedir. PGD aynı zamanda, ilerlemiş ovarian yaşa bağlı kromozomal anöploidi riski artmış, translokasyon taşıyıcısı, IVF'le tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (32).

1. Sekse Bağlı Hastalıklar: 1990'da başarılı PGD gebeliklerinin rapor edilmesinin ardından, sekse bağlı hastalıklar yönünden risk altında bulunan embriyoları taramak için bu teknoloji yaygın olarak kullanılmıştır. Sekse bağlı hastalıkları olan veya bunları taşıyan hastalar için, spesifik genetik mutasyon bilgisi gerekmez, çünkü taşıyıcılık veya hastalık durumu cinsiyetin belirlenmesi ile söylenebilir. X'e bağlı resesif hastalıklar, sekse bağlı hastalıkların en sık görülenleridir ve hemofili A, Duchenne muskuler distrofisi, adrenal lökodistrofı, Lesch-Nyhan sendromu, ve frajil X sendromunu içerir. Sekse bağlı hastalıkları olan babaların kız çocuklarına %50 taşıyıcılık aktarma şansı vardır, ama erkek çocuklarına hastalığı geçiremezler. X'e bağlı hastalığı taşıyan annelerin erkek çocuklarının %50'sine hastalığı aktarma ve kız çocuklarının %50'sine taşıyıcılık geçirme riski vardır. İnkotinentia pigmenti gibi X'e bağlı dominant hastalıklar daha nadirdir. Bu durumda, etkilenmiş annelerin hastalığı %50 oranında çocuklarına geçirme şansı varken, etkilenmiş babalar hastalık durumunu sadece kız

çocuklarına geçirebilirler. Preimplantasyon genetik tanı, bu çiftlere, embriyo cinsiyetini belirleme ve çocuklarının hastalık ve/veya taşıyıcılık durumunu önlemek için cinsiyet seçimi yapılan embriyoların transferi opsiyonunu sunmaktadır. Biyopsi yapılan embriyolarda cinsiyet yaklaşık %99 doğrulukla PCR veya FISH ile belirlenebilmektedir (31).

2. Tek Gen Defektleri: İnsan Genom Projesinin tamamlanması ile birlikte, tek gen hastalıkları için sekans bilgisi embriyonun hastalık veya taşıyıcılık durumunu belirlemek üzere PGD uygulaması yapılmasına olanak sağlayacak şekilde hızla artmıştır. Otozomal resesif hastalıklar daha sıktır ve kistik fibrozis, Tay-Sachs hastalığı, orak hücreli anemi, talasemi, spinal muskuler atrofi ve familial disotonomi gibi bir çoğu PGD ile başarılı bir şekilde taranabilir. PGD uygulanan otozomal dominant hastalıklar, Huntington hastalığı, nörofibromatozis, retinitis pigmentoza, Marfan sendromu ve familial adenomatöz polipozis kolidir. Monogenik hastalıkların preimplantasyon tanısının özelliklerinden biri hastalığa yol açan çeşitli mutasyonların taranmasıdır. Örneğin, kistik fıbrozis, cystic fıbrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) geninde bilinen 1000'den fazla mutasyonla ortaya çıkabilir ki bu mutasyonlardan en sık olanları test edilebilmektedir (31-32).

3. Anöploidi ve PGD: En iyi prognozlu hastalarda bile her IVF siklusu için gebelik başarısı %40-50 ve düşük şansı %15-20'dir. Başarısız implantasyonların ve gebelik kayıplarının çok büyük bir çoğunluğu yaşamla bağdaşmayan anöploid embriyo ile sonuçlanan kromozomal ayrılma hatasına bağlıdır. Kadın yaşamında konsepsiyona kadar olan süre içinde insan oositleri mayoz aşamasında durakladığı için eşleşen kromozomlara yapışan iğ cisimciğinin ve kiazmatanın artan oosit yaşı ile birlikte hasar görmeye özellikle duyarlı olduklarına inanılmaktadır (33).

Bu nedenle anöploidi, insan üremesinde en büyük sınırlamalardan biridir ve bugün elimizde bu fenomeni önleyecek veya geri çevirecek potansiyel bir yöntem yoktur. Ne yazık ki, embriyoların morfolojik analiz ile değerlendirilmesi kromozomal yapı ile korelasyon göstermez ve ne bu ne de diğer bir non-invaziv yöntemle erken devredeki ernbriyolardaki anöploidi veya anöploidi durumu doğru olarak tahmin edilemez. Kromozomal analiz için FISH ile PGD yapılması bu nedenle transfer öncesi kromozomal olarak normal embriyoları seçmede değerli bir teknolojidir. Polar cisimcik biyopsisi embriyoya sadece maternal kromozomal katkıyı değerlendirirken,

embriyolardaki anöploidinin %90'ının maternal kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir ve bu yüzden polar cisimcik analizi güvenilir bir yaklaşım olarak kullanılabilir. Ancak, blastomer biyopsilerinden PGD bir çok fertilite merkezi tarafından tercih edilir, çünkü hem paternal hem de maternal katkı değerlendirilerek analiz blastosist transferine izin verecek şekilde gelişimin 5. gününe kadar tamamlanabilir. Günümüzde anöploidi PGD'si için en sık endikasyonlar ileri maternal yaş, tekrarlayan IVF başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kaybıdır; ancak bu durumların her birinde bu taramanın yararının olduğuna ilişkin bir fikir birliği henüz oluşmamıştır (34).

3. İlerlemiş Maternal Yaş: Anöploidi maternal yaşla birlikte arttığı için ileri reprodüktif yaştaki kadınlarda ki bu genellikle 35 yaş ve üstü olarak kabul edilir, PGD ile anöploidi taraması bir seçenektir (35).

4. Tekrarlayan Gebelik Kaybı: Daha önceden iki veya daha fazla spontan abortus öyküsü olan çiftlerde kromozomal translokasyonlarla birlikte anöploidi taraması değerli bilgiler sağlayarak gebelik başarısını arttırıp gebelik kaybını azaltabilir (36)

5. Tekrarlayan IVF Başarısızlığı: Tekrarlayan gebelik kaybına benzer şekilde, kötü prognozlu hastalarda IVF başarısızlığına neden olan belirgin bir etyoloji kromozomal aberasyonlardır (36).

6. Kromozomal Translokasyonlar: Tekrarlayan gebelik kaybı veya infertilite incelemesi sırasında parental kromozomal translokasyon saptanan çiftlerde de PGD yarar sağlamaktadır. Yapısal kromozom aberasyonları PGD veya FISH ile değerlendirilebilirler. Veriler fazla olmasa da, parental Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar için PGD yapılan yaklaşık 500 hastayı içeren bi raporda, toplam %20-36 gebelik olasılığına karşılık kayıp oranının anlamlı şekilde %2' ye düştüğü bildirilmektedir (30).

2.5.4. PGD'den Fayda Görebilecek Hastaların Seçimi ve Danışmanlığı

Klinisyenler, PGD'den fayda görebilecek hastaları en iyi şekilde, ayrıntılı bir genetik ve obstetrik öykü alarak belirleyebilirler. Tek gen defektleri olabilecek veya taşıyabilecek hastaların aile fertlerinde genetik hastalık veya ailede açıklanamayan gebelik kayıpları ve neonatal ölüm öyküsü olabilir. Bir çiftin aile öyküsü aynı zamanda, orak hücre anemisi ve Afrikalı Amerikalılar veya kistik fıbrozis ve Kuzey Avrupa veya Askenazi Yahudileri arasında olduğu gibi artmış genetik hastalık oranları ile ilişkili özel etnik

durumları ortaya çıkarabilir. Tekrarlayan gebelik kaybı veya tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan çiftlerde, PGD ile test edilebilecek artmış bir kromozomal translokasyon taşıma riski bulunur. Kötü gebelik veya IVF sonucu olan veya ileri matemal yaştaki kadınlarda daha fazla anöploid embriyo gelişir ve bu nedenle PGD seçeneği sunulmaktadır (30, 31).

Çiftlere danışmanlık verilirken, donor gametlerinin kullanımı da dahil, alternatif seçeneklerden haberdar edilmeleri önemlidir. PGD yapılmayan ve gebe kalan kromozomal veya genetik anomali riski taşıyan çiftlerde prenatal tanı daha sonra gebeliğin 12-14. haftasında koryonik villus biyopsisi (CVS) veya 16-20. haftasında amniyosentez ile yapılabilir. PGD isteyen çiftlerin aynı zamanda, baseline hata oranı, embriyonik mozaisizm, ve her siklus için toplam embriyo elde edilmesinin azalma olasılığına bağlı testin kısıtlılığı konusunda bilgilendirilmeleri gerekir (31-32).

2.6. FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH)

2.6.1. FISH'in Temel Mekanizması

Tüm in situ hibridizasyon yöntemlerinde temel olay iki DNA sarmalı arasındaki komplementalliktir. Hedef diziye komplementer olan DNA işaretlenir, hücre genelde bir lam üzerine fikse edilmiştir. Hücredeki protein ortamdan uzaklaştırılır, genomik DNA denature edilir. Speifik olarak eşleşmenin ideal olduğu koşullarda DNA' nın erime noktasından daha düşük bir ısıda işaretli DNA dizisi ile genomic DNA hibridize edilir. Oluşan hibrit çeşitli yöntemlerle görüntülenir (37).

Başarılı bir in situ hibridizasyon için şu 3 temel aşama çok önemlidir:

1. Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliği kaybetmeden korunması,
2. Probla hedefin yüksek bir etkinlikle birbirine bağlanması,
3. Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir reseptör ile en az zemin sinyali olacak şekilde en parlak şekilde görüntülenmesidir.

Nükleik Asitler komplementer dizilere zayıf hidrojen bağları ile bağlanırlar. Hibridizasyon deneyleri sırasında bu bağlar ısı ve alkali ile kırılarak çift sarmalli moleküllerin denatüre olması sağlanır. Uzun DNA parçaları da kısalara gore daha zor denatüre edilir. Bir dublexin denatüre olacağı ısı, içerisindeki Guanin-Sitozin oranına ve

etrafındaki iyon dengesi ile bağlantılıdır. Formamid gibi bazı bileşikler hidrojen bağlarının kırılmasını sağlayarak daha düşük ısıda denatürasyon sağlarlar (37).

Bir DNA-DNA veya RNA- DNA hibritinin stabilitesi erime ısısına bağlıdır. Erime ısısı Tm ile gösterilir. Bu değer sarmalın %50'sinin ayrıldığı ısıdır. Denatüre edilmiş iki DNA molekülünün eşleşmesi için en uygun ısı erime ısısı (Tm) değerinin altındadır. Düşük tuz konsantrasyonu ve yüksek ısı bazların doğru olarak eşleşmesini kolaylaştırır. Ortamda formaamid bulunması doğru eşleşme için gereken ısıyı düşünerek kromozom morfolojisinin korunmasını sağlar.

Işığın formaamidi hızla iyonlaştırması sebebiyle hibridizasyon işlemi genellikle karanlıkta, preparatların kurumaması içinde nemli bir ortamda yapılır. Kullanılan probun cinsine gore denaturasyon ve hibridizasyon için optimal ısı, tuz, formaamid konsantrasyonu ile modifiye edilir.

Tanısal amaçlı kullanılan FISH:

1. Klinik sitogenetik
2. Prenatal tanı
3. İnterfaz sitogenetiği
4. Mikrodelesyon sendromlarının tanısı
5. Dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısı
6. Kanser sitogenetiği
7. Dokuda m RNA

Araştırma amaçlı kullanılan FISH:

1. Gen haritalanması
2. Tümör biyolojisi
3. Mikrobiyoloji / Viroloji
4. Gen ekspirasyon analizi
5. Somatik hücre hibrit gen analizi
6. Mayoz ve mitoz analizleri
7. Hücre tanımlaması

In situ hibridizasyon sisteminin duyarlılığı;

1. Hedef dokunun geçirgenliği,
2. Görüntüleme tekniği,

3. Probun özelliklerine bağlıdır.

Probun hangi yöntemle işaretlendiği, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması spesifik olmayan sinyalleri artırabilir. Hibridizasyonun güvenilir ve duyarlı olmasında kullanılan probun amaca yönelik olması, uzunluğu, kalitesi, hedef bölgeye özgünlüğü büyük önem taşır (37).

2.6.2. Kromozomal Hastalıklarda FISH Uygulaması

Embriyo ve kanser genetiğinde incelemeye alınan hücrelerden band tutabilen metafaz plakları elde etmek çok zor olduğundan, genellikle interfaz FISH kullanılmaktadır. FISH tekniğinde, spesifik bir kromozomdaki komplementer sekanslara bağlanan ve floresan boyalar içeren DNA probları kullanılır. Hibridizasyon sonrasında nükleuslar floresan mikroskop altında incelenir ve floresan sinyallerin sayısı, mevcut kromozomların sayısını belirtir. Üç tip FISH probu vardır;

1. Alfa satellit ya da repeat sequence probları,
2. Lokus spesifik ya da tek sekans probları,
3. Tüm kromozom ya da painting probları.

Interfaz nükleusunda bu problardan yalnızca ilk ikisi kullanılmaktadır (38-40).

1. Alfa satellit ya da repeat sequence probları: Alfa satellit ya da repeat sequence probları ilk geliştirilen FISH problarıdır. Genellikle kromozomun sentromerindeki spesifik bir sekansa bağlanırlar ve bu yüzden bunlara sentromerik problar da denir.

Repeat sekans probları bakterilere yerleştirilen plazmidler ya da kozmidler aracılığı ile klonlanarak elde edilirler ve böylece çok miktarda prob klonlanabilir. Nick translasyonu kullanarak florokrom proba eklenir. Bu problar repeat sekanslara bağlandığı için kısa zamanda hibridize olurlar (1 saatin altında) ve çok parlak sinyaller verirler; tüm FISH prosedürü 2 saatin içinde tamamlanır (39, 40).

2. Lokus spesifik ya da tek sekans probları: Loküs spesifik olan bu problar kromozomun spesifik bir bölgesine bağlanırlar. Bazı lokus spesifik problar doğrudan florokromlarla işaretlenebilirler, fakat indirekt işarsetlemede sinyali amplifiye etmek için kullanılmaktadır. Indirekt işaretleme FISH analizinde kullanılan ilk yöntemdir. Bu problar tek sekans bulmak zorunda oldukları için 6-12 saat hibridizasyona tabi tutulurlar. Ilk olarak kromozom 13 ve 21 için geliştirilmiş olan bu problar kromozom anomalilerinde ve yaşa bağlı anöploidilerde PGD için kullanılmaktadır (39, 40).

3. Tüm kromozom probları: Bu problar tüm kromozomu boyarlar ve 24 adet insan kromozomu için ticari olarak satılmaktadır. Fakat, bunlar yalnızca metafaz kromozomlarında kullanılabilirler. Interfazda kullanıldıkları zaman, genellikle interfaz nükleusunun ortalarında biribirinden ayırt edilemeyen sinyal verirler (39-41).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Laminar Air Flow
2. İnvert Mikroskop
3. Işık mikroskobu
4. Su banyosu
5. pH metre
6. Vorteks
7. Santrifüj
8. Hassas Terazi
9. Derin Dondurucu
10. Buzdolabı
11. Otomatik Pipet
12. Distile Su cihazı
13. Nikon E-1000 İmage analizatör (FISH analiz sistemi)
14. Etüv
15. Distile su cihazı

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. Blastomer biyopsi pipet
2. Zona dissection pipet
3. Lam
4. Lamel
5. Elmas uçlu kalem
6. Ca/Mg free medyum
7. Cam pastör pipetleri
8. Petri kabı
9. Bovıne serum albumin
10. Sodyum sitrat
11. Distile su
12. Mikro filtre
13. Asetik asit
14. Metanol
15. Tüplük
16. Falkon tüpler
17. 13,18,21,X ve Y PGD probları
18. NaCl
19. NP-40 deterjan
20. $Na_3SO_4 2H_2O$
21. Antifade II
22. Etanol
23. Ependorf tüpler
24. Buzluk
25. Hepes-buffered medyum
26. Ovoil

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hasta Seçimi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakultesi Tüp Bebek Ünitesinde infertilite tanısı alarak tüp bebek uygulamasına alınan ve üçüncü günde embriyo transferi sonrasında arta kalan transfer edilebilir kalitede (grade III) bir embriyosu bulunan ve embriyosunun dondurulmasını kabul etmeyen 20 hasta bu tezin çalışma grubunu oluşturdu. Hastalar tez çalışma projesi hakkında bilgilendirilmiştir. Hasta grubunu oluşturan bayanlar 22 ile 36 yaş sınırları arasındadır.

3.2.2. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi

Embriyoların morfolojileri inverted mikroskopta ve aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilmiştir.

- Embriyo blastomer sayısı (hücre sayısı)
- Embriyo blastomer büyüklüğü (blastomerlerin eşit ya da eşit olmaması)
- Fragmantasyon varlığı ve yüzdesi (hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkan çekirdeksiz hücre parçacıkları)

Bu kriterlere göre aşağıdaki embriyo skorlama sistemi kullanılmıştır (Tablo 3.1). Bu skorlama sistemine göre grade III kalitedeki embriyolar kullanıldı (42).

Tablo 3.1. Gün embriyo skorlama tablosu

GRADE I 8=< hücre sayısı < % 10 fragmantasyon Blastomer çapları eşit	
GRADE II 8=< hücre sayısı % 10- 20 fragmantasyon Blastomer çapları eşit	
GRADE III 5- 7 hücre veya % 20 fragmantasyon veya Blastomer çapları eşit değil	

Tablo 3.1. Gün embriyo skorlama tablosu **(devamı)**

GRADE IV 4- 6 hücre veya daha fazla > % 20 fragmantasyon veya Blastomer çapları eşit değil	
GRADE V <= 4 hücre sayısı veya > % 50 fragmantasyon	

3.2.3. Embriyo Biyopsisi

1. ICSI işlemi sonrasında normal olarak döllenmiş grade III embriyolardan biyopsi edildi (43).
2. Biyopsi öncesi blastomerlerin tek nukleus içerdiği test edildi. Her embriyodan bir blastomer alındı (44).
3. Yağ altında HEPES- buffered medium içerisinde embriyo biyopsi işlemi gerçekleştirildi.
4. Embriyolar biyopsi edilmeden önce kalsiyum-magnezyum free medium içerisinde 5 dakika 37ºC'de inkübe edildi.
5. Daha sonra zona pellucidada mekanik olarak yaklaşık 30µm'lik bir delik açılarak bir blastomer aspirasyon pipeti kullanılarak aspire edildi (45).

3.2.4. Blastomer Fiksasyonu

3.2.4.1. Hipotonik Solüsyon Hazırlanması

0.3 mg BSA

0.5 g Sodyum Sitrat

50 ml saf su karıştırılarak 0.2 µm lik filtereden geçirildikten sonra 5 ml'lik kültür tüplerine paylaştırılarak +4ºC'de muhafaza edildi. (46, 47)

Metod

Lam üzerine 3 µl hipotonik solüsyon damlatıldı ve içerisine aspire edilen blastomer hücresi aktarılarak 5 dakika bekletildi (48, 49).

3.2.4.2. Fiksasyon Solüsyonu

25 ml asetik asit

75 ml methanol

Bu ürünler karıştırılarak 5 ml'lik kültür tüplerine paylaştırılarak -20ºC'de muhafaza edildi

Metod

1. Hiptonik solüsyonunun kuruma işlemi tamamlanmadan hemen once 3µl fiksatif solüsyonu blastomer hücresinin üzerine damlatılarak kuruması beklendi.
2. %70-90-100'lük ethanol serilerinin herbirinde 3 dakika bekletildikten sonra kurumaya bırakıldı.
3. Hibridizasyon işlemi sonrasında hücrenin yerini bulabilmek için fikse olan hücrenin yeri cama yazar elmas kalem ile işaretlendi ve slayt üzerinde ki hücrenin lokasyonu mikroskop tablası üzerin deki vernier skalası kullanılarak saptandı.
4. Hibridizasyon işlemi aynı gün gerçekleştirilmediğinde slaytlar -20ºC de muhafaza edildi (50).

3.2.5. FISH Prosedürü

3.2.5.1. Hibridizasyon İşlemi

Slayttaki DNA nın aşırı tuz çözeltisinde dehibrite olup prob DNA sı ile hibridizasyonu esasına dayanan aşamasıdır (51).

Prob karışımının içeriği

PGD probu (13, 18, 21, X ve Y) (Her 5 prob floroforların biri ile direk olarak etiketilenmiştir).

Tablo 3.2. Prob karışımının içeriği

LSI 13 (13q14)	Spectrum kırmızı
CEP 18 (alfa satellite D18Z1)	Spectrum aqua
LSI 21 (21q22.13-21q22.2)	Spectrum yeşil
CEP X (alfa satellite DXZ1)	Spectrum mavi
CEP Y (alfa satellite DYZ3)	Spektrum gold

Metod

1. PGD probları ve slaytlar -20ºC den alınarak oda ısısına gelene kadar bekletildi.
2. 3µl prob solüsyonu slayt üzerinde hücreyi içeren işaretli bölgeye pipet aracılığıyla uygulandı.
3. Hedef bölgenin üzerine 12 mm çapında lamel kapatıldı.
4. Hibridizasyon sırasında prob solüsyonunun kurumaması için slayt parafilm ile kapatıldı.
5. Nemlendirilen havlu kağıtları yerleştirilen siyah bir kutu içerisine slaytlar yerleştirildi ve etüv içerisinde 37ºC de 5 saat bekletildi.

3.2.5.2. Slaytların Yıkanması

Fazla probun ortamdan uzaklaştırılarak yalnış görüntünün engellenmesi amacına dayanmaktadır.

Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

SSC : Sodium saline citrate

1. 20x SSC

175,3 gr NaCl

88.2 gr $Na_3SO_42H_2O$

Distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve pH 5.3'e ayarlandı.

2. 0.4x SSC / %0.3 NP-40 (Hibridizasyon sonrası yıkama solüsyonu)

977 ml saf su

20 ml 20x SSC pH 5.3

3ml NP-40

1000 ml ye tamamlanarak iyice karıştırıldı ve 1N NaOH kullanılarak pH 7.0-7.5 arasında ayarlandı.

3. 2x SSC / %0.1 NP-40

100 ml 20x SSC pH 5.3

899 ml saf su

1 ml NP-40

1000 ml ye tamamlanarak iyice karıştırıldı ve 1N NaOH kullanılarak pH 7.0-7.5 arasında ayarlandı.

Metod

1. Hibridizasyon sırasında 50 ml lik cam bir beher 0.4x SSC / %0.3 NP-40 ile dolduruldu ve 73ºC deki su banyosuna yerleştirildi.
2. 50 ml lik başka bir cam beher 2x SSC / %0.1 NP-40 ile dolduruldu ve oda sıcaklığında bekletildi.
3. Hibridizasyon işlemi tamamlandıktan sonra slaytlardan parafilm uzaklaştırıldı ve hemen sonra 0.4x SSC / %0.3 NP-40 içerisine yerleştirilerek 5 dakika bekletildi ve slaytlardan lamel uzaklaştırıldı.
4. Daha sonra slaytlar 2x SSC / %0.1 NP-40 içerisine aktarılarak bir dakika bekletildi.

5. Slaytlar yıkama solüsyonundan alınarak tamamen kurumaya bırakıldı.
6. Hedef alan üzerine 3µl Antifade II uygulanarak 12 mm lik bir lamel yerleştirildi.

3.2.5.3 Değerlendirme

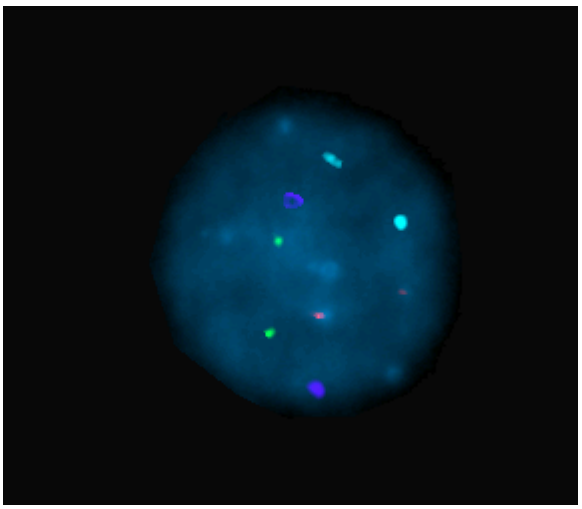
1. Preparatlar değerlendirmeden önce en az yarım saat +4°C'de karanlık bir kutu içierisinde bakletildi.
2. Değerlendirme işlemi için image analizatör sisteminin macprob FISH analiz sistemi seçildi.
3. Her bir blastomer Nikon E-1000 floresan mikroskobu ile bağlantılı single band pass filter sistemi ile değerlendirildi.
4. Her bir filtrenin vermiş olduğu sinyaller probların tanıma bölgelerine göre farklılık gösterdi. Buna göre Mavi filtrede (sperktrum mavi) baktığımızda mavi sinyal X kromozomunun alfa satellitini gösterir. Sarı (spectrum gold) filtrede baktığımızda sarı sinyal Y kromozomunun alfa satellitini gösterir. Yeşil filter (spectrum yeşil) ile baktığımızda yeşil sinyal 21q22.13-21q22.2 bölgelerini gösterir. Kırmızı filter (spectrum kırmızı) ile baktığımızda 13. kromozomun 13q14 bölgesini gösterir. Aqua filresi (spectrum aqua) ile baktığımızda açık mavimsi beyaz sinyal bize 18. kromozomun alfa satellite bölgesini gösterir.

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

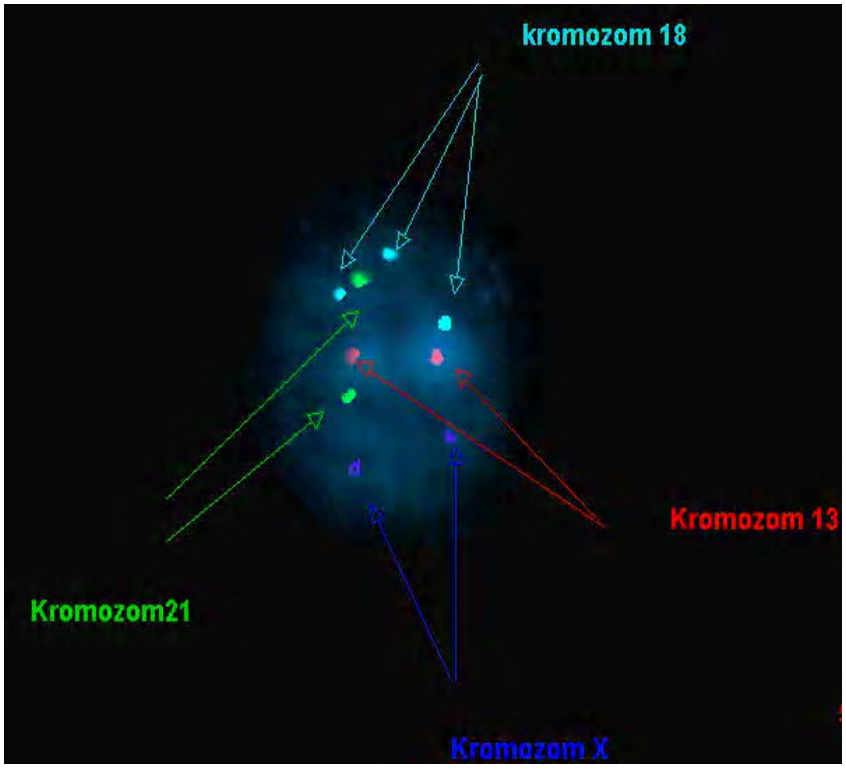
13, 18, 21, X ve Y kromozomları için FISH analizi sonucunda normal olan embriyolar ile anomali gösteren embriyoların elde edildiği hastaların yaş ortancalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal embriyolara sahip hastalar, haploidi ve poliploidi gösteren embriyolar ve anöploidi göstren embriyolara sahip hastaların yaş ortancalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Istatistiksel karşılaştırmalar SPSS 15.0 ile yapıldı. $P< 0.05$ olması anlamlı olarak Kabul edildi.

4. BULGULAR

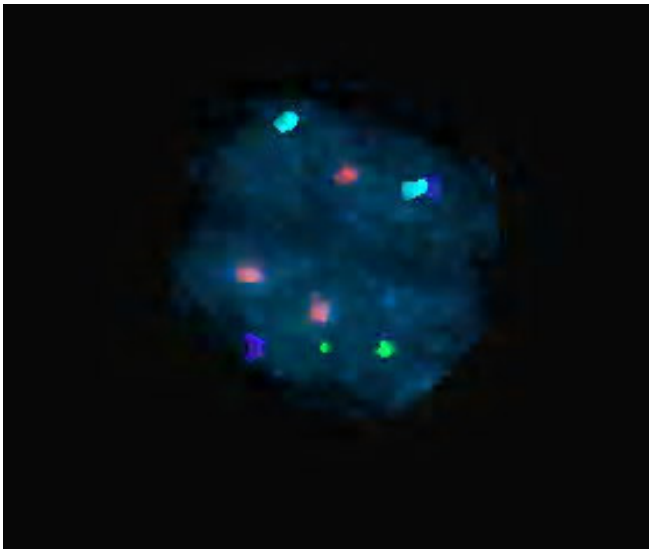
Bu çalışmada, iyi kalitede embriyo gelişimi gösteren 22-36 yaşları arasında 20 hastanın arta kalan grade 3 kalitedeki 3. gün embriyolarından alınan tek blastomerde 13, 18,21, X ve Y kromozomları için anöploidik patolojilere bakılmıştır. Blastomerlerin 15'i bu beş kromozom bakımından normal görünümde olup (Şekil 4.1), üçünde anöploidi (bir trizomi 18, bir trizomi 13, bir monozomi X), birinde triploidi, birinde haploidi bulunmuştur.



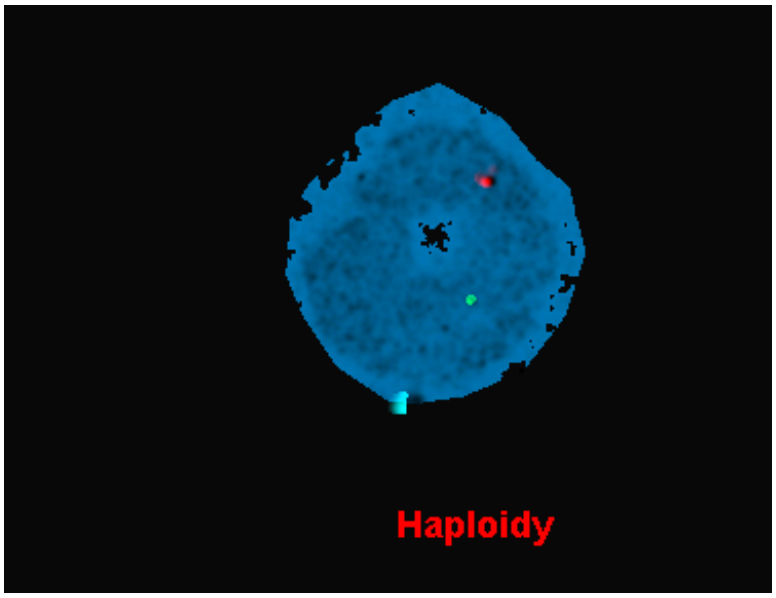
Şekil 4.1. Normal kromozom yapısına sahip blastomer hücresinin FISH görüntüsü



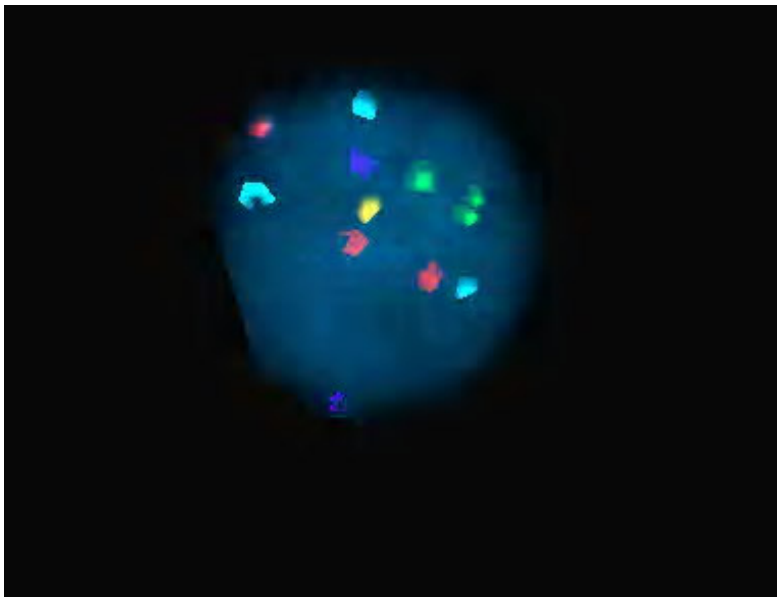
Şekil 4.2. Trizomi 18 gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü



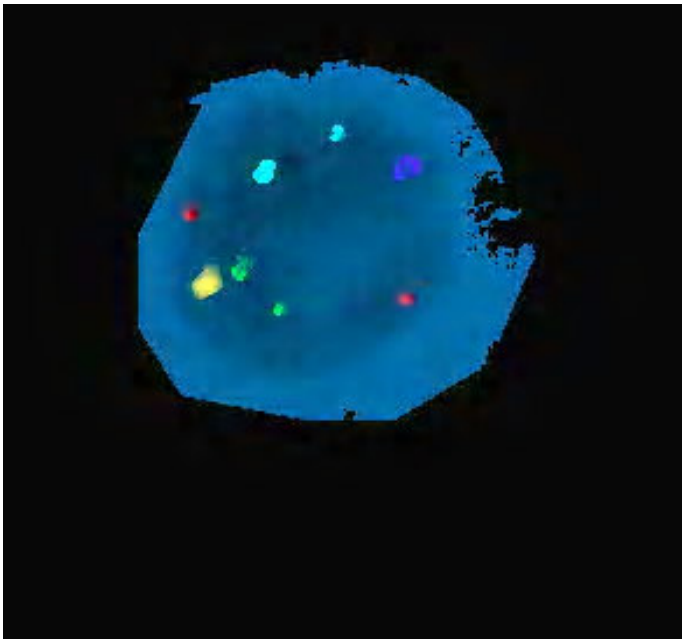
Şekil 4.3. Trizomi 13 gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü



Şekil 4.4. Haploidi gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü



Şekil 4.5. Triploidi gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü



Şekil 4.6. Monozomi X gözlenen blastomer hücresinin FISH görüntüsü

Normal embriyolara sahip hasta yaşlarının ortancası [ortanca (minimum-maksimum)]; 27 (22-35), anomali gösteren embriyolara sahip hastaların yaş ortancası; 28 (25-36) olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P>0.05). Tekrarlayan IVF başarısızlığı gösteren (iki ve üzeri başarısız IVF uygulaması) 7 hastadan elde edilen embriyolardan alınan blastomerlerde herhangi bir anomali gözlemlenmedi. Normal embriyolara sahip hastaların yaş ortancası; 27 (22-35), haploidi ve poliploidi gösteren embriyolara sahip hastaların yaş ortancaları; 28 (25-28) ve anöploidi göstren embriyolara sahip hastaların yaş ortancaları; 34 (32-36) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (P> 0.05).

Tablo 4.1. Hasta yaşı ile anomali varlığının karşılaştırılması

Hasta sayısı	**Hasta yaşı**	**Uygulama sayısı**	**Anomali varlığı**
1	22	1	Normal
2	35	1	Normal
3	32	2	Normal
4	27	1	Normal
5	28	1	**Trizomi 18**
6	27	1	Normal
7	32	1	**Triploidi**
8	23	2	Normal
9	24	3	Normal
10	25	1	**Monozomi X**
11	31	2	Normal
12	26	2	Normal
13	33	1	Normal
14	32	2	Normal
15	28	1	**Trizomi13**
16	25	2	Normal
17	26	1	Normal
18	27	1	Normal
19	36	1	**Haploidi**
20	32	1	Normal

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu, laboratuar şartlarında seçilmiş olan bir spermin seçilmiş bir yumurta içine enjekte edilmesi işlemidir. ICSI işlemini takiben genellikle üçüncü günde morfolojik özelliklerine göre en kaliteli 3 embriyo seçilerek anne rahmine transfer edilmektedir.

Bazen, embriyolarda fazladan bir kromozom ya da eksik bir kromozom olur; buna anöploidi denir. Çoğu kez, embriyo bölünmez ya da bölünmesi birkaç gün sonra durur veya implante olsa bile gelişmesi durur. Ancak, 13, 18, 21, X veya Y kromozomlarının bir fazla olduğu durumlarda gebelik oluşabilir ve anormal bebek doğabilmektedir. Bunlar arasında en sık görüleni trizomi 21 (Down sendromu, mongolizm). Sık görülen diğer anöploidiler Turner sendromu (monozomi X), Klinefelter sendromu (bir X fazla; XXY), Patau sendromu (trizomi 13), Edwards sendromu (trizomi 18). Fazladan bir kromozomu olan çocuklarda genellikle ciddi dış görünüş bozuklukları ile birlikte zeka geriliği ve yaşam süresinin kısalığı vardır. Bahsettiğimiz bu kromozomların dışında kalan kromozomlar etkilenmişse gebelik oluşsa bile hemen her zaman düşükle sonuçlanır. Bunlar arasında en sık görüleni ise 16 nolu kromozomun etkilendiği durumdur.

Genetik bilimindeki son gelişmeler sayesinde birçok kalıtsal hastalığın henüz embriyo düzeyinde iken tanısı konulabilmektedir. Sadece sağlıklı embriyoların seçilerek anneye transfer edildiği bu tekniğe PGD denilmektedir. Bu teknik, genetik hastalıklı çocuk dünyaya getirme riski bulunan ve doğal yolla gebeliği takiben, ilerleyen dönemde amniosentez neticesinde hastalıklı bir gebeliği sonlandırma durumunda kalmak istemeyen çiftler için yeni bir alternatif haline gelmiştir.

FISH yönteminin kullanılması ile gerçekleştirilen PGD, üreme tıbbında önemli bir teknik haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarda insan embriyolarında gerçekleştirilen kromozom analizlerinde, prenatal testlerde rapor edilenden daha yüksek anöploidi oranı gösterilmektedir ve bu gelişimin erken safhalarında kromozomal olarak anormal embriyoların elimine olduğuna işaret etmektedir (52,53). Gebelik sürecinde kromozomal anomali oranını düşürmeye yönelik doğal bir seçim olmasına rağmen yaklaşık %6 oranında ölü doğum (54) ve %0.6 canlı doğum oranları belirtilmektedir (55). Bu nedenle, pek çok araştırmacı embriyonik kayıpların en önemli sebebinin kromozomal anomaliler olduğunu işaret etmektedirler (56, 57).

Baltacı ve arkadaşlarının 132 hasta ve 976 embriyoda 13, 18, 21, X ve Y krmozomları için FISH tekniği ile gerçekleştirdikleri çalışmada, grade III embriyolarda %25.1 anöploidi tesbit etmişler. Hastaları yaşlarına göre 3 gruba ayırdıklarında 33 yaş ve altında %18.3, 34-39 yaş arasında %22.2; 40 yaş ve üzerinde %25 anöploidi oranı bulmuşlar ve yaş ile anöploidi oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Embriyonun morfolojik derecelendirilmesinin öploidi ile ilişkili olduğunu fakat PGD yapılmaksızın iyi kalitedeki embriyoların transferi ile kromozomal olarak anormal embriyoların transfer edilebileceğini öne sürmüşlerdir (58).

Sharon ve arkadaşları, 144 hastadan elde edilen 3. gün embriyolarında (grade I, II, III) kromozom 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X ve Y kromozomları için yapmış oldukları çalışmada hastaları 38 yaş altı ve üstü olarak ikiye ayırdıklarında ileri yaş grubunda önemli oranda anormal embriyo (38 yaş üstü %71.6, 38 yaş altı %61.2) gözlemlemişlerdir. PGD/FISH sonuçları için sitoplazmik fragmantasyonun her iki grup içinde öploid embriyoyu seçmede önemli olduğunu fakat hücre sayısı ile öploidi arasında herhangi bir ilişki olmadığını ve tranfer için embriyo seçiminde PGD'nin morfolojik olarak değerlendirmeye göre daha etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (59).

Baart ve arkadaşları PGD için herhangi bir spesifik nedeni bulunmayan 38 yaş altı 60 kadından elde ettikleri 224 embriyoda 10 kromozom için (1,7,13,15,16,18,21,22,X ve Y) %36 oranında normal embriyoya rastladıklarını belirtmişlerdir (60).

Sayısal kromozom anomalileri implantasyon başarısızlığı ve yüksek oranda embriyonik kayıpla bağdaştırılmaktadır. Anöplidiler başlıca gametogenez sırasında kromozomların ayrılmamasından kaynaklanmaktadır ve yaşla birlikte artmaktadır (61). Ayrılmama olayı (nondisjunction) fertilizasyon sonrası da meydana gelebilmekte ve bu mosaic embriyo gelişimine sebep olabilmektedir (62).

Magli ve arkadaşları inseminasyon sonrası 62. Saatte %10'dan az fragmantasyona sahip, 7 veya 8 hücreli 1607 embriyo analiz edilmiş ve bu embriyoların %51'inin anormal olduğunu belirtmişlerdir (63).

Marquez ve arkadaşları da transfer edilmeyen 731 embriyoda 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarını araştırdıkları çalışmada iyi gelişen embriyolarda anöploidinin daha yaygın olduğunu, yavaş gelişen ve arrest ambriyolarda poliploidinin daha yaygın görüldüğünü belirmişlerdir (64).

Hardarson ve arkadaşları 2. Gün 4 hücreli embriyolarda 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarını araştırdıkları çalışmada, embriyoları uneven (11) ve even (13) embriyolar olarak ayırdıklarında, uneven klivaj gösteren embriyoları even klivaj gösteren embriyolarla karşılaştırdıklarında önemli derecede yüksek anöploidi (%54.5 ve %30.8) oranı belirtmişlerdir (65)

Bu sonuç, mevcut embriyo değerlendirme sisteminde blastomer çapı üzerinde daha çok durulması gerektiğini vurgulamaktadır.

Bizim çalışmamızda, 37 yaş altı 20 hastanın transfer edilmeyen 20 embriyosundan elde edilen bir blastomerın FISH uygulaması ile 13,18,21, X ve Y kromozomları incelendiğinde %25 oranında kromozomal anomali bulunmuştur. Anöploidi oranı %15, poliploidi %5, haploidi oranı %5 olarak bulunmuştur. Bu oran literatürdeki oranlardan daha düşük olarak bulunmuştur, bunun sebebi hasta sayısında ki yetersizlik olabilir.

Sayısal kromozom anomalileri implantasyoon başarısızlığı ve yüksek oranda embriyonik kayıpla bağdaştırılmaktadır. Anöplidiler başlıca gametogenez sırasında kromozomların ayrılmamasından kaynaklanmaktadır ve yaşla birlikte artmaktadır(66).

Ayrılmama olayı (nondisjunction) fertilizasyon sonrası da meydana gelebilmekte ve bu mosaic embriyo gelişimine sebep olabilmektedir (67).

İmplantasyon, embriyo kalitesi, endometrial reseptivite ve immün sistem gibi bir çok faktörün senkronizasyonunu gerektiren oldukça kompleks bir süreçtir. Tekrarlayan IVF başarısızlığı; 2 veya daha fazla başarısız IVF siklusu veya 10 veya daha fazla iyi kalitede embriyo transferine rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır. Bu durumla ilgili, artmış sayısal kromozom anomalileri, azalmış endometrial reseptivite ve yetersiz transfer teknikleri gibi birçok etiyoloji öne sürülmektedir (68).

İleri anne yaşında, yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen düşük başarı oranı bir çok faktörle bağdaştırılmaktadır. Bu faktörler endometriyum veya oosit kaynaklı olabilmektedir. Bozulmuş hormonal çevre, yetersiz uterus kan akımı, yetersiz endometrial proliferasyon, azalmış endometriyum reseptivitesine ve implantasyon başarısılığına sebep olabilmektedir. Ayrıca ileri anne yaşında düşük başarı oranını, kromozomal düzensizlikler, yaşlı oosit ve düşük embriyo kalitesi ile açıklanabilmektedir. Bu tanımı, genç kadınlarda alınan yumurtaların yaşlı kadınlara transfer edilmesi sonucu başarılı gebelik elde edildiğini gösteren çalışmalar desteklemektedir (69).

Gianaroli ve arkadaşları, tekrarlayan IVF başarısızlığı olan 22 hastadan elde edilen 7-8 hücreli embriyoları 13,18,21, X ve Y kromozomları için FISH uygulaması ile değerlendirmişler. Kromozomal anomali yüzdesi tekrarlayan IVF başarısızlığı grubunda %57 olarak tesbit etmişler. Bundan dolayı bu gruptaki hastalarda normal FISH komplementi gösteren embriyoların transferinin gebelik şansını arttırabileceğini ileri sürmüşlerdir (70).

Kahraman ve arkadaşları, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan (ortalama yaş 30.3±3.1) 23 hastadan elde edilen embriyoları (7 hücre ve üzerinde blastomer sayısı, %30'un altında fragmantasyon gösteren embriyolar çalışmaya dahil edilmiştir) 13, 18, 21, X ve Y kromozomları için FISH analizi ile değerlendirmişlerdir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan grupta kromozomal anomali oranı %43.2 olarak bulmuşlar ve anormal embriyorın %66.7'sinin anöploidi, %8.3'ü poliploidi ve %6.2 haploidi bulmuşlardır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığında hastalara PGD tavsiye edilmesini önermişlerdir (71).

Tekrarlayan IVF başarısızlığı olan 38 yaş ve altında 140 infertil çifti içeren çalışmalarında Kayhan ve arkadaşları, bu çiftlerin 54'ünde PGD (13,16, 18,21,22, X ve Y) gerçekleştirmişler ve geri kalan 86 hasta kontrol grubu olarak değerlendirmişlerdir. Elde edilen 308 embriyonun 104'ü (%33.8) öploid, 204'ünün (%66.2) anöploid olduğunu tesbit etmişler fakat 2 grup arasında implantasyon oranı bakımından istatiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ve bunun az sayıda hasta sayısından kaynakladığını ileri sürmüşlerdir (72).

Bu çalışmamızda seçilen 20 hastanın 7 sinde (yaş ort; 27.4) tekrarlayan IVF başarısızlığı gözlemlenmektedir. Bu hastaların embriyolarından alınan blastomerlerin kromozom 13, 18, 21, X ve Y bakımından incelenmesi sonucu yapılan çalışmalardan çok farklı olarak herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır. Bunun sebebi hasta sayısındaki yetersizlik olarak değerlendirilmiştir.

IVF kliniklerinin çoğu 3. gün embriyo transferini seçmektedirler. Her laboratuarın 3. gün embriyo skorlama sistemi farklı olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda morfolojik olarak iyi kalitedeki embriyoların yüksek anöploidi riskine sahip olduğu gösterilmektedir ve tek başına morfolojik değerlendirmenin transfer öncesinde yeterli olmadığı öngörülmektedir.

Sonuç olarak, transfer öncesi pre-implantasyon genetik tanının erken gebelik kayıplarını azaltacağı ve devam eden gebelik oranlarını arttıracağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon İndüksiyonu. I. Baskı. 2000; 122-155
2. Şahmay S, Atasu T,İnfertilite. Jinekoloji. Nobel Kitabevi. 2.baskı.2000; 460-479
3. Speroff L, Fritz MA. Klinik jinekolojik endokrinolji ve infertilite (eds), Erk A, Günalp S. 7. baskı. 2007; 478-816
4. Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, et al. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ed. Güneş Yayınları, 1996 ; 1287-1288
5. Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis LM, Liu HC, Jones GS, Rosenwaks Z. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 1988; 50:298.
6. Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z, Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 1989;51:651
7. NgEH, Chui DK, Tang OS, Lau EY,Yeung WS, Chung HP. In vitro fertilization and embryo transfer during naturel cycles, J Reprod Med 2001; 46:95
8. Claman P, Domingo M, Garner P, Leader A, Spence JEH. Naturel cycle in vitro fertization-embryo transfer at the Unıvesty Ottawa: an inefficient therapy for tuba infertility. Fertil Steril 1993; 60:298.

9. Sung I Roh MD, William G Doods MD, Jong M Park MD, Sherif G Awadalla MD, Chad I Friedman MD et al: In vitro fertilization with concurrent pelvic reconstructive surgery. Fertil Steril 1988, 49(1):96-99.

10. Robert D , Vincent JR, MD: In vitro fertilization and other assisted reproductive techniques. In David H. Chestnut (eds): Obsteteric anesthesia Mosby Inc. 1999:249-262.

11. Cohen J, Mailer H, Fehilly C, et al. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. Lancet 1988; 2:162.

12. Cohen J, Marker H, Wright G, et al. Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. Hum. Reprod. 1989; 4:435.

13. Laws-King A, Trounson A, Trounson A, Sathananthan H, ct al. Fertilizasyon of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. Fertil Steril. 1987; 48:637.

14. Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. Hum Reprod. 1992; 7: 248.

15. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, et al. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa in to human oocytes. Fertil Steril. 1988; 49:835.

16. Iritani A. Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. Mol Reprod Dev. 1991; 28:199.

17. Palermo G, Joris H, Devroey P, el al. Sperm characterictics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1993; 5:826.

18. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm. Hum Reprod. 1993; 8:1061.

19. Reis H. Reprodictive Medicine from A-Z: Oxford Medical publications 1998:97.

20. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo qulıty and viability. Hum Reprod,1997;12(7):1531-1536.

21. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van De Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towerds single embryo transfer. Hum Reprod. 1999; 14(9):2345-2349.

22. 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(7):1545-1549.

23. Roseboom TJ, Vermedien JP, Schoute E, Lens JW, Schats R. The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the avarage morphology score, as revealed by multıple logistic regression analysis. Hum Reprod. 1995; 10(11): 3035-3041.

24. Hartshorne G. The embriyo. Hum Reprod. 2000; 15:4:31-41.

25. Rienzi L, Ubaldi F, Minasi MG, Lacobelli M, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Blastomere cytoplasmic granularıty is unreleated to developmental potential of day 3 human embryos. J Assist Reprod Genet. 2003; 20(8):314-317.

26. Delilbaşı L. Tüp Bebek Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuar Yöntemleri, Baysev Vakfı Yayınları. 1997; 10.

27. Nussabaum RL. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. Güneş Kitabevi. 2005(6. Baskı); 445: 140-143.

28. Therman E. Human Chromosomes Structure, Behaviour Effects.1980; 145-148.

29. Başaran N. Tıbbi Genetik. Güneş & Nobel Kitapevi. 1999 (8.Baskı); 465, 161-163.

30. Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilivie CM. Preimplantation genetic diagnosis. Nature Rev. 2002; 3:941-953.

31. Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. Lancet 2004; 363: 1633-1641

32. Kuliev A, Yerlinsky Y. Place of preimplantation diagnosis in genetic practice Am J Med Genet 2005; 134A: 105-110.

33. Baart EB, Martini E, et al. Preimplantation genetic diagnosis reveals a Kigh madence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. Hum Reprod. 2006; 21:223-233.

34. Staessen C, Platteau P, Van Assche E et al, Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. Hum Reprod 2004; 19: 2849-2858.

35. Munne S, Chen S, Fischer J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in wornen aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriage Fertil Steril. 2005; 84: 331-335.

36. Carp HA, Dirnfeld M, Dor J, Grudzinksas JG. ART in recurrent miscarrîage: preimplantation genetic diagnosis/screening ör surrogacy? Hum Reprod 2004; 19: 1502-1505.

37. Polak JM, McGEE, J.O.D. (Ed.): İn Situ Hybridization Principles and Practise. Oxford Universty Pres. 1990; 135-145.

38. Harper JC, Delhanty JDA, Handyside AH (Eds). Preimplantation genetic diagnosis. John Wiley and Son Ltd, Chichester, 2001; 234-235.

39. Verlinsky Y, Kuliev E (Eds). An atlas of preimplantation genetic diagnosis. The Pathenon Publishing Group, New York.2000; 123-132.

40. Başaran N. (Ed.) Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon. 1996; 32-33.

41. Harper JC, Dawson K, Delhanty JDA and Winston ML. The use of fluorescent in-situ hybridization (FISH) for the analysis of in-vitro fertilization embryos: a diagnostic tool for the infertile couple. Hum. Reprod. 1995; 10: 3255-3258.

42. Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, et al. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. Human Reprod. 2002; 17: 3193-3200.

43. Joris H, De VosA, Janssens R, Devroey P, et al. Comparasion of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acide Tyrode medium or a laser. Hum Reprod. 2003; 15: 2003-2007.

44. Van de Velde H. De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, Lissens W, Van Ranst H, Liebaers I, et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a wiev to preimplantation genetic diagnosis. Prenat Diagn. 2000; 20: 1030-1037.

45. Staessen C, Platteau P, et al. Comparision of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: prospective randomized controlled trial. Hum. Reprod. 2004; 19: 2849-2858.

46. Munne S, Weier HUG, Stein J. Grifo J, Cohen J. A fast and efficient method for simultaneous X and Y in-situ hybridization of human blastomeres. J Assist Reprod Genet . 1993a; 10; 82-90.

47. Kligman İ, et al. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. Hum. Reprod. 1996; 11: 1492- 1498.

48. Handyside AH. Clinical evaluation of preimplantation genetic diagnosis. Prenat Diagn. 1998; 18: 1345-1348.

49. Bielanska M, et al. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome. Hum Reprod. 2002; 17: 413-419.

50. Rubio C, Simon C, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. Hum Reprod. 2003; 18: 182-188.

51. Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's wiev. Hum. Reprod. 2002; 18: 11-20.

52. Clouston HJ, Herbert M, Fenwick J, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts. Prenatal Diagnosis. 2002; 22: 1143-1152.

53. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, et al. Developmental ability of chromosomally abnormal embryos to develop to the blastocyst stage. Human Reproduction. 2001; 16: 1954-1958.

54. Machie GA, Crolla JA. Chromosome constitution of infants dying during the perinatal periyod. Human genetic. 1974; 23: 183-188.

55. Nielsen J. Chromosome examination of new born children. Purpose and ethical aspects. Humangenetic. 1975; 26: 215-222.

56. Munne S, Cohen J, Simpson JL. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. 2007; 357(1): 9-17.

57. Los F, Van Opstal D, Van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal mosaic embryos: a theoretical model. Human Reproduction. 2004; 10: 79-84.

58. Baltacı V, Şatıroğlu H, et al. Relationship between embryo quality and aneuploidies. Reprod Biomed. 2006; 12 (19): 77-82.

59. Sharon E, et al. Day 3 embryo morphology predicts euploidy among older subject. Fertil Steril. 2008; 89: 118-23.

60. Baart EB, Martini E, van den Berg I. Preimplantation genetic screning reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoin IVF. Human Reproduction. 2006; 21: 223-233.

61. Munne S, et al. Embyo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. Fertility and Sterility, 1995; 64: 382-391.

62. Delhanty JD, Handyside A. The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo. Human Reproduction .1995; 1: 201-215.

63. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP. Chromosomal abnormalities in embryos. Mol Cell Endocrinol. 2001; 183: 29-34.

64. Marquez C, Sandalinas M, et al. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. Reprod Biomed. 2000; 1(1):17-26.

65. Hardarson,T, et al. Human embryos with uneven sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. Human Reproduction . 2001;16: 313-318.

66. Munne S, et al. Embyo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. Fertility and Sterility.1995; 64: 382-391.

67. Delhanty JD, Handyside A. The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo. Human Reproduction. 1995; 1: 201-215.

68. Donoso P, et al. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. Human Reproduction. 2007; 13: 15-25.

69. Navot D, Drews M, Bergh PA, et al. Age related decline in female infertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embriyo implantation. Fertil Steril. 1994; 61: 191-207.

70. Gianaroli L, et al. Will preimplantation genetic diagnosis asist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? Hum Rep. 1997;12: 1762-1767.

71. Kahraman S, et all. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patient with advanced maternal age and recurrent implantation failure. Human Reproduction.2000;15: 2003-2007.

72. Yakin K, et al., The effect of preimplantation genetic screening on the probability of live birth in young women with recurrent implantation failure; a nonrandomized paralel group trial. Europan Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2008;140: 224-229.

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
İLAÇ ARAŞTIRMALARI YEREL ETİK KURULU
(Talas Yolu Üzeri 38039 KAYSERİ Tel 0 352 437 49 10 -11 Faks: 0 352 437 52 85)

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ		
	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Pre-Embriyolardan elde edilen blastomer hücrelerinde anöploidik patolojilerin saptanması
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr. Munis Dündar
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	
	FAZI	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	[ ] Tek Merkez [ ] Çok Merkez [X] Ulusal [ ] Uluslararası

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No.su	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe [X] İngilizce [ ]
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			Türkçe [X] İngilizce [ ]
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ			Türkçe [X] İngilizce [ ]
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe [X] İngilizce [ ]

KARAR BİLGİLERİ

Karar No: 2008/23 **Karar :** 08.01.2008

Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Munis Dündar'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve Kurulumuz kararının sorumlu araştırıcıya ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KLAVUZU

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ümit UKŞAL Başkan	Dermatoloji	E.Ü. Tıp Fak.	K	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Prof. Dr. Kader KÖSE Üye	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	K	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU Üye	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ Üye	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Prof. Dr. Murat AKSU Üye	Nöroloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK Üye	Radyodiagnostik	E.Ü. Tıp Fak.	E	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri ULUSOY Üye	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Zübeyde ÇELEBİ Avukat	Avukat	E.Ü	K	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	

* Araştırma ile ilişkili
** Toplantıda bulunma

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Çankırı'da doğdu. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2001-2005 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Tüp Bebek Merkezinde embriyolog olarak çalıştı. 2004 yılında Ankara Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji ve Kadın Doğum Tüp Bebek Merkezinden ÜYTEM Embriyoloji kurs sertifikasını, 2006 yılında ÜYTEM ICSI sertifikasını aldı. . 2005 yılında Erciyes Üniversitesi Kadın Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezinde embriyolog olarak çalışmaya başladı. 2005 yılında güz döneminde Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Şu anda Yüksek Lisans tez dönemine devam etmektedir.

E-mail: betlzdemir@yahoo.com