YENİ NESİL DİZİLEME (NEXT GENERATION SEQUENCING; NGS) TEKNİĞİ İLE PREİMPLANTASYON GENETİK TARAMA YAPILMIŞ IVF HASTALARININ EMBRİYOLARINDA ANÖPLOİDİ ORANLARININ, KADIN YAŞINA GÖRE RETROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ

Emre SOYALAN

YÜKSEK LİSANSTEZİ
Klinik Embriyoloji Programı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet CINCK

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ağustos, 2018

YENİ NESİL DİZİLEME (NEXT GENERATION SEQUENCING; NGS) TEKNİĞİ İLE PREİMPLANTASYON GENETİK TARAMA YAPILMIŞ IVF HASTALARININ EMBRİYOLARINDA ANÖPLOİDİ ORANLARININ, KADIN YAŞINA GÖRE RETROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ

Emre SOYALAN

YÜKSEK LİSANSTEZİ
Klinik Embriyoloji Programı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet CINCK

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emre SOYALAN "Yeni nesil dizileme (next generation sequencing; NGS) tekniği ile preimplantasyon genetik tarama yapılmış IVF hastalarının embriyolarında anöploidi oranlarının, kadın yaşına göre retrospektif olarak incelenmesi" başlıklı tezi 15/08/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi **oy birliğiyle / oy çokluğuyla** olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı. Adı ve Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Mehmet CINCIK	.....
Üye	: Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ	.....
Üye	: Prof. Dr. Özgür DUNDAR	.....

Prof. Dr. Zeliha ÖZER
Enstitü Müdürü

2.İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilmeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; çalışmanın Maltepe Üniversitesinde kullanılan "bilimsel intihal tespit programı" ile tarandığını ve öngörülen standartları karşıladığını beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

08/08/2018

Emre SOYALAN



iv

3.İNTİHAL RAPORU

4.TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesi sırasında desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen her türlü konuda bana destek olan ve yüksek lisansa başlamamı sağlayan tez danışman hocam Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Mehmet CINCIK'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez ile ilgili verilerin toplanmasında bana yardımcı olan ve bu konuda desteğini benden esirgemeyen Tüp Bebek Koordinatörü **Sayın Atınç GENÇ'e** teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam süresince, fikir, öneri ve yardımlarından dolayı **Dr. Berk BULUT**, **Embriyolog Gözde KÖKSAL** ve **Bio. Seçkin YALÇINKAYA**'ya teşekkür ederim.

Meslek hayatı boyunca ışık tutmayı kendine görev edinmiş akıl hocam en büyük destekçim Gazimağusa Tıp Merkezi Tüp Bebek Laboratuvar Sorumlusu **Embriyolog Zerrin ERGİN'e** bilgisi ve tecrübesi ile her daim aydınlatan, meslek hayatım boyunca her daim yanımda olan, Liv Hospital Tüp Bebek Laboratuvar Koordinatörü **Dr. Engin ENGİNSU'ya** teşekkürlerimi sunarım.

Emre SOYALAN

Ağustos, 2018

5.ÖZ

YENİ NESİL DİZİLEME (NEXT GENERATION SEQUENCING; NGS) TEKNİĞİ İLE PREİMPLANTASYON GENETİK TARAMA YAPILMIŞ IVF HASTALARININ EMBRİYOLARINDA ANÖPLOİDİ ORANLARININ, KADIN YAŞINA GÖRE RETROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ

Emre Soyalan

Yüksek Lisans Tezi

Klinik Embriyoloji Programı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet CINCIK

Maltepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018

Bu çalışmada yeni nesil dizileme (Next Generatıon Sequencıng; NGS) tekniğinde genetik analiz ile, kadın yaşına göre gruplandırma yapılan hastalarda; anöploid blastokist oranları ile ilgili değerlendirmeler yapılarak maternal yaşın preimplantasyon genetik tarama sonuçlarına nasıl bir etkide bulunduğunu retrospektif olarak araştırdık.

Çalışmamızda 1 Ocak 2016 ile 31 Aralık 2017 tarihleri arasında Şişli Kolan İnternatioal Hospital Tüp Bebek Kliniğine gelen 80 hastanın dosyası geriye dönük olarak incelendi. Çalışmamızda NGS tekniği ile PGT-A uygulanan hastalar yaş gruplarına ayrılarak, hastaların embriyolarındaki anöploidi oranları analiz edildi. Prognostik değerler PGT-A sonuçlarına göre; öploid blastokist ve anöploid blastokist parametrelerine göre değerlendirildi. Grupların prognostik değerlerle istatistiksel analizi (SPSS) sonucunda yaş gruplarına göre anöploid blastokist oranlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Kadın yaşı ilerledikçe anöploidi oranlarının arttığı görülmüştür (p=0,001).

Anahtar kelimeler:1. Yeni nesil dizileme (NGS);
2. Blastokist; 3. Anöploid; 4. Preimplantasyon genetik tarama(PGT-A).

6. ABSTRACT

RETROSPECTIVE ANALYSİS OF ANEUPLOIDY RATES IN IVF PATİENT'S EMBRYOS WITH PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING (PGT-A) WITH NEXT GENERATION SCREENING (NGS) ACCORDING TO MATERNAL AGE.

Emre Soyalan

Master Thesis

Clinical Embryology Program

Advisor: Prof. Dr. Mehmet CINCIK

Maltepe University Health Sciences Institute, 2018

Genetic analysis of Next Generation Sequencing was done on groups of patients divided by their maternal age: Analysis of aneouploid blastocyst percent ages and its effect on preimplantation genetic screening results according to the maternal age was evaluated retrospectively.

The study period was between January 1st. 2106 and December 31st. 2017 in Şişli Kolan Hospital Assisted Reproductive Technologies Unit. Files of 80 patients were reviewed retrospectively.

Patients subjected to PGT-A with NGS were divided according to their age groups and their aneuploidy rate evaluated. Prognostic values according to the PGT-A results were evaluated on the basis of the euploid and aneuploid blastocyst parameters.

There was a statistically significant difference (SPSS) between the age groups according to their aneuoplody blastocyst rates. Ansignificant increase in aneuoploidy rates with elevated maternal age was detected (p=0.001).

Key Words:1. Next Generation Sequencing (NGS); 2.Blastocyst; 3.Aneuoploid; 4. Preimplantation genetics creening–aneuoploidy (PGT-A)

7.İÇİNDEKİLER

1. JÜRİ VE ENSİTÜ ONAYI .....**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

2.İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

3.İNTİHAL RAPORU iii

4.TEŞEKKÜR vi

5.ÖZ.....vii

6. ABSTRACT viii

7.İÇİNDEKİLER.....ix

8.ŞEKİLLLER LİSTESİ xii

9.TABLOLAR LİSTESi xiii

10.KISALTMALAR DİZİNİ xiv

11.ÖZGEÇMİŞ xv

BÖLÜM 1. GİRİŞ 1

1.1. Problem 2

1.2. Amaç 2

1.3. Önem 2

1.4. Varsayımlar 2

1.5. Sınırlıklar.....3

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. İnfertilite.....4

2.1.1. Tanımı.....4

2.1.2. İnfertilite Nedenleri 4

2.1.2.1. Kadına Ait İnfertilite Nedenleri.....4

2.1.2.2. Erkeğe Ait İnfertilite Nedenleri 8
2.1.2.3. Açıklanamayan İnfertilite 9
2.2. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi 9
2.2.1. Kadın Hastanın Değerlendirilmesi 9
2.2.2. Erkek Hastanın Değerlendirilmesi 11
2.3. Yardımcı Üreme Teknikleri Endikasyonları 13
2.4. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ovulasyon İndüksiyonu 15
2.4.1. GnRH Agonist Protokol (Uzun protokol) 15
2.4.2. GnRH antagonist protokol (Kısa protokol) 16
2.5. İn Vitro Fertilizasyon Uygulamaları 17
2.5.1. Tarihçesi 17
2.5.2. Yumurta Toplama İşlemi (Oocyte Pick-Up, OPU)) 17
2.5.3. Denüdasyon İşlemi 18
2.5.4. Klasik İn Vitro Fertilizasyon 19
2.5.5. İntrasitopazlmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) 19
2.5.6. Fertilizasyon Ve Embriyo Gelişimi 20
2.5.6.1. Pronukleus Değerlendirmesi 20
2.5.6.2. Bölünme Evresi Embriyo Gelişimi 21
2.5.6.3. Blastokist Evresi 23
2.5.7. Assisted Hatching Prosedürü (AHA) 24
2.5.8. Embriyo Biyopsi Yöntemleri 25
2.5.8.1. Blastomer Biyopsi Yöntemi 25
2.5.8.2. Polar Cisim Biyopsi Yöntemi 26
2.5.8.3. Trofektoderm Biyopsi Yöntemi 27
2.5.9. Preimplantasyon Embriyolarının Genetik Analizi 29
2.5.9.1. Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) 29

2.5.9.2. Preimplantasyon Genetik Tarama (PGT-A) 30
2.5.10. NGS Tekniği İle Preimplantasyon Genetik Tarama 32
2.5.11. Embriyo Transferi 36
BÖLÜM 3. YÖNTEM 37
3.1. Araştırma Modeli 37
3.2. Evren ve Örneklem 37
3.3. Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 37
3.4. Veriler ve Toplanması 38
BÖLÜM 4. BULGULAR VE YORUMLAR 40
BÖLÜM 5. SONUÇ 57
5.1. Özet 57
5.2. Yargı 57
5.3. Öneriler 60
12.KAYNAKÇA 62

8.ŞEKİLLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Erkekte infertilite nedenlerinin etyolojisi ve dağılımı (14)..... 9
Şekil 2.2: Opu işleminde overyan follikülden aspire edilen oosit-kumulus hücre kitlesi 18
Şekil 2.3: Denüdasyon işlemi sonrası 19
Şekil 2.4: Pronüklear evre 21
Şekil 2.5: Bölünme evresi 22
Şekil 2.6: Beşinci gün aşamasına ulaşmış blastokistler 24
Şekil 2.7: Üçüncü gün embriyosunda, lazer ışını yardımıyla zona pellusida da oluşturulan açıklık (assisted hatching, AHA) 25
Şekil 2.8: Trofektoderm Biyopsi Yöntemi 28
Şekil 2.9: flow cell kanalları 33
Şekil 2.10: Çalışma mekanizması 34
Şekil 2.11: aCGH test stimülasyonu ve süreleri 35
Şekil 2.12: NGS test stimülasyonu ve süreleri 35
Şekil 2.13: NGS ve aCGH tekniklerinin analiz verilerinin karşılaştırılması . 36
Şekil 4.1: Yaş Dağılımı 40
Şekil 4.2: ET Transfer Sonuçlarının Dağılımı 41
Şekil 4.3: Yaş Gruplarına Göre ET Sonuçlarının Dağılımı..... 45
Şekil 4.4: Yaş Gruplarına Göre Oosit Sayılarının Dağılımı..... 47
Şekil 4.5: Yaş Gruplarına Göre MII Sayılarının Dağılımı 47
Şekil 4.6: Yaş Gruplarına Göre GV Sayılarının Dağılımı 48
Şekil 4.7: Yaş Gruplarına Göre Fertilizasyon Sayılarının Dağılımı 50
Şekil 4.8: Yaş Gruplarına Göre Biyopsi Sayılarının Dağılımı..... 50
Şekil 4.9: Yaş Gruplarına Göre Cryo Sayılarının Dağılımı 51
Şekil 4.10: Yaş Gruplarına Göre Öploid Blastokist Sayılarının Dağılımı 53
Şekil 4.11: Yaş Gruplarına Göre Öploid Oranlarının Dağılımı 54
Şekil 4.12: Yaş Gruplarına Göre AnöploidBlast Sayılarının Dağılımı 54
Şekil 4.13: Yaş Gruplarına Göre Anöploid Oranlarının Dağılımı 55
Şekil 4.14: Yaş Gruplarına Göre ET Yapılan Öploid Sayılarının Dağılımı... 56

9.TABLOLAR LİSTESi

Tablo 2.1: Anovulasyon-oligomenore klasifikasyonu 6
Tablo 2.2: Polikistik Over Sendromu Tanı Kriterleri 7
Tablo 2.3: Semen analizi referans değerleri (WHO)..... 12
Tablo 2.4: Semen Değişkenlerinin Terminolojisi 13
Tablo 2.6: Blastokist gelişim düzeyi puanlanması..... 23
Tablo 2.7: İç hücre kitlesi (ICM) puanlanması 23
Tablo 2.8: Trofektoderim puanlanması..... 24
Tablo 4.1: Katılımcıların yaş dağılımları 40
Tablo 4.2: Transfer ve Sonuç Değişkenlerinin Dağılımı 41
Tablo 4.3: Oosit, MII, MI, GV Değişkenlerinin Dağılımları..... 42
Tablo 4.4: Fertilizasyon, Biyopsi Sayısı, Cryo Sayısı ve NGS Yapılan Blastokist Değişkenlerinin Dağılımları..... 43
Tablo 4.5: ET Yapılan Öploid Sayısı, Öploid Blastokist Sayısı, Öploid Oranı, Anöploid Blastokist Sayısı, Anöploid Oranı, Ampflikasyon Kaybı Sayısı ve Ampflikasyon Oranı Değişkenlerinin Dağılımları..... 44
Tablo 4.6: Yaş Gruplarına Göre Sonuçların Değerlendirilmesi..... 45
Tablo 4.7: Yaş Gruplarına Göre Oosit, MII, MI, GV ve Diğer İşlem Sayılarının Değerlendirilmesi 46
Tablo 4.8: Yaş Gruplarına Göre Fertilizasyon, Biyopsi Yapılan Blastokist Sayılarının ve NGS Yapılan Blastokist Sayılarının Değerlendirilmesi 49
Tablo 4.9: Yaş gruplarına göre Fertilizasyon, Biyopsi Yapılan Blastokist Sayılarının ve NGS Yapılan Blastokist Sayılarının Değerlendirilmesi 52

10.KISALTMALAR DİZİNİ

aCGH	: Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
ET	: Embriyo transferi
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
HLA	: Doku uyumluluğu loküs antijeni
GnRH	: Gonadotropin salınımını sağlayan hormon
GnRH-a	: Gonadotropin salınımını sağlayan hormon agonistleri
hCG	: İnsan koriyonik gonadotropin hormonu
HMG	: Human menopozal gonadotropin
ICSI	: Intrasitoplâzmik sperm enjeksiyonu
IVF	: In-vitro fertilizasyon
KA	: Kompleks anöploidi
KOH	: Kontrollü ovaryen hiperstimülasyon
LH	: Lüteinleştirici hormon
NGS	: Yeni nesil dizileme
PGT-A	: Preimplantasyon genetik tarama-anöploidi
TİB	: Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı
OPU	: Yumurta toplama işlemi
Oİ	: Ovulasyon indüksiyonu
USG	: Ultrasonografi
ÜYTE	: Üremeye yardımcı tedavi
WGA	: Tüm Genom Amplifikasyonu

11.ÖZGEÇMİŞ

Emre SOYALAN

Klinik Embriyoloji Programı

Eğitim

Derece	*Yıl*	*Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı*
Y.Ls.	2015	Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü Klinik Embriyoloji Programı
Ls.	2010	Marmara Üniversitesi, Biyoloji
Lise	2006	20 Temmuz Fen Lisesi

İş/İstihdam

Yıl	*Görev*
2018 -	Biyolog. Liv Hospital
2017- 18	Biyolog. Kolan İnternational Hospital
2016-17	Biyolog. Liv Hospital

Mesleki Birlik/Dernek Üyelikleri

Yıl	*Kurum*
2016 -	Üye: Klinik Embriyoloji Derneği

Kişisel Bilgiler

Doğum yeri ve yılı : Lefkoşa,1992 Cinsiyet: Erkek
Yabancı diller : İngilizce
GSM / e-posta : 05343211992 / emresoyalan@hotmail.com

BÖLÜM 1. GİRİŞ

IVF laboratuvarında, embriyoların gelişimleri ortalama beş ile altı gün arası takip edilmektedir. Bu sürede amaç, embriyoların morfolojik değerlendirilmesiyle transfer edilecek en iyi embriyoyu seçmek ve gebelik şansını arttırmaktır. Beşinci gün en iyi kaliteye sahip blastokist transferi diğer günlere kıyasla hem daha yüksekimplantasyon hem de azalan abort oranlarına ulaşılmasını sağlamaktadır. Fakat embriyo morfolojisi ve diğer non-invaziv laboratuvar değerlendirme metodları gibi standart embriyo takip stratejileri kapsamında embriyoların kromozomal açıdan değerlendirilmesi yoktur.

Embriyo morfolojisinin ve gelişme hızının mikroskop altında ya da time lapse incelenmesi, öploid embriyoları anöploid embriyolardan ayırt edememektedir.

İleri anne yaşı ve embriyoların kromozomal anöploidi oranı arasındaki bağlantı, implantasyon ve gebelik üzerindeki olumsuz etkisi uzun yıllardır bilinmektedir. Bu etki ortaya koyulan çalışmalar ve veriler ile İn Vitro Fertilization (IVF) ve yardımcı üreme teknikleri (ÜYTE) ile elde edilen embriyolarının analizlerinden elde edilen veriler ile doğrulanmıştır. İlerleyen anne yaşı ile birlikte embriyolarda kromozomal anomali oranında artış gözlenmektedir. İleri maternal yaşın mayotik ayrılamama "non-disjunction" ile olan bağlantısı bilinmektedir. IVF uygulamalarında anöploid embriyoların transferlerinin eliminasyonu, implantasyon ve sağlıklı doğum oranlarının artırılması için Preimplantasyon Genetik Tarama (PGT-A) için 5. gün trofoektoderm biyopsisi yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

.

1.1.Problem

İnfertilite, reprodüktif çağda doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, 35 yaş altı kadınlarda en az 12 ay ve 35 yaş üstü kadınlarda ise 6 ay düzenli ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır (1). İnfertilite tüm dünyada bölgeden bölgeye farklılık göstermesine rağmen, reprodüktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Günümüzde Türkiye ve Batı toplumlarında özellikle kadınların çocuk sahibi olma isteklerini ileri yaşlara ertelemesi infertiliteye neden olmaktadır.

1.2.Amaç

Bu çalışma ICSI işlemi uygulanan hastalarda, yeni nesil dizileme (Next Generatıon Sequencıng; NGS) tekniğinde genetik analiz ile kromozom sayısı ve yapısı incelenerek, kadın yaşına göre gruplandırma yapılan hastalarda genetik analiz sonrası; öploid ve anöploid blastokist sayıları ile ilgili değerlendirmeler ile maternal yaşın PGT-A sonuçlarına nasıl bir etkide bulunduğunun, belirlenmesi amacıyla retrospektif olarak planlanıp yürütülmüştür

1.3.Önem

İnfertilite tedavisinde yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır. Yardımla üreme tekniği (ART) olan IVF ve ICSI, ovuma vücut dışında uygulanan ve gebelik oluşturmak için tasarlanmış birtakım prosedürlerdir. Bu tekniklerde temel olarak, overlerin fertilite ilaçlarının bir kombinasyonu ile uyarılması, bir veya daha fazla oosit over foliküllerinden aspire edilerek in vitro ortama alınması ve fertilizasyonun sağlanmasıdır. Daha sonra skorlanan embriyolardan bir veya iki tanesi intrauterin kaviteye transfer edilir. Genel olarak IVF olarak adlandırılan bu döngü 14 günlük bir süre içerisinde gerçekleşmekte ve son yıllarda başarı şansını daha çok arttıran intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tercih edilmektedir.

1.4.Varsayımlar

Araştırmaya dâhil edilen hastaların NGS tekniği ile PGT-A uygulanan 30 yaş ve altı, 31-35, 36-39 ile 40 yaş ve üstü hastaların embriyolarındaki anöploidi oranları

analiz edilerek Prognostik değerler PGT-A sonuçlarına göre; öploid blastokist ve anöploid blastokist parametrelerine göre değerlendirilecektir. Prognostik değerlerin analizleri sonucunda, yaş gruplarına göre anöploid blastokist oranlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olup olmadığı incelenecektir.

1.5.Sınırlılıklar

Çalışmada 01.01.2016 tarihinden 31.12.2017 tarihine kadar Kolan İnternational Hastanesinde yaşları 25 ile 45 arasında değişen, 80 kadın ile yapılmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1.İnfertilite

2.1.1. Tanımı

İnfertilite, reprodüktif çağda doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, 35 yaş altı kadınlarda en az 12 ay ve 35 yaş üstü kadınlarda ise 6 ay düzenli ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır (1).

İnfertilite tüm dünyada bölgeden bölgeye farklılık göstermesine rağmen, reprodüktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Günümüzde Türkiye ve Batı toplumlarında özellikle kadınların çocuk sahibi olma isteklerini ileri yaşlara ertelemesi infertiliteye neden olmaktadır. Erkeklerde ise her yıl yapılan semen analizlerinde stres, çevre kirliliği ve endüstrileşme nedenleri ile düşüşler gözlenmektedir. Bu nedenle infertilite nedenleri birçok etkenin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilir. Bunun yanı sıra %20-25 çiftte hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenir. %15 ciftte ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamaz (2).

2.1.2. İnfertilite Nedenleri

2.1.2.1.Kadına Ait İnfertilite Nedenleri

İnfertil bir çifte yaklaşımda, kadın faktörünün değerlendirilmesi tanı ve tedavide önem arz etmektedir. İnfertilite sebepleri her ne olursa olsun gebelik, kadının anatomi ve fizyolojisi ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle kadına ait infertilite nedenleri infertilitenin %40-50' sini oluşturur.

Ovulatuvar disfonksiyon: Yumurtlama (ovulasyon) normalde üreme çağındaki kadınlarda her ay 1 kere olan ve bu sayede adet (mens) görme, üreme gibi fonksiyonların devamını sağlayan, kadın vücudundaki hormonal değişimlerin ana sebeplerinden birisidir. Ovulatuvar disfonksiyon, yumurtlama problemine bağlı infertiliteyi içerir. İnfertil kadınların %40-50'sinde, ovulatuvar bozukluk görülür. Amenore, anovulasyon ve adet düzensizlikleri ile kendini gösterir. Adetin düzenli olarak görülmesi ovulasyonun var olduğunu göstermektedir. İnfertil hastalarda ovulasyonun varlığı tespit edilmelidir. Ovulasyonun varlığı çeşitli yöntemler kullanılarak saptanabilir.

a)Menstrualhikaye: Düzenli olarak, 21-35 günde adet gören, menstruasyon kanamasının volümünde döngüsel olarak önemli değişiklikler olmayan ve menstruasyon öncesi moliminal semptomları olan kadınlarda ovulasyonun belirtilmesine gerek yoktur.

b) Bazal vücut ısısı ölçümü: Menstrüel siklusun ilk gününden itibaren her sabah aynı saatte yataktan kalkmadan vücut ısısı ölçülerek bazal vücut ısısı çizelgesine not edilir. Normal vücut ısısı 36,5°C civarında olup, ovulasyon öncesi dönemde bu değerler sergilerken, ovulasyondan sonra progesteron (PRG) hormonu artar ve progesteronun termojenik etkisi sonucu vücut ısısında 0,2-0,3°C artış gözlemlenir (3).

c) LH monitarizasyonu: Luteinize edici hormon seviyesindeki artış, yumurtlama olayında etkin bir mekanizmadır. LH ve FSH hormonları pik yaptıkları sırada ovulasyon gerçekleşir. LH eğrisinin başlangıcından 34-36 saat sonra ve LH pikinden 10 saat sonra ovülasyon olur. Bu nedenle LH pikinin tespit edilmesiyle ovulasyonun varlığı kanıtlanabilir.

d) Ultrasonografik monitarizasyon: Transvajinal ultrasonla menstürasyon döneminden itibaren ortalama 4-6 mm çapındaki foliküllerin büyümesinin takibi ve ovulasyon öncesi 20-25 mm çapındaki dominant folikülün ani kollapsı, ani kollaps sonrası folikul sınırlarının net ayrımının yapılamaması, douglasda sıvı izlenmesi ve korpus luteuma benzer internal eko iceren görüntünün oluşması ultrasonografi ile ovulasyonun gercekleştiğinin işaretleridir

e) Luteal faz serum progesteron ölçümü: Progesteron ölçümü sekresyon pik yaptığı midluteal dönemde yapılmalıdır. Mid-luteal serum progesteronun 3ng/ml'den fazla olması ovulasyon icin tanısaldır. Progesteronun düşük veya yüksek seviyelerinin prognostik öneminden bahsetmek icin seri progesteron ölçümlerine ihtiyaç vardır (4).

Dünya Sağlık Örgütü(WHO) anovulasyon ve oligomenoreli hastaları 7 grup altında toplamıştır (5).

Tablo 2.1: Anovulasyon-oligomenore klasifikasyonu

Grup 1: Hipotalamo-hipofizer Yetmezlik.
Grup 2: Hipotalamo-hipofizer Disfonksiyon.
Grup 3: Overyan Yetmezlik.
Grup 4: Konjenital veya Akkiz Genital Yol Bozuklukları.
Grup 5: Hipotalamo-hipofizer bölgede yer kaplayan lezyonu olan hiperprolaktinemik infertilkadınlar.
Grup 6: Hipotalamo-hipofizer bölgede yer kaplayan lezyonu olmayan hiperprolaktinemik infertilkadınlar.
Grup 7: Hipotalamo-hipofizer bölgede yer kaplayan lezyonu olan normoprolaktinemik İnfertilkadınlar

Hipogonadotropik hipogonadizm: Hipotalamo-hipofizer disfonksiyon söz konusudur. Hipotalamustan yeterli miktarda "Gonadotropin Releasing Hormon" (GnRH) salgılanmamaktadır. Yetersiz pitüiter gonadotropin salınımı ile birlikte meydana gelen pitüiter bir bozukluk mevcutdur. Santral hipogonadizm, hipotalamik amenore veya WHO grup 1 anovulasyon olarak da tanımlanabilir. Fizyolojik gecikme, Kallmann Sendromu ve hipotalamik/pitüiter disfonksiyon durumlarında gözlemlenebilir. TVUS'de atrofik endometrium saptanır.

Polikistik Over Sendromu: PKOS hormonal bozukluğa bağlı olarak doğurganlık çağında ortaya çıkan bir hastalıktır. Sendromda en sık kullanılan tanı kriterleri, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından 1990 yılında açıklanmıştır (6,7). Fakat 2003 yılında düzenlenen bir toplantıda 1990 yılında NIH tarafından belirlenen PKOS tanı kriterleri yeniden gözden geçirilmiş ve öncekine benzer şekilde diğer etyolojik nedenler ekarte edildikten sonra PKOS

tanısının konulmasında tabloda belirtilen üç kriterden ikisinin birlikteliği ile konulması önerilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Polikistik Over Sendromu Tanı Kriterleri

1990 NIH Tanı Kriterleri	Rotterdam gözden geçirilmiş tanı kriterleri*
• Biyokimyasal • hiperandrojenizm bulguları ve diğer etyolojik nedenlerin ekarte edilmesi	• Biyokimyasal • hiperandrojenizm bulguları • Polikistik overlerin görüntüsü ve diğer etyolojik nedenlerin ekarte edilmesi

*Tanı için üç kriterden ikisinin bulunması gereklidir

Hipergonadotropik hipogonadizm: Hipergonadotropik hipogonadizm Endojen gonadotropin düzeyi düşük over rezervli olgularda FSH düzeylerinin artması ile karakterizedir (>20 mIU/ml). Genç kadınlarda sıklıkla genetik nedenlerden dolayı rastlanır. Vakit kaybetmeden YÜT'ne başvurulması gerekir.

Tubal-Peritoneal İnfertilite Nedenleri: İnfertil çiftlerin % 30'unda tubal veya peritoneal anormallikler gözlemlenmektedir. Proksimal ve distal tubal tıkanıklıklar, hidrosalpinks, pelvik adezyonlar gibi nedenler tubal ve peritoneal faktörler arasındadır. Tubal ve pelvik patolojilerin değerlendilmesinde kullanılan yöntemler Histerosalpingografi (HSG), histeroskopi, sonohisterografi ve laparoskopidir. HSG siklusun 6-10. günlerinde tubal pasajı değerlendirmede kullanılanır. HSG ile tubal geçiş ve uterin kavite değerlendirilir. HSG ile saptanan intaruterin patolojilerin saptanmasında histeroskopi çok etkilidir.

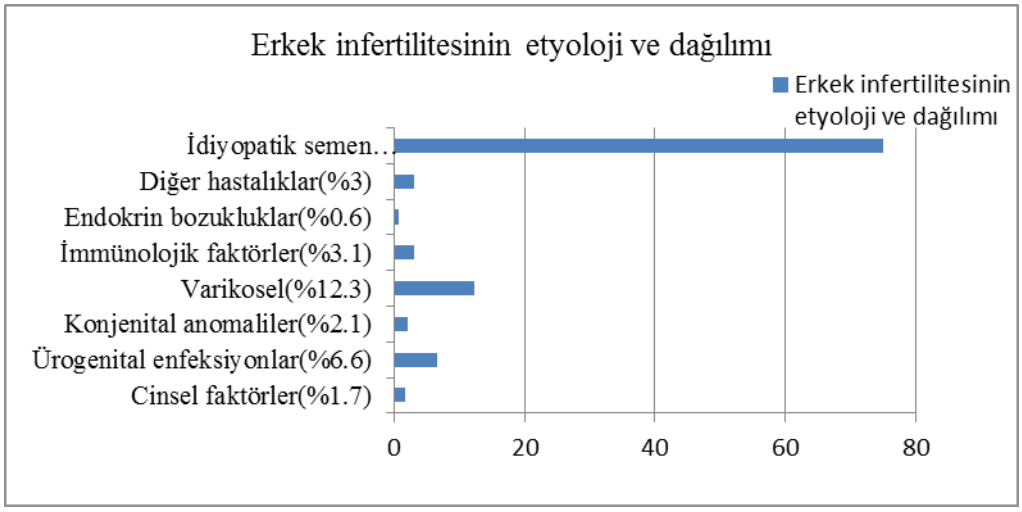
Servikal ve İmmunolojik İnfertilite: Servikal faktörler ile ilişkili infertilite, çiftlerin %1-2'sinde infertilite sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Servikal mukusun yapısı, sperm transportunu etkiler. Mukus üretimininde östrojen arttırıcı, progesteron ise baskılayıcı etki yapar. Servikal mukus ovulasyondan 1-2 gün önce, ince, sulu, asellüler, alkali ve elastik yapı alarak sperm geçişini kolaylaştırır. Sperm mukus etkileşimindeki anormallikler, servikal infertilite nedenleri olarak değerlendirilir (8,9). Beklenen ovulasyondan kısa bir süre önce, koit sonrası yapılan ve servikal mukus ile sperm ilişkisini inceleyen postkoital test (PCT) servikal faktör

incelemesinde uygulanmakta olan bir yöntemdi. Fakat PCT subjektif ve tekrar edilebilirliği zor bir test olduğundan günümüzde rutin infertilite değerlendirilmesinde önerilmemektedir(10,11). YÜT' tedavisinde yaygın olarak kullanılan intrauterin inseminasyonla servikal faktör ortadan kaldırılmaktadır. İmmünolojik infertilite sebeplerini değerlendirmek için, antisperm antikorların tanısında çok farklı testler bulunmaktadır. Sperm aglütinasyon, sperm kompleman bağımlı immobilizasyon ve mixed aglütinasyon testleri, antisperm antikorların tanısında uygulanmaktadır. Bu testlerin infertilite tedavisindeki yeri halen tartışma konusudur.

Diğer nedenler: İnfertilite ile ilişkili diğer nedenler kapsamında, Konjenital defektleri; fallop tüpleri, uterus, serviks ve müllerian kanalların komplet yokluğu (Rokitansky-Küster-Hauser Sendromu), arkuat uterus, vajinal septum gibi anomaliler yer almaktadır. Sekonder infertilitede zor doğum, küretaj, intrauterin araç, geçirilmiş cerrahi sonrası endometrit, adezyon veya sineşi (Asherman Sendromu) ile endometrial kavitenin tıkanıklığı oluşabilir. İntrauterin yapışıklıklar (Ashermann Sendromu) kaviteye baskı oluşturarak embriyo transferi sonrası implantasyona engel olabilmektedir (12,13).

2.1.2.2.Erkeğe Ait İnfertilite Nedenleri

Erkek infertilitesi, infertilil çiftlerin yaklaşık olarak %50'sinde tek nedendir. Son yıllarda yapılan semen analizlerinde, sperm sayısında ve motilitesinde bir düşüş olduğu saptanmıştır. Erkek infertilitesi anatomik olarak pretestiküler, testiküler ve posttestiküler nedenler olarak sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 2.1: Erkekte infertilite nedenlerinin etyolojisi ve dağılımı (14)

2.1.2.3.Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite, sperm analizi, ovulasyon testleri, tubal patolojileri değerlendiren tetkiklerinde herhangi bir anormallik saptanamayan çiftlerde tanımlanan durumdur. Açıklanamayan infertilite oranı, hangi testlerin yapıldığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Açıklanamayan infertilite etiyolojisi; endokrinolojik, immünolojik ve genetik faktörleri de kapsayan geniş bir heterojeniteye sahiptir. Maternal yaşın 35 üzeri olduğu olgularda, açıklanamayan infertilite tanısı daha sıklıkla görülmektedir (15). Açıklanamayan infertilite tanısı konmuş hasta gruplarında, sperm ve oosit fonksiyonunda, fertilizasyon, implantasyon veya embriyo gelişiminde bozukluklar olduğu düşünülmektedir.

2.2.İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

2.2.1. Kadın Hastanın Değerlendirilmesi

Anamnez

Anamnezde detaylı olarak; maternal yaş, gebelik sonuçları ve ilişkili komplikasyonlar, siklus uzunluğu ve özellikleri, infertilite geçmişi; ilave etken olabilecek medikal faktörler; geçirilmiş operasyon veya pelvik inflamatuar hastalık öyküsü; sigara, alkol veya diğer madde kullanımları; Tiroidle ilgili hastalıklar, hirsutismus, galaktore, diabet gibi hastalıklar sorgulanmalıdır (16).

Maternal yaşın artması ile birlikte, doğal fertilitede olduğu gibi, Yardımcı üreme tekniklerindeki (YÜT) başarı oranları da azalmaktadır. Yaşlı kadınlarda gençlere göre elde edilen oosit ve gelişen embriyo sayısı az ve implantasyon şansı daha düşüktür (17,18). 2001 yılı için yapılmış olan ulusal bir özette embriyo transferi başına gerçekleşen canlı doğum oranı 35 yaş altında % 41,1, 35-37 yaş arası % 35,1, 38-40 yaş arası % 25,4, 41-42 yaş arası % 14,5, 43 yaş için % 5,9, 44 yaş ve üzeri için % 2,9 olarak bildirilmiştir (19,20,21).

Kadın hastanın değerlendirilmesi yapılırken gebelik oluşup oluşmadığı sorgulanmalıdır. Sekonder infertilite de tedavi daha kolay ve prognoz genellikle daha iyidir. Daha önceki infertilite tedavileri ve protokolleri, kullanılan ilaçlar, over yanıtı ve sonuçları sorgulanmalıdır. Sigara içme alışkanlığı fertilite açısından değerlidir ve inferilite problemlerine yaklaşım açısından önemlidir. Kadın partnerin sigara içiciligi başarı şansını %50 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Hastanın jinekolojik ve fiziki muayenesi yapılır. Jinekolojik muayene USG ile tamamlanması tercih edilen bir uygulamadır. Yapılacak tetkitler ise; postkoital test, ovulasyon tetkiti, histerosalpingografi (HSG), laparoskopi, histeroskopi ve sonohisterografi.

Laboratuvar İncelemeleri: Over rezervi ölçümü amacıyla menstrüel siklusun 2.-3. günü FSH, LH, östradiol (E2) ve İnhibin B seviyelerinin tüm infertil hastalarda bakılması gerekmektedir. FSH ölçümünün, olguların ovulasyon indüksiyonuna vereceği cevabın değerlendirilmesinde etkilidir. Bazal serum FSH değerleri >15-20 IU/ l seviyesinde bulunması infertilitenin artması yönünde anlamlıdır. Bazal östradiol (E2) değerlerinin < 40 ng/ml seviyesinde olması beklenmektedir. 2. gün serum E2 ölçümünün >50 pg/ml olması ovulasyon indüksiyonu sırasında kötü prognozla ilişkilidir (22). Yüksek E2 değerlerinin (>80ng/ml) belirlenmesinin, gebelik oranlarında ve elde edilen oosit sayısında azalma ile birlikte olduğunu göstermektedir (23). Siklusun 3. gününde İnhibin B > 45 pg/ml seviyesinde olması iyi prognoz belirtisidir (24,25). FSH ve E2 dışında infertil hasta grublarında LH, 21. gün progesteron, prolaktin ve TSH hormon düzeyleri değerlendirilir. Çiftlerin kan grubu belirlenmeli ve kan sayımı yapılmalıdır. Menstruel siklustan bağımsız olarak, Anti-Müllerian Hormon (AMH) düzeyi antral folikül sayısı hakkında bilgi vermektedir. Her iki partnerin Anti-Hbs, Hbs Ag, Anti-HCV, Anti- HIV, Rubella

IgG ve IgM, Toksoplazma IgG ve IgM gibi serolojik testleri yapması gerekmektedir (26). Serolojik testler; laboratuar ekibin ve IVF sonucu elde edilen embriyolar arasında çapraz kontaminasyon olmaması açısından önerilmektedir (27,28) .

2.2.2. Erkek Hastanın Değerlendirilmesi

Erkeğe faktörüne bağlı infertilite araştırması ve değerlendirilmesi nispeten daha kolay olup hikaye; fizik muayene ve semen analizine dayanır. İnfertil bir erkek değerlendirilirken ilk yapılacak işlem 4-6 hafta ara ile en az 2 kez semen analizidir. Semen örneği 2-7 günlük cinsel perhiz sonrası alınmalı ve en gec 60 dakika içinde değerlendirilmelidir. Sonuca göre infertilitenin etiyolojisine göre ek testler talep edilebilir. Bu testleri; ek semen analizi, endokrin değerlendirme, postejakulatuar idrar analizi, ultrasonografi, semen ve spermle ilgili özel testler ve genetik tarama olarak ifade edebiliriz. Erkekte ileri yaş faktörü ile fekunditenin azalması cinsel ilişki sıklığında azalma ve çevresel toksinlere temasdaki kümülatif artış ile bağlantılıdır (29,30). Hastanın öyküsü detaylı olarak incelenmelidir. İnfertilite geçmişi, cinsel yaşam öyküsü, çocukluk çağı hastalıkları ve gelişim öyküsü, enfeksiyonlar, geçirilmiş operasyonlar, gonadal toksinlere maruz kalma, geçirilen sistemik hastalıklar, kullanılan ilalar ve aile öyküsü alınmalıdır.

Klasik Semen Analizi: Erkek fertilizasyon potansiyelinin incelenmesindeki ilk adım en az 1 ay ara ile uygun yapılmış 2 semen analizi olmalıdır(31). Klasik semen analizi için incelenecek ejakülat en az 2 günlük cinsel perhiz sonrasında mastürbasyon ile steril bir kaba alınmalı ve cinsel perhiz 7 günü geçmemelidir (32). Örnek laboratuvarda alınmalı veya en geç 30 dakika içerisinde analiz yapılacak laboratuvara teslim edilmiş olmalıdır. Ejakülatın makroskopik analizinde görünümü, volümü, likefaksiyon süresi, viskozitesi ve pH'sı değerlendirmelidir. İlk değerlendirme için iki örnek alınmalıdır. İki örnek arası geçen süre 7 günden az, 3 haftadan çok olmamalıdır (33,34). Semen analizinin en önemli kısmını ise mikroskopik inceleme oluşturmaktadır. Normal değerleri belirlemekte Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterleri kullanılır (Tablo2.3)(35). Mikroskobik değerlendirme sonucunda semen analizi WHO parametrelerine göre yorumlanır.

Tablo 2.3: Semen analizi referans değerleri (WHO)

Parametre	Alt referans limiti
Semen volümü (ml)	1.5 ml
Total sperm sayısı (milyon/ejekülat)	39 (milyon/ejekülat)
Sperm konsantrasyonu (milyon/ml)	15 (milyon/mL)
Total motilite (PR+NP,%)	40 (%)
Progressive motilite (PR,%)	32 (%)
Vitalite (canlı spermler,%)	58 (canlı sperm, %)
Sperm morfolojisi (normal formlar,%)	4 (normal formlar, %)
pH	≥7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit	<1.0 (milyon / ml
MAR testi (patiküllere bağlı hareketli spermler, %)	<50 (%)
Immunobead testi (boncukların bağlandığı hareketli spermler, %)	<50 (%)
Seminal çinko	≥2.4 (µmol/ejakülat)
Seminal fruktoz	≥13 (µmol/ejakülat)
Seminal nötral glukozidaz	≥20 (mU/ejakülat)

Semen analizi sonrası değerler WHO kriterlerine göre normal gelmişse, tek test yeterli kabul edilmelidir. Sadece, en az iki testin de anormal bulunması durumunda, ileri androlojik araştırma gerektirmektedir. Ürolojik değerlendirmeye detaylı anamnez ve fizik muayene ile başlanır. Bazı semen değişkenleri için terminoloji Tablo 2. 4 ’te gösterilmiştir.

Tablo 2.4: Semen Değişkenlerinin Terminolojisi

Terim	Anlamı
Normozoospermi:	Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat
Oligozoospermi:	Referans değerden düşük sperm konsantrasyonu
Asthenozoospermi:	Hareketlilik için referans değerden daha düşük değer
Teratozoospermi:	Morfoloji için referans değerden daha düşük değer
Oligoasthenoteratozoospermia:	Her üç değişkenin de bozukluğuna işaret eder
Azoospermi:	Ejakülatta hiç spermatozoa bulunmaması
Aspermia:	Hiç ejakülat elde edilememesi

Genetik:

Erkek infertilitesinin % 40'nın nedeni bilinmemektedir. Genetik faktörler ise bu nedenler içerisinde önemli bir yer tutmaktadır (36). Sebebi bilinmeyen azospermik ve oligozoospermik infertil hasta grublarında, sayısal ve yapısal kromozomal anomalilere sıkca rastlamaktadır (37). Spermler ile ilgili yapılan çok sayıdaki çalışmalarda, cinsiyet kromozomları ile 21 ve 22 nolu kromozomlara ait anomalilerinin sıklığının yüksek olduğu bildirilmiştir (38,39). Farklı bir araştırmada ise azoospermik olgularda kromozomal düzensizlik oranı %19,6 verilirken, oligozoospermik olgularda bu oran % 6 olarak açıklanmaktadır (40). Fertil erkeklere kıyasla, infertil erkeklerin spermlerin de daha çok cinsiyet kromozom hiper haploidileri ve diploid sperm nükleusları şeklin de artmış anöploidi oranları olduğu gösterilmiştir (41,42).

2.3.Yardımcı Üreme Teknikleri Endikasyonları

Yardımcı üreme teknikleri günümüzde infertilite tedavisinin birçok nedeninde kullanılmaktadır. Yardımcı Üreme Teknikleri endikasyonları şu şekilde özetlemek gerekirse; tubal faktörler, endometriyozis, over yetmezliği, uterus faktörü, erkek faktörü, açıklanamayan infertilite ve diğer YÜT Endikasyonları.

Tubal Faktörler: Tubal faktörler en sık rastlanan infertilite nedenleri arasında yer almaktadır. Bu grubta yer alan infertil çiftlerde spontan gebelik oluşması

durumunda ektopik gebelik olma riski 1/5 oranında artacaktır (43). Cerrahi tedavi yöntemlerine rağmen iki yıl içerisinde gebe kalamayan ileri yaş grubundaki hastalar direkt olarak ART'e yönlendirilmelidir.

Endometriyozis: Endometriyozisin infertiliteye olan etki mekanizması tam olarak anlaşılamasa da oosit ve embriyo gelişimini engellediği bilinmektedir. Yapılmış birçok araştırmada endometriyozis'li hastalarda over kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir (44). İleri evre endometrioziste seçenek direkt olarak ART olmalıdır.

Erkek Faktörü: Total motil sperm sayısı 10 milyondan fazla olan oligospermilerde IUI tedavisi önerilebilir. Yaklaşık olarak 3-4 siklus IUI tedavisi uygulamasına rağmen gebelik elde edilmemiş veya ileri maternal yaş faktörü varsa IVF-ICSI tedavisi uygulanması gerektiği bildirilmiştir (45). Azospermi ve sperm sayısı 5 milyondan az oligospermilerde direkt olarak ART tedavisi uygun seçim olacaktır. Semen örneğinde hiç sperm olmaması durumuna azospermi denir. Azosermi, testiküler ve nontestiküler olabilir. Bu infertil hasta grubunda testis ya da epididimden elde edilen spermlerin ICSI'de kullanılması söz konusudur.

Açıklanamayan İnfertilite: İnfertilite araştırmaları kapsamında, rutin değerlendirme metodlarıyla tanısı koyulamayan çiftler, açıklanamayan infertilite kapsamında değerlendirilmektedir. Açıklanamayan infertilite endikasyonuna sahip infertil çiftlerde IUI tedavisi 3-4 kez denenebilmektedir. Gebelik elde edilemezse ART yöntemleri kullanılması söz konusudur.

Uterus Faktörü: İnfertilite nedenleri arasında ortalama olarak % 1 oranında görüldükleri iddia edilmektedir. İnfertilite üzerinde kesin bir etkisi olmamasına rağmen, uterin kavitede endometriyal implantasyonu bozarak infertiliteye veya abortus riskini artırdığı öne sürülmektedir.

Over Yetmezliği: Over yetmezliği özellikle kadın yaşının artmasıyla kendini belli eden, oosit sayısında ve üretilen oositin kalitesindeki azalmayı açıklayan bir durumdur.

Diğer YÜT Endikasyonları: Hastalık riski olan veya kalıtsal genetik hastalık taşıyan çiftlerin çocuklarına preimplantasyon genetik tanı (PGT) yapılabilmesi

amacıyla YÜT tedavisi uygulanabilir. Kanser, kemoterapi, radyoterapi veya başka bir medikal hastalık nedeniyle tedavi süresince fertiliteleri olumsuz yönde etkilenecek ise, tedavi öncesi YÜT ile elde edilecek oosit ve embriyoların dondurularak saklanması için adaydırlar.

2.4.Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ovulasyon İndüksiyonu

Kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) ile hedef; YÜT tedavilerinde, yumurtalıklardan iyi kalitede ve yeterli sayıda oosit, düşük iptal oranları, düşük risk, azalmış yan etkiler ve yüksek gebelik eldesidir. Yardımcı Üreme Tekniklerinde tedavi protokolleri 4 grupta toplanabilir. Bunlar; doğal siklus takibi, klomifen sitrat ile ovulasyon indüksiyonu, gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu, GnRH agonisti veya antagonisi ile birlikte olan protokolleridir.

2.4.1. GnRH Agonist Protokol (Uzun protokol)

GnRH 10 aminoasit içermekte olup, molekülün 10. ve 6. aminoasitlerin değiştirilmesi sonucunda GnRH agonistleri oluşmuştur. YÜT'de endojen hipofizer gonadotropin stimulasyonunu baskılamak, erken LH salınımını seviyesinde azalmaya, erken luteinizasyonu ve ovulasyonun meydana gelmemesini sağlamıştır. GnRH agonist tedavisi, luteal aşamada bir önceki siklusun 21. gününde ya da ovulasyondan 7 gün sonra başlanır. Bu evrede gonadotropinlerin salınımını stimüle eden 'flare' etki azalmakta olup, senkronize ve uniform folikül gelişimi sağlanmış olur. GnRH agonist protokolünün tek dezavantajı bir sonraki tedavi protokolünde gonadotropine karşı bir duyarsızlığa sebep olup, stimülasyon için gerekli olan gonadotropin seviyesini arttırmasıdır (46,47). GnRH agonistlerinin uygulandığı protokolleri özetlemek gerekirse: uzun protokoller, oral kontraseptif ve uzun protokoller, kısa protokoller, mikrodoz flare up, ve stop protokollerdir.

GnRH analoglarında stimülasyon için genel tercih minidoz protokolüdür. Uzun GnRHa protokolünde sıklıkla kullanılan Leuprolid asetat günlük 1,0 mg enjeksiyon dozları ile tedaviye başlanır ve baskılanma sağlanır. Sonrasında gonadotropinlerle stimülasyona başlandığında günlük doz 0,5 mg seviyesine iner ve hCG enjeksiyonuna kadar devam edilir. Menstrüasyonun 3. günü ya da analog

tedavisinin 14.günü overlerin baskılanmasını kontrol etmek için hasta değerlendirilmesi yapılır. Hipofizer baskılanmanın yeterli olduğu durumlarda gonadotropinle stimülasyon başlar. Overian baskılamanın sağlanması halinde kadın yaşı, antral folikül seviyesi, vücut kitle indeksi ve önceki tedavi protokollerinde verdiği optimum yanıta göre bireysel gonadotropin dozu ile uyarım yapılmaya başlanmaktadır. Üriner FSH (uFSH), rekombinat FSH (rFSH) veya üriner menotropin (hMG) kullanımında genellikle başlangıç dozu 150 ve 300 IU seviyesinde olmaktadır. İndüksiyon protokolünde step up ya da daha sık uygulanan step down yöntemi kullanılmaktadır. Ovulasyon indüksiyonunbaşlangıcından 3-5 gün sonra yapılan E2 ve follikül ölçümünden sonra hastanın verdiği yanıta göre 1-3 gün aralıklar ile monitarizasyona devam edilmekte ve kadınların birçok kısmında uyarı dönemi bir hafta ile 12 gün arası sürmektedir. Genellikle amaçlanan en az 2 tane 17-18 mm çapında ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında follikül eldesidir.

Rutin olarak, stimulasyon protokolü sırasında endometrial kalınlık takip edilmektedir. Hedeflenen yanıt ortaya çıktıktan son oosit maturasyonu için 5000-10000 IU hCG verilmelidir. Eş dozda kullanılan saflaştırılmış rekominant hCG yaklaşık 250 ug kadardır ve şuan rutin kullanımdadır. Siklusun programlanabilmesi GnRH agonistlerinin kullanımındaki avantajılarındandır. Dezavantajları; ‘flare’ etki, overian kist meydana getirme riski, protokol süresinin uzunluğu ve OHSS’dir.

2.4.2. GnRH antagonist protokol (Kısa protokol)

GnRH moleküler yapısında 1., 2. ve 6. aminoasit dizilimi değiştirilerek ilk GnRH antagonistleri elde edilmiştir. Histamin salınımına bağlı alerjik etkiler geliştirilen GnRH antagonistlerin kullanımını azaltmıştır. GnRH moleküler diziliminde 1.,2.,3.,6. ve 10. aminoasitte değişiklik yapılarak klinikte eş etkinlik ve potansiyele sahip olan setroreliks ve ganireliks adlı iki GnRH antagonistleri kullanılmaktadır.

Cetroreliks 0,25 mg ve 3 mg olmak üzere iki farklı dozajda, ganireliks 0,25 mg tek dozajda kullanılabilmektedir. GnRH antagonistleri sabit ve değişken olarak iki farklı biçimde uygulanabilir. Kullanılan her iki tip GnRH antagonist de erken LH

artışını önlemek için uygulanmaktadır. Sabit uygulamada gonadotropin tedavisi başladıktan 5-6 gün sonra cetroreliks ya da ganireliks 0,25 mg başlanır ve İnsan korionik gonadotropin (hCG) günü dâhil devam edilir. Değişken uygulamada ovulasyon indüksiyon cevabına göre serum E2 seviyesi 400 pg/ml'yi geçtiği zaman ya da önde giden folikül boyutu 13-14 mm'e ulaştığında 0,25 mg antagonist başlanır ve hCG günü dâhil devam edilir. Endojen gonadotropin salınımını hızlı bir şekilde baskılaması, erken luteinizasyonu önlemesi, 'Flare' etkinin olmaması, stimülasyon süresinin kısalığı, stimülasyon döneminde kullanılan toplam gonadotropin dozunun az olması, asimetrik oosit gelişiminin daha az olması, hiperstimülasyon riskinin daha düşük olması ve OHSS gelişiminin az rastlanması antagonist protokolün avantajlarındandır.

2.5.İn Vitro Fertilizasyon Uygulamaları

2.5.1. Tarihçesi

Laboratuvar ortamında bir oositin sperm ile fertilize edilmesi in vitro fertilizasyon ya da halk adıyla bilinen 'tüp bebek' yöntemi olarak tanımlanmaktadır. IVF ilk olarak 1978 yılında İngiltere'de uygulanmaya başlanmıştır. Bu yöntemle doğan ilk bebek olan Louise Brown'un dünyaya gelmesinin ardından, yaklaşık 5 milyon bebek yardımcı üreme teknikleri kullanılarak dünyaya gelmiştir. Yapılan çalışmalar ve gelişmeler günümüzde uygulanmakta olan IVF tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Yıllar içerisinde IVF tedavilerinde birçok yeni yöntem hayatımıza girmiştir.

2.5.2. Yumurta Toplama İşlemi (Oocyte Pick-Up, OPU))

Oosit toplanması kontrollu ovaryan hiperstimülasyonla istenilen büyüklüğe ulaşan yumurtaların hCG enjeksiyonu uygulandıktan sonra 34-36 saat sonra gerçekleştirilmektedir. Bu işlem geçmişte laparoskopi ile yapılmış olsada günümüzde klinisyen tarafından plastik steril bir kılıf içinde ki transvajinal ultrasongrafi (5-7 MHz) probuna ilave edilmiş aspirasyon iğnesi ile yumurtalar steril bir tüp içerisine aspire edilirler. OPU işlemi esnasında steril plastik tüp içerisine aspire edilen yumurtalar embriyolog tarafından, stereo mikroskop altında, yumurtalar folikül sıvısı

içinden steril tek kullanımlık cam pipet yardımıyla alınıp gelişimlerini sürdürebilecekleri uygun koşullardaki (37^oC, %5-6 CO_2) kültür ortamına aktarılırlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Opu işleminde overyan follikülden aspire edilen oosit-kumulus hücre kitlesi

(http://www.klinikembriyoloji.org/galeridetay/1)

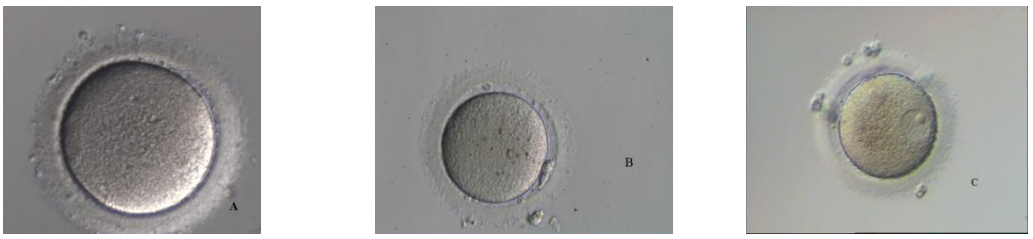
Oositlerin toplanması esnasında laboratuvar ekibinin amacı; tüm oositlerin en kısa zamanda toplanması, inseminasyon veya sperm enjeksiyonuna hazırlanması için kalitesinin ve mayotik matürasyonlarının belirlenmesi, oosit-kumulus-korona komplesindeki tabakaların değerlendirilmesi, folliküler aspirattaki potansiyel fizyolojik ve patolojik önem arzeden işaratlerin belirlenmesidir.

2.5.3. Denüdasyon İşlemi

Overian follikülden serbest kalan yumurtaya kumulus hücresi eşlik eder ve oosit- kumulus hücre kitlesi birlikte alınarak gelişimlerine devam edecekleri uygun koşullardaki (37^oC, %5-6 CO_2) kültür ortamına aktarılırlar. Konvansiyel IVF'den farklı olarak, ICSI öncesi yumurtaları çevreleyen kumulus hücreleri uzaklaştırılmalıdır. En az 1 saatlik ön inkübasyon sonrası, matür oositlerin çıplak bırakılması ICSI için gerekli ön şarttır. Bu inkübasyon süresinin sonunda, çevredeki kumulus hücrelerinin temizlenmesi hyaluronidaz adı verilen enzim ile enzimatik ve steril cam pasteur pipeti ile mekanik yöntemlerin kombinasyonu ile gerçekleştirilir. Tüm bu işlemler stereo mikroskop altında ve 37^oC'a kadar ısıtılmış tabla üzerinde gerçekleştirilerek oositler olgunluk açısından değerlendirilebilecek duruma gelirler (Şekil 2.3). Oositlerin hazırlanması esnasında gerçekleşen ısı değişiklikleri mikrotübül sistemine zarar vererek, kromozomların ayrılmalarında karışıklığa neden

olarak anöploidi ile sonuçlanmaktadır. Denüdasyon işlemi sonrasında sadece olgunluğunu tamamlamış metafaz II (MII) oositlere ICSI işlemi uygulanır.

a) **b)** **c)**



Şekil 2.3: Denüdasyon işlemi sonrası

Şekil 2.3.'te Denüdasyon işlemi sonrasında; **a.** olgun olmayan(metafaz I, MI) oosit, **b.** olgun oosit (metafaz II, MII) oosit, **c.** olgun olmayan (Profaz I) oosit görülmektedir.

2.5.4. Klasik İn Vitro Fertilizasyon

Klasik IVF tekniği diye adlandırılan bu uygulamada, ICSI tekniğinden farklı olarak oositlerin toplanmasından sonra yumurtalara denüdasyon işlemi uygulanmadan gerçekleştirilir. IVF işleminde, hastanın eşinden alınan semen örneği yüzme (swim-up) veya yoğunluk grandienti santrifugasyon (density grandient centrifugation) yöntemleri ile hazırlanan sperm örneği ve oositler aynı ortamda bir araya getirilirler.

2.5.5. İntrasitopazlmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI uygulaması, tek bir sperm hücresinin yumurta sitoplazmasının içerisine enjekte edilmesi olarak tanımlanmıştır. ICSI işlemi, iki adet motorlu kabaca kontrol yapan manipülatör ve iki adet de hidrolik mikro manüplatör donanımına sahip spesiyal mikroskobun ısıtılan yüzeyinde, 200-400 kat büyütmede, tutucu ve enjeksiyon mikropipetleri aracılığıyla gerçekleştirilir. ICSI işlemi yapılacak olan steril, toksik olmayan plastik petri tabağında kültür sıvısı içeren, sperm süspansiyonun konulcağı bir havuz ve matür oositlerin konulacağı mikro damlacıklar hazırlanır. Mikroskop altında 400x büyütmede sperm havuzundan normal morfolojiye sahip ve tercihen motil spermler seçilerek, enjeksiyon pipeti yardımı ile kuyruğun orta parçasına bastırılarak hareketsizleştirilir. Spermin hareketsiz hale

getirilmesi bir zar geçirgenliği işlemi olup, sperm sitozolündeki faktörü salarak oosit aktivasyonunu sağlar. Öncelik özel kültür sıvısı içeren havuzun kenarına yüzen spermlere tanınır. Enjeksiyon pipeti yardımıyla hareketsizleştirilen sperm kuyruk kısmından yakalanarak mikropipet içerisine alınır ve matür oositin içerisinde olduğu mikro damlaya gidilir. Yumurta tutucu pipete uygulanan emme ile sabitlenen yumurtanın daha sıkı tutulması sağlanarak, hareketsizleştirilen sperm yumurta sitoplazması içerisine enjekte edilir. ICSI işlemi tamamlandıktan sonra, yumurtalar uygun koşullardaki (37^oC, %5-6 CO_2) kültür ortamına aktarılırlar. Mikroenjeksiyon işleminden 12-17 saat sonra oositler sitoplazma bütünlüğü, pronükleus sayısı ve büyüklüğüne göre incelenmektedir.

ICSI Endikasyonları;

- Erkek faktörü infertilitesinde (oligospermi, astenospermi veya teratospermi)
- Cerrahi yöntemlerle sperm elde edildiği olgular
- Preimlantasyon genetik tarama planlanan olgular
- Yaşanmış IVF başarısızlığı öyküsü olan olgular

2.5.6. Fertilizasyon Ve Embriyo Gelişimi

2.5.6.1.Pronukleus Değerlendirmesi

Fertilizasyonun değerlendirilmesi, IVF veya mikroenjeksiyon işleminden sonra yaklaşık 12-17 saat sonra yapılmaktadır. Oositler sitoplazma bütünlüğü, pronüleusların sayısı ve büyüklüklerine göre incelenmektedir. Döllenme, sperm girişi, aktivasyonu, mayoz bölünmenin sonlaması ve sonuç olarak 2 hücreli embriyo oluşumu ile sonuçlanan mitoz bölünmeyi kapsar. Özetlenecek olursa, aktive olmuş oosit sitoplazması içerisinde, yumurtadan gelen dişi pronükleus ve tek bir spermden erkek pronükleusun birleşmesi olayıdır. Normal fertilize olmuş bir oositte 2 ayrı pronukleus birinci ve ikinci polar cisimcikleri görülür (Şekil 2.4). Döllenmiş oosit skorlanması; pronukleusların sayısı, boyutu ve pozisyonu, çekirdek içerisindeki çekirdekçiklerin büyüklük, sayı ve dağılımları, polar cisimciklerin yerleşimi ve son basamak olarak sitoplazmaya yönelik ‘Halo’ (hale) varlığı dikkate alınarak yapılır.

a) **b)** **c)**



Şekil 2.4: Pronüklear evre

(http://www.klinikembriyoloji.org/galeridetay/3)

Şekil 2. 4.‘ te pronüklear evrede, sırasıyla;

a. tek nükleuslu oosit (1PN),

b. normal fertilize olmuş iki pronükleuslu zigot (2PN),

c. anormal fertilize olmuş çok sayıda pronükleus gözlenen zigot (Multi PN).

2.5.6.2.Bölünme Evresi Embriyo Gelişimi

Fertilizasyon sonucu oluşan zigot 25-30 saat sonra ilk mitotik bölünme aşamasına girmekte ve her biri blastomer olarak adlandırılan iki hücreye sahip bir embriyo oluşturmaktadır. Bölünme evresindeki embriyolar, blastomerlerin sayı, şekli ve boyutuna, blastomerler arası fragmantasyon oranına, blastomerlerdeki nükleer durumlarına ve erken birleşme gibi özelliklerine göre değerlendirilmektedir (48). Normal bölünme hızına sahip bir embriyonun bölünmeye başladığı ikinci günde 2-4 hücre, üçüncü günde 6-8 blastomer ve dördüncü günde birleşme durumuna bağlı olarak morula evresindeki embriyodur (Şekil 2.5). Bölünme evresindeki embriyonun beklenen zamanda, içeridiği blastomer sayısı bakımından referans limitlerin arasında ise normal embriyo, eğer limitlerin altında ise yavaş gelişen embriyo olarak nitelendirilmektedir. Embriyoların içeridiği blastomer sayısı beklenen zamandan erken yada geç ulaşması öploidi/anöploidi pozisyonunu göstermede bir belirteç olarak değerlendirilebileceği bilinmektedir. Bölünme evresinde kalite değerlendirilmesi yapılırken embriyoların, %0-5 arası fragmantasyon içeren,

granülazasyon içermeyen ve eşit büyüklükte blastomer yapısına sahip olması beklenmektedir.

a) **b)** **c)**



Şekil 2.5: Bölünme evresi

(http://www.klinikembriyoloji.org/galeridetay/4)

Şekil 2.5. bölünme evresindeki embriyolar,

a. ikinci gün aşamasındaki 4 hücreli embriyo,

b. üçüncü gün evresindeki 8 hücreli embriyo

c. dördüncü gün morula aşamasındaki embriyo

Fragmantasyon ve eşit olmayan blastomer yapısına sahip embriyolar, düzensiz bölünmeye ve kromozomal anormalliklere neden olabileceği bildirilmiştir (49). Yüksek fragmantasyon oranına sahip (%30'dan fazla) embriyolar düşük implansasyon oranına sahiptirler. Multinükleasyon embriyo kalitesinin belirlenmesinde karşımıza çıkan diğer bir kriterdir. Multinükleasyonun embriyo üzerinde birden fazla olumsuz etkisi bulunmaktadır. Bu etkinin sonucunda, kromozomal hatalara sahip düşük embriyo kalitesi oluşabilmektedir. Embriyonun on ve üzerinde hücreye sahip evredeyken hücreler arası bağlantılar, blastomerlerin kompaktlaşmasını sağlayarak, embriyonun daha iyi bir iç hücre kütlesi yaratmasına ve ileri dönem embriyo gelişim safhasına ilerlemesine yardımcı olmaktadır.

İmplantasyon gerçekleştirme ihtimali yüksek olan embriyoların seçimi ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Embriyoların genetik açıdan normal olması, implantasyonun ve sağlıklı bebek dünyaya getirilmesi için şartdır. Preimplantasyon genetik tarama testi yapılmadan, embriyoların genetik yapısı hakkunda bilgi edilememektedir. Çok sayıda düşük kalite embriyo transferi ile sağlıklı bebekler

dünyaya gelsede, fragmantasyon oranı yükek ve bölünmesini durdurmuş embriyolarda kromozomal anomali oranı daha yüksektir (50).

2.5.6.3.Blastokist Evresi

İnseminasyon işleminden sonra, fertilize olmuş oositler laboratvar ortamında kültüre edilerek beşinci ve altıncı gün blastosist oluşumunu gerçekleştirmektedir (Şekil 2.6). Blastosist, iç hücre kitlesi (ICM) ve trofektoderm olmak üzere farklılaşmış iki ana hücre tabakasından oluşmaktadır. ICM ileriki zamanlarda fetusu, trofektoderm ise plesentanın ve bebegin beslenmesi için gerekli diğer kısımları oluşturmaktadır. Bölünme evresindeki embriyolarında olduğu gibi, blastosist değerlendirme kriterlerinde de blastosist oluşumunun tamamlandığı süre ve morfolojisi önem arz etmektedir. İnsan blastokistleri için blastokist skorlama sistemi genişlemiş kavite, iç hücre kitlesi (ICM) ve trofektoderim tabakası kriterlerine göre üç ayrıpuanlama yapılmaktadır (Tablo 2.6, Tablo 2.7,Tablo 2.8) (51)

Tablo 2.5: Blastokist gelişim düzeyi puanlanması

1	Erken blastokist-blastosöl embriyo volmünün yarısından az
2	Blastokist- blastosöl embriyo volmünün yasısına eş değer veya daha büyük
3	Tam blastokist- blastosöl, embriyo hacmini tamamiyle doldurması
4	Genişlemiş blastokist- Blastosöl hacmi embriyodan daha büyük ve zona incelmiş.
5	Trofektoderm kırılarak tomurcuklanmanın oluşması
6	Embriyonun trofektodermden tamamen ayrılması, tomurcuklanmanın tamamlanması

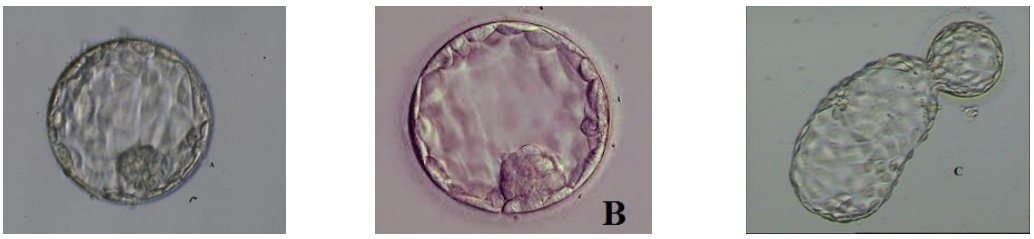
Tablo 2.6: İç hücre kitlesi (ICM) puanlanması

A	Sıkı paketlenmiş biçimde ve çok sayıda hücre içermesi
B	Gevşek kümeler halinde ve birkaç hücre içermesi
C	Çok az sayıda hücre içermesi

Tablo 2.7: Trofektoderim puanlanması

A	Birçok hücreden oluşan yapışkan epitel
B	Birkaç hücreden oluşan gevşek epitel
C	Az sayıda büyük hücreler

a) **b)** **c)**

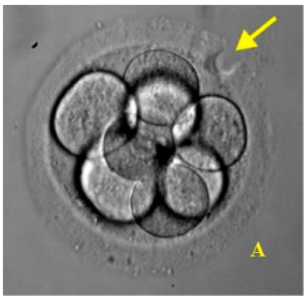


Şekil 2.6: Beşinci gün aşamasına ulaşmış blastokistler

Şekil 2.6'da beşinci gün aşamasına ulaşmış blastokistler görülmektedir. Bunlar; **a.** 5AA blastokist, **b.** 5AA blastokist, **c.** 6AA blastokist (total hatching)

2.5.7. Assisted Hatching Prosedürü (AHA)

Embriyo belli bir boyuta ulaştığında kendisini çevreleyen glikoprotein yapısındaki zarı (zona pellucida, ZP) yırtıp embriyonun dışarı çıkmasıyla (hatching) başlar ve endometrium olarak adlandırılan rahim içindeki dokunun derinliklerine yerleşir. Embriyonun ZP'yı yırtıp dışarı çıkması (hatching), embriyo gelişiminin beşinci veya altıncı günü blastokist safhasına ulaştıktan sonra oluşmaktadır. Yapılan birçok çalışmada gebeliğin oluşmamasında, embriyonun ZP'yı yırtarak dışarıya çıkamaması ve rahim duvarına yerleşememesinin önemine dikkat çekilmiştir. Bu problemin çözümlenmesi için transfer işlemi öncesi yapay olarak ZP açılır (assisted hatching, AHA). Bu işleme ek olarak; trofektoderm biyopsi işlemi uygulanacak olan embriyo gelişiminin beşinci veya altıncı günündeki blastokistlere embriyodan hücre almak için, biyopsi işlemi öncesi embriyo gelişiminin üçüncü gününde lazer ışını yardımı ile embriyoyu çevreleyen ZP açılmaktadır (assisted hatching, AHA) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Üçüncü gün embriyosunda, lazer ışını yardımıyla zona pellusida da oluşturulan açıklık (assisted hatching, AHA)

(http://www.genesisfertility.co/Laser.aspx)

2.5.8. Embriyo Biyopsi Yöntemleri

Belirli kriterler dikkate alındığı zaman preimplantasyon genetik tarama uygulanacak hücre üç farklı yöntemle elde edilmesi mümkündür. Bunlar:

1. Blastomer biyopsi yöntemi

2. Polar cisim biyopsi yöntemi

3. Trofektoderm biyopsi yöntemi

Uygulanacak olan biyopsi yönteminin embriyo gelişimini ve implantasyon başarısını etkilememesi, PGT uygulanmış embriyonun genetik yapısını doğrudan yansıtıyor olması ve maliyet faktörü ile klinik sonuç düşünüldüğü zaman kabul görmesi gibi kriterler dikkate alınması doğru olacaktır.

2.5.8.1.Blastomer Biyopsi Yöntemi

Blastomer biyopsi yöntemi; ESHRE kriterlerine göre klevaj evresinde en az 6 blastomer içeren üçüncü gün embriyosundan hücre alınması olarak tanımlanmaktadır (52). Blastomer biyopsi yönteminde zona pellucida'nın lazer ışını yada, mekanik ve kimyasal yöntemler ile bir açıklık oluşturulması gerekmektedir. Birçok çalışmada bu metodların klinik sonuçlar bakımından kıyaslanmış ve anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (53,54). Segmantasyon evresi biyopsisinde, blastomerlerin alınması implantasyonu ve embriyonun gelişme potansiyelini azaltmaktadır. Kirkegard ve ark. blastomer biyopsisi uygulanan ve işlem uygulanmayan grupların embriyo

gelişimlerini karşılaştırmış ve çalışmada blastomer biyopsisinin blastokist gelişimini yavaşlattığını ve hatchingi bozduğunu bildirmiştir (55). Tüm bu gelişmeler sonrasında Scoot ve ark ları 116 hastanın dâhil olduğu bir çalışma yayınlamışlardır. Bu çalışmada hastalardan transfer için en iyi iki embriyo seçilip, çalışmaya dâhil olan hastaların 46'sında embriyolardan birine blastomer biyopsisi, kalan 70 hastada ise embriyolardan birine trofektoderim biyopsisi uygulanmış olup, her iki guptada diğer embriyoya işlem uygulanmayıp kontrol grubu oluşturulmuştur.

Kontrol grubu ve biyopsi uygulanmış iki embriyo seçilip transfer edilerek gebelik takibi yapılmıştır. Gebelik sonucu abortus ile sonlananan hastalarda, implante olan embriyonun biyopsi uygulanmış veya kontrol grubu embriyosundan hangisine ait olduğu incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, blastomer biyopsisi uygulanan grupta implantasyonu gerçekleştiren embriyoların %50 sinin kontrol grubu embriyosu olduğu, %30,4 'ünün blastomer biyopsisi yapılan embriyolar olduğu görülmüş, blastomer biyopsisi yapılan grupta implante potansiyelinde belirgin bir düşüş saptanmıştır (p=0.02). Trofektoderim biyopsisi uygulanmış embriyolarda ise implantasyon oranları %51 ve kontrol grubu embriyolarında %54 olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Özetle, blastomer biyopsisi uygulanmış embriyolarda implantasyon başarı oranlarında %39 gibi ciddi bir düşüş ve embriyonun gebelik meydana getirme potansiyelinde azalma saptanmıştır.

2.5.8.2.Polar Cisim Biyopsi Yöntemi

Blastomer biyopsisinin arzulanan başarıyı gösterememiş olması dünya genelinde yeni arayışlar içinde olunmasına neden olmuştur. Bu arayışlar neticesinde blastomer biyopsisine alternatif olarak polar cisim (PB) biyopsisi tanımlanmıştır.

Erkek genomuna ait bilgileri içermediği için monogenik hastalıkların tanısından yararı kısıtlıdır. Capalbo A ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PB biyopsisinin anöploidi taramasında kısıtlı fayda sağladığı bildirilmiştir (56). Bu çalışma kapsamında aynı embriyodan PB, blastomer ve trofektoderm biyopsisi olmak üzere üç farklı yöntemle biyopsi alınmış ve aCGH ile gemetik analiz yapılmıştır. Genetik analiz ile ileri yaş hastalarda implantasyon öncesi gelişimin kromozomal paternlerini araştırma fırsatı yaratmıştır. Belirgin bir anöploidi sıklığının

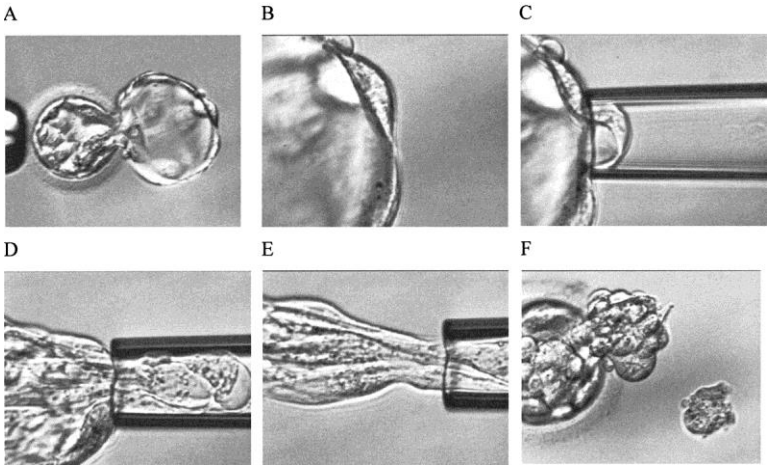
mayoz-2 evresinde olduğu saptanmıştır. Bu nedenden dolayı polar cisim (PB) biyopsisi uygulamasında her iki polar cisim de incelenmesi gerekliliğine sebep olmaktadır; bu durum ise maliyeti ve emeği artırmaktadır.

Tüm bunlara ek olarak paternal kaynaklı gen mutasyoları, mitoz nedenli anöploidiler, embriyo gelişiminin sonraki safhasında olası düzeltilebilecek olan mayotik hatalar ve/veya tek gen analizinde paternal kaynaklı mutasyon analizi PB biyopsisi uygulamasında gözden kaçmış olacaktır.

2.5.8.3.Trofektoderm Biyopsi Yöntemi

Trofektoderm biyopsi yöntemi Boer ve ark. tarafından 2004 yılında bildirilmiştir (57). İmplantasyon öncesi gelişim evresinde blastokist aşamasına ulaşan embriyolar morfolojik olarak farklılıklar gösterebilirler. Embriyoların gelişimsel oranları veya morfolojik olarak değerlendirilmeleri ile anöploidi oranları arasında ilişki olmadığı açıklanmıştır (58). IVF tedavisiyle oluşturulan embriyolar kalite kriterlerine bakılmaksızın biyopsi alınması gerekmekte ve transfer öncesi genetik açıdan incelenebilmektedir. Böylece sağlıklısız embriyoların eleminasyonu sağlanmaktadır. Preimplantasyon genetik tarama (PGT-A) ve preimplantasyon genetik tanı (PGT) yöntemi ile embriyolar transfer edilmeden önce genetik ve kromozomal açıdan incelenmesi mümkündür.

Blastokist evresine ulaşan embriyo ortalama 40-150 hücre içermektedir. Trofektoderm biyopsi yönteminde iç hücre kitlesine (ICM) müdahalede bulunulmadan, sadece dış hücre (trofektoderm) tabakasından 8-10 trofektoderm hücresi alınarak yapılmaktadır. Bu yöntem ile alınan trofektoderim hücreleri sayısını artırdığı için genetik analizde tanı koyma başarısını artırmaktadır. Butün bu işlemlerin yapılabilmesi için beşinci ve altıncı gün blastokist aşamasındaki embriyonun tek katmanlı dış tabakasını saran epitel kaynaklı trofektoderm hücre biyopsisinin yüksek büyütme altında mikropipet yardımıyla sekiz ile on hücre alınıp genetik analiz yapılacak laboratuvara teslim edilmesi gerekmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Trofektoderm Biyopsi Yöntemi

Şekil 2.8.'de (59): Preimplantasyon Genetik Tarama (PGT-A) ve Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) uygulamasında trofektoderm biyopsi yöntemi görülmektedir.

a. Embriyo gelişiminin üçüncü gününde lazer yardımı ile zona pellusida da açıklık oluşturulup, beşinci gün aşamasında zonadan dışarı çıkmış trofektoderm hücre kitlesi ile hatching gözlemlenen blastokist aşamasındaki embriyo
b. Yakın çekim dışarı çıkmış trofektoderm hücre kitlesi
c. Biyopsi pipeti ile tutulan trofektoderim hücre kitlesi
d. trofektoderm hücreleri biyopsi pipeti içerisine çekilir
e. Biyopsi pipeti ile trofektoderm hücreleri aspire edilir ve bu esnada lazer ışınları yardımıyla blastokistden ayrılması sağlanır
f. Trofektoderim biyopsisi sonucu normal gelişimine devam eden blastokist ve biyopsi ile alınan trofektoderim hücreleri.

Sonuç olarak klinik uygulamada trofektoderm biyopsisi uygulamak maliyet açısından yararlı olmaktadır. Bunun sebebi ise, gelişim potansiyeli düşük olan embriyoların ileri dönem olan blastokist evreye ulaşamamasıdır. Tüm bu gelişmelerin sonucunda trofektoderim biyopsisi uygulanmış embriyo sayısında bir azalma ve maliyetten bir kazanım olacaktır. Yıllar içerisinde trofektoderm biyopsisi uygulaması sayılarında bir artış gözlemlenmektedir. Polar cisim biyopsisi uygulaması ise ciddi oranda azalmıştır. Fakat birçok dezavantajlar sebebi ile

blastomer biyopsisi uygulanması oranlarında azalma olmasına rağmen halen, kullanılan en sık yöntem olarak bilinmektedir

2.5.9. Preimplantasyon Embriyolarının Genetik Analizi

Preimplantasyon Genetik Test (PGT), üreme tıbbında İVF tekniği sonucu oluşan embriyolardaki gen mutasyonlarını ortaya koyan bir yöntemdir. Preimplantasyon genetik testin en önemli avantajı, implantasyon öncesi uygulanması ile genetik olarak sadece sağlıklı embriyonun tespit edilerek hastaya transfer edilebilmesine imkân sağlamasıdır. Bu sayede ebeveynler, gebelik dönemini fetusun sağlıklı olduğu bilinci ile geçirebilmektedir. İki farklı perimplantasyon genetik testi mevcutur. Bunlar, aile kurmak isteyen çiftlerin biri veya ikisinin bilinen bir gen anomalisi taşıyıcısı olması durumunda ve genetik hastalık açısından etkilenmiş embriyoların seçilmesinde uygulanan Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) ve kromozomal düzensizlikleri ayırt etmeye yönelik Preimplantasyon Genetik Tarama (PGT-A).

2.5.9.1.Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT)

Preimplantasyon genetik tanı işlemleri implantasyon öncesi evrede uygulanan test metotları olduğu için ebeveynlere İVF uygulanması zorunluluğunu getirmektedir. PGT uygulamaları endikasyon ve yöntem bakımından prenatal tanı metotlarına kıyasla farklılıklar içermektedir.

Preimplantasyon genetik tanı uygulamaları incelendiği zaman, çok önemli endikasyon grubu olarak dengeli translokasyon taşıycılığı karşımıza çıkmaktadır. Bu endikasyon grubuna dâhil ebeveynlere ait herhangi bir sağlık tehlikesi bulunmamasına rağmen, çocuğun dengesiz translokasyon anomalisine sahip şiddetli defektlere maruz kalabilir. Dengeli translokasyon taşıyıcısı endikasyonuna sahip ebeveynlere, implantasyon öncesi uygulanan PGT sonuçlarının analiz edildiği birtakım araştırmalar bulunmaktadır.

Analiz sonuçlarında canlı doğum oranın % 11,5'ten % 79,4'e yükseldiği ve gebeliğin düşük ile sonlanma oranın ise % 95'ten % 12,5'e azaldığı bildirilmiştir.

Tek gen hastalığı açısından risk taşıyan eşlere PGT uygulanması ivmeli bir şekilde kullanımı artmış, günümüzde güvenilir ve çok tercih edilir bil hal almıştır. PGT yöntemi ile Kistik Fibrozis, Beta Talasemi ve Tay Sacs gibi tek gen hastalıklarının tanısı yapılabilmektedir. Türkiye geneli bilhassa akraba evliliklerinden kaynaklanan tek gen hastalığına sahip canlı doğum oranlarının yüksek olması nedeniyle, PGT tanı uygulaması yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

İlerleyen teknoloji ile birlikte günümüzde, ebeveynler hasta çocukları için HLA uyumlu kardeş amaçlı PGT uygulamalarına başvurmaktadır. Bu amaçla ebeveynler için en makul yöntem, IVF tekniği ile geliştirilen embriyolarda PGT metoduyla hasta çocukları için HLA uyumlu kardeş aramaktır.

2.5.9.2.Preimplantasyon Genetik Tarama (PGT-A)

Yıllar içerisinde teknolojik gelişmelere paralel olarak IVF uygulamalarında embriyo seçimi ile ilgili pek çok yeni metotlar geliştirilmiştir. İVF tedavilerinde temel amaç, gebelik oluşturma potansiyeli yüksek olan embriyoyu seçebilmek ve ebeveynleri sağlıklı çocuk sahibi yapmaktır. IVF tedavilerinde rutin olarak morfolojik skorlama sistemine dayalı iyi kalite embriyo seçimi yapılmakta ve iyi nitelikte embriyo transferi hedeflenmektedir. Fakat, bir çok denemede iyi kalite embriyo seçimi ve transferi ile de gebelik meydana gelmemektedir. Bu durumun nedenlerinden birincil olanı, morfolojik olarak iyi kalite olan embriyoların, genetik olarak anöploid olmasıdır. Bu sebepten dolayı embriyo transferi öncesi sayısal koromozom yapısını analiz eden Preimplantasyon Genetik Tarama (PGT) metodu geliştirilmişir. Bu uygulama İngilizce olarak “Preimplantation Genetic Screening-PGS” nosyonu olarak adlandırılmakradır. Son zamanlarda bu tarama testi “Preimplantasyon Genetik Tanı-Anöploidi -PGT-A” kavramı olarak literatürde karşımıza çıkmaktadır.

Sıklıkla PGT-A metodu, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, ileri maternal yaş ve tekrarlayan abortus vakalarında alternatif bir tedavi planı olarak uygulanmaktadır. Birçok merkezde ise çoğul gebeliği önlemek adına tek embriyo transferinde, embriyo seçilim metodu olarak PGT-A uygulaması kendine yer bulmaktadır.

PGT-A metodu uygulanmaya başladığı ilk yıllarda pek olumlu neticeler vermemiştir. Bu nedenle pek çok kez PGT-A uygulaması tartışmalara sebep olmuştur. Mastenbroek ve ark.'nın yayınlamış oldukları bir metaanalizde ileri anne yaşında, PGT-A uygulamasının bir yararı olmadığını, hatta kümülatif gebelik şansını azalttığını bildirmiştir. Fakat incelendiği zaman, Mastenbroek ve ark.'nın yapmış oldukları metaanalizde dâhil edilen çalışmalar döneminde PGT-A için genel yaklaşım segmentasyon biyopsisi ile floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniğiydi. Klinik anlamda beklenen başarının elde edilmemesinin en birincil nedeni FISH tekniğinin sınırlı sayıda kromozomları taramasıdır. Artan PGT-A çalışmalarıyla birlikte, implantasyon öncesi embriyolarda 24 kromozomun herhangi bir tanesinde anöploidi bulunabileceği ve embriyonun genetik açıdan sağlıklı olduğunu tanımlayabilmek için 24 kromozomun incelenmesi gerektiği bildirilmiştir. FISH tekniği ile PGT-A taraması sonucu anöploid olarak nitelendirilmiş embriyoların, trofektoderm biyopsisi sonucu 24 kromozomu analiz edilmiş ve %40 oranında öploid embriyoya rastlanmıştır. Bu nedenle, tüm kromozomların analiz edilmediği FISH tekniğinde, anöploid embriyoların tamamının elemine edilmemesi ve öploid embriyoların transfer edilmemesi PGT-A uygulamasının bir dezavantajı olarak bilinmektedir.

İlerleyen teknoloji ile birlikte detaylı kromozom taramasına imkân sağlayan genetik tarama metodları gelimiş ve sağlıklı embriyo seçiminde rutin uygulamalar haline gelmiştir. Bu uygulamalar array Comperative Genomic Hybridisation (aCGH), metafaz CGH, Single Nucleotide Polymorphisim (SNP), kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ve yeni nesil dizileme (next generation sequencing; NGS) olarak tanımlanmıştır. Geliştirilen bu metotların, uygulamadaki pratikliği ve güvenilir sonuç vermesi bakımından kendi aralarında farklılıklar göstermekle birlikte, birbirlerine kıyasla olumlu ve olumsuz yönleri mevcuttur.

Metafaz CGH arrayleri sıklıkla polar cisim taramalarında kullanılmasına rağmen, analiz süresi uzun bir çalışma gerektirdiğinden segmentasyon ve blastokist evresi embriyolarda taze embriyo transferine imkân vermemektedir.

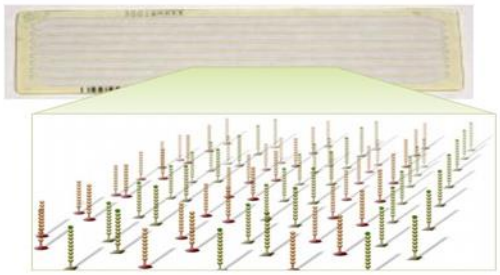
aCGH arrayleri, metafaz CGH arraylerine kıyasla test süresi daha kısa bir protokol (12-16 saat) gerektirmekedir. Bu sayede blastomer ve trofektoderm

biyopsilerinde taze embriyo transferine olanak sağlamaktadır. 2012 yılında Yang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, trofektoderm biyopsisi ve aCGH uygulanan öploid embriyolarla, yalnızca morfoloji kriterlerine dayalı seçilen embriyolar gebelik açısından kıyaslanmıştır. Bu çalışmada aCGH grubu sonuçları anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir (60).

2.5.10. NGS Tekniği İle Preimplantasyon Genetik Tarama

Detaylı kromozom taraması yöntemlerinde son teknoloji olan yeni nesil sekanslama (Next Generation Sequencing –NGS) preimplantasyon genetik tarama uygulamlarında yaygın olarak kullanılması ile yeni bir dönem başlattı. NGS tekniği sayesinde tüm ekzom ve genom dizilemelerine ulaşılabilmektedir. 2007 yılında NGS tekniği ile ilk genom taramasını yayınlayan James Watson, PGT ve PGT-A uygulamalarında yeni heycan yaratmıştır.

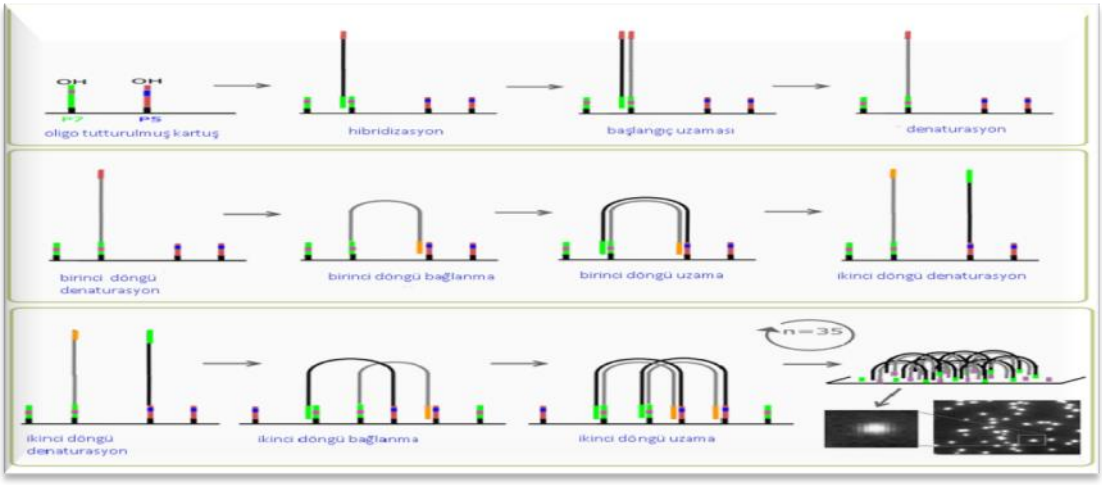
NGS tekniğinini çalışma prensibi: NGS tekniğinin çalışma ilkesi saflaştırılmış DNA materyalinin izole edilip hazırlanması ile başlar. Yeni nesil dizileme tekniğinde birinci basamak işaretleme yapmaktır. Bu safhada DNA örneğine adaptörler yerleştirilir. Dizileme işlemi uygulanacak olan DNA materyalleri, şeritli bir cam üzerindeki (flow cell) dizinlere karşılık gelecek biçimde zemine yerleştirilir. Yerleştirilen her bir DNA izotermik bir biçimde artarak, ayni DNA örneğinin kopyalarını ihtiva eden hücre gruplarını (cluster) meydana getirir. Flowcell, şerit halinde iki tip oligonun çimen şeklinde yerleştirilmiş olduğu kanalları içeren bir camdır (Şekil 2.9). Cam zemin üzerindeki birinci ve ikinci oligo tipleri ile hibridizasyon gerçekleşmektedir. Fragman kısmındaki adaptör bölüme karşılık gelen oligo, polimerizasyon hibridinin bir karşılığını oluşturmaktadır. İkili sarmal yapıya sahip materyal denatüre olur ve özgün taslak yıkanıp atılır.



Şekil 2.9: flow cell kanalları

Şekil 2.9'da görüldüğü gibi yeni nesil dizilemede rutin olarak flow cell olarak adlandırılan, kanalları olan bir cam kullanılmaktadır. Kanallar içerisine iki farklı oligo çifti yerleştirilmiştir. Hibridizasyon, kanallara yerleştirilmiş olan iki tip oligo sayesinde olmaktadır.

DNA materyalleri köprü amplifikasyonu şeklinde çoğaltılırlar. Bu evrede DNA materyali es geçilerek, şeritli cam yüzeyindeki ikinci tip oligo ile hibridizasyon gerçekleştirir. Tüm bu evredeki işlemler, karşı zincir içinde gerçekleşir. Bu prosedür çok kez tekrarlanarak, senkron bir şekilde milyonlarca DNA parçasının kopyalarını içeren hücre kümeleri oluşturulur. Birinci dizileme primerinin ilk okumayı meydana getirmesi için uzatılmasıyla birlikte sekanslama başlamış olur. Tekrarlanan bu döngülerde, floresan eklenmiş dört nükleotid, gelişmekte olan halkaya eklenmek için rekabet ederler. Orijinal taslağın dizisine göre yalnızca bir tanesi dâhil edilir. Eklenen her nükleotid sonrası gruplar bir ışık kaynağı ile uyarılır. Bunun sonucunda özgün bir floresan sinyali yayılır. Milyonlarca grup muntazam paralel bir süreçte dizilenir (Şekil 2.10).

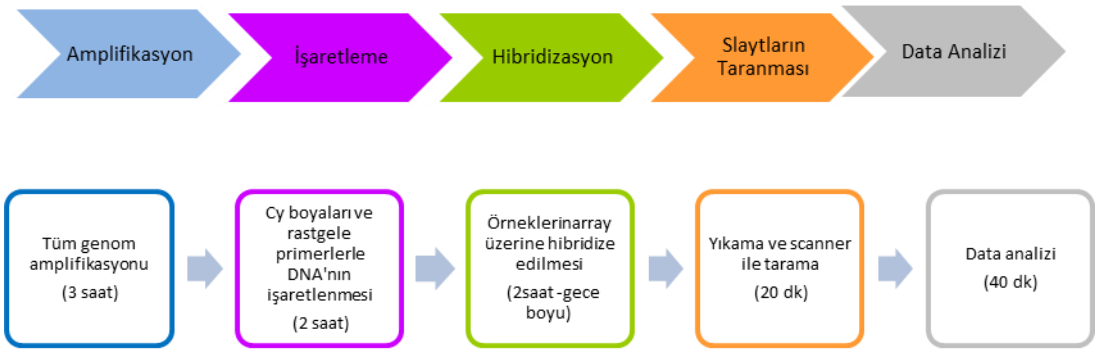


Şekil 2.10: Çalışma mekanizması

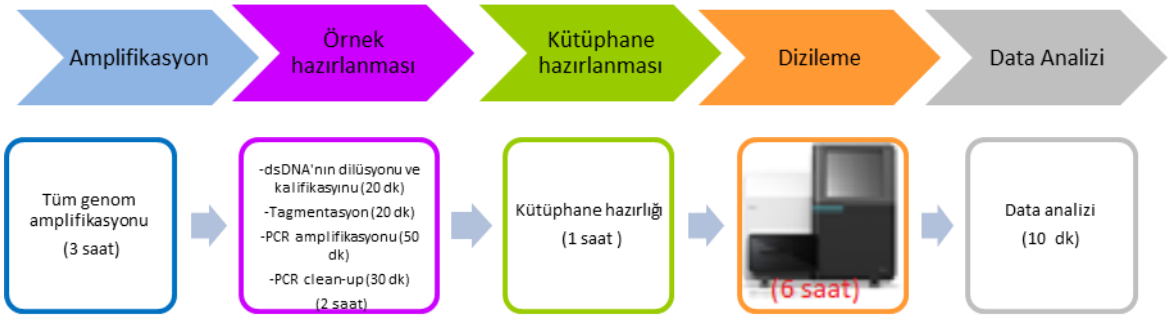
Şekil 2.10. (Mikrogen Laboratuvaarından alıntı yapılmıştır); Dizilenmesi amaçlanan DNA, adaptör olarak adlandırılan sekansı belli modüller sayesinde şeritli cam üzerindeki oligolara tutunabilen index primerlerle bağlanılır ve sonraki tepkimelerle bu modüller flowcell yüzeyine tutunur. Karşı zincir oluştuktan sonra, pek çok kez özdeş zincirin eşleniği meydana getirilir. Her bir nükleotid zincire bağlanırken bir ışık kaynağı ile uyarılır. Bunun sonucunda özgün bir floresan sinyali yayılır ve kendini tanıtır. Bu biçimde bir kısmın cluster olarak adlandırılan pek çok kopyasını içeren gruplar meydana gelir.

NGS ve aCGH uygulamalarının test stimülasyonları ve uygulama süreçleri: Uygulanacak olan iki metoda göre de embriyo kaynaklı hücreler elverişli yıkama stimülasyonları izlenerek PCR tüplerine aktarılır ve tüm genom amplifikasyonu (Whole Genome Amplification- WGA) gerçekleştirilir. WGA teknolojisinde nanogram miktarındaki bir DNA'dan mikrogram miktarına kadar çoğaltım yapılmaktadır. Bu safhadan sonra aCGH metodunda numune ve referanslar farklı iki floresan boya ile işaretlenecekleri, 150-180 dakika kadar süren labelling evresine geçecektir. Bir araya gelen materyaller saflaştırılır ve hibridizasyon sonrası minumum 4 saatlik bir inkübasyona bırakılır. İnkübasyon işlemini takiben arrayler yarım saat süren yıkama işlemi sonrasında, analiz edilip özel yazılımlar (Bluefuse multi software -Illumina C.A.) sayesinde değerlendirilirler. Bu süreç yeni nesil sekanslama metodunda WGA işleminin hemen sonrasına, elde edilen çift sarmal yapıdaki DNA'nın dilüsyonu ve değerlendirilmesi tamamlandıktan sonra flowcell yüzeyindeki indeks oligolara bağlanmayı sağlayan adaptör takılması işlemi

uygulanır. Protokoller evresi dahilinde cihazda ortalama 6 saatlik bir sekanslama safhası bulunmaktadır (Şekil 2.12).



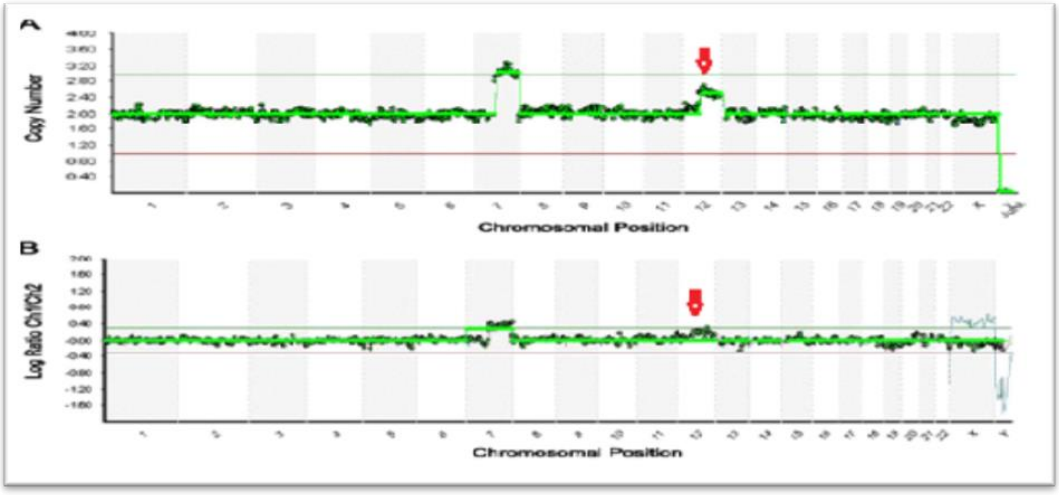
Şekil 2.11: aCGH test stimülasyonu ve süreleri



Şekil 2.12: NGS test stimülasyonu ve süreleri

Şekil 2.11 ve Şekil 2.12 (Mikrogen Laboratuvarından alıntı yapılmıştır) 'de NGS ve aCGH metotlarında stimülasyon ve süreleri belirtilmektedir. Özetlenecek olursa, NGS tekniği 14 saat süren bir işlem olmakla birlikte sekanslama 6 saat sürmekte ve analizi aCGH yöntemine göre daha kolay ve hızlıdır.

NGS teknolojisi kullanımı her geçen gün artmaktadır. NGS teknolojisinin en önemli avantajı yüksek değerlendirme aralığına sahip olmasıdır. Yapılan birçok araştırmada NGS sonuçları ile aCGH sonuçlarının % 99.9 - % 100 uyum gösterdiği bildirilmiştir (61,62). aCGH teknolojisine kıyasla kısmi anöploidiler ve mozaisizmler, NGS teknolojisinde daha iyi ayırt edilmektedir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: NGS ve aCGH tekniklerinin analiz verilerinin karşılaştırılması

Şekil 2.13 (Mikrogen Laboratuvarından alıntı yapılmıştır) 'te NGS ve aCGH tekniklerinin analiz verilerinin karşılaştırılması görülmektedir. A. NGS tekniği ile detaylı kromozom (24 kromozom; 1-22 + X ve Y) taraması. B. aCGH tekniği ile detaylı kromozom (24 kromozom; 1-22 + X ve Y) taraması. Ayni embriyo üzerinde yapılan detaylı kromozom taraması analiz verileri karşılaştırıldığı zaman, krozomal anomalilerin NGS tekniği ile daha duyarlılıkla değerlendirilebildiği gözlemlenmektedir. NGS tekniği ile yapılan detaylı kromozom analizinde, yeşil ve kırmızı çizgi arasındaki analiz aralığının daha belirgin olduğu görülmektedir.

2.5.11. Embriyo Transferi

Embriyo transferinde en önemli faktör, embriyonun rahim içerisinde verileceği en uygun yerin tespit edilmesi ve embriyo transferinin zamanlamasıdır. Genel olarak 3.gün ve 5.gün embriyo transferi yapılmaktadır. Eğer transfer edilecek embriyoya, preimplantasyon genetik test uygulanmışsa, dondurulmuş olan embriyolar içerisinden sağlıklı embriyo çözülerek transfer edilir. Embriyo transferinde minimum travma ile hızlı bir şekilde embriyoları uterusa yerleştirmek amaçlanmaktadır. Bu işlemi gerçekleştirirken kan, mukus ve uterin kasılmaların oluşmaması için dikkat edilmelidir. Ultrasonografi eşliğinde, yumuşak katater tercih edilerek yapılan transferler, serviste kanama riskini azaltmaka ve en başarılı sonuçları vermektedir.

BÖLÜM 3. YÖNTEM

3.1.Araştırma Modeli

Bu çalışma kapsamında 1 Ocak 2016 ile 31 Aralık 2017 tarihleri arasında İstanbul Şişli Kolan İnternational Hospital Tüp Bebek Merkezi'ne çocuk sahibi olamama şikayeti ile başvuran ICSI işlemi uygulanmış, yaşları 25-45 arasında değişen Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing; NGS) tekniği ile preimplantasyon genetik tarama uygulanmış 80 hasta dosyası ve 259 embriyoya ait veriler retrospektif olarak incelenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen hasta dosyalarında çiftlerin PGT-A endikasyonlarını tekrarlayan implantasyon başarızlığı, kadına ait ileri yaş faktörü ve açıklanamayan infertilite oluşturmaktadır. Belirtilen endikasyonlar sebebi ile çalışmaya dâhil edilen infertil hastaların beşinci gün embriyolarına PGT-A uygulanmış ve dolayısıyla üçüncü günde biyopsi yapılmış embriyolara sahip hastalar çalışmanın dışında tutulmuştur.

3.2.Evren ve Örneklem

Araştırma 01.01.2016 tarihinden 31.12.2017 tarihine kadar Kolan İnternational Hastanesinde yaşları 25 ile 45 arasında değişen, 80 kadın ile yapılmıştır.

3.3.Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

İstatistiksel analizler için SPSS yazılımı (Windows için SPSS 18.0, IBM, Chicago, IL, ABD) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) yanı sıra nicel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırılmasında Pearson ki-kare test kullanıldı. Anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

3.4.Veriler ve Toplanması

Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing; NGS) tekniği ile preimplantasyon genetik tarama uygulanmış hastaların izinleri alındı. Ovulasyon stimülasyonu öncesi, tıbbi öykülerinin kaydedilmesini takiben tüm hastaların fiziki ve ultrason muayeneleri yapıldı. Menstüral siklusun 3. günü FSH, LH ve E2 düzeyleri değerlendirildi.

Ovulasyon indüksiyonu için menstruel siklusun üçüncü gününden itibaren hastalara 150-225 IU dozunda rekombinant Folikül Stimüle edici Hormon verildi. Stimulasyon takibinde önde giden folikül 11-14 mm olduğunda gonadotropin salgılatıcı hormon GnRH antagonist uygulamasına başlandı. Folikül çapı ortalama 18-20 mm ulaştığında, 250 μg recombinant hCG (r-hCG; Ovitrelle®; Merck Serono, İsviçre) uygulanarak 34-36 saat sonra anestezi altında transvajinal ultrason eşliğinde yumurta toplama işlemi yapıldı.

OPU işlemi sonrası elde edilen oosit-kümülüs hücre kompleksi, kültür sıvısında yıkanıp 1 saat ayarlı inkübatörde bekletildi (%6 CO2, %5 O2 ve 37°C). İnkübasyon süresinin sonunda, denüdasyon işlemini gerçekleştirildi. Yumurta toplama işleminden 2-4 saat sonra ICSI işlemi, x400 büyütme altında Zeıss Axio Observer A1 inverted mikroskop kullanılarak HEPES (İrvine Scientific®, Santa Ana, ABD) içeren MHM mediumu içerisinde yapıldı. Mikroenjeksiyon işlemi uygulanmış oositler, inkübatör içerisindeki bir gün öncesinden hazırlanmış üzeri parafin yağı (Origio®, Målov, Danimarka) ile kaplı özel kültür ortamına kaldırıldı (Life Global®, Seattle, ABD).

Embriyolar %6 CO2, %5 O2 ve 37°C ayarlı inkübatör ortamında beşinci veya altıncı güne kadar kültüre edildi. Embriyonal gelişimin ilk günü pronükleus değerlendirilmesi yapıldı. Bölünme evresi; eşit olmayan bölünme, fragmantasyon ve blastomer sayısı bakımından skorlandı ve günlük olarak takip edildi. Gelişimin üçüncü gününde, lazer atışı (OCTAX Laser Shot System) ile zona pellusida da açıklık oluşturuldu. Blastokist (5.gün ve 6.gün) aşamasına ulaşan embriyolar Gardner ve ark. 'nın skorlama indeksine göre değerlendirilip, 2AB ve üzeri kalitedeki embriyolara trofektoderm biyopsisi uygulandı.

Trofektoderm biyopsisi uygulanacak blastokistler, kültür yağı (Origio®, Målov, Danimarka) ile kaplanmış ve HEPES'li Ca2+ / Mg2+ içeren 37°C' ye ayarlı embriyo kültür ortamına (İrvine Scientific®, Santa Ana, ABD) aktarıldı. İnverted mikroskopta yüksek büyütme altında iç çapı 20-40µm olan biyopsi pipeti (Origio®, Målov, Danimarka) yardımıyla sekiz ile on trofektoderm hücresi aspire edildi. Blastokistlerden aspire edilen trofektoderm hücreleri 2,5 ul'lik toplam hacimde ince duvarlı 0.2mL PCR tüplerine aktarılarak, lizise maruz bırakıldı ve NGS tekniği ile PGT-A yapılacak laboratuara teslim edildi.

Trofektoderm biyopsi işlemini takiben Cobo ve ark. tarafından yapılan tanımlar çerçevesinde, solüsyonlar ve VitriFit (Origio®, Målov, Danimarka) taşıyıcısı kullanılarak embriyo dondurma ve çözme işlemleri gerçekleştirildi. Embriyo dondurma işleminde, her bir taşıyıcıya ayrı numara verilerek embriyo yüklemesi yapıldı. Genetik analiz sonrası embriyo transferi için uygun birden çok öploid embriyo olması halinde, dondurma işlemi öncesi en iyi morfolojik seviyeye sahip embriyo çözülüp, transfer işleminden önce 2-3 saat inkübe edildi. Embriyo transfer işlemi ile aynı gün çözülen embriyolar, transferden hemen önce belirtilen morfolojik kriterlere göre tekrar bir değerlendirmeye tabi tutulup, embriyolog eşliğinde klinisyen tarafından ultrason altında özel bir katater (COOK®, Bloomington, ABD) ile transfer edildi.

Transfer edilen embriyo sayısı, kadın yaşı ve deneme sayısı kriterlerine göre 6 Mart 2010 tarihli ÜYTE yönetmeliğine uygun olacak şekilde belirlendi.

Genetik Laboratuvar Testlerinden; Tüm örneklere laboratuvar yeni nesil dizilimleme (NGS) uygulandı. Alınan trofektoderm biyopsisi örneklerinin Tüm Genom Çoğaltılması (WholeGenomeAmplification; WGA) işlemi IonSingleSeqKit'i (IonSingleSeq, A28955,Thermofisher) ile gerçekleştirildi. Örneklerin sekans işlemi için run planı IonTorrentserver kullanılarak hazırlandı ve sekanslama işlemi yaklaşık olarak 5 saat sürdü. Sekanslama işlemi sonrasında sekan verileri Ion PGM cihazı tarafından IonTorrentReporter'a aktarılarak analiz işlemi tamamlandı.

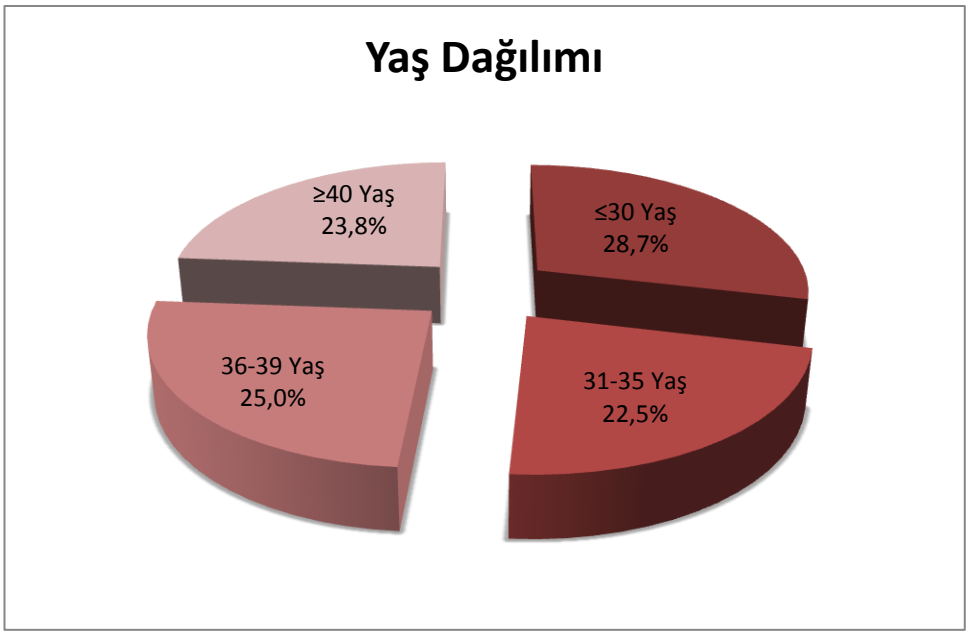
BÖLÜM 4. BULGULAR VE YORUMLAR

Çalışma 01.01.2016-31.12.2017 tarihleri arasında Kolan İnternational Hastanesinde yaşları 25 ile 45 arasında değişmekte olup, ortalama 34,83±5,38 yaş olan toplam 80 kadın ile yapılmıştır.

Tablo 4.1: Katılımcıların yaş dağılımları

Yaş (yıl)	Min-Maks (Medyan)	25-45 (35)
	Ort±Ss	34,83±5,38
	≤30 Yaş (ortalama)	23 hasta (28,7)
	31-35 Yaş (ortalama)	18 hasta (22,5)
	36-39 Yaş (ortalama)	20 hasta (25,0)
	≥40 Yaş (ortalama)	19 hasta (23,8)
Toplam Hasta		80 hasta (34,83)

Olguların %28,7'sinin (n=23) 30 yaş ve altında olduğu gözlenirken, %22,5'inin (n=18) 31-35 yaş arasında, %25'inin (n=20) 36-39 yaş arasında ve %23,8'inin (n=19) 40 yaş ve üzerinde olduğu gözlenmiştir.

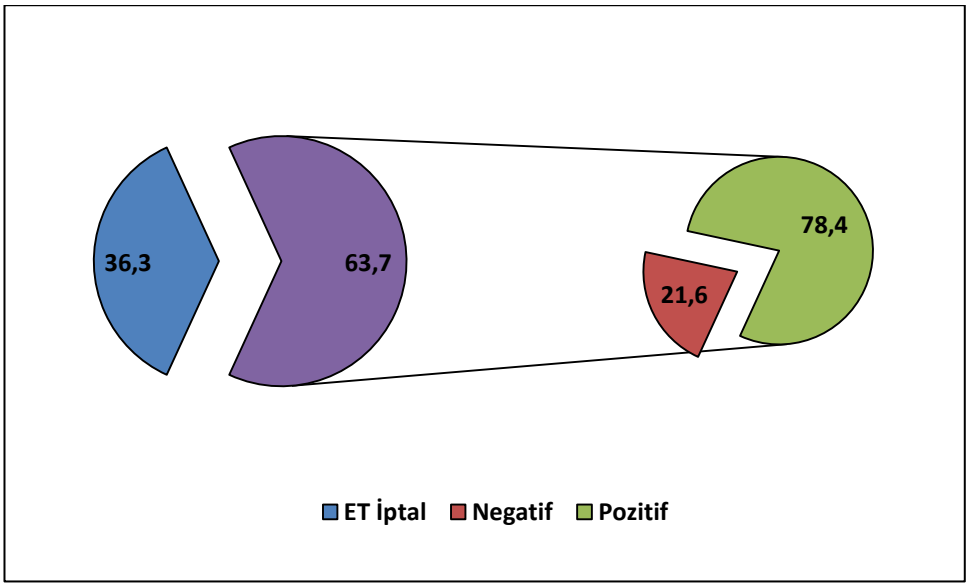


Şekil 4.1: Yaş Dağılımı

Tablo 4.2: Transfer ve Sonuç Değişkenlerinin Dağılımı

Transfer	ET İptal	29 (36,3)
	Transfer (+)	51 (63,7)
Sonuç	Negatif	11 (13,7)
	Pozitif	40 (78,4)

Çalışmaya katılan olguların %36,3'ünün (n=29) ET transferinin iptal olduğu; %63,7'sinin (n=51) ise transfer yapıldığı gözlenmiştir. Transfer yapılanların %78,4'ünün (n=40) transfer sonucunun pozitif olduğu gözlenirken, %21,6'sının (n=11) negatif olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2: ET Transfer Sonuçlarının Dağılımı

Tablo 4.3: Oosit, MII, MI, GV Değişkenlerinin Dağılımları

Oosit Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	1-44 (11)
	Ort±Ss	13,39±9,82
	Toplam Oosit	1071
MII	*Min-Maks (Medyan)*	1-35 (8)
	Ort±Ss	10,41±7,45
	Toplam MII	833
MI	*Min-Maks (Medyan)*	0-5 (0)
	Ort±Ss	0,83±1,23
	Toplam MI	66
GV	*Min-Maks (Medyan)*	0-16 (1)
	Ort±Ss	1,56±2,52
	Toplam GV	125
Diğer	*Min-Maks (Medyan)*	0-5 (0)
	Ort±Ss	0,59±1,13
	Toplam Diğer	47

Çalışmaya katılan olguların oosit sayıları 1 ile 44 arasında değişmekte olup, ortalama 13,39±9,82 olarak saptanmıştır. Çalışmaya alınan 80 kadından elde edilen toplam oosit sayısı 1071 olarak saptanmıştır.

Olguların MII sayıları 1 ile 35 arasında değişmekte olup, ortalama 10,41±7,45 olarak saptanmıştır. Toplam MII sayısı ise 833 dür. Olguların MI sayıları 0 ile 5 arasında değişmekte olup, ortalama 0,83±1,23 olarak saptanırken, toplam MI sayısı 66 olarak saptanmıştır. Olguların GV sayıları 0 ile 16 arasında değişmekte olup, ortalama 1,56±2,52 olarak saptanırken, toplam GV sayısı 125 olarak saptanmıştır.

Olguların diğer yöntemlerle alınan yumurta sayıları 0 ile 5 arasında değişmekte olup, ortalama 0,59±1,13 olarak saptanırken, toplam oosit sayısı 47 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.4: Fertilizasyon, Biyopsi Sayısı, Cryo Sayısı ve NGS Yapılan Blastokist Değişkenlerinin Dağılımları

Fertilizasyon	*Min-Maks (Medyan)*	0-30 (7)
	Ort±Ss	8,20±5,93
	Toplam Fertilizasyon	656
Biyopsi Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	1-14 (4)
	Ort±Ss	4,23±2,77
	Toplam Biyopsi	338
Cryo Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	1-14 (4)
	Ort±Ss	4,24±2,76
	Toplam Cryo	339
NGS Yapılan Blastokist	*Min-Maks (Medyan)*	1-8 (3)
	Ort±Ss	3,24±1,77
	Toplam Blastokist	259*

Çalışmaya katılan olguların fertilizasyon sayıları 0 ile 30 arasında değişmekte olup, ortalama 8,20±5,93 olarak saptanırken, toplam fertilizasyon sayısı 656 olarak saptanmıştır.

Çalışmaya katılan olguların biyopsi sayıları 1 ile 14 arasında değişmekte olup, ortalama 4,23±2,77 olarak saptanırken, toplam biyopsi sayısının 338 olduğu gözlenmektedir.

Olguların cryo sayıları 1 ile 14 arasında değişmekte olup, ortalama 4,24±2,76 olarak saptanırken, toplam cryo sayısının 339 olduğu gözlenmektedir.

Olguların NGS yapılan Blastokist sayısı 1 ile 8 arasında değişmekte olup, ortalama 3,24±1,77 olarak saptanırken, toplam blastokist sayısının 259 olduğu gözlenmiştir.

** NGS tekniği ile PGT-A uygulamasının maliyetinin yüksek olmasından dolayı, hastalar ekonomik koşullarını dikkate alarak biyopsi uygulanmış embriyolar içerisinden, seçilmiş olanlara PGT-A uygulanmıştır.*

Tablo 4.5: ET Yapılan Öploid Sayısı, Öploid Blastokist Sayısı, Öploid Oranı, Anöploid Blastokist Sayısı, Anöploid Oranı, Ampflikasyon Kaybı Sayısı ve Ampflikasyon Oranı Değişkenlerinin Dağılımları

ET Yapılan Öploid Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	0-2 (1)
	Ort±Ss	0,88±0,77
	ET Yapılan Öploid Toplamı	70
Öploid Blastokist Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	0-5 (1)
	Ort±Ss	1,25±1,30
	ÖploidBlast Toplamı	100
Öploid Oranı	*Min-Maks (Medyan)*	0-100 (25)
	Ort±Ss	34,24±34,06
Anöploid Blastokist Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	0-7 (2)
	Ort±Ss	1,90±1,49
	AnöploidBlast Toplamı	152
Anöploid Oranı	*Min-Maks (Medyan)*	0-100 (66,67)
	Ort±Ss	62,11±35,33
Ampflikasyon Kaybı	*Var; n(%)*	8 (10,0)
	Yok; n(%)	72 (90,0)
Ampflikasyon Oranı	*Min-Maks (Medyan)*	0-100 (0)
	Ort±Ss	4,27±15,00

Çalışmaya katılan olguların ET yapılan öploid sayısı 0 ile 2 arasında değişmekte olup, ortalama 0,88±0,77 olarak saptanırken, ET yapılan öploid toplam sayısı 70 olarak saptanmıştır.

Olguların öploid blastokist sayıları 0 ile 5 arasında değişmekte olup, ortalama 1,25±1,30 olarak saptanırken, toplam öploid blastokist sayısı 100 olarak saptanmıştır. Olguların öploid oranları 0 ile 100 arasında değişmekte olup, ortalama 34,24±34,06 olarak saptanmıştır.

Çalışmaya katılan olguların anöploid blastokist sayıları 0 ile 7 arasında değişmekte olup, ortalama 1,90±1,49 olarak saptanırken, toplam anöploid blastokist sayısının 152 olduğu gözlenmektedir. **Öploid embriyo bulunamadığı için ET yapılamayan 29 hasta mevcuttur.**

Olguların anöploid oranları 0 ile 100 arasında değişmekte olup, ortalama 62,11±35,33 olarak saptanmıştır.

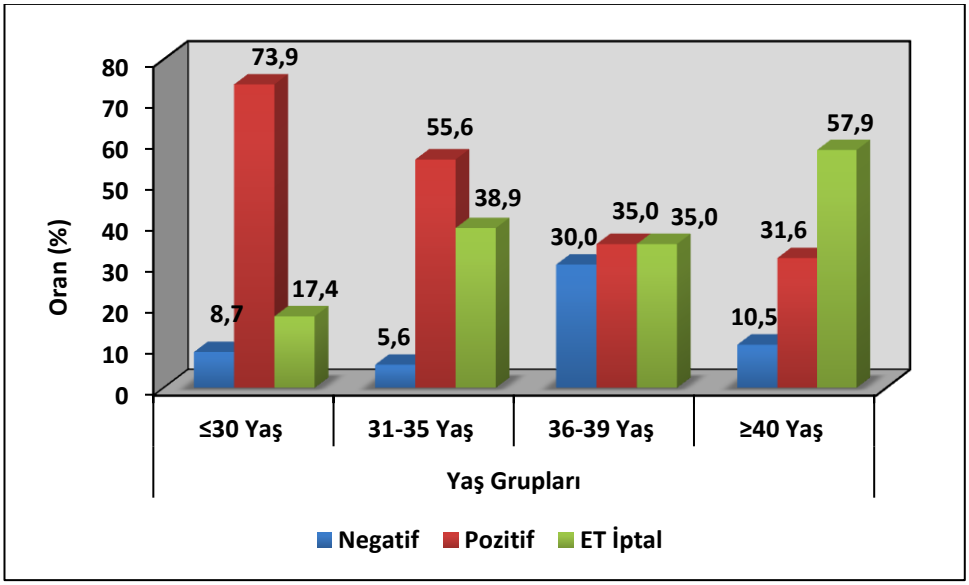
Çalışmaya katılan olguların ampflikasyon kaybı %10'unun (n=8) saptandığı gözlenmiştir. Olguların ampflikasyon oranları 0 ile 100 arasında değişmekte olup, ortalama 4,27±15,00 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.6: Yaş Gruplarına Göre Sonuçların Değerlendirilmesi

		Yaş Grupları				Test Değeri
		≤30 Yaş	31-35 Yaş	36-39 Yaş	≥40 Yaş	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Sonuç	Negatif	2 (8,7)	1 (5,6)	6 (30,0)	2 (10,5)	χ2:13,532
	Pozitif	17 (73,9)	10 (55,6)	7 (35,0)	6 (31,6)	a0,027*
	ET İptal	4 (17,4)	7 (38,9)	7 (35,0)	11 (57,9)	

[a]*PearsonChi-Square Test* **p<0,05*

Yaş gruplarına göre olguların transfer sonuçlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,027; p<0,05). Yaşları 30 ve altında olan olgularda transfer sonucunun pozitif olması oranı, yaşları 36-39 arasında ve 40 yaş ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,010; p=0,006; p<0,05).



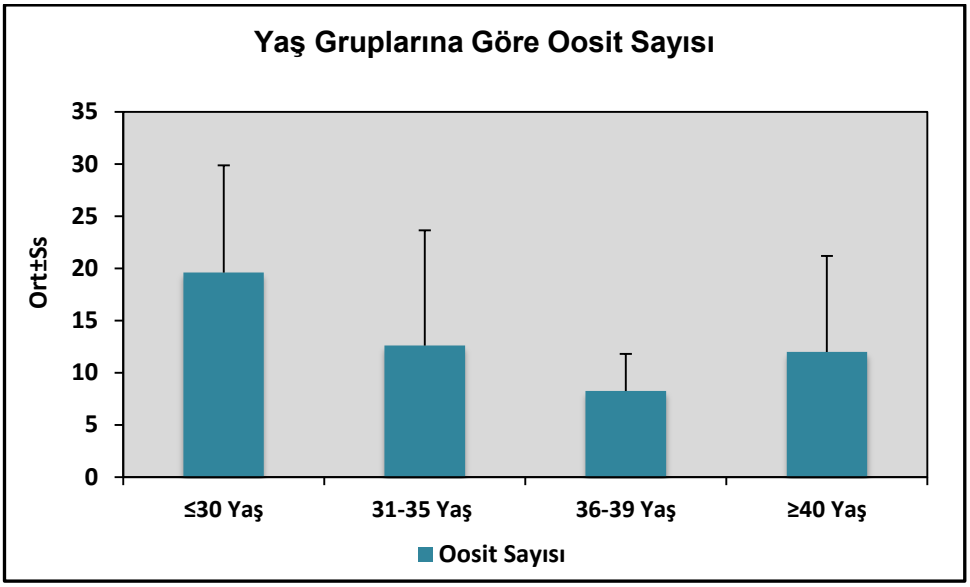
Şekil 4.3: Yaş Gruplarına Göre ET Sonuçlarının Dağılımı

Tablo 4.7: Yaş Gruplarına Göre Oosit, MII, MI, GV ve Diğer İşlem Sayılarının Değerlendirilmesi

		Yaş Grupları				Test Değeri
		≤30 Yaş (n=23)	31-35 Yaş (n=18)	36-39 Yaş (n=20)	≥40 Yaş (n=19)	^{b}p
Oosit Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	4-44 (18)	2-37 (8)	3-14 (8)	1-39 (11)	χ^2:16,640
	Ort±Ss	19,61±10,28	12,61±11,04	8,25±3,54	12,00±9,20	***0,001***
	Taplam oosit	451	227	165	228	
MII	*Min-Maks (Medyan)*	4-35 (13)	1-27 (7)	2-13 (7)	1-32 (8)	χ^2:13,410
	Ort±Ss	14,65±8,36	10,06±7,89	6,80±3,02	9,42±7,14	***0,004***
	Toplam MII	337	181	136	179	
M1	*Min-Maks (Medyan)*	0-5 (0)	0-5 (0)	0-2 (0,5)	0-2 (1)	χ^2:0,955
	Ort±Ss	1,04±1,52	0,89±1,64	0,60±0,68	0,74±0,81	*0,812*
	Toplam MI	24	16	12	14	
GV	*Min-Maks (Medyan)*	0-16 (2)	0-4 (0)	0-3 (0)	0-11 (1)	χ^2:11,294
	Ort±Ss	2,87±3,44	0,89±1,28	0,65±0,93	1,58±2,69	*0,010**
	toplamGV	66	16	13	30	
Diğer	*Min-Maks (Medyan)*	0-5 (0)	0-5 (0)	0-1 (0)	0-1 (0)	χ^2:6,090
	Ort±Ss	1,04±1,40	0,78±1,56	0,20±0,41	0,26±0,45	*0,107*
	Toplam diğer işlem	24	14	4	5	

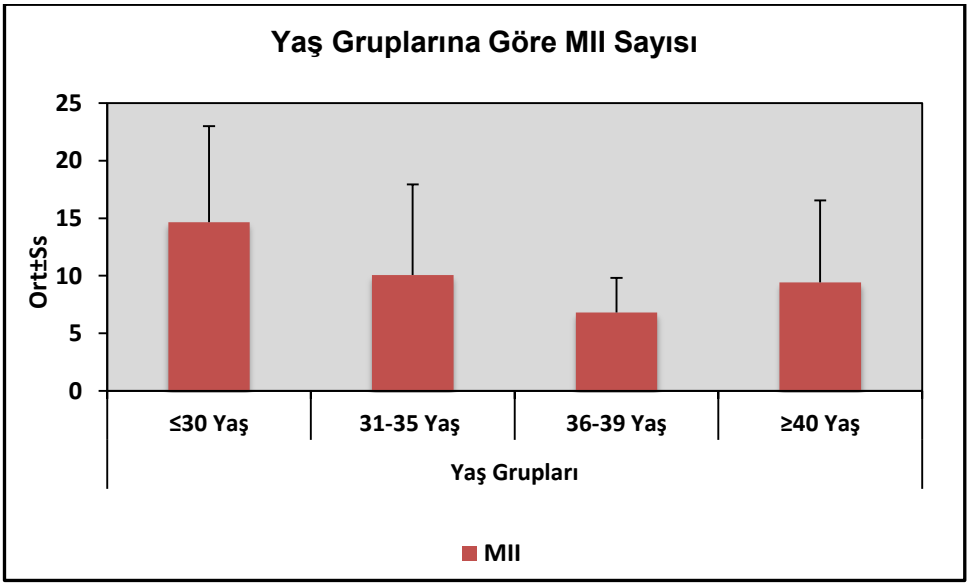
^{b}Kruskal Wallis Test **p<0,05* ***p<0,01*

Yaş gruplarına göre olguların Oosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,001; p<0,01). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitne U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların Oosit sayıları, yaşları 40 ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı olmamakla birlikte dikkat çekici düzeyde yüksek saptanırken (p=0,054; p>0,05); yaşları 36-39 arasında olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,001; p<0,01).



Şekil 4.4: Yaş Gruplarına Göre Oosit Sayılarının Dağılımı

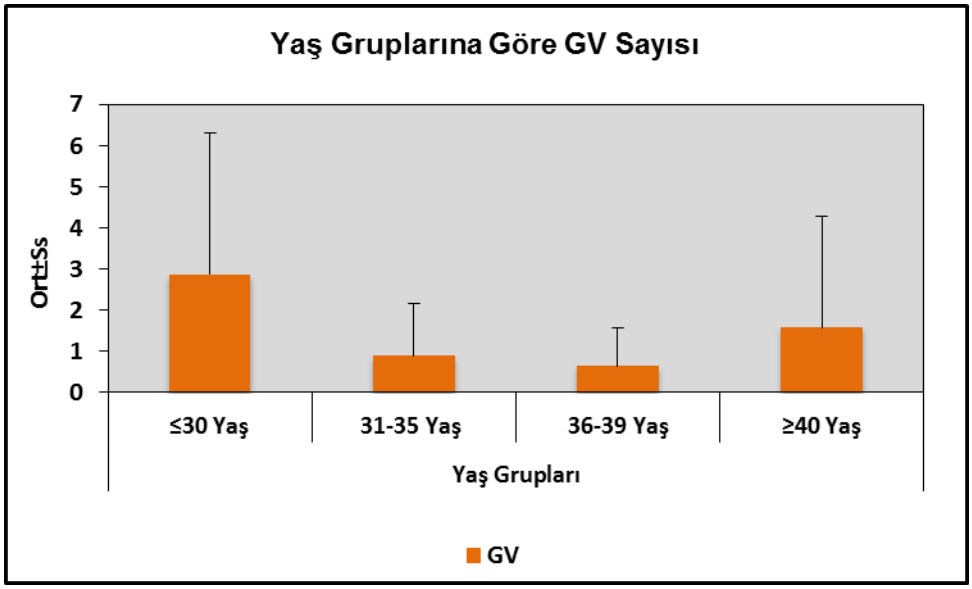
Yaş gruplarına göre olguların MII sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,001; p<0,01). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitne U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların MII sayıları, yaşları 36-39 arasında olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,001; p<0,01).



Şekil 4.5: Yaş Gruplarına Göre MII Sayılarının Dağılımı

Yaş gruplarına göre olguların MI sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Yaş gruplarına göre olguların GV sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,010; p<0,05). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitne U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların GV sayıları, yaşları 36-39 arasında olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,018; p<0,05).



Şekil 4.6: Yaş Gruplarına Göre GV Sayılarının Dağılımı

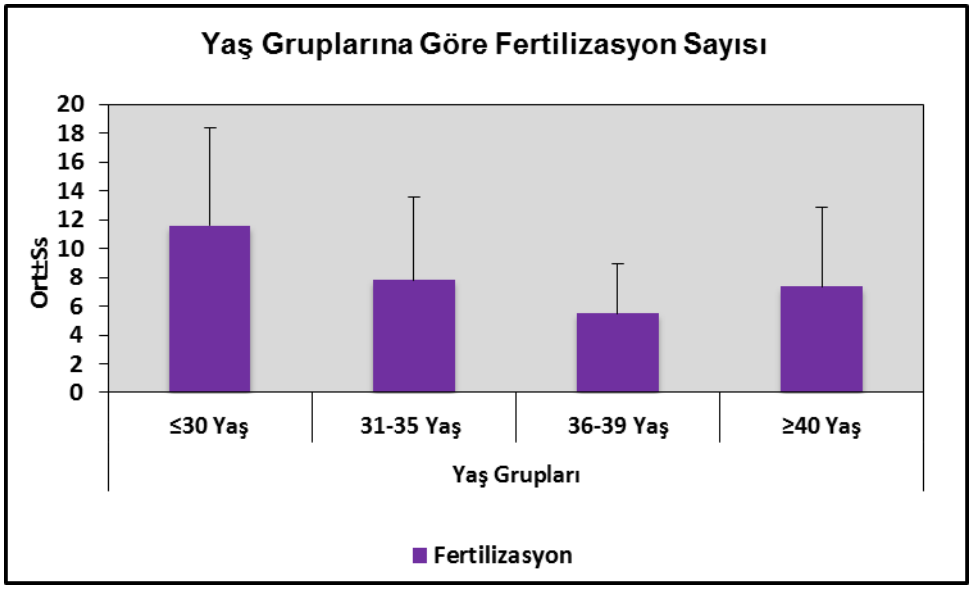
Yaş gruplarına göre olguların diğer yöntemlerle alınan yumurta sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 4.8: Yaş Gruplarına Göre Fertilizasyon, Biyopsi Yapılan Blastokist Sayılarının ve NGS Yapılan Blastokist Sayılarının Değerlendirilmesi

		Yaş Grupları				Test Değeri
		≤30 Yaş (n=23)	31-35 Yaş (n=18)	36-39 Yaş (n=20)	≥40 Yaş (n=19)	[b]*p*
Fertilizasyon	*Min-Maks (Medyan)*	3-30 (11)	1-19 (5,5)	0-12 (5,5)	1-26 (6)	χ^2:11,636
	Ort±Ss	11,57±6,79	7,83±5,78	5,5±3,43	7,32±5,52	***0,009****
	Toplam fertilizasyon	266	141	110	139	
Biyopsi Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	1-14 (5)	1-11 (3)	1-8 (3)	1-9 (3)	χ^2:8,120
	Ort±Ss	5,65±3,17	3,72±2,61	3,3±2,11	3,95±2,5	*0,044**
	Toplam Biyopsi	130	67	66	75	
Cryo Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	1-14 (5)	1-11 (3)	1-8 (3,5)	1-9 (3)	χ^2:7,807
	Ort±Ss	5,65±3,17	3,72±2,61	3,35±2,11	3,95±2,5	***0,049****
	Toplam Cryo	130	67	67	75	
NGS Yapılan Blastokist Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	1-7 (3)	1-7 (2,5)	1-8 (3)	1-7 (3)	χ^2:2,679
	Ort±Ss	3,65±1,7	2,83±1,65	3,15±1,98	3,21±1,75	*0,444*
	Toplam NGS Yapılan Blast	84	51	63	61	

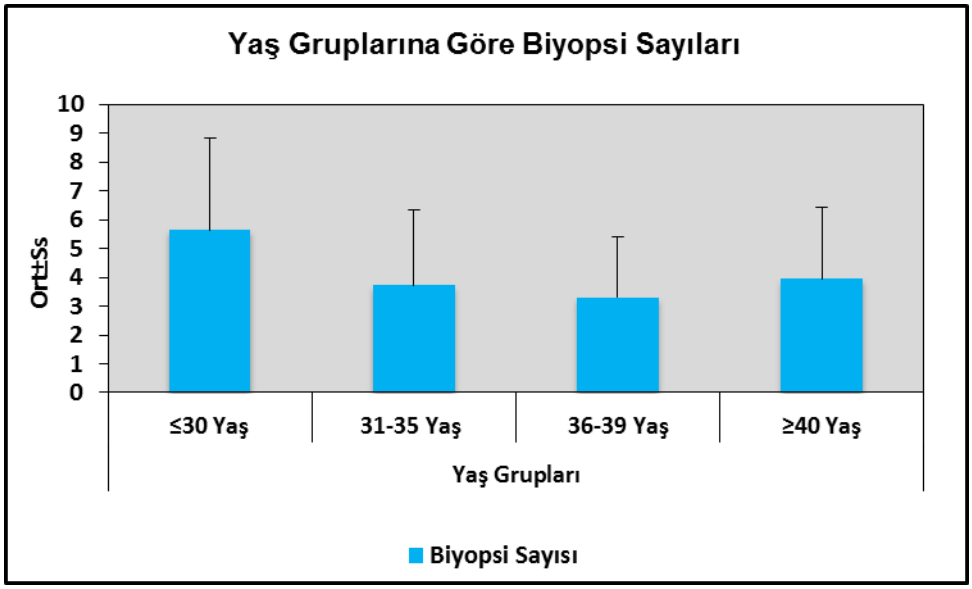
[b]*Kruskal Wallis Test* **p<0,05* ***p<0,*

Yaş gruplarına göre olguların fertilizasyon sayılarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,009; p<0,01). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların fertilizasyon sayıları, yaşları 36-39 arasında olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,006; p<0,01).



Şekil 4.7: Yaş Gruplarına Göre Fertilizasyon Sayılarının Dağılımı

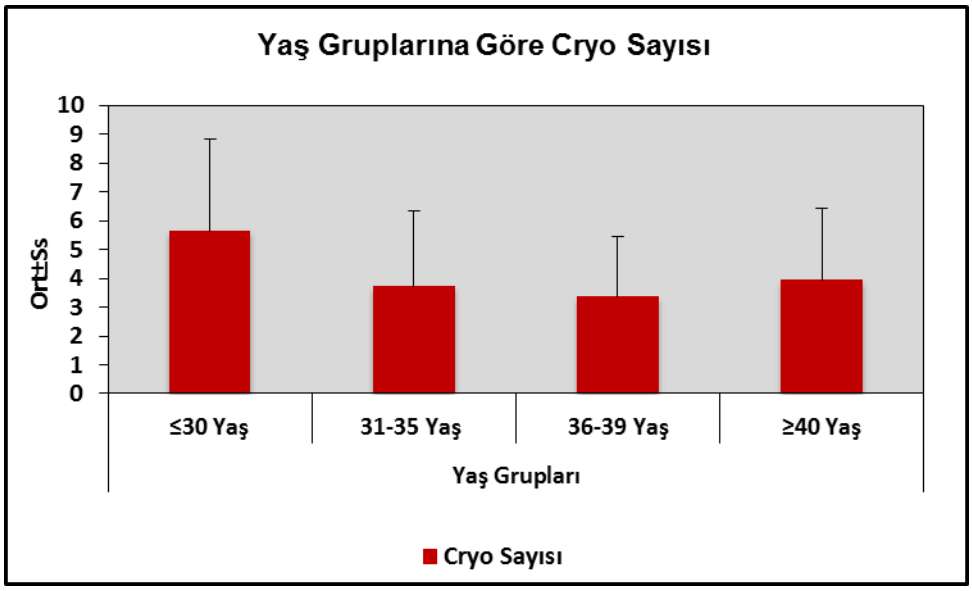
Yaş gruplarına göre olguların biyopsi sayılarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,044; p<0,05). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların biyopsi sayıları, yaşları 36-39 arasında olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,040; p<0,05).



Şekil 4.8: Yaş Gruplarına Göre Biyopsi Sayılarının Dağılımı

Yaş gruplarına göre olguların cyro sayılarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,049; p<0,05).

Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların cyro sayıları, yaşları 36-39 arasında olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,013; p<0,05).



Şekil 4.9: Yaş Gruplarına Göre Cryo Sayılarının Dağılımı

Yaş gruplarına göre olguların NGS yapılan blastokist sayılarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

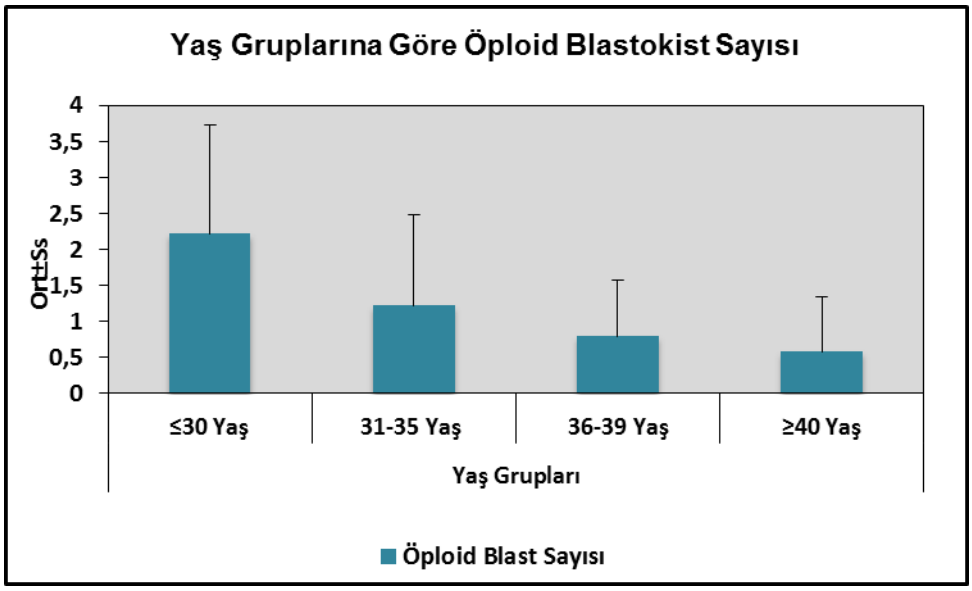
Tablo 4.9: Yaş gruplarına göre Fertilizasyon, Biyopsi Yapılan Blastokist Sayılarının ve NGS Yapılan Blastokist Sayılarının Değerlendirilmesi

		Yaş Grupları				Test Değeri
		≤30 Yaş (n=23)	31-35 Yaş (n=18)	36-39 Yaş (n=20)	≥40 Yaş (n=19)	[b]*p*
Öploid Blastokist Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	0-5 (2)	0-4 (1)	0-3 (1)	0-2 (0)	χ^2:17,063
	Ort±Ss	2,22±1,51	1,22±1,26	0,8±0,77	0,58±0,77	***0,001****
	Toplam ÖploidBlast	51	22	16	11	
Öploid Oranı	*Min-Maks (Medyan)*	0-100 (66,67)	0-100 (32,5)	0-60 (20)	0-100 (0)	χ^2:18,186
	Ort±Ss	57,38±32,18	38,94±39,56	20,71±19,3	16,02±26,37	***0,001****
Anöploid Blastokist Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	0-4 (1)	0-6 (1)	1-7 (2)	0-6 (2)	χ^2:12,001
	Ort±Ss	1,35±1,07	1,44±1,54	2,3±1,56	2,58±1,5	***0,007****
	Toplam AnöploidBlast	31	26	46	49	
Anöploid Oranı	*Min-Maks (Medyan)*	0-100 (33,33)	0-100 (55)	40-100 (80)	0-100 (100)	χ^2:21,365
	Ort±Ss	39,72±31,33	50,87±41,35	78,04±20,37	83,11±26,67	***0,001****
Ampflikasyon Kaybı; *n(%)*	*Var*	2 (8,7)	3 (%16,7)	1 (%5,0)	2 (10,5)	χ^2:1,494
	Yok	21 (91,3)	15 (83,3)	19 (95,0)	17 (89,5)	0,684
Ampflikasyon Oranı	*Min-Maks (Medyan)*	0-33,33 (0)	0-100 (0)	0-25 (0)	0-50 (0)	χ^2:1,736
	Ort±Ss	2,9±9,6	10,19±26,28	1,25±5,59	3,51±11,89	*0,629*
ET Yapılan Öploid Sayısı	*Min-Maks (Medyan)*	0-2 (1)	0-2 (1)	0-2 (1)	0-2 (0)	χ^2:11,349
	Ort±Ss	1,3±0,76	0,83±0,79	0,75±0,64	0,53±0,7	***0,010****
	Toplam ET Yapılan Öploid	30	15	15	10	

[b]*Kruskal Wallis Test* **p<0,05* ***p<0,01*

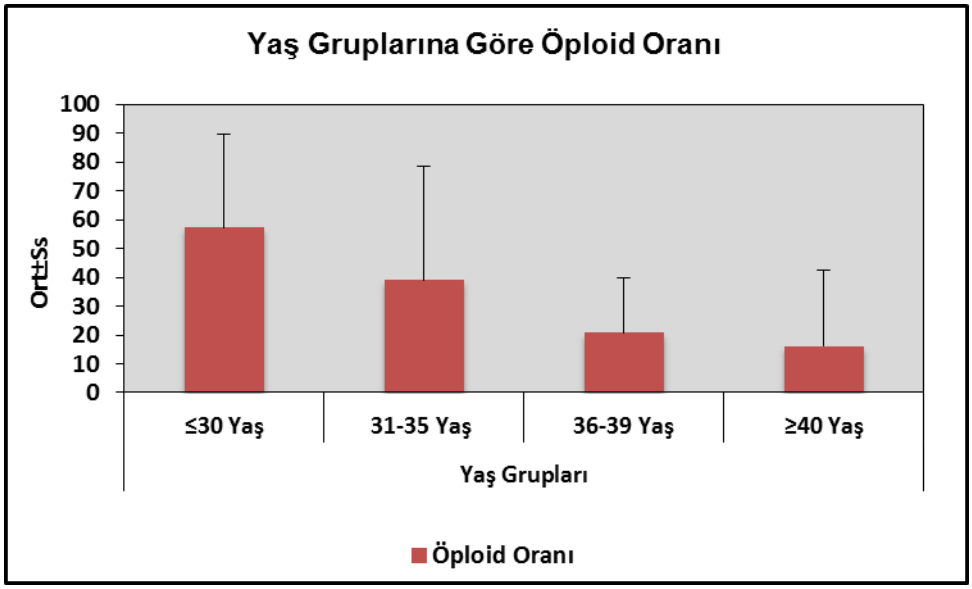
Yaş gruplarına göre olguların öploid blastokist sayılarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,001; p<0,01).

Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların öploid blastokist sayıları, yaşları 36-39 arasında ve 40 ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,006; p=0,001; p<0,01).



Şekil 4.10: Yaş Gruplarına Göre Öploid Blastokist Sayılarının Dağılımı

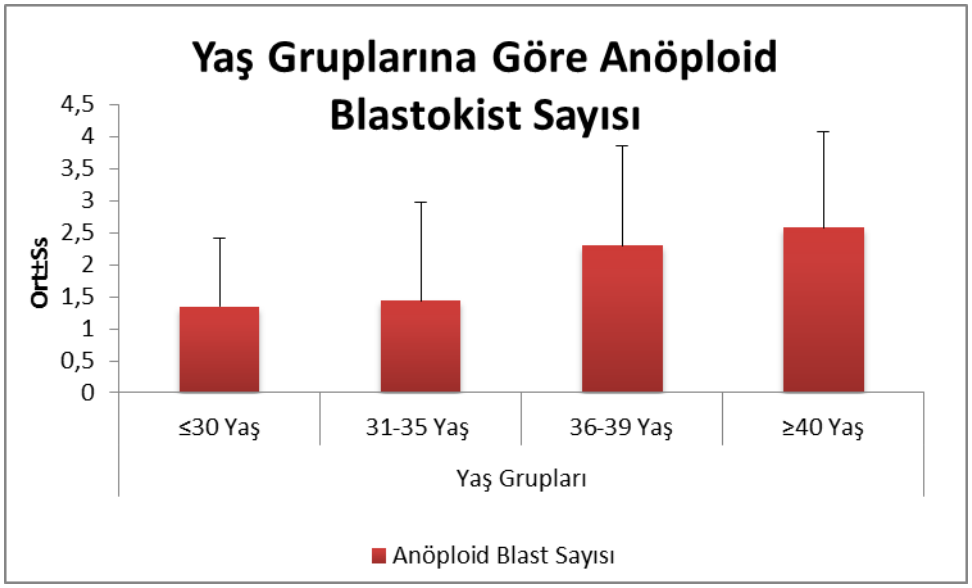
Yaş gruplarına göre olguların öploid oranlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,001; p<0,01). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların öploid oranları, yaşları 36-39 arasında ve 40 ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,001; p=0,001; p<0,01).



Şekil 4.11: Yaş Gruplarına Göre Öploid Oranlarının Dağılımı

Yaş gruplarına göre olguların anöploid blastokist sayılarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,007; p<0,01).

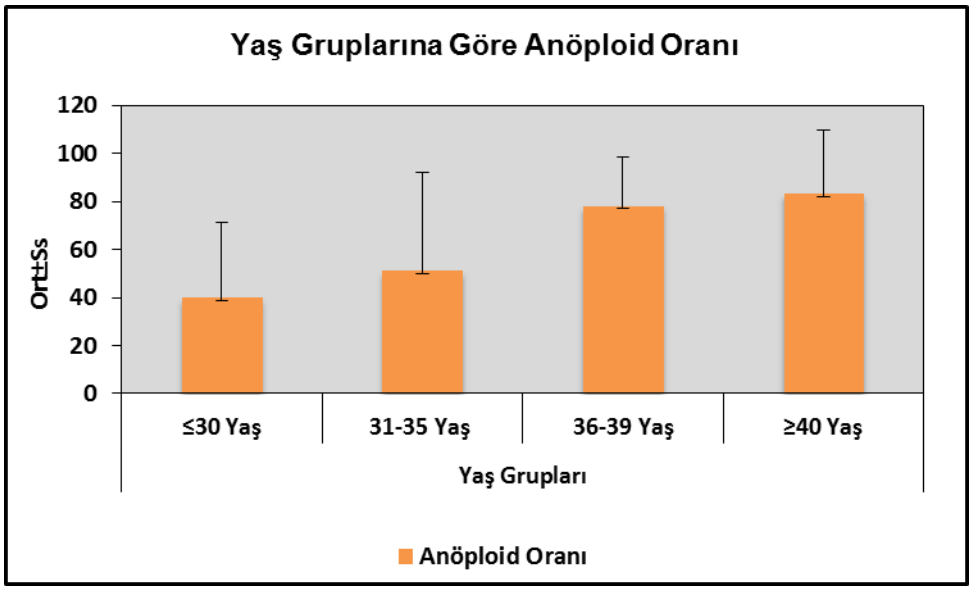
Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların anöploid blastokist sayıları, yaşları 40 ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (p=0,030; p<0,05).



Şekil 4.12: Yaş Gruplarına Göre AnöploidBlast Sayılarının Dağılımı

Yaş gruplarına göre olguların anöploid oranlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,001; p<0,01). Farklılığı

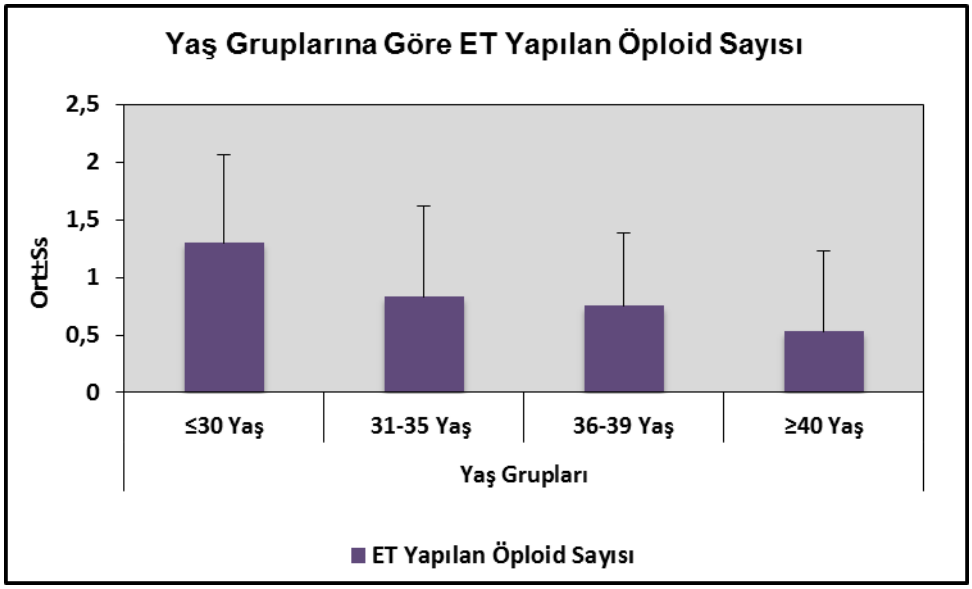
belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların anöploid oranları, yaşları 36-39 arasında ve 40 ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (p=0,001; p=0,001; p<0,0).



Şekil 4.13: Yaş Gruplarına Göre Anöploid Oranlarının Dağılımı

Yaş gruplarına göre olguların ampflikasyon kaybı oranlarının dağılımları, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Yaş gruplarına göre olguların ET yapılan öploid sayılarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,010; p<0,05).Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test sonuçlarına göre; yaşları 30 ve altında olan olguların ET yapılan öploid sayıları, yaşları 40 ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,012; p<0,05).



Şekil 4.14: Yaş Gruplarına Göre ET Yapılan Öploid Sayılarının Dağılımı

İstatistiksel analizler için SPSS yazılımı (Windows için SPSS 18.0, IBM, Chicago, IL, ABD) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) yanı sıra nicel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırılmasında Pearson ki-kare test kullanıldı. Anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

BÖLÜM 5. SONUÇ

5.1.Özet

Araştırmaya dâhil edilen 80 hasta dosyası dört yaş grubunda incelemeye alındı. NGS tekniği ile PGT-A uygulanan 30 yaş ve altı, 31-35, 36-39 ile 40 yaş ve üstü hastaların embriyolarındaki anöploidi oranları analiz edildi. Prognostik değerler PGT-A sonuçlarına göre; öploid blastokist ve anöploid blastokist parametrelerine göre değerlendirildi. Prognostik değerlerle yapılan analizler sonucunda, **yaş gruplarına göre anöploid blastokist oranlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü.**

5.2.Yargı

Günümüzde Türkiye ve Batı toplumlarında özellikle kadınların çalışma hayatında daha sık yer almaları ve kariyer yapmaları, çocuk sahibi olma isteklerini ileri yaşlara ertelemelerine neden olmaktadır. Sosyo-ekonomik düzey arttıkça, ileri kadın yaşına bağlı infertilite endikasyonlarında artış gözlemlenmektedir.

Teknolojik ilerlemelerle birlikte, preimplantasyon genetik tarama uygulamaları sayesinde, günümüzde ileri kadın yaşına bağlı anöploid artışı ile birlikte; tekrarlayan implantasyon başarısızlığı veya nedeni belli olmayan tekrarlayan düşük gibi olgularda, öploid embriyonun seçilerek anne rahmine yerleştirilmesi ile ebeveynler, gebelik dönemini fetusun sağlıklı olduğu bilinci ile geçirebilmektedir.

Bu çalışmada, NGS tekniğinde PGT-A uygulanan IVF hastalarının embriyolarında, kadın yaşına göre gruplandırma yapıldıktan sonra, gruplar arası anöploidi oranları retrospektif olarak araştırılmıştır. Esas amaç anöploidi ve kadın yaşı arasındaki ilişkiyi saptamaktır.

Çalışmamıza dâhil edilen, yaşları 25-45 arası değişen, ortalama 34,83±5,38 yaşa sahip, 80 hasta dört yaş grubuna ayrılmıştır. Trofoektoderm biyopsisi uygulanan 338 adet embriyodan, ekonomik kaynaklı tercihlerden dolayı 259 tane embriyoya

genetik analiz yapılmıştır. PGT-A sonuçlarına göre 259 embriyonun, 152'sinde anöploidi (%62,11) saptanırken, 100 embriyo öploid (%34,24) olarak bulunmuş ve 7 embriyoda ise ampflikasyon kaybı (%4,27) sebebi ile genetik analiz yapılamamıştır. PGT-A uygulamasında genetik analiz yapılamayan embriyo oranı büyük önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz amplifikasyon kaybı oranı, The European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) raporunda yer alan değerlere göre oldukça düşüktür (%4,27'e karşın ESHRE raporunda %14). Literatürde yapılan başka çalışmalara bakıldığı zaman, Francesco Fiorentino ve ark.'larının yaptığı çalışmada ampflikasyon kaybı sebebi ile genetik analiz yapılamamış embriyo oranı %1,5 (3/195) seviyesinde olup, bizim çalışmamız sonucunda elde etdiğimiz (n=8, %4,27) değer ile benzerlik göstermektedir (63).

Yaş grupları arasında amplifikasyon oranları incelendiği zaman anlamlı bir fark saptanmamıştır (p= 0,684).

Çalışmamızda yaş gruplarına göre olguların fertilize oosit sayıları dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır (p=0.009; p< 0,01). Bu sonuçlar ile yapılan çalışmalar kıyaslandığı zaman Munne ve ark'nın yaptığı araştırmada PGT-A klinik sonuçlarında bir iyileşme elde edilebilmesi için çiftin en az 8 fertilize oosite sahip olması gerektiğini bildirmiş olup (64), bizim çalışmamızda yaşları 30 ve altında olan olgularda ortalama 11.57±6.79 fertilize oosit gözlemlenmiştir (p=0.009) ve Munne ve ark.' nın çalışması ile uyumlu olarak klinik sonuçlarda iyileşme olduğu tespit edilmiştir.

Platteau ve ark.'nın çok değişkenli lojistik regresyon analizi şeklinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada PGT-A sonrasında embriyo transferi uygulaması şansına sahip olmak için hastanın en az 10 metafaz-II ve 8 normal fertilize oosite sahip olması ve en az 6 adet embriyoya biyopsi yapılmış olması gerektiğini ortaya koymuşlardır (65). Yaptığımız çalışmada da 30 yaş ve altında olan olgularda benzer sonuçlar ortaya koymaktave transfer iptali oranı en düşük grup olarak dikkat çekmektedir. (%17,4; p=0.027).

Krzysztof Lukaszuk ve ark. 'nın yaptığı çalışmada in vitro fertilizasyon tedavisi ile ortalama yaş 36.3 ± 4.6 olan kadınlardan elde edilen 198 blastokist

üzerinde trofektoderim biyopsisi sonrsı NGS tekniği ile PGT-A uygulanmıştır. Çalışma neticesinde gruplar arası %52,2 ile %62,3 arasında değişim gösteren, %56,6 oranında anöploid blastokist elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda bu oran % 62.11'di. Bu çalışma sonuçlarına göre % 42,9 (n=85) oranında öploid blastokist kadın yaşına göre 5 gruba ayrılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir. Gruplar arası normal blastokist oranları karşılaştırıldığı zaman, <31 yaş altı grup için öploid blastokist oranı %41,9 (n=13), 31-35 yaş arası grup için öploid blastokist oranı %47,6 (n=20), 36-38 yaş arası grup öploid blastokist oranı %47,8 (n=22), 39-40 yaş arası grup öploid blastokist oranı %37,7 (n=20) ve >40 yaş üzeri hasta grubu için öploid blastokist oranı %38,5 (n=10) olarak bildirilmiştir (66).

Filippo Ubaldi ve ark.'larının 530 hasta üzerinde (toplam 654 siklus) yaptıkları çalışmada PGT-A sonuçları değerlendirildiğinde; anormal kromozom yapılı embriyo görülme riski, 35 yaş altında %37 iken, 36-38 yaşında %52, 39-41 yaşında %70 ve 42-45 yaş aralığında %80'e kadar çıktığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da yaş gruplarına göre anöploid blastokist oranlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Analiz sonuçlarına göre; sonuçlarına göre, yaşları 30 ve altında olan olguların anöploid oranları, yaşları 36-39 arasında ve 40 ve üzerinde olan olgulara göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (p=0,001; p=0,001; p<0,01).

Yukarıda bahsettiğimiz iki literatür çalışması ile bizim çalışmamızı karşılaştırdığımızda P değerinin literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiş ve **kadın yaşı ilerledikçe anöploidi oranlarının arttığı görülmüştür.**

Bu sonuçlara bağlı olarak, çalışmamızda yaşa bağlı anöploidi artışı ile birlikte embriyo transfer iptal oranlarının da istatistiksel olarak arttığı görülmektedir.

Çalışmamızın p değerinin literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiş ve kadın yaşı ilerledikçe anöploidi oranlarının arttığı görülmüştür.

5.3.Öneriler

Çalışmamızdaki 80 hastanın PGT-A sonuçları göz önünde bulundurarak analiz ettiğimizde öploid blastokist ve anöploid blastokist değerleri açısından anlamlı bir sonuç aldığımızı söyleyebiliriz. Kadın yaşının artmasının anöploid ve öploid blastokist değerlerini etkilediği, artan kadın yaşı ile öploid blastokist oranının azaldığı, anöploid blastokist oranının arttığı gözlemlenmiştir. Buna göre ilerleyen kadın yaşının, overian yanıt, embriyo morfolojisi ve gelişimi, biyopsi yapılan embriyo sayısı, embriyo transfer iptalleri ve gebelik üzerineki olumsuz etkisine dair raporlar göz önünde bulundurulmalıdır. Dolayısıyla infertilite kliniğine başvuran anöploidi açısından risk taşıyan çiftlerde IVF tedavisine alınmadan en doğru bilgilendirme yapılmalıdır. Bu bilgiler doğrultusunda, ileri yaşa rağmen over rezervi azalmamış hastalarda PGT-A uygulamasının embriyo seçiminde bir avantaj sağlayarak, klinik sonuçlarda olumlu etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

12.KAYNAKÇA

1- Vayena E., Rowe P., Griffin P. Current Practices and Controversies inAssisted Reprudiction. Report of a meeting on Medical, Ethical andSocial Aspets of Assisted Reprodiction held at WHO HeadquartersIn; 2002 17-21 September 2001; Geneva, Switzerland; 2002.

2- Gomel V., Urman B., Yarali H. Investigation of the infertile couple. In: Aksel S., Beksac S., editors.***Reproductive Endocrinology and Infertility Medical Network***, Ankara, 1993; p.143-55.

3- World Health Organization. (1980). Temporal relationships between ovulation and defined changes in the concentration of plasma estradiol 17b luteinizing hormone, follicle stimulating hormon and progesteron.Am J Obset Gynecol.138:383-90.

4- Filicori M., Butler J.P., Crowley W.F., ***Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human***. Evidence for pulsatile progesterone secretion. J Clin Invest. 1984;73(6):1638-47.

5- Sperof L., Glass R.H., Kase N.G., eds. ***Clinical Gynocologic Endocrinology and Infertility. 6 th edition***. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 487-522 and 1013-1132.

6- Pişkinpaşa S., Yıldız B.O. Polikistik over sendromu. ***Hacettepe Tıp Dergisi*** 2005; 36: 168-174

7- ***Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group***. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod. 2004; 19: 41-47

8- Speroff L., Glass R.H., Kase N.G.; ***Clinical Gyneacologic Endocrinology and İnfertility***.Williams&Wilkins, Baltimore. First Edition, 1973; 256-257.

9- Rowe P., Comhaire F., Hargreave T. Female partner. In: WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge Press Syndicate of the University of Cambridge; 2000: 40-67.

10- Griffith C.S., Grimes D.A. The validity of the postcoital test. Am J Obstet Gynecol. 1990;162(3):615-20.

11- Oei S.G. The postcoital test: a controversial investigation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1998;77(2):123-4.

12- Speroff L., Glass R.H., Kase N.G. Clinical Gyneacologic Endocrinology and İnfertility.Williams&Wilkins, Baltimore. First Edition, 1973; 256-257.

13- Rowe P., Comhaire F., Hargreave T. Female partner. In: WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge Press Syndicate of the University of Cambridge; 2000: 40-67.

14- World Health Organization. WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Male. Cambridge: Cambridge University Press, 2000

15- Maheshwari A., Hamilton M., Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. Hum Reprod, 2008. 23(3): p. 538-42

16- Speroff L., Glass N.H., Kase R. Clinical gynaecologic endocrinology and infertility. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2005:pp.84-133

17- Brugo-Olmeda S., Chillik C., Kopelman S. ***Definition and causes of infertility***. Reprod Biomed Online 2001; 2 (1): 41-53.

18- Balassch J. Gonadotrophin ovarian stimulation and intrauterin insemination for unexplained infertility. Reprod Biomed Online 2004; 9 (6): 664-72.

19- Barnhart K., Dunsmoor-Su R., Coutifaris C. Effect of endometriosis on invitro fertilization. ***Fertil Steril*** 2002; 77:1148

20- Hughes E.G., Brennan B.G. Does cigarette smoking impair natural or as assisted.***Fertil steril*** 1996 Nov;66(5):679-89.

21- Feichtinger W., Papalambrau K., Poehl M., Krischker U., Neumann K. Smokingand in vitro fertilization: a meta-analysis. J Assist Reprod Genet 1997; 14:596

22- Speroff L., Glass R.H., Kase N.G. İnvestigation ofthe infertile couple. In Speroff L., Glass R.H., Kase N.G.***Clinical Gynaecological Endocrinology and Infertility, 5th edition Baltimore***: Williams and Wilkins, 1994. pp 816.

23- Smotrich D.B., Widra E.A., Gindoff P.R., Levy M.J., Hall J.L., Stillman R.J. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome***.Fertil Steril*** 1995;64:1136-40.

24- Speroff L., Glass R.H., Kase N.G. İnvestigation ofthe infertile couple. In Speroff L., Glass R.H., Kase N.G.***Clinical Gynaecological Endocrinology and Infertility, 5th edition Baltimore***: Williams and Wilkins, 1994. pp 816.

25- Seifer D.B., Lambert-Messerlain G., Hogan J.W., et al. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. ***Fertil Steril*** 1997; 67: 110-114.

26- Speroff L., Glass R.H., Kase N.G. İnvestigation ofthe infertile couple. In Speroff L., Glass R.H., Kase N.G. ***Clinical Gynaecological Endocrinology and Infertility, 5th edition Baltimore***: Williams and Wilkins, 1994. pp 816.

27- Lunenfeld E., Shapiro B.S., Sarow B., Sarow I., Insler V., Decherney A.H. The association between chlamydial – specific Ig G and Ig A antibodies and pregnancy outcome in an in vitro fertilization program. J In Vitro Fert Embryo Transfer1989;6:222

28- Licciardi F., Grifo J.A., Rosenwaks Z., Witkin S.S. Relation between antibodies to Chlamydia trachomatis and spontaneous miscarriage following in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 1992; 9:207

29- Mol B.W.J., Swart P., Bossuyt P.M.N., van der Veen F. Is hysterosalpingography an important tool in predicting fertility outcome.***Fertil Steril*** 1997;67:663-6.

30- Günalp S., Enginsu E., Şahin A. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. Kişnişçi H.A, Gökşin E., Durukan T., Üstay K., Ayhan A., Gürkan T. ve ark (Editörler). ***Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi***. Ankara: Güneş Kitabevi, 1996: .s.1119-29,1287.

31- World Health Organization. ***WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edition***. Geneva, World Health Organization, 2010.

32- Günalp S., Aktan E., Yücel A. (Eds.). ***WHO laboratuar el kitabı***: İnsan semeni ve sperm servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. Ankara: Tıp Teknik Yayınevi, 4. baskı, 2002; s.6-62.

33- World Health Organization. ***WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edition***. Geneva, World Health Organization, 2010.

34- Işık A.Z., Vicdan K. ***İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar***. Ankara, Çağdaş Medikal, 1999.

35- World Health Organization, Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen, 5th, 2010.

36- De Kretser D.M. Male infertility. Lancet. 1997;349:p:787-90

37- Chandley A. Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as casual factors in male infertility. Hum. Reprod. 1998;13:p:45-50

38- Martin R.H., Rademaker A.W. Nondisjunction inhuman sperm: comparison of frequencies inacrocentric chromosomes. Cytogenet Cell Genet 1999;86(1):43-5

39- Vidal F., Blanco J., Egozcue J. Chromosomal abnormalities in sperm. Mol Cell Endocrinol 2001;183(Suppl 1):S51-4.

40- Chandley A.C. Chromosomal basis of human infertility. Br Med Bull. 1979;35(18):p:1186

41- Vegetti W., Van Assche E., Frias A., Verheyen G., Bianchi M.M, Bonduelle M. et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. Hum Reprod 2000;15(2):351-65.

42- Egozcue S., Vendrell J.M., Garcia F., Veiga A., Aran B., Barri P.N. et al. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet 2000;17 (6):307-9.

43- Dubuisson J.B., Bouquet de Joliniere J., Aubriot F.X., Darai E., Foulot H.,Mandelbrot L. Terminal tuboplasties by laparoscopy: 65 consecutive cases. ***Fertil Steril*** 1990; 54: 401-3.

44- Hock D. L., K. Sharafi. ‘’Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis.’’ J Reprod Med 46: 7-10, 2001.

45- La Marca A., Minasi M.G., Sighinolfi G., Greco P., Argento C., Grisendi V., Fiorentino F., Greco E. Female age, serum antimüllerian hormone level, and number of oocytes affect the rate and number of euploid blastocysts in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. ***Fertil Steril*** 2017 :4. pii: S0015-0282(17)31877-0.

46- Hughes E.G., Fedorkow D.M., Daya S., Sagle M.A., Van de Koppel P., Collins J.A. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists

prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. ***Fertil Steril*** 1992; 58:888

47- Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro and gamete intrafallopian transfer cycles. ***Cochrane Database Syst Rev.*** 2000; CD001299

48- Z. Atayurt, H. Yelke, S. Unal, Y. Kumtepe, S. Kahraman. Human embryo vitrification with home-made or commercial solutions: how quality of vitrification solution affects post thaw embryo quality and clinical result. ***European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE).***July 1 – 4, 2012, Istanbul, Turkey.

49- Hardarson T., Hanson C. Sjogren A. et al. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lover pregnancy and implantation rates: Indications for eneuploidy and multinucleation. Hum reprod 2001; 29-34.

50- Baltaci V., Şatıroğlu H., Kabukçu C., Ünsal E., Aydınuraz B., Üner Ö., Aktaş Y.,Çetinkaya E., Turhan F., Aktan A. Relationship Between Embryo Quality and Aneuploidies. RBM Online; 1.Vol 12. No 1. 2006 77-82

51- Gardner D.K., Lane M. et al. (2000) Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril 73.1155-58

52- Harton G., Traeger-Syndinos J.G.V. Data from ESHRE PGD consortium. Hum Reprod. 2012;Suppl. 2(27).

53- Eldar-Geva T., Srebnik N., Altarescu G., Varshaver I., Brooks B., Levy-Lahad E. et al. Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis. ***Fertil Steril***. 2014;102(4):1016–21.

54- De Steirteghem AVA Van. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. Prenat Diagn. 2001;21(9):767–80

55- Kirkegaard K., Juhl Hindkjaer J., Ingerslev H.J. Human embryonic development after blastomere removal: A time-lapse analysis. Hum Reprod. 2012;27(1):97–105.

56- Capalbo A., Bono S., Spizzichino L., Biricik A., Baldi M., Colamaria S., et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: Insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. Hum Reprod. 2013;28(2):509–18.

57- De Boer K.A., Catt J.W., Jansen R.P.S., Leigh D., McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. Vol. 82, Fertility and Sterility. 2004. p. 295–8.

58- Capalbo A., Rienzi L., Cimadomo D., Maggiulli R., Elliott T., Wright G., et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. Hum Reprod. 2014;29(6):1173–81.

59- McArthur. Blastocyst biopsy for PGD. ***Fertil Steril*** 2005; Dec;84(6):1628-36.

60- Yang Z., Liu J., Collins G.S., Salem S.A., Liu X., Lyle S.S. et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. Mol Cytogenet [Internet]. 2012;5(1):24.

61- Fiorentino F., Bono S., Biricik A. et al. Application of nextgeneration sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. Hum Reprod. 2014b;29:2802-13.

62- Zheng H., Jin H., Liu L., Liu J. and Wang W. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos. Molecular Cytogenetics 2015; 8:38

63- Francesco F., Sara B., Anil B. et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. Human Reproduction, 2014; Vol.29, No.12 pp. 2802–2813.

64- Munne S., Sandalinas M., Escudero T. et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Reprod Biomed Online 2003; 7: 91- 7.

65- Platteau P., Staessen C., Michiels A., Van Steirteghem A., Liebaers I., Devroey P. Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening Reprod Biomed Online 2006; 12: 334- 9.

66- Krzysztof L., Grzegorz J., Waldemar K. et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic testing of blastocysts aneuploidies in women of different ages. ***Annals of Agricultural and Environmental Medicine*** 2016, Vol 23, No 1, 163–166