

KKTC
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OOSİT DONASYON PROGRAMINDA BABA YAŞININ ÜREME
BAŞARISI ÜZERİNE ETKİSİ

ALİ KIZILKANAT

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NEDİME SERAKINCI

LEFKOŞA

2016

KKTC
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OOSİT DONASYON PROGRAMINDA BABA YAŞININ ÜREME
BAŞARISI ÜZERİNE ETKİSİ

ALİ KIZILKANAT
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NEDİME SERAKINCI

LEFKOŞA
2016

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir)

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez danışmanım Prof Dr. Nedime SERAKINCI'ya,

Tezimin hazırlanmasında ve eğitim sürecimde değerli katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli eşim Uzm. Mol. Biy. Meral KIZILKANAT'a,

Yüksek Lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleriyle büyük emekleri geçen değerli hocalarım Prof Dr. Ulun ULUĞ, Prof Dr. Aygöl DEMİROL, Dr. Rasime KALKAN, Dr. Mahmut Çerkez ERGÖREN'e,

İstatistik çalışmalarımnda yardımları için Yrd. Doç. Dr. Özgür TOSUN'a,

Tezim için gerekli tüm yardımları ile bana destek olan Dr. Halil İbrahim TEKİN ve UKCF IVF Center Laboratuvar çalışanlarına,

Yardımlarını ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgili anneme, babama, ablalarım ve kızlarıma tüm kalbimle

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Uzm.Embriyolog Ali KIZILKANAT

İTHAF

Kızlarım İpek Nazlı ve Elif'e ithaf ediyorum.

EFFECT OF PATERNAL AGE ON REPRODUCTIVE OUTCOME IN OOCYTE DONATION PROGRAM

Ali Kızıllkanat

UKCF Tüp Bebek Merkezi, Mağusa, KKTC

The effect of paternal age on reproductive function is still remain controversial for several reasons. Paternal age has also shown to be associated with increased risk of genetic diseases such as, DNA mutations along with chromosomal aneuploidies. In thi study, we examined the effect of paternal age on possible genetic (chromosomal) abnormalities between non-oocyte donors and oocyte donors.

We studied volunteered 30 non-oocyte donors (40.9 ± 4.7) and 17 (36.6 ± 2.3) oocyte donors. ICSI has been carried on both oocyte groups with male partners' average age of respectively 39.3 ± 2.4 and 43.8 ± 4.5 . PGD was used for analyzing the aneuploidy of five chromosomes (13, 18, 21, X and Y) by Fluorescence in situ hybridization (FISH) . In total, 166 embryos from oocyte donors and 246 embryos from non-oocyte donors have been analyzed by PGD-FISH.

51% of abnormal embryos from 246 non-oocyte donors and 40% abnormal embryos from 166 oocyte donors were detected. Most frequent abnormalities included 13.6% trizomy 13, 12% monosomy 18, 10.6% monosomy 21 and continues with other choromosomal abnormalities such as monosomy 13 (6%), trizomy 21 (4.5%) and trizomy 18 (4.5%) for oocyte donors. Moreover, for non-oocyte donors 9.6% monosomy 18, 8% trisomy 13, 7.2% monosomy 21 were observed.

This study suggests abnormal chrosomal abnormality development is not associated with paternal age between oocyte donors and non-oocyte donors (P: 0.255). Thus, in our study paternal age does not play a significant role in abnormal embryo development.

Anahtar Kelimeler: Oosit Donasyonu, IVF, ART technology

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İTHAF.....	v
ÖZET.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
GRAFİKLER LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tüp Bebek Uygulaması.....	3
2.2 Yardımcı üreme teknikleri.....	3
2.2.1 İn vitro fertilizasyon (IVF)	4
2.2.2 Gamet intrafallopian transfer (GIFT).....	4
2.2.3 Zigot İntrafallopian transfer (ZIFT).....	4
2.2.4 İntrasitoplazmik sperm Enjeksiyonu (ICSI).....	4
2.2.5 İn vitro maturasyon (IVM).....	4
2.3 IVF Tedavisinde Başarısızlığın Sebepleri.....	5

2.4 IVF kimlere önerilmektedir ?.....	6
2.5 Kadın Yaşının IVF Uygulamasında Önemi.....	6
2.6 Erkek Yaşının IVF Uygulamasında Önemi.....	7
2.7 IVF Tedavisi Aşamaları.....	9
2.8 ICSI ve Klasik IVF Yöntemi.....	12
2.9 ICSI işlemi kimlere uygulanır?.....	13
2.10 Preimplantasyon Genetik Tanı (PGD) ve Preimplantation Genetic Screening(PGS).....	14
2.11 Preimplantasyon Genetik Tanı'nın Amacı.....	15
2.12 Preimplantasyon Genetik Tanı ve PGS de Kullanılan Yöntemler.....	15
2.13 PGT/PGS Önerilen Durumlar.....	17
2.14 Mutasyon ve Mutasyon çeşitleri.....	18
2.14.1 Kromozom Mutasyonları.....	18
2.14.2 Gen (nokta) Mutasyonları	23
2.15 Mutasyonun Sebep ve Etkileri.....	24
2.16 Sperm Morfolojisi	25
2.17 Şiddetli Sperm Morfolojik Defektleri.....	27
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	29
3.1 Gereç.....	29

3.1.1 Kullanılan Gereçler.....	29
3.1.2 Kimyasallar.....	29
3.1.3 Standart Solüsyonlar.....	29
3.1.4 Çalışma Grubu.....	29
3.2 Yöntemler.....	31
3.2.1 Kesintili Yoğunluk Gradient (Gradient Yöntemi).....	31
3.2.2 Tüp Bebek Yönteminin Basamakları.....	33
3.2.2.1 Kontrollü Ovariya Hiperstimulasyon.....	33
3.2.2.2 Yumurta Toplanması (OPU, Oocyte Pick-Up).....	35
3.2.2.3 Oosit Denidasyon Ve ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection)	36
3.2.2.4 Fertilizasyon, Klivaj Ve Blastokist.....	40
3.2.3 PGT (Preimplantasyon Genetik Tanı).....	46
3.2.4 Biyoistatistik Değerlendirme.....	46
4.BULGULAR.....	47
4.1 Morfolojiye Göre Sağlıklı Embriyo.....	47
4.2 Biyopsi/ PGD.....	48
4.2.1 Transfer.....	48
4.3 PGD değerlendirme sonuçlarında görülen anöploid türlerinin, grupların kendi içinde ve diğer grup ile karşılaştırılması	48
5. TARTIŞMA.....	57

6. KAYNAKLAR.....	63
EKLER.....	84

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Çalışmaya alınan donasyon olan ve donasyon olmayan hastalara ait yaş ortalaması, hasta başına embriyo transfer ortalamaları normal ve anormal embriyo hesaplaması.....	47
Tablo 4.2: Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda bakılan PGD sonrası aneuploidi oranları.	49
Tablo 4.3 Aneuploidi oranları ile baba yaşı arasındaki istatistiksel hesaplama. Yapılan p value hesaplaması sonucunda baba yaşı ile çiftlerin anöplöidik embriyo oranları arasında bir bağlantı bulunmamıştır.....	52
Tablo 4.4 Donasyon olan ve donasyon olmayan hasta gruplarında normal embriyo yüzdelerinin karşılaştırılması.....	53
Tablo 4.5 Toplam 68 çiftte anne yaşı ve baba yaşı ile aneuploidiler arasındaki korelasyon analizi.....	53
Tablo 4.6 Donasyon olan ve donasyon olmayan hasta gruplarında normalembriyoların blasto gitme oranlarının karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.7 Baba yaşı ve anne yaşının fertilizasyon yüzdesi ile karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.8 Anne yaşı ve baba yaşının donasyon olan ve donasyon olmayan gruplarda karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.9 Baba yaşının 3 gruba (<39, 40-44, >44) ayrılarak normal embriyo yüzdelerinin karşılaştırılması.....	56

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 4.1: Donasyon olan ve donasyon olmayan hastaların aneuploidi % oranları.....	50
Grafik 4.2: Baba yaşının 3 gruba (<39, 40-44, >44) ayrılarak donasyon olan ve donasyon olmayan gruplaraki aneuploidi% <i>oranları</i>	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Tüp bebek tedavisinde OPU aşamaları.....	10
Şekil 2.2 Blastomerler ve Zona Pellicida.....	11
Şekil 2.3 Mikroenjeksiyon Şekli.....	14
Şekil 2.4 Mayoz bölünmede gerçekleşen nondisjunction.....	19
Şekil 2.5 Gametlerde ayrılmama sonucu ortaya çıkan genotipler.....	22

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1.1 Mikromanipilatör resmi.....	40
--	----

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

TESE : Testicular Sperm Extraction
TESA : Testicular Sperm Aspiration
MESA : Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration
PESA : Percutane Epididymal Sperm Aspiration
Embryo Freezing : Fazla Embriyoların Dondurulması
PGD : Preimplantasyon Genetik Tanı
IVF: In Vitro Fertilization
DFI: DNA fragmentation index
ART: Assisted reproductive technologies
ET: Embriyo Transferi
CA: Kompleks Aneuploidi
CGH: Karşılaştırmalı genomik Hibridizasyon
GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon
FSH: Folikül Stimule Edici Hormon
E₂: Estradiol
KOH: Kontrollü Ovarian Hiperstimulasyon
PGS:Preimplantation Genetic Screening(PGS)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sperm DNA'sındaki kırık ya da hasarlar sağlıklı çocuk sahibi olma oranında düşüş ve anomalili hamilelikler oluşmasına neden olduğu bilinmektedir (Evenson D and Wixon R, 2006). Spermde DNA hasar oranının yüksek olması embriyoların gelişimini olumsuz etkilemekle birlikte, spermdeki apoptoz ve mutasyon oranında artışı olduğu gösterilmiştir(Filho RM ev ark., 2015). Sonuç olarak, embriyoların blastosist evresine gelme şansı azalmakla birlikte düşük oranında artış ve embriyoda anomali gelişimi gözlenebilmektedir. Fertilizasyon sonrasında gerçekleşen DNA tamir mekanizması genç oositlerde daha iyi çalıştığından sperm DNA sı hasarlı olsa bile oositlerdeki tamir mekanizmalarının tamir oranlarına göre de sağlıklı gebelik ve doğum gerçekleşme şansı artmaktadır (Evenson D and Wixon R, 2006). Fakat hasarlı sperm oranı fazla ise tamir mekanizması yetersiz kalmakta ve anomali gebelik şansı artmaktadır (Filho RM ev ark., 2015).

Spermde DNA kırıkları ve artmış DNA hasar oranının fertilizasyonu etkilemediği ve embriyo gelişimi gözleendiği olgular bildirilmekte fakat ileri aşama olan blastosist gelişmesini anlamlı derecede bozduğu bildirilmiştir(Sakkas D. Ve ark., 1998).Spermdeki DNA kırıklarına bağlı olarakDNA hasarı artmışsa, gebelik şansı azalmakta ve düşük gelişme riski artmaktadır(Filho RM ev ark., 2015). Yapılan çalışmalar doğrultusunda eğer sağlıklı bir gebelik bekleniyor ise hasarlı DNA içermeyen sperm sayısının yani DFI'nin %30'un üzerinde olması gerektiği gösterilmiştir (Kocer A. Ve ark., 2015).

İleri anne yaşının (+38) etkisi çok çalışılmış olup, çeşitli embriyonik gelişim ve aneuploidiler ile bağlantısı bulunmuştur(Rink BD ve ark., 2015). Baba yaşının nörodejeneratif genetik hastalıklar/vakalar üzerindeki etkisi bilinmekle birlikte eneuploidiler ile bağlantısı ve genetik olarak etkisi tam olarak bilinmeyip bu konudaki araştırmalar hiç denecek derecede azdır (Kari S., 2012).

Türkiye ve birçok ülkede donasyon programı yasal olmamasına rağmen Kıyey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde belirli koşullar çerçevesinde donasyon programının uygulanabilmesi yasaldır. Bu çerçeve doğrultusunda donasyon programı vaka sayısı fazla olan Kıbrısta baba yaşının üreme başarısı ve aneuploidiler üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada oosit donasyon programında baba yaşının üreme başarısı üzerine etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Son 20 yılda sıradan bir yöntem haline gelen tüp bebek uygulamasını, kısaca özetlemek gerekirse, kadın ve erkeğe ait üreme hücrelerine vücut dışı laboratuvar koşullarında fertilizasyon sağlanmasıdır(Bradley J. Ve ark., 2007).

2.1 Tüp Bebek (IVF)Uygulaması:

Tüp bebek (IVF) uygulaması, normal koşullarda gebelik şansı çok az olan yada hiç olmayan çiftlerde gebelik şansını artıran bir tedavi yöntemidir. İlk IVF1978 yılında İngiltere’de uygulanırken Türkiye’de ise 1989 yılında Ege üniversitesinde ilk IVFgerçekleştirilmiştir.Özetle IVFişlemi, kadından alınan oosit (germ üreme hücresi) ile, erkekten alınan spermin in vitro ortamda biraraya getirilerek oositnin fertilize olması ile gelişen embriyonun anneye transfer edilmesi işlemidir. Herhangi bir işlem yapılmadan normal çiftlerde normal bir adet döneminde canlı doğum yapma oranı %27.7 iken IVFsikluslarında bu oran %40-45 lere çıkmaktadır (Seng SW, 2005).

IVFuygulaması oosit toplama işlemi (OPU), ICSI (ICSI), preimplantasyon genetik tanı (PGD), embriyo transferi (ET) aşamalarından oluşmaktadır.

2.2 Yardımcı üreme teknikleri:

Yardımcı üreme teknikleri, foliküllerden oosit toplanması ve gebelik sağlanması amacıyla kullanılan tüm tedavi yöntemlerini içermektedir .

2.2.1 İn vitro fertilizasyon (IVF) :

Alınan oositlerin sperm ile laboratuvar ortamında fertilizasyonu ve oluşan embriyoların 3-5 gün sonra anne rahmine transfer edilmesi olarak özetlenebilir(Bradley J. Ve ark., 2007).

2.2.2 Gamet intrafallopian trasfer (GIFT):

Oosit ve sperm fallop tüpü içerisine yerleştirilir ve burada fertilizasyonun olması beklenmektedir. Günümüzde bu yöntem pek tercih edilmemektedir (Masakuni S., 2014).

2.2.3 Zigot İntrafallopian transfer (ZIFT):

Oosit ile spermin laboratuvar ortamında birleştirilmesi ve ertesı gün fallop tüpü içine yerleştirmesi işlemidir ki günümüzde bu yöntem de pek tercih edilmemektedir (Toner JP., 2002).

2.2.4 İntrasitoplazmik sperm Enjeksiyonu (ICSI):

Bu yöntem oosit içerisine özel iğne ile sperm bırakılarak fertilizasyon sağlanması prensibine dayanmaktadır. Özellikle sperm sayısında ve kalitesinde ciddi problem olan hastalarda tercih edilmektedir(G. D. Palermo, Q. V. Neri, T. Takeuchi, et al.2009).

2.2.5 İn vitro maturasyon (IVM):

Normal siklus veya ilaç kullanılarak uyarılan yumurtlama sikluslarında, foliküllerde henüz yeterince olgunlaşmamış olan oosit hücrelerinin laboratuvar ortamında olgunlaştırılması ve embriyo elde etmek üzere kullanılması esasına dayanmaktadır. Gebelik ve fertilizasyon oranları foliküller içerisinde olgunlaşan(klasik IVFprosedüründe olduğu gibi) oosit hücreleri ile elde edilen başarıya göre düşüktür (Yixuan Wu ve ark., 2015).

IVFbaşarısını belirleyen en önemli etken infertiliteye sebep olan nedenlerin belirlenmesidir. Folikül rezervi azalmış hastalarda IVFbaşarı oranı düşükken(%15) diğer taraftan yumurtlama problemleri nedeniyle IVFyapılan hastaların başarı şansları (%38) daha fazladır.

2.3 IVFTedavisinde Başarısızlığın Sebepleri:

IVFtedavisinin çeşitli aşamalarında başarısızlıklar ortaya çıkabilmektedir ve genellikle bunların tam sebebi bilinmemekle beraber :

1. İleri anne yaşı, azalmış ovaryum rezervi, foliküllerin uygun şekilde uyarılmaması ve
2. Sperm morfolojisi ve yapısı
3. Laboratuar koşullarının yeterli olmamasının embriyo kalitesine olumsuz etkileri
4. Rahim iç duvarının embriyonun yerleşimine hazır ve uygun halde olmaması,
5. Rahime ait doğuştan gelen veya sonradan oluşan hidrosalpinks adı verilen tüplerde sıvı toplanması durumu ya da enfeksiyon gibi faktörler de embriyonun rahime implante olmasına engel olabilmektedir

Ayrıca embriyo transferi sırasında yaşanabilecek servikal kanalının travmatize olması gibisıkıntılar embriyonun rahime tutunmasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Ancak başarısızlığın sebebinin genellikle tam olarak ortaya konulamadığı unutulmamalıdır. Bu nedenle, sebepleri ortaya koyabilmek amacıyla, tekrarlayan IVFbaşarısızlıklarında çiftin histereskopi, karyotip analizi, Y-mikrodelesyon, Sperm FISH gibi ileri tetkikler ile değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.4 IVF kimlere Önerilmektedir?

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2010 yılındaki deklarasyonuna göre 35 yaş üzeri kadınlarda 6 ay sonunda, 35 yaş altındaki kadınlarda ise 1 yıl süreyle düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik sağlanmadığı takdirde çift infertil olarak kabul edilir ve ileri tetkikler yapılmalıdır.

Yapılan tetkikler sonucunda;

1. Erkekten alınan semen örneğinde normal yollarla gebelik sağlanması için yeterli sayı ve morfolojide sperm olmaması
2. Kadın yaşı (<35) düşük olmasına rağmen, yapılan tetkikler sonucunda oositlik rezervinin azaldığının belirlenmesi
3. İleri anne yaşı (38 yaş ve üstü) ve 6 ay korunmasız devamlı cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması
4. Endometriozis'in, ovaryum-tüp ilişkisinin bozulmasına sebep olması
5. Yumurtlama fonksiyonunda bozukluk
6. Kadınlarda fallop tüplerinin tıkalı olması

Veya tüm tetkiklerin sonucu normal olmasına rağmen bilinmeyen bir sebeple infertilite görülmesi durumlarında çiftlerde IVF uygulaması önerilmektedir.

2.5 Kadın Yaşının IVF uygulamasında Önemi:

İn Vitro Fertilization (IVF) tedavi yöntemlerinde anne adaylarında 40 yaş üzerinde gebe kalma şansı azalırken, düşük yapma ve anomalili bebek riski artmaktadır (Yan J. Ve ark., 2012). Kadınlarda ilerleyen yaşa bağlı olarak oosit kalitesi azalmakla (Yan J. Ve ark., 2012; Vincent R ve ark., 2012) birlikte sperm tarafından döllenme olasılığı düşmekte (Yan J. Ve ark., 2012) ve

döllendikten sonra da kaliteli bir embriyo oluşma şansı da azalmaktadır(Yan J. Ve ark., 2012;Shrim A. Ve ark., 2010).

Kırk yaş üzeri kadınlarda söz konusu oositlerin döllenmesi durumunda genetik bozukluklar açısından risk artmaktadır (örneğin, Down Sendromu)(Yan J. Ve ark., 2012). İleri anne yaşına bağlı olarak endometriumun (rahmin iç tabakasının) döllenmiş oositi tutma yeteneği azalmaklabirlikte oluşacak olan gebelik şansı da düşmektedir(Yan J. Ve ark., 2012). Kadınlarda otuz yaşın altında gebe kalabilme şansı %20 iken, kırk yaş üzerinde bu şans %5 olarak bildirilmiştir (Yan J. Ve ark., 2012;Vincent R. Ve ark., 2012).

Kadınlarda yaş ilerledikçe ovaryumların yumurtlama kapasitesi ile beraber oositlerin kalitesinde azalma başlamaktadır(Yan J. Ve ark., 2012). (Yan J. Ve ark., 2012;Seng SW ve ark., 2005). Kadın yaşının ilerlemesi ile beraber oosit kalitesi ve oluşacak sağlıklı embriyo sayısı azalmakta böylece normal yollarla gebe kalma şansı da azalmaktadır. 35 yaş altı hastalarda canlı doğum oranları %40 civarındaykenbu oran 40 yaş ve üzeri hastalarda %10 civarındadır(Yan J. Ve ark., 2012;Shrim A. Ve ark., 2010).

2.6 Erkek Yaşının IVF uygulamasında Önemi:

Sperm kalite ve sayısının doğum efektleri , aging (yaşlanma) Alport sendromu (FGFR3 mutasyonu), Kistik Fibrozis (CFTR geni) gibi otozomal dominant hastalıklar ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Kimberly ve ark., 2012). Yapılan populasyon çalışmalarına göre erkek yaşına bağlı olası anlamlılıklar populasyonlar arasında değişkenlik gösterebilmektedir(Kimberly ve ark., 2012; Domenico Dell ve ark., 2015; Kang Liu ve ark., 2015).

Spermdeki DNA hasarları değişen çevresel faktörler (Sigara içilmesi, cep telefonunun genital bölgeye yakın tutulması(Moskovtsev SI ve ark., 2009), dizüstü bilgisayar sonucunda oluşabilmektedir(Moskovtsev SI ve ark., 2009).

Genelde Sperm gelişirken DNA hasar görebilmekte ve vücut bunu onarabilmektedir(Hakan Koyuncu, 2011;Kocer A. Ve ark., 2015). Bu onarım işlemini sağlayan enzimlerin azlığı ve onarım eşiğinin aşıldığı durumda spermin oositle birleşip embriyoyu oluşturması zor olmaktadır (Hakan Koyuncu, 2011).

İlerleyen erkek yaşı ile birlikte buna bağlı nadir genetik bozukluklar riskinde artış olduğu gösterilmiştir(Risch N ve ark. 1987; Bellver J. Ve ark., 2008). İleri baba yaşı ile şizofreni , otizm ve bazı kanser türleri arasında bağlantı bulunmuştur (Kong A. Ve ark., 2012;Glasson EJ ve ark., 2004). National Birth Defects Prevention çalışma verilerine göre baba yaşının, bazı multifaktöryel doğum kusurları için bir risk faktörü olabileceğini göstermiştir (Green RF. ve ark., 2012). Artan baba yaşına bağlı olarak yarık damak, diyafragma hernisi, sağ ventrikül çıkış yolu tıkanıklığı vakalarının görüldüğü rapor edilmiştir(Green RF. Ve ark., 2012).

Sperm DNA 'sının sağlıklı olması normal bir gebeliğin gelişmesinde önemlidir. Son yıllarda, sperm DNA'sındaki kırık ve hasarın çocuk sahibi olma oranlarını düşürdüğü gösterilmiş olup hasarlı DNA içeren spermlerin sayısının artmasının da çiftlerde infertiliteye neden olduğunu gösterilmiştir. Spermlerindeki DNA hasarı yüksek olsa dahi normal gebelik görülebilmektedir. Fakat bu oran anlamlı derecede düşmektedir. Çünkü spermdeki DNA hasar oranı yüksek ise, sonrasında oluşup gelişecek embriyoların gelişiminin de bozuk olması beklenmektedir. Bunun nedeni, spermlerde meydana gelen apoptoz ve mutasyon oranlarındaki artıştır. Sonuçta embriyoların blastosist evresine gelme şansı azalırken, düşükler artar ve buna bağlı olarak embriyoda anomaliler gelişebilmektedir (Sheena E.M. Lewis., 2015;Pfeifer S. Ve ark., 2013).

Birçok çalışmada İleri baba yaşında spermde DNA hasarının da arttığını göstermiştir. Sperm DNA hasarı, sonucunda aging, apoptoz ve infertiliteye neden olmaktadır. Artan baba yaşına bağlı olarak Spermde DNA kırıkları da meydana gelmektedir(Wyrobek AJ ve ark., 2006). Oksidatif stres, testis ve üreme sistemi içindeki sperm DNA'sının yanı sıra, sperm mitokondriyal ve

nükleer membranına zarar verebilir(Aitken RJ ve ark., 2003). Spermatogenez sırasında olan germ hücre apoptosisi normal bir olay olarak gerçekleşir, Erkek farelerde yapılan çalışmalarda, yaşlı erkek farelerin testislerinde genç yetişkinlere göre daha düşük apoptoz seviyesi olduğu gözlenmiştir (Brinkworth MH. Ve ark., 2003).

2.7 IVFTedavisi Aşamaları

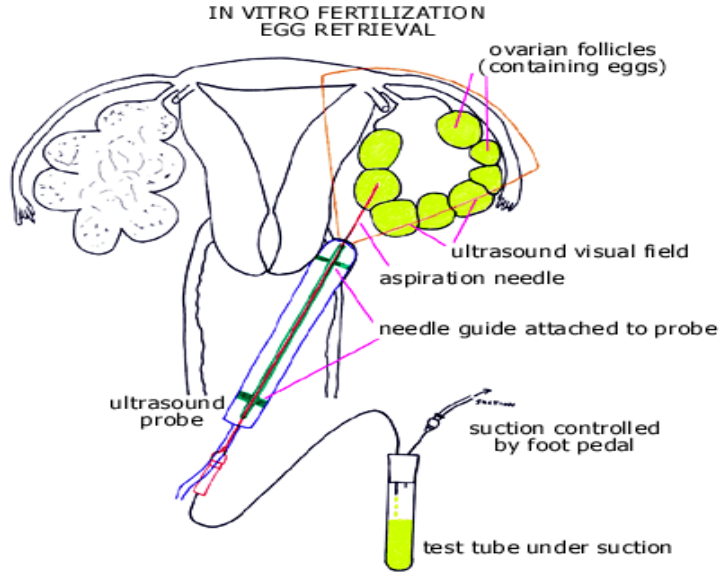
IVFuygulamasının 4 basamağı vardır

1. Basamak :Oosit toplama İşlemi (OPU)

İlk aşaması olarak birden fazla oosit elde edebilmek amacı ile normal şartlarda vücutta üretilen hormonlardan daha yüksek dozlarda enjeksiyon yapılmasını takiben gelişen oositler sık sık ultrasonografi ile takip edilerek kan tahlili ile östradiol seviyesi takibi yapılarak (Yixuan Wu ve ark., 2015)oositler istenen boyutlara ulaştıklarında (18-20mm) ovulasyonu sağlamak için tek dozluk (hCG, GnRHa) uygulanarak olgunlaşan oosit çatlaması sağlanmaktadır.

Yumurtlama iğnesinin yapılmasından 35-36 saat sonra ameliyathane ortamında anestezi altında, transvajinal ultrasonografi ile beraber bir iğne yardımıyla oositler toplanmaktadır. Bu esnada erkekten alınan sperm örneği özel tekniklerle işleme uygun hale getirilir.

IVFtedavisinin ilk basamağını oluşturmaktadır.Toplama işlemindetek tek bütün oositlerin içindeki sıvı dışarıya alınır. Mikroskop altında bu folikül sıvıları incelenerek oosit hücreleri bulunur. Toplanan oositlerin matürasyonunu sağlamak amacıyla inkübatörde ayıklama işlemine kadar 2 saat bekletilir. Sonrasında ayıklama (denüstasyon) işlemine geçilir.



Şekil 2.1 IVF tedavisinde OPU aşamaları (thenew jersey infertility treatment center, 2015)

2. Basamak: ICSI-Fertilizasyon

ICSI işleminde, oositin içine seçilen tek bir sperm özel bir iğne yardımıyla enjekte edilerek oosit içine alınır ve fertilizasyon sağlanır.

3. Basamak: Embriyo Takibi

Fertilizasyon sonucu oluşan embriyo gelişimi izlenmektedir. Embriyolar gelişim süresince takip edilerek, sayısal simetrik bölünme yetenekleri, blastomerlerde çekirdek olup olmaması yada birden fazla bulunması, blastomerlerin simetrileri, fragmentasyon oranlarının düşük olması gibi özelliklerine göre takip edilir.

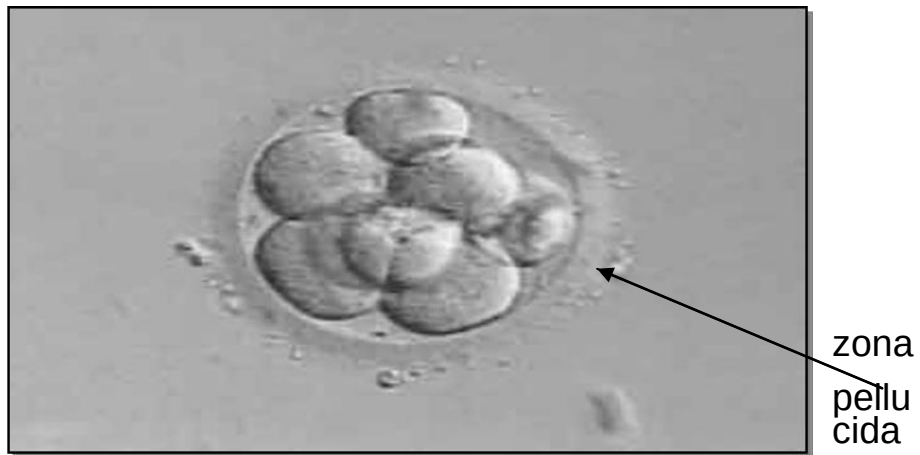
4. Basamak: Embriyo transferi

Embriyo gelişim takibi sonucunda rahme tutunma oranı en olası embriyolar seçilir. Seçilen embriyolar, kullanılan özel kateterler ile anne

rahmine vajinal yoldan yerleştirilir(Yixuan Wu ve ark., 2015). Gelişen embriyolar arasından transfer edilmeyen yüksek kaliteli embriyolar sıvı azotta dondurularak saklanıp gebelik olmaması durumunda tekrar transfer edilebilir (CV Steer ve ark., 1992).

Fertilizasyon sonrasında, oluşan zigot hücre bölünmeleri (blastomer) bölünmeye geçirerek embriyoyu oluşturmaya başlar. Oosit toplanıp fertilizasyon gerçekleştikten sonra 3. Günde embriyolar 6-8 hücreli bir yapı halini alır. Daha sonra blastokist (5. Günde embriyolar) adı verilen hücre sayılarının arttığı ve daha sıkı halde olduğu evreye gelirler. Embriyo transferi genellikle oosit toplamadan sonraki 3. Yada 5. Günde yapılır(Şekil 2.2).

Hastadan toplanan oosit sayısı ile birlikte gelişen embriyoların gelişiminin iyi olması durumunda 5. Gün transferi (blastokist transferi) yapılabilir. Buradaki amaç embriyolardan en iyi gelişim gösterenlerin ve anne rahmine tutunabilme yeteneği en fazla olanların seçilmesidir. Yapılan araştırmalarda 5. Gün yapılan transferin daha fazla canlı gebelik oranıyla sonuçlandığı görülmüştür(Bradley J. Ve ark., 2007). Buna rağmen transfer edilen embriyo gelişimini devam ettiremeyebilir ve 5. Güne ulaşamayabilir. Sonrasında bu embriyolar elenecektir.



Şekil 2.2 3. Gün embriyo (wikipedia.org).

2.8 ICSI ve Klasik IVF Yöntemi

Klasik IVF de oosit etrafına bırakılan 100,000 spermden sadece biri oosit dış zarını geçerek oosite girer ve fertilizasyon sağlanır. ICSI işlemi, invert mikroskop altında mikromanipulator ile yapılmaktadır. ICSI işlemi 1992 yılından beri uygulanmaya başlanmasıyla özellikle ciddi sperm problemi olan, 5 milyon/ml'nin altında sperm sayısına sahip olan yada yeterli sayı olsada sperm kalitesi düşük olan bireylerin çocuk sahibi olma şansları ciddi ölçüde artırmıştır(CV Steer ve ark., 1992).

İdiyopatik infertilite ve tekrarlayan geleneksel in vitro fertilizasyon (IVF) başarısızlıkları ICSI endikasyonu içerir (CA Julsen. H. Benavida, L. Siano, et al.1999). ICSI sonrası fertilizasyon ileri yaşa bağlı olarak yaklaşık % 70 - % 80 oranında gerçekleşmektedir (G. D. Palermo, Q. V. Neri, T. Takeuchi, et al.2009) . İnfertil çiftlerde gerçekleştirilen çalışmalarda baba yaşının kromozomal anöploidilerin yanı sıra DNA hasarı ile de ilişkili olduğunu göstermektedir (Armand Zimi ve ark., 2008).

Erkek infertilitesinde İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) olarak bilinen yöntem büyük bir çığır açmıştır(Mc Dowell S, 2010). ICSI'de görünümüne bakılarak seçilen sperm, annenin oositine enjekte edilerek elde edilen embriyolar da annerahmine transfer edilmektedir. Ancak bazen sperm normal görünse bile, gelişim kusurları, hasarlı DNA'ları nedeniyle dölleme gerçekleşmemekte ya da kötü embriyo elde edilmektedir.

Geleneksel ICSI uygulamalarında sperm mikroskop altındaki şekil ve hareketlerine göre seçilerek DNA bütünlüğü ile ilgili herhangi bir seçim yapılmamaktadır.

Spermin baş kısmı hyaluronabağlanmasını sağlayan tanıma bölgelerini barındırır. Olgun olmayan spermelerde bu tanıma bölgeleri olmadığından oosite bağlanamazlar.. Oosite bağlanmayan yani olgun olmayan spermelerde protein miktarı düşük ve DNA kırıkları yani genetik hasarlar artmaktadır(Mc

Dowell S, 2010). PCSI, olgun spermilerin hyaluronan maddesine bağlanma özelliği sayesinde de sperm seçiminde kullanılan bir yöntemdir. Doğal fertilizasyonun önemli bir seçim aşaması olan, spermin oosite bağlanmasını taklit etmesinden dolayı sperm hakkında değerli bilgiler vermektedir. Bunun sonucunda bağlanma yeteneği yüksek olan sperm seçilerek ICSI işleminde kullanılmaktadır(Mc Dowell S, 2010).

PCSI dish kullanılırken aynı dish içerisine hem oosit hem de spermier konup, içinde DNA kırığı olmayan spermieri seçme ve aynı anda oosit içerisine enjekte edilmektedir. Böylece hem klinik gebelik oranı artmakta hemde gebelik kaybı riski azalmaktadır(Mc Dowell S, 2010).

ICSI işleminde ejakülatlarından detaylı inceleme ile seçilen göreceli olarak daha normal baş yapısına sahip spermier kullanılarak gelişen embriyolar yapılan genetik tanı (PGD) ile kromozomal olarak incelenerek PGD sonrası kromozomal olarak normal olan embriyolar anne adaylarına transfer edilerek yüksek gebelik oranları elde edilmiştir(Munne S. Ve ark., 2003; R. Beguen ve ark., 2014).

Spermierin klasik yöntemden farklı olarak mikroskop altındayüksek büyütme ile seçilmesi IMSI yöntemi adını almaktadır. Normalde 200-400 büyütme ile seçilen spermier bu teknikle 8050 kez büyütölmekte ve sperm DNA hasarına yol açabilen vakuollerin varlığı tanımlanabilmekte ve bu bozuklukları taşımayan spermierin seçimi mümkün olmaktadır(Mc Dowell S, 201; Teixeria DM ve ark., 2013).

Günümüzde makrosefal yada çok büyük başlı spermierin ağırlıklı olduğu örneklerde IMSI yöntemi ile sperm seçimi ve ICSI en yararlı yöntemlerdir.

2.9 ICSI işlemleri kimlere uygulanır?

İleri düzey sperm sayı, hareket ve morfoloji bozukluğu olan ya da sperm sayısı 5 milyon/ml'den düşük hastaların ;

- Embriyolarına Pre-implantasyon genetik tanı (PGD) uygulanması endike hastalar

- Daha önce klasik IVF yöntemi ile fertilizasyon olmamış hastalarda gebelik şansını arttırmak için ICSI işlemi uygulanır (Şekil 2.3).

Azoospermik bireylere Cerrahi yöntemlerle (TESE, TESA, PESA, vb.) sperm elde edildikten sonra ICSI işlemi uygulanabilir.



Şekil 2.3 Mikroenjeksiyon Şekli (Coşkun Şimşir, 2015)

2.10 Preimplantasyon Genetik Tanı (PGD) ve Preimplantation Genetic Screening(PGS)

Genetik alanındaki son gelişmeler; IVF yöntemleriyle geliştirilen embriyolarda genetik incelemeler yapılmasına imkan tanımaktadır. Bu yöntemle embriyodan alınan tek bir hücreye genetik tanı yapılma işlemi yani “embriyoda genetik tanı” (Preimplantasyon Genetik Tanı) adı verilmektedir. İmplantasyon öncesi genetik tanı (PGD) adı verilen bu işlem; oosit ve sperm hücrelerinin laboratuvar ortamında fertilizasyon sonucunda gelişen embriyolardan alınan 1 veya 2 adet balstomer ile gerçekleştirilmektedir. Preimplantasyon Genetik Screening (PGS) yöntemi ise, kromozomlardaki sayısal ve yapısal anomalileri tespit etmekte kullanılmaktadır; Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) tek gen hastalıkların tanısında kullanılmaktadır (Munne S. Ve ark., 2003).

Buradaki amaç ilk bölünmelerinde alınan tek blastomer hücrelerinde moleküler sitogenetik ve/veya moleküler genetik yöntemler kullanılarak ve doğacak bebekteki sayısal ve yapısal kromozom bozuklukları ile tek gen hastalıklarının (Thalassemia, orak hücreli anemisi, kistik fibrozis gibi) tanısı yapılarak sağlıklı embriyoların anne adayına transferi yapılarak sağlıklı bebeklerin doğması sağlanabilmektedir.

2.11 Preimplantasyon Genetik Tanı'nın Amacı :

PGD işlemi günümüzde sıklıkla IVF uygulamalarında anne-baba taşıyıcı olduğu kromozomal anormallikleri embriyo aşamasında belirlenebilmek ve sağlıklı çocukların doğmasını sağlayabilmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca ileri anne yaşına bağlı oluşabilecek kromozom anomalilerinin, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, anomalili fetus öyküsü olan bireyler de de kullanılarak sağlıklı gebelikler elde edilmektedir.

Bireylerin, taşıdıkları kalıtsal hastalığı değişik oranlarda çocuklarına aktarma riskleri nedeniyle genetik hastalıkların çiftlerde ve embriyolarda belirlenmesi sağlıklı çocuk sahibi olabilmesi için önemlidir. Günümüzde farklı teknikler kullanılarak çok sayıda kalıtsal hastalığın henüz embriyo düzeyinde iken tanımlanması mümkün hale gelmiştir. Preimplantasyon Genetik Tanının amacı, öncelikle genetik hastalıkların embriyo aşamasında tanımlanmasıdır. Ayrıca infertilite problemi nedeni ile IVF tekniklerinin uygulanacağı çiftlerin embriyoların da oluşması muhtemel genetik bozukların tanımlanması için kullanılmaktadır. Sadece kalıtsal hastalıklar değil fertilizasyon sonrası embriyoda bölünmeler sonrası ortaya çıkabilecek embriyo anomalileri belirlenir.

2.12 Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) ve preimplantasyon genetik tarama (PGS) de Kullanılan Yöntemler :

Preimplantasyon Genetik Screening (PGS), kromozomlardaki sayısal ve yapısal anomalileri tespit etmekte kullanılırken; Preimplantasyon Genetik

Tanı (PGT) tek gen hastalıkların tanısında kullanılmaktadır(Ferraretti AP ve ark., 2004;Munne S. Ve ark., 2003).

PGT, kromozomal anomailer ve tek gen hastalıklarda bakılmakta olup infertilite olmaksızın da kullanılmaktadır.PGS ise, ileri anne yaşı, tekrarlayan düşükler, tekrarlayan IVF başarısızlığı, aneuploidili gebelik hikayesi ve kromozomal aneuploidi taraması yapılması durumlarında kullanılmaktadır(Harper ve ark., 2012;Kahraman ve ark., 2011).

Döllenen ve iyi gelişen hücrelerden (embriyo) 3. günde 1-2 tane hücre alınarak Kromozomal hastalıklar için Floresence in situ hibridizasyon (FISH), Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH), Array CGH, Tek gen hastalıkları için ise Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA dizi analizi (sequencing) yapılabilmektedir.

PGSişlemi, moleküler sitogenetik metod olan FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) yöntemiyle yapılmaktadır(Scriven P.N. ve ark., 2011). FISH yönteminde kromozomlara özel olarak hazırlanan floresan işaretli problr kullanılmaktadır. Biyopsi sonrasında embriyodan alınan hücrelerin kromozomlarına bu floresan problrın bağlanmasından sonra bu hücrelerden alınan sinyalleremikroskopta bakılarak sınırlı sayıdakromozomlar incelenmektedir. Ayrıca FISH yönteminin dezavantajı kromozomlara ait sinyallerinin üst üste geldiği durumlarda sonucun değerlendirilememesidir.

DNA dizi analizi, çoğunlukla gen mutasyonlarının (mutasyon, delesyon, insersiyon, vb gibi) tespiti yada rekombinant DNA oluşumunun yapı tayininde kullanılmaktadır.Kalıtsal hastalık taşıyan (Thallasemia, vb) eşlerde IVF tedavisi sırasında embriyolardan izole edilen DNA'lar DNA dizi analizi yöntemi ile analiz edilerek tek hastalığı taşıyan embriyolar elenerek tek gen hastalığı taşımayan sağlıklı embriyoların transferine imkan sağlanmaktadır (Dominic Grun ve ark., 2015).

Embriyolarda tüm kromozomların daha detaylı incelenebilmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. İlk defa 1996 yılında blastomerlerde uygulanan Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (Comparative Genomic Hybridization – CGH) yöntemi, hücrenin bütün kromozomlarının incelenebilmesini

sağlamaktadır. CGH yönteminin FISH yöntemine göre uygulamasının kolay olması ve tüm genomu taraması nedeniyle büyük bir avantaj sağlamaktadır. CGH yönteminde, tüm kromozom sayıları yanısıra kromozom üzerindeki mikro delesyonlar veya duplikasyonlar da belirlenebilir ve saptanabilir. CGH yöntemiyle belirlenebilen kromozom bozukluklarının %20-40'ı FISH yöntemi ile belirlenememektedir(de Ravel TJ ve ark., 2007).

2.13 PGT/PGS Önerilen Durumlar

Genetik predispozisyon gösteren;

- Çiftlerde genetik veya kalıtsal bir taşıyıcılığı bulunması
- Daha önce genetik hastalığı olan çocuk veya çocuklara sahip çiftlerde
- Bağımsızlık sistemi hastalıklarında HLA (doku) tiplemesi için
- Erkek infertilite durumlarında
- İleri yaş grubundaki kadınlarda (35 yaş ve üzeri)
- Tekrarlayan gebelik kayıpları bulunan çiftlerde
- Başarısız IVFdenemeleri (2 veya daha fazla)
- Nedeni açıklanamamış kökeni bilinmeyen infertilite durumunda
- Ailede bilindik bir translokasyon taşıyıcılığı olan durumlardan az birini taşıyan bireylere infertilite nedeniyle yardımcı üreme teknikleri uygulanacakçiftlere önerilmektedir.

Moleküler sitogenetik inceleme için Sayısal kromozom anomalilerinin tanımlanabilmesi için geliştirilmiş olan ve beş farklı kromozomu içeren iki ayrı panel mevcut olup bunlar 13, 18, 21, X , Y veya 13, 16, 18, 21, 22 kromozomlarını içerir. Günümüzde, gerekli durumlarda yedi (13, 16, 18, 21, 22, X ve Y) veya dokuz kromozomu (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X ve Y) içeren daha geniş kromozom taraması da yapılabilmektedir.

Moleküler genetikte kullanılan PGD işleminde ise , kalıtsal hastalık taşıyıcısı olan veya daha önce genetik hastalıkla doğan çocuk veya çocukları bulunan ailelerde sağlıklı bir bebek sahibi olmalarını sağlamaktır. Önceden genetik bir hastalık kesin tanısı konamayan kişilerde embriyo düzeyinde genetik inceleme yapmak mümkün değildir. Çünkü, hastalığa neden olan genetik değişim her hastalık için farklı olup PGT işleminin yapılabilmesi için gerekli olan mutasyonu belirleyici genetik değişikliğe özgü test uygulanması gerekmektedir(Scriven P.N. ve ark., 2011).

Teknik imkanların gelişmesi ile birlikte günümüzde birçok kalıtsal hastalık genetik testlerle kesin olarak ortaya konabilmektedir. Kesin tanı konmuş ailelerde saptanmış olan genetik bozukluğa spesifik set-up yapılması sonrasında PGD işlemi rahatlıkla uygulanabilmektedir.

2.14 Mutasyon ve Mutasyon Çeşitleri :

Mutasyon,somatik hücreler yada gamet hücrelerinin genetik materyalindemeydana gelen değişikliklerdir (Bilge BD. Ve ark. , 2006).Mutasyonun en önemli etkilerinden biri, bir sonraki nesile farklı genetik özellikler aktarılmasına neden olmasıdır. Eşey üreme (gamet) hücresi mutasyonları kalıtsal olan ve bir sonraki nesillere aktarılan mutasyonlardır. Canlıda farklı fiziksel özelliklerin oluşumuna sebep olmaktadırlar. Mutasyonlar ;

1. Kromozom mutasyonları
2. Nokta(gen) mutasyonları olarak ikiye ayrılır.

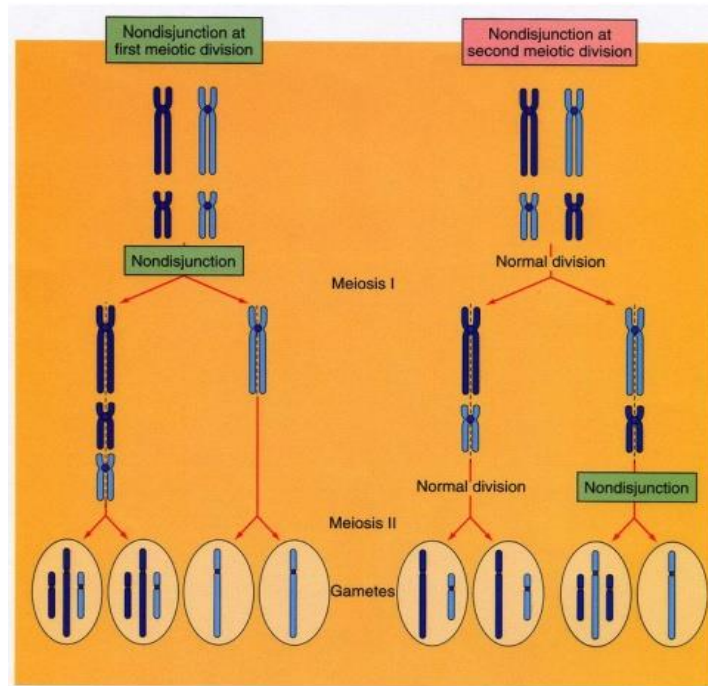
2.14.1 Kromozom Mutasyonları:

Sayısal ve yapısal kromozom mutasyonları olmak üzere 2'ye ayrılır. Kromozom mutasyonları,kromozomun bir parçasında kopma veya parça değişimi (crossing-over) sırasında yanlış yapısal ya da sayısal değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Mayoz ve mitoz bölünme sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklanır ve daha ağır hasarlar oluşturmaktadır. Mayoz

bölünmenin ilk evrelerinde crossing-over (homolog kromatitler arası parça değişimi) olayı gerçekleşir ve genetik çeşitlilik oluşumu sağlanır.

Bazen kromatitler, crossing-over olmadan parça değişimi gerçekleştirebilmektedir. Herhangibirkromozomun bir kısmının kendi kendini eşlemesi, bir kromozomun başka bir kromozoma tutunması, kromozomun bir parçasının kopup kaybolması, kromozomal materyalde eksilme veya artma, kromozomun uçlarının kopması ve halka şeklinde birleşmesi gibi değişiklikler kromozomun yapısında meydana gelen değişimlerdir.

Nondisjunction, mayoz aşamasında gametlere az yada çok kromozom ayrılması olayı olup ayrılmama ve anafazda gecikme olarak 2.4 şekilde gerçekleşmektedir.



Şekil 2.4 Mayoz bölünmede gerçekleşen nondisjunction, 2 ayrı hücreye gitmesi gereken bir kromozom çiftinin her iki üyesinin birbirinden ayrılmayıp yeni hücreye gitmesi şeklindedir. Böylece gametlerden birinde adı geçen kromozomdan hiç bulunmazken; diğerinde normalde 1 tane olması gerekirken 2 tane olacaktır. Bu gamet, söz konusu kromozomdan normal olarak 1 tane taşıyan karşı cins gametle birleşince normalde zigotta 2 kromozom bulunurken ; bu zigotta 1 adet bulunacaktır. Böyle bir hücreye monozomik diyoruz (Sezgin İ., 2006).

İki kromozom içeren gamet bir diğer normal gametle birleşince, zigotta bu kromozomdan 3 adet olur ki buna da trizomi denir (Herder Lexikon der Biologie, 2004). Trizomi örneklerinin başında Down Sendromu seks kromozom monozomiler gelir (Len Leshin, 2003). Monozomik durum otozomal kromozomlarda meydana gelmişse hayatla bağdaşmaz. Otozomal trizomiler çok sık gözlenir. Klasik Down sendromu, Edwards sendromu (trizomi 18), Patau sendromu (trizomi 13) buna örnektir (Len Leshin, 2003).

Kromozomlar mitoz ve mayoz bölünme sırasında bazen düzenli olarak ayrılmazlar. Sonuçta kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana gelir ve kalıtsal açıdan bazı sorunlar oluşturur.

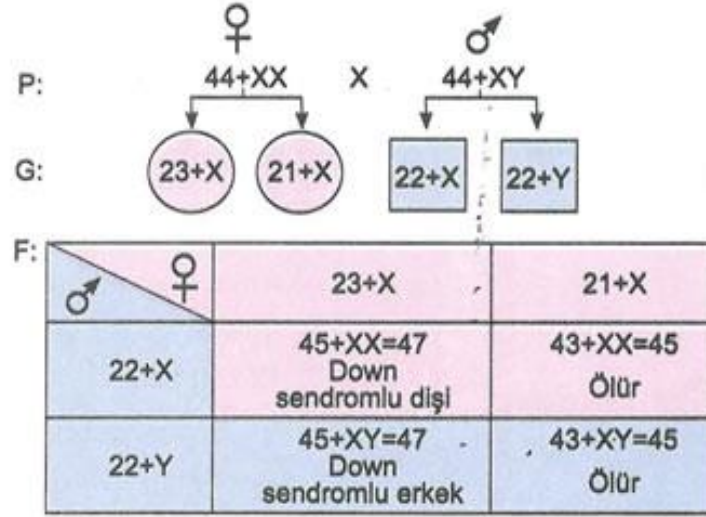
Bir kromozom kırıklarının oluşup yeniden düzenlenmesiyle kromozom yapısal değişiklikleri meydana gelmektedir. Translokasyonlar, Delesyonlar, Duplikasyonlar, İnsersiyonlar, Ring (Yüzük, Halka) Kromozomlar, İnversiyonlar Kromozom yapısında meydana gelen değişimlerdir (Nussbaum, 2001). Delesyonlar, kromozom yapısındaki bir parçanın kaybolması durumudur. Bu durumda en sık rastlanan örnekler, Wolf-Hirschhorn sendromunda görülen 4. Kromozomun kısa kolunda bir parçanın yok olması ve Jacobsen sendromundaki 11. Kromozomun terminal kısmında meydana gelen delesyonlardır. Duplikasyonlar, bir kromozomun kendisini bir parçası ile eşlemesi ve fazla miktarda genetik materyal oluşturulması sonucu oluşan düzensizliklerdir. Rett sendromu ve Bloom sendromu duplikasyonlara örnektir. Translokasyonlar, Bir kromozom parçası yada kromozomun başka bir kromozom ile birleşmesi sonucu oluşan düzensizliklerdir. 13, 14, 15, 21 ve 22. Kromozomlarda sıklıkla görülmektedir. İnversiyonlar, kromozomdaki bir bölgenin kopup, ters dönerek tekrar aynı yere bağlanması ile meydana gelen düzensizliklerdir.

Ring (halka) kromozomlar, kromozomda bir parçanın koparak halka şeklini alarak kendisiyle birleşmesi sonucunda oluşan düzensizliktir (Thomson and Thomson 2015).

2.14.1.1 Kromozom Sayısındaki Değişiklikler :

Normal şartlarda gamet oluşumunda ataya ait kromozom sayısı mayozla yarıya iner. Yani homolog kromozomlar eşit olarak birbirinden ayrılır ve karşılıklı kutuplara çekilir. Ancak mayozda homolog kromozomlar bazen birbirinden ayrılmayarak aynı kutba gider. Bu olay sonucunda yeni oluşan eşey hücrelerinin birinde fazla, diğerinde ise eksik kromozom bulunur. Bu olaya non-disjunction (ayrılmama) denir(Simmons, 2006). Ayrılmama olayı hem gonozomlarda hem de otozomlarda görülebilir. Otozomlarda ayrılmama: İnsanların otozomlarında ayrılmama sonucu oluşan ve en sık görülen mutasyon örneği Down sendromudur(Simmons, 2006).

Down sendromu ilk kez 1866'da John Langdon Down (Con Langdın Davn) tarafından tanımlanmıştır (Simmons, 2006). genellikle Anne yaşına bağlı bir durum olup 21. kromozomun ayrılmama durumu olarak netelendirilen bir durumdur. Annenin otozomlarından birinin ayrılmaması sonucu 24 (23+X) ve 22 (21+X) kromozomlu oositler oluşur. Bu oositler normal sperm (22+Y) ile döllendiğinde oluşan bireylerin kromozom sayısı 45 veya 47 olur. 45 kromozomlu dişi (43+XX) ve erkek (43+XY) bireyler ölürken 47 kromozoma sahip Down sendromlu dişi (45+XX) ve erkek (45+XY) bireyler yaşamlarını sürdürür (Şekil 2.4).



Şekil 2.5 Gametlerde ayrılmama sonucu ortaya çıkan genotipler(webhatti, kromozomlardaki-degisiklikler, 2015).

Kromozom sayısındaki değişimler, bir yada daha fazla haploid kromozom takımının ilavesinden bir yada daha fazla kromozom ilavesi veya kaybı şeklinde değişkenlik gösterebilir. Öploid ve Anöploid olarak ikiye ayrılır(Nussbaum, 2001).

Anöploidiler genellikle anne ebeveyn üreme hücresinde gametogenezde meydana gelen ayrılma olayları nedeniyle olduğu bilinmektedir. Birçok çalışmada anöploidilerin mayoz aşamasındaki non-disjunction (ayrılmama) kaynaklı olduğu ispatlanmıştır (R. Garcia-Cruz ve ark., 2010).

Öploid :

Kromozom sayısındaki artış ve azalışlar temel kromozom sayısının tam katları kadar oluyorsa buna öploid ve sayıya da öploid denir. Öploidde temel kusur, hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmamasıdır(endoreduplikasyon)(Nussbaum, 2001).

Anöplöidi :

Anöplöidi, bazı kromozomların genomdaki kaybı (eksilmesini) veya çoğalmasını (ilavesini) ifade eder. Bu durum gametogeneizde hatalı bir kromozom ayrılması ile ortaya çıkmaktadır. Normalde mayoz bölünme sırasında homolog çiftin biri bir kutuba diğeri karşıt kutuba gider. Fakat bazen bir kromozom bir kutuba homologu ile birlikte çekilerek aynı gamette yer alırlar. Bu olaya mayotik non-disjunction(homolog kromozom çiftlerinin segregasyonu sırasında birbirinden ayrılmaması) denilmektedir (Nussbaum, 2001). Diğeri bir anöplöidi mekanizması ise anafaz lag. Anafazlag'dır (anafaz safhasında geri kalma veya kaybolma). Burada hücre bölünmesi sırasında uzunlamasına bölünerek karşıt kutuplara giden kromozomlardan biri anafazda geri kalır.Hareket etmekte geç kalan bu kromozom ya özdeşinin bulunduğu kromozom grubuna katılır ya da kaybolur(Pampaloma J. Ve ark., 2016;Kara T. Ve ark., 2016)

Anöplöidi Çeşitleri:

Monozomi ($2n-1$): Eğer " $n-1$ "gameti " n " gameti ile döllenirse " 1 " gameti, " n " gameti ile döllenirse oluşan gamete monozomik ($2n-1$) gamet, böyle canlılara da monozomik canlılar denir. Bir hücrede dolayısıyla organizmada ahenkli bir denge için gerekli olan genetik denge alt üst olur. İkincisi ise tek kalan kromozomdaki herhangi bir resesif allel, hemizigotluk sonucu direkt olarak fenotipte görülebilmesidir. Monosomi olayına insanlarda görülen Turner Sendromunu ($45, X$) verebiliriz. $\frac{3}{4}$ Trisomi Trisomi ($2n+1$): Eğer " $n+1$ " gameti, " n " gameti ile döllenirse oluşan gamete trizomik ($2n+1$) gamet, böyle canlılara da trizomik canlılar denir.

2.14.2 Gen (nokta) Mutasyonları:

Kromozomların yapısında ya da sayısında herhangi bir değişiklik olmadan DNA'nın kısıtlı bir bölümünde doğal veya rastgele meydana gelen

mutasyonlardır. Mutasyona uğramış bir gen oluşan tahribat miktarına göre nadiren eski haline dönebilir(Herder Lexikon der Biologie, 2004).

Üreme hücrelerinde oluşan nokta mutasyonları nesilden nesile aktarılır. DNA'ya baz ilavesi (insersiyon) veya DNA'dan baz çıkarılması (delesyon) genetik bilgiyi değiştirmede en etkin iki mutasyon tipi olarak öngörülmektedir. Kod okuma çerçevesinin kayması ile gen yapısında önemli değişiklikler meydana gelir. Ultraviyole ışınları, X ışınları, radyasyon, radyoaktif materyaller, bazı mutajenik kimyasallar gen mutasyonlarına neden olurlar.

Mutasyona yol açan ajanlara ise "mutajenik faktör" denir(Herder Lexikon der Biologie, 2004).

Gen mutasyonları, hücredeki kalıtsal bilgiyi taşıyan, çift nükleotid zincirinden oluşan, DNA (deoksiribonükleik asit) molekülündeki gen denilen ve belirli bir özelliği kodlayan bölümündeki değişiklikten kaynaklanır. Mutasyonlar, bir DNA zincirindeki bazın (A, T, G, C) başka bir bazla yer değiştirmesi sonucunda ortaya çıkabileceği gibi, zincire bir ya da daha çok bazın eklenmesi veya zincirdeki bazların eksilmesi sonucunda da ortaya çıkabilir(Herder Lexikon der Biologie, 2004).

2.15 Mutasyonun Sebep ve Etkileri :

DNA'nın kendini doğru olarak kopyalayamaması ve orijinal DNA'nın yapısının bozulması ile DNA kopyalarının birebir birbirini tutmaması doğal sebeplerle oluşan mutasyonları meydana getirir. Mutasyonlar birkaç sebepten dolayı meydana gelebilir.

1) DNA'nın kendini doğru olarak kopyalayamaması: Hücre bölünürken, DNA'sının bir kopyasını çıkarır ve bazen bu kopyalar birebir olmaz. Replikasyon hatalarıdır.

2) Dış etkiler mutasyona sebep olabilir: Mutasyonlar ayrıca belirli kimyasallara ya da radyasyona maruz kalındığında gerçekleşebilir. Bunlar DNA'da bozulmaya sebep olur. Doğal olmayan yollarla gerçekleşmesi zorunlu değildir - en izole ve bozulmamış çevrelerde bile, DNA bozulur. Bu durumda, hücre DNA'yı onarırken, her zaman mükemmel şekilde gerçekleştiremez.

Mutasyonlar; yararlı, etkisiz ya da zararlı olabilir. DNA'daki bir değişiklik organizmanın herhangi bir özelliğinde değişime sebep olabilir.

2.16 Sperm Morfolojisi

Sperm kalitesinin en önemli göstergelerinden biri olan morfoloji Kruger kriterlerine göre yapılmaktadır. Özel bir boyama sonrası (Spermac) spermin şekli (morfoloji) özellikleri incelenerek sperm örneğinin fertilite (dölleme) kapasitesi belirlenir. Bu boya sperm çekirdeğini kırmızı renkte, akrozom, boyun ve kuyruğu ise yeşil renkte boyar. Semende spermlerin %4'ünden fazlasının normal şekle sahip olması gerekir. Eğer normal şekle sahip sperm sayısı %4'den az ise bu durum IVF uygulamalarındaki başarıyı olumsuz yönde etkileyebilir. İnfertil çiftin değerlendirilmesinde erkeğin rolüne dair ilk yapılan tanısal inceleme semen analizidir(spermiogram). Bu analizde sperm sayısı, motilitesi (hareketliliği) ve morfolojisi (şekil özellikleri) değerlendirilir. Semen analizinde en az 100 sperm değerlendirilir. Doğru ve detaylı bir şekilde uygulanan semen analizi, tedavi yönünden alınacak kararları ciddi ölçüde etkilemektedir.

Semen analizinde değerlendirilen parametreler içerisinde spermin dölleme potansiyeli konusunda en önemli bilgiyi sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi vermektedir(WHO lab, 2010).Sperm morfolojisi ile fertilizasyon başarısı arasındaki ilişki birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur.(WHO lab, 2010 ; Jiang WJ ve ark., 2016; He B ve ark., 2016).

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan yaygın 2 metod vardır; WHO kriterleri ve Kruger kriterleri (Kruger's strict criteria) (Sariibrahim B ve ark., 2013). Kruger kriterleri, morfoloji konusunda çok daha detaylı bir inceleme imkanı sağlaması nedeniyle en çok kabul gören ve merkezimizde de kullanılan metoddur. Bu kriterlere göre yapılan incelemede spermin baş, boyun ve kuyruk bölgesine ait bilinen toplam 38 farklı anomali açısından değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme sonucunda %4'ün altında normal morfolojili sperm gözlenmesi durumu Teratozoospermi olarak tanımlanır.

Bu oranın altı ve üstündeki değerler fertilizasyon ve gebelik oluşması yönünden önemli bulunmuş ise de her laboratuvarın kendi kriterlerini belirlemesi ayrıca önem arz etmektedir. Bir başka deyişle Kruger'e göre yapılan sınıflamada %4 ün altında normal formların bulunması durumunda, anomalilerin alt dağılımına bakılmaktadır. Alt dağılımda sperm başına ait anomaliler şiddetli ve hafif olarak ayrılmaktadır. Merkezimizde Kruger kriterlerine göre sperm baş anomalilerinin %80'den fazla görülmesi önemli kabul edilmektedir.

Sperm üretimi (spermatogenez) kompleks ve hassas bir süreç olup, genetik yapıya vücudun iç ortamına ya da dış etkenlere bağlı olarak değişik aşamalarda meydana gelen bozulmalar teratozoospermiye neden olabilir. Sperm hücresi üç kısımdan meydana gelir: baş, orta kısım ve kuyruk. Baş, genetik materyali içerir. Orta kısım, sperm hareketi için gerekli enerjiyi, kuyruk kısmı ise sperm hareketini (motiliteyi) sağlar. Morfoloji değerlendirmelerinde normal bir spermin baş uzunluğu 4 ila 5 μm (WHO lab, 2010). baş eni 2.5 ila 3.5 μm , (WHO lab, 2010). başın uzunluk/en oranı 1.50-1.75 olmalıdır(WHO lab, 2010).Orta kısım silindir 0.5 μm -1 μm kalınlıkta, 7-8 μm uzunluğunda ve başa aksiyal olarak bağlanmalıdır (WHO lab, 2010).Kuyruk orta kısımdan biraz daha ince, kıvrımsız, düzgün biçimli ve yaklaşık 40-50 μm uzunluktadır. (Griswold MD ve ark., 2015; AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2015)

2.17 Şiddetli Sperm Morfolojik Defektleri :

Dünya genelinde tüm çiftlerin yaklaşık %15'inde birincil veya ikincil dereceden infertilite sorunu mevcuttur ve infertil çiftlerin yarısına yakınında erkek kaynaklı problemler asıl infertilite nedenini oluşturmaktadır. Günümüzde, IVF uygulamalarında kullanılan sperm hazırlama teknikleri, intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu (ICSI) (WHO lab, 2010). ve son zamanlarda çok etkin olarak kullanılmaya başlanan intrasitoplazmik morfolojik olarak seçilmiş sperm enjeksiyonu (IMSI) erkek kaynaklı infertilite sorununu büyük ölçüde çare olmaktadır(WHO lab, 2010).

Sperm morfolojik anomalilerinin spermin dölleme kapasitesini değişik oranlarda olumsuz etkilemektedir ve bu oran anomalinin şiddetine göre değişmektedir(WHO lab, 2010). En önemli anomaliler büyük baş (Megalo head, Makrosefali), yuvarlak baş (Round head, Globozoospermia) ve kuyruğa ait anomali olup sperm baş bölgesinde de anormallikle birlikte görülen Tail-stump sendromlarıdır(WHO lab, 2010; Griswold MD ve ark., 2015). Bu anomaliler, mevcut oldukları örneklerde yüksek oranda bulunmaları ve dolayısıyla normal sperm seçiminin çoğunlukla mümkün olamaması nedeniyle yüksek fertilizasyon başarısızlığı, kötü ve / veya yavaş embriyo, blastosist gelişimi görülebilir.(WHO lab, 2010; AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2015).

Normal sperm (insanda 23) de 1N olarak gösterilen kromozomal içerik büyük başlı spermelerde, katlanarak 2N, 3N (poliploidy) hatta daha fazla olabilmektedir. Ayrıca bu spermelerde bir veya daha fazla kromozomda anormal sayısal değişiklikler (yüksek anöploidi) saptanmaktadır. Bu nedenle yüksek oranda büyük spermi olan vakaların spermeleriyle yapılan enjeksiyonlarda düşük fertilizasyon oranlarıyla, embriyolarda yüksek kromozomal anormallikleriyle ve düşük gebelik oranlarıyla karşılaşmaktadır.

Son yapılan çalışmalar, ejakülatında yüksek oranda büyük baş anomalisine sahip sperm bulunan vakalarda, normal baş yapısına sahip sperm bulunsa dahi, bunların kromozomal olarak anormallikler içermeye ihtimalinin çok yüksek olduğunu göstermektedir(WHO lab, 2010; Varghese

AC ve ark., 2009). Bunun sebebi de spermin oluşması esnasında fonksiyonel olan genlerden birinin bozuk olması, yani genetik bir problemin olmasıdır(WHO lab, 2010; Vagnini L. Ve ark., 2007). Bu anomalinin mevcut olduğu örneklerde başsız (pin-head) spermlerde sıklıkla rastlanır.(WHO lab, 2010).

İlk olarak 1977 yılında tanımlanan spermlerdeki büyük baş sendromu, ejakülatta çok yüksek oranda büyük başlı, ileri derecede baş anormallikleri olan ve birden fazla kuyruğu olan spermlerin varlığı ile tanımlanmaktadır.(WHO lab, 2010; Slotter E. Ve ark., 2006; Singhup ve ark., 2003). Makrosefali(Büyük Baş) olarak bilinen bu sendrom şiddetli erkek infertilitesi olan vakaların %1'den daha azında görülmektedir.(WHO lab, 2010; Mc Dowell S ve ark., 2014; Seli E. Ve ark., 2004).

2007 yılında 10 infertil erkekte yapılan bir çalışmada, sperm mayoz bölünme mekanizmasında önemli rolü olan bir gen bölgesindeki "aurorakinase C" eksikliğinin; neden olduğu saptanmıştır.(WHO lab, 2010; Elvan ok, 2010; Fischer MA ve ark., 2003). Genetik faktörün yanı sıra dış etkenler nedeniyle veya zamanla spermin mayoz bölünme mekanizmasında meydana gelebilecek problemlerinde sorumlu olabileceği öne sürülmektedir.(WHO lab, 2010; Greco E. Ve ark., 2005).

Tanısal olarak testler, COMET Assay, Halosperm, TUNEL, Chromomycin A3 Test, DNA Breakage Detection-FISH, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) kullanılmaktadır.(WHO lab, 2010; Fischer MA ve ark., 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 GEREÇ

3.1.1 Kullanılan Gereçler

Bu projede hassas terazi, otomatik pipetler, 37⁰C İnkübatör (Esco miri multi room incubator, XQ1), CO2 inkübatörü, Azot tankı, buzdolabı (+4⁰C), derin dondurucu (-20⁰C), hood, santrifuj, ısı bloğu, İnvert Mikroskop, Makler sperm sayma makinesi, polizinli lam(Menzel- Superfrost), pH metre, Mikromanipilatör (TE300410709, Nikon) ve laminar kabin kullanıldı.

3.1.2 Kimyasallar

PBS(p3813, Sigma), Tween 20(p9416, Sigma), 1N HCL (193155, Sigma).

3.1.3 Standart Solüsyonlar

Standart solüsyonlar , LIFEGLOBAL AllGrad 45%,LIFEGLOBAL AllGrad 90%, LIFEGLOBAL AllGrad Wash,Sage 1-step (REF 67010060A),Flushing Medium (REF 10840125A)- Glass Bottles, Sol A, Sol B, Fiksatif solusyon.

3.1.4 Çalışma Grubu

Çalışmamız 2 yıllık bir süre içerisinde toplan 68 rutin vaka ve donör üzerinde yapılmış olup,çalışmada bulunan 46 rutin vakanın embriyoları kontrol grubu olarak belirlenirken 22 donöre ait embriyolar ise çalışma grubunu oluşturmaktadır.Blastokist gelişimi olan ve transfer işlemi gerçekleştirilmiş bu hasta grubunda antagonist protokol uygulanmıştır.

Kontrol grubunun belirlenmesinde, oosit toplanacak olan kadınların anemnezinde bilinen kromozomal genetik bir hastalığının bulunmaması, iyi bir overial rezervinin bulunması, 2 yıllık bir infertilite geçmişi ve ilk IVFdenemesi olması yönünden belirlenirken, çalışma grubunda bulunan kadınların belirlenmesinde anemnezinde bilinen kromozomal genetik bir hastalık bir hastalığının bulunmaması, genç yaşta olmaları ve iyi overial rezervinin bulunması yönünden belirlenmiştir.

Yapılan çalışma kapsamında toplam 68 siklus değerlendirmeye alındı. Çalışma grubunda, Oosit donasyonu yapılan 22 siklusta 201 embriyo değerlendirilirken, kontrol grubunda kendi oositine ICSI uygulanan (46 siklus) 352 embriyo analiz edildi. Kontrol grubunda yaş ortalaması 35 iken, donasyon uygulanan kadınlarda yaş ortalaması 42 ve donör yaşı ortalaması ise 22 olarak hesaplandı (Tablo1). Yapılan bu çalışmada tüm vakalarda blast gelişimi gözlenmiş olup PGD işleminde 3. Gün biyopsisi sonrası fikse edilen çekirdekler 5 kromozom (13, 18, 21, X ve Y) için incelendi.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Kesintili Yoğunluk Gradient (Gradient Yöntemi) :

Kesintili dansite gradyanları; iyi kalitede spermilerin seçilmesini, spermilerin diğer hücre tipleri ve hücre döküntülerinden ayırt edilebilmesini sağlayabilmektedir. Yüzdürme tekniğine göre standardize edilmesi daha kolay olduğu için, daha tutarlı sonuçlar vermektedir. IVF ve ICSI için sperm eldesi amacıyla bu teknik kullanılmaktadır.

Gradient yönteminde, kolloidal silika kaplı silan içeren dansite gradyanları, hücreleri dansitelerine göre ayrılır. Ayrıca, hareketli spermier yüzerek gradyan materyali içinden geçip tüpün dibinde yumuşak bir pellet oluşturur. En yaygın biçimde kullanılan basit iki aşamalı kesintili dansite gradyan hazırlama yöntemi, tipik olarak % 45 (v/v) dansiteli üst katman ve % 90 (v/v) dansiteli alt katmandan ibarettir. Dansite gradyanı santrifüjlemesi kullanarak hazırlanan sperm preparatları; genellikle hücre döküntüleri, kontamine edici lökositler, germ dışı hücreler ve dejeneratif germ hücrelerinden arınmış yüksek derecede hareketli spermierin elde edilmesini sağlamaktadır.

Dansite gradyan medyumlarının çoğu, yapısal olarak düşük osmolaliteye sahip göreceli yüksek moleküler kitleli bileşenleri içerdiği için, genellikle kadın üreme yolu sıvılarıyla izoozmotik bir kültür medyumunda hazırlanırlar.

1. Hasta öncelikle semen analizinin verilmesi için bu amaçla hazırlanmış özel semen analizi odasına alınır. Hastaya analizi vermesi için steril özel bir kap verilir bu kap hastanın yanında açılır ve hastanın bilgileri kabın üzerine yazılır ve hastaya teslim edilir gerekli kurallar hastaya bildirilir.

2. Teslim edilen semen örneği tipik olarak yarı katı koagüle kitle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde genellikle likefiye olmaya (incelmeye) başlar. Bu sırada sıvı içinde heterojen topaklardan oluşan karışım görülecektir. Likefikasyon devam ederken semen daha homojen ve hemen hemen su gibi bir hale gelir.
3. Son evrelerde yalnızca küçük koagülasyon alanları kalır. Numunenin tümü oda sıcaklığında genellikle 15 dakika içinde likefiye olur, bu durum nadiren 60 dakika veya daha uzun zaman alabilir.
4. Likefiye olan semen öncelikle makroskopik açıdan incelenir. Burada semen kokusu, rengi ve volümü bakılır.
5. Makroskopik inceleme sonrasında semen analizi mikroskopik olarak incelenir. Burada Makler® Sperm Sayma Kamerası 10 mikrolitre semen örneği mikroskopta 20'lik büyütme ile kamera üzerinde bulunan kareler sağdan sola doğru 10 tanesi üzerine de bulunan hareketli ve hareketsiz tüm spermier sayılır. Çıkan sayı milyon ile çarpılır böylece semen örneğinin 1 ml içerisindeki toplam sayısı bulunur. Bulunan sayı ile aynı karelerdeki hareketsiz spermier ayrı olarak sayılır ve hareketli spermierle orantılanarak hareketlilik yüzde olarak belirlenir.
6. Makroskopik ve mikroskopik olarak incelenen semen KESİNTİLİ DENSİTE GRADYANLARI (GRADİENT YÖNTEMİ) ile hazırlamak için steril Falcon konik tabanlı 15 ml'lik tüpe steril serolojik pipet ile önce LIFEGLOBAL AllGrad® 90% 1ml olacak şekilde tabana konur bunu üzerine tüp 45° tutularak ve iki katman karışmayacak şekilde steril serolojik pipet yardımı ile LIFEGLOBAL AllGrad® 45% 1 ml olacak şekilde 2. kat olacak şekilde konik tüpün içine eklenir.
7. Konik tüpün üzerine yine 45° tutularak steril serolojik pipet ile köpürtülmeden karıştırılmış semen örneği 1 veya 2 ml olacak şekilde tüpün üzerine eklenir. Böylece konik tüp içerisinde 3 kat şeklinde bir yapı oluşur.

8. Bu tüp dengeleyici tüple beraber santrifuje konur ve 15-20 dk 300-400 g'de santrifüjlenir.
9. 37 C° inkübatörde bekletilen LIFEGLOBAL AllGrad Wash® - Glass Bottles steril yuvarlak tabanlı 5ml tüpe steril serolojik pipet ile 3 ml olacak şekilde medium eklenir.
10. Santrifuj işlemi biten semen örneği 3 ml'lik steril cam pastör pipet yardımıyla diğer katmanlardan bulunan vasatı çekmeden dikkatli bir şekilde konik tüpün tabanında toplanan pelet alınır ve LIFEGLOBAL AllGrad Wash® içeren steril yuvarlak tabanlı 5 ml'lik tüpün içerisine al-ver yapılarak konur.
11. Hazırlanan yeni tüp pelet içerisinde bulunan ve spermatozoonları silika kaplı silanlardan temizlemektir. Hazırlanan tüp 5-7 dk 200-300 g'de santrüfüje edilir.
12. Santrüfüj işlemi sonrasında tüp içerisine ki üst vasat serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırılır. Semen ICSI işlemi için hazırdır.

3.2.2 IVFYönteminin Basamakları

3.2.2.1 Kontrollü Ovariya Hiperstimülasyon :

Üreme çağındaki bir kadında her ay overlerde bir grup primordial folikül gelişimi başlamakta ve bunların oluşturduğu havuzdan seçilen sadece bir foliküldeki oosit hücresi (oosit) mayoz bölünme sürecine girerek ovulasyon oluncaya kadar mayoz bölünmenin diploten aşamasında duraksamaktadır.

Her adet döneminde adetin başında hipotalamustan salgılanan GnRH (gonadotropin releasing hormon) beynin hipofiz bölgesinden folikül stimule edici hormon (FSH) salgısını uyarmaya başlar. FSH etkisi ile folikül gelişimi devam ettikçe artan Estradiol (E₂) seviyeleri endometrial proliferasyonu ve servikte sperm penetrasyonuna izin verecek değişikliklere yol açar.

Normalde tek bir follikül dominans kazanarak matür follikül (Graaf follikülü) haline gelirken gelişmekte olan diğer folliküller atreziye uğrar ve rezorbe olurlar.

Maximal E_2 düzeylerine ulaşıldığında artan estradiol'un pozitif feedback etkisi ile LH salgısını artırmaya başlar. LH aniden yükselmeye başlayarak oositteki granülosa hücrelerinin luteinizasyonunu ve progesteron üretimini başlatır. Artan progesteron düzeyleri ise prostaglandinlerle birlikte follikül rüptüründen sorumlu proteolitik enzimlerin aktivitesini artırır. LH piki olduktan sonra 10-12 saat sonra, E_2 pik düzeylerine ulaşıldıktan 24-36 saat sonra oositin follikül dışına çıkışını sağlayan follikül rüptürü, yırtılması (ovulasyon) gerçekleşir. Oosit bu dönemde 2. Mayoz bölünmenin metafaz aşamasındadır ve fertilizasyon gerçekleştiğinde 2. Mayoz bölünme tamamlanır.

Dışarıya atılan oosit tuba uterinaların ucunda bulunan fimbrialarla tutularak tüba içine alınır. Spermle oosit tubada karşılaşır, fertilizasyon olursa 2-3 gün sonra uterusu embriyo geçer, 3-6 gün içinde de endometriuma implante olur. Fertilizasyon gerçekleşmezse endometrium adet olarak dökülür. Kontrollü Ovarian Hiperstimulasyonda (KOH) birden fazla oosit gelişmesi amaçlanmaktadır. İyi sayıda ve kalitede oosit elde edilmesi için gerekli olan KOH protokolü, her hasta için kendi özellikleri doğrultusunda planlanmalıdır.

KOH protokolleri hipotalamus-hipofiz-over aksının tedavi siklusu öncesinde baskılanıp baskılanmamasına göre uzun ve kısa protokoller olarak ayrılır. Bu amaç için GnRH analogları kullanılmaktadır. GnRH antagonistlerinin kullanıma girmesi, prematür LH yükselmesi korkusuna karşı kullanılan uzun protokoller, GnRH analogu kullanımı ve overlerin baskılanması gerekliliğini ortadan kaldırmıştır. Günlük enjeksiyonlar ile prematür LH yükselmesi önlenmekte ve bu şekilde baskılayıcı bir ajan yardımına gerek duyulmadan multiple follikül gelişimi sağlanabilmektedir.

Antagonist protokolde GnRH antagonistleri 2 şekilde kullanılabilir. Sabit uygulama şemasında 2. ve 3. Günü başlatılan gonadotropin kullanımının 6. Gününde cetrorelix veya ganirelix başlatılır ve gonadotropinlerle birlikte ovulasyonun tetiklenmesine dek (HCG günü) o günde dahil olacak şekilde kullanılır.

Değişken şemada ise önde giden folikül boyutlarının 13-14 mm ye ulaşmasını ve kan östrojen seviyesi yaklaşık 600 pq/ml üzerine çıkmasını takiben 0,25 mg antagoniste başlanır ve fix şemada olduğu gibi devam edilir. Foliküllerden az 3-4 adeti 17-19 mm olunca (18-20 mm kabul eden yerlerde bulunmaktadır). Hastalara human coryonik gonadotropin iğnesi uygulanır. 34-36 saat sonra oosit toplama işlemi OPU gerçekleştirilir.

KOH uygulamasında hangi protokol uygulanırsa uygulansın temel hedef erken gonadotropinlerin uyarısı ile ideal sayı ve kalitede oosit elde edilmesidir. Gonadotropinler FSH ve HMG olarak tek başına veya birarada kullanılabilir. Bazal LH'sı yüksek polikistik hastalarda yalnızca FSH uyarısı tercih edilmektedir.

Foliküllerin monitorizasyonu ultrasonografi ve gelişme gösteren foliküllerden salgılanan E₂ tayinidir. Vaginal ultrasonografi tercih edilmelidir. Foliküllerin matür oosit barındıracak büyüklüğe ulaştığına karar verildiğinde ovulasyon tetiklenir. Burada amaçlanan oluşturulan LH piki etkisi sayesinde ovulasyonun gerçekleştirilmesi değil, oositin metafaz 2 safhasına geçişini uyarmaktır.

3.2.2.2 Oosit Toplanması (OPU, Oocyte Pick-Up):

1. OPU işleminden bir gün önce embriyoloji laboratuvar işlem hazırlıkları yapılır.
2. OPU işlemi sırasında gelecek olan oositleri toplamak için öncelikle toplama petrisi hazırlığı için falcon centre-well petrisi orta kısmına ve çevresinde ORİGİO Flushing(REF 10840125A)medium with 10IU/ml heparinoosit toplamada dış ortam mediumu olarak kullanıldı.
3. Flushing'den steril serolojik pipet yardımıyla 2'şer ml konur ve 37 C'ye ayarlanmış gazsız inkübatöre kaldırıldı.
4. Fertilizasyon petrisi hazırlığı, Nunc steril 60 mm petri içerisine sage 1-step medium'la 500 mikrolitre 2 adet drop ve 40 mikrolitre 4 adet

yapılır ve drobun üstü tamamen vitrolife parafin oil(cat no:LGPO-500)(embriyonun içinde bulunduğu mediumun osmolaritesini, ısısını ayrıca dış etkenlerden embriyonun bulunduğu ortamı korumak için kullanılır) ile steril serolojik pipet yardımı ile kaplandı vesonra %6 CO2 ve 37 C'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı.

5. Kültür petrisi hazırlığı için Nunc 60 mm petriye (cat no:150270, nunc) sage one step mediumla 25 mikrolitre olacak şekilde 3 adet yıkama ve 15 adet kültür drobu yapılır ve üzerleri steril serolojik pipet yardımıyla vitrolife parafin oil ile tüm droplar kapanacak şekilde kaplandı ve %6 CO2 ve 37 C'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı.
6. Anestezi altına OPU yapılan hastaların toplanan oositleri folikül sıvılarıyla beraber 15 ml'lik steril tüpler ile embriyoloji laboratuvarına getirilir ve tüpler falcon 100 mm petrisine boşaltıldı.
7. Kabin içerisinde bulunan sterio mikroskop altında steril cam pasteur pipet ile granülosa ve kumulus hücresi içeren oositler toplandı ve toplama petrisi olan center-well'in dış kısmına konur.
8. Toplanan oositler center-well'in orta kısmında SAGE one step (REF 67010060A) ile yıkandı. Yıkama işlemi tamamlanan oositler fertilizasyon petrisinde 500 mikrolitrelik dropların birinde yıkandıktan sonra diğer 500 mikrolitrelik droba konur ve %6 CO2 ve 37 C'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.3 Oosit Denüstasyon ve ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection):

1. Oosit aspirasyonu sonrası kümülüs oosit kompleksleri sage 1-step petrisine alınıp bir gözünde yıkanıp diğer gözünde 2 saat boyunca %6 CO2 ve 37 C'ye ayarlı inkübatörde bekletildi. Bekletilen oositlerin olgunlaşmaları sağlanır .
2. Denüstasyon, oositlerin çevresinde bulunan kümülüs hücrelerinin uzaklaştırılmasıdır. Bu işlem kimyasal ve fiziksel

olarak 2 aşamada yapılmaktadır. Bu iki aşama ayrı ayrı değil aynı anda yapılan bir işlemdir.

3. Bu işlem için oositlerin beklemesinin 1. saatinde nunc 60mm petri içersine ORİGİO Flushing medium with 10IU/ml heparin'den 300 mikrolitre büyük bir drop yapıldı ve bu drobun içersine 100 mikrolitre lifeglobal hyaluronidaz (LGHY-010) eklendi.
4. Bu drop kimyasal denidasyon işlemi için kullanılır. Bu drobun çevresine 40 mikrolitre olacak şekilde 4 adet yıkama ve fiziksel denüdasyon dropları oluşturuldu.
5. Petri üzerinde bulunan dropların üzerleri tamamen vitrolife parafin oil ile steril serolojik pipet yardımı ile kaplandıktan sonra 37 C'ye gazsız inkübatöre kaldırıldı ve 1 saat kadar ısınması beklendi.
6. İki saati dolmasından sonra steril cam pastör pipet yardımıyla fertilizasyon petrisinde bulunan dış hücre kitleli oositler denüdasyon petrisindeki kimyasal denüdasyon bölümüne konur
7. Steril cam pasteur pipet yardımıyla al ver yapılarak hyaluronidaz enziminin etkisi ile oositlerin etrafını saran kümülüs hücrelerinin parçalanması sağlanır.
8. Artık 2- 3 katlı corona radiata hücre katmanı ile kalan oosit petride bulunan diğer yıkama drobuna denüdasyon pipeti yardımıyla toplanır ve burada yıkanan oositler hyaluronidaz etkisinin dejeneratif etkisini azaltmak amacıyla diğer droplara aktarılır.
9. Sunlight (REF:SDP-130)denüdasyon pipeti ile al ver yapılan oositlerlerin çevresinde bulunan son kat corona radiata hücreleride uzaklaştırılır böylece fiziksel denüdasyon işlemi de

- tamamlanır. Denüstasyon işlemi sonrasında yalnızca zona pellicuda zarlı oositler kalır.
10. Zona pellucuda zarı ile kalan oositler 4 sınıf üzerinde ayrılır. Bu sınıflardan 3 tanesi bölünme evresi 1 tanesi dış etkilerle ilgilidir. Oositler kalitesine ve skorlanmasına göre farklı evrelerde incelenir.
 11. Metafaz II, metafaz I, germikal vezükül ve dejenere olarak ayrılır ve steril cam pasteur pipet yardımıyla fertilizasyon petrisinin yıkama drobunda yıkandı ve diğer droba aktarılır ve %6 CO₂ ve 37 C'ye ayarlı inkübatöre kaldırılır.
 12. Denidasyon işleminin 2 saat sonra sonrasında ICSI işlemi yapılır. ICSI işlemi metafaz II evresindeki oositlere spermlerin iğne yardımıyla sperm enjekte edilmesi işlemidir.
 13. Denidasyon işleminin 1 saat sonrasında falcon ICSI petrisi (Falcon, 351006) hazırlığı yapılır. Falcon ICSI petrisine ORİGİO Flushing medium with 10IU/ml heparin'den 5 mikrolitre 4 adet ICSI drobu 10 mikrolitre 3 adet yıkama drobu ve 1 adet 15 mikrolitre sperm havuzu hazırlanır.
 14. Aynı petri üzerine Lifeglobal clinical grade PVP(LPVP-502) for ICSI mediumdan 3 mikrolitre PVP havuz yapılır ve üzerleri tamamen vitrolife parafin oil ile steril serolojik pipet yardımı ile kaplandıktan sonra 37 C'ye ayarlı gazsız inkübatöre kaldırılır ve 1 saat kadar ısınması beklenir.
 15. PVP(Polyvinylpyrrolidone) sperm hareketi yavaşlatması ve rahat işlem yapma olanağı sağlar. Denüstasyon işlemi 2 saat sonrasında nikon manipilatör hazırlanır ve manipilatöre sunlight holding pipeti ve ICSI pipeti takılır.

16. Steril cam pastör pipet yardımıyla fertilizasyon petrisinde bulunan metafaz II evresindeki (matür) oositler ICSI petrisinde yıkama drobunda yıkanır ve ICSI droplarına dağıtılır.
17. ICSI petrisinin androloji laboratuvarında hazırlanan spermden steril cam pastör pipet ile 2 mikrolitre alınır ve sperm havuzuna konur.
18. ICSI petrisi hazırlanan manipilatörün (marka ve nr)üzerine yerleştirilir. ICSI iğnesi ile sperm havuzundan normal morfoloji ve harekete sahip spermler seçilir. Seçilen spermler PVP havuzuna konur. Burada spermin boyun ve baş kısmına dokunan kuyruk böylesi ile boyun bölgesinin arasına ICSI iğnesi ile sürme hareketi yapılarak spermin hareketsizliği ve karakteristik Z görünümü sağlanır. Bu işlemin yapılış nedeni spermlerin akrozom reaksiyonun başlamasını sağlamaktır.
19. Hareketsizliği sağlanan spermler ICSI iğnesinin içine tek tek çekilir ve ICSI drobunda bulunan metafaz II evresindeki oositlerin yanına getirilir.
20. Holding pipeti yardımıyla oositler tutulur ve metafaz II evresindeki oositlerin karakteristik polar body mikroskop altında ICSI iğnesi yardımıyla saat 12 veya 6 yönünde ayarlanır bunun amacı oositlerin polar body bölgesine yakın kısımlarında spindlelerin varlığıdır. ICSI iğnesinin bunlara zarar vermesini önlemek için bu işlem yapılır.
21. Ayarlanan oositler holding pipeti ile sabit tutulur. ICSI iğnesinin içerisinde bulunan sperm iğnenin uç kısmına getirilir ve iğne tam olarak orta kısımdan oositin içine girilir ve oositin orta noktasına kadar ilerlenerek yavaşça oositin sitoplazmasında oositte karakteristik dalgalanma görölene kadar yavaşça ICSI iğnesinin içine çekilir. Sitoplazmanın ICSI iğnesi içine çekilmesindeki

amaç oositin metafaz evresinin tamamlama uyarısında bulunmak ve CA reaksiyonun başlamasını sağlamaktır.

22. İçeri çekilen sitoplazma ile sperm oositin içine bırakılır ve ICSI iğnesi oositin içinden çıkarıldı. Bu işlem metafaz II evresindeki oositlerin tamamına uygulandı.

23. ICSI işlemi sonrasında steril cam pastör pipet yardımıyla oositler bir gün önceden hazırlanan kültür petrisinin yıkama drobunda yıkandı ve petrinin diğer droplarına tek tek dağıtıldı.

24. Oosit içeren kültür petrisi %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO benchtop inkübatörüne konulur .



Resim1.1 Mikromanipilatör resmi (TE300410709, Nikon)

3.2.2.4 Fertilizasyon, Klivaj Ve Blastokist :

İşlem yapılan oositlerin fertilizasyon durumları incelenmesi ICSI sonrasında 16-18 saat sonra yapılır. Böylece oositlere uygulanan ICSI

işlemi günü 0. gün olarak kabul edilir. Embriyolar 5 gün boyunca takip altında tutulur. 5. gün ya transfer yapılır veya vitrifikasyon yöntemiyle dondurulur. Embriyolar bu dönemlerde farklı isimler alırlar. Farklı isimler almasıyla beraber 5 günlük süre boyunca erken embriyo döneminde morfolojik değişimlerle beraber gelişim olaylarıyla ilgili farklı olaylarda gerçekleşir. Saat bazında incelediğinde ICSI 0. saat olarak kabul edilir ve 120 saat sürer. 0-4 saatleri arasında fertilizasyon 4-10 saatleri arasında DNA sentezi ve DNA yeniden programlanması 30-72 saatleri arasında genom aktivasyonu 72-120 saatleri arasında ise transkripsiyon, kompaksiyon, ekspansiyon ve farklılaşma başlar (Henig ve ark., 2004).

1. Erken embriyoların değerlendirilmesinde morfolojik olarak sınıflandırma gözlem yoluyla mikroskoplarda oda ısısı koşullarında yapılır. Bunu için birinci gün pronücleus (PN) varlığının ve 2. polar body gözlenir. Pronücleus sperm ve oosit nücleuslarının gözlenmesidir ve ideal olarak 1.günde 2 adet pronucleus gözlenir. 2. polar body metafaz II. evresinin tamamlanmasıyla az bir sitoplazma ile beraber previtellin aralığa küçük bir yapı atılmasıdır ve ideal olarak 2 adet polar body gözlenir.
2. 2 ve 3. gün hücre sayısı, hücrelerde nucleus varlığı, fragmentasyon varlığı ve yüzde olarak derecesi, hücre bölünmesinin simetrikliği ve hücrelerin sitoplazma renk tonu olarak değerlendirilir. Bu değerlendirme kısaltmalar kullanılarak yapılır.
3. 3. gün gelişimi takip edilen embriyolar ICSI işleminin üzerinden 66 ile 72. Saatler arasında mikromanipülatör'de 3. gün değerlendirilmesi yapılır. Yapılan değerlendirme de en az 6 hücreli %20'den az fragmente, çekirdekleri gözlenen, açık renkli ve eşit blastomer bölünmesi olan embriyolar belirlenerek petri inkübatöre kaldırılır.

4. FALCON 90x5 ıcsı petrisi (ref:351006) üzerine SAGE quinn's advantage with hepes (CaMg free) (ref:4100-12) 5 mikrolitre olacak şekilde işlem yapılarak embriyo sayısı kadar drop oluşturulur. Sonrasında bu dropların üzeri 10 ml falcon serolojik pipet (ref:356551) yardımıyla life global paraffin oil (ref: LGPO-500) ile bütün droplar örtülecek şekilde kaplanır. Hazırlanan bu petriye biopsi petrisi denir. Biopsi petrisi 37⁰C ısıya ayarlanmış etüve kaldırılarak ısınması için 1 saat beklenir.
5. Embriyo biyopsisi öncesi mikromanipilatör hazırlanması için mikromanipilatörün sağ koluna ORIGIO biopsy pipeti (ref:MBB-FP-M-30) sol koluna ise ORGIO holding pipeti (ref:MPHC001-30) takılır. 1 saat beklemeden sonra cam pastör pipet yardımıyla kültür petrisinden önceden belirlenen embriyolar alınır ve biopsi petrisinde bulunan droplara tek tek yerleştirilir ve kültür petrisi tekrar inkübatöre kaldırılır.
6. Biopsi petrisi mikromanipilatörde bulunan lazer objektif (HAMILTON THORNE ZILOS-tk) ile embriyoların zonalarına delik açılır ve açılan bu delikten her bir embriyodan 1 adet çekirdeği gözlenen blastomer biyopsi pipeti yardımıyla çıkarılır. Ve her bir blastomer kendi bulunduğu embriyonun yanında bırakılır.
7. Biopsi işlemi sonrasında embriyolar numaralandırılarak tekrar kültür petrisine aktarılır ve bu işlem ortalama 15 dk sürmektedir. Çıkarılan blastomerler biopsi petrisinde numaralandırılan embriyolar ile aynı numaralara ait blastomerler fiksasyon işlemine hazır hale getirilir.
8. Her bir blastomer bir dakika PBS te bekletilir. Sonra spreading solüsyonu yardımı ile polizimli lamda hipotonik olarak patlatılıp çekirdeğinin fikse edilmesi sağlanır. Ve bu çekirdeğin lokasyonu daha sonra genetik laboratuvarına bildirmek için kağıt üzerinde belirlenir beş dakika PBS de bekletilir. Sonrasında %70, %85 ve %100 lük alkolde ikişer dakika bekletildikten sonra kurutulup çekirdekler invert mikroskopta tekrardan kontrol edilir. Sonrasında PGT analizi için Genetik Laboratuvarına gönderilir.

9. 3 gün için ideal bir erken embriyo 8 hücreli, tüm hücrelerde çekirdek varlığı, %0 fragmentasyon, hücrelerin tamamı simetrik ve hücre sitoplazması açık renk olmalıdır. Bu sınıflandırmanın dışına çıkan 3. gün embriyolar olabilir. Bunlar kompakt bir yapı olan marula evresindeki embriyolardır.
10. Blastokist sınıflandırmasında erken embriyo farklılaşma gözlenir. Embriyo ICM (iç hücre kitlesi), embriyo içi kavite ve kaviteyi saran trofektoderm hücrelerinden oluşurlar. Burada sınıflandırmada GRADE yöntemi kullanılır.
11. Embriyonun ICM kalitesi, blastokist gelişimi ve trofektoderm durumuna göre değerlendirilir. Buna göre blastokist gelişimi ve görünüm 1'den 6'ya kadar farklı sayılarla numaralandırılır. 1 blastokistin kavitesi embriyonun toplam görüntünün yarısında az olduğunda 2 blastokistin kavitesinin embriyonun toplam görüntüsünün yarısından fazla olduğunda 3 embriyonun içinin kaviteyle kaplı olduğunda 4 kavite genişlemesiyle zonanın ince bir yapı alması 5 ve 6 embriyonun hatch (zonadan embriyonun kurtulması) yapmasına göre sınıflandırılır(EK 1.2).
12. İç hücre kitlesine göre sınıflandırma A, B ve C harfleri kullanılır. Buna göre A çok sayıda iç hücre kitlesi sıkı bir şekilde paketlenmiştir. B iç hücre kitlesi gevşek şekilde gruplanır. C iç hücre kitlesi çok az olarak gözlenir(EK 1.2).
13. Trofektoderm hücrelerine göre sınıflandırması A, B ve C harfleri kullanılır. Buna göre A trofektoderm hücrelerinin birçoğu uyumlu bir tabaka oluştururlar. B trofektoderm hücrelerinin az bir kısmı epitelyal bir görünüme sahiptir. C trofektoderm hücrelerinin büyük ve az sayıdadır.

14. Blastokist evresindeki erken bir embriyo buna göre sınıflandırılır ve en iyi blastokist olarak 6AA kalitesi söylenebilir .
15. ICSI günü 1.gün için ve 2. günde 3. gün için kültür petrisi hazırlanır. Kontrol edilen embriyolar 1. gün ve 3. gün birer gün önce hazırlanan petrilere aktarma yapılarak değiştirildi.
16. Kültür petrisi hazırlığı için Nunc 60 mm petriye sage one step mediumla 25 mikrolitre olacak şekilde 2 adet yıkama ve 15 adet kültür drobu yapıldı ve üzerleri steril serolojik pipet yardımıyla vitrolife parafin oil ile tüm droplar kapanacak şekilde kapladı ve %6 CO₂ ve 37 C'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı.
17. 1.gün embriyolar ICSI'den 16-18 saat sonra sıcak zeminli mikromanipilatör mikroskopta tek tek kontrol edildi.
18. PN ve 2. polar body varlıklarına göre belirlenir. Belirlenen embriyolar steril cam pastör pipet yardımıyla bir gün önceden hazırlanan kültür petrisine aktarıldı.
19. Aktarma işleminde yıkama droplarında embriyolar yıkandı ve diğer droplara tek tek dağıtıldı.
20. Embriyo içeren kültür petrisi %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO inkübatör benchtop inkübatörüne konulur.
21. 2.gün sıcak zeminli micromanipilatör mikroskopta tek tek kontrol edilir ve embriyoların ilk klivaj (bölünme) gözlenir.
22. Embriyolar hücre sayısı, hücrelerde nucleus varlığı, fragmentasyon varlığı ve yüzde olarak derecesi, hücre bölünmesini simetrik ve hücrelerin sitoplazma renk tonu olarak değerlendirilir.

23. Aynı petri %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO benchtop inkübatörüne konulur .
24. 3.gün sıcak zeminli mikromanipülatör mikroskopta tek tek kontrol edilir ve embriyolar hücre sayısı, hücrelerde nucleus varlığı, fragmentasyon varlığı ve yüzde olarak derecesi, hücre bölünmesini simetrik ve hücrelerin sitoplazma renk tonu olarak değerlendirilir.
25. Değerlendirilen embriyolar yerlerini aynı kalacak şekilde steril cam pasteur pipet yardımıyla bir gün önceden hazırlanan kültür petrisine aktarılır. Aktarma işleminde yıkama droplarında embriyolar yıkanır ve diğer droplara tek tek dağıtılır.
26. Embriyo içeren kültür petrisi %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO inkübatör benchtop inkübatörüne konulur .
27. 5. gün sıcak zeminli mikromanipülatör mikroskopta tek tek kontrol edilir ve embriyonun ICM kalitesi, blastokist gelişimi ve trofektoderm durumuna göre değerlendirilir.
28. Değerlendirilen embriyolar aynı gün transfer etmek için tekrar petri %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO inkübatör benchtop inkübatörüne konulur.
29. Belirlenen embriyolar aynı gün transfer saatine kadar 37⁰C %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO inkübatörde bekletilir.

3.2.3 PGT (Preimplantasyon Genetik Tanı) :

Üçüncü gün embriyolarına gerçekleştirilen blastomer biyosisi sonrası gerçekleştirilen fiksasyon işlemi sonrasında blastomerde PGD FISH işlemi yapılmıştır. PGD FISH işlemi Yakın Doğu Üniversitesi Genetik Laboratuvarında Scriven ve arkadaşlarının belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir(Scriven P.N. ve ark., 2011).

3.2.4 Biyoistatistik Değerlendirme :

Araştırmada incelenen tüm değişkenler için tanımlayıcı istatistikler hesaplanmıştır. Kategorik değişkenler için frekans ve yüzdeler, sürekli değişkenler içinse ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum gibi istatistikler hesaplanmıştır. Tüm gerekli tanımlayıcı istatistikler metin içerisinde sunulmaktadır. Kategorik değişkenlerin gruplar arasındaki değişiminin istatistiksel analizinde Pearson ve Fisher Kesin Ki Kare testleri kullanılmıştır. Sürekli değişkenlerin dağılım özellikleri Shapiro Wilk Normallik testi ile incelenmiştir. Buna göre, iki grup arasındaki farklılıkların incelenmesi amacıyla İki Ortalama Arası Farkın Önemlilik testi ve ikiden çok grup kıyaslanması durumundaysa Tek Yönlü Varyans Analizi uygulanmıştır. Araştırma değişkenleri arasındaki olası ilişkilerin incelenmesi amacıyla Pearson Korelasyon Analizi kullanılmıştır. Tüm araştırma analizlerinde SPSS (Versiyon 18.0) ve grafik çizimlerinde de MsExcel (Microsoft Office for Mac - 2016) yazılımları kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0,05$ olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Morfolojiye Göre Sağlıklı Embriyo

Kontrol ve çalışma grubunda döllenmiş oositlerin 22+ 46 siklusda 553 embriyo analiz edilerek ortalama 2/3'ü sağlıklı bulunarak bir sonraki işleme yani 3. Gün biyopsisi, PGT'ye ve transfer işlemine gidildi.

Tablo 4.1 Çalışmaya alınan donasyon olan ve donasyon olmayan hastalara ait yaş ortalaması, hasta başına embriyo transfer ortalamaları normal ve anormal embriyo hesaplaması.

	OOSIT DONASYONU	OOSIT DONASYONU OLMAYAN
SİKLUS SAYISI	22	46
Yaş Ortalaması	42,6	35,8
EMBRYO	201	352
NORMAL	125	190
ANORMAL	76	162
ET	46	82
ET Ortalaması	2,09	1,78

Mikroskopik incelemede morfoloji ve bölünme kalitesine göre donasyon grubunda analiz edilen 201 embriyoda % 62 oranında normal embriyo saptanırken, oosit donasyonu olmayan kontrol grubunda 352 embriyoda % 53 normal ve % 47 anormal embriyo gözlenmiştir.

4.2 Biyopsi/ PGD

PGD FISH işlemi için Yakın Doğu Üniversitesi Genetik Laboratuvarına gönderilmiştir (Tablo 4.1).

4.2.1 Transfer

Çıkan sonuca göre eş zamanlı olarak embriyonun blastosiste gelişme durumları ve normal/anormal hali gözetilerek aynı zamanda hastanın yaşı ve embriyonun kalitesi düşünülerek 5. Günde transferleri gerçekleştirilmiştir.

4.3 PGD değerlendirme sonuçlarında görülen anöploidi türlerinin, grupların kendi içinde ve diğer grup ile karşılaştırılması

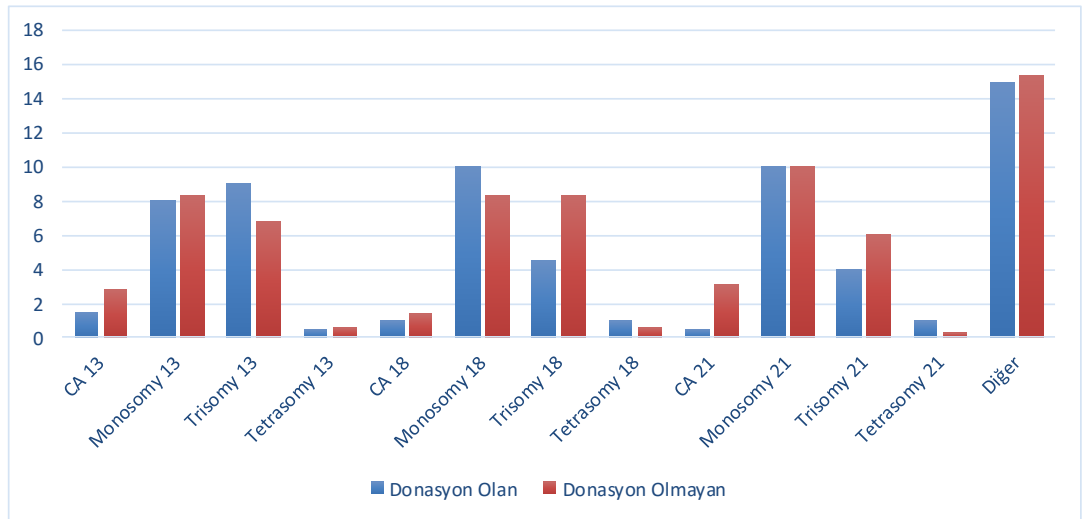
Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda PGD sonrası 13, 18,21,XY'lerde görülen anomali oranları hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo4.2Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda bakılan PGD sonrası aneuploidi oranları.

	Donasyon	Donasyon Olmayan
CA13	3 (% 1,5)	10(% 2,8)
Monozomi 13	16(% 8)	29(% 8,3)
Normal 13	162(% 81)	286(% 81,5)
Trizomi 13	18(% 9)	24(% 6,8)
Tetrazomi 13	1(% 0,5)	2(% 0,6)
CA18	2(% 1)	5(% 1,4)
Monozomi 18	20(% 10)	29(% 8,3)
Normal 18	167(% 83,5)	286(% 81,5)
Trizomi 18	9(% 4,5)	29(% 8,3)
Tetrazomi 18	2(% 1)	2(% 0,6)
CA21	1(% 0,5)	11(% 3,1)
Monozomi 21	20(% 10)	35(% 10)
Normal 21	169(% 84,5)	283(% 80,6)
Trizomi 21	8(% 4)	21(% 6)
Tetrazomi 21	2(% 1)	1(% 0,3)
Diğer	(% 15)	(% 15,4)

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda donasyon olan ve olmayan hastalarda ayrı ayrı aneuploidi ve normal embriyo oranları belirlenmiştir.

Aneuploidi 13 için donasyon hastalarının %81'i normal, %19'u anormal (CA13, Monozomi 13, Trizomi 13, Tetrazomi 13), donasyon olmayan hastaların %81,5'i normal, %18,5'i anormal (CA13, Monozomi 13, Trizomi 13, Tetrazomi 13). Aneuploidi 18 için donasyon olmayan hastalarda %81,5 normal, %18,5 anormal (CA18, Monozomi 18, Trizomi 18, tetrazomi 18), donasyon hastalarının %83,5 normal, %16,5 anormal (CA18, Monozomi 18, Trizomi 18, tetrazomi 18). Aneuploidi 21 için donasyon hastalarının %84,5'i normal, %15,5'i anormal (CA 21, Monozomi 21, Trizomi 21, tetrazomi 21), donasyon olmayan hastalarda %80,5 normal, %19,5 anormal (CA 21, Monozomi 21, Trizomi 21, tetrazomi 21) olarak bulunmuş olup Grafik 4.1 de gösterilmiştir.



Grafik 4.1: Donasyon olan ve donasyon olmayan hastaların aneuploidi % oranları.

Aneuploidi oranlarına bakılarak istatistiksel analizler (p value) hesaplanmıştır. Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda PGD analizi sonucu 13, 18, 21, XY kromozomlarındaki kompleks anomali, monozomi, trizomi ve tetrazomi sonuçlarına bakılarak baba yaşı ile bağlantılı olup olmadığına bakmak için p value hesaplaması yapılmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda baba yaşı ve aneuploidiler arasında anlamlı bir bağlantı görülmemiştir (Tablo 4.3) (Ek 1.1).

Tablo 4.3 Aneuploidi oranları ile baba yaşı arasındaki istatistiksel hesaplama. Yapılan *p* value hesaplaması sonucunda baba yaşı ile çiftlerin anöploidik embriyo oranları arasında bir bağlantı bulunmamıştır.

		DONASYON n (%)		DONASYON OLMAYAN n (%)		<i>p</i>
	ANEUPLOİDİLER	YOK (%)	VAR (%)	YOK (%)	VAR (%)	
Kromozom 13	CA13	197 (% 98,5)	3 (% 1,5)	341(% 97.2)	10(% 2.8)	0,393
	MONOZOMİ 13	184(% 92)	16(% 8)	322(% 91.7)	29(% 8.3)	0,914
	TRİZOMİ 13	182(% 91)	18(% 9)	327(% 93.2)	24(% 6.8)	0,358
	TETRAZOMİ 13	199(% 99.5)	1(% 0.5)	349(% 99.4)	2(% 0.6)	1
Kromozom 18	CA18	198(% 99)	2(% 1)	346(% 98.6)	5(% 1.4)	1
	MONOZOMİ 18	180(% 90)	20(% 10)	322(% 91.7)	29(% 8.3)	0,491
	TRİZOMİ 18	191(% 95.5)	9(% 4.5)	322(% 91.7)	29(% 8.3)	0,094
	TETRAZOMİ 18	198(% 99)	2(% 1)	349(% 99.4)	2(% 0.6)	0,624
Kromozom 21	CA21	199(% 99.5)	1(% 0.5)	340(% 96.9)	11(% 3.1)	0,064
	MONOZOMİ 21	180(% 90)	20(% 10)	316(% 90)	35(% 10)	0,991
	TRİZOMİ 21	192(% 96)	8(% 4)	330(% 94)	21(% 6)	0,316
	TETRAZOMİ 21	198(% 99)	2(% 1)	350(% 99.7)	1(% 0.3)	0,299
Diğer	XY	170	30	297	54	0,904

Oositdonasyonu olan hastalarda bakılan PGD sonuçlarına göre toplam aneuploidi ve normal blastomer sonuçları ile baba yaşı arasındaki anlamlılığa bakılmış olup bir anlamlılık saptanmamıştır. Bu sonuçlar ile karşılaştırma yapılarak oosit donasyon olmayan hastalardaki aneuploidi ve normal blastomer sonuçları ile de baba yaşı arasındaki istatistiksel analiz sonucunda da bir bağlantı bulunmamıştır (Tablo 4.4ve Tablo 4.5).

Tablo 4.4 Donasyon olan ve donasyon olmayan hasta gruplarında normal embriyo yüzdelerinin karşılaştırılması.

	Normal Embriyo Yüzdesi (Ort.± ss)	P
DONASYON	64,56 ± 14,40	0,052
DONASYON OLMAYAN	56,19 ± 17,10	

Tablo 4.5 Toplam 68 çiftte anne yaşı ve baba yaşı ile aneuploidiler arasındaki korelasyon analizi.

	Normal Embriyo Yüzdesi (r ; p)
BABA YAŞI	r= + 0,223 ; p=0,070
ANNE YAŞI	r= + 0,309 ; p=0.011

Donasyon olan ve donasyon olmayan gruplarda sağlıklı embriyoların 5. Gün blast'a gitme ve sonrasında fertilizasyon yüzdesine bakılmış olup bu gruplar arasında da bir anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.005$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

Tablo 4.6 Donasyon olan ve donasyon olmayan hasta gruplarında normalembriyoların blast'a gitme oranlarının karşılaştırılması

	5. gün blast'a gitme oranı (Ort.± ss)	<i>p</i>
DONASYON OLAN	67,01±20,16	0,724
DONASYON OLMAYAN	69,22±25,71	

Tablo 4.7 Baba yaşı ve anne yaşının fertilizasyon yüzdesi ile karşılaştırılması.

	Fertilizasyon Yüzdesi (Ort.± ss)	<i>p</i>
DONASYON OLAN	79,42±14,31	0,585
DONASYON OLMAYAN	81,44±14,02	

Araştırma bulgularına göre normal embriyo elde edilebilme yüzdesi ile baba yaşı arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmezken, anne yaşı ile pozitif ve anlamlı bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Donasyon olan ve donasyon olmayan gruplar kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirildiği zaman donasyon olan grupta anne yaşı ile baba yaşı arasında bir korelasyon olduğu gözlemlenmiş olup, donasyon olmayan grupta anne yaşı ve baba yaşı arasında korelasyon olmadığı bulunmuştur($p<0.005$)(Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Anne yaşı ve baba yaşının donasyon olan ve donasyon olmayan gruplarda karşılaştırılması.

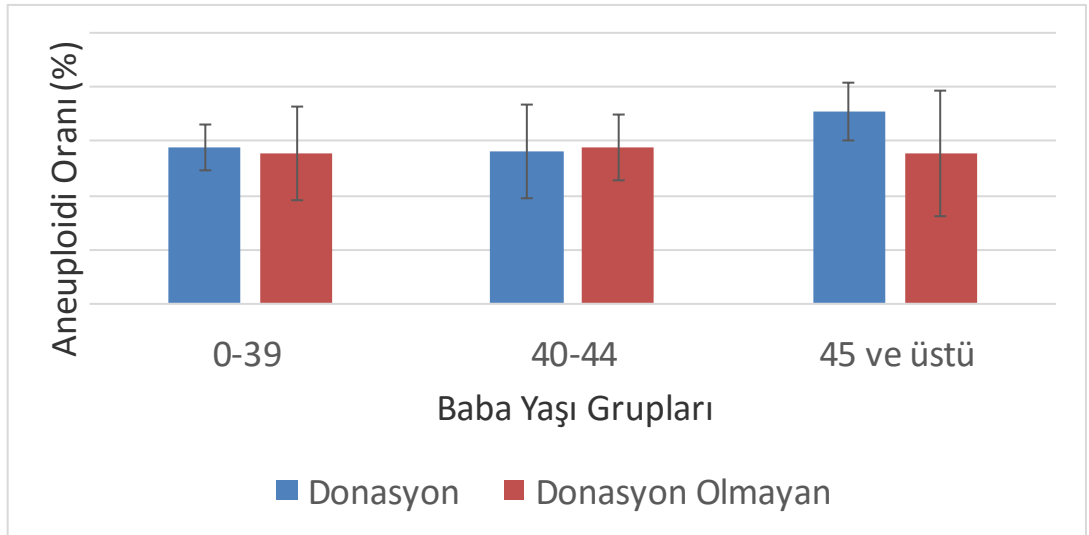
		r	p
DONASYON OLAN	BABA YAŞI	0,447	0,037
	ANNE YAŞI	0,634	0,002
DONASYON OLMAYAN	BABA YAŞI	0,018	0,908
	ANNE YAŞI	-0,028	0,856

Baba yaşını 3 gruba (<39, 40-44, >44) ayırarak donasyon hastalardaki aneuploidi sonuçları ile karşılaştırılarak anlamlılığına bakılmış ve bir bağlantı bulunmamıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9 Baba yaşının 3 gruba (<39, 40-44, >44) ayrılarak normal embriyo yüzdelerinin karşılaştırılması.

Yaş Grupları	Normal Embriyo Yüzdesi (Ort.± ss)	p
<39	55,78±16,53	0,172
40-44	57,19±13,68	
>44	64,52±18,56	

Bulgularımız baba yaşının oosit donasyonunda erkek yaşının üreme ve aneuploidiler üzerine bir etkisi bağlantısı olmadığı bulunmuştur. Tüm 68 çift değerlendirildiğinde, baba yaşı gruplarına göre normal embriyo elde edilme yüzdeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0.172).



Grafik 4.2:Baba yaşının 3 gruba (<39, 40-44, >44) ayrılarak donasyon olan ve donasyon olmayan gruplarıdaki aneuploidi% oranları.

5.TARTIŞMA

Wyrobek ve arkadaşları 22-80 yaş aralığındaki 97 erkekte yapmış oldukları çalışmada erkek yaşı ile DFI(DNA fragmentation index) arasında anlamlı bir bağlantı bulmalarına rağmen, erkek yaşı ile cinsiyet, aneuploidi ve gelişmemiş kromatin arasında bir bağlantı olmadığını bildirmişlerdir (Wyrobek ve ark., 2006).

Bodri ve arkadaşlarının 222 oosit donör hastada yapmış olduğu çalışmada embriyo da kromozom anomalileri (13,18,21kromozomları) ile artan baba yaşı arasında bir anlamlı bağlantı olmadığı bulunmuştur (Bodri D, 2007).

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılan oositlerde fertilizasyon, embriyo kalitesi ve anomali açısından karşılaştırıldığında farklı yaş grupları (35, 36-39, 40 ve >40) açısından bakıldığı zaman erkek yaşına bağlı anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (Elvan Ok ve ark., 2010)

İleri erkek yaşı sonucunda elde edilen gebelik sonuçlarına göre; artan gebelik kayıpları, epilepsi, Down sendromu, Diyabet ve meme kanseri ilişkilendirilmiştir (Kleinhaus K, Obstet Gynecol 2006). Carmen ve arkadaşları 32 genç oosit donör hastasında GnRH (gonadotropin) hormon seviyesine bakarak aneuploidi oranlarını araştırmıştır. Bunun sonucunda iki doz uygulanan (yüksek doz: 225IU ve düşük doz:150 IU) GnRH hormonu sonucunda 22 hastada olumlu sonuç almışlardır. Bu 22 hastanın düşük doz (150IU) GnRH hormon verilen 12'sinde fertilizasyonda iyi sonuç alınıp, aneuploidilerde düşüş saptanmıştır (Carmen Rubio ve ark.,2010).

Daha önceki çalışmalarda erkek yaşının düşük seminal hacmi ve hareketli spermatozoa yüzdesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Kidd ve ark., 2001; Eskenazi ve ark., 20013). Bizim çalışmamızda ise erkek yaşı ile oosit donasyonu arasında bir anlamlılık bulunmamıştır.

Begueria ve arkadaşları 36 yaş altı 4887 oosit donasyon hastasında ICSI yöntemi kullanılarak baba yaşı ve sperm kalitesinin önemli olup olmadığına bakmıştır. Çalışma sonucunda baba yaşının üreme ve anomaliler açısından taranan 36 yaş altı oosit donör hastalarında etkili olmadığı bulunmuştur. Buna bağlı olarak baba yaşından önce anne yaşının üreme ve anomaliler üzerine daha etkili olduğu bulunmuş olup, ICSI yöntemi ve oosit kalitesinin yaşa bağlı olarak sperm kalitesinden daha önemli olduğu bildirilmiştir (R. Begueria ve ark., 2014).

Sagi-Dain L ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 12,538 oosit donasyon hastasında ileri baba yaşı ve döllenme oranı, bölünme embriyo gelişimi, implantasyon, gebelik, düşük, ya da canlı doğuma bağlı olarak istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır. Blastosist embriyo oluşumundaki değişime bağlı istatistiksel anlamlılık sadece iki makalede öne sürüldü. Hacim ve muhtemelen hareketlilik dışında, konsantrasyon ve morfoloji gibi diğer sperm özellikleri yaşla birlikte değiştirmede (Sagi-Dain L ve ark., 2015).

Bernard ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmaya göre genç erkek yaşına (<30) sahip babaların down sendromlu çocuk sahibi olma riskleri, yaşlı erkek yaşına (>30) göre iki kat daha fazladır. Bunun spermdeki DNA hasarı ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Bernard Steiner ve ark., 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalar doğrultusunda spermdeki kırık ya da hasarlı DNA sayısının artması bireylerde infertiliteyi artırdığı ve çocuk sahibi olma oranlarını düşürdüğü gösterilmiştir (Aitken RJ ve ark., 2009). Bu bilimsel çalışmalar hasarlı DNA ya sahip sperm oranının artmasının sağlıklı gebelik oran ve gelişimini de önleyebileceğini ortaya koymuştur (Varghese AC ve ark., 2009). Erkeğe ait spermdeki DNA hasarı yüksek olsa dahi normal gebelikler ve sağlıklı doğumlar görülebilir. Bunun nedeni, spermdeki DNA hasarının oranı yüksek ise, spermelerde meydana gelen apoptoz ve mutasyon oranındaki artışa bağlı olarak oluşabilecek embriyo gelişimi de bozulmaktadır (Moskovtsev SI ve ark., 2009). Sonuç olarak embriyoların blastosist evresine gelme şansı azalmakla birlikte düşük oranlarında artış ve embriyolarda anomaliler gelişebilmektedir (Tarozzi N. Ve ark., 2007).

Javier Garcia-Ferreya ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, embriyolardaki aneuploidi oranlarıyla ileri baba yaşı arasındaki bağlantı olup olmadığına bakmışlardır. Çalışma <39,40-49 ve >50) yaş grubu olmak üzere baba yaşı 3 grupta analiz edilmiş olup, oosit donasyonu olan grupta >50 baba yaşı grubu ile birlikte embriyolardaki aneuploidi oranlarını artırdığını ileri sürmektedirler. Ayrıca >50 baba yaşı olan grubun diğer iki gruba (<39 ve 40-49) göre yüksek DNA hasarı, düşük blastosit gelişimi ve embriyolarda yüksek aneuploidi oranı olduğunu gözlemlemişlerdir (Javier Garcia-Ferreya ve ark., 2015). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada baba yaşı ile aneuploidiler arasında bir bağlantı bulunmaz iken sadece donasyon olan grupta anne yaşı ve baba yaşı arasında anlamlı bir korelasyon görülmüştür. Bu anlamlı korelasyonun donasyon olan gruptaki oositlerin daha kaliteli ve genç olduğundan dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Çalışma grubumuzun sayısını artırarak sadece 13,18,21,X,Y anomalileri değil, embriyolarda PGS analizi yaparak ileri baba yaşı ile aneuploidiler (delesyon, inversiyon, dublikasyon) arasındaki bağlantıya bakmayı düşünmekteyiz.

Spermin baş kısmında bulunmakta olan DNA molekülü enfeksiyon, sigara, ateşli hastalıklar, yaş ve çevresel faktörlere bağlı olarak hasara uğramaktadır (Evenson D ve ark., 2006). Yapılan bilimsel çalışmalar, sperm oositoya girdiği zaman yani döllenme sırasında oositde bulunan enzimler hasarlı DNA' yı tamir edebildiği gösterilmiştir. Genç oositde bulunan enzimler tarafından yapılan tamir mekanizması daha iyi çalışmaktadır (Evenson D. Ve ark., 2006). Spermdaki hasarlı DNA oranı fazla olsa bile kadın yaşı ne kadar gençse sağlıklı gebelik ve doğum oluşma oranı o kadar artmaktadır(Greco E. Ve ark., 2005). Fakat sperm hasarı çok fazla ise tamir mekanizması yetersiz kalabilir. Buna bağlı olarak döllenme ve embriyonun ilk bölünmesi etkilenebilir, embriyonun blastosist gelişmesi bozulabilir, gebelik şansı azalarak düşük oranı artabilir (Guerin P. Ve ark., 2005;Virro MR ve ark., 2004; Gandini L. Ve ark., 2004).Yapmış olduğumuz çalışmada 553 oosit'de aneuploidiler ile erkek yaşı arasında bir korelasyon bulunmaz iken, anne yaşı ile aneuploidiler ve normal embriyo oluşması arasında anlamlılık bulunmuştur($p<0.005$).

Camargos ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada fertilizasyon üzerinde oosit morfolojisinin etkili olmadığını ileri sürerken, Wilding ve arkadaşları ise bilimsel çalışmalar sonucunda oositin morfolojisinin embriyo gelişimi ve fertilizasyon ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir (Camargos ve ark., 2012;Wilding ve ark., 2007). Bizim bulgularımıza göre donasyon olan grupta anne yaşı ve baba yaşı arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuş olup ($p<0,005$), donasyon olmayan grupta anne yaşı ve baba yaşı arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir

Brian ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada artan erkek yaşı ile oosit donasyonu arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır. ART (assisted reproductive technologies) teknikleri kullanılarak yapılan çalışmada donörlerin tedavi döngüsü ve yaş dikkate alındığında erkek yaşı ile anlamlılık bulunamamıştır (Brian ve ark., 2011). Diğer bir çalışmada erkek yaşının sperm kalitesi ve fertilizasyon ile bağlantılı olduğu, ayrıca bu durumun >40

yaş üzeri anne adaylarındadaha net görüldüğü bildirilmiştir. Bu durumda özellikle Down sendromu bulgusuna rastlanmıştır (Isiah D. Ve ark., 2011).

Artan erkek yaşına bağlı olarak çevresel faktörler- toksinlere maruz kalmanın sperm kalitesini azalttığı ve DNA kırıklarının arttığı bulunmuştur (Isiah D. Ve ark., 2011). Epigenetik etkilerinde sperm hasarı ve yapısı üzerin etkili olduğu düşünülmektedir. Spermdeki DNA hasarının erkek fertilizasyonu ve gebelik oranını azalttığı, gebelikte düşükleri artırdığı bulunmuştur (Mausumi Das ve ark., 2013).

Kari Stefansson ve arkadaşları, çocuğun sağlığı ve gelişimi üzerinde, annenin değil babanın yaşının daha çok etkili olduğunu göstermişlerdir (James X. Sun ve ark., 2012). Yapılmış olan birçok bilimsel araştırma sonucuna göre Down sendromunun ileri anne yaşına bağlı olduğu bildirilmiş olmasına göre, şizofreni ve otizm gibi nörodejeneratif hastalıkların anne yaşı değil, babanın yaşının etkisi altında olduğu bildirilmiştir. Spermde meydana gelen anomaliler sadece sayısal kromozomal onomaliler ile sınırlı değildir Dr. Stefansson ve arkadaşları, 78 ebeveyn ve çocuklarının DNA'larındaki mutasyonlar incelemişlerdir. Bunun sonucunda, çocuğun DNA'sındaki mutasyon veya ufak değişimler ile babasının yaşı arasında doğrudan bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır (James X. Sun ve ark., 2012). Bulunan sonuçlara göre, 20 yaşındaki bir baba çocuğuna ortalama 25 mutasyon aktarırken, 40 yaşındaki bir baba yaklaşık 65 mutasyon aktarmaktadır. Çalışmanın gösterdiği bir diğer sonuç ise çocuğa geçen mutasyonların %97'sininileri baba yaşına (>47) bağlı olduğu ve bir erkeğin babalığı ertelediği her yıl için çocuğa iki mutasyon fazla aktarma ihtimali olduğudur (James X. Sun ve ark., 2012). Mutasyonların sebebinin kadına değil erkeğe bağlı olması, erkeklerin hayatları boyunca sperm üretmeleri ve olası yaşlanmaya bağlı üretim hatalarından dolayı olduğu şeklinde açıklanmıştır (James X. Sun ve ark., 2012). Çünkü meydana gelen genetik mutasyonlar erkek yaşı arttıkça sperm üretimi esnasında meydana gelmektedir. Bizim bulgularımıza göre baba yaşı ile aneuploidiler arasında bağlantı bulunmamış olup, çalışmamızda sadece en sık görülen 13,18,21,X,Y kromozomlarına ve bunlardaki aneuploidilere bakılmıştır.

Literatürlere uygun olarak 68 siklustan elde ettiğimiz bulgularla baba yaşının üreme başarısı ile ve embriyonal kromozom anomalileriyle ilişkisi olmadığı gösterilirken donör programında donör yaşı ile ilişkisi olduğu ileri sürülmektedir.

KAYNAKLAR

Abdalla HI, Billet A, Kan AK, Baig S, Wren M, Korea L, et al. Obstetrical outcome in 232 ovum donation pregnancies. *Br J Obstet Gynecol* 1998;105: 332–7.

Abdalla HI, Wren ME, Thomas A, Korea L. Age of the uterus does not affect pregnancy or implantation rates; a study of egg donation in women of different ages sharing oocytes from the same donor. *Hum Reprod*. 1997;12:827–9. doi:10.1093/humrep/ 12.4.827.

Abramsson L. On the investigation of men from infertile relations. A clinical study with special regard to anamnesis, physical examination, semen-, hormone- and chromosome analyses, from men with non-"normal" semen. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1988;113:1–47.

Agarwal A, Makker K and Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*. 59(1):2-11

Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod BioMed Online*. 2003;7:65–70.

Aitken RJ, De Iuliis GN and McLachlan RI (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32(1):46-56

Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*. 1999;71:836–42. doi:10.1016/S0015-0282(99)00092-8.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE • Sperm morphology (shape): Does it affect fertility? 2014.

Andersen AM, Vastrup P, Wohlfahrt J, Andersen PK, Olsen J, Melbye M. Fever in pregnancy and risk of fetal death. Results from the better health for mother and child-project. *Ugeskr Laeger* 2004;166:53–6.

Antinori S, Gholami GH, Versaci C, Cerusico F, Dani L, Antinori M, et al. Obstetric and prenatal outcome in menopausal women: a 12-year clinical study. *Reprod Biomed Online* 2003;6:257–61.

Armand Zini, Jason M. Boman, Eric Belzile and Antonio Ciampi (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis *Human Reproduction* 23(12):2663-2668

Astolfi P, De Pasquale A, Zonta LA. Late paternity and stillbirth risk. *Hum Reprod.* 2004;19:2497–501. doi:10.1093/humrep/deh449.

Bellver J, Rossal LP, Bosch E, Zúñiga A, Corona JT, Meléndez F, et al. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril.* 2003;79:1136–40. doi:10.1016/S0015-0282 (03)00176-6.

Bellver J, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod Biomed Online* 2008;17:595–604.

Bernhard Steiner, Rahim Masood, Kaspar Rufibach, Dunja Niedrist, Oliver Kundert, Mariluve Riedel and Albert Schinzel. An unexpected finding: younger fathers have a higher risk for offspring with chromosomal aneuploidies. *European Journal of Human Genetics* 23, 466-472 (April 2015).

Bilge DEBELEÇ-BÜTÜNER , Gülten KANTARCI, MUTASYON , DNA HASARI , ONARIM MEKANİZMALARI VE KANSERLE İLİŞKİSİ, Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm, Ankara 35 (2) 149 - 170 , 2006 35 (2) 149 - 170 , 2006.

Bodri D, Colodron M, Vidal R, Galindro A, Durban M, Coll O. Prognostic factors in oocyte donation: an analysis through egg-sharing recipient pairs showing a discordant outcome. *Fertil Steril* 2007 Dec;88(6):1548-53. Epub 2007 Apr. 6.

Boe-Hanson GB, Fedder J, Ersboll AK and Christensen P (2006) The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 21(6):1576-1582

Borini A, Bianchi L, Violini F, Maccolini A, Cattoli M, Flamigni C. Oocyte donation program: pregnancy and implantation rates in women of different ages sharing oocytes from single donor. *Fertil Steril*. 1996;65:94–7.

Bradley J. Van Voorhis, M.D, *In Vitro Fertilization*, *N Engl J Med* 2007; 356:379-386 January 25, 2007 DOI: 10.1056/NEJMcp065743

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988;332:459–61. doi:10.1038/332459a0.

Brian W. Whitcomb, Renée Turzanski-Fortner, Kevin S. Richter, Simon Kipersztok, Robert J. Stillman, Michael J. Levy, Eric D. Levens, M.D. Contribution of male age to outcomes in assisted reproductive technologies. January 2011 Volume 95, Issue 1, Pages 147–151.

Brinkworth MH, Schmid TE. Effect of age on testicular germ cell apoptosis and sperm aneuploidy in MF-1 mice. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl*. 2003;2:103–9.

Budak E, Garrido N, Soares SR, Melo MA, Meseguer M, Pellicer A, et al. Improvements achieved in an oocyte donation program over a 10-year period: sequential increase in implantation and pregnancy rates and decrease in high-order multiple pregnancies. *Fertil Steril.* 2007;88:342–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.118.

Bulletti C, de Ziegler D. Uterine contractility and embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005;17:265–76. doi: 10.1097/01 .gco 0000169104 . 85128. 0e.

Bungum M, Humaida P, Spano M, Jepson K, Bungum L and Giwercman A (2004) The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI *Human Reproduction* 19 (6): 1401-1408

C.V. Steer, C.L. Mills, S.L. Tan, S. Campbell, R.G. Edwards: SHORT COMMUNICATION: The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme, *Hum. Reprod.* (1992) 7 (1): 117-119.

Camargos Md, Lobach VN, Pereira FA, Lemos CN, Reis FM, Camargos AF. Computer-assisted oocyte morphometry before ICSI: correlation of oocyte measurements with fertilization and embryo development. *Reprod Sci* 2012;19(3):306-11.

Cano F, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Effect of aging on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity. *Fertil Steril.* 1995;64:584–9.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305:609–13.

Carmen Rubi, Amparo Mercader¹, Pilar Alama, Ce'sar Liza'n, Lorena Rodrigo, Elena Labarta, Marco Melo, Antonio Pellicer, and Jose' Remohi'. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Human Reproduction*, Vol.25, No.9 pp. 2290–2297, 2010, Advanced Access publication on July 13, 2010 doi:10.1093/humrep/deq174.

Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec, J and Check ML (2005) Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Arch Androl*. 2005 Mar-Apr;51(2):121-4.

Cooper GM, Hausman RE. *The Cell*. 3rd Ed. ASM Press USA. 2004.
Sayfalar: 89-95, 139-157, 631-663.

Das M, Al-Hathal N, San-Gabriel M, Phillips S, Kadoch IJ, Bissonnette F, Holzer H, Zini A, de La Rochebrochard E, de Mouzon J, Thepot F, Thonneau P. French National IVF Registry (FIVNAT) Association: Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of in vitro fertilization in France. *Fertil Steril*. 2006;85:1420–4. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.11.040.

de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns J-P, Vermeesch JR (2007) What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridization (CGH). *European journal of pediatrics* 166:637-643.

Domenico Dell'Edera, Donatello Salvatore, Michele Benedetto and Annunziata A. Epifania , Domenico Dell'Edera, et al. Reports of Three Cases of Atypical Cystic Fibrosis with Azoospermia <http://dx.doi.org/10.19104/crcm.2015.108>.

Dominic Grün, Alexander van Oudenaarden, Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments, Volume 163, Issue 4, p799–810, 5 November 2015.

Dowdney L. Childhood bereavement following parental death. *J Child Psychology and Psychiatry* 2000;41:819–30.

Dulitski M, Soriano D, Schiff E, Chetrit A, Mashiach S, Seidman DS. Effect of very advanced maternal age on pregnancy outcome and rate of cesarean delivery. *Obstet Gynecol* 1998;92:935–9.

Dunson DB, Colombo B, Baird DD. Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod*. 2002;17:1399–403. doi:10.1093/humrep/17.5.1399.

Elvan OK, Seda DOĞAN, Müge KOVALI, Erbil DOĞAN, Bülent GÜLEKLİ , İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu Uygulanan Çiftlerde Erkek Yaşının Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesi Üzerine Etkisi , 2010;27:156-159.

Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, et al. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod*. 2003;18:447–54. doi:10.1093/humrep/deg107.

Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Childrearing ability and the provision of fertility services. *Fertil Steril* 2009;92:864–7.

Evans MI, Hume RF Jr, Polak S, Yaron Y, Drugan A, Diamond MP, et al. The geriatric gravida: multifetal pregnancy reduction, donor eggs, and aggressive infertility treatments. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:875–8.

Evenson D and Wixon R (2006) Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Biomed. Online* 12 (4): 466-472

Evenson DP, Wixon R (2005) Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA(R)). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Sep 1;207(2 Suppl):532-7

Fancsovits P, Tóthné ZG, Murber Á, Rigó J Jr, Urbancsek J. Importance of cytoplasmic granularity of human oocytes in in vitro fertilization treatments. *Acta Biol Hung* 2012;63(2):189-201.

Ferraretti AP, Magli MC, Kopcow L, Gianaroli L. Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome. *Hum Reprod* 2004;19:694–9.

Filho RM, Beletti ME, de Oliveira F. Ultrastructure of bovine sperm chromatin, *Microsc Res Tech.* 2015 Oct 30. doi: 10.1002/jemt.22593.

Fiorentino F (2012) Array comparative genomic hybridization: its role in preimplantation genetic diagnosis. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 24:203-209

Fisch H, Hyun G, Golden R, Hensle TW, Olsson CA, Liberson GL. The influence of paternal age on Down syndrome. *J Urol* 2003;169:2275–8.

Fischer MA, Willis J and Zini A (2003) Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology* 61(1):207-11

Ford WC, North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Golding J. Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod* 2000;15:1703–8. doi:10.1093/humrep/15.8.1703.

Frances Rice , Anita Thapar. Estimating the relative contributions of maternal genetic, paternal genetic and intrauterine factors to offspring birth weight and head circumference. *Early Hum Dev.* 2010 Jul; 86(7): 425–432.

doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.05.021

Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott RT Jr. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2008;90:97–103.

doi:10.1016/j.fertnstert. 2007.06.009.

Gallardo E, Simon C, Levy M, Guanes PP, Remohi J, Pellicer A. Effect of age on sperm fertility potential: oocyte donation as a model. *Fertil Steril* 1996; 66:260–264.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spano M. (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1409-17

Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C and Tesarik J (2005) Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 2005 20(1):226-230

Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):1-17. doi: 10.1152/physrev.00013.2015.

Guerin P, Matillon, C, Bleau G, Levy R and Menezo, Y (2005) Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2005 Sep;33(9):665-8.

Hakan Koyuncu, Sperm DNA hasarı tespit yöntemleri, *Türk Urol Sem* 2011; 2: 18-23.

Halvaei I, Ali Khalili M, Razi MH, Nottola SA. The effect of immature oocytes quantity on the rates of oocytes maturity and morphology, fertilization, and embryo development in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(8):803-10.

Hansen JP. 198: Older maternal age and pregnancy outcome: a review of the literature. *Obstet Gynecol Surv.* 1986;41:726–42. doi:10.1097/00006254-198611000-00024.

He B, Cheng JP, Pan Q, Chi Y, Huang TS, Mao XB, Qin J, Tan WH. *Zhonghua Nan Ke Xue*. Normal sperm morphology and the outcomes of routine in vitro fertilization. 2016 Jan;22(1):32-6. Chinese.

Henig, Robin Marantz (2004). *Pandora's Baby: How the First Test Tube Babies Sparked the Reproductive Revolution*. New York: Houghton Mifflin. ISBN 0-618-22415-7.

Henkel R, Maass G, Schuppe HC, Jung A, Schubert J, Schill WB. Molecular aspects of declining sperm motility in older men. *Fertil Navot D, Drews MR, Bergh PA, Guzman I, Karstaedt A, Scott RT Jr, et al.* Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril.* 1994;61:97–101.

Herder Lexikon der Biologie, 2004: Mutation

High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Jun;30(6):843-8. doi: 10.1007/s10815-013-0015-0. Epub 2013 Jun 1.

Hope T, Lockwood G, Lockwood M (June 1995). "Should older women be offered in vitro fertilisation?". *BMI* 310 (6992): 1455–6. DOI:10.1136/bmj.310.6992.1455.PMC 2549820. PMID 7613283. Isiah D Harris, MD, Carolyn Fronczak, Lauren Roth, MD, and Randall B Meacham, MD. Fertility and the Aging Male. *Rev Urol.* 2011; 13(4): e184–e190. http://www.bbc.com/turkce/haberler/2012/08/120823_older_dad.shtml

<http://www.coskunsimsir.com/ICSI-icsi-islemi-nedir>

http://www.thenewjerseyinfertilitytreatmentcenter.com/d_egg_retrieval.php

<http://www.webhatti.net/forum/konu/kromozomlardaki-degisiklikler.775406/>

<https://cs.wikipedia.org/wiki/Blastomera>.

Javier García-Ferreira, Daniel Luna, Lucy Villegas, Rocío Romero, Patricia Zavala, Roly Hilario, and Julio Dueñas-Chacón. High Aneuploidy Rates Observed in Embryos Derived from Donated Oocytes are Related to Male Aging and High Percentages of Sperm DNA Fragmentation Clin Med Insights Reprod Health. 2015; 9: 21–27. Published online 2015 Nov 11. doi: 10.4137/CMRH.S32769.

Jiang WJ, Jin F, Zhou LM. Zhonghua Nan Ke Xue. Values of the sperm deformity index, acrosome abnormality rate, and sperm DNA fragmentation index of optimized sperm in predicting IVF fertilization failure. 2016 Feb;22(2):147-52. Chinese.

Jo-Ann Johnson, Suzanne Tough. Delayed Child- Bearin. J Obstet Gynaecol Can 2012;34(1):80-93. Alain Ggnon. Evaluation of Prenatally Diagnosed Structural Congenital Anomalies. No 234 September 2009.

Joshua U., Klein, M.D., and Mark V. Sauer, M.D., Ethics in Egg Donation: Past, Present and Future.

K.C Humm and D. Sakkas. Role of increased male age in IVF and egg donation. Fertil Steril 2013;99:30-36.

Kang Liu, Ruizhe Zhao, Min Shen, Jiaxin Ye, Xiao Li, Yuan Huang, Lixin Hua, Zengjun Wang & Jie L . Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on Male infertility. Scientific Reports 5, Article number: 15548 (2015) doi:10.1038/srep15548.

Kara T, Katie F, Gothami F, Darren G, Dimitrios I. Multicolour detection of every chromosome as a means of detecting mosaicism and nuclear organisation in human embryonic nuclei. *Panminerva Med.* 2016 Mar 16.

Kathryn C. Humm and Denny Sakkas, Role of Increased Male Age in IVF and Egg Donation Outcomes, January 2013 issue of *Fertility and Sterility*.

Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril.* 2001;75:237–48.
doi:10.1016/S0015-0282(00)01679-4.

Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina D, Harlap S., Paternal age and spontaneous abortion, *Obstet Gynecol.* 2006 Aug;108(2):369-77.

Klonoff-Cohen HS, Natarajan L. The effect of advancing paternal age on pregnancy and live birth rates in couples undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:507–14.
doi:10.1016/j.ajog.2004.01.035.

Kocer A, Henry-Berger J, Noblanc A, Champroux A, Pogorelnik R, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Saez F, Johnson GD, Krawetz SA, Alvarez JG, Aitken RJ, Drevet JR, Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: Size matters., *Free Radic Biol Med.* 2015 Oct 25. pii: S0891-5849(15)01088-6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.419.

Kort DH, Gosselin J, Choi JM, Thornton MH, Cleary-Goldman J, Sauer MV. Pregnancy after age 50: defining risks for mother and child. *Am J Perinatol* 2012;29:245–50.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003;80:895–902.
doi:10.1016/S0015-0282(03)01116-6.

Le Ray C, Scherier S, Anselem O, Marszalek A, Tsatsaris V, Cabrol D, et al. Association between oocyte donation and maternal and perinatal outcomes in women aged 43 years or older. *Hum Reprod* 2012;27:896–901.

Leary S, Fall C, Osmond C, Lovel H, Campbell D, Eriksson J, Forrester T, Godfrey K, Hill J, Jie M, Law C, Newby R, Robinson S, Yajnik C. Geographical variation in relationships between parental body size and offspring phenotype at birth. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85(9):1066-79.

Len Leshin, MD, FAAP, Trisomy 21, 2003.

Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. (2008) Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis *Syst Biol Reprod Med*. May-Jun;54(3):111-25

Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A, Wyrobek AJ. Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet* 2001;69:1046–54.

Luna M, Finkler E, Barritt J, Bar-Chama N, Sandler B, Copperman AB, Grunfeld L. Paternal age and assisted reproductive technology outcome in ovum recipients. *Fertil Steril* 2009;92:1772–1775.

Lunde A, Melve KK, Gjessing HK, Skjaerven R, Irgens LM. Genetic and environmental influences on birth weight, birth length, head circumference, and gestational age by use of population-based parent-offspring data. *Am J Epidemiol*. 2007 Apr 1;165(7):734-41. Epub 2007 Feb 20.

Masakuni SUZUKI, Early days of *in vitro* fertilization and embryo transfer and future prospects for assisted reproductive technology, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2014 May 9; 90(5): 184–201., doi: 10.2183/pjab.90.184.

Mathews TJ, Hamilton BE. Mean age of mother, 1970–2000. *Natl Vital Stat Rep.* 2002;51:1–13.

McDowell S, Kroon B, Ford E, Hook Y, Glujovsky D, Yazdani A., Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Oct 28;10:CD010461. doi: 10.1002/14651858.CD010461.pub2.

McIntosh GC, Olshan AF, Baird PA. Paternal age and the risk of birth defects in offspring. *Epidemiology* 1995;6:282–8.

Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod.* 1990;5:586–92.

Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 2002;17:990–8. doi:10.1093/humrep/ 17.4.990.

Moskovtsev SI, Lecker I, Mullen, JB, Jarvi k, Willis J, White J and Lo KC (2009) Cause-specific treatment in patients with high sperm DNA damage resulted in significant DNA improvement. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 55(2):109-15

Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm survival: relationship to age-related sperm DNA integrity in infertile men. *Arch Androl.* 2007;53:29–32. doi:10.1080/01485010600908330.

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

Munne S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2006;12:234–53.

Noyes N, Hampton BS, Berkeley A, Licciardi F, Grifo J, Krey L. Factors useful in predicting the success of oocyte donation: a 3-year retrospective analysis. *Fertil Steril*. 2001;76:92–7. doi:10.1016/S0015-0282(01)01823-4.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson and Thompson "Genetics in Medicine", 6th Ed. W.B Saunders Company. 2001. Sayfalar:1-31, 51-77,135-165, 289-332.

Pampalona J, Roscioli E, Silkworth WT, Bowden B, Genescà A, Tusell L, Cimini D. Chromosome Bridges Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment throughout Mitosis and Rarely Break during Anaphase. *PLoS One*. 2016 Jan 19;11(1):e0147420. doi: 10.1371/journal.pone.0147420. eCollection 2016.

Paulson RJ, Boostanfar R, Saadat P, Mor E, Tourgeman DE, Slater CC, et al. Pregnancy in the sixth decade of life: obstetric outcomes in women of advanced reproductive age. *JAMA* 2002;288:2320–3.

Paulson RJ, Milligan RC, Sokol RZ. The lack of influence of age on male fertility. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184:818–22. doi: 10.1067 /mob. 2001 .113852.

Paulson RJ, Thornton MH, Francis MM, Salvador HS. Successful pregnancy in a 63-year-old woman. *Fertil Steril* 1997;67:949–51.

Paulson RJ, Milligan RC, Sokol RZ. The lack of influence of age on male fertility. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Apr;184(5):818-22; discussion 822-4.

Pfeifer S, Goldberg J, Thomas M, Pisarska M, Widra E, Licht M, Sandlow J, Collins J, Cedars M, Rosen M, Vernon M, Davis O, Dumesic D, Gracia C, Catherino W, Odem R, Rebar R, Barbera AL., The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline, *Fertil Steril*. 2013 Mar 1;99(3):673-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.049. Epub 2013 Feb 1.

Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. Bioessays. 2000;22:423–30.

Prof Dr. İlhan Sezgin, Tıbbi Genetik, KROMOZOMLAR VE ANOMALİLERİ
Prof.Dr.İlhan Sezgin TIBBİ GENETİK 28.3.2006,
(<http://slideplayer.biz.tr/slide/3103118/>)

Prof. Dr. Ateş KADIOĞLU, 2010, WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi, BEŞİNCİ BASIM,Çeviri Editörü: ISBN: 978-975-00112-4-5.

Qinghua Shi, Randall W. King, Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines, *Nature* 437, 1038-1042 (13 October 2005) | doi:10.1038/nature03958; Received 14 April 2005; Accepted 22 June 2005

R. Beguería, D. Garcí'a, A. Obradors, F. Poisot, R. Vassena and V. Vernaev, Paternal age and assisted reproductive outcomes in ICSI donor oocytes: is there an effect of older fathers?, *Human Reproduction*, Vol.29, No.10 pp. 2114–2122, 2014.

R. Garcia-Cruz, A. Casanovas, M. Brieño-Enríquez, P. Robles, I. Roig, A. Pujol, L. Cabero, M. Durban, and M. Garcia Caldé s, Cytogenetic analyses of human oocytes provide new data on non-disjunction mechanisms and the origin of trisomy 16, *Human Reproduction*, Vol.25, No.1 pp. 179–191, 2010. Advanced Access publication on October 14, 2009 doi:10.1093/humrep/dep347.

Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, et al. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:1026–32.

ReynoldsMA, Schieve LA,Martin JA, Jeng G,Macaluso M. Trends in multiple births conceived using assisted reproductive technology, United States, 1997–2000. *Pediatrics*. 2003;111:1159–62.

Rink BD, Norton ME, Screening for fetal aneuploidy, *Semin Perinatol*. 2015 Dec 24. pii: S0146-0005(15)00160-3. doi: 10.1053/j.semperi.2015.11.006

Rolf Knippers (1997). *Molekulare Genetik*, Thieme, ISBN 3-13-477007-5

Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A., Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development, *Hum Reprod*. 1998 Dec;13 Suppl 4:11-9.

Salihu HM, Shumpert MN, Slay M, Kirby RS, Alexander GR. Childbearing beyond maternal age 50 and fetal outcomes in the United States. *Obstet Gynecol* 2003;102:1006–14.

Sariibrahim B, Cogendez E, Kayatas S, Asoglu MR, Koleli I, Bakir L. Does Kruger's strict criteria have prognostic value in predicting ICSI clinical results? *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2013;40(2):257-60, WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen 5th ed 2010).

Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA. Oocyte donation to women of advanced reproductive age: pregnancy results and obstetrical outcomes in patients 45 years and older. *Hum Reprod* 1996;11:2540–3.

Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA. Pregnancy after 50: application of oocytedonation to women after natural menopause. *Lancet* 1993;341:321–3.

Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod*. 2007;22:180–7. doi:10.1093/humrep/del338.

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;82:378–83. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.12.039.

Seng SW, Yeong CT, Loh SF, Sadhana N, Loh SK (March 2005). "In-vitro fertilisation in women aged 40 years and above" (PDF). *Singapore Med J* 46 (3): 1326.PMID 15735878.

Seyffert W (2003). Genetik, 2. Auflage, Spektrum, ISBN 3827410223

Sheena E.M. Lewis, The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management, Volume 18, Issue 2, June 2013, Pages 78–82, doi:10.1016/j.mefs.2013.01.010.

Sheffer-Mimouni G, Mashiach S, Dor J, Levran D, Seidman DS. Factors influencing the obstetric and perinatal outcome after oocyte donation. *Hum Reprod* 2002;17:2636–40.

Shrim A, Levin I, Mallozzi A, Brown R, Salama K, Gamzu R, Almog B. Does very advanced maternal age, with or without egg donation, really increase obstetric risk in a large tertiary center?. *J Perinat Med*. 2010 Nov;38(6):645-50. doi: 10.1515/JPM.2010.084. Epub 2010 Aug 13.

Sills ES, Fryman JT, Perloe M, Michels KB, Tucker MJ (2004) Chromatin fluorescence characteristics and standard semen analysis parameters: correlations observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation. *J Obstet Gynaecol*. 2004 Jan;24(1):74-7.

Simmons, D. Peter Snustad, Michael J. (2006). *Principles of genetics* (4. ed.). New York, NY [u.a.]: Wiley. ISBN 9780471699392

Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA doublestrand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*. 2003;80:1420–30. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.04.002.

Sipos A, Rasmussen F, Harrison G, Tynelius P, Lewis G, Leon DA, et al. Paternal age and schizophrenia: a population based cohort study. *BMJ* 2004;329: 1070.

Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol* 2005;161:816–23. doi:10.1093/aje/kwi097.

Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum Reprod*. 2006;21:2868–75. doi:10.1093/humrep/del250.

Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I and Castro A (2006) Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Human Reprod*. 21(4):986-993

Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simón C, Remohí J, et al. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4399–404. doi:10.1210/jc.2004-2252.

Spandorfer SD, Avrech OM, Colombero LT, Palermo GD, Rosenwaks Z. Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:334–8. doi:10.1093/humrep/13.2.334.

Steiner AZ, Paulson RJ. Motherhood after age fifty: An evaluation of parenting stress and physical functioning. *Fertil Steril* 2007;87:1327–32.

Steiner AZ, Paulson RJ. Parenting issues among women of advanced reproductive age: Does age really matter? *Fertil Steril* 2006;85:S8.

Sun JX, Helgason A, Masson G, Ebenesersdóttir SS, Li H, Mallick S, Gnerre S, Patterson N, Kong A, Reich D, Stefansson K. A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat Genet*. 2012 Oct;44(10):1161-5. doi: 10.1038/ng.2398. Epub 2012 Aug 23.

Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C and Borini A (2007) Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 14(6):746-57.

Teixeira DM, Barbosa MA, Ferriani RA, Navarro PA, Raine-Fenning N, Nastri CO, Martins WP. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jul 25;7:CD010167. doi: 10.1002/14651858.CD010167.pub2.

Toner JP (2002). "Progress we can be proud of: U.S. trends in assisted reproduction over the first 20 years.". *Fertil Steril*. 78 (5): 943–50. doi:10.1016/s0015-0282(02)03769-x.PMID 12413976.

Toner JP, Grainger DA, Frazier LM. Clinical outcomes among recipients of donated eggs: an analysis of the U.S. national experience, 1996–1998. *Fertil Steril* 2002;78:1038–45. doi:10.1016/ S0015-0282(02)03371-X.

Tunc O, Thompson J and Tremellen K (2009) Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online* 18(6):761-8.

Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online*. 2007;15:514–9.

Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, Kundu S, Pal M, Bhattacharyya AK and Agarwal A (2009) Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia* 41(4):207-15

Vincent-Rohfritsch A, Le Ray C, Anselem O, Cabrol D, Goffinet F. Pregnancy in women aged 43 years or older: maternal and perinatal risks. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2012;41:468–75.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2004;81:1289–95. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.09.063.

Whitcomb BW, Turzanski-Fortner R, Richter KS, Kipersztok S, Stillman RJ, Levy MJ, Levens ED. Contribution of male age to outcomes in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2011;95:147–151.

Wilding M, Di Matteo L, D'Andretti S, Montanaro N, Capobianco C, Dale B. An oocyte score for use in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2007;24(8):350-8.

Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn*. 2002 Jun;22(6):512-8.

World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.

www.tupbebek-genetik.com/laboratuvar-yontemleri/androloji-laboratuvar%C4%B1/.MemorialIVFMerkezi, Androloji laboratuvarı).

Wyrobek, A J.; Eskenazi, B; Young, S; Arnheim, N; Tiemann-Boege, I; Jabs, E W.; Glaser, R L.; Pearson, F S.; Evenson, D. Advancing Age Has Differential Effects on DNA Damage, Chromatin Integrity, Gene Mutations, and Aneuploidies in Sperm. October 2006 - Volume 61 - Issue 10 - pp 648-649. doi:10.1097/01.ogx.0000238646.91712.3e.

Yan J, Wu K, Tang R, Ding L, Chen ZJ., Effect of maternal age on the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET), *Sci China Life Sci*. 2012 Aug;55(8):694-8. doi: 10.1007/s11427-012-4357-0. Epub 2012 Aug 30.

Yang Q, Wen SW, Leader A, Chen XK, Lipson J, Walker M. Paternal age and birth defects: how strong is the association? Hum Reprod. 2007;22:696–701. doi:10.1093/humrep/del453.

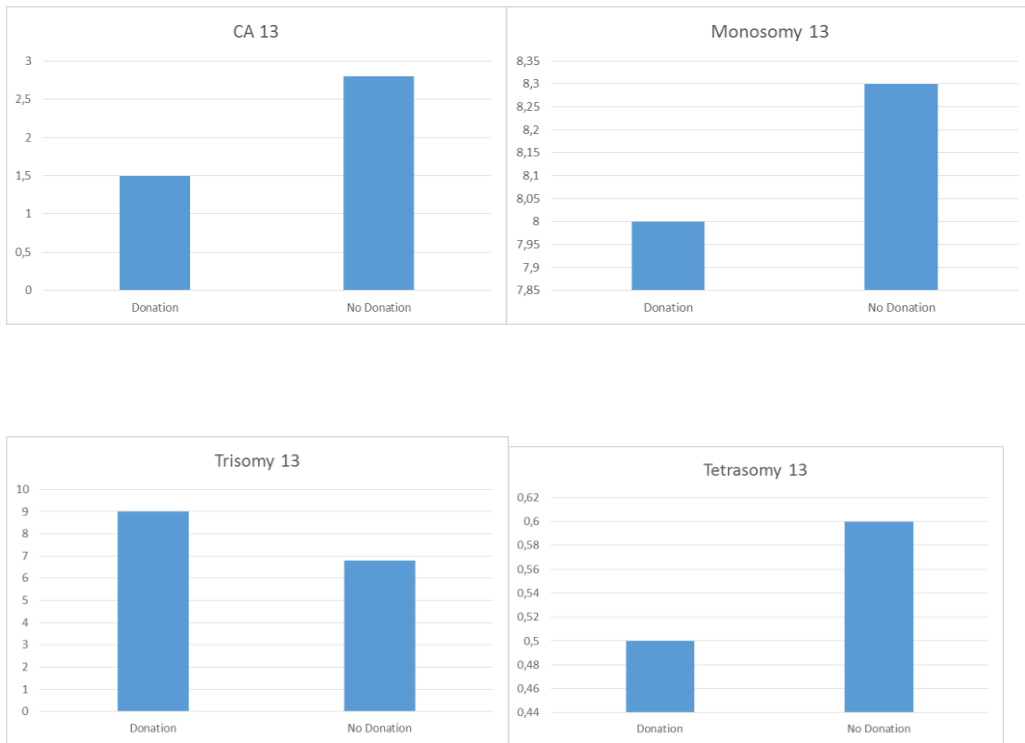
Yixuan Wu, Xiangjin Kang, Haiyan Zheng, Haiying Liu, Jianqiao Liu, Effect of Paternal Age on Reproductive Outcomes of In Vitro Fertilization, July 26, 2015.

Young ID. Medical Genetics, 1st Ed. Oxford University Press. 2005. Sayfalar: 1-95, 112-113, 117-133, 187-205.

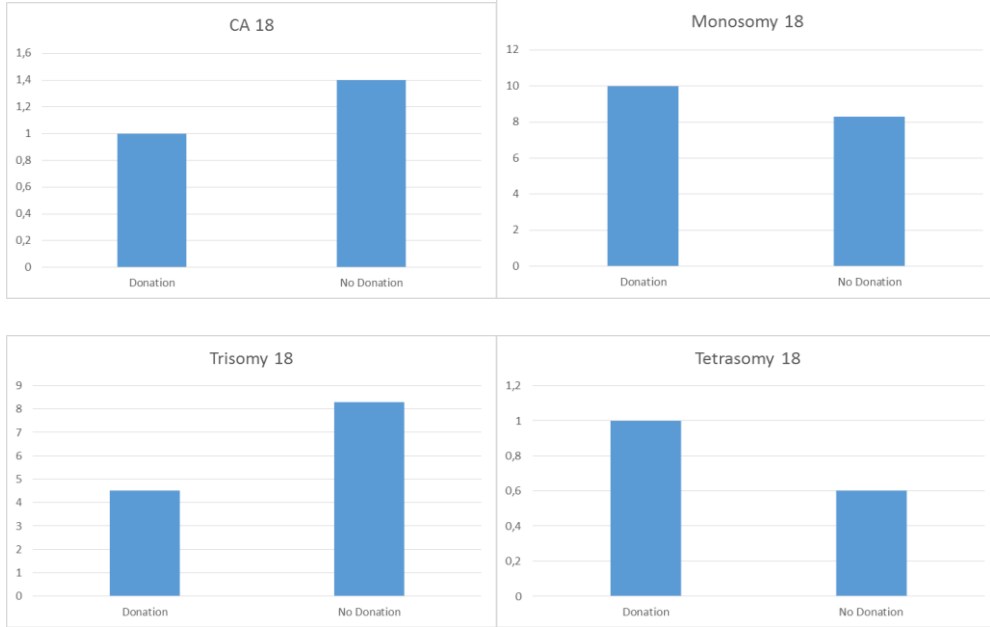
EKLER

EK 1.1 Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda aneuploidi oranlarının karşılaştırılması.

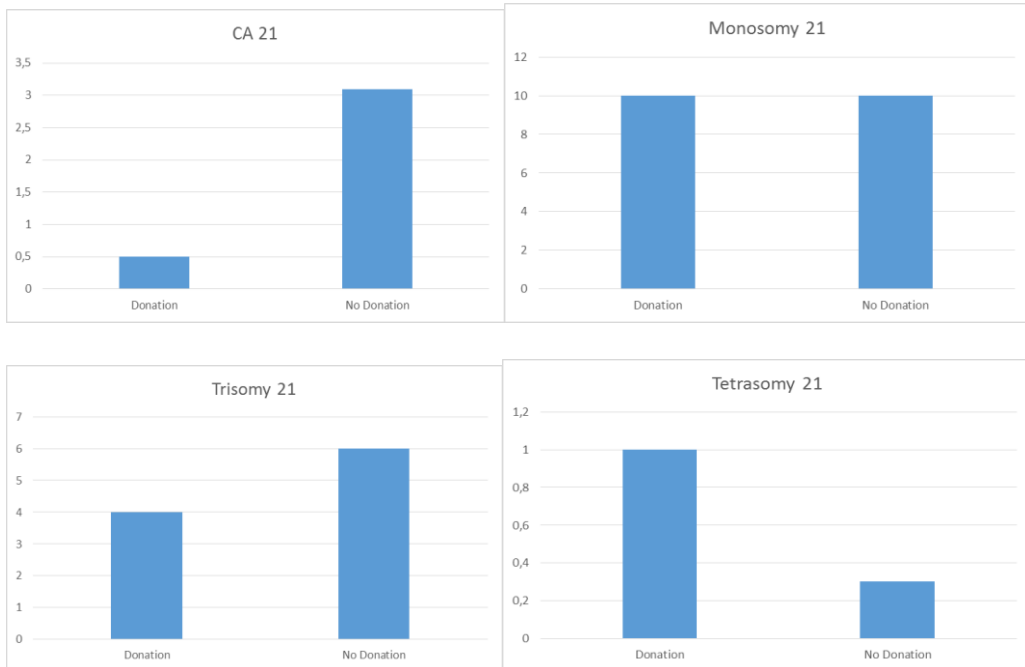
Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda CA13, Monozomi 13, Trizomi 13, Tetrazomi 13 sonuçlarının gösterilmesi



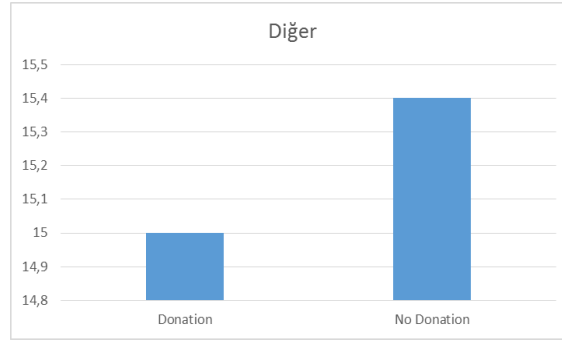
Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda CA18, Monozomi 18, Trizomi 18, Tetrazomi 18 sonuçlarının gösterilmesi



Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda CA21, Monozomi 21, Trizomi 21, Tetrazomi 21 sonuçlarının gösterilmesi



Donasyon olan ve donasyon olmayan hastalarda cinsiyet kromozomlarında normal sonuçlarının gösterilmesi



EK 1.2 Embriyo gelişiminde oositlerin durumsal incelenmesi formu.

TOPLAM OOSİT	1. GÜN	2.GÜN	3. GÜN	5.GÜN
	2 PN	KLİVAJ	ERKEN EMBRIYO	BLASTOKİST
METAFAZ 2				
METAFAZ 1				
GERMİNAL VEZİKÜL				
DEJENERE				
ZONA FREE				
EZ				