

İNTRASTOPLASMİK SPERM İNJEKSİYONU GEBELİKLERDE KROMOZOM ANALİZİ BULGULARI

FETAL CHROMOSOMAL ANALYSIS OF PREGNANCIES FOLLOWING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION WITH AMNIOTIC TISSUE CULTURE

Hale ŞAMLI¹, Mustafa SOLAK¹, Necat İMİRZALIOĞLU², Yavuz BEYATLI³, Solmaz ŞİMŞEK¹, Semra KAHRAMAN⁴

¹ Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D., Afyon

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D., Ankara

³ Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

⁴ Memorial Hastanesi, Yardımcı Üreme Merkezi, İstanbul

ÖZET:Ocak 1996 – Aralık 2000 tarihleri arasında İntrastoplasmik Sperm İnjesiyonu (ICSI) ile gebelik elde edilmiş ardışık 98 olgu çalışıldı. Bu olgulara ait 142 fetus amniyotik hücre kültürü ile tarandı. 142 fetusun 6 tanesinde (%4,2) kromozom anomalisi saptandı. Bu anomaliler 46, XX / 69, XXX / 92, XXXX, 46, XY / 69, XXY / 92, XXYY, 47, XY+21, 47,XY+7, 47,XXY, 45,X0 şeklinde gözlemlendi. Biri dışında tüm gebelikler çiftlerin onayı ile sonlandırıldı. Gebeliğin sonlandırılmasını takiben yapılan fetal cilt fibroblast kültürü ile 1 olgu dışında prenatal tanı doğrulandı.

ICSI gebeliklerinde kromozomal düzensizlik oranının hafifçe artmış olduğu görülmektedir. Morfolojik anomalili spermilerin kullanılmasıyla paternal faktörler, ileri anne yaşı ile maternal faktörler ve sıklıkla de novo oluşan sex kromozomal düzensizlikler bu konuda sorumlu tutulabilir [1].

[Anahtar kelimeler : kromozom anomalisi / ICSI / amniyotik hücre kültürü / prenatal tanı.]

ABSTRACT:From January 1996 to December 2000, 98 consecutive patients who had become pregnant after Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) were studied. Hundred and forty-two fetuses of these patients were screened with fetal amniotic tissue culture. Chromosomal anomalies were detected from 6 out of 142 (4.2%) fetuses. Anomalies were as follows, '46,XX / 69,XXX / 92,XXXX', '46,XY / 69, XXY / 92,XXYY', '47,XY+21', '47,XY+7', '47,XXY' and '45,X0'. All except one pregnancies were terminated with the consent of the couples. Fetal skin fibroblast cultures were also studied after termination of the pregnancy in order to confirm prenatal diagnosis.

The ratio of chromosomal anomalies seems to be slightly increased in ICSI pregnancies, paternal factors due to morphology abnormal spermatozoa maternal factors due to increased mother age and more frequently, de novo occurring sex chromosome abnormalities may be responsible for this outcome.

[Key Words : chromosomal anomalies /ICSI /amniotic tissue culture /prenatal diagnosis]

GENEL BİLGİLER

İnfertilite merkezlerine gelen çiftlerin %60'ı erkek faktör nedeniyle. (%40 erkek, %40 kadın, %20 erkek + kadın faktördür) [2]. Kromozom anomalileri erkek faktör infertilite nedenlerinin %30'unu oluşturur. Erkek faktör

nedeni ile IVF merkezlerine gelen çiftler genellikle mikromanipulasyon tekniklerine tabi tutulur [3]. Genetik anomalilerin erkek infertilite nedenlerinin %30'unu oluşturması ve genellikle ileri anne yaşının olması embriyonun kromozom anomali riskini oldukça arttıracağını düşündürmektedir.

Spontan gebelik sonucu oluşan ve bir anomali ile canlı doğan bebeklerin %3'ünün yaşamını büyük doğmalık yapı bozuklukları tehdit etmektedir. Bu bozuklukların genellikle genetik yapıda oluşan düzensizlik sonucu oluştuğu bilinmektedir [4].

Doğmalık yapı bozukluklarının nedenlerinin %6'sını oluşturan kromozom anomalileri genetik hastalıklar içinde doğum öncesi ve sonrası tanımlamaları daha kolay olan hastalık grubunu oluşturmaktadır [5]. Yenidoğanda 1:60 sıklıkla belirlenen kromozom anomalileri insan morbidite ve mortalitesinde önemli bir etiyolojik faktördür [6]. Majör kromozom anomalileri genellikle ilk trimester da spontan abortuslara neden olur. Spontan abortuslarda görülen %50 - 60 kromozomal anomali oranı bunu doğrulamaktadır [7]. Yaşamla bağdaşan durumlarda ise kromozomal anomali zihinsel özür, dismorfik görünüm, gelişme geriliği ile karakterize sendromları oluşturmaktadır.

Spontan elde edilen gebeliklerde dahi genetik anomali oranı %3,2 [8] iken, %30 genetik anomali nedeniyle infertil olan erkeklerden alınan immatür, immotil, motil, matür spermilerin kullanılması ile elde edilen fetusta kromozom anomali riskinin artacağı beklenen bir durumdur.

Bu çiftlerde hem baba adaylarında genetik anomali oranının yüksek olması, hem de immotil, immatür spermelerinde kullanılarak elde edilen fetuslarda genetik anomali riskinin artacağını düşündürmüştür.

MATERYAL METOD

Bu çalışmada 1996 - 2000 tarihleri arasında erkek faktör infertilite nedeniyle Yardımcı Üreme Merkezine başvuru mikroenjeksiyon programına alınan ve gebelik elde edilen 98 çift (196 birey) değerlendirmeye alınmıştır.

ICSI uygulaması neticesinde gebelik elde edilen tüm çiftlere amniyosentez ile prenatal tanı önerilmiştir. Ailelerin %93,5'i tarafından prenatal tanı fetusu kaybetme korkusu nedeniyle rededilmiştir. 1500 ICSI gebesinden ancak 98'i (%6,5) işlemi kabul etmiştir. Gissler

ve arkadaşları [9] 1997 de Finlandiyada ICSI uygulamasına giren ve gebelik elde eden çiftlerden %10'nunun, Beral ve Doyle [10] 1990'da İngilterede %10, Bondulle ve arkadaşları ise [11] 1998'de Belçika'da %40'nın prenatal tanıyı kabul ettiklerini bildirmişlerdir.

Prenatal tanıyı kabul eden 98 olguya Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları tarafından 16-20. gebelik haftaları arasında yapılan amniyosentez sonucu elde edilen amniyotik sıvı doku kültürü laboratuvarına ulaştırılmıştır. Steril şartlarda 2 ayrı kültür flasksı hazırlamak amacıyla 2 ye bölünen amniyotik mayı 1300 rpm de 10 dakika çevirilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Amniyotik hücre kültüründe Hoehn ve arkadaşlarının protokolü uygulanmıştır [12]. Dibe çöktürülen hücreler üzerine BIO-AMF medium (%1 L-Glutamin, %1 Penesilin Streptomisin) eklenmiştir. Süspansiyon haline getirilen hücreler 25 cm²'lik kültür flaskslarına aktarılmıştır. 37 C° de %5 CO₂ de ve nemli ortamda inkübe edilmiştir. 24-96 saat sonra kültür flasksının zeminine yapışan hücre oranı invert mikroskopta izlenmiştir. Yapışma gösteren hücreler koloniler oluşturmaktadır. Kültürlerin medyumları 5-7 günde bir değiştirilmiştir.

Kültür ortamında uygun sayıya ve mitotik aktiviteye ulaşan amniyon hücreleri kromozomal çalışmaya alınmıştır. Bu amaçla hücrelerin üzerine 0.02 ml'e kolsemid solüsyonu (10µg/ml) eklenmiştir. Kültürler tekrar 37C°'de %5 CO₂'li ortama alınıp, 2-4 saat bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda flask yüzeyine yapışan hücreleri kaldırmak amacıyla tripsin kullanılmıştır. Bu amaçla steril ve - 20°C'de bekletilen tripsin EDTA solüsyonu oda ısısında eritilmiş ve kültür flasksı içerisinde 1-2 ml konmuştur. Hücreler bir süre 37C°'de bekletilerek, invert mikroskop ile takip edildiğinde flasksın alt yüzeyine yapışan hücrelerin kalktığı gözlenmiştir. Hücreler tamamen kalktıktan sonra santrifüj tüpüne aktarılmışlar ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış pellet üzerine vorteks aracılığı ile 4,5-5 ml'e 0,075M KCL, hipotonik solüsyon damla damla

eklenmiştir. 37°C sıcaklıkta 20 dakika bekletilmiş, 10 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve sonra süpernatant atılmıştır. Pellete taze hazırlanmış fiksatif solüsyonundan (3:1-metanol:asetik asit) 4,5-5ml'e damla damla eklenmiştir. Bu solüsyon buzdolabında +4°C'de saklanmıştır. Bir gün sonra, fikse edilen solüsyon 1200 rpm'de 10 dakika çevrilerek süpernatant atılmış ve fiksasyon işlemi üç kez tekrarlanmıştır. En son fiksasyondan sonra üstte kalan kısım atılmış ve altta kalan çökelti kısmı pipet ile karıştırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu asetik asit ve alkol ile temizlenmiş, lamalara bir pastör pipeti yardımı ile lam 30-45⁰ derece eğim yapacak şekilde damlatılmış ve

kromozom preparatları hazırlanmıştır. Preparatlar 37°C'de 3 gün bekletilerek kurutulmuş ve modifiye Seabright yöntemi ile GTG bantlama yöntemi uygulanmıştır.

Yapılan bantlama sonucu elde edilen preparatlarda en az 20 metafaz değerlendirmeye alınmıştır. Anomali gözlenen metafaz alanları ile normal metafaz alanlarından ikişer metafaz plağı fotoğraflanarak karyotip yapılmıştır.

SONUÇLAR

ICSI uygulamasına alınan ve gebelik elde edilen 98 annenin yaşları ve taşıdıkları fetus sayıları Tablo I de verilmiştir.

Tablo I : 98 annenin yaşları ve taşıdıkları fetus sayıları.

Anne Yaşı	Anne Sayısı	Fetus Sayısı
19-25	11	15
26-30	25	38
31-35	30	44
36-40	26	38
41-45	6	7
Toplam	98	142

98 annenin taşıdığı 142 fetusa yapılan prenatal tanı sonucunda elde edilen karyotip sonuçları Tablo II de verilmiştir.

Tablo II: 98 annenin taşıdığı 142 fetusa yapılan prenatal tanı sonuçları.

Karyotip	Fetus Sayısı
46, XX	71
46, XY	65
47, XY+21	1
47, XXY	1
45, XO	1
46, XX / 69, XXX / 92, XXXX	1
46, XY / 69, XXY / 92, XXYY	1
46, XY / 47, XY+7	1

Kromozom anomalisi gösteren fetusa sahip anne ve baba adaylarının karyotipleri, yaşları, infertilite süreleri, babaların

spermiyogramları, fetuslara ait karyotipler Tablo III de yer almıştır.

Tablo III:Anne ve baba adaylarının karyotipleri, yaşları, infertilite süreleri, babaların spermiyogramları, fetuslara ait karyotipler.

Fetuslara Ait Karyotipler	Kadınlara Ait Karyotipler	Erkeklerle Ait Karyotipler	Kadınların Yaşı	Erkeklerin Yaşı	Çiftlerin İnfertilite Süreleri	Erkeklerle Ait Spermiyogramlar
47,XY+21	46, XX	46,, XY	42	45	15	Vol:5 ml 650.000/ml %14+4 %10+3 %20+2 %55+1
47,XXY	46, XX	46,, XY	36	42	10	Vol:4,5 ml 0/ml %0+4 %0+3 %0+2 %0+1
45,XO	46, XX	46,, XY	34	41	10	Vol:4 ml 300.000/ml %15+4 %10+3 %0+2 %75+1
46,XX / 69,XXX / 92,XXXX	46, XX	46,, XY	27	33	7	Vol:4,3 ml 100.000/ml %45+4 %19+3 %6+2 %30+1
46,XY / 69,XXY / 92,XXYY	46, XX	46,, XY	27	33	7	Vol:4,3 ml 100.000/ml %45+4 %19+3 %6+2 %30+1
46,XY / 47, XY+7	46, XX	46,, XY	36	40	16	Vol:4 ml 200.000/ml %10+4 %5+3 %0+2 %85+1

TARTIŞMA

ICSI'nin kullanımında en çok merak edilen ve sorgulanan konu, çocukların kromozom anomalisi taşıyıp taşımayacağıdır. Bu teknik sayesinde immatur spermatozoa oositleri dölemek amacı ile kullanılabilir. Bunun da kromozom anomalisi riskini artıracığı düşünülmektedir [13]. Şiddetli erkek infertilitesi nedeniyle ICSI kullanılarak oluşmuş gebeliklere ait genetik riskler uygulanan işlemlerin kendisine ya da hastaların özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Gamet hücrelerinin ICSI işlemi için hazırlanmasının kromozom anomalisi riskini artırmadığı fikri günümüzde ön plandadır. Ancak hasta popülasyonunun özellikleri genetik endişenin asıl nedenini oluşturmaktadır.

Peschka ve arkadaşları 1999'da erkek infertilitesi nedeniyle IVF'de başarısız olup ICSI programına giren 781 çifti kromozomal

anomali yönünden değerlendirmişlerdir. 1562 hastanın 1012'sinde normal karyotip (%64.8) ve 204 hastada kromozomal anomali (%13.1) bulmuşlardır [14]. Normal popülasyondaki kromozomal anomali oranı %0.6 [15] iken, bu çalışma grubunda artmış olması fetal kromozomal anomali oranını arttıracığını düşündürmektedir.

1999 yılında yapılan bir çalışmada ICSI uygulamasındaki 301 çiftin sitogenetik sonuçlarında %3.6 kromozomal yapı bozukluğu bulunmuştur. Bunlardan %2.9'u erkeklerde ve %0.7'i kadınlardadır [16].

Erkek infertilitesi etyolojisinde %30 genetik nedenler söz konusudur [3]. Fakat kromozomal olarak normal olan infertil erkeklerin spermatozoolarında otozom ve seks kromozomu dizomilerinin arttığı izlenmiştir. Bu da ICSI'de seks kromozom anomalisi artışını açıklayabilir [17].

Şiddetli oligozoospermik erkeklerin periferik lenfosit karyotiplerinde yüksek

oranda (%13.7-15.4) kromozomal anomali saptanmaktadır [18]. Bu kadar riskli bir topluluktan elde edilecek fetusların yüksek oranda kromozomal anomaliye sahip olacağı beklenebilir

In't Veld ve arkadaşlarının 1995 yılında ICSI sonrası elde edilen 15 gebelikte yaptıkları prenatal tanıda %33.3 seks kromozom anomali oranı bildirerek büyük bir tartışmaya neden olmuşlardır [19]. Van Opstal ve arkadaşları daha fazla sayıda ICSI gebeliğini (71) prenatal tanı ile incelemişlerdir. 71 gebede bulunan 71 fetusun 9 tanesinde kromozomal anomali (%12.7) bulunmuş, 2 tanesi maternal, 6 tanesi paternal kökenli, 1 tanesi *de novo* olarak bildirilmiştir [20]. Yapılan ilk çalışmaya göre kromozomal anomali oranı daha düşük olmakla birlikte normal popülasyondan yüksektir. İlk çalışmaya göre daha fazla hasta sayısı olmakla birlikte, incelenen olgu sayısı yetersiz kabul edilmektedir.

Bondulle ve arkadaşları yalnızca ICSI endikasyonu ile oldukça büyük bir grup olan 1082 gebeye amniyosentez yapılmışlar ve 28 (%2.6) fetusta kromozomal anomali tespit etmişlerdir. Bunun %0.92'si maternal/paternal kaynaklı kromozom anomalisi, %1.66 *de novo* düzensizlikler (%50'si seks kromozom anomalisi, %50'si otozomal kromozom anomalisi) olarak bildirilmişlerdir. Kromozom anomalisi bulunan 28 fetusun biri dışında hepsinin babasında kromozom anomalisi bulunmuştur [21].

Bu çalışmada 98 gebe ve 142 fetus incelemeye alınmıştır. Fetusların 54 tanesi tek (%55), 44 tanesi (%45) ikizdir. Amniyotik hücre kültürü ile yapılan fetal kromozom incelemesinde, 6 fetusta (%4.2) kromozom anomalisi tespit edilmiştir. Bunlardan 2 tanesi (%1.4) seks kromozom anomalisi iken, 4 tanesi (%2.8) otozomal kromozom anomalisidir. Anöploidi sayısı 4 (%66) iken, öploidi sayısı 2'dir (%33).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ICSI sonucu elde edilen fetuslarda otozomal kromozomal anomali oranının fazla artmadığı, fakat seks kromozom anomali oranının arttığı (% 0,83) bildirilmektedir [21].

Çalışmamızda ise bunun aksine otozomal kromozom anomali oranı %2.8 iken seks kromozom anomalisi oranı %1.4 olarak bulunmuştur.

Bu konuda yapılan diğer çalışmalar ve buldukları sonuçlar ise şöyledir; 1997'de Meschede ve arkadaşları ICSI gebeliklerinde incelenen fetuslarda seks kromozom anomali oranının arttığını iddia etmişlerdir [22]. 1996'da Wisonto ve arkadaşları ejakulat, testiküler, epididimal spermatozoa ve dondurulmuş embriyo kullanılarak elde edilen 904 ICSI gebeliğinin incelenmesi sonucunda fetusların %97.6'sında normal, %1.2'sinde *de novo* ve %1.2'sinde kalıtsal kromozom anomalisi olmak üzere toplam %2.4'ünde kromozom anomalisi rapor etmişlerdir [23].

Gordts ve arkadaşları da 1998'de yaptıkları bir çalışmada, ICSI sonrası konjenital malformasyon oranının toplumdan yüksek olmadığını, fakat erkek infertilitesinde genetik faktörün önemli rol oynaması nedeniyle seks kromozom anomalisi yönünden gelecek neslin inceleme altında olmasını savunmuşlardır [24]. Wennerholm ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada, 149 bebeğe prenatal tanı yapılmış ve 4 fetusta (%2.7) kromozom anomalisi bulunmuştur [13].

Cruikshank ve arkadaşları 1983'de 35-39 yaşındaki annelerin gebeliklerinde %3, 40 yaş ve üzerindeki annelerin gebeliklerinde ise %7.2 oranında kromozomal anomali bildirmişlerdir [25]. Golbus ve arkadaşlarının 1974 yılında fertil toplumda 2700 anneden alınan amniyotik sıvıya yaptıkları amniyotik hücre kültürü neticesinde fetusların %3'ünde kromozomal anomali tespit etmişlerdir [26]. Oğur ve arkadaşları 1994'de, 122 olgu içeren çalışmalarında %3.2 kromozomal anomali bildirmişlerdir [8]. Anne yaşı 35 ve üzerinde olan olgularda %2-3, anne yaşı 40 ve üzerinde olan olgularda ise %4-7 dolayında kromozomal anomali görülmektedir [25, 27].

Bu çalışmaların hepsinde de ileri anne yaşında kromozom anomalisi özellikle 40 yaşından sonra çok artmaktadır. Snijders ve Nicoladies ise 1996'da invitro tedavi edilen kadınlarda elde edilen gebeliklerde kromozom

anomalisi oranının artmış olmasını ileri anne yaşı ile ilgili olduğunu savunmuştur [28].

Bu çalışmada 36-40 yaşları arasında yer alan anne sayısı 26 olup fetus sayısı ise 38'dir. Kromozom anomalili fetus sayısı ise bu grupta 2'dir (%5.2). 40 yaş ve üzerinde olan 6 anne ve 7 fetus yer almaktadır. Kromozomal anomalili fetus sayısı ise 1 kadardır (%14). Sonuçlarımız yaş gruplarına göre fertil popülasyondan biraz yüksek olmakla birlikte, onlara paralellik göstermektedir.

ICSI sonrası elde edilen gebeliklerdeki kromozom anomalisi oranının normal toplumdakinden çok da farklı görülmemesi embriyo seçimi nedeniyle olabilir. Laverge ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada ICSI sonucu elde edilen kötü morfoloji sergileyen, birden fazla nükleusu olan ve kötü skorlamaya sahip 116 embriyo, FISH metodu ile X, Y, 13, 16, 18, 21 nolu kromozomları incelenmiş ve embriyolardan 54 tanesi (%47) normal diploidi gösteriyorken, 62 tanesinde (%53) kromozom anomalisi saptanmıştır [29], 2 embriyoda non-disjunction izlenmiş ve 39 embriyoda anöploidi bulunmuştur. Anöploidi izlenen embriyoların 22 tanesi mozaik, 17 tanesi haploid, triploid ya da tetraploid, 12 embriyo da kaotik olarak değerlendirilmiştir. Görüldüğü gibi kötü skorlamaya sahip embriyolardaki kromozomal anomalisi oranı oldukça yüksektir. Ebeveynleri dikkate alındığında, bu sonuç çok şaşırtıcı gelmemektedir. Belki de embriyoların gözlenebiliyor olması ve iyi kalitede embriyoların anneye transfer edilmesi ICSI sonrası elde edilen fetustaki genetik anomalisi oranını düşürüyor olabilir .

ICSI uygulaması çoğunluğunu erkek faktörün oluşturduğu infertil çiftlerde, 1991'den beri başarı ile uygulanmaktadır. Erkek infertilitesinin %30'unu genetik nedenlerin oluşturması, sperm ve oositin laboratuvarında tabii tutuldukları işlemler ve immatür spermilerin bu teknikte oositi dölemek için kullanılabilmesi fetuste kromozomal anomalisi oranını artırabileceğini düşündürmektedir. Bu düşünce ile yaptığımız çalışmada değerlendirilen 142 fetusun 6 tanesinde (%4,2) tespit edilen kromozomal

anomalisi oranı, normal popülasyondaki aynı yaş gruplarında yer alan gebelere yapılan prenatal tanıda elde edilen kromozomal anomalisi oranına (%3,2) yakındır [8].

Bu sonuç ICSI'nin güvenilir bir yöntem olduğunu ve fetuste kromozom anomalisi oranını artırmadığı sonucunu vermektedir. Ancak yine de bu teknik ile elde edilen fetusların prenatal tanı ile incelenmesinin devam etmesi gerekliliğini de ortaya koymaktadır.

Her ne kadar ICSI tekniği güvenilir olarak kabul edilse de, paternal kromozomal anomalisi oranının bu toplulukta yüksek olması, ailenin yıllar sonra çok fazla masraf ve emek neticesinde sahip olacakları bebeğin sağlıklı olması için de bu grupta, PGT teknikleri ile tüm kromozomlar değerlendirilebilince ye kadar, amniyosentez ile prenatal tanı uygulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Forti, G., Krausz, C. 1998, Clinical review 100: Evaluation and treatment of the infertile couple, J Clin Endocrinol Metab., 12, 4177-4188.
2. Greenberg SH., Lipsultz LI., Wein AJ. 1978, Experience with 425 subfertile male patients. J Urol., 119(4): 507-510.
3. Küpker, W., Schwinger, E., Hiort, O., Ludwig, M., Nikolettos, N., N. Schlegel, P., Diedrich, K. 1999, Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. Hum Reprod. 14:1, 24-37.
4. D'Alton, ME., DeCherney, AH. 1993, Prenatal Diagnosis, N. Engl. J. Med., 114-120.
5. Gagnon, S., Fraser, W., Fouquette, B., Bastide, A., Bureau, M., Fontaine, J., Huot, C., 1992, Nature and Frequency of Chromosomal Abnormalities in Pregnancies with Abnormal Ultrasound Findings: An Analysis of 117 Cases with Review of The Literature, Prenat Diagn., 112: 9-18.
6. Thompson, MW., McInnes, RR., Willard, HF. 1992, General principles and autosomal abnormalities, Genetics in Medicine. Beşinci baskı. Wonsiewicz MJ (ed). WB Saunders, Philadelphia, 201-229

7. Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, J., Matsuyama, A., Wilson, C., Yamane, JA., Jacobs, PA. 1980, A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions, *Ann Hum Genet.*, 44: 29-36.
8. Oğur, G., Bahçe, M., İmirzalıoğlu, N., Başer, İ., Pabuşçu, R., Koç, a., Saraçoğlu, F., Danışman, N., Dölen, I., Gül, D., Yıldız, A. 1994, Results of 121 prenatal cytogenetic diagnosis from GATA Medical Faculty, Ankara-Türkiye, 7. International Conference on Early Prenatal Diagnosis; Jerusalem (Israel) 22-27.
9. Gissler, M., and Tirtien, A. 1997, IVF-statistic in Finland 1992-1996. National reserch and development Centre for Welfare and Health. Helsinki, 12:
10. Beral, V., and Doyle, P. 1990, Births in Great Britain resulting from assisted conception, 1978-1987. *Br Med.J.*, 300: 1229-1233.
11. Bonduelle, M., Wilikens, A., Buysse, A. 1998, A fallow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod.*, 13:1, 196-207.
12. Hoehn, H., Bryant, EM., Karp, LE., Martin, GM. 1974, Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential. *Pediatr Res.*, 8:746-754.
13. Wennerholm, U.-B., Bengh, C., Hamberger, L., Lundin, K., Nilsson, L., Wikland, M., Köllen, B. 2000, İncidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod.*, 15:4, 944-948.
14. Peschka, B., Leygraaf, J., Van der ven, K., Montag, M., Schartmann, B., Schubert, R., Van der ven, H., Schwanitz, G. 1999, Type and frequency of chromosome aberations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprot.*, 14:9, 2257-2263.
15. Şentürk, L., Hekim, N. 1992, Prenatal tanıda noninvaziv yöntemler, *Prenatal Tanı ve Tedavi*, Aydınli, K., Perspektiv, İstanbul, 40-51.
16. Causio, F., Fischetto, R., Schonarver, LM., Leonetti, T. 1999, Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural cytogenetic abnormalities. *Reprod Med.*, 44: 859-864.
17. Egozcue, S., Blanco, J., Vendrell, JM., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Barr, PN., Vidal, F., Egozcue, J. 2000, Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod.*, 6:1, 93-105.
18. Van Assche, E., Bondulle, M., Tournage, H. 1996, Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod.*, 11:4, 1-24.
19. In't Veld, P., Branderburg, H., Verhoeff, A. 1995, Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.*, 346-773.
20. Van Opstal, C., Los, F.J., Ramlakhan, S. 1997, Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*, 12: 682-686.
21. Bondulle, M., Aytöz, A., Van, Assche, E., Devroey, P. 1998, İncidence of chromosomal aberration in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*, 13: 781-782.
22. Meschede, D., Horst, J. 1997, Sex chromosomal anomalies in pregnancies conceived through intracytoplasmic sperm injection: a case for genetic counselling. *Hum Reprod.*, 12:6, 1125-1127.
23. Wisanto, A., Bondulle, M., Camus, M., Tournaye, H., Magnus, M., Liebares, I., Van Steirteghem, A., Devroey, P. 1996, Obstetric outcome of 904 pregnancies after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*, 11:4, 121-129.
24. Gordts, S., Rombauts, L., Rozieis, P., Serneels, A., Gavrois, B., Vercruyssen, M., Campo, R. 1998, Intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male

- subfertility. Eur J. Obstet Gynecol Reprod Biol., 81:2, 207-211.
25. Cruikshank, D.P., Varner, M.W., Cruikshank, J.E., Grant, S.S., Donnelly, E. 1983, Midtrimester amniocentesis; An analysis of 923 cases with neonatal follow-up. Am J Obstet Gynecol., 146: 204-210.
 26. Golbus, MS., Conte, FA., Schneider, EL., Epstein, CJ. 1974, Intrauterine diagnosis of genetic defects, Result, problems, and follow-up of one hundred cases in a prenatal genetic detection center, Am J Obstet Gynecol., 118: 897-905.
 27. Gosden, C. M. 1983, Amniotic Fluid Cell Types and Culture. Br Med Bull., 39: 348-354.
 28. Snijders, R.J.M., Nicolaides, K.H. 1996, Ultrasound markers for fetal chromosomal defects. In frontiers in fetal medicine. The Parthenon Publishing Group, London-UK.
 29. Laverge, H., De Sutter, P., Verschraegen-Spae, M.R., De Paepe, A., Dhont, M. 1997, Triple colour fluorescent in-situ hybridization for chromosomes X, Y and 1 on spare human embryos. Hum Reprod., 12:4, 809-814.

Yazarlar:

H.ŞAMLI: Yrd. Doç. Dr. , Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.

M. SOLAK:Prof. Dr. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.

N İMİRZALIOĞLU: Doç. Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D

Y. BEYATLI:Prof. Dr., Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

S. ŞİMŞEK: Doç. Dr. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.

S. KAHRAMAN:Doç. Dr., Memorial Hastanesi, Yardımcı Üreme Merkezi

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Hale ŞAMLI, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D, Afyon

Tel: 217 17 53

Fax:217 20 29