

TEKRARLAYAN İVF BAŞARISIZLIKLARINDA GENETİK FAKTÖRLERİN KLİNİK VE PROGNOZİK ÖNEMİ

Zeynep OCAK¹, Tülay ÖZLÜ²

¹ Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bolu.

² Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Bolu.

ÖZET

1978 yılında *in-vitro* fertilizasyon sonucu elde edilen bir gebelikten ilk bebeğin doğması sonucunda infertilite tedavisinde yeni bir dönem başlamıştır. Bunu takiben, *in-vitro* fertilizasyon gibi yardımcı üreme teknikleri sayesinde çocuksuz çiftlerin önemli bir yüzdesi sağlıklı gebelikler elde edebilmişlerdir.

Yardımcı üreme tekniklerindeki tüm gelişmelere rağmen, gebelik hızları beklendiği şekilde artmamış ve ne yazık ki transfer edilen emriyolarda implantasyon başarısı düşük yüzdelerde kalmıştır (%15). Etiyolojisi net olarak bilinmeyen ve muhtemelen multifaktöriyel nedenlerden kaynaklanan rekürren gebelik kayıplarına benzer şekilde, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaların da değerlendirilmesi zor ve komplekstir. Çiftlerde yada embriyoda genomik yeniden düzenlenmeler, sperm DNA hasarı ve imprinting hataları gibi genetik risk faktörleri tekrarlayan implantasyon başarısızlığı nedenleri arasında kabul edilmektedir.

Genetik tarama, genetik bir hastalık tanısı konulan hastalara ve ailelere iyi bir tıbbi bakım verilebilmesi için gerekli bir uygulamadır. Prekonsepsiyonel genetik taramanın amacı fertilitiyi değerlendirmek, infertilite tedavilerinin başarılarını artırabilmek, ve fatal ve/veya çoklu konjenital anomaliler ile etkilenmiş çocuk doğurabilecek sağlıklı taşıyıcıları tespit edebilmektir. Bu derlemede, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile ilişkili muhtemel genetik faktörler güncel literatür bilgileri ışığında tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: anöploid, DNA metilasyonu, karşılaştırmalı genom hibridizasyonu, kromozom aberasyonları, preimplantasyon tani, tüp bebek, Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Cilt: 10, Sayı: 3, Sayfa: 181- 92

CLINICAL AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF GENETIC FACTORS IN RECURRENT IN-VITRO FERTILIZATION FAILURES

SUMMARY

In 1978, a new era has started in the treatment of infertility by the birth of the first baby from a pregnancy achieved by *in-vitro* fertilization. Following this, healthy pregnancies have been achieved by assisted reproductive techniques such as *in-vitro* fertilization by an important percentage of the childless couples.

Despite all developments in assisted reproductive techniques, pregnancy rates haven't increased as expected, and unfortunately the rate of implantation success of transferred embryos remained at low levels (15%). Similar to recurrent pregnancy loss in which the etiology is not clear yet and the causes are probably multifactorial, evaluation of patients with recurrent implantation failure is difficult and complex. Genetic risk factors such as genomic rearrangements in the couples and the embryo, sperm DNA damage and imprinting defects have been considered among the causes of recurrent implantation failure.

Genetic screening is an integral part of providing good medical care of patients and families receiving a diagnosis

Yazışma adresi: Yard. Doç. Dr. Zeynep Ocak, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bolu.
Tel.: (0532) 343 81 28

e-posta: zeynep_ipek@yahoo.com

Alındığı tarih:28.06.2012, revizyon sonrası alınma: 28.06.2012, kabul tarihi: 09.01.2013, online yayım tarihi: 10.01.2013

of a genetic disorder. The aim of preconceptional genetic screening is to assess the fertility, to be able to increase success rate of infertility treatments and to detect the healthy carriers who may have a baby with the risk of fatal and/or multiple congenital anomalies. In this review, possible genetic factors associated with recurrent implantation failure are discussed in the light of the current literature.

Key words: aneuploidy, chromosome aberrations, comparative genomic hybridization, DNA methylation, fertilization in vitro, preimplantation diagnosis
Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Vol: 10, Issue: 3, Pages: 181- 92

TANIM VE ÖNEM

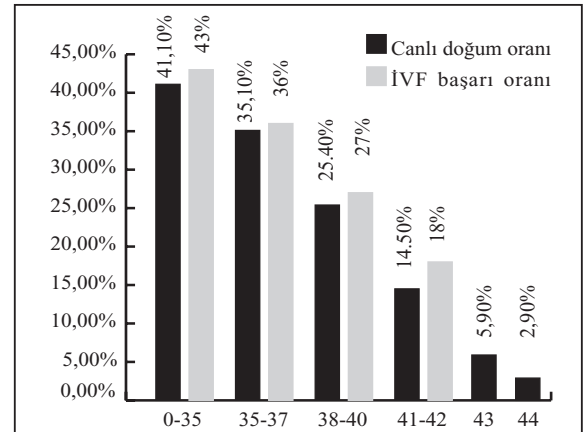
Tekrarlayan *in-vitro* fertilizasyon başarısızlığı (RIF), ardışık en az üç *in-vitro* fertilizasyon (IVF)/Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)-Embriyo Transferi (ET) uygulaması sonrası iyi kalitede embriyo transfer edilmesine rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmıştır^(1,2). Yardımcı üreme tekniklerindeki tüm gelişmelere rağmen ET sonrası implantasyon başarı oranı %15 gibi düşük seviyelerde kalmıştır^(3,4). Bu durumun etiyojisi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir ve muhtemelen altta yatan bir çok neden vardır. Bu nedenle RIF olan hastaların değerlendirilmesi oldukça zor ve karmaşıktır.

IVF uygulamalarında genetik faktörlerin de incelenmesi hem işlem başarısına olan etkisi hem de çiftlere özgü izlenecek yolun belirlenebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu hastalar için planlanan genetik taramalar prekonsepsiyonel dönemde ya da fertilitte durumunun değerlendirilmesi sürecinde yapılmalıdır.

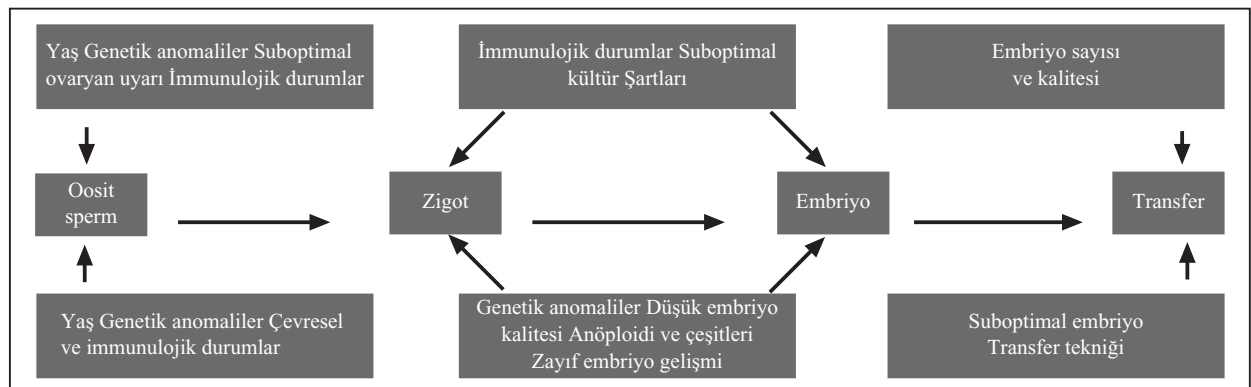
TEKRARLAYAN IVF BAŞARISIZLIKLARININ ETİYOLOJİSİ

RIF anne, baba ve embriyoya ait birçok faktörün rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Anneye ait faktörler arasında ileri yaşta kaynaklanan oosit ve embriyo kalitesizliği ile kromozomal anöploid riskinde artma

temel nedenler arasında sayılmaktadır. Artan yaşla birlikte IVF başarı oranlarının ve canlı doğum oranlarının azaldığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir⁽¹⁾ (Resim 1). Yine annede endometrial polipler ve submüköz fibroidler gibi anatomik değişikliklerin, embriyoya karşı immün reaksiyon oluşmasına neden olabilen antitroid antikor ve antinükleer antikor varlığının da RIF ve tekrarlayan gebelik kayıplarına (RPL) neden olabileceği gösterilmiştir. Çiftlerde kromozomal anomaliler, tek gen hastalıkları, multifaktöriyel hastalıklar ve sperm anöploidileri gibi genetik anomalilerin varlığı^(5,6), suboptimal ovarian stimülasyon protokolleri, suboptimal kültür koşulları, uygun olmayan embriyo transfer teknikleri ve embriyoya ait intrinsek nedenlerin de implantasyon başarısını etkilediği gösterilmiştir^(7,8) (Resim 2).



Resim 1: Yaşa bağlı olarak IVF başarı ve canlı doğum oranı arasındaki ilişki.



Resim 2: İmplantasyon başarısını etkileyen temel faktörler.

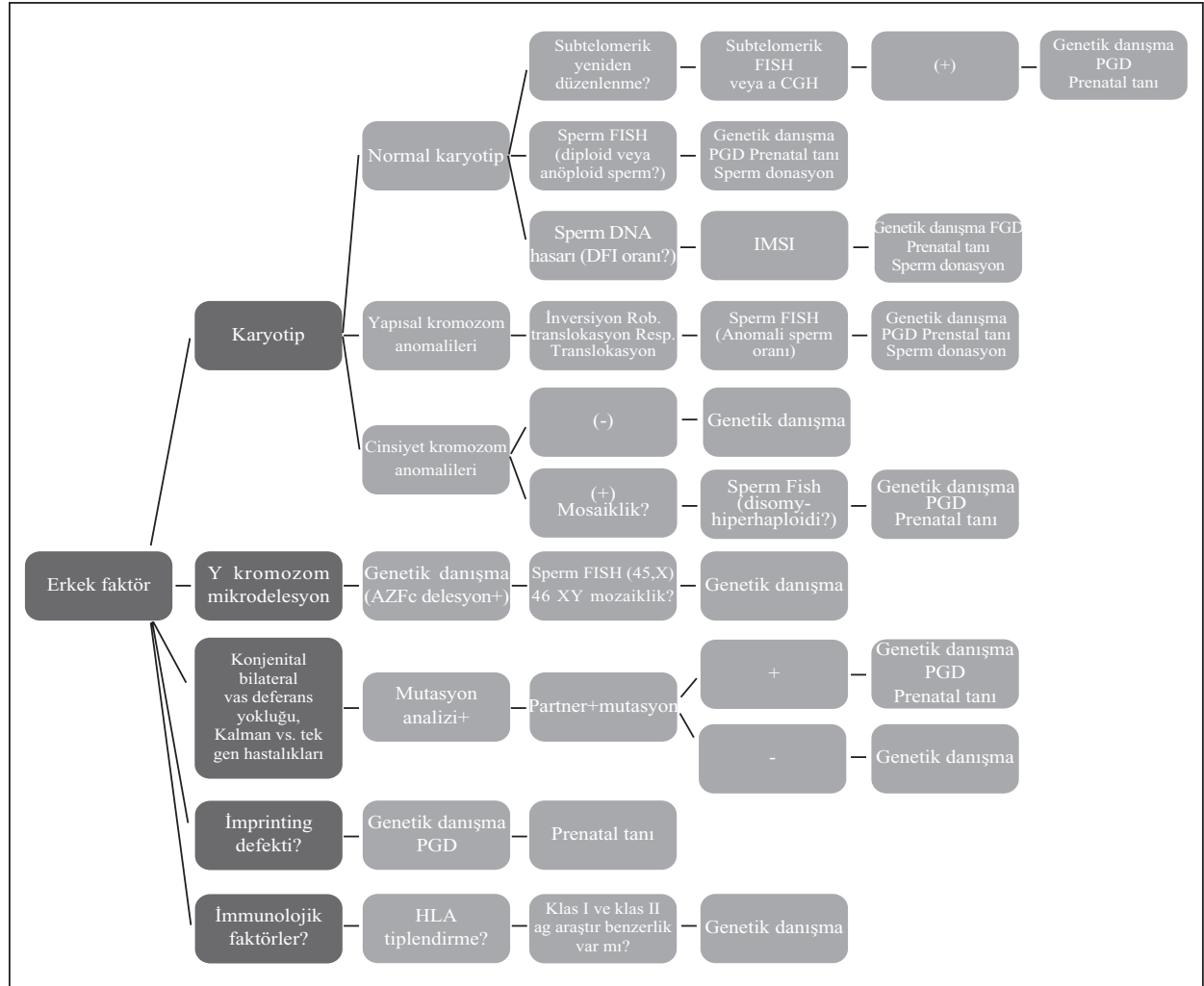
1) Tekrarlayan İVF Başarısızlıklarında Etkili Genetik Faktörler

a. Kromozomal anomaliler:

Yapılan çalışmalarda gebelik kayıplarının %80'den fazlasının birinci trimesterde oluştuğu ve fetüs ya da aborta ait materyallerin analizinde yaklaşık %53 oranında kromozomal anomali saptandığı bildirilmiştir⁽⁹⁾. Benzer şekilde RIF olan çiftlerden elde edilen embriyolarda da preimplantasyon genetik tarama (PGS) ile oldukça yüksek oranda kromozomal bozukluk tespit edilmiştir. Bu kromozomal bozukluklardan en sık gözlenenler anöploidilerdir. Bunun yanında 3 veya daha fazla kromozomu içeren sayısal ve kompleks anomaliler de bildirilmiştir^(9,10). RPL'lı annelerin abort materyallerine kromozom analizi yapıldığında anöploidili fetus doğurma riskinin ileri anne yaşında normalden daha yüksek olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir⁽⁵⁾. RPL'lı annelerin hem kan hem de bukkal smear örneklerinde X alfa satelit problemleri kullanılarak yapılan FISH analizinde yaştan bağımsız olarak düşük oranda X monozomi mozaizminin de RPL için önemli bir risk faktörü olduğu tespit

edilmiştir⁽¹¹⁾. Bu nedenle İVF uygulanacak çiftlerde ileri anne yaşı veya mozaik X kromozom monozomisi tespit edildiğinde aileye PGS ve prenatal tanı önerilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Normal karyotip ve anormal spermiyogram saptanan infertil erkeklerde yapılan sperm FISH çalışmalarında, kromozom sayısı anomalisi ile diploid sperm oranında artış gözlenmiş olup bu bulguların sperm sayı ve motilitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir⁽¹²⁾. Yapılan sperm anöploidi çalışmalarında, cinsiyet kromozomları ile 21 ve 22 nolu kromozomlara ait anomalilerinin sıklığının daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir⁽¹³⁾. Mozaik olmayan XXY-Klinefelter olgularında yapılan bir çalışmada cinsiyet kromozom dizomisinin %7.69; mozaik (XY/XXY) olgularda %2.54 ve XYY olgularında ise %3.97 oranında olduğu gösterilmiştir⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Bu nedenle erkek faktör nedeniyle İVF uygulanması düşünüldüğünde sperm FISH çalışmaları ile sperm anöploidisinin olup olmadığı araştırılmalı gerekirse aileye PGS, prenatal tanı önerilmelidir (Resim 3).



Resim 3: Erkek faktörü nedeniyle İVF uygulaması düşünüldüğünde genetik yaklaşım.

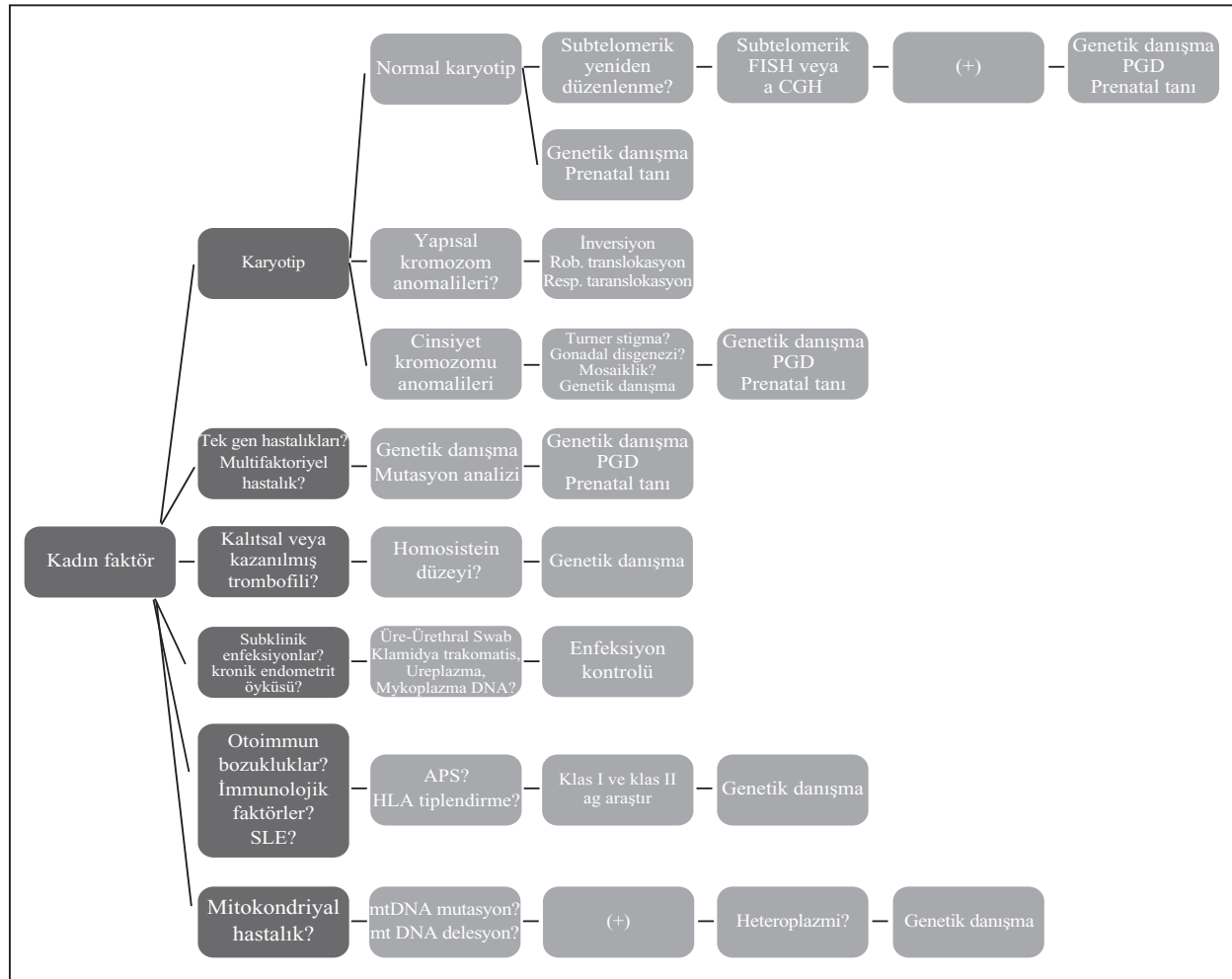
RPL öyküsü olan çiftlerde, eşlerden en az birinin yapısal kromozom anomali için taşıyıcı olma sıklığının %3-11 arasında değiştiği bildirilmiştir⁽¹⁷⁾. Bu yapısal anomaliler içinde en sık otozomal kromozom translokasyonları yer almaktadır. RIF olan çiftlerde kromozomal translokasyonların görülme sıklığı oranı %2.5, RPL olan çiftlerde %9.2, yenidoğanlarda ise %0.2 olarak tespit edilmiştir^(9,11). Yapısal kromozomal anomali taşıyıcısı olan çiftlerde IVF ve gebelik başarı oranının düşebileceği ve düşük için artmış riskin bulunabileceği bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Yine bu çiftlerin gebeliklerinde fetusun çoklu konjenital anomali, mental retardasyon ve kısa yaşam süresi ile sonuçlanacak bir kromozomal anomaliye sahip olabileceği bildirilmiştir⁽¹⁷⁾.

Robertsonian translokasyon taşıyıcısı erkeklerde anormal sperm oranının %3.4-40, resiprokal translokasyon taşıyıcılarında %47.5-81 arasında değiştiği gösterilmiştir⁽¹⁸⁾. Translokasyon taşıyıcısı olgular anormal sperm üretimine bağlı olarak beklenenden daha fazla oranda anormal embriyo üretebilmektedirler.

İnversiyonlar diğer bir yapısal kromozomal değişikliklerdendir⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Taşıyıcı bireylerin dengesiz gamet oluşturma olasılığı nedeniyle önemlidir. RPL olan çiftlerde saptanan major kromozomal anomalilerin %5-10'unu perisentrik inversiyonlar oluşturmaktadır. İnversiyon taşıyıcısı erkeklerde inversiyonun uzunluğu ve ilmek oluşturup oluşturumama durumuna göre anormal spermatozoid frekansı % 0-54.3 arasında değişmektedir^(19,20).

Telomerik bölgeyi etkileyen kromozomal yeniden düzenlenmelerin de dengesiz gamet oluşturma nedeniyle RIF ve RPL'larına yol açabileceği bildirilmiştir. Tüm bu sebeplerden dolayı eşlerden en az birinde yapısal bir anomali tespit edildiğinde bu çiftlere preimplantasyon genetik tanı (PGD) yapılması önerilmiştir⁽²¹⁾ (Resim 3,4). Konvansiyonel sitogenetik tetkiklerle saptanamayan anormalliklerin subtelomerik FISH veya Array-Comparative Genomic Hibridization (a-CGH) gibi FISH'den daha hassas yöntemler ile çalışılması önerilmiştir⁽²¹⁾.

Son yıllarda kromozomlardaki heterokromatin



Resim 4: Kadın faktörü nedeniyle IVF uygulaması düşünüldüğünde genetik yaklaşım.

bölge polimorfizmlerinin de üreme sağlığı üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu polimorfik değişikliklerin bilinen genetik bir hastalığa yol açmadığı halde reproduktif başarısızlık ve RPL'den sorumlu olabilecekleri düşünülmüştür⁽¹⁷⁾. Yine heterokromatin polimorfizmi bulunan erkek hastalarda sperm FISH ile anöploidi oranlarında artış tespit edilmiştir^(17,22,23).

Heterokromatin değişikliklerinin sperm üretimindeki mekanizmaları nasıl etkilediği henüz bilinmemekle birlikte, normal varyant olduğu düşünülen değişikliklerin detaylandırılmaları ile sperm üretiminde rol oynayan genlerin nasıl etkileştikleri açığa kavuşturulacaktır.

b. Y Kromozomu Mikrodelesyonu:

Y kromozomu delesyonuna sahip olgularda fertilizasyon ve gebelik oranlarının düşük olduğu bildirilmiştir. Y mikrodelesyonu vakaları çoğunlukla de novo'dur⁽²⁴⁾. Delesyonların en sık görüldüğü bölge Y kromozomunun uzun kolu üzerinde lokalizedir (Yq11). Y kromozomu üzerinde delesyonun bulunduğu yer spermatogenezi etkilemesi bakımından önemlidir. Y kromozomu mikrodelesyonu, azospermi ya da şiddetli oligozoospermisi olan vakalarda %10-15 sıklığında görülmektedir^(20,24). Azospermisi olan vakaların %16'sında ve ağır oligozoospermili vakaların %5'inde AZFc delesyonu saptanmaktadır. AZFc delesyonlarının toplumdaki sıklığının 1/4000 olduğu düşünülmektedir⁽²⁰⁾. AZFb delesyonları ise vakaların %2'sinde görülmektedir^(18,21).

Fertil ancak nedeni açıklanamayan RPL olan çiftlerde de etiyolojide Y kromozomu delesyonunun etkili olabileceği düşünülmektedir. RPL ile proksimal AZFc delesyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada RPL olan 17 olgunun 14'ünde (%82) Y kromozomu proksimal AZFc bölgelerinde delesyon saptanırken canlı doğumu olan grupta delesyon görülmemiştir^(20,23,24).

Bununla birlikte AZFc delesyonları saptanan erkeklerde Y kromozomunun kaybı sonucunda babanın gonadlarında 45,X/46,XY mozaizmi bulunabilmektedir. Bu şekilde ICSI ile X açısından monozomik embriyo oluşabilmekte veya embriyonun erken dönemlerinde erkek embriyoya aktarılan stabil olmayan Y kromozomu nedeniyle 45,X/46,XY mozaizmi oluşabilmektedir. Oluşan mozaizim nedeniyle şüpheli eksternal genitalya veya mikst gonadal disgenezili erkek çocuk doğabildiği bildirilmiştir⁽²⁴⁾. İVF aday

olan çiftlere İVF/ICSI uygulamalarından önce endikasyona göre karyotip analizine ilave olarak Y kromozomu mikrodelesyon testleri yapılması önerilmiştir.

c. Sperm DNA Hasarı:

Erkek infertilitesini indirekt olarak değerlendiren sperm sayısı, morfoloji ve motilitesini içeren testler fertilitite kliniklerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda anormal semen parametrelerine sahip hastalarda sperm DNA hasarının yüksek olduğunun tespit edilmesi ile yeni yaklaşımlar gündeme gelmiştir⁽²⁵⁾. Sperm DNA hasarı anormal kromatin paketlenmesi, reaktif oksijen türevleri (ROS), sperm apoptozisi gibi farklı mekanizmalar ile oluşabilmektedir⁽²⁶⁾. Sperm DNA bütünlüğünün erkek infertilitesi üzerindeki potansiyel etkisi bilinmektedir. Tamir edilemeyen hasarlanmış spermilerin apoptozis sürecine girerek fertilitite yeteneğini kaybettikleri bildirilmiştir⁽²⁷⁾. Baba yaşı ile artan erkek germ hücrelerindeki DNA hasarı normal koşullarda DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilerek üreme/fertilizasyon devam ettirilmektedir⁽²⁸⁾. Ancak normal semen parametrelerine sahip hastaların da %8'inde sperm DNA hasarı bulunduğundan İVF ve ICSI sonuçlarına olan etkisi halen tartışmalıdır.

Sperm Kromatin Yapısı Tayini (SCSA) testi ile ölçülen ve DNA denatürasyonunu gösteren DNA fragmentasyon indeksi (DFI) %30'a kadar olan fertilizasyonlarda, oositin sperm DNA fragmentasyonlarını kompanse edebildiği bildirilmiştir⁽²⁹⁾. DFI<%30 olan infertil çiftlerde ICSI ve rutin İVF'a bağlı gebe kalma ihtimalinin 2 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir⁽³⁰⁾. Ancak, sperm DNA fragmentasyonu > % 30 olan olgularda, her ne kadar ilk üç günlük embriyo gelişimi pek de olumsuz etkilenmeyecekse de, daha sonra bunu sağlıklı blastokiste gidış ve gebelik oranlarının takip etmeyeceği gösterilmiştir^(31,32). Bungum ve arkadaşlarının yaptıkları 387 intrauterin inseminasyon (IUI) siklusunu içeren bugüne kadarki en geniş seride DFI >%30 olan hastalarda biyokimyasal gebelik, klinik gebelik ve doğum oranları anlamlı oranda düşük bulunmuştur⁽²⁸⁾. Ancak bu konuyla ilgili çalışmalarda DFI ile sperm anöploidi arasında saptanan korelasyonlar çelişkilidir. DFI ve sperm anöploidi arasındaki ilişkiyi inceleyen iki çalışmada pozitif korelasyon görülürken son yıllarda yapılan farklı bir çalışmada bu korelasyon bulunamamıştır. Her üç çalışmada da embriyo anöploidileri değerlendirilmemiş-

tir⁽³³⁾. Yine Balaban ve arkadaşlarının yaptığı prospektif randomize bir çalışmada morfolojik olarak seçilen sperm ile intrasitoplazmik enjeksiyon (IMSI) sonrası implantasyon ve klinik gebelik oranı ICSI sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda ICSI'de sırasıyla %19.5 ve %54.0 olarak bulunan oranların IMSI ile % 28.9 ve %54.0'e arttığı gözlenmiştir⁽³⁴⁾. Bu nedenle beş veya üzerinde şiddetli RIF olan çiftlere rutin IMSI yapılması önerilmiştir⁽³⁴⁾.

Anöploidi oranı yüksek embriyo oluşumu, erken dönem gebelik kayıpları, epigenetik değişimlere bağlı olarak metabolik hastalık riski, çocukluk çağı kanserleri gibi problemler halen araştırma konusudur. ICSI için kullanılan sperm DNA'sının hasarlı olması ile doğacak çocukta oluşturabileceği potansiyel etkiler arasındaki ilişki net değildir, ileri araştırmalar gerektirmektedir. Sperm DNA hasarının oluşum mekanizmalarını ve IVF başarısı üzerine olan etkilerini ortaya koyacak geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

d. Tek Gen Hastalıkları ve Multifaktöriyel Hastalıklar:

Tek gen hastalıkları, özellikle aile öyküsü olan bireylerde RPL'larına ve IVF başarısızlıklarına yol açabilmektedir. Tek gen hastalıklarının iki şekilde gebelik kayıplarında etkili olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan ilki fetüste var olan hastalığın hayatla bağdaşmayan bir soruna yol açabilmesi diğeri ise annede mevcut tek gen hastalığının gebeliği olumsuz etkileyebilme ihtimalidir. Akraba evliliklerinde görülme sıklıkları artan orak hücre anemisi, alfa talasemi, zelweger hastalığı, glutarik asidüri gibi tek gen hastalıklarının gebelik kayıplarına yol açabildiği gösterilmiştir⁽²³⁾. Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) PGD Consortium'un 2012 yılındaki verilerine göre son on yılda tek gen hastalıkları için 4733 siklus yapılmıştır. Bu rapora göre günümüzde en yaygın olarak sırasıyla kistik fibrozis, orak hücreli anemi ve spinal muskuler atrofi için PGD yapılmıştır. Otozomal dominant hastalıklar içinde ise en çok miyotonik distrofi için PGD yapılmaktadır⁽³⁶⁾.

X kromozomu üzerindeki resesif kalıtılan defektler etkilenen erkek fetus için intauterin dönemde letal seyredebilir. RPL olan kadınlarda X-linked letal genlerin araştırıldığı bir çalışmada kontrol gurubuna göre yüksek oranda kaymış X inaktivasyon paterni saptanmıştır^(22,23). Hücrelerin %90'dan fazlasında belli bir X kromozomunda inaktivasyon olduğu test edilmiştir. Lökositler,

oral mukoza hücreleri, kas biyopsilerinde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Genetik defektin olduğu lokus Xq28 bölgesine haritalanmıştır⁽²³⁾.

Günümüzde X'e bağlı hastalıklardan en çok Frajil X sendromu, Duchenne musküler distrofi (DMD) ve hemofili için PGD yapılmaktadır⁽³⁶⁾. Direkt olarak fetal ölümlere yol açabilen bu gibi durumlar IVF uygulamasından önce araştırılmalıdır.

e. Polimorfik Değişiklikler:

Çalışmalardan elde edilen verilere göre p53, HLA-G, VEGF ve IL-1RN gibi bazı genlerde gösterilen mutasyon ve polimorfizmler IVF sonrası meydana gelen RIF'e genetik yatkınlıkta rol oynamaktadır. Sipak-Szmigiel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, fetüsten orijin alan trofoblast hücrelerinde eksprese olan HLA-G antijeninin gen polimorfizmi ile RIF arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır⁽³⁷⁾. Gebelik fizyolojisinde önemli bir rol oynayan bu antijen gebelik esnasında maternal immün sistemin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. HLA-G antijeni ayrıca bazı blastokislerde de saptanabildiğinden implantasyonda da rol oynayabilmektedir. HLA-G gen polimorfizminin pre-eklampsi, RPL ve RIF'a neden olabildiği gösterilmiştir⁽³⁷⁾. Sipak-Szmigiel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada söz konusu HLA-G gen polimorfizmi ile artmış RIF riski arasında bir bağlantı bulunduğu tespit edilmiştir⁽³⁷⁾. Goodman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma anjiyogenezin en iyi karakterize edilmiş regülatörü olan VEGF geninin -1154A/A polimorfizminin RIF olasılığını etkilemede yatkınlık faktörü olabileceğini göstermiştir⁽³⁸⁾. Goodman ve arkadaşlarının farklı bir çalışmada ise; fertilitateyle ilişkili olduğu ve üremeyi düzenlediği düşünülen p53 geninin Pro72, koagülasyonda rol oynayan proteinleri kodlayan PAI geninin 4G/4G ve VEGF geninin -1154A/A polimorfizmlerinin RIF ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır⁽³⁹⁾.

Tüm bu verilerden yola çıkarak, RIF gelişiminde polimorfizmlerin rol oynayabileceği ve bu gen polimorfizmleri için çeşitli testlerden oluşacak bir panelin, IVF sonrası RIF için risk taşıyan bayanların belirlenmesinde yararlı olabileceği düşünülmektedir.

f. Mitokondrial Değişiklikler:

mtDNA genomunda yeniden düzenlemeler, büyük parça delesyonları ve nokta mutasyonları sperm hareketliliği ve morfolojisinde önem taşımaktadır.

Sperm mtDNA'sında oluşan genetik değişikliklerin, sperm fonksiyonunu, dolayısıyla da normal fertilizasyonu etkilediği gösterilmiştir⁽⁴⁰⁾. İnfertil erkeklerde, anormal sperm ile sperm mtDNA'sında artış görülmekte ve bu artış ICSI sırasında ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Mitokondrial rRNA veya tRNA'ların tam kaybının mitokondrial protein sentezini durdurarak erken embriyonik gelişimi etkilediği veya fetal ölümlerle sonuçlanabildiği bildirilmiştir^(55,56). Aynı zamanda kadınlarda yaş ilerledikçe yumurtalık disfonksiyonlarında defektif mtDNA artışı da literatürde tanımlanmıştır⁽⁴⁰⁾.

g. Metilasyon-Imprinting Bozuklukları:

Germ hücre genomunun metilasyonu, gerek spermatogenezin normal devam etmesinde gerekse fertilizasyonu takiben embriyo gelişiminde önemli role sahiptir. Hücre genomunun işlevini görebilmesi için major epigenetik düzenleyicinin DNA'nın metilasyonu olduğu bildirilmiştir. Genom imprinting bozukluklarının hipospermatogeneze yol açtığı ve oligozoospermik erkeklerin bu imprinting defektlerini çocuklarına da geçirdikleri gözlenmiştir⁽⁴¹⁾.

Sperm ve oosit fertilizasyon sırasında metilasyona uğramaları nedeniyle transkripsiyon yapamazlar. Oysa diploid olduktan sonra embriyonun somatik gelişimini sürdürebilmesi için kromatin DNA'sı metilasyon durumunda değişiklik yaparak yeniden şekillenir. Bunun için erken embriyo devresinde babadan gelen genom fertilizasyonun ilk birkaç saati içerisinde demetilasyon geçirirken, anneden gelen genom iki-hücreli embriyo dönemini takiben sadece pasif bir demetilasyon süreci izler. Morula ve blastokist geliştikten sonra ise artık her iki genom da eşit metil kaybına uğramışlardır ve daha sonra yeni metilasyonlar oluşur⁽⁴²⁾. Benchaib ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada metilasyon bozukluklarının anormal fetal gelişmeye, Angelman sendromu ve Beckwith-Wiedemann sendromu gibi hastalıklara neden olabildiği, metilasyonun arttığı olgularda ise gebelik başarısının arttığı gösterilmiştir^(42,43).

h) İmmünojenik faktörler ve trombofililer

Günümüzde implantasyon başarısında maternal ve fetal yüzde meydana gelen lokal immün fonksiyonlardaki düzensizliklerin etkisi giderek artan bir ilgi alanı olmuştur⁽⁴⁴⁾. Son yıllarda immünojenik alanındaki gelişmelerle birlikte yapılan araştırmalar, nedeni

bilinmeyen düşüklerin %80'inin immünojenik faktörlere bağlı olabileceğini göstermiştir. Fetal veya plasental antijenlere karşı anormal maternal immün yanıt oluşturan alloimmün bozukluklar maternal sitotoksik antikorlar, "natural killer" hücre fonksiyon ve dağılımlarındaki anormallikler IVF başarısını etkileyebilen immünojenik faktörlerdendir⁽⁴⁴⁾. Bunların birçoğunun yeni tedavi yöntemleri ile önlenilebileceği bildirilmiştir⁽⁷⁾. Eğer çiftlere IVF uygulaması öncesinde yapılan tüm testler normale implantasyonu etkileyebilecek immünojenik faktörlerinde göz önüne alınması gerektiği önerilmiştir. Bu amaçla ilk yapılması gereken şey çiftlerin lenfositlerinin cross-match testi yapılarak immünojenik reaksiyonun gözlenmesidir. Eğer erkeğin antijenlerine karşı bayanda bir reaksiyon yoksa bunlarda insan lökosit antijen (HLA) benzerliği olduğu düşünülebilir. Literatürde bu benzerliğin RPL ve RIF'a yol açabileceği bildirildiğinden çiftin Klas I ve Klas II HLA'larının incelenmesi ve bu vakaların yüksek doz iv immünglobulin ile tedavi edilmesi önerilmiştir⁽⁴⁶⁾.

Hereditör veya kazanılmış trombofilinin, implantasyon yüzeyindeki maternal vasküler yapılarda lokal mikrotrombüsler oluşturarak mikrosirkülasyonu bozup RIF ve erken gebelik kayıplarına neden olabileceği bildirilmiştir⁽⁴⁷⁾. Kazanılmış trombofilik nedenlerinden olan antifosfolipid antikor sendromu (AFS), arteriyel ve venöz tromboz nedeniyle fetal ölüm ve RPL'na yol açan otoimmün klinik bir patolojidir. Antifosfolipid antikorlar genel popülasyonun %14'ünde, sistemik lupus eritematozis (SLE) hastalarının ise %30-50'sinde görülürler. Ayrıca Sifiliz, Lyme hastalığı, sık görülen virüs ve mikoplazma enfeksiyonları ile klorpromazin, klonidin, fenitoin, prokainamid gibi bazı ilaçların kullanımında geçici antifosfolipid antikorları bulunabilir. Fakat bu gibi durumlarda tromboz oluşumunun görülmediği bildirilmiştir⁽⁴⁸⁾.

Yapılan çalışmalarda SLE'li kadınlarda görülen fetal ölümlerin hemen hepsinin AFS (lupus antikoagülanı-LA ve antikardiolipin antikorları-AKA) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^(47,48). Bu antikorlar fetal distres ve ölümden en duyarlı göstergelerdir. Klinik yanında LA ve orta veya yüksek seviyelerdeki AKA (IgG veya IgM) seviyelerinin gösterilmesi önemli laboratuvar tanı kriteridir. AFS'nun RPL ile olan bu ilişkisine karşın 2008 yılında Amerika Tıbbi Üreme Derneği (ASRM) tarafından AFS'nun IVF başarısını etkilemediği bildirilmiştir⁽⁴⁹⁾. Bu raporda yaklaşık 16 derleme ile 2053 vaka hem bireysel hem de toplu olarak

değerlendirilmiş ve AFS ile IVF başarısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmediği bildirilmiştir⁽⁴⁹⁾.

Literatürde herediter trombofilik gen mutasyonlarının RPL ve IVF başarısı üzerine olan etkisi ile ilgili en az 694 çalışma bulunduğu bildirilmiştir⁽⁵⁰⁾. Bu çalışmalar içinde derlemeler, meta analizler, vaka sunumları toplu olarak göz önüne alındığında en az 6092 vakanın değerlendirilebildiği görülmüştür. Vaka kontrol çalışmalarında birden fazla AFS antikoru bulunma durumunda IVF başarısızlığının normalden üç kat daha fazla olduğu gözlenmiştir⁽⁵⁰⁾. Kohort çalışmalarında ise AFS nin canlı doğum ve gebelik oranı ile ilişkili olmadığı saptanmıştır⁽⁵⁰⁾. Sekiz vaka kontrol çalışmasında Faktör V leiden mutasyonu olan hastalarda IVF başarısının normalden üç kat azaldığı gösterilmiştir⁽⁵⁰⁾. İki kohort çalışmasında ise bu ilişki tespit edilememiştir. Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni homozigot mutasyonunun hiperhomosistinemi gelişimine zemin hazırladığı koryon villus vaskülarizasyonunda bozulmaya neden olarak erken gebelik kaybı riskini arttırdığı gösterilmiştir^(51,52). Yine bu mutasyonun fetusde NTD riskini de 1.9 kata kadar arttırdığı bildirilmiştir⁽⁵¹⁾. Folat-metabolizmasını etkileyebilecek MTHFR mutasyonun fetusdeki tüm bu etkilerine rağmen RIF ile olan ilişkisi kanıtlanmamıştır. Yakın zamanda Laanpere ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada folat metabolizmasında görevli genlerin heterozigot değişikliğinde over stimülasyonu ve IVF başarısının kontrol gurubuna göre düştüğü bildirilmiştir⁽⁵⁰⁾.

Fetüste trombofili olduğu zaman gebelik kaybı ihtimalinin arttığını düşünenler olmakla birlikte bu konuda henüz kesin kanıtlar elimizde bulunmamaktadır⁽⁵³⁾. Literatürde birkaç vaka ile sınırlı gebelik kaybı, erken doğum, serebral palsi tanımlanmıştır⁽⁵⁴⁾.

Multiple trombofilik gen mutasyonu, RPL olan kadınlarda %74 iken kontrol grubu kadınlarda %20 olarak bulunmuştur⁽⁵²⁾. Tüm bu verilerden yola çıkarak, RIF olan hastalarda IVF/ICSI uygulamalarından önce trombofili taramasının faydalı olabileceği düşünülmektedir (Resim 4).

2) Subklinik Enfeksiyonlar:

Klamidya trakomatis, Üreoplazma ve Mikoplazma, Toksoplazma gondii, Listeria Monositogenez, Herpes virüs ve Sitomegalovirüs enfeksiyonlarının RPL'larına yol açabileceği bildirilmiştir⁽⁵⁵⁾. Ancak erken gebelik kayıplarının

nedeni olarak servikovajinal enfeksiyonların olasılığını bildiren veriler yetersiz ve çelişkilidir⁽⁵⁶⁾.

Kamiyama ve ark. subklinik üst genital sistem enfeksiyonları ile IVF-ET başarısızlığı arasında ilişki olup olmadığını değerlendirmiş, IVF-ET yapılan 38 hasta arasında menstrüel kanda endotoksin konsantrasyonu belli bir düzeyin üzerinde olan hastaların hiç birinde gebelik olmazken, endotoksin düzeyleri kabul edilen sınır değerinin altında olanların 1/3'ünde gebelik olduğunu görmüşlerdir⁽⁵⁷⁾. Endometriumun gram negatif bakterilerle önceden kolonizasyonunun implantasyonu bozarak ya da erken spontan düşüklere indükleyerek IVF-ET başarısızlığına yol açabileceğini savunmuşlardır. Bu bulgulardan yola çıkan Romero ve ark. IVF-ET başarısızlığında genital kanal enfeksiyonlarının muhtemel rolünü yaptıkları bir derlemede desteklemiştir⁽⁵⁸⁾.

Bu bilgiler ışığında, günümüzde klinik enfeksiyon bulguları olmayan yada cinsel yolla bulaşan hastalıklar açısından risk faktörü olmayan bir hastada IVF öncesi için bahsedilen enfeksiyon ajanları açısından tarama yararlı olabilir gibi görünse de, henüz bunun rutin olarak önerilmesine yetecek düzeyde geniş çaplı çalışmalar mevcut değildir. Bu konuda değerlendirme hastanın risk faktörlerine göre yönlendirilmelidir. Öte yandan, IVF uygulamasından önce her iki partnerin HIV, hepatit B, hepatit C enfeksiyonu açısından rutin taramaları yapılmalıdır. Bu tıbbi ve laboratuvar ekibinin ve IVF sonucu elde edilecek fetusün korunması ve dondurulmuş embriyolar arasında çapraz kontaminasyon olmaması açısından önemlidir.

IVF BAŞARISIZLIKLARINDA PREİMLANTASYON GENETİK TANI VE ARRAY-CGH UYGULAMALARI

ESHRE PGD Konsorsiyumu' nun yayınladığı raporda, 39 farklı merkezden alınan verilere göre 27 000'den fazla siklusun %61'inin anöploidi için, %17'sinin tek gen hastalıkları, %16'sının kromozomal anomaliler, %4'ünün X'e bağlı hastalıklar, son olarak %2'sinin sosyal endikasyon nedeni ile yapıldığı belirtilmiştir⁽³⁶⁾.

PGS, embriyodaki anöploidilerin değerlendirilerek IVF sonucu elde edilen en iyi embriyoyu seçip aktarma amacıyla kullanılan bir tekniktir. IVF merkezlerindeki implantasyon başarısının artırılması veya düşüklerin

azaltılması PGS'nin kullanımındaki temel uygulama amaçlarından biridir⁽³⁶⁾. PGS tekniği özellikle ileri anne yaşı, RPL ve RIF olan çiftlerde düşünülmelidir.

Yapılan çalışmalarda, PGS uygulaması ile oosit başına düşen hamilelik oranının %29'dan %38'e yükseldiği gösterilmiş ve taşıyıcı ebeveynlerin doğal hamileliklerinde görülen %92'lik abortus oranının PGS uygulaması sonrası %12.5 oranına gerilediği bildirilmiştir⁽⁵⁹⁾. Anöploidi ve translokasyonların tayini için çoğunlukla FISH tekniği kullanılmaktadır. FISH yöntemiyle sınırlı sayıda kromozomun incelenebilmesi, sonuçların yoruma açık oluşu, uygun olmayan biyopsi ve fiksasyon tekniklerinin kullanılması farklı sonuçlar elde edilmesine sebep olmaktadır⁽⁶⁰⁾. Sınırlı sayıda kromozomun incelendiği FISH yöntemine alternatif olarak aCGH yöntemi embriyolarda tüm kromozomların incelenmesini mümkün kılmaktadır. Bu yöntem ileri anne yaşı, RPL, RIF, şiddetli erkek faktörü, translokasyon ve inversiyon taşıyıcılığı gibi endikasyonlara uygulanabilmektedir. Yapılan çalışmalar aCGH yöntemiyle belirlenen kromozom bozukluklarının %30-40'ının FISH yöntemiyle belirlenebileceğini ortaya çıkarmıştır^(60,61).

PGS'den farklı olarak PGD translokasyon gibi yapısal kromozomal yeniden düzenlenmeler ile ailesel geçişli genetik hastalığı veya genetik hastalık taşıyıcılığı olan çiftlerde embriyoların seçilerek transfer edilmesi işlemine dayanmaktadır. Bu şekilde çiftlerin sağlıklı çocuk sahibi olma şansı arttırılmakta ve tıbbi endikasyonlarla gebeliğin sonlandırılması riskinin azaltılması amaçlanmaktadır.

Ülkemizde akraba evliliklerinin sık olması nedeniyle, beta-talasemi gibi otozomal resesif geçiş gösteren hastalıklarda PGD yapılması büyük önem arz etmektedir. Myotonik distrofi, Huntington hastalığı ve Marfan sendromu gibi otozomal dominant hastalıklar için de PGD uygulamaları geliştirilmeye başlanmıştır. Otozomal dominant hastalıklara PGD uygulama sıklığının, otozomal resesif olanlara göre daha az olduğu bildirilmiştir⁽³⁶⁾. Ancak otozomal dominant hastalığa sahip bireylerdeki problemin embriyolarına aktarılma riskinin, resesif bireylerdekinden fazla olması nedeniyle yakın zaman içinde PGD uygulamalarının artacağı düşünülmektedir⁽³⁶⁾.

İVF uygulamaları için PGD her ne kadar avantajlı görünse de birçok tartışmalı durumu da beraberinde getirmektedir. Özellikle İngiltere gibi prenatal tanının devlet tarafından ödendiği, ancak PGD'nin ödenmediği ülkelerde işlem çok pahalıdır. PGD'de fertil çiftler için

en zor kısım çok pahalı ve stresli olan İVF'e gitmek zorunda olmalarıdır. Yine yalnızca pozitif veya negatif sonuçların olabilmesi genetik danışmanlıkta da vurgulanması gereken diğer bir dezavantajdır. PGD nin diğer bir dezavantajı oluşturduğu etik kaygılardır. Penetransı %100 olmayan kalıtsal kanserlerde, hungtinton hastalığı gibi geç başlangıçlı genetik hastalıklarda, yaşamı tehdit etmeyen işitme kaybı gibi durumlarda da PGD yapılmaya başlanması birçok etik kaygıyı beraberinde taşımaktadır^(36,62).

Sayısal kromozom bozuklukların yanında mikrodelesyon, duplikasyon, uniparental dizomi ve marker kromozom gibi yapısal anomalilerin de embriyolarda tanımlanabilmesine olanak sağlayan ve tek nükleotid polimorfizmi-tek nükleotid varyasyonu (SNP-CNV) çalışmaları da son dönemlerde popülerite kazanmıştır. Oligo aCGH temeline dayanan bu yöntemde aynı anda yaklaşık 250.000 genomik veri analiz edilebilmektedir. Alınan 1 adet blastomerde yapılan tüm genom amplifikasyonunu takiben 250.000 SNP bölgesi analiz edilebilmektedir⁽⁶¹⁾. Son veriler mikroarray testleri sonrasında implantasyon ve gebelik başarı oranlarının arttığını gösterse de elde edilen sonuçların sağlıklı biçimde yorumlanabilmesi ciddi bir problemdir ve uzun vadeli geniş kapsamlı biyoinformatik çalışmalar ile desteklenmelidir⁽⁶¹⁾. Array-SNP uygulamaları, oluşan beklentiler ve soru işaretleriyle insanları hem heyecanlandıran, hem de bazı verilerin sağlıklı biçimde yorumlanmasındaki yetersizlikler ve etik kaygılar nedeniyle endişelere sürükleyen bir niteliğe sahiptir. Günümüzde preimplantasyon aşamasında yapılan tüm bu çalışmalar hızlı sonuçlar verse de hala zahmetli ve zor uygulamalardır.

PGD laboratuvarlarının ISO 15189 veya eşdeğeri bir şekilde akredite edilmesi ve PGD çalışan laboratuvarların verilerini bilimsel toplantılarda paylaşması bu konudaki bilgi ve deneyimin gelişiminde önemli rol oynayacaktır. Sitogenetik ve moleküler genetik disiplinlerini doğru bir biçimde birleştirebilmek için eğitim programlarının düzenlenmesinin de bu yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı bildirilmiştir⁽⁶³⁾.

GENETİK DEĞERLENDİRME

Sonuç olarak; yardımcı üreme teknikleri uygulanması öncesinde, sırasında veya sonrasında genetik tanı testlerine başvurulması iyi klinik uygulamaların bir parçasıdır. Bu testler doğru tanı konulmasını sağladığı gibi uygun genetik danışmanlığın verilmesini de mümkün kılmaktadır. Uygulanacak testlere karar verilmesi sırasında klinik bulgulara ek olarak aile öyküsünün genetik danışmanlık sırasında değerlendirilmesi hastaların daha fazla yarar görmesini sağlamaktadır.

Üreme sağlığına yönelik olarak yapılan genetik taramalarda ölümcül ve/veya ciddi derecede anomalilerle seyreden bir hastalıkla etkilenmiş bir bebek dünyaya getirme riski yüksek olan, sağlıklı taşıyıcıları ortaya çıkarabilmek temel amaç olmalıdır. RIF olan çiftlerde hangi testin yapılacağına karar verilirken uygulanacak genetik testin maliyeti, etkinliği ve testin etiyojik nedeni ortaya koyabilme etkinliği göz önünde bulundurulmalıdır. Genetik tarama amacı ile yapılan testler hasta bireylere veya çiftlere üreme sağlıkları ile ilgili doğru bilgiler sunarak karar verme süreçlerini kolaylaştırmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Ly KD, Aziz N, Safi J and Agarwal A. Evidence-Based Management of Infertile Couples with Repeated Implantation Failure Following IVF. *Current Women's Health Reviews* 2010; 6: 200- 18.
2. Macklin VM. Ovarian Stimulation and ovulation induction. *Fertil Steril* 2001; 75: 88- 91.
3. ASRM/SART Registry. Assisted reproductive technology in the United States: Results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 2000; 72: 641.
4. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). The European IVF-monitoring programme (EIM), for ESHRE. Assisted reproductive technology in Europe, 1998. Results generated from European Registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2001; 16: 2459.
5. Dewald GW, Michels VV. Recurrent Miscarriages: Cytogenetic Causes and Genetic Counseling of Affected Families. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1986; 29: 865- 83.
6. Chandley AC. Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum*

7. *Reprod* 1998; 13: 45- 50.
7. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine. 2001 assisted reproductive technology success rates, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 2003. 2000; 72: 641.
8. Bolarinde O, Tin-Chiu L. İn-vitro fertilizasyonu takiben implantasyon başarısızlığı. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology (Türkçe Baskı)* 2006; 18: 440- 5.
9. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985; 70: 11- 7.
10. Delhanty J, Griffin D, Handyside A. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Hum Mol Genet* 2 1993; 1183- 5.
11. Ishikawa M, Hidaka E, Wakui K, Nakayama K, Takagi Y, Fukushima Y, Katsuyama T. Habitual abortion and high frequency of low frequent X chromosome monosomy mosaicism: detection by interphase FISH analysis of buccal mucosa cells and lymphocytes Rinsho Byori 2000; 48(10): 955- 9.
12. Bronet F, Martnez E, Gaytan M, Linan A, Cernuda D, Ariza M. et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Human Reproduction*. 2012; 1- 8.
13. Vidal F, Blanco J, Egozcue J. Chromosomal abnormalities in sperm. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 22; 183: 51- 4.
14. Egozcue S, Blanco J, Vidal F, Egozcue J. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod* 2002; 17: 5- 7.
15. Jaarola M, Martin, RH, Ashley, T. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 218- 24.
16. Ishikawa M, Hidaka E, Wakui K, Nakayama K, Takagi Y, Fukushima Y, Katsuyama T. Habitual abortion and high frequency of low frequent X chromosome monosomy mosaicism: detection by interphase FISH analysis of buccal mucosa cells and lymphocytes Rinsho Byori 2000 Oct; 48(10): 955- 9.
17. Durak B, Yesil M, et al. Is recurrent abortion an indication for subtelomeric region analysis? *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30: 1465- 8.
18. Jaarola M, Martin RH, Ashley T. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 218- 24.

19. Dohle GR, Diemer T, Giwercman A et al. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology 2010; 4: 14- 6.
20. Pang MG, Kim YJ, Lee SH, Kim CK. The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. Human Reproduction 2005; 20: 1688-94.
21. Harper JC, Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the ART 2011. Hum Genet 2012; 131: 175- 86.
22. Mercy YL, Robin L, Bennett, Devki SS, et al. Genetic Evaluation and Counseling of Couples with Recurrent Miscarriage: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. Journal of Genetic Counseling 2005; 14: 3.
23. Hoffman, Eric P. Screening test for the lethal genetic trait of recurrent spontaneous pregnancy loss.
24. Siffroi JP, Bourhis CL, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, et al. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. Hum Reprod 2000; 15: 2559- 62.
25. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. Fertil Steril 2001; 75: 674- 7.
26. 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: 202- 5.
27. Alvarez JG. The predictive value of sperm chromatin structure assay. Hum Reprod 2005; 28: 2365- 7.
28. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. Hum Reprod 2007; 22: 174- 9.
29. Regan L, Rai R. Thrombophilia and pregnancy loss. J Reprod Immunol 2002; 55: 163.
30. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122- 8.
31. Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lin DP, Lee MS. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoatozoospermic males. J Assist Reprod Genet 2004; 21: 119- 26.
32. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosa'lvéz J, Alvarez JG, Ferná'ndez JL. Increased Aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and fish analysis. J Androl 2007; 28: 38- 49.
33. Balasuriya A, Speyer B, Serhal P, Doshi A, Harper JC. Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. Reprod Biomed Online 2011; 22: 428- 36.
34. Bronet F, Martinez E, Gaytan M, Linan A, Cernuda D, Ariza, Nogales M. at al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients Human Reproduction 2012; Vol.00, No.0 pp. 1- 8.
35. Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. Reprod Biomed Online 2011; 22: 472- 6.
36. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122- 8.
37. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, Sengupta SB, Pehlivan Budak T, Renwick P, De Rycke M, Geraedts JP, Harton G. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. Hum Reprod Update 2012; 18(3): 234- 47.
38. Sipak-Szmigiel O, Cybulski C. HLA-G polymorphism and in vitro fertilization failure in a Polish population. Tissue Antigens 2009; 73: 348- 52.
39. Goodman C, Jeyendran RS. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and implantation failure. Reprod Biomed Online 2008; 16: 720- 3.
40. Goodman C, Jeyendran RS. P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. Fertil Steril 2009; 92: 494- 8.
41. Sanchez CD, Ruiz-Pesini E, Lapen'a, AC, Montoya J, Pe'rez-MartosA, Enr'_quez, JA, Lo'pez-Pe'rez MJ. Mitochondrial DNA Content of Human Spermatozoa. Biology of Reproduction 2003; 68: 180.
42. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. Lancet 2004; 22: 1700- 2.
43. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 2001; 293: 1089- 93.
44. Benchaib M, Ajina M, Lornage J, Niveleau A, Durand P, Guerin JF. Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. Fertil Steril 2003; 80: 947- 53.
45. Ogasawara M, Aoki K, Hayashi Y. A prospective study on

- pregnancy risk of antiphospholipid antibodies in association with systemic lupus erythematosus. *J Reprod Immunol* 1995; 28: 159.
46. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996; 156: 4027.
47. Simon A, Lafe N. Repeated implantation failure: clinical approach *Fertility and Sterility* 2012; 97, 15- 0282.
48. Ogasawara M, Aoki K, Hayashi Y. A prospective study on pregnancy risk of antiphospholipid antibodies in association with systemic lupus erythematosus. *J Reprod Immunol* 1995; 28: 159.
49. Sauer R, Roussev R, Jeyendran RS, Coulam CB. Prevalence of antiphospholipid antibodies among women experiencing unexplained infertility and recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2010; 1; 93: 2441- 3.
50. Practice Committee of the ASRM. Anti-phospholipid antibodies do not affect IVF success. Practice Committee of the ASRM. *Fertil Steril* 2008; 90: S172- 3.
51. Laanpere M, Altmäe S, Kaart T, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Salumets A. Folate-metabolizing gene variants and pregnancy outcome of IVF. *Reprod Biomed Online*. 2011; 22(6): 603- 14.
52. Rey E, Kahn SR, David M and Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361: 901- 08.
53. Coulam CB, Jeyendran RS. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology* 2006; 12: 322- 7.
54. Tranquilli AL, Saccucci F, Giannubilo SR, Cecati M, Nocchi L, Lorenzi S, Emanuelli M. Unexplained fetal loss: the fetal side of thrombophilia. *Fertil Steril*. 2009.
55. von Kries R, Junker R, Oberle D, Kosch A, Nowak-Göttl U. Foetal growth restriction in children with prothrombotic risk factors. *Thromb Haemost*. 2001; 86(4): 1012- 6.
56. Witkin SS, Kligman I, Grifo JA, Rosenwaks Z. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis detected by the Polymerase Chain Reaction in the cervixes of women undergoing in vitro fertilization: Prevalence and Consequences. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1995; 12(9): 610- 4.
57. Sermon K, Steirteghem AV, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 2004; 363: 1633- 41.
58. Kamiyama S, Teruya Y, Nohara M, Kanazawa K. Impact of detection of bacterial endotoxin in menstrual effluent on the pregnancy rate in in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2004; 82: 788- 92.
59. Romero R, Espinoza J, Mazor M. Can endometrial infection/ inflammation explain implantation failure, spontaneous abortion, and preterm birth after in vitro fertilization? *Fertil Steril*. 2004; 82(4): 799- 804.
60. Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T, Munn S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 226- 31.
61. Trussler JL, Pickering S, Ogilvie CM. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using Comparative Genomic Hybridization. *Reprod Biomed Online* 2004; 80: 860- 8.
62. Bisignano A, Wells D, Harton G, Munné S. Reply: PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: a responsible path towards greater utility. *Reproductive BioMedicine Online* 2012; 24: 4- 5.
63. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). The European IVF-monitoring programme (EIM), for ESHRE. Assisted reproductive technology in Europe, 1998. Results generated from European Registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2001; 16: 2459.
64. Harper JC, Harton G (2010) The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 94(4): 1173- 7.