

Canlılığını Yitirmiş Embriyolarda Gözlenen Anöploidi Sıklığının Sperm-FISH ve Sperm-Apoptozis Sonuçları ile Karşılaştırılması

Comparison of Aneuploidy Frequency to Sperm FISH and Sperm Apoptosis Results in Embryos That Lost the Vitality

Dr. Tufan ÇANKAYA,^a
Dr. Cihangir ÖZKINAY,^b
Cumhur GÜNDÜZ,^c
Dr. Erol TAVMERGEN,^d
Dr. Elçin BORA,^a
Dr. Ferda ÖZKINAY^b

^aTıbbi Genetik AD,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
^bTıbbi Genetik AD
^cTıbbi Biyoloji AD
^dKadın Hastalıkları ve Doğum AD,
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 27.01.2010
Kabul Tarihi/Accepted: 03.11.2010

Bu makale, Avrupa Genetik Kongresi (ESHG 2006, 6-9 Mayıs 2006, Amsterdam)'nde tebliğ edilmiştir.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Tufan ÇANKAYA
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik AD, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
tcankaya@gmail.com

ÖZET Amaç: Embriyolarda görülen kromozom anomali oranının spontan abortuslarda görülen değerlere göre daha yüksek olduğu bilinmekte ve bu oran yaklaşık %23 ile 80 arasında değişmektedir. Bu çalışmada gelişimi durmuş embriyolarda;

- 13,16,18,21 ve 22 nolu kromozomlara ait sayı anomalilerinin araştırılması
- Kromozom anomali oranları ile aynı sıklukta bulunan embriyoların canlılık oranları arasındaki ilişkinin gösterilmesi,
- Ve aynı sıklukta elde edilmiş sperm hücrelerindeki kromozom sayı anomalileri ile apoptozis ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Gelişimi durmuş 20 embriyoda 13,16,18,21 ve 22 nolu kromozomların sayısal anomalileri FISH yöntemi ile analiz edildi. Aynı yöntemle embriyoların babalarından aynı sıklukta elde edilen sperm hücrelerinde X,Y ve 18 nolu kromozomların sayı anomalileri analiz edildi. Sperm hücrelerinde apoptozis durumunu değerlendirmek için TUNEL testi kullanıldı. **Bulgular:** Gelişimi durmuş embriyolardaki kromozom sayı anomali oranı %80 olarak bulunmuştur. Embriyolarda görülen sayısal anomali oranı ile embriyolardaki canlılık oranları ve spermlerdeki toplam anomali oranı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Sperm apoptozisi ile embriyolarda görülen sayısal anomali oranları arasında ilişki saptanmamıştır. Spermelerde görülen kromozom anomali sayısı ile spermiogram sonuçları arasında anlamlı sonuç saptanmıştır. **Sonuç:** Gelişimi durmuş embriyolarda 13,16,18,21 ve 22 nolu kromozomlara ait sayısal anomali oranı yüksektir. Spermelerde görülen sayısal kromozomal anomali ve apoptozis sıklığı ile incelediğimiz embriyolarda görülen sayısal kromozomal anomaliler arasında ilişki bulunmamış fakat baba adaylarından elde edilen spermiogram sonuçları ile gelişimi durmuş embriyolarda görülen sayısal anomaliler arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Preimplantasyon tanısı; in situ hibridizasyon, floresans; blastomerler; anöploidi; in situ nick-end labeling

ABSTRACT Objective: Rate of chromosomal abnormality which is seen in embryos is higher than those in spontaneous abortions. This rate varies from 23 to 83 percent. In this study; in embryos with developmental arrest, we aimed

- To investigate the number abnormalities in 13rd, 16th, 18th, 21st and 22nd chromosomes,
- To show the correlation between the chromosomal abnormality rates in embryos with developmental arrest and rate of live embryos in same cycle.
- To investigate the correlation between the apoptosis and the chromosomal number abnormalities in embryos with developmental arrest and sperm cells that are obtained in same cycle.

Material and Methods: In twenty embryos with developmental arrest, the number abnormalities of 13rd, 16th, 18th, 21st and 22nd chromosomes were analyzed with FISH method. The chromosomal numbers of X, Y and 18th chromosomes were analyzed with same methods in sperm cells that are obtained from the fathers of embryos at the same cycle. Apoptosis status in sperm cells was assessed with TUNNEL test. **Results:** The chromosomal number abnormality rates was 80 % in embryos with developmental arrest. No significant correlation was detected between the abnormality rate in embryos and living embryo rate as well as total abnormality rate in sperm cells. No correlation was detected between sperm apoptosis and chromosomal abnormality rates in embryos. However a significant correlation was detected between chromosomal abnormality rate and spermiogram results. **Conclusion:** In embryos with developmental arrest, chromosomal abnormality rates were higher in 13rd, 16th, 18th, 21st and 22nd chromosomes. Chromosomal abnormality and apoptosis frequency in sperms were not significantly correlated with chromosomal abnormalities in embryos however a significant correlation was found between spermiogram results of fathers and chromosomal abnormalities in embryos with developmental arrest.

Key Words: Preimplantation diagnosis; in situ hybridization, fluorescence; blastomeres; aneuploidy; in situ nick-end labeling

doi:10.5336/medsci.2010-16982

Copyright © 2011 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(4):896-903

Embriyoların erken dönem kayıplarında en önemli faktörün genetik nedenli olduğu görülmüştür. Bu nedenlerden en sık kromozom sayı anomalilerinin sorumlu olduğu bilinmekte ve kromozomları açısından sağlıklı embriyoların seçimi, gelişen teknoloji ile gerçekleştirilebilmektedir. İnsan embriyolarından yapılan kromozom analizleri, anöploidi sıklığının prenatal testlerde bulunanlardan daha fazla olduğunu göstermiştir. Anomalili embriyoların, gelişimin erken basamaklarında kayb olduğu düşünülmektedir.¹⁻⁸ Yapılan çalışmalarda, ileri anne yaşı ile anöploidi; embriyonel gelişim durması ile poliploidi ve yavaş gelişim ile post-mayotik kromozom anomalileri arasında doğrudan ilişki gösterilmiştir.^{4,9}

Spermlerde yapılan çalışmalar, cinsiyet kromozomları ile 21 ve 22 nolu kromozomlara ait anomalilerinin sıklığının yüksek olduğunu göstermiştir.¹⁰⁻¹⁴ Mayotik bozukluk gösteren olgular incelendiğinde ise sperm diploidisinin en sık rastlanan kromozom bozukluğu olduğu gösterilmiştir.¹⁵ Spermlerdeki kromozom anomalileri ile kromozomal anomalili embriyolar arasındaki ilişkiyi saptamak için yapılan çalışmalar; cinsiyet kromozom anomalileri, otozomal dizomiler ve nadir görülen diploidileri ortaya çıkarmak üzere yoğunlaşmış, triploid gebelik ürünlerinde, diploid sperm oldukça önemli bir role sahip olduğu görülmüş ve bu durumun anafaz I evresinde sinaptik anomaliler nedeniyle oluşabileceği öne sürülmüştür.¹⁶ İnfertil erkeklerin spermlerinde çocuk sahibi olanlara göre daha çok cinsiyet kromozom hiperhaploidileri ve diploid sperm nükleusları şeklinde artmış anöploidi oranları olduğu gösterilmiştir.^{13,16}

İnfertil erkeklerde kromozom anomalisi normal populasyona göre on kat artmış görünmesine rağmen, pek çok infertil erkek normal karyotipe sahiptir. Fakat bunların çoğunun spermiogramları anormaldir. Yapılan çalışmalarda, bu grup için artmış kromozom sayı anomalisi ve diploid sperm oranına rastlanmıştır. Bu bilgi klinik veri olarak kullanılacak olursa, spermatositlerdeki anöploidi ve diploidinin direkt olarak sayı ve motilite ile ilişkili olduğu söylenebilir.^{13,17-19}

Artan baba yaşıyla ilişkili olarak germ hücre kuşağında hücre hasarlanması görülmektedir.²⁰ Er-

kek germ hücrelerindeki bu DNA hasarlanması, bir bakıma DNA tamir mekanizmalarındaki azalma nedeniyle karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, spermatogenezis sırasında hücresel mekanizmalar, bu hasarlanmış spermlerin tümüyle apoptozise girmesine izin verir ve eşey hücre farklılaşması böylece sorunsuz tamamlanmış olur.^{21,22} Sonuç olarak ejaküle edilmiş gametler hem mitotik hem de nükleer yönden genetik hasarlanmayı gösterebilmektedir.²³ Fertilizasyon sonrası dönemde gerçekleşen en ufak bir hata ise karşımıza mutasyon olarak çıkmakta ve doğumdaki sağlıklı çocukların bir sebebi olabilmektedir.^{24,25} Spontan düşüklerin yaklaşık %50-70'inin kromozom anomalilerine, %50'sinin ise bilinmeyen genetik ve epigenetik faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir.^{26,27} Sonuçta, embriyo gelişimi ve sağlıklı döllerin oluşturulmasında babaya ait etkinin araştırılması oldukça önemlidir. Bu etkiler, genetik ve epigenetik olarak insan spermünde gerçekleşen DNA değişikliklerine bağlıdır.²⁸

Embriyolarda yapılan çalışmalar %23-80 oranında anöploidi bulunduğunu göstermektedir. Anöploidinin nedeni anneye bağlı faktörler olabileceği gibi problem baba kaynaklı da olabilmektedir.^{3,9,29-31} Bu çalışmada, erken dönemde bulunan embriyolarda gelişimin durmasını açıklamaya çalışmak üzere embriyonun kendisinde ve babadan elde edilen spermlerde araştırma planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma kapsamına, toplam 20 çiftten elde edilen canlılığını yitirmiş embriyo dahil edilmiş ve bu embriyoların oluşturulması sırasında kullanılan spermleri içeren ejakulat sıvıları incelemeye alınmıştır. Çalışma, Helsinki Deklerasyon 2008 prensiplerine uygun olarak yapılmış olup, Ege Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Her bir olgudan bilgilendirilmiş onam formu imzatarak alınmıştır.

Fertilizasyon sonrası üçüncü günü ve sonrası bölünme aşamasında durmuş embriyolar blastomer biyopsisi için ayrılmıştır.

Blastomer biyopsisi için mekanik parçalama, lazer biyopsi veya asid tyrode's (pH: 2.4) yöntemlerinden uygun olanı ile gerçekleştirilmiştir. Blas-

tomer fiksasyonu literatürde tariflendiği gibi gerçekleştirilmiştir.³²

On üç, 16, 18, 21 ve 22 nolu kromozomlara uygun direkt isaretli prob (MultiVysion PB, Vysis, US) çalışma protokolünde belirtildiği gibi çalışılmış, denatürasyon için 73°C, 5 dakika; hibridizasyon için 37 °C, 3 saat 30 dakika uygulanmıştır. Tüm değerlendirme işlemleri fluoresan mikroskopta (Olympus BX50) eş zamanlı olarak iki kişi tarafından gerçekleştirilmiştir.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) yapılacak çiftlerden mastürbasyon yolu ile elde edilmiş semen spermilerin ICSI işlemi için kullanıldıktan sonra flöresan in-situ hibridizasyon (FISH) analiz ve apoptozis analizi için ayrılmıştır. Sperm FISH analizi literatürde tariflendiği şekilde yapılmış olup incelemeler iki kişi tarafından eş zamanlı gerçekleştirilmiştir. FISH analizi sırasında X,Y ve 18 nolu kromozom problemleri kullanılmıştır (AneuVysion, Vysis, US). Babalarda gözlenen spermogram anomalileri, derecesine göre normalden ağıra doğru (normal, teratospermi, oligospermi, oligoastenospermi, oligoastenoteratospermi, ve azospermi) sıralanmıştır. Apoptozis için TUNEL test (Roche TUNEL Kit, Cat no.1684795) üretici firma protokolü eşliğinde kullanılmıştır. Karşıt boyama propidium iodide (1 µg/ml) ile sağlanmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gruplar arasındaki ilişkinin gösterilmesi için lineer regresyon, non-parametrik korelasyon (Kendall's tau) ve Pearson χ^2 analizi uygulanmıştır. Çalışmada SPSS V.11 (Windows XP için) paket programı kullanılmış olup $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGU VE SONUÇLAR

İncelenen embriyoların anne adaylarının yaş ortalaması 30.80 ± 6.246 (min: 20, max: 41); baba adaylarının yaş ortalaması 35.20 ± 6.502 (min: 20, max: 47) olarak bulunmuştur.

Gelişimi durmuş 20 embriyonun ebeveynlerinin in vitro fertilizasyon (IVF) merkezine başvuru nedenleri incelendiğinde toplam 24 endikasyon (bazı olgularda birden fazla endikasyon vardı) olduğu görülmüştür. Bu endikasyonlar görülme sık-

lığına göre androlojik (13/24); düşük oogenez cevabı (4/24); nedeni belirlenemeyen infertilite (idiyopatik) (3/24); ileri anne yaşı (1/24); genital tüberküloz (1/24); tubal nedenler (1/24) ve tekrarlayan IVF denemesi (1/24) şeklinde sıralanmıştır. Tüm olgularda spermogram yapılmıştır. Olguların, IVF merkezine başvuru nedenleri ve spermogramları Tablo 1'de verilmiştir.

Olgu embriyolarının incelemesinin yapıldığı siklustaki tüm embriyolar dikkate alındığında aile başına elde edilen ortalama embriyo sayısının 6.75 ± 3.89 ve canlı kalan embriyo ortalamasının 3.60 ± 2.437 olduğu görülmüştür. Siklusta elde edilen embriyo sayısı ile bu embriyolarda gözlenen canlı kalma oranları arasında korelasyon analizi uygulanmış olup istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır (R: 0.579 ; $p < 0.05$).

Anne ve baba yaşının embriyoların canlı kalma oranları üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmış ve sonuçlar anlamlı bulunmamıştır (R: 0.261, $p > 0.05$); (R: 0.197, $p > 0.05$).

Gelişimi durmuş embriyoların beş kromozom için 13,16,18,21 ve 22 problemleri ile araştırıldığında embriyoların her birinin 0 ile 5 kromozomu ilgilendiren anomali taşıyabildiği görülmüş ve embriyo başına düşen anomali ortalaması 1.85 ± 1.599 olarak bulunmuştur. Tüm embriyolarda toplam 37 farklı anomali tespit edilmiş ve en sık rastlanan anomali grubunun monozomi olduğu (27/37), bunun dışında yedi embriyoda tetrazomi; iki embriyoda trizomi ve bir embriyoda nullizomi bulunduğu saptanmıştır.

İncelenen kromozomlar açısından yapılan dağılımda en sık 18 nolu kromozoma ait anomalilerin bulunduğu (%80) görülmüş, diğer kromozomlar için (13,16,21,22) anomalilerin toplamın %20'sini oluşturduğu saptanmıştır.

Çalışma sonucuna göre ortalama sperm-FISH anomali yüzdesi 10 ± 11.965 (min: %0; max: %47) olarak tespit edilmiştir.

Embriyo FISH anomali yüzdesi ile spermogram anomalisi arasında Pearson χ^2 analizi uygulanmış olup aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur (χ^2 : 35.726, $p < 0.05$).

TABLO 1: Olguların in vitro fertilizasyon merkezine başvurma nedenleri ve spermiogram sonuçları.

Embriyo No	Başvuru Nedeni	Spermiogram Sonuçları
1	Androlojik	Oligospermi
2	Androlojik+düşük-oogenez cevabı	Azospermi
3	Tubal	Normal
4	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi
5	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi
6	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi Şiddetli
7	Androlojik	Azospermi
8	Düşük oogenez cevabı	Normal
9	İdiyopatik	Normal
10	İdiyopatik	Normal
11	İleri anne yaşı, genital tüberküloz,tekrarlayan IVF denemesi	Normal
12	Androlojik	Oligospermi
13	İdiyopatik	Normal
14	Androlojik+düşük oogenez cevabı	Teratospermi
15	Androlojik	Oligospermi
16	Androlojik	Teratospermi
17	Androlojik	Oligoasthenoteratospermi
18	Androlojik	Oligospermi
19	Düşük oogenez cevabı	Normal
20	Androlojik	Oligoteratospermi

Anne ve baba yaşı ile embriyo FISH anomali sayısı arasında korelasyon analizi uygulanmış olup anlamlı ilişki bulunmamıştır (R: 0.362; $p > 0.05$ /R: 0.392; $p > 0.05$).

Sperm FISH sonuçları ile önceki IVF deneme sayısı arasında korelasyon analizi uygulanmış olup anlamlı sonuç elde edilmiştir (R: 0.380; $p < 0.05$).

Sperm FISH anomali oranlarının embriyo canlılık oranlarına olan etkisi araştırılmış olup istatistiksel anlamlı sonuç elde edilmemiştir (R: 0.132; $p > 0.05$).

Olgulardan elde edilen spermere uygulanan TUNEL test sonucuna göre ortalama apoptozis oranı 10.490 ± 9.2417 olarak tespit edilmiştir.

Sperm apoptozis sonuçlarının baba yaşları ile karşılaştırılması sonucu anlamlı ilişki saptanmamıştır (R: 0.07; $p > 0.05$).

Sperm apoptozis sonuçları ile sperm FISH sonuçları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (R: 0.135; $p > 0.05$).

Sperm apoptozis oranlarının embriyo canlılık oranlarına olan etkisi araştırılmış olup istatistiksel anlamlı sonuç elde edilmemiştir (R: 0.109; $p > 0.05$).

TARTIŞMA

Androlojik nedenli infertilite, in vitro fertilizasyon (IVF) merkezlerine başvuran çiftlerin yaklaşık %50'sinde söz konusu olup spermelerin kalitatif-kantitatif problemleri ve/veya iletili kanallardaki defekt-tıkanıklık nedeniyle ortaya çıkmaktadır.^{33,34} Ülkemizde infertilite olgularında öncelikle kadına uygulanan tedavi yöntemleri sayesinde çiftlerin bir kısmında hamilelik gerçekleşmektedir. Eğer hamilelik olmazsa ikinci seçenek olarak erkeğe bakılmakta ve bu durum sorunun erkekte olduğu olgular için IVF merkezine yapılan başvurulardaki artışı açıklayabilmektedir. Androlojik nedenler ile başvuran olgularımızın spermiogramlarında; azospermi, oligoasthenoteratospermi, oligospermi, oligoteratospermi ve teratospermi bulunmaktaydı (Tablo 1). Bu endikasyonlar, IVF merkezlerine başvuran çiftlerde testiküler sperm ekstraksiyonu (TE-

SE) ve ICSI uygulamalarını gerektirmektedir. Bu yöntemlerin uygulamaya girmesiyle, oositlerde dölleme oranı artmıştır.³⁵

Tüp bebek merkezleri, anne adayına yerleştirilecek embriyo seçimi için farklı değerlendirme yöntemleri uygulamaktadır. Burada en sağlıklı embriyonun seçilerek anne adayının çoklu gebeliklerden korunması amaçlanmaktadır. Seçim yapılacak grup ne kadar büyük olursa sağlıklı olan bireylerin de aynı oranda daha fazla olacağı bilinmektedir. Bu amaçla tüp bebek merkezleri elde ettikleri embriyolarda canlılık oranlarının artırılması amacıyla kültür ortamlarından etüv koşullarına kadar her şeyi ayarlayan düzenlemeler yapmaktadır.³⁶ Literatürde efektif bir preimplantasyon genetik tanı (PGT) siklusunda elde edilmesi gereken minimum embriyo miktarları belirtilmiştir. Vandervorst ve ark. PGT yapılması planlanan bir siklusta en az altı adet embriyonun olmasını önermektedirler.³⁷ Bizim incelediğimiz grupta, siklus başına elde edilen embriyo sayısı ortalama 6.75 ± 3.89 olarak bulunmuştur. Çalıştığımız olgularda PGT yapılmamıştır. Fakat bu olgular, PGT yapılacak bir grup olarak değerlendirilseydi elde edilen ortalama embriyo sayıları literatürde belirtilen efektif PGT şartlarını sağlayabilecekti. Embriyo elde etmenin ardından ikinci önemli basamak bu embriyoların canlılığını devam ettirilmesinin sağlanmasıdır. Elde edilen embriyolardaki canlılık oranı, transfer edilecek embriyolar için alternatifleri arttırması açısından önemlidir. Gardner ve ark. yaptıkları çalışmada elde ettikleri embriyoların sadece %46.5'inin blastokist aşamasına ulaştığını göstermiştir.³⁸ Çalıştığımız grupta embriyolarda canlı kalma oranı %49 olarak bulunmuştur. Siklusta elde edilen embriyo oranları ile bu embriyolarda gözlenen canlılık oranları arasındaki ilişkiyi saptamak için korelasyon analizi uygulanmış ve gruplar arasında anlamlı sonuç elde edilmiştir. Siklusta ne kadar çok embriyo elde ediliyorsa bu embriyolardaki canlı kalma oranları da o kadar yüksek olmaktadır.

PGT ve prenatal tanıda anöploidi taraması için ileri anne yaşının sınırı ülkeden ülkeye değişmektedir.^{23,39} Genel olarak 35-39 yaş arası sınır değer olarak kabul edilmekte ve bu yaşın üstünde IVF uygulaması yaptıranlara PGT işlemi öneril-

mektedir. İleri anne yaşının mayotik ayrılama "non-disjunction" ile olan ilişkisi iyi bilinmektedir.⁴⁰ Bu nedenle ileri anne yaşı gebeliklerinde embriyonun ve/veya fetusun kromozomal açıdan herhangi bir anomaliye sahip olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla prenatal tanı yöntemlerinin veya PGT yöntemlerinin uygulanması önem kazanmaktadır. Prenatal tanı amacıyla ülkemizde genel olarak ileri anne yaşı için sınır otuz beş olarak kabul edilmekte ve bu yaş grubundaki anne adaylarında Down sendromlu çocuk doğurma riskinin yaklaşık 1/350 olduğunu görülmektedir.⁴¹ Çalıştığımız grupta annelerin yaşları 22 ile 41 arasında idi ve grubun yaş ortalaması $30.80 (\pm 6.246)$ olması nedeniyle grup genç anne adaylarından oluşmaktaydı.

Çalışma grubunda androlojik veya nedeni belli olmayan (idiyopatik) olgular, toplamın %80'ini oluşturmaktadır. Tüp bebek merkezlerine başvurularda nedeni belirlenememiş veya androlojik olgular, çoğunluğu oluşturmaktadır. Bu açıdan bakıldığında incelediğimiz grubun literatürde bildirilen başvuru nedenleriyle uyumlu olduğu görülmüştür.⁴²

Baba yaşının sperm kalitesi ile ilişkisi bilinmektedir. Eskenazi ve ark. yaptıkları çalışmada ilerleyen baba yaşı ile sperm kalitesinde bozulma olduğunu göstermiştir.⁴³ Fakat bu kalite bozukluğunun infertilite ile ilişkisi olmakla birlikte literatürde, bu durumun elde edilen embriyolardaki canlılık oranlarına etkisini gösteren bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada anne ve baba yaşlarının embriyo canlılıkları üzerine olan etkisinin araştırılması için korelasyon analizi uygulanmış olup sonuçlar arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda, incelenen olgu sayısının az olmasına rağmen bu konuda yapılan ilk çalışma olması nedeniyle sonuçların önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle, baba yaşının embriyo canlılık oranları üzerine etkisinin olmadığını, bu konuda ayrıntılı bilginin ise geniş serileri kapsayan çalışmaların yapılmaya başlanmasıyla kesinlik kazanacağını düşünmekteyiz. Baba yaşının fertiliteye olan etkisi için bu kadar az çalışma olmasına rağmen anne yaşının infertil olgularda sıkça araştırılmış olduğunu bilmekteyiz.²

Gelişimi durmuş embriyolar için en önemli nedenin kromozom bozukluğu olduğu belirtilmiştir.⁴⁴ Yapılan çalışmalarda %23 ile %80 arasında kromozomal anomalinin tespit edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ise anomalili embriyoların oranının %80 olduğu görülmüş ve sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Munne; 22, 16, 15 ve 21 nolu kromozom bozukluklarının daha sık görüldüğünü X, Y, 14, 6, ve 18 nolu kromozomlara ait bozuklukların ise daha az tespit edildiğini belirtmiştir.³⁹ Bizim çalışmamızda en sık görülen kromozom bozukluğunun 18 nolu kromozoma ait olması literatürde bulunan değerlerden farklı olmuştur. Çalıştığımız grupta literatürde çalışılanlardan farklı olarak gelişimi durmuş embriyo kullanımı nedeniyle sonuçlar farklı bulunmuş olabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada spermiogramda görülen anomali şiddeti ile embriyolarda görülen kromozom anomali sıklığı arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur. Bununla birlikte sperm FISH sonuçları ile embriyolarda görülen kromozom anomali sıklığı arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Bu durum şiddetli erkek infertilitesinin önemli bir PGT endikasyonu olarak kullanılmasını anlamlı kılmıştır.⁴⁵ Böyle bir durumda PGT için başvuru yapmış çiftlerin incelenmesinde sperm FISH analizinin ne kadar gerekli olduğunun sorgulanması gerekmektedir. Standart tüp bebek başvurularında uygulanan spermiogram incelemesinin elde edilen embriyolarda PGT uygulaması için yeterli bir sebep olacağını düşünmekteyiz.

Embriyolarda görülen sayısal kromozom anomalilerinin anne yaşı ile bağlantısını gösteren çalışmalar mevcuttur.^{24,39} Bizim çalışmamızda anlamlı sonuç elde edilememiş olmasının iki nedeni olabilir; birincisi, incelediğimiz grupta bulunan anne adaylarının yaş ortalamasının genç anne grubunda olması, ikincisi incelediğimiz gruptaki olgu sayısının az olması. Baba yaşının ilerlemesi ile cinsiyet kromozomlarının artmış anöploid riskini gösteren literatürde bildirilmiş yayınlar vardır. Martin ve ark. yaptıkları çalışmada otozom kromozomlarda baba yaşı ile birlikte artmış risk göstermelerine rağmen diğer çalışmalarda anlamlı sonuç elde edilme-

miştir.^{34,46,47} Bizim çalışmamızda, baba yaşının embriyolarda saptanan FISH anomalileri ile karşılaştırılması sonucunda anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu sonuçlar ile, baba yaşının embriyoda görülen kromozom sayı anomalilerine etki etmediğini düşünebiliriz.

FISH yöntemlerinin uygulamaya başlanmasından itibaren sperm nükleuslarındaki kromozomal durumun ortaya çıkarılması için çalışmalar yapılmaktadır.¹⁰⁻¹² Bu çalışmada sperm hücreleri X, Y ve 18 nolu kromozomlara ait FISH problemleri ile sayısal anomali var/yok şeklinde incelenmiştir. İncelemede X, Y ve 18 nolu kromozomların seçilmesinin iki nedeni vardır: Bunlardan ilki cinsiyet kromozom anomalilerinin spermelerde daha sık karşımıza çıkması, ikincisi prob setinin kullanılabilirliğinin kolay olmasıydı. Sperm FISH sonuçlarında anomali oranı %0 ile %47 arasında bulunmuş olup ortalaması %10 (± 11.965) olarak tespit edilmiştir.

Spermiogramda gözlenen durumun sperm FISH ile ileri tetkik edilmesi, klinisyene PGT uygulaması sırasında ek bilgi sağlayacaktır. Bu durumda sperm FISH sonuçları gerek ve şart olmakla birlikte PGT uygulayıcı ekip için uygulama sırasında olabileceklerin önceden fark edilmesine yardımcı olabilecektir. Ayrıca çalışmamızda tespit ettiğimiz sperm FISH anomali sıklığı ile önceki IVF denemesi sayısı arasındaki anlamlı korelasyon, tüp bebek uygulaması için ilk başvuru yapan çiftlerde uygulamanın başarısı hakkında bilgi sağlayıcı olabilecektir.

Sperm FISH anomalilerinin incelendiği farklı gruplarda birbiri ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalarda genel olarak infertilite nedeniyle başvuru yapan olgularda yüksek oranda kromozom sayı anomalisi görülmektedir. Geol ve ark. yaptıkları çalışmada ICSI uygulanan olgularda daha yüksek oranda sperm FISH anomali oranı tespit etmişlerdir.⁴⁸ Martin ve ark. oligozoospermik olgularda kromozom sayı anomalileri için artmış risk olduğunu göstermişlerdir.⁴⁶ ICSI uygulanan veya infertilite nedeniyle IVF merkezlerine başvuran olgularda görülen bu yüksek orandaki kromozom sayı anomalisinin embriyolarda bulunabilecek kromozom sayı anomalileri için yüksek riski de bera-

berinde getirebileceğini düşünüyoruz. Ayrıca embriyoların gelişiminin durmasından en fazla genetik faktörlerin sorumlu olduğunu bilmekteyiz.^{10,49} Çalışmamızda sperm FISH anomalileri ile embriyo canlılıkları arasında anlamlı bir sonuç elde edilememiş olması nedeniyle incelediğimiz grupta tek başına sperm FISH anomalilerinin yeterli olmadığını düşünebiliriz. Etki eden diğer faktörlerin araştırılması için planlanan çalışmaların, embriyo canlılığını arttırmak için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Gorzyca ve ark. yaptıkları çalışmada baba yaşının sperm apoptozisinde önemli bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir.²¹ Bu çalışmamızda baba yaşı ile sperm apoptozis oranları arasında anlamlı korelasyon tespit edilmedi. Çalışmadaki yaş gruplarına göre olgu sayısının az olması sonucu etkilemiş olabilir. Ayrıca incelenen gruptaki erkekler, gelişmesini durdurmuş embriyoların ebeveynleri olduğu için ve IVF başvuruları nedenleri içinde en sık androlojik nedenler geldiği için böyle bir ilişkinin aranmasının bir grupta uygun olmayacağı düşünülmüştür.

Erkek infertilitesinin sebeplerini açıklamak için yapılan çalışmalarda ayrı ayrı olarak kromozom sayı anomalileri ve apoptotik hücre oranları kullanılmıştır. Literatürde bu iki parametrenin birlikte değerlendirildiği Carrell ve ark.na ait çalışma bulunmuştur. Tekrarlayan düşükleri olan çiftlerdeki erkeklerden elde edilen sperm örneklerinde sperm FISH anomalileri ile apoptotik hücre oranla-

rı birbiri ile uyumlu bulunmuştur.⁵⁰ DNA fragmantasyonu ile spermlerdeki kromozom sayı anomali oranı arasındaki bu uyum ilgi çekicidir. Spermatogenez sırasında gerçekleşen mekanizmalar bu durumun açıklanmasında önemli rol oynamaktadır. Spermatogenez ve mayoz, mayotik kontrol noktaları ile düzenlenmektedir. Bunlarda gerçekleşen mayotik hatalar hücresel apoptozisi uyarabilir ve bu şekilde spermlerde sayısal kromozom anomalileri ile apoptozis oranları arasında uyum görülebilir. Sperm FISH sonuçları ile sperm apoptozis oranları karşılaştırması sonucunda aralarında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Sonucumuzun bu çalışmada bulunan sonuçtan farklı olmasını açıklamaya çalışacak olursak incelenen grupların birbirinden farklı olmasıyla açıklayabiliriz. Çalıştığımız grupta hiçbir çiftin üçten fazla düşüğü bulunmamaktaydı. Yani çiftler arasında tekrarlayan gebelik kaybı bir endikasyon değildi.

Sonuç olarak; gelişimi durmuş embriyolarda %80 oranında sayısal kromozom anomalisi saptanmış olup, bu anomalilerin en sık 18 nolu kromozomu ilgilendirdiği ve en çok da monozomi (27/37) olduğu görülmüştür. Her siklusta elde edilen embriyo sayısı ile canlı kalım oranları birbiri ile korelasyon göstermiştir. Spermiogramda görülen anomali şiddetinin embriyoda görülen kromozom anomalileri ile uyumlu olduğu bulunmuş, sperm FISH anomali oranları ile sperm apoptozis oranlarının embriyoların canlı kalma oranlarına etkisi olmadığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001;16(9): 1954-8.
2. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985;70(1):11-7.
3. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980;44(Pt 2):151-78.
4. Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 64(2): 382-91.
5. Warburton, D, Kline J, Stein, Z. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In: Porte IH, Wiley A, eds. *Perinatal Genetics: Diagnosis and Treatment*. 1st ed. New York: Academic Press; 1980. p.133-48.
6. 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(1): 97-101.
7. Bahçe M. [Preimplantation genetic diagnosis]. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2007;3 (13): 108-12.
8. Sherman SL, Petersen MB, Freeman SB, Hersey J, Pettay D, Taft L, et al. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. *Hum Mol Genet* 1994;3(9): 1529-35.
9. Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000;1(1):17-26.

10. Martin RH, Rademaker AW. Nondisjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999;86(1):43-5.
11. Downie SE, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD. Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997;3(9):815-9.
12. Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;3(5):441-52.
13. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15(2):351-65.
14. Vidal F, Blanco J, Egozcue J. Chromosomal abnormalities in sperm. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183(Suppl 1):S51-4.
15. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;6(1):93-105.
16. Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, et al. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2000;17(6):307-9.
17. Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, et al. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 2001;16(7):1433-9.
18. Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L. Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet* 1998;102(2):129-37.
19. Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16(10):2084-92.
20. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003;80(6):1420-30.
21. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207(1):202-5.
22. McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril* 2004;81(Suppl 1):767-74.
23. Sawyer DE, Roman SD, Aitken RJ. Relative susceptibilities of mitochondrial and nuclear DNA to damage induced by hydrogen peroxide in two mouse germ cell lines. *Redox Rep* 2001;6(3):182-4.
24. 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(3):694-9.
25. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001;122(4):497-506.
26. Philipp T, Kalousek DK. Generalized abnormal embryonic development in missed abortion: embryoscopic and cytogenetic findings. *Am J Med Genet* 2002;111(1):43-7.
27. Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002;63(3):329-34.
28. Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005;322(1):33-41.
29. Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GH, Pieters MH, et al. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Hum Mol Genet* 1993;2(8):1183-5.
30. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993;8(12):2185-91.
31. Pellestor F, Girardet A, Andréo B, Arnal F, Humeau C. Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 1994;39(2):141-6.
32. Veilla E, Escudero T, Munné S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2002;4(3):210-7.
33. Attia AM, Al-Inany HG, Proctor ML. Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(1):CD005071.
34. Griffin DK, Hyland P, Tempest HG, Homa ST. Safety issues in assisted reproduction technology: Should men undergoing ICSI be screened for chromosome abnormalities in their sperm? *Hum Reprod* 2003;18(2):229-35.
35. Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, Veeck LL, Zaninovic N, Menendez S, et al. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* 1998;338(9):588-90.
36. Behr B, Wang H. Effects of culture conditions on IVF outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115(Suppl 1):S72-6.
37. Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod* 1998;13(11):3169-76.
38. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13(12):3434-40.
39. Munné S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation--a review. *Placenta* 2003;24(Suppl B):S70-6.
40. Moore KI, Persaud TVN. [Blastocyst formation]. In: Yıldırım M, Dalçık H, Translatör eds. *İnsan Embriyolojisi*. 1st ed. Ankara: Nobel Publishing; 2002. p. 41-2.
41. Antonarakis SE. 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 1998;51(1):1-16.
42. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003;126(1):13-25.
43. 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(2):447-54.
44. Benkhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh MB. Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet* 1996;13(2):140-8.
45. Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendía P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005;11(4):497-506.
46. Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW. The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet* 1995;57(6):1395-9.
47. Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y. The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2000;17(1):51-9.
48. Pang MG, Kim YJ, Lee SH, Kim CK. The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Hum Reprod* 2005;20(6):1688-94.
49. Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH, Harper JC. FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn* 2000;20(7):552-60.
50. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003;101(6):1229-35.