



T.C.

UFUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MOZAİK VE ÖPLOİD EMBRİYOLAR ARASINDA
FRAGMENTASYON, KLİVAJ SÜRECİ, BLASTULASYON VE
MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BELKIS NURDAN HELVACIOĞLU

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. EMRE GÖKSAN PABUÇCU

ANKARA

2023

T.C.
UFUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MOZAİK VE ÖPLOİD EMBRİYOLAR ARASINDA
FRAGMENTASYON, KLİVAJ SÜRECİ, BLASTULASYON VE
MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BELKIS NURDAN HELVACIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. EMRE GÖKSAN PABUÇCU

ANKARA

2023

BİLDİRİM

Hazırladığım tezin/raporun tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin/raporumun kağıt ve elektronik kopyalarının Ufuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullardan birine göre saklanmasına izin verdiğimi onaylarım:

(+) Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

() Tezim/Raporum sadece Ufuk Üniversitesi yerleşkelerinde erişime açılabilir.

() Tezimin/Raporumun yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvurmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı heryerden erişime açılabilir.

Tarih ve İmza

Belkıs Nurdan HELVACIOĞLU

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimi ve tez hazırladığım dönemde bilgi,birikim ve tecrübesiyle bana her daim yol gösteren, mesleki ve etik olgulara yaklaşımı, araştırmacı kişiliğıyle kendilerini her zaman örnek alacağım değerli Doç. Dr. Emre Göksan PABUÇCU ve Prof. Dr. Recai PABUÇCU hocalarıma,
Tez araştırmamda hiçbir desteğini esirgemeyen değerli Emb. Cem SANCAR, Emb. Hüseyin GÜNEŐ, Emb. Tuğçe DİLBER, Emb. Fulya őAHİN,
Emb. Ekrem AKSU'ya sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Belkıs Nurdan HELVACIOĞLU

ÖZET

HELVACIOĞLU Belkıs Nurdan. Mozaik ve Öploid Embriyolar Arasında Fragmentasyon, Klivaj Süreci, Blastulasyon ve Morfolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması Yüksek Lisans Tezi, Ankara,2023.

Araştırmamızın amacı; Mozaik embriyoların , sağlıklı-öploid embriyolardan farklı olarak nasıl bölünme özellikleri gösterdiği ve bunların kayıt altına alınması, böylece PGT-A için biyopsi alınmadan önce, muhtemel bölünme sorunlarının tespiti ve böylece anormal bölünme özelliği gösteren embriyoların, transfer işlemi için daha geri planda seçilmeleri konusunda fikir sahibi olunmasıdır.

Bu çalışma, 2019-2023 yılları arasında Centrum Klinik Tüp Bebek Merkezi' nde yapılmış retrospektif, veri tarama çalışmasıdır. Analize dahil edilme kriterleri, PGT-A işleminden geçmiş popülasyon olmak üzere, 38 yaş üzeri kadınlar, tekrarlayan erken gebelik kaybı olanlar (>3) ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olanlar şeklinde tanımlanmıştır.

Araştırmamızda, öploid, mozaik ve anöploid sonuç almış embriyoların 3. gün ve 5. gün kaliteleri karşılaştırılmıştır. Böylelikle farklı PGT-A sonuçları alan embriyoların gelişimsel özelliklerinin arasında transfer edilene kadar olan süreçte anlamlı bir fark olup olmadığını görmeyi amaçladık.

Beşinci gün blastokist aşamasındaki embriyolardan biyopsi alınarak genetik laboratuvarlarına gönderilmiş olup Preimplantasyon Genetik Test sonuçlarına göre öploid, mozaik ve anöploid embriyolar gruplanmıştır.

Genetik olarak farklı sonuçlar almış bu embriyoların 3. gündeki hücre sayılarında bir farklılık çıkmasını bekleyebildik fakat çalışmamızda bu açıdan anlamlı bir farka rastlamadık.

3. Gün embriyolarında rastlayabileceğimiz fragmentasyon dediğimiz, hücreler bölünürken birikmekte olan sitoplazma artıkları yönünden embriyoları incelediğimizde, anöploid embriyoların bu konuda daha dezavantajlı olduğunu gördük. Yine mozaik embriyoları incelediğimizde bunların tıpkı öploid embriyolar gibi fragmentasyon

oranları açısından anöplöid embriyolardan daha düşük seviyede olduğu görölmüştür. Dolayısıyla fragmantasyon oranları açısından öplöid ve mozaik embriyoların anöplöid embriyolara göre daha avantajlı olduğu söylenebilir.

Öplöid, mozaik ve anöplöid embriyo gruplarının 5. gün kaliteleri, Grade 1: Expanded blastosist ve üzerinde gelişim gösteren embriyolar, Grade 2: Full blastosist, Grade 3: Early blastosist, Grade 4:Kavitasyon embriyo olmak üzere derecelendirildi. Bu derecelendirmeye göre yapılan çalışmada, mozaik embriyoların 5. gün embriyo kalitesi açısından öplöid embriyolarla anlamlı bir farkı olmadığı, anöplöid embriyoların ise öplöid embriyolardan daha dezavantajlı olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır.Bu konu hakkında daha fazla sayıda randomize çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler; Fertilizasyon, PGT-A, Mozaik Embriyo, Öplöid Embriyo, Anöplöid Embriyo, Embriyo Kalitesi, Fragmantasyon.

ABSTRACT

HELVACIOĞLU Belkıs Nurdan. Fragmentation Behind Mosaic and Euploid Embryos, Cleavage Process, Blastulation and Comparison of Morphological Characteristics Master Thesis, Ankara, 2023.

The aim of our research; Unlike healthy-euploid embryos, mosaic embryos

how it exhibits cleavage properties and their recording so that PGT-A

detection of possible cleavage problems and thus abnormal

Embryos showing dividing characteristics are selected in the background for the transfer process to have an idea about it.

This study was carried out at Centrum Clinic IVF Center between 2019-2023.

It is a retrospective data review study. Inclusion criteria from the PGT-A process women over 38 years of age, including the previous population, recurrent early pregnancy loss (>3) and those with recurrent implantation failure.

In our study, the quality of the embryos with euploid, mosaic and aneuploid results on the 3rd and 5th days were compared. Thus, we aimed to see whether there is a significant difference between the developmental characteristics of embryos with different PGT-A results in the process until transfer.

On the fifth day, biopsies were taken from the embryos at the blastocyst stage and sent to the genetics laboratories, and euploid, mosaic and aneuploid embryos were grouped according to the Preimplantation Genetic Test results.

We could have expected a difference in the number of cells on day 3 of these embryos that had genetically different results, but we did not find a significant difference in this respect in our study.

When we examined the embryos in terms of cytoplasm residues accumulating while the cells were dividing, we saw that aneuploid embryos were more disadvantageous in this

regard. When we examined mosaic embryos again, it was seen that they were at a lower level than aneuploid embryos in terms of fragmentation rates, just like euploid embryos. Therefore, it can be said that euploid and mosaic embryos are more advantageous than aneuploid embryos in terms of fragmentation rates.

The 5th day quality of euploid, mosaic and aneuploid embryo groups were graded as Grade 1: Expanded blastocyst and embryos developing above, Grade 2: Full blastocyst, Grade 3: Early blastocyst, Grade 4: Cavitation embryo. In the study conducted according to this grading, it was concluded that mosaic embryos did not differ significantly from euploid embryos in terms of embryo quality on the 5th day, and that aneuploid embryos were more disadvantageous than euploid embryos. More randomized studies are needed on this subject.

Keywords; Fertilization, PGT-A, Mosaic Embryo, Euploid Embryo, Aneuploid Embryo, Embryo Quality, Fragmentation.

Keywords; Mosaic, Euploid, Aneuploid, ART, Blastocyst, Fragmentation,
Cleavage

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.İNFERTİLİTE TANIMI.....	2
2.2.İNFERTİLİTE EPİDEMİYOLOJİSİ.....	2
2.3.ANÖPLOİDİ.....	3
2.4.MOZAİSİZM.....	5
2.5.PGT.....	8
2.5.1.PGT-M (MONOGENİK).....	9
2.5.2.PGT-SR (YAPISAL).....	10
2.5.3.PGT-A.....	10
2.6.MOZAİK EMBRİYOLARIN TEŞHİSİ.....	15
2.7.MOZAİK EMBRİYO İNSİDANSI.....	16
3.MATERYAL VE METOD.....	18
3.1.ÇALIŞMANIN DİZAYNI.....	18
3.2. Ejekülat ile Sperm Alma ve Hazırlama İşlemi.....	20
3.3.1 Oosit Toplama (OPU) İşlemi.....	21
3.3.2. Denüdasyon İşlemi.....	21
3.4. ICSI (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu).....	22

3.5. Fertilizasyon Kontrolü.....	22
3.6.Klivaj Dönemi Sınıflandırılması.....	23
3.7. 4.Gün ve Blastokist Evresi Değerlendirmesi.....	24
3.8.Trofoektoderm Biyopsisi.....	27
3.9.Verilerin Analizi.....	28
4.BULGULAR.....	29
5.TARTIŞMA.....	33
6.KAYNAKÇA.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİN

DSÖ/WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ESHRE : Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği

ICM : İç Hücre Kitlesi

ICSI : İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IVF : İn vitro fertilizasyon

OPU : Folikül Aspirasyonu

PB : Polar Body

PCOS : Polikistik Over Sendromu

PN : Pronükleus

TE : Trofoektoderm

TESA/TESE : Testiküler Sperm Aspirasyonu/Testiküler Sperm

Ekstraksiyonu

VKI : Vücut Kütle İndeksi

YÜT/ÜYT/ART : Yardımlı Üreme Teknikleri/Üremeye Yardımcı Teknikler

ZP : Zona Pellusida

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

TABLOLAR VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil I: Embriyolarda Anöploidi Orijinleri.....	4
Şekil II: Mozaisizm Çeşitleri.....	6
Şekil III: Mozaisizm Oranları İle Transfer Sonuçları Arasındaki İlişki..	17
Şekil IV: Trofoektoderm Biyopsisi.....	27
Tablo 1: ESHRE 2011 konsensusa göre: 3. gün embriyo skorlama sistemi	23
Tablo 2: ESHRE 2011 konsensusa göre: 4. gün embriyo skorlaması.....	24
Tablo 3: Blastokist gelişme aşaması – genişleme ve hatching	25
Tablo 4: İç hücre kütlesi (ICM) skoru veya kalitesi	26
Tablo 5: Trofektoderm (TE) skoru veya kalitesi	26
Tablo 6: Sosyo Demografik Özelliklere İlişkin Betimsel Sonuçlar.....	30
Tablo 7: 3 Grup Embriyonun Bölünme Dinamikleri Sonuçları.....	31

1.GİRİŞ

Kromozomal anöploidiler, insanlarda sıklıkla spontan düşüklere yol açan yaygın olarak tanınan genetik bozukluklardır. Preimplantasyon genetik tarama, erken embriyolarda kromozomal anöploidileri tespit etmek için kullanılır(1). Aynı zigottan köken almasına rağmen, tüm embriyonik hücreler aynı kromozomal tamamlayıcıları paylaşmaz. Embriyo gelişimi sırasındaki mitotik hatalar kromozomal olarak farklı hücre popülasyonlarına neden olabilir; bunlara mozaik embriyolar denir(2). Mozaik transferlerin sonuçlarını değerlendirirken, öploid embriyolar mevcutken (belki de güçlü bir cinsiyet tercihi olmadıkça) neredeyse hiçbir hastanın veya klinisyenin tahmin edilen bir mozaik embriyoyu transfer etmeyi gönüllü olarak seçmediğini anlamak önemlidir. Hala biraz tartışmalı olsa da, öploid embriyolar arasında seçim yaparken embriyo morfolojisinin öngörücü bir rolü olduğu görülmektedir(3). Ayrıca, seçilebilecek birden fazla öploid embriyo içeren döngülerin başarı şansı daha yüksek olabilir(4). Bu nedenle, bir mozaik embriyo transfer edildiğinde, genellikle kapsamlı danışmanlıktan sonra ve IVF döngüsü (veya döngüleri) öploid embriyolarla sonuçlanmadığı veya hasta öploid embriyolarını transfer ederken gebe kalamadığı için yapılır(5).Bu nedenle bu çalışma, mozaik embriyoları saptamak,bunların blastokiste gidiş oranlarının,klivaj süreçlerinin, fragmentasyon oranlarının ve morfolojik özelliklerinin öploid embriyolara göre farklılıklarını gözlemlemeyi böylece mozaik embriyolar ile sağlıklı gebelik elde edilmesi hakkında bilgi edinmeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE TANIMI

İnfertilite, bir yıl boyunca herhangi bir korunma yöntemi kullanmaksızın düzenli cinsel ilişkide bulunulduğu halde gebeliğin olmaması durumudur. İnfertilite, 'primer infertilite' (daha önce hiç gebelik oluşmaması) ve 'sekonder infertilite' (öncesinde gebelik elde edilmiş fakat son 1 yılda gebelik elde edilmemiş) olarak iki başlıkta incelenebilir (6).

Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15'ini infertildir. Doğum kontrol yöntemleri kullanmayan fertil çiftlerin % 5 'si ilk üç ay içinde, %72'si altı ay içinde ve % 85'i bir yıl içinde gebe kalabilmektedir (7).

2.2. İNFERTİLİTE EPİDEMİYOLOJİSİ

Sağlıklı genç çiftler için üreme döngüsü başına gebelik olasılığı yaklaşık %20 ila %25'tir. Kümülatif gebe kalma olasılıkları ilk 6 ay içinde %60, ilk 1 yıl içinde %84 ve doğurganlık odaklı düzenli cinsel ilişkinin ikinci yılında ise %92'dir. Birçok çalışmada farklı infertilite nedenleri bildirilmiştir. Literatürde en sık erkek faktör infertilitesi (sperm anormallikleri gibi), kadın faktör infertilitesi (ovulatuvar disfonksiyon ve tubal patoloji gibi) kombine kadın ve erkek faktör infertilitesi ve açıklanamayan infertilite gibi nedenler görülmektedir (8)

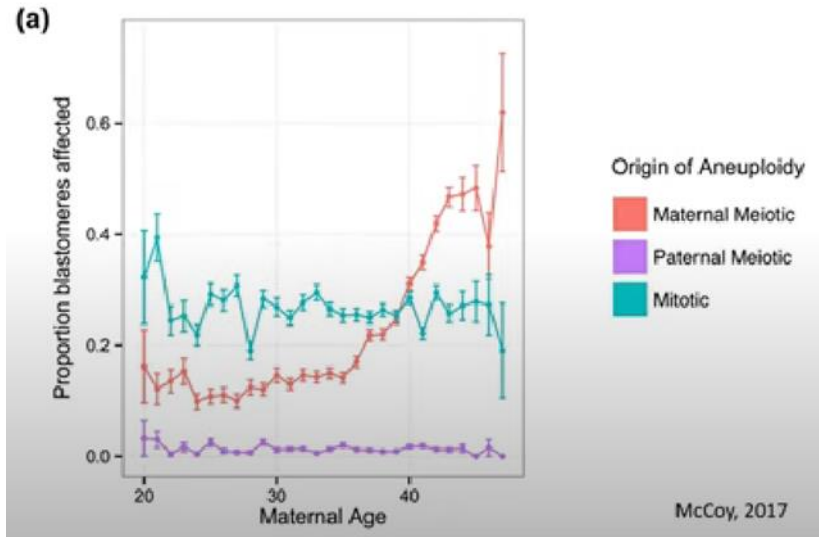
Üreme tıbbındaki hızlı ilerleme ve infertilite yöntemi ile edinilen deneyimler sayesinde, infertil çiftler için daha geniş tedavi seçenekleri mevcut hale gelmiştir. Bunlar tıbbi (ovulasyon indüksiyonu tedavisi), cerrahi, (laporoskopi ve histeroskopi) ve IVF/ICSI, Intra Uterin İnseminasyonu (IUI) gibi çeşitli yardımcı üreme teknikleri ile tedavileridir.

2.3. ANÖPLOİDİ

Mayoz, gametogenezdeki tanımlayıcı olaylardan biridir. Erkek ve dişi germ hücrelerinin her ikisi de, gametlerin ploidisini azaltmak ve böylece döllenmeden sonra türün ploidisini korumak için gelişimleri sırasında bir tur mayotik hücre bölünmesine tabi tutulur (9). Embriyolar, yirmi iki otozomun her birinin bir kopyasını ve her bir ebeveynden bir cinsiyet kromozomunu miras almalıdır ve anöploidi, bu kromozomlardan herhangi birinin çok fazla veya çok azının miras alınmasını içerebilir. Bir otozomun (otozomal monozomi) yalnızca bir kopyasını miras alan çoğu anöploid embriyo, ciddi anormallikler geliştirir ve hamileliğin klinik olarak tanınmasından önce ölür. Bir otozomun fazladan bir kopyasının kalıtılması (otozomal trizomi) ayrıca ciddi gelişimsel anormalliklerle ilişkilidir ve tüm düşüklerin yaklaşık üçte birini oluşturur. Bazı otozomal trizomiler ve bazı cinsiyet kromozomu anöploidileri insanlarda doğumla uyumludur. Down sendromunun nedeni olan Kromozom 21 trizomi, canlı doğumları etkileyen açık ara en sık görülen anöploididir (10). Trizomik ve monozomik (anöploid) embriyolar, insan gebeliklerinin en az %10'unu oluşturur ve üreme ömürlerinin sonuna yaklaşan kadınlar için insidans %50'yi geçebilir. Anöploidiye yol açan hatalar neredeyse her zaman oositte meydana gelir, ancak yoğun araştırmalara rağmen altta yatan moleküler temel belirsizliğini korumuştur.(10).

İnsan preimplantasyon embriyolarındaki kromozomal anormalliklerin etiyolojisi çok yönlüdür. Hatalar oositten, spermden veya embriyogenezin altında yatan mitotik bölünmeler sırasında ortaya çıkabilir (11,12). Mayotik olarak türetilen anormallikler genel olarak tüm embriyonik hücreleri eşit şekilde etkilerken, post-zigotik hatalar mozaikliğe, yani tek bir embriyo içinde kromozomal olarak farklı hücrelerin varlığına yol açar (12). Mozaik embriyolar hem öploid hem de aneuploid hücreleri barındırabilir (öploid/anöploid mozaikler) veya tamamen anormal hücre popülasyonlarından oluşabilir (anöploid mozaikler). Haploid, diploid ve poliploid hücrelerin herhangi bir kombinasyonunu içeren ploidi mozaikler, gelişimin hem bölünme hem de blastosist aşamalarında da gözlemlenmiştir (11). Özellikle bazı poliploid varyasyonlar, implantasyon sırasında trofoblast farklılaşmasının normal bir özelliğini oluşturur (13).

Şekil I: Embriyolarda Anöploidi Orijinleri (53)



2.4. MOZAİSİZM

Preimplantasyon embriyolarındaki anöploidilerin büyük çoğunluğu, özellikle anne kaynaklı olmak üzere mayotik hatalardan kaynaklansa da, kromozomal olarak farklı hücre popülasyonları ile sonuçlanan erken embriyo gelişiminin tüm aşamalarında kusurlu mitoz oluşabilir bunlar, farklı hücrelere sahip embriyolar olarak tanımlanan mozaik embriyolar olarak tanımlanır. Mozaikliğin kökeni, mitoz sırasında homolog kromozomların anafaz gecikmesi ve kromozom ayrılmaması nedeniyle ayrılamaması ile ilişkilendirilebilir (54). Diğer nedenler, DNA çoğaltma (amplifikasyon), hücre füzyonu, çok kutuplu bölünmeler veya kusurlu hücre döngüsü kontrol noktalarıdır.(55).

Blastomer fragmentasyonu ve mikronükleus oluşumu ayrıca insan embriyolarında mozaikliğin varlığı ile ilişkilendirilmiştir (56).

Genetik bir durum, bazı çiftlerde mozaikçilik riskini artırabilir ve varsayılan mitotik kaynaklı anöploidi ile maternal genomların 4. kromozomundaki bağlantılı genetik varyantlar arasındaki ilişkiyi tanımlayabilir. Bu ilişkili bölge , merkezci duplikasyonda iyi karakterize edilmiş bir rol oynayan ve küçük düzensizlikler üzerine mitotik sadakati değiştirme yeteneğine sahip bir aday gen, Polo benzeri kinaz 4 (PLK4) içerir (57).

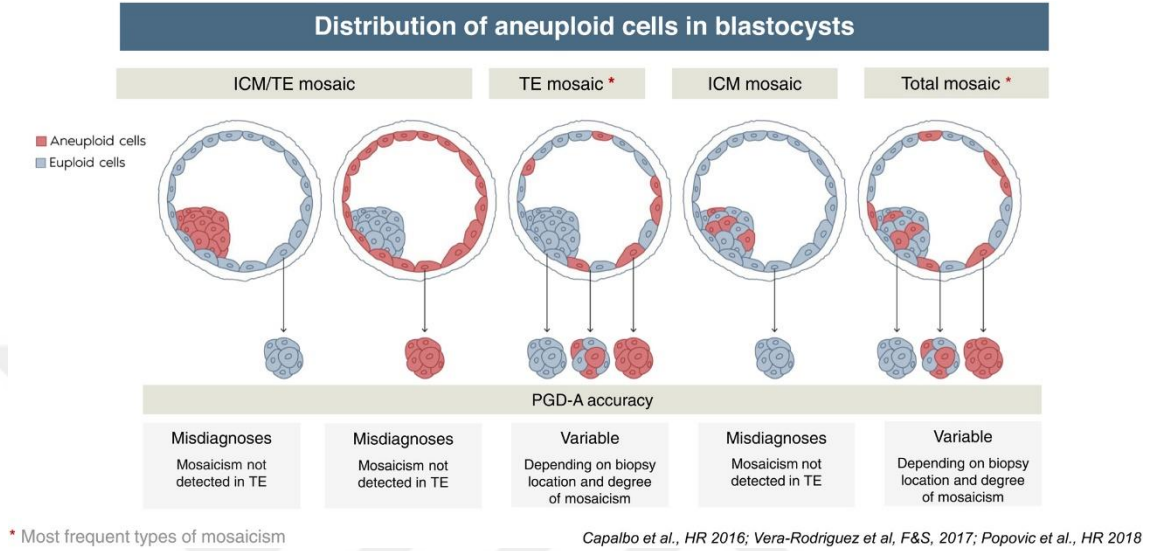
Daha fazla TE hücresi aynı anda analiz edilebildiğinden, blastokist aşamasında tespit daha yaygın olmasına rağmen, mozaikleşme iki hücreli aşama kadar erken ortaya çıkabilir. Blastosist aşamasında, üç ana mozaik embriyo tipi tanımlanmıştır: diploid-anöploid mozaiklik, normal diploid hücreler ve aneuploid hücrelerin bir kombinasyonu; farklı anöploidlere sahip hücre kombinasyonu ile anöploid mozaikizm; ve aneuploid hücreler birden fazla anöploid kromozoma sahip olduğunda kaotik mozaikizm (53).

Etkilenen hücre soyuna göre, iç hücre kütlesi (ICM) ve TE'de aneuploid ve öploid hücreler belirsiz bir şekilde bulunduğunda 'toplam mozaik' bir embriyo gözlenir.

Alternatif olarak, mozaik popülasyon, bu hücre popülasyonlarından biri ile sınırlandırılabilir ve böylece "ICM mozaikliği" veya "TE mozaikliği" üretilebilir.

Son olarak, ICM'deki tüm hücrelerin anöploid olması ve TE'ninkilerin öploid olması (veya tam tersi) "ICM/TE mozaikliği" sağlar

Şekil II: Mozaizm Çeşitleri (20)



Mozaizm, anöplöid hücrelerin yerleşimine göre sadece iç hücre kitlesinde (ICM), sadece trofoektodermde (TE) veya her iki blastosist kompartımanında dağılım gösterir.

Kromozomal mozaiklik ağırlıklı olarak döllenmeyi takiben mitozdaki hatalardan kaynaklanır. Daha sonraki gelişim evrelerinde daha az yaygın gibi görünse de, insan blastosistlerinde mozaikliğin gerçek prevalansını belirlemek son derece zordur(14).

Genetik bozukluklarda, bozukluktan sorumlu olan genetik mutasyon genellikle tüm vücut hücrelerinde bulunur. Buna karşılık, tüm vücut hücrelerinin aynı genetik yapıya sahip olmadığı ve bazı hücrelerde patojenik bir mutasyon bulunduğu zaman, mozaik durumundan söz edilir. Postzigotik kromozomal hatalı dağılım gibi genetik mozaikliğin neden olduğu bozukluklar uzun zamandır bilinmektedir (15). Prensi olarak, herhangi bir monogenik bozukluk mozaik formda da ortaya çıkabilir, bu durumda tüm vücut hücrelerini etkileyen mutasyonlara kıyasla daha hafif veya atipik bir seyirle ilişkilidir.

Yeni genom analizi yöntemleri, özellikle 2005 yılında tanıtılan yüksek verimli yeni nesil dizileme (NGS) yöntemi, mozaikliğin tespitini ve dolayısıyla mozaik bozuklukları anlayışımızı büyük ölçüde geliştirdi (16) . Sadece mozaik şeklinde ortaya çıkan

bozukluklar üzerinde öncü çalışmalar yapılmıştır. Bunlara, yapısal düzeyde (tüm hücrelerde) mevcutsa ölümcül olabilecek merkezi sinyal yollarındaki mutasyonlar neden olur (17, 18). Bu bozukluklar sıklıkla klinik olarak kısmi aşırı büyüme, fokal beyin malformasyonları, kutanöz semptomlar ve vasküler malformasyonlar olarak ortaya çıkar. Her bir klinik tablo kendi içinde nadirdir, ancak bu bozukluklar birlikte, karakteristik anormallikler sergileyen, giderek artan bir tanımlanabilir klinik tablo grubunu oluşturur (19).

PGT-A bağlamında, tek tip tam kromozom anormallikleri, TE biyopsisinin embriyonun kromozomal yapısını yansıtmaması muhtemel olduğundan, yeterli doğrulukla tespit edilebilir (20;21;22;23). Ayrıca, bu tür teşhisler büyük ölçüde klinik sonuçları öngörmektedir (32;33;34). En ikna edici kanıt, Scott ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen kör, seçimsiz çalışma tarafından sağlandı . (2012), burada blastosistlere genetik test yapılmadan biyopsi yapıldı ve transfer edildi. Klinik sonuçlar bilindiğinde, bir TE biyopsisinin klinik prediktif değerini değerlendirmek için SNP dizisi kullanıldı. Genel olarak, anöploid olduğu belirlenen embriyoların %96'sı implante olmazken, öploid embriyoların %41'i devam eden bir gebeliğe veya canlı doğuma yol açmıştır (25). Benzer şekilde, aCGH kullanılarak üniform monozomiler veya üniform monozomiler ve trizomilerin bir kombinasyonu ile teşhis edilen blastosistlerin (n = 10) transferini takiben hiçbir canlı gebelik elde edilmedi (23). Ayrıca, orijinal blastosist biyopsisinde teşhis edilen tek tip sayısal anöploidiler, gelişimin hem 8. hem de 12. Günlerinde uyumluydu ve bu da, genişletilmiş in vitro kültür sırasında öploid embriyolara kıyasla daha kötü gelişimsel sonuçlara yol açtı (28) . Toplu olarak, bu veriler, mayotik bir hata varsa, PGT-A'nın doğru bir teşhis sağlama olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

Tek bir TE biyopsisinin NGS analizine dayanarak, mozaikliğin son yaygınlık tahminleri her blastokist için %2 ila %13 arasında değişmektedir (29;30;31). TE biyopsisinin geniş, çok merkezli bir çalışmada, Katz-Jaffe ve ark . (2017), embriyoların %3'ünde mozaiklik ile uyumlu teşhisler bildirmiştir. Bu, yalnızca mozaik anormallikleri ile teşhis edilen embriyolar dahil ve kromozom 13, 16, 18, 21, X ve/veya Y'yi etkileyen farazi mozaik monozomiler veya trizomiler hariç olmak üzere, klinik olarak ilgili kabul edilen mozaik çağrılarının prevalansı (%2) ile karşılaştırılabilir (31). Tüm kromozomlar dikkate alındığında, bildirilen kromozomal mozaikizm prevalansı %5'e yükselmiştir

zeger(31). Ruttanajit ve ark. (2016), TE biyopsisi ve NGS'nin ardından analiz edilen blastosistlerin %9'unda tüm kromozomlarda öploid/anöploid mozaikçilik rapor etmiştir. Yine de, ek tekdüze anöploidiler sunan embriyolara genişletildiğinde, prevalans %13'e yükseldi (29). Benzer şekilde, NGS tabanlı PGT-A'yı değerlendiren yeni bir çok merkezli randomize kontrollü çalışma (RCT), analiz edilen blastokistlerin %17'sinde mozaiklik bildirdi (27). Bu, mozaik olarak rapor edilen toplam blastosist sayısının %11'ini oluşturan hem mozaik hem de üniform aberasyonlar ile teşhis edilen embriyoları içermektedir. Bununla birlikte, oranlar ~%10 ile ~%26 arasında değişen laboratuvarlar arasında değişiklik göstermiştir. Özellikle, mozaiklikle tutarlı kopya sayısı sapmalarını belirleme kriterleri, deneme sırasında farklılık gösterdi (27). Bireysel kromozomlar göz önüne alındığında, tüm otozomlarda ve cinsiyet kromozomlarında varsayılan mozaik anormallikler bildirilmiştir (32;33;27) İlginç bir şekilde, ön NGS verileri, 22, 4 ve 19 numaralı kromozomlar dahil olmak üzere spesifik kromozomların mozaizizm teşhisleriyle daha sık ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (34). Bununla birlikte, bu bulguları doğrulamak için daha fazla çalışma ve daha kapsamlı veri setlerine ihtiyaç duyulacaktır.

2.5.PGT (PREİMLANTASYON GENETİK TEST)

Preimplantasyon genetik tanı (PGD) ve preimplantasyon genetik tarama (PGS) ile ilgili önceki terimler, infertilite bakımından kullanılan terminolojinin gözden geçirilmesinin ardından preimplantasyon genetik test (PGT) terimi ile değiştirilmiştir (58) . PGT , HLA tiplendirmesi veya genetik anormallikleri belirlemek için oositlerden (polar cisimler) veya embriyolardan (bölünme aşaması veya blastosist) alınan DNA'yı analiz etmek için yapılan bir test olarak tanımlanır. Bu, anöploidi için PGT'yi (PGT-A), tek genli/tek gen kusurları için PGT'yi (PGT-M) ve kromozomal yapısal yeniden düzenlemeler için PGT'yi (PGT-SR) içerir (58). Yüksek genetik riskli kromozomal sayısal sapmalar için PGT, ESHRE PGT konsorsiyumunun veri koleksiyonlarında PGT-SR'ye dahil edilmiştir. (59)

Genetik tanı koymak istediğimizde, anne veya babada spesifik mutasyon veya kromozomal imbalans, monogenik hastalıklar, translokasyonlar varsa bunları embriyo gelecek nesillere kalıtmasın diye bunu tanımlayıp ayırırız.

Genetik tarama yapmak istediğimizde ise, anne-baba kromozomal olarak normal (veya normal kabul edilir) embriyoda anöploidi olup olmadığını kontrol ederiz.

2.5.1.PGT-M (Monogenik)

PGT-M, hastalığa neden olan lokusların (nükleer veya mitokondriyal) kesin olarak tanımlandığı, X'e bağlı, otozomal dominant veya resesif kalıtsal monogenik bozukluklara (kombinasyonlarına) neden olan DNA patojenik varyant(lar)ının test edilmesini ifade eder. (59)

PGT-M, embriyoların spesifik bir gen hastalığından etkilenip etkilenmediğini belirlemek için embriyo biyopsilerine uygulanan bir testtir. Test, PGT-M ön hazırlık sırasında her hasta ve spesifik genetik mutasyon ya da mutasyonlar için özel olarak tasarlanmaktadır. Mendelyen kurallara göre kalıtılan tek gen hastalıkları kromozomlar üzerinde yer alan tek bir gendeki defekten kaynaklanır. Günümüzde tespit edilen ortalama 4000'in üzerinde tek gen hastalığı bulunmaktadır. Bu tip değişimlerde kalıtım modelini belirleyen unsur otozomal ya da gonozomal genlerin kökenidir.

Bir fenotip öngörüsü olmayan, önemi bilinmeyen genetik varyant vakaları PGT'den çıkarılmalıdır. PGT testi, belirsiz genetik tanı durumunda (örneğin genetik/moleküler heterojenite) veya belirsiz kalıtım modu durumunda uygun değildir.

Probandda tek bir patojenik varyantın teşhis edildiği ve yalnızca bir ebeveynin bulunduğu otozomal resesif bozukluklar için, eğer patojenik genotip tek bir gene atfediliyorsa ve aile soyağacından elde edilen yeterli kanıt hastalığın tanımlanmasına izin veriyorsa PGT önerilmesi kabul edilebilir.

2.5.2.PGT-SR (Yapısal)

PGT-SR (structural rearrangement) , translokasyon taşıyıcısı çiftlerde transfer için normal/dengeli embriyoların seçilmesinde uygulanan genetik testi ifade eder.

Kromozom translokasyonları, inversiyonlar gibi kromozom yapısı yeniden düzenlemelerinin tanısında kullanılır. PGT-SR, kromozom yeniden düzenlemesine sahip olan ve bu nedenle yanlış kromozom sayısı veya yapısına sahip embriyolar oluşturma riski taşıyan kişiler için uygundur. Kromozom bozukluğu olan bir çocuğu veya hamileliği olan ya da kendisinde bulunan hastaların yardımcı üreme tedavilerinin başlangıcında bu testi yaptırması uygundur. Bu hastalıklar beta talasemi, kistik fibrozis, huntington, fragile X gibi kromozomal hastalıklardır.

Kromozom yeniden düzenlemeleri kalıtsal olabilir veya kendiliğinden olabilir. Dengeli kromozom yeniden düzenlemelerinin birçok taşıyıcısı sağlıklıdır ve çocuk sahibi olmaya çalışana kadar taşıyıcı durumlarının farkında değildir.

Dengeli yeniden düzenlemelerin taşıyıcıları, tipik olarak başarılı bir hamileliğe yol açmayan yanlış miktarda kromozomal materyal içeren embriyolar üretme riski altındadır. PGT-SR, başarılı bir hamilelik ve sağlıklı canlı doğuma yol açma olasılığı en yüksek olan doğru miktarda kromozomal materyale sahip embriyoların belirlenmesine yardımcı olabilir. Test edilen başlıca üç yeniden düzenleme türü şunlardır; karşılıklı translokasyonlar, Robertsonian translokasyonlar ve inversiyonlar (60)

2.5.3.PGT-A

Anöploidi için preimplantasyon genetik testi (PGT-A), IVF tarafından üretilen embriyolardaki kromozomal anormallikleri tanımlamak için kullanılır ve sonuçta olumsuz klinik sonuçların (yani implantasyon başarısızlığı, düşük ve kromozomal anormallikten etkilenen canlı doğum) olasılığını dışlayarak en aza indirmeyi amaçlar. Transferden anöploid embriyolar seçimini kaldırma stratejisi için kullanılır. Tekdüze tam kromozom anöploidileri (yani, tüm embriyonik hücrelerde bir kromozom kopyasının kaybı veya kazanımı) esas olarak mayoz geçirirken olgunlaşan oositlerde meydana gelen kromozom segregasyon hatalarından kaynaklanır.(10, 35,20).

İmplantasyon öncesi genetik tarama, embriyo DNA'sının implantasyondan önce anöploidi için kapsamlı kromozomal taramaya tabi tutulduğu yardımcı üreme teknolojisinde kullanılan yaygın bir tekniktir. (36). Trofektoderm biyopsisi, kromozom analizi için çok sayıda hücre sağlayabilir ve böylece tanısal hata olasılığını azaltabilir (37-38). Trofektoderm biyopsilerini gözden geçiren çalışmalar , IVF anöploidisini artan anne yaşı ile ilişkilendirir (39) , fakat aynı zamanda daha genç kadınlarda bile yüksek anöploidi oranları gösterir (40).

Prospektif bir çalışma, tekrarlayan gebelik kaybı (RPL) hastalarında yumurtalık rezervi etkisini araştırdı ve 38 yaşından genç kadınlarda yumurtalık rezervinin azlığında (döngünün 3. günü folikül uyarıcı hormon seviyesi >10 IU/mL ve/ veya antimüllerian hormon <1 ng/mL), yumurtalık rezerv testi normal olan kadınlara kıyasla, transfer edilecek bir öploide embriyoya sahip olma olasılığının önemli ölçüde daha düşük olduğunu gösterdi. (61)

Preimplantasyon genetik tarama yani PGT-A, aşağıdaki durumlarda yapılmaktadır;

- İleri anne yaşı (>38)
- Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı
- Tekrarlayan gebelik kaybı
- Şiddetli erkek faktör infertilitesi
- Elektif tek embriyo transferi istemi

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK):

Üç ve daha fazla gebeliğin 20. haftasından önce düşükle sonlanması olarak tanımlanır.

Farklı nedenlerden dolayı yaşanabilir;

Kromozomal anomaliler

Genetik anomaliler

Anne adayının ileri yaşı

Kan pıhtılaşması

Hormonal sorunlar

Anne adayında yaşanan metabolik hastalıklar (tiroid, diyabet vs)

Bağışıklık sisteminde dengesizlik

Rahimde yaşanan yapısal sorunlar

Çevresel faktörler

Yumurta ve sperm kalitesinde sorunlar

Anne adayında yumurtalıklarda yumurta gelişimi sırasında yaşanan sorunlar, baba adayında spermde bulunan DNA hasarı, yapısal bozukluklar, sayı azlığı ya da embriyo gelişimi sırasında meydana gelen genetik - kromozomal bozukluklar da gebelikte anomali yaşanmasına neden olur ve tekrarlayan düşükler ile sonuçlanabilir. Yumurta gelişiminde yaşanan sorunlar en çok anne adayının ileri yaşta olması ve yumurtalıklarda kaliteli yumurta gelişmemesinden kaynaklanır. İleri yaşla birlikte yaşanan düşük over rezervi de bu sorun için önemli bir olumsuz faktördür ve infertilite kapsamında değerlendirilmelidir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB);

40 yaşın altında en az üç kez taze ya da donma-çözme siklusunda en az dört adet iyi kaliteli embriyo transferine rağmen klinik gebelik elde edilememesidir. Başarılı bir implantasyon için blastokist aşamasında embriyo, reseptif endometriyum ve endometriyum ile embriyo arasında başarılı bir iletişim gerekmektedir. Kromozomal anomaliler, sperm DNA hasarı, zona kalınlaşması, yetersiz kültür ortamları, embriyo kalitesinin kötü olması TİB etiyolojisinde rol oynayan embriyonik faktörlerdir.

PGT-A yönteminde 5 güne kadar laboratuvar ortamında büyütülmüş embriyolardan (blastosist) biyopsi tekniği ile alınan 5-10 hücre alınmaktadır. Daha sonra genetik laboratuvarında bu hücre örneklerinin DNA'ları Tüm Genom Amplifikasyonu (WGA) adı verilen özel bir teknik ile çoğaltılır ve sonrasında Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi ile analiz edilerek kromozom sayısı ve yapısı incelenir. Bu yöntemin temeli çoğaltılan DNA parçalarının en son teknoloji ile çalışan NGS cihazında sayılarının belirlenmesi ile gerçekleşir. Cihazın okuma işlemleri tamamlandığında genetik laboratuvarında çalışan biyolog ve genetik uzmanı doktorlar birlikte analiz sonuçlarını inceleyerek embriyoların kromozomları hakkında son kararı verirler.

- NGS teknolojisi ile daha önceki analiz yöntemleri ile karşılaştırıldığında potansiyel olarak daha hassas ve doğru bir inceleme sağlanmaktadır,
- %20 – 80 arası mozaiklik oranları tespit edebilmektedir,
- Hücrenin enerjisini sağlayan mitokondriyal DNA miktarını tespit edebilmektedir,

Analiz sonucunda embriyoların Normal (Öploid), Anormal (Anöploid) ya da Mozaik olduğuna karar verilir ve bu şekilde raporlanır.

Anöploidi için preimplantasyon genetik testinin (PGT-A) kullanımı, iyi prognozlu hastalarda transfer başına daha iyi sonuçlar gösteren çalışmaların yayınlanmasının ardından son yıllarda artmıştır (26). Hücre hattı çalışmaları, NGS'nin bir model embriyo biyopsisinin normal ve anormal hücrelerin bir karışımını içerip içermediğini daha güvenilir bir şekilde tahmin edebildiğini gösterdi ve mozaik teşhisinin PGT-A sözlüğünün bir parçası haline gelmesine yol açtı(5)

Anöploidi için preimplantasyon genetik testinin (PGT-A) birincil amacı, morfolojiye dayalı embriyo transfer seçeneklerinde bulunan anöploid embriyoların sayısını ve etkisini azaltarak seçilen IVF transfer sonuçlarını iyileştirmektir (41). Bir öploid embriyonun transferi, anöploid embriyolara kıyasla implantasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarında iyileşme olduğunu göstermiştir (42,52). İlk çalışmaların çoğu, sınırlı FISH analizi ile bölünme aşaması biyopsisi kullanılarak gerçekleştirilen PGT-A'nın bir avantajını gösteremedi. Çeşitli trofektoderm hücrelerinin biyopsisi ile birlikte

kromozom analizi (43) artık embriyo kromozomal durumunun değerlendirilmesi için optimal kabul edilmektedir. Erken aşama biyopsi ve embriyo sonuçlarını azaltma potansiyeli çoğu klinikte durdurulmuştur. Bununla birlikte, tek bir analizde birden fazla hücrenin analizi, tam kromozom (veya kısmi/segmental kromozom) ara kopya sayısı sonuçları olasılığını ortaya çıkarır.(61)

Yeni Nesil Dizileme (NGS), implantasyon öncesi genetik testler için en son yaklaşımdır. Bu protokolün ilk adımı, aCGH için olduğu gibi WGA (Bütün Genom Amplifikasyonu) 'dan oluşmaktadır. Genom amplifikasyonundan sonra, farklı numunelerin belirli dizilerle etiketlendiği bir barkodlama prosedürü gerçekleştirilir. Bu süreç, bir dizileme çalışmasında 24 ila 96 biyopsinin (uygulanan dizileme platformuna bağlı olarak) birleştirilmesine ve dizilen embriyo başına bu optimize edilmiş maliyetin birleştirilmesine izin verir. Her dizi daha sonra bir referans insan genomu ile karşılaştırılır ve kopya sayısı varyasyonlarını ve büyük delesyonları veya duplikasyonları tanımlamak için özel bir yazılım kullanılır (44,45,46).

2.6. Mozaik Embriyoların Teşhisi

Mozaikliği teşhis etmek, özellikle öploid/anöploid mozaikler düşünüldüğünde oldukça karmaşıktır. Bu gibi durumlarda, gerçek mozaizmi ayırt etmek her zaman mümkün olmayabilirken, öploid/anöploid blastokistlerin gelişim potansiyeli belirsizliğini koruyor. Konservatif bir yaklaşım, tüm mozaik embriyoları klinik olarak uygunsuz olarak sınıflandırmak olsa da, çok gerçekçi bir değerlendirme, transfer için hiçbir öploid blastosistin mevcut olmamasıdır. Bu risk, anne yaşıyla birlikte önemli ölçüde artar (49;20). Hem Popovic hem de ark. (2018) ve Fragouli ve diğerleri. (2019), yanlış pozitif hatalardan kaynaklanan yanlış tanımlamanın büyük ölçüde mozaiklik teşhisi ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir. Bu nedenle, mozaik blastosistlerin klinik olarak uygunsuz olarak sınıflandırılması, sonuçta hasta için gebelik olasılığını azaltabilir. Bu, özellikle mozaizmi bildirilmemişse, yani bir embriyoyu anormal olarak sınıflandırmak için eşik değerler çok düşük ayarlanmışsa (örn. %30 anormal hücre) meşru bir endişe oluşturur. Fridenthal ve ark. (2018) yakın zamanda aCGH'ye kıyasla NGS tabanlı PGT-A'yı takiben devam eden gebelik oranlarında iyileşme olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, NGS ile PGT-A uygulanan hastalarda, varsayılan mozaik embriyoların hariç tutulması nedeniyle, transfer için önemli ölçüde daha az embriyo mevcuttu (14).

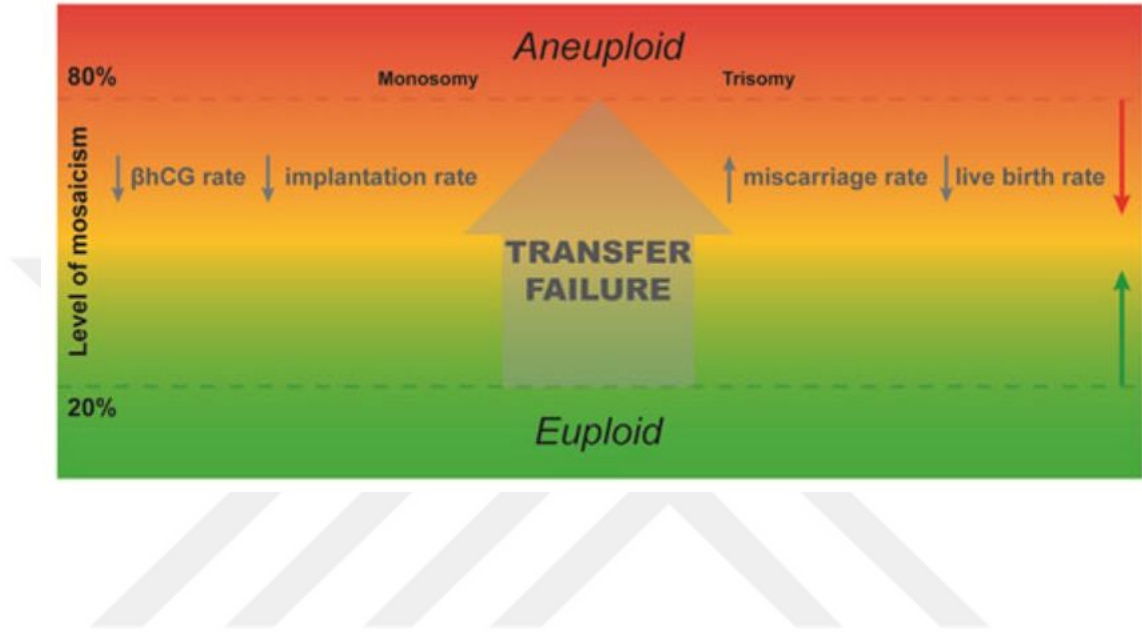
Canlı embriyoların yanlışlıkla klinik olarak uygunsuz olarak sınıflandırılmasını önlemek için, mozaik olarak sınıflandırılan embriyolar şu anda PGT-A'da üçüncü bir teşhis kategorisi olarak ortaya çıkmaktadır (50). Mozaik blastokistler kaçınılmaz olarak rutin IVF döngüleri sırasında transfer edilmektedir. Daha da önemlisi, şu anda YÜT sonrası doğan çocuklarda kromozomal mozaikçilik riskinin arttığına dair bir kanıt yoktur. Bu nedenle, mozaik olarak teşhis edilen embriyoların bir kısmı canlı gebelikler elde edebiliyorsa, bunların dışlanması tedavi sonuçlarını tehlikeye atacaktır. Yine de mozaik blastokistlerin transferi dikkatli bir değerlendirme gerektirir ve şu anda klinik bakım için net, standartlaştırılmış bir çerçeve yoktur. Kromozomal mozaizmi teşhis etmek, daha az normal embriyonun atılmasına yol açarken, anormal blastokistler de onun öncülü altında yanlışlıkla transfer edilebilir. Bunlar her zaman implantasyon başarısızlığına veya düşüklere yol açacaktır (14).

2.7. Mozaik Embriyo İnsidansı

Kromozom mozaikliği, genellikle embriyoların sadece küçük bir kısmında olmasına rağmen, yaygın olarak gözlemlenmiştir. Dizi CGH ve NGS tabanlı yöntemler gibi hassas teknolojiler, tek tip anöploidileri (biyopsideki tüm hücreleri etkileyen) mozaik anöploidilerden (biyopsideki yalnızca bazı hücreleri etkileyen) değişken bir şekilde ayırt edebilir. Blastokist aşamasında, NGS yöntemleri kullanılarak rapor edilen mozaiklik insidansı klinikler arasında oldukça değişkendir; %2'den %40'a kadar değişir ve kliniklerin büyük çoğunluğu araştırılan yaş grubuna bağlı olarak %5-15 arasında rapor verir. (23;4;48,). Seçilen bir klinikte sürekli yüksek mozaik embriyo insidansı, baskın hasta yaş grubu, klinik tedavi ve/veya spesifik embriyoloji uygulamaları ile ilişkili olabilir (23), sevk edilen tüm kliniklerde yüksek düzeyde görünür mozaiklik, daha zayıf test laboratuvarı uygulamalarının göstergesi olabilir. Her iki durumda da, klinik ve/veya test laboratuvarı uygulamalarının gözden geçirilmesi garanti edilebilir. PGT-A için biyopsileri harici bir test laboratuvarına gönderen klinikler, laboratuvarından embriyo mozaik oranlarını ve eşik aralıklarını açıklamasını talep etmelidir. Bu, kliniklerin kendi performanslarının yanı sıra sevk edilen herhangi bir test laboratuvarının analitik yeteneklerini değerlendirmelerine yardımcı olacaktır. (PGDIS,2021)

Mozaik embriyo transferinden sonra başarılı gebelikleri bildiren ilk yayınlanmış çalışmadan bu yana (32), diğer gruplar da daha fazla sayıda mozaik embriyo içeren sonuçlar bildirmiştir (50;51;47). Bu çalışmalar, mozaik veya mozaik segmental embriyoların sağlıklı gebeliklere yol açtığını ortaya koymuştur (52;51), ancak bu tür transferlerin düşük implantasyon oranları ve genellikle daha yüksek düşük oranları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (42).

Şekil III: Mozaisizm Oranları İle Transfer Sonuçları Arasındaki İlişki (61)



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmanın Dizaynı

Çalışmamız 2019-2023 yılları arasında, Centrum Klinik Tüp Bebek Merkezinde yapılmış retrospektif bir veri tarama çalışmasıdır. Hasta dosyaları ve elektronik medikal kayıtlar taranarak verilere erişim sağlanmıştır. Eksik verisi olan olgular dahil edilmemiştir.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

PGT-A işlemi önerilmiş ve uygulanmış seçilmiş hasta grubu:

- 38 yaş üzeri kadınlar (elektif PGT-A)
- Tekrarlayan erken gebelik kaybı olanlar (>3)
- Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olanlar olarak tanımlanmıştır. (40 yaşın altında en az üç kez taze ya da donma-çözme siklusunda en az dört adet iyi kaliteli embriyo transferine rağmen klinik gebelik elde edilememesidir). Bu grup olgulardan, özellikle blastosist aşamasına gidilmiş, teknik olarak uygun trofoblast biyopsisi yapılmış, NGS ile PGT-A işlemine uygun bulunmuş ve sonuçları rapor şeklinde elde edilmiş olgular çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

Azoospermi olguları, yuvarlak spermatid injeksiyonu yapılan olgular, tek gen hastalıkları, uterus patolojisi bulunanlar, endokrin veya metabolik hastalığı bulunanlar, siklus iptali olanlar ve fertilizasyon sorunu yaşayan olgular dahil edilmemiştir.

Çalışmaya dahil edilen ve PGT-A işlemi uygulanıp, embriyolar hakkında genetik bilgisine erişilen olgular, 3 gruba ayrılmıştır:

1. Normal/öplöid
2. Anormal/anöplöid sonuç alınmış
3. Mozaik

Bu 3 grup embriyoların, fertilizasyon aşamasından itibaren bölünme dinamikleri şu şekilde değerlendirilmiş ve 3 grup arasında karşılaştırılmıştır:

- Klivaj embriyo fragmantasyon oranları
- Klivaj embriyo <8 hücre oranı
- Klivaj embriyo >8 hücre oranı
- 5.gün blastokist sayısı
- 5.gün en iyi kalitede (G1) blastokist oranı
- 5.gün orta kalite (G2-G3) blastokist oranı

3.2 Ejekülat ile Sperm Alma ve Hazırlama İşlemi

Ejekülat ile sperm alma işleminde hastalar OPU günü özel sperm örneği verme odalarına alınır. Androlog tarafından hastaya üzerinde isim etiketi, işlemin çeşiti, cinsel perhiz süresi yazılı steril pvc örnek kabı verilir. Kalitesi yüksek bir sperm örneği elde edebilmek için ideal cinsel perhiz süresi 3 gün ile 7 gün arasındadır. Hastaya örneği vermeden önce ellerini yıkaması gerektiği, herhangi bir kayganlaştırıcı kullanmaması, örnek kabının içine dokunmaması, kan ve idrar gibi vücut sıvılarını örneğe bulaştırmaması söylenir. Örnek mastürbasyon yoluyla verilip laboratuvara teslim edildikten sonra etüve alınır. Etüvde 37 derece sıcaklıkta en az 15 dakika bekletilerek likefiye olması sağlanır. Bu süre bittiğinde örnek incelenmek için yeterince likefiye olup olmadığı kontrol edilir. Eğer örneğin viskozitesi hala yüksekse 3ml lik falcon pipet ile pipetaj yapıp bir süre daha etüve kaldırılır. Örnek hazır olduğunda androloji defterine isim, işlem türü, cinsel perhiz süresi ve örneğin kaç ml olduğu not edilir. Daha sonra falcon pipetle iyice pipetaj yapılan örnekten bir damla maklere alınır ve mikroskop altında inceleme yapılır. Sperm sayısı ve motilite yüzdesi tespit edilip deftere yazılır. Örnek, mikroçipe ya da önceden falcon tüpte hazırlanıp oda sıcaklığına gelmiş gradiente alınır. Gradient için %80 ve %40 olmak üzere iki farklı derişimde pure sperm ve sperm wash karışımı kullanılmaktadır. Bu karışımlardan önce %80 lik sonra %40 lık olandan birer ml karışmadan dikkatlice falcon tüpüne aktarılır. Falcon tüpü 45 derece eğik tutulup sıvının ucundan tüpün ucuna doğru bir yol çizilerek sperm örneği tüpe aktarılır. Örneğin açıldığı sperm sayısı, motilite yüzdesi ve sperm kalitesi gibi değişkenler göz önünde bulundurularak 1200,1500 devirde 8,10 dakika santrifüje alınır. Sonra tüpün dibinden cam pipet yardımıyla hafifçe kazınarak 0.5 ml örnek alınarak başka bir falcon tüpe aktarılır. Üzerine 2 ml sperm wash konularak 3000 devirde 5 dk santrifüje alınır. Tüpün üstündeki örnek çekilir ve altındaki 0,5 ml örnek etiketlenmiş küçük tüpe aktarılır. Buradan da ICSI dishindeki sperm havuzunun sol kenarına yüzmesi için bir çizgi halinde, mikropipet ile 50 mikrolitre kadar sperm basılır.

3.3.1 Oosit Toplama (OPU) İşlemi

Oosit toplanması işlemi (OPU; oocyte pick-up) sırasında tüm oositler en kısa sürede alınır, embriyolog tarafından örnek içerisinde tespit edilir, sayılır. Kumulus-oosit kompleksinin maturasyon durumunu değerlendirilir.

Folikül aspirasyonu ile oositlerin toplanması işlemi hCG enjeksiyonunu takiben 34-36 saat sonra gerçekleştirilir. İşlem vajinal ultrasonografi eşliğinde genel anestezi ile yapılır. Önce vajen steril serum fizyolojik ile yıkanır. İşlem için 16-18 G 'luk steril aspirasyon iğneleri takılı transvajinal prob steril kılıf içine sarılarak en uygun vakum basıncında (100-150 mmHg) 23 ultrasonografi eşliğinde kullanılarak folikül aspirasyonu sağlanır. 37 derece sıcaklıkta bekletilen tüplere alınan örnekler hemen laboratuvara götürülür ve laminar air flow kabini içinde petri dishlerine konulan foliküller sıvı içerisinde sterio mikroskop ile oositler bulunur, sayıları tespit edilir.. Pastör pipeti ile HEPES solüsyonu içeren dishlere alınır. Oosit kalitesi ve embriyo gelişiminin ısı, osmolarite ve pH değişimlerini ile etkilenmemesi için oositler en kısa sürede kültür medyumuna konulup inkübatöre yerleştirilir, etiketleme yapılır.

3.3.2. Denüdasyon İşlemi

Oositlerin ICSI işlemine hazır olması için etrafında bulunan kumulus hücrelerinden temizlenmesi gerekmektedir. Bu işlem iki basamakta yapılır. Önce 2 tane insülin iğnesi yardımıyla kumulus hücreleri katlanıp kopartılarak olabildiğince azaltılır. Daha sonra hyalüronidaz enziminde yaklaşık 15-20 dk tutulup kumulus hücrelerinden temizlenen oositler polar cisimciğin varlığı (M2) veya yokluğu (M1) ya da germinal vezikül (GV) varlığı açısından değerlendirilir. ICSI işlemi için önceden hazırlanmış kültür medyumuna içeren dishlere konulur ve etiketlenerek inkübatöre kaldırılır.

3.4. ICSI (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

ICSI işlemi tek bir spermin oositin stoplazmasının içine enjekte edilmesidir. ICSI işlemi öncesinde aynı gün ICSI dishi hazırlanıp etüve kaldırılır. ICSI dishi hazırlanırken sperm havuzu, sperm toplama damlacığı, oosit mikroenjeksiyon damlacıkları, PVP ve yıkama damlacıkları %5'lik HSA içeren HEPES medyumunu kullanılarak hazırlanır. 37°C ısıtılan inverted mikroskobun tablasına üzerinde özel mikroığneler ile sperm havuzundan seçilerek toplanan spermier PVP içerisine alınır ve burada kuyrukları kırılarak hareketsiz hale getirilir. Daha sonra holding pipet ile tutulan oosit polar cisimciğı saat 12 yönünde olacak şekilde sabitlenir. Mikropipet içine alınan sperm dikkatli ve net bir hareketle önce biraz sitoplazma sıvısı çekilip kırılma anı denilen bir noktadan sonra oosit içerisine bırakılır. ICSI sonrası oositler kültür mediumuna konulur, etiketlenir ve inkübatöre kaldırılır.

3.5. Fertilizasyon Kontrolü

Fertilizasyon, sperm hücresinin sekonder oosit ile birleşmesiyle başlar. Spermium oosit içerisine girdiğinde sekonder oosit 2.mayozu tamamlayarak ovum haline geçer. Oluşan ikinci kutup cisimciğı 1.si ile birlikte dejenere olarak kaybolacaktır. Nükleuslar pronükleus halini alır. Erkek ve dişiye ait pronükleusların oluşması ile fertilizasyon tamamlanır. Böylece zigot oluşmaya başlar. Fertilizasyon kontrolü IVF veya mikroenjeksiyon işleminden 14-18 saat sonra yapılır. Fertilize olan oositin sitoplazmasında ayrı iki pronükleus (PN) ve perivitellin aralıkta iki kutup cisimciğinin olması normal fertilizasyon olarak kabul edilir.

3.6.Klivaj Dönemi Sınıflandırılması

Klivaj kelimesi bölünme anlamına gelmektedir. Embriyonun 2 hücreden (OPU'dan sonraki 1.gün), 15-20 arası sıkıca birleşmiş hücre içeren (morula) aşamaya kadar (OPU'dan sonraki 4.gün) olan gelişimi klivaj (bölünme) dönemi olarak adlandırılır. Bu dönemde embriyo mitoz bölünme ile hücre sayısını artırır. Bir yandan da hücre içerisinde metabolik faaliyetler, protein sentezi ve DNA kopyalama işlemleri gerçekleştirilir. Bu dönemde gerçekleşen en önemli değişimlerden biri 8 hücre aşamasından sonra artık sperm genetik yapısının da embriyo gelişimini yönlendirmeye katılmasıdır (embriyonik genom oluşumu). Dolayısıyla sperm kaynaklı olası problemler çoğunlukla bu aşamadan sonra ortaya çıkar.

Tablo 1: ESHRE 2011 konsensusa göre: 3. gün embriyo skorum sistemi

İyi Kalite/Grade 1 Embriyo	< %10 fragmentasyon, 2. günde 4, 3. günde 8 blastomer, blastomerler eşit büyüklükte, multinükleasyon yok
Orta Kalite/Grade 2 Embriyo	% 10-25 fragmentasyon, Blastomer sayı ve şekli grade 1 embriyolara benzer, multinükleasyon yok,
Köyü Kalite/Grade 3 Embriyo	>%25 fragmentasyon, günüyle spesifik olmayan hücre büyüklüğü ve sayısı, multinükleasyon var

3.7. 4. Gün ve Blastokist Evresi Değerlendirmesi

Dördüncü güne gelindiğinde embriyonun hücre sayısı iyice artmıştır ve 16-32 hücreden oluşan sıkı bir yumak halindedir. Bu aşamadaki kompaktlaşmış embriyoya morula denir. Morula evresinden sonra iç kısımda bulunan hücreler ile dış kısımdaki hücreler ileri gelişim aşamasında başkalaşım gösterirler. Blastosel boşluğunun genişlemesiyle birlikte zona pellusida giderek incelir. Blastokist evresinde iç hücre kütesini (inner cell mass) ve dış hücre (trofektoderm) tabakasını oluştururlar. İç kısımda blastosel sıvı ile dolu kısım oluşur. Embriyonun kalitesinin değerlendirmesinde blastosel kavitenin yapısı, iç hücre kütesini oluşturan hücrelerin sayısı ve yapısı, trofektoderm hücrelerinin yapısı ve düzgün dizilip dizilmediği dikkat edilen kriterlerdir.

Tablo 2: ESHRE 2011 konsensusa göre: 4. gün embriyo skorlaması

Grade 1 Embriyo:	Bölünmenin dördüncü aşaması, embriyo hacminin neredeyse tamamını kaplayan kompaktlaşma,
Grade 2 Embriyo:	Bölünmenin dördüncü aşaması, embriyo hacminin büyük bir kısmını kapsayan kompaktlaşma,
Grade 3 Embriyo:	Orantısız kompaktlaşma, embriyo hacminin yarısından azını kaplayan kompaktlaşmayla birlikte 2 veya 3 hücrenin kompaktlaşmaya katılmadığı,

Gardner blastosist derecelendirme sistemi, her bir blastosist embriyosuna 3 ayrı kalite puanı atar:

1. Blastokist gelişme aşaması – genişleme ve hatching
2. İç hücre kütesi (ICM) skoru veya kalitesi
3. Trofektoderm (TE) skoru veya kalitesi

Tablo 3: Blastokist gelişme aşaması – genişleme ve hatching

Genişletme derecesi	Blastokist gelişimi ve evre durumu
1	Embriyo hacminin yarısından daha az blastösel boşluğu
2	Blastösel boşluğu, embriyonun hacminin yarısından fazlası
3	Tam blastosist, embriyoyu tamamen dolduran boşluk
4	Genişletilmiş blastokist (expanded), embriyodan daha büyük boşluk, zona pellusidanın incilmesi
5	Zona pellusidadan çıkma dönemi (hatching)
6	Zona pellusidadan tamamen çıkmış halde

Tablo 4: İç hücre kütlesi (ICM) skoru veya kalitesi

ICM notu	İç hücre kütle kalitesi
A	Sıkıca paketlenmiş birçok hücre
B	Gevşek bir şekilde gruplandırılmış birkaç hücre
C	Çok az hücre

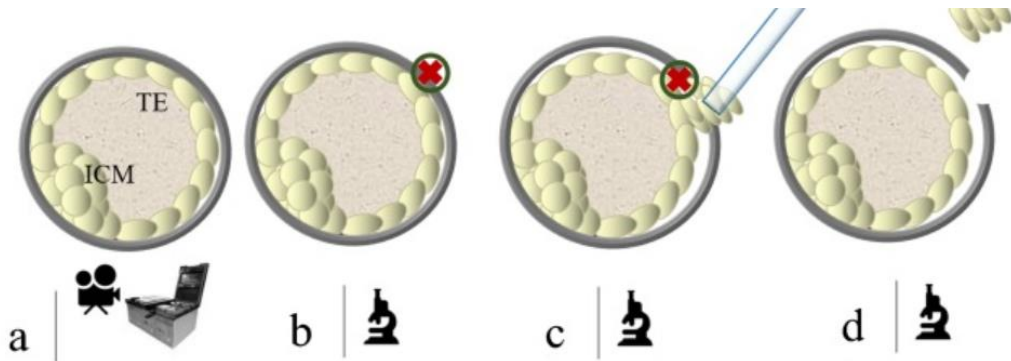
Tablo 5: Trofektoderm (TE) skoru veya kalitesi

TE notu	Trofektoderm kalitesi
A	Sıkı bir tabaka oluşturan birçok hücre
B	Gevşek bir epitel oluşturan birkaç hücre
C	Çok az büyük hücre

3.8.Trofoektoderm Biyopsisi

Trofoektoderm biyopsisi, embriyo gelişiminde blastokist dönemine ulaşmış yani beşinci günde embriyolara uygulanan biyopsi tekniğidir. Günümüzde en sık tercih edilen biyopsi şeklidir. Bu işlem sırasında embriyoların trofoektoderm hücrelerinden 5-9 adet alınarak hazırlanır ve genetik laboratuvarlarına gönderilir. Biyopsi işlemi için HEPES dropletleri içeren biyopsi dishleri işlemin aynı günü hazırlanır ve etüve kaldırılır. ICSI işlemi için hazırlanmakta olana benzer şekilde hazırlanan bu dishte 9 tane droplet vardır. Embriyoyu yakalamak ve sabit tutmak için holding pipeti kullanılır ve önce embriyo sabit halde tutulur. İşlemi gerçekleştirmek yani trofoektoderm hücrelerini aspire edebilmek için ince cam biyopsi pipeti kullanılır. İnverted mikroskopta holding pipetinin, biyopsi pipetinin ve embriyonun aynı düzlemde olduğunu anlayabilmek için görüntünün netliği ayarlanır. İşlem sırasında trofoektoderm yapısı incelenir. Özellikle hücreler arasına denk gelen, incelmış olan bölüm tercih edilerek birkaç defa lazer atılır. Sonrasında biyopsi pipetinin içine 8-10 hücre çekilir. Biyopsi pipetinin uç kısmına denk gelecek şekilde tekrar lazer atılarak bu hücreler kopartılıp alınmış olur. Son olarak, çıkarılan trofoektoderm hücreleri, analiz için bir tüpe aktarılır. Genetik laboratuvarına gönderilen bu örnek sayesinde embriyonun öploid, anöploid ya da mozaik yapıda olduğu tespit edilir.

Şekil IV: Beşinci Gün Trofoektoderm Biyopsisi



(a) Embriyo, ya hızlandırılmış ya da standart bir inkübatörde tamamen genişlemiş blastokist aşamasına kadar kültürlenir; (b – c) Zona pellucida, İç Hücre Kütlesinin

karşısındaki bir noktada delinir, trofektoderm nazikçe ondan ayrılır ve birkaç hücre pipetle emilir ve daha sonra dönüşümlü olarak germe ve blastosist gövdesinden çıkarılır. Lazeri ateşlenir; (d) Biyopsi parçası serbest bırakılır (Antonio Capalbo, 2016)

3.9. Verilerin Analizi

Tüm istatistiksel analizler SPSS IBM programı ile yapılmıştır.

Bulguların yorumlanmasında frekans tabloları ve betimsel istatistikler kullanılmıştır.

Değişkenlerin normal dağılım hipotezine uyup uymadığı çarpıklık ve basıklık katsayılarına bakılmak suretiyle tespit edilmiş ve parametrik test yöntemleri tercih edilmiştir (Tablo 1).

Çalışmada elde edilen verilerin özetlenmesinde tanımlayıcı istatistikler sürekli(sayısal) değişkenler için dağılıma bağlı olarak ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan, minimum ve maksimum tablo halinde verilmiştir. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak özetlenmiştir

Gruplara göre kategorik değişkenler arasında farklılık karşılaştırmalarında Ki-Kare kullanılmıştır.

Ulaşılan bütün sonuçlarda istatistiki anlamlılık $p<0,05$ seviyesinde değerlendirilmiştir.

4.BULGULAR

Veri analizinin yapıldığı dönemde, dahil edilme kriterlerini karşılayan toplam 300 olgu saptanmış olup, tez analizi için gerekli tüm verilerin bulunduğu ve dahil edilme kriterlerini karşılayan toplam Toplam 51 olgu çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu gruplardan elde edilen ve biyopsi yapıp NGS sonuçları alınan toplam 129 tane

5. Gün embriyosu vardır.

Bu embriyoların;

-52 tanesi (%40,3) normal/öplid

-52 tanesi (%40,3) anöplid

-25 tanesi (%19,4) mozaik olarak rapor edilmiştir.

Tablo 6: Sosyo Demografik Özelliklere İlişkin Betimsel Sonuçlar

Değişkenler	
Yaş ortalaması (yıl)	35.46±5.32
Öploid embriyo oranı %	%40.3
Toplam hareketli sperm sayısı (ABC) (Milyon)	24.94±23.93
>38 yaş kadın sayısı	17(%33,3)
Tekrarlayan gebelik kaybı olguları	11(% 21,6)
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olguları	28(%54,9)
Önceki başarısız IVF geçmişi olan kadınlar	35(%68,6)
Toplanan oosit toplamı (n)	392
Olgu başına ortalama oosit	7.6
M2(n)	349
Olgu başına ortalama M2	6.8
2PN toplam sayısı	332
Fertilizasyon %	%84.6
PGT-A için biyopsi yapılabilen embriyo sayısı	150
Sonucu elde edilen toplam 5.gün embriyo sayısı	129 (%86)

Tablo 6' ya göre kadınların yaş ortalamasının 35.46 olduğu, 38 yaşından büyük kadın sayısının 17 olduğu, toplam TGK sayısının 11 olduğu, toplam RIF sayısının 28 olduğu, Önceki başarısız IVF sayısının 35 olduğu, Toplanan oosit sayısının 392, M2 sayısının 349 ve 2PN sayısının ise 332 olduğu belirlenmiştir. Toplam hareketli sperm sayısının ortalamasının 24,94 milyon olduğu tespit edilmiştir.

Tablo-7: 3 Grup Embriyonun Bölünme Dinamikleri Sonuçları

	Normal (N=52)	Anöplöid (N=52)	Mozaik (25)	p
3. Gün fragmantasyon saptanmayan embriyo sayısı(n)	52 _b (%100,0)	33 _a (%63,5)	25 _b (%100,0)	.000
3. Gün %5 fragmanlı embriyo sayısı (n)	0 _b (%0,0)	13 _a (%25,0)	0 _b (%0,0)	.000
3. Gün %10 fragmanlı embriyo sayısı (n)	0 _b (%0,0)	6 _a (%11,5)	0 _{a, b} (%0,0)	.009
3. Gün < 8 hücre embriyo sayısı (n)	4 _b (%7,7)	21 _a (%40,4)	2 _b (%8,0)	.000
3. Gün ≥ 8 hücre (G1) embriyo sayısı (n)	48 _b (%92,3)	31 _a (%59,6)	23 _b (%92,0)	.000
5. Gün G1 embriyo sayısı (n)	38 _b (%73,1)	11 _a (%21,2)	17 _b (%68,0)	.000
5. Gün G2 embriyo sayısı (n)	9 _b (%17,3)	20 _a (%38,5)	6 _{a, b} (%24,0)	.049
5. Gün G3 embriyo sayısı (n)	5 _b (%9,6)	21 _a (%40,4)	2 _b (%8,0)	.000

*Ki-Kare testi kullanılmıştır. Grup Farkı için Bonferroni testi yapılmıştır ve farklı harfler grup farkını belirtmektedir. %: Satır Yüzdesi

- 3.gün fragmentasyon saptanmayan klivaj embriyo oranlarının anöplöid embriyo grubunda, diğer iki gruba göre anlamlı olarak daha az izlendiği saptanmıştır. Normal ve mozaik grupları arasında ise anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

- 3.gün %5 fragmentasyon saptanan klivaj embriyo oranlarının, özellikle anöplöid embriyo grubunda, diğer 2 gruba göre anlamlı olarak daha fazla izlendiği saptanmıştır. Normal ve mozaik grupları arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır.

- 3.gün %10 fragmentasyon saptanan klivaj embriyo oranlarının, özellikle anöplöid embriyo grubunda, diğer 2 gruba göre anlamlı olarak daha fazla izlendiği saptanmıştır. Normal ve mozaik grupları arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır.

- 3.gün < 8 hücre embriyo sayısı olan klivaj embriyo oranlarının, özellikle anöplöid embriyo grubunda, diğer 2 gruba göre anlamlı olarak daha fazla izlendiği saptanmıştır. Normal ve mozaik grupları arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır.

- 3.gün ≥ 8 hücre (G1) embriyo sayısı olan klivaj embriyo oranlarının, özellikle anöplöid embriyo grubunda, diğer 2 gruba göre anlamlı olarak daha az izlendiği saptanmıştır. Normal ve mozaik grupları arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır.

- Normal embriyolarda 5. gün G1 oranının (%73,1) mozaik embriyolarda 5.gün G1 oranından (%68,0) ve anöplöid embriyolarda 5. gün G1 oranından (%21,2) anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

5.TARTIŞMA

Bu çalışmaya göre, normal ve mozaik embriyolar, anöploid embriyolara göre genel olarak daha iyi ve kendi içlerinde benzer bölünme dinamikleri göstermiş olup, sadece en iyi kalite blastosiste gidiş aşamasında öploid yani normal genetikli embriyoların daha çok saptandığı dikkati çekmiştir. PGT-A; ileri anne yaşı (>38), tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı, şiddetli erkek faktör infertilitesi gibi durumlarda yapılır. PGT-A yapılmadığı takdirde IVF tarafından üretilen embriyolardaki kromozomal anöploidiler tanımlanamaz ve implantasyon başarısızlığı, düşük ve kromozomal anormalliklerden etkilenen canlı doğum riskleriyle karşılaştırılır.

Genel literatürde %30-40 oranlarında görülen mozaik embriyo oranı (63) bizim çalışmamızda %19,4 olup düşüktür. Mozaisizm tüm yaş gruplarında benzer oranlarda görülmesi ve paternal etkilerin az olması sebebiyle oluşan bu farkın genetik laboratuvarının uygulama farklılıkları ve kullanılan eşik aralıklarından kaynaklandığını düşünebiliriz (23). Yapılan çalışmalar, düşük aralıktaki (<%50 olarak tanımlanan) mozaik embriyoların, öploid embriyolara kıyasla benzer implantasyon oranlarına sahip olduğunu gösterirken, diğer yayınlanmış araştırmalar mozaik embriyo transferlerinin, artan implantasyon başarısızlığı ve düşük oranları ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir ve daha yüksek mozaiklik değerleri, iyi sonuçlar üretmek için daha da az elverişli görünmektedir (62). Yapılan mozaik embriyo transferlerinin sağlıklı canlı doğum oranları yaklaşık %33 tür (32). Kromozomal olarak normal bir embriyosu bulunmayan hastaya öncelikle yeni bir siklus ile normal embriyo bulunması önerilebilir. Tekrar uygulama sonrası embriyo bulunamadığında veya hasta öncelikli olarak mozaik embriyonun transferini tercih ettiğinde embriyonun mozaisizm yüzdesi ve mozaikliğe katılan kromozom sayısı ve tipi dikkate alınarak transfer yapılmalıdır.

Mozaik embriyolarda gebelik anlamında nasıl bir potansiyel beklemeliyiz diye düşündüğümüzde, genellikle mozaiklik oranı %50 ve altında olduğunda iyi bir potansiyeli olduğu kabul edilebilir (64). Çünkü düşük oranlı mozaizmde embriyonun diğer bölgelerinde anöploidi görülme riski daha düşüktür. Burada sorunun çok daha lokalize olabileceğinden ve embriyonun tamamını temsil etmeyebileceğinden bahsederiz.

Çalışmamızda yaş ortalaması 35,46 olan 51 hastanın sonuçları değerlendirilmiştir. Bu hastalardan elde edilen ve biyopsi yapıp NGS sonuçları alınan toplam 129 tane 5. Gün embriyosu vardır. Bu embriyoların; 52 tanesi (%40,3) normal, 52 tanesi (%40,3) anöploid, 25 tanesi (%19,4) mozaik olarak sonuç almıştır. 35,46 ortalama yaşa göre bulunan %40,3 anöploidi oranları azdır. Literatürde %65 civarlarında beklenen bu oran teknik okuma kaynaklı olarak daha az bulunmuş olabilir (39). Anöploidi kadınlarda 26-30 yaş arasında en az görülür. 26 yaşından büyük kadınlarda artmaya başlayan anöploidi oranı 40 yaş civarında %50 ye çıkarken 43 yaşında bu oran %90 a kadar çıkıp sabit kalmaktadır (39).

Normal ve mozaik embriyoların tümü 3.günde fragmentasyon bulundurmamaktadır.

Anöploid embriyolar %25,0 oranında %5 fragmentasyon, %11,5 oranında %10

fragmentasyon bulundurmaktadır. Normal ve mozaik embriyolar özellikle 3.gün klivaj evresi embriyolarındaki fragmentasyon oranları başta olmak üzere benzer dinamikler göstermişlerdir. Fragman, genellikle perivitellin boşluktaki zara bağlı hücre dışı sitoplazmanın varlığı ile karakterize edilen heterojen bir yapıdır. Fragmentasyonun oluşumu, hücre ölümü, kromozomal fragman oluşumu, hücre iskeleti bozuklukları ve vezikül oluşumu gibi çeşitli mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir (65). Anöploid embriyolar daha fazla fragman bulundurmaktadır. Anöploid kromozomlar embriyonun normal gelişiminin engellenmesine sebep olur. DNA replikasyonu sırasındaki bir hata herhangi bir iğ kompleksi ve kortikal mikrofilamentler arasındaki etkileşim kaybı ve hücresel fragman oluşumu ile ilişkilidir (65). Anormal bölünmeler sırasında açığa çıkan kromozomlar mikronükleus olarak sitoplazmada varlığını sürdürmektedir.

Anormal hücre döngüsü süresi ve sitokinezi olan embriyoların (genelde gecikmiş birinci mitoz, ikinci mitozun erken başlangıcı ve üçüncü mitozun daha uzun süreli) parçalanma olasılığı daha yüksektir. Bunlar anöploid embriyolarda daha fazla fragman görülmesinin nedeni olabilir.

Öploid ve mozaik embriyolar benzer kalitelere sahip olsa da öploid embriyolar 5.gün G1 blastokist sayısı bakımından mozaik embriyolardan daha fazlaydı. Bu da mozaik embriyoların gelişimlerinin iyi olmasına rağmen transfer sürecinde öploid embriyolar kadar avantajlı olmayabileceğini göstermektedir. Özellikle mozaikliğin yüzdesi ve kromozomal bozukluğun özellikleri mozaik embriyonun kalitesini belirlemektedir.



7.KAYNAKÇA

- 1) Juan-Carlos Biancotti , Nissim Benvenisty (2011). Aneuploid human embryonic stem cells: origins and potential for modeling chromosomal disorders.
- 2) Maria Vera-Rodriguez, Carmen Rubio (2017). Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos.
- 3) Irani M., Recihman D., Robles A., Melnick A., Davis O., Zaninovic N., et al. (2017). Morphologic grading of euploid blastocysts influences implantation and ongoing pregnancy rates.
- 4) Morin S., Melzer-Ross K., McCulloh D., Grifo J., Munne S. (2014). A greater number of euploid blastocysts in a given cohort predicts excellent outcomes in single embryo transfer cycles.
- 5) Eric J. Forman (2019). Demystifying "mosaic" outcomes.
- 6) Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility.
- 7) Speroff, F.M., Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 10. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril, 2013.
- 8)Remah m. Kamel, Management of the infertile couple:an evidence –based protocol, Reprod Boi Endocrinol,2010
- 9)Oosit gelişimi, mayoz ve anöploidi
Marie MacLennan 1, James H Crichton 2, Christopher J Playfoot 3, Ian R Adams 4 (2015)
- 10)İnsan anöploidisi: asırlık bir soruna mekanizmalar ve yeni bakış açıları
I. Nagaoka , Terry J. Hassold ve Patricia A. Hunt (2012)
- 11)Munné ve diğerleri , 1994 ; Hassold ve diğerleri , 1996 ; Bielanska ve diğerleri , 2005
- 12)Delhanty ve diğerleri , 1993

13)Evsikov ve Verlinsky, 1998 ; de Boer ve diğeri , 2004

14)İnsan blastokistlerinde kromozomal mozaizizm: nihai teşhis ikilemi

Mina Popoviç, Lien Dhaenens , Annekatrien Boel , Björn Menten , Björn Heindryckx
İnsan Üreme Güncellemesi , Cilt 26, Sayı 3, Mayıs-Haziran 2020

15) larke CM, Edwards JH, Smallpeice V. Bazı mongoloid karakterlere sahip zeki bir çocukta 21-trizomi/normal mozaiklik. Lancet. (1961)

16) Rohlin A, Wernersson J, Engwall Y, Wiklund L, Björk J, Nordling M. Mozaik mutasyonlarının saptanmasında kullanılan paralel dizileme: dört tanışal DNA tarama tekniğiyle karşılaştırma. Hum Mutat. 2009

17) Lim YH, Moscato Z, Choate KA. Deri hastalıklarında mozaikçilik. Annu Rev Genet. 2017

18) Happle R. Deri mozaikçiliği kategorileri: önerilen bir sınıflandırma. Am J Med Genet A. 2016

19) Hafner C, Groesser L. Mozaik RASopatiler. Hücre döngüsü. 2013

20) Trofektoderm biyopsilerinde mozaikliğin saptanması: mevcut zorluklar ve gelecekteki olasılıklar Antonio Capalbo 1 2, Filippo Maria Ubaldi 1 2, Laura Rienzi 1 2, Richard Scott 3, Nathan Treff 3 (2017)

21) Farklı trofektoderm biyopsi bölgeleri ile yeni nesil sıralama platformuyla ölçülen kromozomal bileşimin iç hücre kütlesi arasındaki uyum Tzu-Hsuan Chuang 1, Jhih-Yuan Hsieh 1, Meng-Ju Lee 1, Hsing-Hua Lai 1, Chia-Lin Hsieh 1, Huai Lin Wang 1, Yu Jen Chang 2, Shee Uan Chen 3 (2018)

22) İnsan blastokistlerinde kromozomal mozaizizm: preimplantasyon genetik testinin nihai zorluğu M Popoviç 1, Bir Deedene 2, C Christodoulou 1, J Taelman 1, L Dhaenens 1, F Van Nieuwerburgh 3, D Güçlendirme 3, E Van den Abbeel 1, P De Sutter 1, B Menten 2, B Heindryckx 1 (2018)

23) İnsan blastokistlerinin sitogenetik yapısı: kapsamlı kromozom tarama stratejilerinden elde edilen bilgiler Elpida Fragouli 1 2, Santiago Munne 3 4 5, (2019)

24) Blastokist aşamasında kapsamlı kromozomal taramanın klinik uygulaması

William B Schoolcraft 1, Elpida Fragouli , John Stevens , Santiago Munne , Mandy G Katz-Jaffe (2010)

- 25) Kapsamlı kromozom taraması, insan embriyolarının üreme potansiyelini yüksek oranda tahmin eder: prospektif, kör, seçimsiz bir çalışma Richard T Scott Jr. 1, Kathleen Feribotu , Jing Su , Xin Tao , Katherine Scott , Nathan R Treff (2012)
- 26) Kapsamlı kromozom taraması, embriyo seçimini iyileştirir: bir meta-analiz Elias M Dahdouh (2015)
- 27) İyi prognozlu hastalarda dondurulup çözülmüş tek embriyo transferi için seçim kriteri olarak anöploidi ve morfoloji için preimplantasyon genetik testi: çok merkezli, randomize bir klinik çalışma Santiago Munne 1, Brian Kaplan 2, John L Frattarelli 3, Tim Çocuk 4, Gary Nakhuda 5, F Nicholas Shamma 6, Kaylen Silverberg 7, Tasha Kalista 8, Alan H Handyside 9, Mandy Katz-Jaffe 10, Dagan Kuyuları 11, tony gordon 12, Sharyn Stock-Myer 13, Susan Willman 14; STAR Çalışma Grubu (2019)
- 28) Extended in vitro culture of human embryos demonstrates the complex nature of diagnosing chromosomal mosaicism from a single trophoctoderm biopsy M Popovic 1, L Dhaenens 1, J Taelman 1, A Dheedene 2, M Bialecka 3, P De Sutter 1, S M Chuva de Sousa Lopes 1 3, B Menten 2, B Heindryckx 1(2019)
- 29) Kopya sayısı varyasyon dizilimi kullanılarak insan blastokistlerinde kromozomal mozaizmin saptanması ve miktarının belirlenmesi Tida Ruttanajit 1, Sujin Chanchamroen 1, David S Cram 2 3, Kritchakorn Sawakwongpra 1, Wanwisa Suksalak 1, Xue Leng 3, Junmei Hayranı 4, Li Wang 4, Yuanqing Yao 4, Wiwat Quangkananurug 1(2016)
- 30) İnfertilite teşhisinin gelişmekte olan blastokistlerin transkriptomu üzerinde önemli bir etkisi vardır. Blair R McCallie 1 2, Jason C Parkları 1 2, Darren K Griffin 3, William B Schoolcraft 4, Mandy G Katz-Jaffe 1 4 (2017)
- 31) Klinik sonuçlar, endometriyal faktör için kontrol edilen 5. gün ile 6. gün tek embriyo transferleri arasında farklılık gösteriyor mu? Tiffany Stankewicz 1, Maria Ruiz-Alonso 2, Marc Soler-Ibañez 3, Carlos Simon 4, Diana Valbuena 5 (2017)
- 32) Mozaik Aneuploid Blastosistlerin Rahim İçi Transferinden Sonra Sağlıklı Bebekler Ermanno Greco 1, Maria Giulia Minasi , Francesco Fiorentino (2015)

33) Kromozomal mozaikçiliğin kapsamı, in vitro fertilizasyon tedavilerinin klinik sonucunu etkiler

Francesca Spinella 1, Francesco Fiorentino 2, Anıl Biricik 1, Sara Bono 1, Alessandra Ruberti 3, Ettore Cotroneo 1, Marina Baldı 1, Elisabetta Cursio 3, Maria Giulia Minasi 3, Ermanno Greco 3 (2018)

34) Mozaik embriyolar zorlu bir klinik karar sunar

Emily K Osman 1, Marie D Werner 2 (2019)

35) Tripolar mitoz ve genomun bölünmesi, insan preimplantasyon gelişimini in vitro olarak durdurur

Christian S Ottolini 1 2 3, John Kitchen 4, Leoni Xanthopoulou 5, tony gordon 5, Michael C Summers 1 2, Alan H Handyside 6 7 (2017)

36) Hızlandırılmış görüntüleme, dengesiz kromozomal translokasyonlar taşıyan embriyoların gecikmiş gelişimini ortaya koyuyor

hadar amir 1, Shiri Barbash-Hazan 1, Yael Kalma 1, Tsvia Frumkin 1, Mira Malkov 1, Nivin Samara 1, Joseph Hasson 1, Adi Reches 1, Foad Azem 1, Dalit Ben-Yosef 2 3 (2017)

37) Carson et al. 1993

38) Anöploidi için PGD'nin in vivo ve in vitro etkinliği ve etkinliği

L Gianaroli 1, MC Magli , AP Ferraretti (2001)

39) Kadın partnerin yaşı arttıkça anöploidinin doğası: Kapsamlı kromozomal tarama ile değerlendirilen 15.169 ardışık trofektoderm biyopsisinin gözden geçirilmesi

Jason M Franasiak 1, Eric J Forman 2, Kathleen H Hong 2, Marie D Werner 2, Kathleen M Upham 3, Nathan R Treff 2, Richard T Scott Jr. 2 (2014)

40) Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ile preimplantasyon genetik tanıdan sonra anne yaşının implantasyon üzerindeki etkisinin azalması

Gary L Harton 1, Santiago Munne , Mark Surrey , Jamie Grifo , Brian Kaplan , David H McCulloh , Darren K Griffin , Dagan Wells ; PGD Uygulayıcı Grubu (2013)

41) Preimplantasyon genetik tanı için yeni nesil dizileme

Nathan R Treff , Eric J Forman , Richard T Scott Jr. (2013)

42) IVF embriyo seçimleri ve gebelik sonuçları

50) Yüksek çözünürlüklü yeni nesil dizileme kullanımıyla blastosist aşamasında mozaikliğin saptanması

Santiago Munne 1, Wells 2 (2017)

51) Klinik kullanım için bir embriyo sıralama sistemi formüle etmek için bin mozaik embriyo transferinden elde edilen sonuç verilerinin kullanılması

Manuel Viotti 1, Andrea R Victor 2, Frank L Barnes 3, Christo G Zouves 3, Andria G Besser 4, James A Grifo 4, En Hui Cheng 5, Maw-Sheng Lee 6, Jose A Horcajadas 7, Laura Corti 8, Francesco Fiorentino 9, Francesca Spinella 9, Maria Giulia Minasi 10, Ermanno Greco 10, Santiago Munne 11 (2021)

52) Anöploidi tahlili ve biyopsinin etkisi için hedeflenen yeni nesil dizileme tabanlı preimplantasyon genetik testi kullanılarak bir anöploid tanısının prediktif değerini değerlendiren çok merkezli, prospektif, kör, seçimsiz bir çalışma

Ashley W Tiegs 1, Xin Tao 2, Yiping Zhan 2, Christine Whitehead 3, Julia Kim 4, Brent Hanson 4, Emily Osman 4, Thomas J Kim 5, George Patunakis 6, Jacqueline Gutmann 7, arthur castelbaum 7, Emre Seli 8, Chaim Jalas 2, Richard T Scott Jr. 4 (2021)

53) İmplantasyon Öncesi İnsan Embriyolarında Mozaizm: Kromozomal Anormallikler Norm Olduğunda Rajiv C McCoy, 2017

54) Tek nükleotid polimorfizm dizisi analizi ile tanımlanan mozaikçilik, kimerizm ve uniparental dizomy mekanizmaları; Laura K Conlin 1, Brian D Thiel , Carsten G Bonnemann , Livija Medne , Linda M Ernst , Elaine H Zackai , Matthew A Deardorff , Ian D Krantz , Hakon Hakonarson

55) Yardımcı üreme teknolojisi döngülerinde implantasyon öncesi insan embriyoları için kültür ortamı ;Mohamed MA Youssef 1, Eleni Mantikou , Madelon van Wely , Fulco Van der Veen , Hesham G Al-Inany , Sjoerd Temsilcisi , Sebastiaan Mastenbroek, 2015

56) İnsan embriyoları genellikle gelişim sırasında anormal çekirdekler oluşturur: DNA hasarı, embriyonik anöploidi ve gelişimsel duraklama mekanizması

Daniel H Kort 1, Gloryn Chia 2, Nathan R Treff 3, Akemi J Tanaka 2, Tongji Xing 4, Lauren Bauer Vensand 5, Stephanie Micucci 2, Robert Prosser 6, Roger A Lobo 6, Mark V Sauer 6, Dieter Egli 7, 2016

- 57) İmplantasyon Öncesi Gelişim Sırasında Kompleks Mitotik Kökenli Anöploidiye Karşı Seçim Kanıtı. Rajiv C. McCoy, Zachary P. Demko, Allison Ryan, Milena Banjević, Matthew Tepesi, Styrmir Sigurjonsson, Matthew Rabinowitz, Dmitry A. Petrov, 2015
- 58) Uluslararası Kısırlık ve Doğurganlık Bakımı Sözlüğü, 2017. Fernando Zegers-Hochschild, David Adamson , İpek Boyacı , Catherine Rakovski , Jacques de Mouzon , Rebecca Sokol , Laura Rienzi
- 59) ESHRE PGT Konsorsiyum Yönlendirme Komitesi , ESHRE PGT Konsorsiyumu PGT organizasyonu için iyi uygulama tavsiyeleri, 2020
- 60) PGT Sağlayıcıları Kitapçığı-ABD, 2022
- 61) Shahine LK, Marshall L., Kuzu JD, Hickok LR, Blastosistlerde daha yüksek anöploidi oranları ve in vitro fertilizasyon uygulanan azalmış yumurtalık rezervi olan tekrarlayan gebelik kayıplı hastalarda daha yüksek embriyo transferi olmama riski., Fertil Steril. 2016
- 62) Mozaik Embriyo Transferi Konusunda PGDIS Uzman Danışmanlığı Raporu, 19 Ağustos 2021
- 63) Mozaiklik: "en güçlü olanın hayatta kalması" ve "geride hiçbir embriyo kalmaması" Santiago Munne , James Grifo (2016)
- 64) The Pregnancy Outcome of Mosaic Embryo Transfer: A Prospective Multicenter Study and Meta-Analysis
Ying Xin Zhang, Jang Jih Chen, Sunanta Nabu, 2020
- 65) İnsan Embriyolarının Parçalanmasının Hücresel ve Moleküler Doğası
Anna Cecchele , Greta Chiara Cermisoni , Elisa Giacomini , Monica Pinna , Paola Vigano (2022)

