



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IVF KÜLTÜR SIVISININ PRE İMPLANT GENETİK TANI AMAÇLI  
GENOMİK VE METABOLOMİK ANALİZİ**

İBRAHİM ORÇUN OLCAY

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Cengiz YAKICIER

İSTANBUL-2022





ACIBADEM MEHMET ALI AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IVF KÜLTÜR SIVISININ PRE İMPLANT GENETİK TANI  
AMAÇLI GENOMİK VE METABOLOMİK ANALİZİ**

İBRAHİM ORÇUN OLCAY

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Cengiz YAKICIER

İSTANBUL-2022

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih

İbrahim Orçun Olcay

(İmza)

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çok değerli danışmanım ve hocam Prof. Dr. Cengiz YAKICIER'e doktora çalışmalarım boyunca gösterdiği destek için çok teşekkür ederim. Danışman hocamın engin bilgileri, anlayışı ve yardımı olmadan bu çalışma gerçekleşmezdi. Çözümleyici bakış açısı ve desteği sayesinde çalışmam anlam kazandı.

Doktora eğitim hayatımda öncelikle bildikleriyle yol gösteren, sonrasında da danışmanlığımı kabul ederek, çalışmamın yönlendirilmesinde değerli yorumlarıyla önemli katkılar sağlayan sayın Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR hocama teşekkürü bir borç bilirim. Tezime istatistiki bilgi ve birikimiyle bir anlamlılık katan sayın Prof. Dr. Muhittin Abdulkadir SERDAR hocama her şey için çok teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde bulunan değerli hocalarım, Prof. Dr. Ayşe ÖZER ve Dr. Öğr. Üyesi Cemaliye AKYERLİ BOYLU'ya doktora çalışmalarım boyunca gösterdikleri destek için çok teşekkür ederim. Çalışmanın yönlendirilmesinde değerli yorumlarıyla önemli katkılar sağlamışlardır.

Çalışmamda topladığım kültür sıvılarının genomik açıdan incelenmesinde bilgi birikimlerini ve desteklerini hiç esirgemeyen Dr. Jülide CAFERLER' e ve moleküler biyolog Çağrı OĞUR' a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarıyla tezime yardımcı olan SYNLAB laboratuvarı biyokimya uzmanı Dr. Namık Kemal NAZAROĞLU ve kromografi uzmanı biyolog Fevzi ÖZER' e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezi yazmama olanak sađlayan, hiřbir zaman desteđini benden esirgemediđi, motivasyonumu kaybettiđimi hissettiđimde bile beni pozitif dűşünmeye ikna ettiđi ve problemlerin çözümüne destek olduđu için Dr. Öğr. Üyesi Murat BAŞAR'a, ayrıca çok teřekkür ederim.

Kurumda beraber alıştığım Bahçeci Sağlık Grubu Bilimsel Direktörü Dr. Necati FINDIKLI ve embriyolog Berkay AKÇAY başta olmak üzere, tüm Bahçeci Umut Tüpbebek Merkezi Laboratuvarı ekibine, beni hep cesaretlendirdikleri ve daima motive ettikleri için sonsuz teşekkür ederim.

En derin saygı ve sevgilerimi emekli diř doktoru aynı zamanda Bahřeci Sağlık Grubu satın alma müdürü annem Sibel OLCAY, Beykoz Ağız ve Diř Sağlığı Bařhekimi babam Ömer Besim OLCAY ve tabi ki ikiz kardeşim Biruni Üniversitesi protetik diř tedavisi anabilim dalı Dr. Öğr. Üyesi Emin Orkun OLCAY' a sunarım. Hepsi, ihtiyacım olan her an, ayrı ayrı destek ve motivasyon sağlamışlardır. Ve tabiki olmazsa olmaz Gamze SALKAYA' ya her zaman yanımda olduğu için ne zaman karamsarlığa dűřsem beni çıkardığı için ayrıca çok teşekkür ederim.

Son olarak bu mesleği seşmeme vesile olan, mesleğimde kendimi geliştirmem için her türlü desteği sağlayan, mesleğin sadece yapılan iş olmadığını aynı zamanda yeni çıkan yayınların okunarak kendini geliştirmenin zorunluluk olduğunu öğreten Prof. Dr. Mustafa BAHÇECİ'ye teşekkürü bir borç bilirim. Doktora tezim boyunca çalışmalarımın gerçekleşmesini mümkün kıldığı için kendisine ayrıca teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iv
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
RESİMLER LİSTESİ.....	xivv
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
1.1 Tez Çalışmasının Hipotezi.....	3
1.2 Tez Çalışmasının Amacı .....	3
1.3 Tez Çalışmasının Bilime Katkısı.....	4
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Üremeye Yardımcı Tekniklere (ÜYTE) Bakış .....	5
2.1.1 İnfertilite nedenleri ve ÜYTE kullanımı .....	5
2.1.2 ÜYTE yöntemleri .....	6
2.2 Gamet ve Embriyo Kültürü .....	8
2.2.1 Embriyo kültür medyum içeriği .....	8
2.2.2 Gametogenez.....	9
2.2.2.1 Spermatogenez .....	10
2.2.2.2 Oogenez .....	11
2.2.3 Gamet etkileşimi.....	12
2.2.4 Oosit ve sperm füzyonu.....	13
2.2.5 Döllenme evresi.....	14
2.2.6 Embriyo implantasyon aşamaları.....	15

2.3	Konvansiyonel Embriyo Değerlendirme Yaklaşımları.....	16
2.3.1	Fertilizasyon ve erken klivaj aşaması embriyo değerlendirilmesi.....	16
2.3.2	Blastokist aşaması embriyo değerlendirmesi.....	19
2.4	Girişimsel (İnvaziv) Embriyo Değerlendirme Yaklaşımları .....	20
2.4.1	Embriyonik anöploidi .....	20
2.4.2	Embriyo biyopsisi.....	21
2.4.3	Preimplantasyon genetik tanı (PGT-A) sonrası embriyo seçimi.....	23
2.5	Girişimsel Olmayan (Non-invaziv) Embriyo Değerlendirme Yaklaşımları .....	25
2.5.1	Time lapse morfolojik analiz.....	30
2.5.2	Kullanılmış hücre kültür medyumunda serbest (Cell-free) DNA analizi.....	31
2.5.2.1	Kültür ortamındaki embriyonik DNA'nın olası kökeni.....	32
2.5.2.2	Kullanılmış hücre kültür medyumunu (SCM): Örneklemeye, saklama ve analiz şartları.....	35
2.5.3	Kullanılmış hücre kültür medyumunda proteomik/metabolomik analiz.....	39
2.6	Amino Asit Transport Düzenlemesi ve Erken Embriyo Gelişimi.....	40
2.7	Esansiyel Olmayan Amino Asitlerin Embriyo Gelişimine Faydası .....	42
2.8	Esansiyel Amino Asitlerin Embriyo Gelişimine Faydası.....	49
2.9	Protein Sentezi ve Birikimi.....	49
2.10	Embriyo Proteomik ve Metabolomik Analizlerinde Kullanılan Teknikler.....	49
2.10.1	Kütle spektrometrisi (MS).....	44
2.10.2	Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi .....	45
2.10.3	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	46
2.10.4	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) .....	47
3	GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1	Gereçler .....	49
3.1.1	Yumurta toplama için kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler .....	49
3.1.2	Döllenme ve embriyo kültürü için kullanılan demirbaş, sarf ve kimyasal malzemeler .....	49
3.1.3	TE biyopsisi ve biyopsi materyallerinin tüplere aktarımı .....	54
3.1.4	Anöploidinin belirlenmesi.....	54

3.1.5	Kültür medyumunun toplanması .....	54
3.2	Yöntem .....	55
3.2.1	Ovaryum uyarılması ve yumurta toplama.....	55
3.2.2	Döllenme ve embriyo kültürü.....	55
3.2.3	Embriyoların skorlanması.....	57
3.2.4	Trofoektoderm (TE) biyopsisi.....	59
3.2.5	Biyopsi sonrası örneklerin tüplere aktarımı .....	61
3.2.6	NGS yöntemiyle anöploidinin belirlenmesi.....	61
3.2.7	Kültür medyumunu toplanması .....	62
3.2.8	Kullanılmış kültür medyumları genomik analizi .....	63
3.2.8.1	Tüm genom çoğaltma işlemi.....	64
3.2.8.2	Template hazırlığı .....	67
3.2.8.3	Dizileme .....	68
3.2.8.4	Sekanslama kimyası.....	69
3.2.8.5	Analiz.....	69
3.2.9	Kullanılmış kültür medyumları metabolomik analizi .....	71
3.2.9.1	Kültür medyumunu amino asit ölçüm çalışmaları.....	71
3.2.9.2	Kültür medyumunu bileşen miktarlarının belirlenmesi.....	71
3.2.10	PGT-A sonuçlarının yorumlanması.....	72
3.2.11	Öploid embriyo transferi .....	73
3.2.12	Metabolomik data analizi için kullanılan istatistik .....	73
4	BULGULAR .....	74
4.1	Hasta Demografisi .....	74
4.2	Genomik Analiz Sonuçları.....	75
4.3	Metabolomik Analiz Sonuçları .....	85
4.3.1	Preliminer çalışmalar .....	85
4.3.2	LC-MS/MS sonuçları .....	86
4.3.3	Anöploidilerin hasta yaşına göre dağılımı.....	88
4.3.4	Anöploidilerin toplanan oosit sayısına göre dağılımı.....	89
4.3.5	Anöploidilerin oosit maturasyon yüzdesine göre dağılımı .....	91
4.3.6	Anöploidilerin sperm sayısına göre dağılımı .....	92
4.3.7	Anöploidilerin sperm hareketliliğine göre dağılımı .....	94

4.3.8	PGT-A sonucu normal embriyoların gebelik sonuçları.....	95
4.3.9	Embriyo öploidi durumu ve aminoasit tüketimi ilişkisinin LC-MS/MS yöntemiyle analizi.....	96
4.3.9.1	Serin.....	97
4.3.9.2	Triptofan .....	98
4.3.9.3	Treonin .....	100
4.3.9.4	Lizin .....	101
4.3.9.5	Histidin .....	103
4.3.9.6	Glisin .....	104
4.3.9.7	Glutamin .....	106
4.3.9.8	Glutamik asit .....	106
4.3.9.9	Asparajin.....	109
4.3.9.10	Alanin .....	110
4.3.9.11	Ornitin.....	112
4.3.9.12	Fenilalanin .....	113
4.3.9.13	Sistin .....	115
4.3.9.14	Valin .....	116
4.3.9.15	Tirozin .....	118
4.3.9.16	Lösin .....	119
4.3.9.17	Aspartik asit.....	121
4.3.9.18	Metiyonin .....	122
4.3.9.19	Hidroksipirolin .....	124
4.3.9.20	Sitrülin.....	125
4.3.9.21	Arjinin .....	127
4.3.9.22	SCM amino asit miktarı vs. embriyonik anöplöidi ilişkisi .....	128
5	TARTIŞMA .....	131
5.1	Genomik İnceleme.....	132
5.2	Metabolomik İnceleme.....	135
6	SONUÇ.....	141
7	KAYNAKLAR.....	144
8	EKLER.....	162
8.1	Etik Kurul Raporu .....	162
8.2	Tez Yayını .....	163
9	ÖZGEÇMİŞ.....	170

## KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

<b>°C</b>	Derece santigrat
<b>µM</b>	Mikrometer
<b>aCGH</b>	Array Comparative genomic hybridization / Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
<b>AI</b>	Artificial intelligence / Yapay zeka
<b>APCI</b>	Atmospheric pressure chemical ionization / Atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon
<b>APS</b>	Amonyum peroksodisulfat
<b>BF</b>	Blastösel sıvı
<b>Bp</b>	Baz pair
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum iyon
<b>cfDNA</b>	Serbest nükleik asit molekülleri
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotit trifosfat
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>DSÖ</b>	Dünya sağlık örgütü
<b>ESHRE</b>	European society of human reproduction and embryology
<b>ESI</b>	Electrospray ionization / Elektrosprey iyonizasyon
<b>EVler</b>	Ekstraselüler veziküller
<b>FET</b>	Frozen embryo transfer / Dondurulmuş embriyo transferi
<b>FISH</b>	Floresan in situ hibridizasyon
<b>GnRH</b>	Gonadotropin
<b>hMG</b>	Human menapozal gonadotropin

<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography / Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>ICM</b>	Inner cell mass / İç hücre kütlesi
<b>ICSI</b>	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
<b>IgA</b>	İmmüoglobulin A
<b>IgG</b>	İmmüoglobulin G
<b>IUI</b>	Intrauterin inseminasyon
<b>IVF</b>	In vitro fertilization
<b>İAY</b>	İleri anne yaşı
<b>İH</b>	İleri hareketlilik
<b>LC</b>	Liquid chromatography / Sıvı kromatografisi
<b>LC-MS/MS</b>	Liquid chromatography mass spectrometry / Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
<b>L-Gln</b>	L-Glutamin
<b>miRNA</b>	Mikro RNA
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA
<b>MS</b>	Mass spectrometry / Kütle spektrometresi
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>m/z</b>	Mass/charge number – kütle/yük sayısı
<b>Na+</b>	Sodyum iyon
<b>NGS</b>	Next generation sequencing / Yeni nesil dizileme
<b>NH</b>	Normal hareketlilik
<b>niPGT-A</b>	Non-invasive preimplantation genetic testing - aneuploidy

<b>Nm</b>	Nanometre
<b>NMR</b>	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
<b>PAP</b>	Daha önce anormal gebelik yaşamak
<b>PCOS</b>	Polikistik over sendromu
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>Pg</b>	Pikogram
<b>PGT</b>	Preimplantasyon genetik tanı
<b>PGT-A</b>	Preimplantasyon genetik tanı anöploidi
<b>pH</b>	Power of hydrogen
<b>rFSH</b>	Rekombinant folükül uyarıcı hormon
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RT-PCR</b>	Real-time polymerase chain reaction
<b>SCM</b>	Spent culture medium / Kullanılmış kültür sıvısı
<b>SET</b>	Single embryo transfer / Tek embriyo transferi
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism
<b>TE</b>	Trofektoderm
<b>TGK</b>	Tekrarlayan gebelik kaybı
<b>TİB</b>	Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı
<b>TL</b>	Time lapse
<b>ÜYTE</b>	Üremeye yardımcı tedaviler
<b>vki</b>	Vücut kitle indeksi
<b>ZP</b>	Zona pellusida

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. IVF & ICSI. ....	7
Şekil 2.2. Spermatogenez.....	11
Şekil 2.3. Oogenez. ....	12
Şekil 2.4. Sperm – oosit kaynaşması aşamaları. ....	14
Şekil 2.5. Klivaj embriyosunun morfolojik değerlendirme kriterleri. ....	18
Şekil 2.6. TE biyopsisi için embriyo hazırlığı.....	22
Şekil 2.7. niPGT-A uygulama prosedürü.....	26
Şekil 2.8. DNA salınım yollarından apoptoz ile nekrozun kıyaslanması.....	34
Şekil 3.1. niPGT için embriyo kültür kabı şeması. ....	57
Şekil 3.2. Tüm genom çoğaltma, template hazırlığı, sekanslama ve analiz.....	63
Şekil 3.3. Barkod tabağı.....	65
Şekil 3.4. NGS iş akışında iyon raportör yazılım işlevleri.....	70
Şekil 4.1. TE biyopsi-SCM örneklerine ait NGS profilleri.....	84
Şekil 4.2. SCM örneklerine ait NMR spektrum sonuçları .....	86
Şekil 4.3. Anöploidilerin hasta yaşına göre dağılım grafiği.....	88
Şekil 4.4. Anöploidilerin hasta yaşına göre istatistiksel analizi .....	89
Şekil 4.5. Anöploidilerin toplanan oosit sayısına göre dağılım grafiği .....	90
Şekil 4.6. Anöploidilerin toplanan oosit sayısına göre istatistiksel analizi .....	90
Şekil 4.7. Anöploidilerin oosit maturasyon yüzdesine göre dağılım grafiği .....	91
Şekil 4.8. Anöploidilerin oosit maturasyon yüzdesine göre istatistiksel analizi .....	92
Şekil 4.9. Anöploidilerin sperm sayısına göre dağılım grafiği .....	93
Şekil 4.10. Anöploidilerin sperm sayısına göre istatistiksel analizi .....	93

Şekil 4.11. Anöploidilerin sperm hareketliliğine göre dağılım grafiği .....	94
Şekil 4.12. Anöploidilerin sperm hareketliliğine göre istatiktiksel analizi.....	95
Şekil 4.13. Öploid durumu blastokist gelişim gününe göre dağılım grafiği.....	96
Şekil 4.14. Serin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	97
Şekil 4.15. Serin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	98
Şekil 4.16. Triptofan amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği .....	99
Şekil 4.17. Triptofan amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	99
Şekil 4.18. Treonin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	100
Şekil 4.19. Treonin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	101
Şekil 4.20. Lizin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	102
Şekil 4.21. Lizin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	102
Şekil 4.22. Histidin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	103
Şekil 4.23. Histidin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	104
Şekil 4.24. Glisin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	105
Şekil 4.25. Glisin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	105
Şekil 4.26. Glutamin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği .....	106
Şekil 4.27. Glutamin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	107
Şekil 4.28. Glutamik asit amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	108
Şekil 4.29. Glutamik asit amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	108
Şekil 4.30. Asparajin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	109
Şekil 4.31. Asparajin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	110
Şekil 4.32. Alanin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	111
Şekil 4.33. Alanin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	111
Şekil 4.34. Ornitin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	112

Şekil 4.35.Ornitin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	113
Şekil 4.36.Fenilalanin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği .....	114
Şekil 4.37.Fenilalanin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	114
Şekil 4.38.Sistin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği .....	115
Şekil 4.39.Sistin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	116
Şekil 4.40.Valin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	117
Şekil 4.41.Valin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	117
Şekil 4.42.Tirozin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	118
Şekil 4.43.Tirozin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	119
Şekil 4.44.Lösin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği .....	120
Şekil 4.45.Lösin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	120
Şekil 4.46.Aspartik asit amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği .....	121
Şekil 4.47.Aspartik asit amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	122
Şekil 4.48.Metiyonin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	123
Şekil 4.49.Metiyonin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	123
Şekil 4.50.Hidroksiprolin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	124
Şekil 4.51.Hidroksiprolin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	125
Şekil 4.52.Sitrülin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği .....	126
Şekil 4.53.Sitrülin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi .....	126
Şekil 4.54.Arjinin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği.....	127
Şekil 4.55.Arjinin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi.....	128
Şekil 4.56. Anöplid embriyolara ait ROC eğrisi.....	129

## RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. Günlere göre embriyo gelişim evreleri. ....	16
Resim 2.2. ICSI işlemi sonrası pronükleus oluşumu. ....	17
Resim 3.1. Invert mikroskop ve mikromanipulatör .....	56
Resim 3.2. Benchtop inkübatör .....	57
Resim 3.3. Üçüncü gün embriyo gelişimleri ve skorlanması.....	58
Resim 3.4. Beşinci gün blastokist gelişimleri ve skorlanması.....	59
Resim 3.5. Biyopsi işlemi tamamlanmış blastokist ve biyopsi örneği.....	60
Resim 3.6. Çalışma alanı (Laminar flow hood).....	62
Resim 3.7. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan cihaz .....	66
Resim 3.8. Saflaştırma ve miktar tayini için hazırlığı.....	67
Resim 3.9. Ion chef sistemi .....	68
Resim 3.10. Ion Gene Studio S5 .....	68
Resim 3.11. İnceleme sonucunun grafiksel gösterimi .....	70
Resim 3.12. SHIMADZU 8030 LC-MS/MS cihazı.....	71

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. İnsan spermi referans değerleri.....	7
Tablo 2.2. Blastokist değerlendirmesi.....	19
Tablo 2.3. SCM’de embriyonik DNA analizi gerçekleştirilen alışmalar .....	37
Tablo 2.4. Aminoasit grupları. ....	41
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar .....	50
Tablo 3.2. Sarf malzemeler .....	51
Tablo 3.3. Demirbaş listesi.....	52
Tablo 3.4. Pre-amplifikasyon için master mix hazırlığı.....	64
Tablo 3.5. Preamplifikasyon polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.....	64
Tablo 3.6. Amplifikasyon polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.....	66
Tablo 4.1. Hastalara ait demografik parametreler.....	74
Tablo 4.2. Genomik analiz kapsamında değerlendirilen embriyolar ve sonuçlar.....	75
Tablo 4.3. Örnekleme gününe göre SCM Sonuçları.....	85
Tablo 4.4. Embriyo kalitesine göre SCM Sonuçları .....	85
Tablo 4.5. Çalışmaya dahil edilen hastalara ait zellikler .....	87
Tablo 4.6. Anöploid embriyoların kromozomal dağılımı .....	87
Tablo 4.7. Normal vs. Anploidide amino asit alt grubu tablosu.....	130

## ÖZET

### IVF Kültür Sıvısının Pre İmplant Genetik Tanı Amaçlı Genomik ve Metabolomik Analizi

Üremeye yardımcı tedavilerde (ÜYTE) başarısızlığın en önemli nedenleri yetersiz embriyo seçim metodları ve artan anne yaşına bağlı olarak artan embriyonik anöploidilerdir. Günümüzde bu anomalilerin PGT-A yöntemi ile embriyo transferi öncesi tespiti mümkündür fakat analiz için gerekli olan embriyo biyopsisi beraberinde ek riskler ve maliyet getirebilmektedir. Bu çalışmada amaç, girişimsel olmayan şekilde ve embriyoya ait kullanılmış kültür ortamlarının (SCM) genomik ve metabolomik incelenmesi temeline dayalı, etkin ve düşük maliyetli bir test yaklaşımı geliştirmektir. Çalışmaya Nisan 2019 – Nisan 2022 tarihleri arasında Bahçeci Umut Tüp Bebek Merkezinde tedavi gören ve PGT-A uygulanan 149 hastaya ait 392 TE biyopsisi yapılmış embriyo ve SCM örneği dahil edilmiştir. Bunların arasından 22 SCM örneği (11 öploid ve 11 anöploid) genomik niPGT-A analizi amaçlı olarak NGS tekniği ile, 49 SCM örneği (17 öploid ve 32 anöploid) metabolomik niPGT-A analizi amaçlı olarak LC-MS/MS tekniği ile analiz edilmiştir. Genomik PGT-A amaçlı incelenen 22 örneğin 11'inde hücresiz DNA başarılı bir şekilde çoğaltılabilmiş ve 4 örneğin tam, 4 örneğin ise kısmı olarak TE biyopsi sonucuyla uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın metabolomik niPGT-A kolunda tirozin aminoasit konsantrasyonunun öploid/anöploid açısından istatistiksel olarak anlamlı şekilde ayrıştırıcı olduğu, Treonin, lizin, histidin, glisin ve asparajin amino asitlerinin monozomik embriyolarda scm'deki miktarları istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ayrıca yine monozomik embriyolarda scm'deki glutamin miktarı istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Fenilalanin, valin, metiyonin, arjinin, lösin, aspartik asit, hidroksiprolin ve sitrülün amino asit miktarlarının monozomi ve trizomi ile ilişkili olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0.05$ ). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar embriyoların metabolomik niPGT-A yaklaşımı kullanılarak anöploid tanısı koymada yardımcı olabileceğini göstermekle birlikte genomik niPGT-A tanısı koymak için ek çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** IVF, embriyo kültürü, girişimsel olmayan PGT-A, öploid, anöploid.

## **ABSTRACT**

### **Genomic and Metabolomic Analyses of IVF Culture Medium for Preimplantation Genetic Diagnosis**

The most important reasons for failure in assisted reproductive technologies (ART) treatments are inadequate embryo selection methods and increasing embryonic aneuploidies due to increasing maternal age. Today, it is possible to detect these anomalies before embryo transfer with PGT-A method, but embryo biopsy required for analysis may bring additional risks and costs. The aim of this study is to develop an efficient and low-cost testing approach based on genomic and metabolomic examination of embryonic used culture media (SCM) non-invasively. In the study, 392 TE biopsied embryos and SCM samples of 149 patients who were treated at Bahçeci Umut IVF Center and underwent PGT-A between April 2019 and April 2022 were included. Among them, 22 SCM samples (11 euploid and 11 aneuploid) were analyzed by NGS technique for genomic niPGT-A analysis, 49 SCM samples (17 euploid and 32 aneuploid) were analyzed by LC-MS/MS technique for metabolomic niPGT-A analysis. Cell-free DNA was successfully amplified in 11 of 22 samples examined for genomic PGT-A, and it was found that 4 samples were compatible with the TE biopsy result as complete and 4 samples partially. In the metabolomic niPGT-A arm of the study, the tyrosine amino acid concentration was statistically significantly different in terms of euploidy/aneuploidy, and the amounts of threonine, lysine, histidine, glycine and asparagine amino acids in scm in monosomic embryos were found to be statistically high ( $p < 0.05$ ). In addition, the amount of glutamine in scm was found to be statistically low in monosomic embryos ( $p < 0.05$ ). It has been shown statistically that the amino acid amounts of phenylalanine, valine, methionine, arginine, leucine, aspartic acid, hydroxyproline and citrulline are associated with monosomy and trisomy ( $p < 0.05$ ). The results obtained in this study show that embryos can be helpful in diagnosing aneuploidy using the metabolomic niPGT-A approach, but further studies are needed to diagnose genomic niPGT-A.

**Keywords:** IVF, embryo culture, non-invasive PGT-A, euploid, aneuploidy.

# 1 GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1 Tez Çalışmasının Hipotezi

Üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) süreçlerinde embriyoların içinde buldukları ortama nükleik asit, amino asit ve pek çok farklı protein molekülleri saldıkları bugüne kadar gerçekleştirilen farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışmalarda ayrıca bu moleküllerin tipleri ve miktarlarının embriyoların canlılığı ve implantasyon potansiyelleri ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın hipotezi, ÜYTE tedavi süreçlerinde üretilen embriyolar tarafından kültür ortamına salgılanan nükleik asitlerin ve ortamda bulunan metabolitlerin kullanılmış kültür sıvıları içerisindeki konsantrasyonlarında meydana gelen değişikliklerin (salınan ve tüketilen ürünler) embriyonun ploidi durumu ile ilişkili olduğu ve bu durumun girişimsel olmayan şekilde öploid ve canlılık oranı yüksek embriyo seçimi amaçlı kullanılabilirdir.

## 1.2 Tez Çalışmasının Amacı

Bu tez çalışmasında 4 ana amacımız vardır;

- i- Embriyonun içinde büyütüldüğü kültür sıvısı içerisine salgıladığı nükleik asit miktarının ölçülmesi ve ölçülen nükleik asitlerden elde edilen öploid sonuçları ile trofektoderm biyopsi yoluyla elde edilen sonuçlar arasındaki uyumunun değerlendirilmesi,
- ii- Embriyonun içinde büyütüldüğü medyumdaki aminoasit konsantrasyonu değişikliklerinin belirlenmesi ve bu değişikliklerin preimplantasyon genetik tanı anöploid (PGT-A) sonuçları ile kıyaslanması.
- iii- Elde edilen nükleik asit ve aminoasit analizi sonuçlarının klinik sonuçlar ile korelasyonlarının araştırılması.
- iv- ÜYTE' de kullanılmak üzere non-invaziv öploid embriyo seçim metodolojisi amaçlı pilot bir çalışma gerçekleştirilmesidir.

### 1.3 Tez Çalışmasının Bilime Katkısı

Anne olma yaşının giderek arttığı günümüzde her geçen gün daha fazla çift bebek sahibi olabilmek amacıyla ÜYTE merkezlerine başvurmaktadır. ÜYTE merkezlerinde sunulan tedaviler sonucunda oluşturulan embriyoların yaklaşık %50'sinin anöploid olduğu, artan anne olma yaşının embriyo anöploidisiyle doğrudan korelasyon gösterdiği de son yıllarda gerçekleştirilen pek çok çalışmada gösterilmiştir. Belirtilen bu sebeplerden dolayı embriyo biyopsisi yöntemi ile gelişmekte olan embriyolardan (gelişime zarar verme riski imkân dahilinde en az düzeyde tutularak) hücre örneklerinin alınması ve alınan hücre örneklerinin Genetik tanı merkezlerinde incelenerek embriyonun kapsamlı kromozom yapısının incelenmesi/analizi şeklinde gerçekleştirilen PGT-A yöntemine ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Bununla birlikte işlem için gerekli olan biyopsi süreci invaziv (girişimsel) ve embriyoya düşük oranda da olsa zararı olabilecek bir yaklaşımdır.

Bu tez çalışması kapsamında, girişimsel olmayan bir yaklaşımla kültür sıvısından alınan örneklerin incelenmesi ile embriyonun ploidi durumunun belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu yaklaşım sayesinde embriyonun kromozomal yapısının tayininin TE biyopsisi tabanlı girişimsel PGT-A yönteminden daha düşük maliyetli olması, ayrıca embriyolarda oluşabilecek zararı en aza indiriyor olması sebebiyle hasta/embriyo dostu bir yöntem olması öngörülmektedir.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Üremeye Yardımcı Tekniklere (ÜYTE) Bakış

1978’de İngiltere’de dünyanın ilk IVF bebeğinin doğumundan sonra yardımcı üreme tedavilerine talep artmıştır. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar batı ülkelerindeki spontan doğum oranlarının önemli ölçüde azalmakta olduğunu, her altı erkekten veya kadından birinin infertilite (kısırlık) sebebiyle yaşamının bir noktasında sıkıntı çekmekte olduğunu göstermektedir. Artan ihtiyaç/talep ve gelişen arz yöntemleri sayesinde 2014 yılı itibariyle dünya çapındaki doğumların 5 milyondan fazlasının üremeye yardımcı tedaviler (ÜYTE) sonucunda meydana geldiği tahmin edilmektedir <sup>1</sup>.

#### 2.1.1 İnfertilite nedenleri ve ÜYTE kullanımı

İnfertilite, 12 ay boyunca korunmasız olarak düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması durumudur. Primer ve sekonder olmak üzere iki çeşit infertilite türü vardır. Primer infertilite, süreçte (gerçekleştirilen tedaviler de dahil) hiç gebelik elde edilememiş olması durumu iken sekonder infertilite çiftin daha önce en az bir gebelik hikayesinin olmasına rağmen çocuk sahibi olmak istenen dönemde gebelik elde edilememesi durumudur. İnfertilite, anatomik, fizyolojik, endokrinolojik, genetik kaynaklı olabileceği gibi çevresel faktörlere ve yaşam tarzı gibi nedenlere de bağlı olabilir <sup>2</sup>.

Kadın üreme sistemindeki problemlere (endometriyozis, sineşi vb.) ek olarak gebe kalma şansını en çok etkileyen faktör yaştır. Kadın yaşı arttıkça yumurtalık rezervi azalır, bunun yanı sıra oosit büyümesi ve olgunlaşması sırasında mayotik başarısızlık olasılığı artmaktadır <sup>3</sup>. Kadınlar, doğurganlığını 20’li yaşlar yerine, gittikçe 30’lu yaşlara ertelemekte ve bu yardımcı üreme tedavilerine başvurunun artmasına neden olmaktadır. Anne yaşının yanı sıra obezite gibi yaşam tarzı faktörleri de hem kadınlar hem erkekler için üremenin azalmasında rol oynamaktadır. Bununla birlikte düşük yağ

oranının ve ağır egzersizlerin üreme üzerindeki olumsuz etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve sigara kullanımının yaygınlığının da kadın üreme potansiyeli üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmiştir <sup>4</sup>. Ayrıca kabakulak gibi virüslerin infertilite riskini arttırdığı bilinmektedir. Miyomlar gibi fizyolojik faktörlerin ve polikistik over sendromunun daha fazla yaygınlaşmasının gebe kalmayı olumsuz etkilediği bildirilmiştir <sup>5</sup>.

Günümüzde aşırı kilo ve obezite dünya çapında üreme çağındaki yetişkin erkekler arasında ciddi bir sorun haline gelmiştir. Ayrıca obezitenin azospermi ve oligozoospermi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir <sup>6</sup>. Sigara içmek gibi yaşam tarzını etkileyen faktörler semen miktarının ve kalitesinin veya boşalma bozukluklarının birincil nedenlerinden olduğu açık olarak bilinmektedir. Erkek üreme organlarındaki fizyolojik bozukluklar, hormonal regülasyon bozuklukları veya semedeki Immüoglobulin A (IgA) ve Immüoglobulin G (IgG) gibi immünolojik faktörler de infertilite sebebi olabilir <sup>5</sup>. Son çalışmalara göre epigenetik faktörlerdeki değişiklikler, histonların dağılımı ve protamin izoformları gibi sperm kromatini ile ilişkili proteinler de infertil hastalarda tespit edilmiştir <sup>7</sup>.

Üreme organlarında oluşan kanserler, metastaz ve tedaviler veya çeşitli kanser türleri de kadın/erkek infertilitesi ile ilişkilidir <sup>8-10</sup>. Ayrıca otoimmün nedenlerin de infertilite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir <sup>11</sup>.

### **2.1.2 ÜYTE yöntemleri**

ÜYTE'de kullanılan en yaygın yöntemler in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)'dur <sup>12</sup>. Tedaviler titizlikle steril bir laboratuvarında gerçekleştirilir. IVF, kadından toplanan oositlerin kümülüs hücrelerinden temizlenmeden erkekten elde edilen spermin ortak kültür kabına konulmasıyla gerçekleştirilir. ICSI, semen örneğindeki spermin sayısı veya motilitesi çok düşük olduğu erkeğe bağlı infertilite tedavisinde uygulanan bir yöntemdir (Şekil

2.1.). Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) <sup>13</sup> göre semen analizi için referans değerler Tablo 2.1.'de aşağıda belirtilen şekilde olmalıdır:



Şekil 2.1. IVF & ICSI.

Tablo 2.1. İnsan spermi referans değerleri

Parametre	Referans Değer
Semen Hacmi (mL)	1.4
Total Sperm Sayısı (10 <sup>6</sup> /mL)	39
Sperm Konsantrasyonu (10 <sup>6</sup> /mL)	16
Total Motilite (% İH + NH)	42
İleri Hareket (%)	30
Canlılık (%)	54
Normal Sperm Morfolojisi (%)	4 (3.0-4.0)
pH	≥ 7.2

Ayrıca IVF ile döllenme gerçekleşmediği durumlarda ICSI yöntemi de kullanılabilir. ICSI tedavisinden önce kadın hormon tedavisi alır ve oositler toplanır. Hareketli ve normal şekilli spermier ICSI uygulamak için semen örneğinden yıkanarak ayrılır. Döllenme bir spermin ince bir cam iğne ile olgun bir oositin içerisine enjekte edilmesiyle gerçekleşir <sup>14</sup>.

Aşılama (IUI), ÜYTE yöntemlerinden biri olarak da sınıflandırılır. Bu prosedürde sperm hücreleri oositi döllenmek için dışı üreme yollarına yerleştirilir. Bu yöntem diğer in vitro fertilizasyon yöntemlerinde olduğu gibi semen örneğinin yıkanmasını gerektirir <sup>15</sup>.

## **2.2 Gamet ve Embriyo Kültürü**

IVF ve ICSI yöntemlerinin her ikisinde de döllenmiş oositler, dışı üreme sistemindeki ortamın taklit edildiği inkübatörlerde saklanarak büyütülür (sıcaklık 37 °C, O<sub>2</sub> %5, CO<sub>2</sub> %5-6). Embriyolar grup olarak ya da tek tek kültür edilir. Kültür sıvı damlacıkları, embriyoyu aşırı oksijen veya diğer bileşiklerin olası zararından koruyan ve buharlaşmayı önleyen (böylece ozmotik ve pH değişikliklerini dengede tutan) mineral yağ ile kaplanır. Oositin döllenmesi ile oluşan embriyoların gelişimi her fazda izlenir ve morfolojilerine göre skora yapılır. Genellikle oositlerin %70'i döllenir ve döllenmiş oositlerin yaklaşık %30-50'si kaliteli embriyolara dönüşür <sup>16</sup>. En iyi embriyolar döllenme işleminden 2-5 gün sonra uterusu yerleştirilmek üzere seçilerek transfer edilir. Taze transferlerin yaklaşık %30-40'ı klinik gebelik oluşturur. Kalan kaliteli embriyolar vitrifikasyon tekniği ile dondurulur ve gelecekte olası dondurulmuş embriyo transferini (FET) beklemek için sıvı azot içerisinde (-196°C) saklanır. Embriyonun plöidi durumunu incelemek için de blastomer (klivaj aşaması) ya da TE (blastokist aşaması) biyopsisi sonrası sonuç gelene kadar da dondurulabilir <sup>17</sup>.

### **2.2.1 Embriyo kültür medyum içeriği**

İlk uygulamalardan günümüze kadar in vitro embriyo gelişimi amaçlı pek çok farklı kültür ortamı geliştirilmiştir ve günümüzde bu ortamların büyük bir kısmı içeriklerinin firmalar tarafından korunduğu kullanıma hazır ticari ürünler olarak pazarlanmaktadır <sup>18,19</sup>. Günümüzde bu ürünler kullanım şekillerine göre “ardışık” veya “tek aşamalı” (single step) kültür ortamları olarak adlandırılabilir. Ardışık kültür sisteminde embriyoların in vitro kültür aşamasının 0-3. gün aralığında birinci aşama, 3-6. gün aralığında da 2. aşama olmak üzere iki farklı içeriğe sahip sistem kullanılıyor

iken tek aşamalı kültür sistemlerinde tüm kültür dönemi içinde aynı içeriğe sahip kültür ortamı kullanılır. Kültür medyumunun amacı, embriyo için en uygun hücre büyüme ve gelişme koşullarını sağlamaktır. Embriyonun büyüdüğü kültür damlacığı kadın üreme sistemini taklit etmektedir. Kültür medyumuna, beslenme için karbonhidratlar, insan serum albümin, amino asitler ve pH değişikliklerinin önüne geçmek için tamponları içermektedir. Medyada ayrıca vitaminler ve antibiyotikler de vardır<sup>20</sup>. İnsan serum albümini, su, iyonlar, yağ asitleri, hormonlar, bilirubin ve ilaçlar için iyi bağlama kapasitesine sahip bir proteindir ve plazma yoluyla hücrelere ana çinko taşıyıcısıdır. Ek olarak, albümin DNA'ya bağlanma yeteneğine sahiptir<sup>21</sup>.

## 2.2.2 Gametogenez

Gerek doğal üreme sürecinde gerekse ÜYTE tedavi süreçlerinde sağlıklı embriyo üretimi, gebelik ve canlı doğum elde edilmesi, çiftlerin gamet üretim potansiyelleri ve üretilen gametlerin sağlıklı bir dölllenme ve embriyo gelişimi sağlayıp sağlayamaması ile doğrudan ilişkilidir. Erkeklerde üreme hücresi üretimi spermatogenez, kadınlarda ise oogenez olarak adlandırılır. Yeni üreme hücreleri oluşurken spermatogenez ve oogenez birbirinden ayrılır. Erkeklerde sperm üretimi yaşamları boyunca sürerken, kadınlarda üreme hücre sayısı doğuştan bellidir. Kadınlarda ortalama 40-45 yaşlarında oosit üretimi durmaktadır. Erkeklerde ortalama günlük sperm üretimi 300 milyon civarındadır. Kadınlarda yaşamları boyunca yaklaşık 500 oosit ovüle olur<sup>22</sup>.

Erkek ve kadınlar da üreme hücresi oluşumu sırasında mayoz bölünme görülür ve gamet üretimi somatik hücre bölünmesine kıyasla farklılık gösterir. Kromozom sayısı diploid (46)'den haploid (23)'e düşer. Mayoz da iki hücre bölünmesi görülür. Erkeklerde mayoz bölünme esnasında 4 adet haploid sperm hücresi üretilirken kadınlarda sadece 1 tane haploid oosit üretimi gerçekleşir. Kalan genetik materyal, birinci (diploid) ve ikinci (haploid) polar cisimcikten çıkarılır. Mayoz I'de, DNA bir çift kromozomal materyal seti üretmek üzere çoğaltılır ve daha sonra her biri 46 kromozom içeren 2 adet hücreyi oluşturacak şekilde bölünür. Bu aşamada, genetik

değişkenlik rekombinasyon (krosing over) ve rastgele dağılımlar yoluyla artırılır. Çoğaltılmış maternal ve paternal kromozomlar, homolog kromozomlarla eşleştiğinde ve kromozomların bir kısmı yer değiştirdiğinde, krosing over meydana gelir.

### 2.2.2.1 Spermatogenez

Erkek bireylerin testislerindeki seminifer tübüllerinde erkek üreme hücresi olan spermin oluşumuna “spermatogenez” denir. Spermatogenez, ergenlikle beraber testiste seminifer tübüllerde başlar. Seminifer tübüller, primer germ hücreleri ve büyük sertoli hücrelerinden oluşan germinal epitel ile kaplanır. Seminifer tübüllerde bulunan  $2n$  kromozumlu sperm ana hücrelerine “*spermatogonyum*” denir. Spermatogonium, mitoz bölünme geçirerek bir kısmı spermatogonyum A’yı oluştururken bir kısmı spermatogonium B’yi oluşturur. Spermatogonium A mevcut spermatogonyum havuzundaki hücre miktarının sabit kalmasını sağlarken spermatogonium B hücreleri gelişimlerine ve farklılaşmalarına devam ederek primer spermatositler oluşturur. Primer spermatositler mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatositleri, sekonder spermatositler ise spermatidleri oluştururlar (Şekil 2.2). Bu aşamada oluşan spermatidlerin dölleyebilme kapasiteleri mevcut değildir ve olgun sperm hücreleri (spermatozoa) spermatidlerin daha ileri derecelerde farklılaşmasıyla oluşur. Farklılaşma sırasında çekirdeğin yoğunluğu artar ve hacmi küçülür. Bu esnada sitoplazmanın büyük bir kısmı atılır.



Şekil 2.2. Spermatogenez

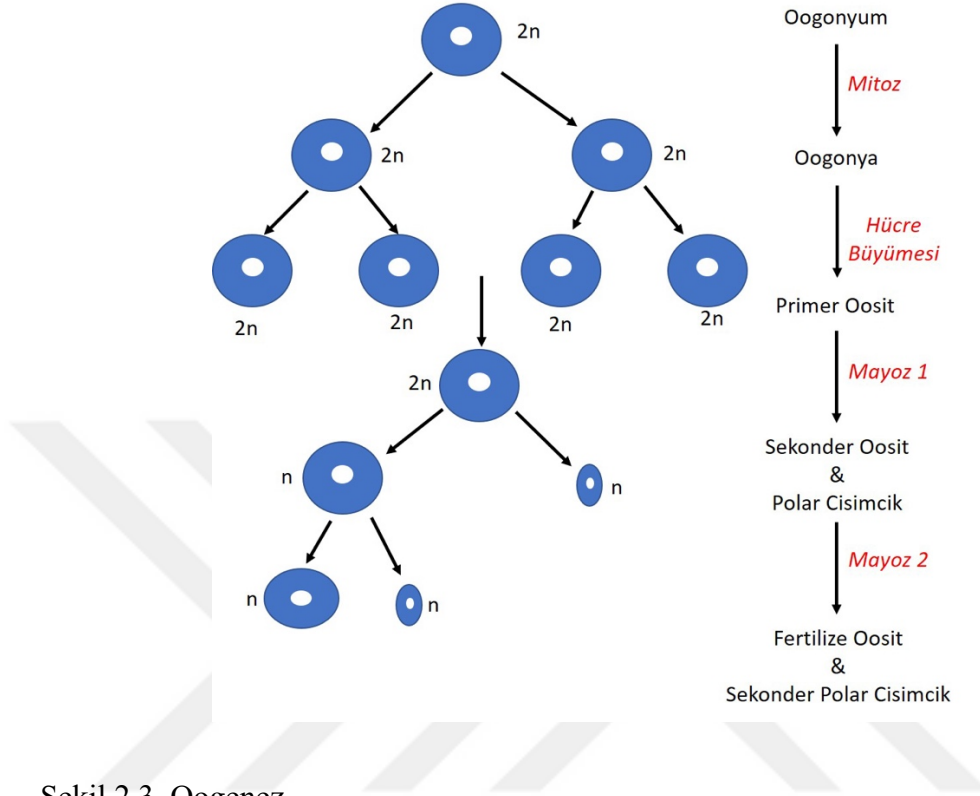
Spermatogenez, yaklaşık 74 gün sürer. Semen, seminal vezikül, prostat, sperm hücreleri ve bulbo-urethral bez tarafından üretilen plazmadan oluşur. Plazma, canlılık için gerekli amino asitleri, karbohidratları ve enzimleri barındırır. Bunların yanı sıra çinko iyonları, sitrik asit ve C-vitaminini de bulunmaktadır<sup>22</sup>.

#### 2.2.2.2 Oogenez

Kadın öncül üreme hücreleri (primordiyal germ hücreleri) maksimum sayısına fetal gelişimin 5. ayında ulaşır. Bu hücreler yumurtalıklarda lokalizedir ve gelişim sürecinde ardışık mitotik bölünmelerden sonra “oogonyum” a dönüşürler. Doğumda tahmini 600.000 ile 800.000 arasında primer oosit bulunsa da miktarlarının yaklaşık 7 milyon olduğu ön görülmektedir<sup>22,23</sup>.

Oogenez sırasında, oogonia, kromozomları kopyalamak ve mayoz I başlatmak için DNA replikasyonuna uğrayan olgun oositlere dönüşür. Ergenlikte, primer oositler mayoz I'i tamamlar. Ovulasyondan yaklaşık 3 saat önce metafaz evresindeyken mayoz

II'yi başlatır ve birinci polar cisimcik atılarak ilk mayotik bölünme tamamlanır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Oogenez.

Oogenez, kadınlarda her iki yumurtalıkta da gerçekleşir. Primer oositler, primordiyal bir folikülden oogenezle eş zamanlı olarak olgunlaşan foliküllerin içinde gelişirler. Primer oosit, çevresindeki zona pellucida ve kümülüs hücrelerinin iç tabakası olan korona radiatadan oluşmaktadır. Zona pellucida ve kümülüs hücreleri oositi destekleyerek oosit için gerekli proteinleri sağlarlar. Bir oositin çapı yaklaşık 100  $\mu$ m'dir ancak boyutları büyük ölçüde değişir<sup>23</sup>.

### 2.2.3 Gamet etkileşimi

Döllenme, ancak sperm ve oositler sitoplazmik olgunlaşmasını tamamladığı takdirde gerçekleşir. Sperm ve oosit etkileşimi hücre-hücre etkileşimidir ve türe özgüdür. Erkek gamet hücresi döllenme anından önce mayozu tamamlamıştır. Dişi gamet hücresi döllenme gerçekleştikten sonra ikinci mayotik bölünme ile son nükleer

olgunlaşmayı tamamlar. Kontrollü senkronize gamet aktivasyonu, embriyonik gelişim için gereklidir. Üremeye yardımcı tedavilerde (ÜYTE) kullanılan ICSI tekniği, döllemenin ilk aşamalarını atlar, ancak başarılı dölleme, oosit ve sperm doğru şekilde aktivasyonu ile sağlanmaktadır<sup>24</sup>.

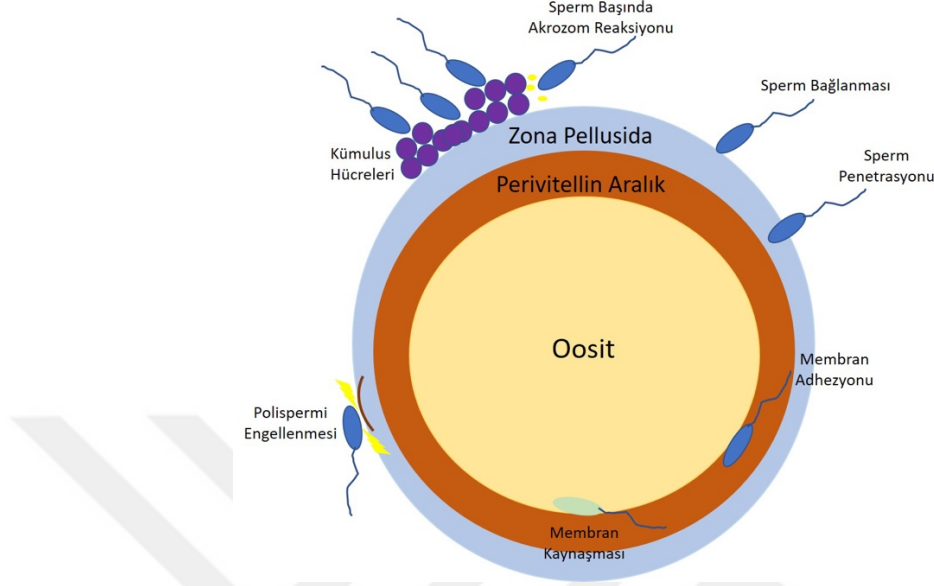
Döllemenin ilk aşamaları iki farklı yapıya bağlıdır. Birincisi spermatozoonun akrozomu, ikincisi oositin zona pellusida (ZP)'sıdır. Sperm-oosit etkileşiminde üç ana olay meydana gelmektedir. Her şeyden önce, spermatozoon ZP'ye yapışır. Bundan sonra spermatozoon, akrozom reaksiyonunu başlatır ve iç akrozomal zarını açığa çıkarır. Akrozom reaksiyonu sırasında sindirim enzimleri salınır. Son olarak, sperm zarı, oosit plazma zarı ile temas eder ve bu iki zar birbirine kaynaşır (Şekil 2.3)<sup>22</sup>.

#### **2.2.4 Oosit ve sperm füzyonu**

Gametler arasında membran füzyon işlemi pH, sıcaklık ve kalsiyum iyonuna ( $Ca^{+2}$ ) bağlıdır ve iki membranın yakın temasta olması gerekir. Bununla birlikte, füzyon membranla ilişkili proteinler tarafından kolaylaştırılmış görünmekle birlikte ZP'ye ait glikoproteinler sürece doğrudan dahil değildir. Zona penetrasyonu boyunca spermatozoon, akrozomal içeriğini kaybeder. Buna ek olarak, iç akrozomal membran zona ile doğrudan temas halindedir. Sperm başının post-akrozomal bölgesi görünüşte oosit plazma zarı ile birleşir ve iki zar kalıcı hale gelir. Plasental memelilerde bu alan sadece akrozom reaksiyonundan sonra eriyebilir.

Oosite nüfuz için sperm hareketli olması gerekir, ancak gamet füzyonu için hareket gerekli değildir. Sperm, oosit yüzeyine tutunmasından itibaren yaklaşık 20 saniye boyunca flagellar hareketine devam eder. Küçük memelilerde sperm-oosit füzyonu 15 dakika sürer ve pronükleus oluşumu yaklaşık 60 dakikada görülür. İnsan gametlerinin füzyonundan sonra, kuyruğun aksenal filamentleri ve ortadaki mitokondrinin dağıldığı görülmektedir. Dölleme anında sperm plazma membranı

giriş noktasına kadar tıkalı kalır. Bundan sonra, pronükleus oluşmuş ve sperm yüzey antijeni zigotun tüm yüzeyine yayılmıştır (Şekil 2.4.)<sup>22</sup>.



Şekil 2.4. Sperm – oosit kaynaşması aşamaları.

### 2.2.5 Döllenme evresi

Ovülasyon sırasında, ZP ve korona radyata (kümülüs hücreleri ve hücre dışı matriks) ile çevrili sekonder oosit, yumurtalıktaki bir folikülden fallop tüpünün fimbrialarına salınır. Oosit, fallop tüpünün ampulla bölgesinde döllenir. Döllenme, dişi üreme kanalında kapasitasyona uğramış sperm hücresi tarafından gerçekleştirilir. Kapasitasyon, hyaluronidaz ile korona radyata hücre katmanından geçen oosit içine spermün nüfuz etmesini sağlar ve reseptörlere bağladıktan sonra ZP'ye nüfuz eder. Spermün oosit membranı ile kaynaşması için akrozom reaksiyonu gerekmektedir. Sperm, ZP'ye bağlandığında, oositin birden fazla sperm ile döllenmesini önleyen ZP proteinlerinin sertleşmesini sağlar (zona reaksiyonu) ve hücre içi kalsiyum salınımını başlatır. Sperm akrozomu ve oosit hücre zarı füzyonu, sperm çekirdeğinin oositin sitoplazmasına geçişini sağlar ve böylece sekonder oositte mayozu tamamlar. Böylece döllenme gerçekleşmiş olur. Bu esnada oositte 2 adet pronükleus belirir ve ikinci polar cisimcik atılır (Şekil 2.3)<sup>25</sup>.

### 2.2.6 Embriyo implantasyon aşamaları

Kromozomal eşleşme, DNA replikasyonu ve ilk mitoz meydana geldikten sonra embriyo bölünmeye başlar ve yaklaşık 12 saat sonra pronükleuslar kaybolur. Bu da yaklaşık olarak inseminasyondan sonraki 23-24'üncü saatlere tekabül etmektedir. Bu evre “erken bölünme” evresi olarak adlandırılır. Erken bölünme evresi, embriyonun sonraki günlerdeki gelişimine de ışık tutmaktadır. Pronükleusları geç silinen ve tekil bölünen embriyoların sonraki günlerdeki gelişimlerinin de yavaş olduğu gözlenmiştir. Zigot içerisindeki bölünen hücrelere “blastomer” denir. Embriyo gelişimi sırasında, blastomer klivajı, yaklaşık 3-4 gün sürmektedir. Bölünmenin sırasıyla 2, 4, 8 ve 16 hücre olarak devam etmesi embriyonun morfolojik açıdan doğru geliştiğinin göstergesidir. Embriyo morula olarak adlandırıldığında yaklaşık 16 hücreye ulaşmış ve hücreler birbirleriyle kaynaşmaya başlamıştır (Resim 2.1).

Morula safhasında, blastomerler çevresel faktörlere karşı çok hassastırlar. İnseminasyonun ardından geçen takriben 4. günün sonunda veya 5. günün erken saatlerinde blastomerler polarize olur ve “blastokist” denilen bir yapıda iki ayrı hücre grubu oluşturacak şekilde genişlerler<sup>26</sup>. Dış koşullara duyarlılık devam eder fakat hücre aşamasına göre daha kuvvetlidir. Polarizasyon ve farklılaşma sonrasında blastokistte belirgin olarak iki farklı hücre tipi oluşumu gözlenir: İç hücre kütleli (ICM) ve trofektoderm (TE) hücreleri. Blastosel sıvısı, blastokistin iç boşluğunu doldurur. ICM daha sonra fetusu oluşturur, dışta bulunan TE hücreleri ise plasentayı meydana getirir<sup>26,27</sup>. Blastokist 5. günde rahim içine taşınır (Resim 2.1). Embriyonun 5. ve 6. günlerinde blastosel sıvısının miktarı artar, farklılaşmış hücre tipleri bölünmeye ve embriyo genişlemeye devam eder. Bu esnada ZP gittikçe incelik. Genişleyen embriyo ZP'yi yırtar ve dışarı çıkmaya başlar. Bu aşama “hatching” (yumurtadan çıkma) olarak adlandırılır. Blastokist, ZP'den çıktıktan sonra rahime TE hücreleri ile implante olur. İmplantasyon genellikle 8. günde gerçekleşir<sup>26</sup>.

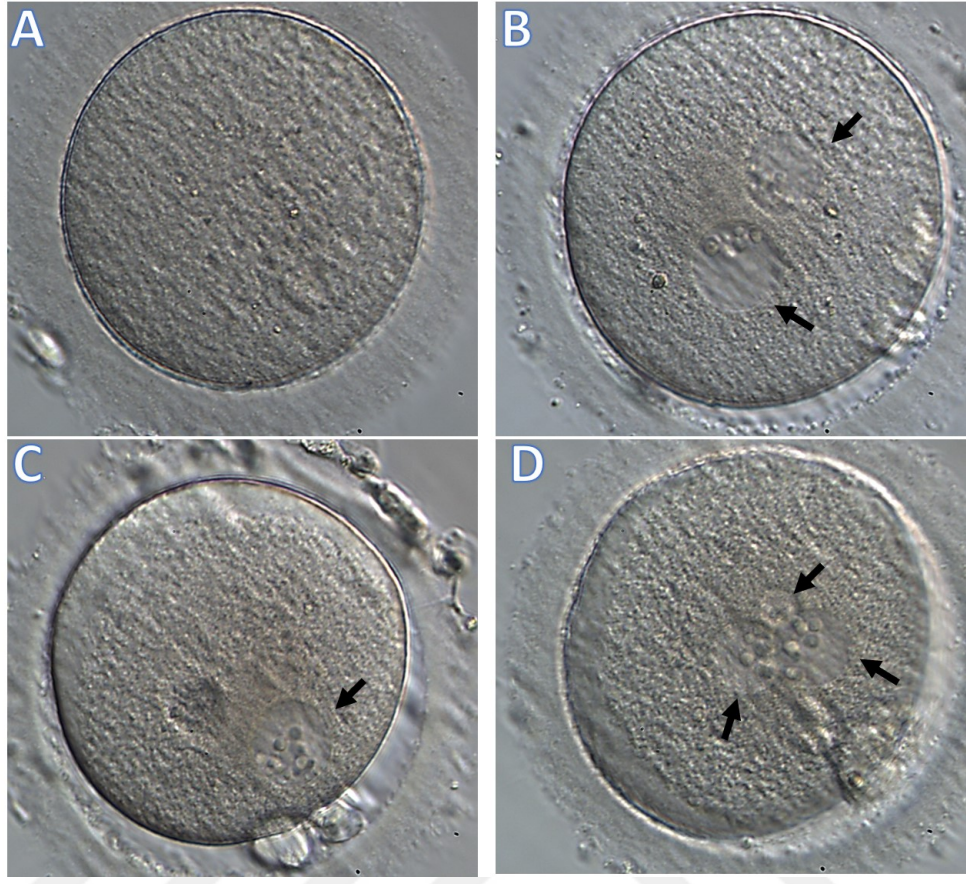


Resim 2.1. Günlere göre embriyo gelişim evreleri.

## 2.3 Konvansiyonel Embriyo Değerlendirme Yaklaşımları

### 2.3.1 Fertilizasyon ve erken klivaj aşaması embriyo değerlendirilmesi

Embriyolar in vitro olarak büyütüldüklerinde gelişimsel potansiyelleri mikroskop altında düzenli olarak değerlendirilir. Döllenme aşamasından sonra erkek ve dişi haploid pronükleuslar birbirine yaklaşır ve nüklear membranlar parçalanır. Pronükleuslar, mikroskopla açıkça görülebilir ve bu sayede döllenmiş, döllenmemiş ve anormal döllenmiş yumurtalar birbirinden ayrılır (Resim 2.2). Döllenme sonrası oluşan embriyoların gelişim ve implantasyon potansiyellerini değerlendirebilmek için günümüze kadar farklı skorlama sistemleri geliştirilmiştir <sup>28-31</sup>.

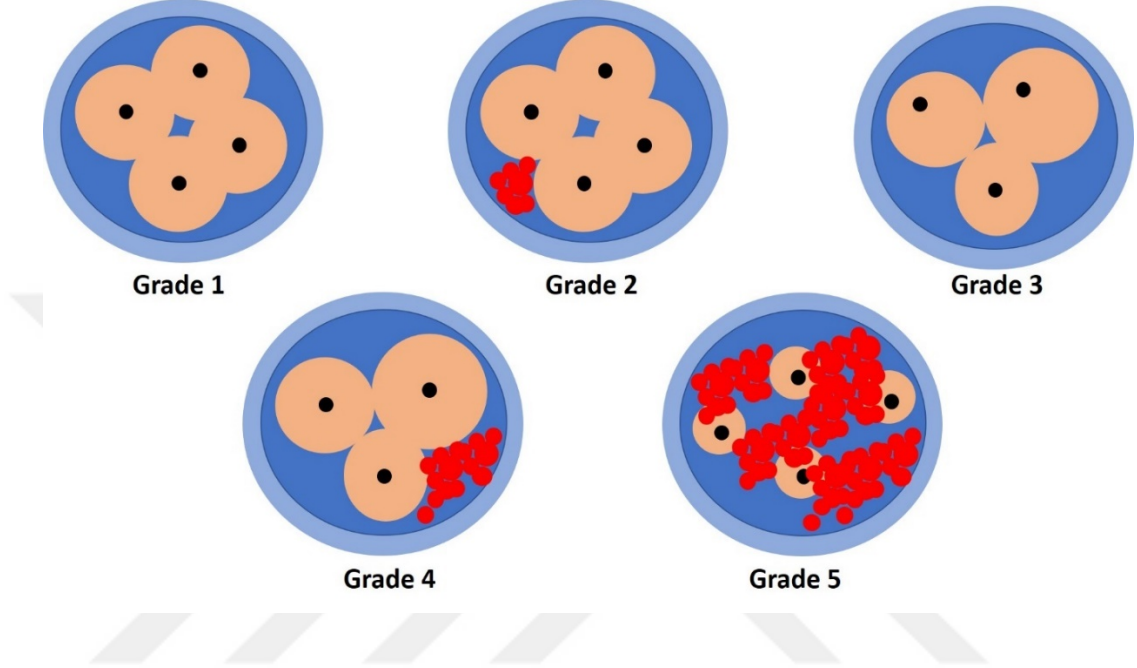


Resim 2.2. ICSI işlemi sonrası pronükleus oluşumu.

1a. döllenmemiş oosit (PN yok), 1b. normal döllenmiş oosit (2PN), 1c. anormal döllenmiş oosit (1 PN) ve 1d. anormal döllenmiş oosit (3PN). Ok işaretleri pronükleusları (PN) göstermektedir.

Son yıllarda içerik olarak zenginleştirilmiş ve gelişmiş kültür ortamlarının kullanılmasıyla birlikte insan embriyoları laboratuvar ortamında blastokist aşamasına kadar standart olarak büyütülebilmektedir. Ardışık kültür ortamlarının kullanıldığı kliniklerde besin gereksinimindeki farklılıklar nedeniyle embriyoların 3. günde birinci aşamadan ikinci aşama besi ortamına aktarılmaları gerçekleştiriliyor iken tek aşamalı kültür ortamı kullanılan kliniklerde embriyoların besi ortamını değiştirmeden de gelişimleri sağlanabilmektedir. Klivaj embriyolarını sınıflandırmak için embriyonun

kaç hücreye bölüdüğü, bölünen hücrelerin birbirleri ile olan boyut farkı, herhangi bir fragmentasyon gözlenip gözlenmediği, çekirdek görünürlüğü ve sitoplazma yapısı her embriyo için ayrı ayrı gözlemlenir (Şekil 2.5.)<sup>29,31</sup>.



Şekil 2.5. Klivaj embriyosunun morfolojik değerlendirme kriterleri.

Grade 1; eşit büyüklükte blastomer yapısı, fragmentasyon yok. Grade 2; eşit büyüklükte blastomer yapısı,  $<5\%$  fragmentasyon. Grade 3; eşit olmayan büyüklükte blastomer yapısı, fragmentasyon yok. Grade 4; eşit olmayan büyüklükte blastomer yapısı,  $>5\%$  fragmentasyon. Grade 5; belli olmayan blastomer yapısı,  $>20\%$  fragmentasyon<sup>28,30</sup>.

Günümüzde kullanılan farklı embriyo seçim sistemleri her ne kadar gelişim potansiyeli yüksek embriyoların seçiminde belirli bir oranda katkı sağlıyor görünse de klivaj süreçlerindeki farklılıklar nedeniyle bu kriterlerin embriyo implantasyonuna etkisi öngörülebilir değildir<sup>32-34</sup>. Sebebi muhtemelen embriyonik genom aktivasyonunun 2. gün den sonra başlaması ve 3. günde de devam etmesi olabilir.

Embriyonun iyi bir şekilde büyüebilmesi oositin mRNA transkripsiyonuna ve protein rezervine bağlıdır <sup>35</sup>.

### 2.3.2 Blastokist aşaması embriyo değerlendirme

Gardner ve Schoolcraft tarafından geliştirilen blastokist derecelendirme sistemi birçok IVF laboratuvarı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır <sup>36</sup>. Her blastokist, 1 ila 6 arasında değişen bir sayısal değer atanarak genişleme derecesine göre değerlendirilir. Bir blastokist sınıf 3 veya üstüne genişledikçe, blastosel boşluk tam olarak oluşur. Bu aşamada ve sonrasında ICM ve TE, değerlendirme için açıkça ayırt edilebilir ve her birine, hücre sayısına ve yoğunluk durumuna bağlı olarak bir A, B veya C harf notu verilir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Blastokist değerlendirme

Blastokist Genişlemesi	Tanımlama
1	Embriyo hacminin yarısından daha az bir blastosel sahip erken bir blastokist
2	Embriyo hacminin en az yarısı olan blastosel sahip bir blastokist
3	Embriyoyu tamamen dolduran bir blastosel sahip bir blastokist
4	İncelmiş ZP ile erken embriyodan daha büyük bir blastosel hacmi olan genişletilmiş bir blastokist
5	ZP 'nin yırtılmaya başlamasıyla trofektodermi ZP den dışarı çıkmaya başlayan bir blastokist
6	Blastokistin ZP'den tamamen çıktığı bir blastokist
<b>İç Hücre Kitlesi (ICM)</b>	
A	Çok sayıda ve sıkıca paketlenmiş hücreler

B	Birkaç ve gevşek paketlenmiş hücreler
C	Birkaç düzensiz hücre
Trofektoderm(TE)	
A	Sıkıca paketlenmiş birçok hücre, uyumlu bir epitelyum halinde düzenlenmiştir
B	Gevşek bir epitelyum halinde organize edilmiş birkaç hücre
C	Birkaç hücre

Klivaj embriyo skorlamasındaki sınırlamalardan dolayı, embriyo morfolojisinin implantasyon potansiyeli ile daha iyi bir korelasyona sahip olduğu aşama blastokist aşamasıdır <sup>37-39</sup>. Prognozu iyi olan hastalarda tek bir blastokistin intrauterin transferi %45 canlı doğum oranına ulaşabilmektedir <sup>40-42</sup>.

## 2.4 Girişimsel (İnvaziv) Embriyo Değerlendirme Yaklaşımları

### 2.4.1 Embriyonik anöploidi

Anöploidi, mayoz ve/veya mitoz bölünme sırasında ortaya çıkabilmektedir. Gametogenez sırasında kromozomlar mayoz bölünmede doğru şekilde ayrılmadığı takdirde oluşan oosit ve sperm hücreleri oluşan hatayı taşıyacak ve hatanın yaşam ile bağdaşır bağdaşmamasına göre embriyonik gelişim sürecinde çoğaltacak ve oluşan yeni hücreler de bu hatayı taşıyacaklardır <sup>43</sup>. Benzer şekilde, homolog kromozomlar mitozun anafazı sırasında düzgün şekilde ayrılmazlarsa, bir yavru hücre etkilenen kromozomun fazladan bir kopyasını alırken, diğer yavru hücre hiçbirine sahip olmayacak ve sonuçta iki anöploid hücre ortaya çıkmaktadır <sup>44</sup>.

Oosit kaynaklı anöploidi genellikle embriyo anöploidisinin en sık nedenidir <sup>45</sup>. Anne yaşı arttıkça hücre bölünmesi esnasında meydana gelen eş kromozomların bölünmemesi de artmaktadır bu da dolaylı olarak mayozdaki hataları doğurmaktadır

<sup>46</sup>. Anöploidilerin çoğunluğu, primer oositte mayoz I'deki eş kromozomların bölünmemesi durumundan kaynaklanmaktadır. Bunların dışında 18 trizomisi, mayoz II de meydana gelen hatalar yüzünden açığa çıkar <sup>47-52</sup>. 47, XXY ve 47, XYY, sırasıyla %50 ve %100 olarak babadan gelen genlerle açığa çıkar. 8, 9, 13, 18, 21 trizomileri, X monozomisi (Turner sendromu) veya XXY trizomisi (Klinefelter sendromu) canlı doğumla sonuçlanabilir ancak diğer kromozomlardaki anöploidiler hamilelik sırasında düşüklere neden olabilir <sup>53</sup>.

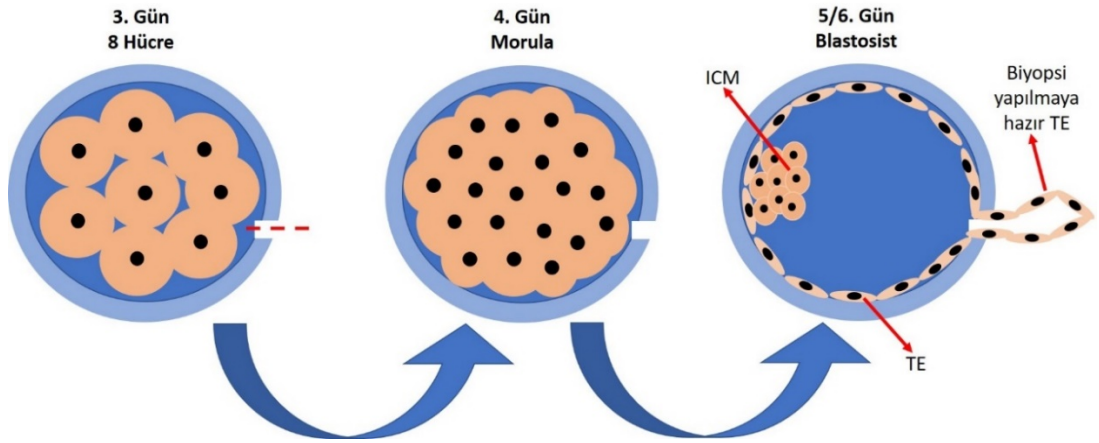
Bir embriyoda mitotik hatalar meydana geldiğinde, karyotipik olarak farklı en az iki hücre soyu meydana gelecek ve bu da mozaisizm denen olguya neden olacaktır. Mozaisizm, erken insan embriyosunun erken gelişim dönemlerinde yaygındır. IVF embriyolarından elde edilen veriler, mitotik hataların sıklıkla bölünme aşamasında meydana geldiğini göstermektedir <sup>54-56</sup>. Erken bölünme sırasındaki hücre döngüsü kontrolü nedeniyle, çoğu anöploid embriyo gelişim sırasında durur <sup>57,58</sup>. PGT-A, TE biyopsisi sonucu elde edilen hücrelerin tüm blastokistin temsilcisi olduğunu varsayarlar. Bazı çalışmalar TE ve ICM arasında yüksek uyum olduğunu gösterirken <sup>59,60</sup>, diğer çalışmalar TE'in genetik yapısının ICM'inkini temsil etmeyebileceğini göstermektedir <sup>61,62</sup>. NGS'nin uygulamalarının yaygınlaşması bol miktarda TE örneğinin mozaik olduğunu ortaya çıkarmıştır. PGT-A'dan sonra mozaik embriyoların transferi üzerine yapılan son çalışmalar bu embriyoların da sağlıklı, canlı doğumlarla sonuçlanabileceğini göstermiştir <sup>63-65</sup>.

#### **2.4.2 Embriyo biyopsisi**

Embriyo biyopsisi, gelişimin farklı aşamalarında uygulanabilen bir yöntemdir. Bazı ülkelerde, dini veya yasal düzenlemelerden embriyoya uygulanmasa da oositin ve/veya bir zigottan yalnızca birinci ve/veya ikinci kutup cisimleri alınmak suretiyle uygulanabilir. Embriyo gelişiminin 3. gününde klivaj aşaması biyopsisi taze transfer için yeterli test süresine izin verdiği için bir zamanlar “normal” kabul edilmekteydi. Bununla birlikte, klivaj aşamasındaki embriyoların mozaik olma ihtimalinin yaklaşık

%70 olduğu bilinmektedir. Bunlara ek olarak bir mozaik embriyodan tek bir blastomeri analiz etmek yanlış bir negatif/pozitif sonuca yol açabilir <sup>66-69</sup>.

Embriyo kültür ortamındaki iyileşme ve kriyoprezervasyondaki başarı, in vitro blastokist kültürünün IVF laboratuvarlarında rutin olarak uygulanmasına olanak vermiştir. PGT-A için TE'den 5 ila 10 hücrenin çıkarılabildiği blastokistlere biyopsi yapmak, DNA amplifikasyon hatasını azaltır ve ICM'ye olası hasarı en aza indirmektedir [26]. Ayrıca, yapılan randomize kontrollü bir çalışmaya göre klivaj embriyosuna uygulanan biyopsi embriyoların implantasyon potansiyelinin bozulmasına neden olurken TE biyopsisinin blastokistlerin implantasyon potansiyelini etkilenmediğini göstermiştir <sup>70</sup>.



Şekil 2.6. TE biyopsisi için embriyo hazırlığı.

Embriyonik gelişimin 3. günü incelenerek lazer ile ZP'si açılan (kırmızı kesik çizgi) embriyo 5./6. ya da nadir olarak 7. güne kadar büyütülür. ZP açıklığından tomurcuklanan TE hücre grubuna biyopsi işlemi uygulanır.

Birçok embriyo, gelişimin 5. gününde blastokist oluştururken bazıları yalnızca 6. günde blastokistlere dönüşebilmektedir. Yapılan çalışmalar bu farkın 5. günden itibaren blastokistlerde daha yüksek anöploidi oranıyla doğrudan ilişkili olabileceğini

göstermektedir <sup>71,72</sup>. Bu nedenle, her PGT-A siklusunda öploid embriyo bulma şansını en üst düzeye çıkarmak için 5. ve 6. günlerde blastokist aşamasına ulaşan embriyolara biyopsi uygulamak gerekmektedir. İlginç bir şekilde son dönemde yapılan çalışmalar 7. günde blastokist aşamasına ulaşan yavaş büyüyen embriyoların da yaşayabilir olduğunu göstermiştir (Şekil 2.5). Bu embriyolarda anöploidi oranlarının daha yüksek olduğu fakat 7. gün öploid blastokistlerin küçük bir kısmının sağlıklı canlı doğumlara neden olabileceğini göstermiştir <sup>73,74</sup>. Bu çalışma, kötü prognozlu bazı PGT vakalarını 7. güne kadar büyütme veya 6. günde morula aşamasında biyopsi yapma olanağı tanımlamıştır <sup>75</sup>.

### **2.4.3 Preimplantasyon genetik tanı (PGT-A) sonrası embriyo seçimi**

Son yıllarda büyük bir hızla gelişen modern moleküler tanı yöntemleri sayesinde tüp bebek tedavileri sırasında elde edilen embriyoların genetik profilinin araştırılması kabul edilebilir bir maliyet ile mümkün hale gelmiştir. Böylece risk grubuna giren hastalarda bu yöntemler uygulanarak doğum sonrası konjenital patolojilere neden olabilecek kromozomal hataların önüne geçilebilmektedir <sup>76,77</sup>.

Tüp bebek tedavisi görecekte olan çiftlerde kromozomal hataya rastlanma sıklığının genel popülasyondan daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir <sup>78</sup>. Anöploidi için pre-implantasyon genetik test (PGT-A) tüp bebek yöntemleri ile üretilen embriyoların taranarak öploid olanlarının transfer edilmesine olanak sağlayan bir yöntem olarak dünya genelinde her geçen gün daha fazla çiftin tedavisinde uygulanmaktadır. PGT-A kapsamında tüm kromozomlar taranarak implantasyon başarısızlıkları, tekrarlayan düşükler ve genetik anomalilerin azaltıldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir <sup>79-81</sup>.

PGT-A'nın ileri anne yaşı (İAY), tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB), tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) veya daha önce anormal gebelik (PAP) yaşayan kadınlara önerilebileceği ve bu hastaların PGT-A uygulamasından fayda

sağlayacakları kabul edilmektedir. PGT-A'nın ciddi erkek faktörüne bağlı infertilitede ve düşük yumurtalık rezervinden dolayı oosit ihtiyacı duyan kadınlara faydalı olup olmadığı halen tartışılmaktadır<sup>82</sup>. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PGT-A'nın 35 yaş ve üstü hastalarda daha yararlı olduğu bulunmuştur. 25-34 yaş PGT-A yapılan veya yapılmayan hastalarda devam eden gebelik oranlarında istatistiksel bir fark bulunamamıştır<sup>83</sup>.

PGT-A'nın ilk uygulandığı 90'lı yıllardan 2000'li yılların ortalarına kadar tanı amaçlı en yaygın kullanılan teknik Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği iken 2000'li yılların sonundan günümüze kadar olan süreçte bu tekniğin yerini sırasıyla Real-time PCR (RT-PCR), karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon (CGH), array CGH (aCGH), SNP (tek nükleotid polimorfizmi) mikrodizi ve NGS (next generation sequencing)<sup>29</sup> gibi moleküler genetik tabanlı teknolojiler almıştır<sup>84-87</sup>.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada preimplantasyon embriyodaki 24 kromozomdan herhangi birinde anöploidilerin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir ve bu nedenle PGT-A uygulanan vakaların çoğunda aCGH'nin kullanıldığı bildirilmiştir<sup>88,89</sup>. Mikrodizi-tabanlı CGH uygulamasında, iki farklı floresans etiketli genom aracılığı ile amplifiye olmuş DNA içeriğini karşılaştırır. İki genom, bir test numunesi ve referans DNA parçalarının lam üzerinde sabitlenmesiyle hibridize edilir. Hibridizasyon sonrası floresan ışımaya yoğunluğu ölçülerek kromozomal anomalilerle ilişkili DNA kopya sayısı değişikliklerinin yüksek çözünürlüklü değerlendirilmesi sağlanır<sup>90</sup>. SNP dizisi, aynı zamanda sabitlenmiş allele özgü oligonükleotid problemlerinin spesifik polimorfizmi belirlemek için seçildiği ve her iki alleli saptamak için kullanıldığı dizi tekniğine de dayanmaktadır. Bu yöntemde yüz binlerce SNP aynı anda genotiplendirilebilir<sup>84</sup>.

PCR analizi, genellikle embriyolarda PGT-A uygulamasının yasal düzenlemelerle sınırlandırıldığı Almanya gibi ülkelerde kullanılmaktadır<sup>91</sup>. Bu yöntemde genellikle polar cisimler kullanılır. Polar cisimler yapı taşlarına ayrıldıktan sonra oluşan lizat aynı

oyuklara pipetlenerek kromozom başına birkaç çoklu kopya spesifik hedef ile PCR yöntemi uygulanır. RT-PCR da ise her kromozomun her bir kolunun en az iki dizisi amplifiye edilir <sup>84</sup>.

PGT-A için son yıllarda özellikle yüksek verimli sekanslama olarak da bilinen NGS yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. NGS yöntemi paralel olarak yürütülen, yüksek sayıda sekanslama reaksiyonu temeline dayanmaktadır ve diğer yöntemlere göre çok daha hassastır. Günümüzde çeşitli NGS teknikleri mevcut olup test kapsamını özelleştirme imkânı, numune başına gerekli okuma sayısını değiştirme, onlarca örneği aynı anda inceleme ve test maliyetini azaltma, NGS yönteminin başlıca avantajlarıdır <sup>92</sup>.

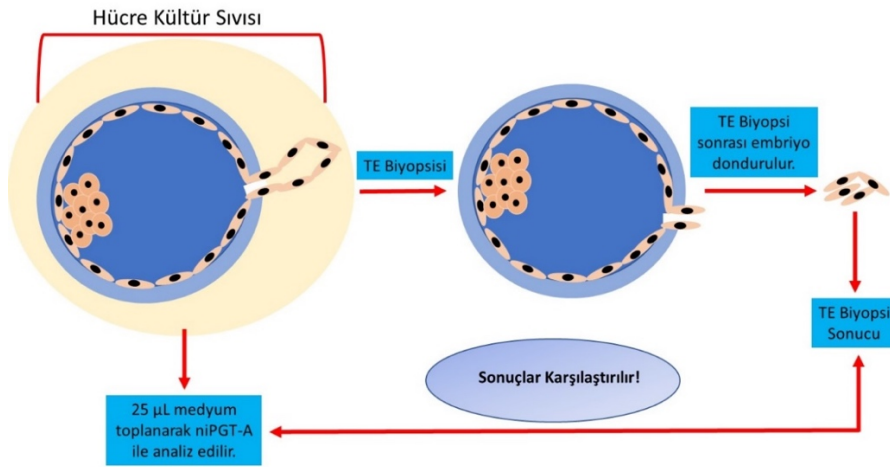
## **2.5 Girişimsel Olmayan (Non-invaziv) Embriyo Değerlendirme Yaklaşımları**

1978 yılındaki ilk tüp bebek uygulamasından bu yana bu yöntemle doğan bebek sayısı 8 milyonu aşmış olup yıldan yıla da artmaya devam etmektedir. Bu alanda 40 yılı aşkın bir süredir yapılan araştırmalar sonucunda önemli gelişmeler sağlanmakla birlikte, embriyonun rahme nakli sonrası tutunma (implantasyon) oranları %4 ila %40 arasında değişen düşük bir değerde kalmaktadır <sup>93</sup>. Bu oranların artırılması üreme biyolojisi ve üreme tıbbı alanındaki araştırmacıların güncel odak noktası haline gelmiştir.

Canlı doğum şansını artırmak ve gebelik elde etme süresini kısaltmanın bir yolu, transfer öncesi embriyoların gelişimlerine zarar vermeyecek şekilde teknolojik yöntemlerle incelenmesi ve implantasyon kapasitesi yönünden değerlendirilip seçilmesidir. Günümüzde çağdaş tüp bebek tedavi süreçlerinde embriyo seçimi büyük oranda yüksek eğitilmiş embriyologlar tarafından embriyo gelişim süreçlerinin ve morfolojilerinin belirli zamansal noktalarında mikroskop altında gerçekleştirilen “statik görüntüleme” şeklinde gerçekleştirilmektedir <sup>94</sup>. Tüp bebek tedavi süreçlerinin aileler için fiziksel ve psikolojik olarak yarattığı baskının finansal açıdan da maliyetli

ve stresli bir süreç olduğu aşikardır. Dolayısı ile rahme nakil öncesinde embriyoların implantasyon potansiyelleri bakımından en yetkin şekilde taranması ve değerlendirilebilmesi, canlı doğum başarısı yanında çoklu tedavi ihtiyacını azaltarak tedavinin çift üzerindeki maddi yükünü azaltmayı ve özellikle başarısız tüp bebek tedavilerine bağlı kaygı, depresyon ve stresi azaltmayı amaçlamaktadır. Bu alanda geliştirilecek yeni, başarılı, kolay kullanımlı ve düşük maliyetli yeni yöntemler ile adı geçen bu sorunların mümkün olan en düşük seviyeye indirilmesi hedeflenmektedir.

PGT-A uygulaması ile anöloid embriyoların ayrımı ve öploid embriyoların seçimi ile belirli hasta gruplarında faydalı sonuçlar alınıyor olsa da bu yaklaşımın tüm IVF hastaları için evrensel bir tarama testi olarak uygulanmasının yararlı olup olmayacağı hala bilinmemektedir. Bunun başlıca nedenleri olarak embriyo biyopsi prosedürünün invaziv olması sebebiyle embriyo gelişimi üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabileceği, biyopsi sonrası embriyolarda gerçekleştirilen kriyoprezervasyon/çözme süreçlerinin farklı riskler getirebiliyor oluşudur<sup>70,95,96</sup>. Buna ek olarak TE'nin genetik oluşumunun iç ICM temsil etmeyebileceği mozaizm ile ilişkisi belirsizdir<sup>97</sup>. Bu nedenle, bir bütün olarak embriyonun kromozomal durumunu değerlendirebilen ve invaziv olmayan bir yöntem, embriyo seçiminde ideal olacaktır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. niPGT-A uygulama prosedürü

İlk tüp bebek tedavisi uygulamalarından bugüne literatürde çok sayıda yaklaşım ve embriyo skorlama aracı önerilmiştir. Bu yaklaşım ve araçların embriyo seçimindeki sınırlarını değerlendiren çok sayıda bilimsel çalışma ve yayın mevcuttur ve sonuçlar günümüzde statik görüntüleme kullanılarak gerçekleştirilen embriyo seçimlerinin çoğunda değerlendirme yapan embriyologun yetkinliği ve yanlılığı ile optimal olmayan kültür şartlarına bağlı faktörler nedeni ile beklenenden oldukça düşük bir başarı sunduğunu göstermektedir <sup>28,30</sup>. Bununla birlikte son yıllarda adı geçen faktörleri iyileştirmek amaçlı farklı yenilikçi cihazlar (Time-Lapse görüntüleme sistemleri vb.) ve yaklaşımlar (Yapay zekâ-tabanlı yazılımlar vb.) da geliştirilmektedir ve bu gelişmelerin embriyo implantasyon oranlarında bir miktar iyileşme sağlaması amaçlanmaktadır <sup>98</sup>.

Tüp bebek tedavilerinde implantasyon başarısızlığı ve erken dönem düşüklerin en önde gelen nedenlerinden biri ebeveynlerde gamet hücreleri yolu ile aktarılan veya preimplantasyon dönemde *de novo* oluşan kromozom bozukluklarıdır <sup>99,100</sup>. Preimplantasyon genetik testi (PGT), embriyo implantasyonunu, gelişimini veya bebeğin sağlığını bozabilecek kalıtsal kromozomal anormallikler için embriyoların gelişimlerine zarar vermeden test etmek için tasarlanmıştır. PGT, her ne kadar embriyolarında artmış kromozom bozukluğu olması beklenen belirli endikasyonlarda tercih edilen bir yaklaşım olsa da günümüzde pek çok klinikte gebeliğe erken ulaşmak veya çoğul gebelik kaynaklı riskleri azaltmak amacıyla daha geniş bir uygulama alanı bulabilmektedir <sup>101,102</sup>.

Mevcut altın standart yöntemde, gelişen embriyodan PGT amaçlı genetik materyal elde etmek için biyopsi yapılması gerekmektedir. Embriyo biyopsisi ile ilişkili olarak embriyo gelişimine zarar verebilme riski, doğan çocuklarda biyopsi kaynaklı uzun vadeli klinik sonuçların bilinmezliği ve biyopsi prosedürüyle ilişkili yüksek maliyetler, bu konuda çalışan araştırmacıları daha az girişimsel olan veya girişimsel olmayan (non-invaziv) seçenekleri araştırmaya ve klinik uygulama olanaklarını değerlendirmeye teşvik etmiştir <sup>103,104</sup>. Bu amaçla bazı araştırmacılar daha

az girişimsel bir yaklaşım sergilemesi açısından blastösel sıvının (Blastocoel Fluid; BF) ICSI iğnesi ile aspirasyonu (Blastosentez) ve aspire edilen sıvının incelenmesi yaklaşımını değerlendirmişlerdir <sup>105-109</sup>. Tümüyle girişimsel olmayan bir yaklaşım şeklinde embriyonun içinde büyütüldüğü “kullanılmış kültür sıvısı”nın (Spent Culture Media, SCM) kaynak olarak kullanıldığı diğer çalışmalarda araştırmacılar embriyonun gelişim sırasında bulunduğu ortama bıraktığı, nükleik asitleri de içeren “sekrotom” özelliklerinin öploidi, implantasyon ve klinik başarı ile ilişkilerini incelemiştirler <sup>110-115</sup>. Günümüzde gelinen noktada araştırmaların sonuçları hem BF hem de SCM tabanlı incelemelerin yüksek implantasyon kabiliyeti olan embriyoların tespiti için yeterli (ve yakın gelecekte daha verimli) araçlar olabileceğini öne sürerken, diğer taraftan geleneksel seçim ve biyopsi yöntemleriyle karşılaştırıldığında üstesinden gelinmesi gereken birçok zorluğu da beraberinde getirdiğine işaret etmektedir <sup>116</sup>.

Günümüzde embriyoların implantasyon potansiyellerinin belirlenmesi amaçlı kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen yöntemlerin eksileri göz önüne alındığında, mevcut ve yeni çalışmalar girişimsel olmayan yeni tekniklerin geliştirilmesi yönünde ilerlemektedir. Non-invaziv bir yaklaşım uygulanmasının, embriyoyu, çevresini ve dolayısıyla gelişme potansiyelini bozma/olumsuz yönde etkileme şansını azaltması ile birçok yönden faydalı olması beklenmektedir. Benzer yaklaşımların ayrıca girişimsel bir biyopsi ihtiyacını ortadan kaldırması, etkinliklerinin artırılması ile sağlıklı canlı doğuma ulaşmak için gerekli tedavi sayısını azaltması, böylece maliyetleri de önemli ölçüde düşürmesi diğer olumlu beklentilerdir.

Girişimsel olmayan yaklaşımlar ile embriyonun implantasyon potansiyelinin değerlendirilmesi çalışmaları hem ploidi durumunun belirlenmesinde hem de canlı doğum sonucu için en yüksek potansiyele sahip embriyonun seçiminde yeni perspektifler açabilme potansiyeline sahiptir. Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalara ait sonuçlar, yaklaşımın klinikte elektif tek embriyo transferi (eSET) için en uygun embriyonun “önceliklendirilmesi” bakımından faydalı olabileceğine işaret etmektedir <sup>117</sup>. Bu şekilde gebelik başarısını azaltmadan girişimsel olmayan bir

yaklaşım ile “seçilebilen” bir embriyo, konvansiyonel yaklaşım ile gerçekleştirilecek birden fazla embriyonun gebelik oluşturması nedeniyle hem anne hem de bebeklerde karşılaşılabilecek çoğul gebelik ve buna bağlı olumsuz tıbbi durumlarla ilişkili sorunlardan kaçınmanın en etkili yoludur <sup>118</sup>. Girişimsel olmayan embriyo seçim yaklaşımları üzerine gerçekleştirilen klinik-öncesi ve klinik çalışmalar günümüzde (yapan zekâ algoritmaları ile kombine olabilen) embriyoların özel mikroskop düzenekleri kullanılarak inkübatör içerisinde time-lapse (TL) morfokinetik incelemeler ve embriyonun içinde büyütüldüğü kültür ortamlarının genomik ve/veya proteomik analizi olarak iki ana kolda toplanabilir <sup>119,120</sup>. Genomik, birbirinden farklı türlere ait genomların tüm işlevsel ve yapısal yönlerini inceleyen bilim dalıdır. Kromozomların dizilenmesi tekniklerini uygulayarak, organizmaların genomlarını, yani genler bütününcü inceler. Metabolomik, metabolitleri, küçük molekülleü substratları, ara ürünleri ve hücre metabolizması ürünlerini içeren bütün kimyasal süreçleri inceler. Proteomik ise proteinlerin büyük ölçekli bir çalışmasıdır ve protein bileşimi, yapısı ve aktivitesi seviyesinden araştırılmasını kapsar.

Girişimsel olmayan yenilikçi embriyo seçim metotlarının geliştirilmesi sırasında klinik öncesi veya klinik çalışmalarda elde edilecek sonuçların başarısı ile aynı zamanda geliştirilmekte olan metodolojinin kullanıcı dostu olup olmadığı, laboratuvarla kolayca uygulanarak IVF sonuçlarını iyileştirip iyileştiremeyeceği gibi birçok faktör de teknolojinin yaygın kullanımı konusunda belirleyici olmaktadır. Örneğin yakın bir süre önce Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Fransa'da yüksek sayıda ÜYTE kliniklerinin katılımı ile gerçekleştirilen anket sonuçlarında katılımcıların önemli bir kısmının (%57-60) TL izleme sistemine sahip olmadıklarını, adı geçen sistemlerin statik embriyo seçim yöntemlerine üstünlükleri konusunda bilgi sahibi olmalarına rağmen ayrıca yakın gelecekte böyle bir sistem sahibi olmayı planlamadıkları görülmektedir <sup>121,122</sup>. Bu sonuçlar, yeni geliştirilen veya geliştirilmekte olan ve klinik açıdan başarıyı arttırma potansiyeline sahip uygulamaların etkin kullanımını sağlayabilmek için, test veya metodolojinin uyarlanması kolay ve kullanıcı dostu olmasını, embriyo gelişiminde ek bir risk oluşturmaması gerektiğini göstermektedir.

### 2.5.1 Time lapse morfokinetik analiz

Dünya genelinde günlük embriyo gelişim değerlendirmeleri ve seçimi için kullanılan altın standart halen invert mikroskop altında günün belirli saatlerinde ve oldukça kısa süre içerisinde gerçekleştirilmesi gereken statik seçim yöntemidir. Yöntem dünyada ilk ÜYTE uygulamalarıyla birlikte farklı araştırma grupları tarafından, farklı embriyo gelişim gün veya dönemlerine özgü veya tümünün birlikte (kümülatif) kullanıldığı değerlendirme sistemleri şeklinde kullanılmaktadır. Çoğu literatüre girmiş ve yaygın olarak kullanılan sistemlerin yanında ayrıca her kliniğin de kendine has seçim yaklaşımının varlığı bu seçim sistemlerinin “universal” bir şekilde kullanımını oldukça kısıtlamaktadır. Bazı uluslararası dernekler bu karmaşıklığı azaltmak için yakın bir süre önce bu alanda çalışan uzmanları bir araya getirerek “konsensüs” toplantıları düzenlemişler ve bu karmaşıklığı biraz olsun gidermeye çalışmışlardır <sup>123,124</sup>. Günümüzde, bu tür sistemler, bilgisayarla statik görüntü işleme kullanan ve embriyo canlılığı tahmini için AI tabanlı modeller geliştiren, gelişmiş hesaplama teknikleri ile giderek daha fazla geliştirilmektedir <sup>125</sup>. Bu tekniklerin en önde gelen avantajları, önyargılı olmamaları ve deneyimli (senior) embriyologlar arasında düşük uyum oranlarına kıyasla çok daha tutarlı olmalarıdır. Time-Lapse mikroskopisi ile bütünlük inkübatörlerin laboratuvarlarda yerini alması ile mevcut statik seçim yöntemleri önemli bir evrim geçirerek statik görüntü değerlendirmesi yanında morfokinetik pek çok parametreyi de içermektedir. Günümüzde bu iki özelliğe ait parametrelerin matematiksel olarak ölçülmesi ve etkinlik sıralarının belirlenmesi ile belirli embriyo gelişim günleri için farklı seçim algoritmaları geliştirilmiştir ve bu algoritmaların kullanılması ile geleneksel statik seçim yöntemlerine kıyasla daha yüksek bir implantasyon sağlanabildiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir <sup>126-128</sup>. Ayrıca ek olarak, algoritmalara AI tabanlı modellerin de eklenmesi ile gerçekleştirilen çalışmalarda bu yaklaşımın bir veya birden fazla klinikte görev yapan uzman embriyologlardan daha iyi performans gösterebileceği de ortaya konulmuştur <sup>129,130</sup>. Embriyo morfokinetik özellikleri ile, embriyonun öploidi/anöploidi durumu arasındaki olası ilişki de bazı araştırmacılar tarafından incelenmiştir ancak farklı grupların elde ettikleri çelişkili sonuçlar nedeniyle bu konu halen tartışmalıdır <sup>131-142</sup>.

## 2.5.2 Kullanılmış hücre kültür medyumunda serbest (Cell-free) DNA analizi

Üreme tıbbında ilk olarak 2011 yılında tanıtılan serbest DNA analizi yöntemi, erken gebelikte annenin kan plazmasından, dolaşımdaki fetal DNA'nın elde edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir<sup>143</sup>. Bu yaklaşım son yıllarda farklı araştırma grupları tarafından implantasyon öncesi embriyoların içinde büyütüldükleri kültür sıvılarının incelenmesi ile non-invaziv olarak belirli bazı genetik hastalıklar/riskler için test edilmesi amaçlı denenmektedir. İlk çalışmalar genel olarak kullanılmış embriyo kültür ortamı (SCM) ve TE biyopsisi arasında %15,4'ten %100'e kadar değişen oranlarda (heterojen) uyum bildiriyor iken, özellikle son dönemdeki çalışmalar SCM'nin ploidi açısından invaziv TE biyopsisi sonuçları ile oldukça yüksek ve tutarlı bir uyum gösterdiğine işaret etmektedir<sup>144-148</sup>. Ayrıca serbest DNA çalışmalarının çoğunda esas olarak embriyo ploidisinin tanımlanması için kullanılsa da yöntem ayrıca gebelik oranı ve embriyo kalitesi gibi diğer sonuçları ilişkilendirmek için de (örneğin mtDNA-tabanlı testler sayesinde) araştırılmaktadır<sup>149,150</sup>.

TE biyopsisine kıyasla SCM'den elde edilen serbest DNA analizinin bir avantajı, yanlış pozitifleri ve yanlış negatifleri azaltabilmesidir. Günümüzde araştırmacılar SCM analizinin genetik olarak tüm embriyonun daha iyi temsil edildiği bir yaklaşım olduğunu ifade etmektedirler ve bu durum biyopsi kaynaklı embriyonik mozaizm sonuçlarının azalması bakımından oldukça önemlidir.<sup>144</sup> Ayrıca beklendiği üzere teknik olarak zorlayıcı ve invaziv olan TE biyopsisinin iç hücre kütleleri (ICM) hücrelerini içermemesi nedeniyle sadece trofoblast hücrelerine ait genetik sonuçları temsil ediyor olma kısıtlılığı için de bir çözüm olabilir<sup>151</sup>. Bununla birlikte SCM'de bulunan DNA'nın kaynağının tam olarak ne olduğu bilinmemekte, içerisinde maternal hücre kaynaklı genetik kontaminasyon içerebileceği de halen tartışılmaktadır<sup>152</sup>. Yayınlanan son çalışmalar ve yapılan derleme çalışmaları, SCM'de serbest DNA analizi üzerine yapılan araştırmalarda özellikle örnek alınması, saklanması ve işlenmesi aşamalarında ciddi bir standardizasyon eksikliği olduğu, sonuçların buna bağlı olarak ciddi farklılıklar gösterebildiği, alınan farklı sonuçlar nedeniyle de yaklaşımın güvenilirliğinin artmasına rağmen yöntemin halen tartışmalı olduğu vurgulanmaktadır<sup>153-155</sup>.

### 2.5.2.1 Kùltür ortamındaki embriyonik DNA'nın olası kökeni

Çok değişken oranlarda da olsa, embriyo kùltür medyumunda embriyonik DNA varlığı günümüze kadar gerçekleştirilen çok sayıda çalışmada gösterilmiştir <sup>156-161</sup>. Embriyo kalitesi ile ilişkili olarak kùltür medyumunda bilinen ilk mitokondriyal ve genomik DNA analizi Stigliani ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir <sup>162,163</sup>. Galluzi ve arkadaşları, DNA miktarlarının 3. gün örnekleri arasında 58 pg (medyan) ve 5. gün örnekleri arasında ise 67 pg (medyan) olduğunu ve bunun da yaklaşık 10 hücrenin DNA miktarına karşılık geldiğini bildirmişlerdir <sup>161</sup>. Kùltür medyumundan elde edilen DNA'nın embriyo kaynaklı olduğunu kanıtlamak için bilinen gen mutasyonu olan hastalar kullanılarak, kùltür medyumunda içindeki DNA ile eşleştirilmiştir <sup>156,161</sup>. Ayrıca kùltür ortamında bulunan kromozomların incelemesi TE ve polar cisim biyopsisi sonuçlarıyla da korelasyon göstermiştir <sup>158,160</sup>.

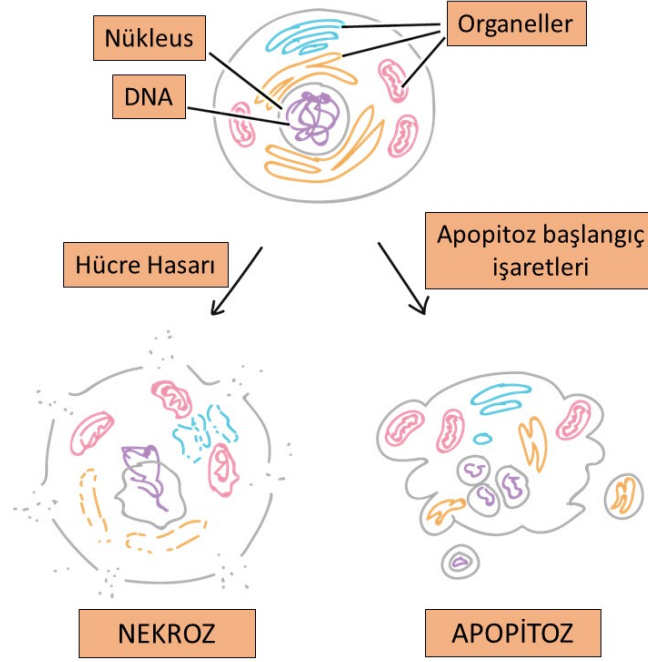
DNA'nın embriyodan kùltür medyumuna nasıl salındığı, hala netlik kazanmamıştır <sup>156</sup>. Kùltür ortamında bulunan DNA kaynağının embriyo içindeki ölü hücreler olduğu ana hipotez olarak düşünülse de DNA salgılayan taşıyıcılar olarak eksozomların da araştırılması gerekmektedir. Apoptotik veya nekrotik hücrelerden pasif DNA salınımına ek olarak son zamanlarda deneysel kùltür çalışmalarıyla da gösterilen aktif taşıyıcı mekanizma da bulunmaktadır. Bu olayın çok miktarda apoptotik veya nekrotik hücre olmadan da meydana geldiği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda inkübasyon sonrası kùltür ortamındaki DNA miktarı her medyum değişiminden sonra da aynı olarak bulunmuştur. Kùltür ortamında hücre ölüm belirteçlerinin olmayışı DNA salınımının canlı hücreler tarafından homeostatik bir mekanizmayla yapıldığını düşündürmüştür <sup>164</sup>.

Apoptoz, ortamdaki serbest DNA kaynağı olarak en fazla öne sürülen mekanizmadır <sup>156,159,165-167</sup>. Bu mekanizmaya göre apoptoz sürecinde DNA nükleozom boyutlarındaki fragmanlara kesilir (yaklaşık 180 bp) ve veziküllerin içine taşınır. Embriyolar arasında istenmeyen ve kromozomal olarak anormal hücrelerin apoptoza

uğradığı bilinmektedir <sup>168</sup>. Yapılan çalışmalara göre klivaj aşamasındaki embriyolarda mosaisizm oranı yaklaşık %60 olsa bile, blastokist aşamasında bu oran azalmaktadır <sup>169,170</sup>. Apoptozun mozaik fare blastokistlerinde görülmesi “apoptoz aracılı hücre salınımı” teorisini desteklemektedir <sup>158</sup>. Klivaj evresindeki embriyoların apoptoz geçirdiği gösterilmez iken, özellikle 5-6 günlük blastokist evresindeki embriyolarda apoptoz sıklıkla gözlenmektedir <sup>171</sup>. Bu durumun embriyoların erken klivaj aşamasındaki genom inaktivasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir <sup>172</sup>. Bunlara ek olarak yapılan çalışmalarda DNA'nın kültür ortamında parçalanmış olarak bulunduğu saptanmıştır <sup>173</sup>. DNA'nın 180 bp'lik fragmentlere parçalandığı ve bu uzunluktaki parçaların hücre kültür ortamıyla birlikte blastoselde de bulunmasından dolayı sonuçlar kültür ortamında bulunan DNA kaynağı olarak “apoptotik yolak hipotezi”ni de doğrulamaktadır <sup>156,163</sup>.

Apoptotik bileşenler, genellikle hücre zarındaki fagositler/fagositoz partikülleri tarafından uzaklaştırılırlar. Bu hücre zarı molekülleri, blastokist aşamasına kadar hücre zarında görünmezler <sup>168</sup>. Ancak Galluzzi ve arkadaşları 3. gün kültür ortam örneklerinde DNA miktarının yaklaşık 58 pg olduğu gözlemlenmişlerdir ve bu da yaklaşık 10 hücrenin DNA miktarına karşılık gelmektedir. Üç günlük embriyonun yaklaşık 6-10 hücre içerdiği göz önüne alındığında adı geçen miktardaki DNA salınımı için apoptotik yolun tek salgılama yöntemi olmadığı da düşünülmektedir.

Başka bir DNA salınım yöntemi de nekroz aracılı yoldur. Embriyolar arasında da nekroz olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Nekrozda, DNA rastgele boyutlu fragmanlar halinde kesilir ve apoptotik yoldan farklı olarak serbest bırakılır <sup>174</sup>. Nekrotik hücre bileşenlerinin uzaklaştırılması için fagositoz da sıklıkla kullanılır. Burada pinositoz yöntemi kullanılarak daha büyük DNA parçaları ortama salınır <sup>174,175</sup>. Genel olarak, nekroz çevresel uyaranlara cevap olarak meydana gelir. Genomda bir mutasyonun olması hücreyi nekroza götürebilmektedir. Böylece, nekroz yolağı aktif ise DNA embriyoyu apoptotik DNA fragmanlarından daha iyi temsil edebilir (Şekil 2.8) <sup>174</sup>.



Şekil 2.8. DNA salınım yollarından apoptoz ile nekrozun kıyaslanması

Üçüncü günde embriyoda fragmantasyon görülmesi hem apoptoz hem de nekrozun yanı sıra anöplidi, poliploidi ve zayıflamış gelişme potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir <sup>163,174,176</sup>. Embriyo kültür ortamındaki yüksek DNA miktarının, embriyolarda artan fragmantasyon seviyesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir <sup>156,162</sup>. Fragmantasyon sonucu hücreler sitoplazmayı, mitokondriyi ve mtDNA gibi hücre organellerini kaybeder. mtDNA'nın rolü hala araştırılmaktadır. Stigliani ve arkadaşları fragmante embriyoların kültür ortamında artan mtDNA miktarını bildirmiş ancak daha sonra mtDNA artışını iyi morfolojiye sahip embriyolar arasında da göstermiştir <sup>163</sup>.

DNA'yı hücre dışına taşıyıcı olarak "eksozom yolağı" olduğu da önerilmiştir. Eksozomlar, ortalama büyüklüğü 30 ile 150 nm arasında olan küçük veziküllerdir ve endozomlardan kaynaklandığına inanılmaktadır. Hücre iskeleti ve şaperon proteinleri, haberci RNA, mikro RNA, metabolizma enzimleri gibi çeşitli bileşenler içerirler. Eksozomların ana işlevleri ve rolleri iyi anlaşılmamıştır, ancak protein döngüsüne dahil oldukları düşünülmektedir. Ayrıca bağışıklık sistemi ve RNA taşıyıcılarının yanı

sıra somatik hücre özelliklerinin, ekzozom aracılı yolla diğer hücrelere aktarıldığı ileri sürülmektedir <sup>177,178</sup>. Ekzozomların embriyo gelişiminde kritik bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Qu ve arkadaşlarına göre, kültür medyumunu değiştirildiğinde embriyo gelişimi yavaşlamış fakat ekzozomlar yeni embriyo kültür medyumuna aktarıldığında, embriyo gelişimi önemli ölçüde iyileştiği gözlemlenmiştir <sup>179</sup>. Pallinger ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre ise ekzozom ve nükleik asit miktarlarının düşük seviyede olduğu kültür ortamındaki embriyonun, gebelik potansiyelinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir <sup>180</sup>.

#### **2.5.2.2 Kullanılmış hücre kültür medyumunu (SCM): Örnekleme, saklama ve analiz şartları**

Girişimsel olmayan teknikler kullanılarak günümüze kadar gerçekleştirilen embriyo seçimi amaçlı yeni test geliştirme çalışmalarında elde edilen sonuçlar, incelenen biyobelirteçlerin medyunda serbest (cfDNA, mikroRNA vb.) veya ekstraselüler vesiküller (EVler) içerisinde bulduklarına işaret etmektedir. MikroRNAlar (miRNA) herhangi bir gen kodlamayan 22 nükleotide kadar uzunluğu olan ortamda bozunmadan kalabilen ve kolayca tanımlanabilen kısa RNA molekülleridir. Bu moleküller oldukça karmaşık bir oluşum sürecine sahip olup blastokist aşamasında örneklenen SCMLerde 130'dan fazla miRNA tipi tanımlanmıştır <sup>181</sup>. Bu moleküllerden bazılarının potansiyel bir “invaziv olmayan embriyo seçim biyobelirteci” olarak kullanılabilmesi pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiş olsa da hem moleküllerin olası etki ettiği mekanizmalar hem de adı geçen biyobelirteçler kullanılarak geliştirilen testlerin klinik kullanım amaçlı standardizasyonu ve etkinliği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır <sup>182</sup>. EVler, hücrelerin birbirleri ile iletişim kurmak ve pek çok diğer amaç için kullandıkları, farklı boyut ve içeriğe (kargoya) sahip çift katlı lipit zar ile çevrili nanopartiküllerdir ve biyooluşum mekanizmalarına ve kaynaklarına göre üç farklı sınıf altında (Ekzozomlar, mikrovesiküller ve apoptotik cisimcikler) değerlendirilmektedirler <sup>183</sup>. Adı geçen oluşumların tüm preimplantasyon embriyo gelişim dönemi boyunca salgılanabildikleri ve kolay bir şekilde zona pelusidayı geçerek embriyonun çevresi ile iletişim kurmasına

yardımcı oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir<sup>184-186</sup>. Yakın zaman önce gerçekleştirilen bir çalışmada, örneklenen SCMLerin akış sitometrisi ile incelenmesi sonrasında örneklerde bulunan belirli çaplardaki EVlerin yoğunlukları ile embriyoların gelişim kapasitelerinin oldukça yüksek oranda korelasyon gösterdiği, bu durumun rutin tüpbebek uygulamalarında ek bir embriyo seçim kriteri olabileceği bildirilmiştir<sup>187</sup>.

SCM örneklerinin içerdikleri serbest nükleik asit molekülleri (cfDNA) bakımından incelenmesi konusundaki ilk çalışma Stigliani ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş olup daha sonra farklı araştırmacılar da bu konuyu moleküllerin kaynağı ve potansiyel klinik kullanım açısından sorgulamışlardır<sup>188-190</sup>. Çalışmaların bazılarında cfDNA moleküllerinin embriyo içerisindeki apoptotik olaylar sonucu ortaya çıktığını destekleyen, diğerlerinde ise cfDNA üretiminin apoptozdan bağımsız olduğunu varsayan sonuçlar elde edilmiştir<sup>191-193</sup>. Ayrıca bu konuda gerçekleştirilen ilk çalışmalardaki sonuçlar SCM içerisindeki serbest nükleik asitlerin önemli oranda maternal kontaminasyon içerdiği ve örnekteki miktarları arasında ciddi oranda farklılıklar olduğu gösterilmiş olsa da daha sonraki çalışmalar geliştirilen farklı metod ve yaklaşımlar sonrası bu problemlerin büyük oranda ortadan kaldırılabilirdiğini ifade eder niteliktedir<sup>194-197</sup> (Tablo 2.3.).

Çalışmalar arasındaki bu ciddi farklılıkların olası sebepleri olarak SCM örneğinin embriyo kültürü öncesi miktarı (embriyonun kültüre edildiği damlacık volümü), kültür süresi, embriyonun kültür sürecinde nasıl manipüle edildiği (agresif hyaluronidaz uygulaması, 3.gün zona pelüsünün lazer ile manipülasyonu, alınan SCM örneğinin saklama koşulları ve saklama sıcaklığı vb.) gibi embriyoloji laboratuvarı kaynaklı veya (amplifikasyon için kullanılan teknik ve malzemeler, analiz için kullanılan platformlar, analiz öncesi veya sonrası kullanılan ek algoritmaların varlığı vb.) genetik analizin gerçekleştirildiği laboratuvar kaynaklı değişkenlerin olası etkileri çeşitli çalışmalarda araştırmacılar tarafından öne sürülmektedir<sup>198-201</sup>. Rubio ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çok merkezli çalışmada analiz başarısının kullanılan embriyo kültür

ortamına veya embriyoların içinde büyütüldükleri inkübatörlerin modellerine bağlı önemli bir değişiklik göstermedikleri vurgulanmıştır<sup>202</sup>.

Tablo 2.3. SCM’de embriyonik DNA analizi gerçekleştirilen çalışmalar

SBM: Spent blastosist medium, TE: Trofektoderm SCM: Spent culture medium

D: Day

Yazar	SBM No	TE - SCM Uyum	Yanlış Pozitif	Yanlış Negatif	Medyum Miktarı	Embriyo Manüplasyonu	Kültürde Geçen Süre
Shamonki ve ark. (2016)	57	Ploidy (all full): 33.3 (2/6)	-	-	15 (15)	3. gün lazer	D3–D5/6
Feichtinger ve ark. (2017)	22	Ploidy: 72.2 (13/18) Full: 22.2 (4/18) Partial: 50.0 (9/18)	5.6 (1/18)	22.2 (4/18)	25 (5)	PB biyopsi, 3. gün lazer	D0–D5/6
Vera-Rodriguez ve ark. (2018)	56	Ploidy: 33.3 (17/51) Full: 17.6 (9/51) Partial: 15.7 (8/51)	-	66.7 (34/51)	25 (20)	3. gün lazer	D3–D5
Ho ve ark. (2018)	41	Ploidy: 65.0 (26/40)	-	-	25 (5)	3. gün lazer atılmış/atılmamış	D1–D5
Huang ve ark. (2019)	52	Ploidy: 89.1 (41/46) Full: 65.2 (30/46) Partial: 23.9 (11/46)	2.2 (1/46)	8.7 (4/46) 1	15 (3.5)	3. gün lazer, TE biyopsi, 5. ve 6. gün dondurulmuş	D5–D6 D6–D7 Çözdürme sonrası 24 saat kültür
Yeung ve ark. (2019)	168	Ploidy: 73.3 (85/116) Full: 23.3 (27/116) Partial: 50.0 (58/116) D5: Ploidy 76 (38/50)	12.9 (15/116) D5: 12 (6/50)	13.8 (16/116) D5: 12 (6/50)	30 (3)	3. gün lazer	D3–D5 D3–D6

		D6: Ploidy 71.2 (47/66)	D6: 13.6 (9/66)	D6: 15.2 (10/66)			
Rubio ve ark. (2019)	115	Ploidy: 78.7 (85/108) Full: 63.9 (69/108) Partial: 14.8 (16/108) D5: Ploidy 63 (17/27)g D6/7: Ploidy 84 (68/81)	13.9 (15/108) D5: 29.6 (8/27) D6/7: 8.6 (7/81)	2.8 (3/108) D5: 3.7 (1/27) D6/7: 2.5 (2/81)	10 (10)	-	D4–D5 D4–D6/7
Rubio ve ark. (2020)	1301	Ploidy: 78.2 (866/1108) Full: 67.7 (750/1108) Partial: 10.5 (116/1108)	12.4 (137/1108 )	8.3 (92/1108 )	10 (10)	-	D4–D6/7 R
Lledo ve ark. (2020)	92	Ploidy: 74.7 (62/83) or 72.3 (60/83)	12.0 or 15.7 (10/83 or 13/83)	13.3 or 12.0 (11/83 or 10/83)	20 (7.5 each method)	3. gün lazer	D3–D5/6
Shitara ve ark. (2021)	20	Ploidy: 88.9 (16/18)e Full: 66.7 (12/18) Partial: 22.2 (4/18)	5.6 (1/18)	5.6 (1/18)	-	5. ve 6. gün dondurulmuş, ZP hatching	D5 24 saat D6 3 saat blastosist
Hanson ve ark. (2021)	166	Ploidy: 63.5 (66/104) D3/4–D5: Ploidy (and full) 50.0 (3/6) D3/4–D6/7: Ploidy 64.3 (63/98) Full: 30.6 (30/98) Partial: 33.7 (33/98)	26.9 (28/104) D3/4–D5: 33.3 (2/6) D3/4– D6/7: 26.5 (26/98)	8.7 (9/104) D3/4– D5: 16.7 (1/6) D3/4– D6/7: 8.2 (8/98)4	30 (-)	3. gün lazer	D5: 24–48 saat D6: 48–72 saat D7: 72–96 saat
Chen ve ark. (2021)	265	Ploidy: 74.2 (190/256)	14.5 (37/256)	11.3 (29/256)	– (20–25)	-	D3–D5/6

### 2.5.3 Kullanılmış hücre kültür mediumunda proteomik/metabolomik analiz

Önceki bölümlerde genel hatları ile açıklanan embriyoların statik ve morfokinetik analiz parametreleri ile değerlendirmesi yaklaşımları, embriyoların ve bu embriyoların implantasyonu sonrası doğacak bebeklerin sağlığıyla mutlak bir korelasyon veya bağlantı içerme konusunda son derece kısıtlı bir öngörü sağlamaktadır. Bu açıdan bakıldığında konvansiyonel embriyo değerlendirme/seçim yaklaşımlarına ek olarak SCM örneklerinde analiz edilebilecek serbest DNA dışında ek kalite göstergelerinin/moleküler işaretçiklerin (marker) varlığı/yokluğu, embriyonun mikroskop altında nasıl görüldüğünün ötesinde bir katkı sağlama gücüne sahiptir. Diğer bir deyişle, güncel çalışmaların sonuçları, uygun şartlarda örneklenen ve gerçekleştirilen SCM analizi ile embriyonun çevresinin farklı OMICS yaklaşımları kullanılarak profillenmesi, embriyonun epigenetik durumu da dahil olmak üzere doğacak bebeğin sağlığının ölçülebilmesinin de mümkün olduğuna işaret etmektedir<sup>203</sup>.

Embriyo morfolojisi üreme başarısının çok iyi bir belirleyicisi olmaması sebebiyle yakın zaman öncesine kadar pek çok klinikte başarı oranlarının kabul edilebilir seviyelere yükseltebilmek adına çoklu embriyo transferi stratejisi yaygın olarak tercih edilmiştir. Ancak aynı anda iki veya daha fazla embriyonun transfer edilmesi çoğul gebelik riskini de artırdığı için gebelik şansı yüksek embriyoyu seçerek başarı oranlarını arttırıp gebe kalma süresini kısaltan bir belirteç arayışı önem kazanmıştır. Uygun belirteçlerin araştırılması için, embriyoların içinde büyütüldüğü kültür besi yerinin incelenmesi üzerinde durulmuştur. Amino asit döngüsü ile ilgili yapılan çalışmalar gebelik vadeden embriyoların, gelişimini durdurmuş embriyolara göre metabolik olarak daha dingin olduğunu göstermiştir<sup>204</sup>. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak incelenen kültür sıvılarında asparajin, glisin ve lösin amino asitlerinin yıkımının klinik gebelik ve canlı doğum ile anlamlı bir korelasyonu olduğu bulunmuştur<sup>205</sup>. Bu çalışmanın dezavantajlarından biri ölçümleme için kültür ortamındaki başlangıç amino asit miktarlarının net olarak bilinmesi gerekliliğidir ve adı geçen çalışmada kullanılan kültür ortamı dışında diğer

kültür ortamı formülasyonlarında amino asit devri konusunda başka bir araştırma yapılmamıştır.

Kültür ortamında insan embriyolarının protein salgılarını ve sekretomlarını inceleyen farklı çalışmalar vardır. Kütle spektrometresi kullanılarak kaliteli blastokistler ile gelişimi durmuş embriyoların kültür sıvılarındaki protein profilleri arasında fark olduğu gösterilmiştir <sup>206,207</sup>. Polikistik over sendromu (PCOS) olan kadınlardan geliştirilen blastokistlerin donör oositlerinden elde edilen blastokistlere göre farklı protein salgılama ve transkripsiyonel profilleri olduğu yapılan son çalışmalarla gösterilmiştir <sup>208</sup>. Bunlara ek olarak implante olan ve implante olmayan blastokistlerin kültür sıvılarında da proteomik farklılıklar olduğu gösterilmiştir <sup>209,210</sup>.

Diğer spektrometri yöntemlerinin kullanılması, protein ve amino asitler dışında farklı embriyonik metabolitlerin de araştırılabilmesine olanak sağlamıştır. Biyoinformatik ile her embriyonun kültür sıvısından bir canlılık indeksi çıkarılmıştır. Daha sonra validasyon ve pilot çalışmalardan elde edilen veriler ile gebelik ve canlı doğum sağlayan embriyolarda canlılık indekslerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir <sup>211,212</sup>.

## **2.6 Amino Asit Transport Düzenlemesi ve Erken Embriyo Gelişimi**

Amino asitler, proteinlerin oluşturulduğu monomerik yapı taşlarıdır. Tüm canlı organizmalar için evrensel olan 20 farklı amino asit vardır. Amino asitler, diyet gereksinimlerine göre esansiyel, esansiyel olmayan veya koşullu olarak esansiyel olmayan şeklinde sınıflandırılırlar (Tablo 2.4.). Esansiyel amino asitler vücut tarafından üretilemez ve diyetle bulunmalıdır. Esansiyel olmayan amino asitler vücut tarafından üretilebilir ve bu nedenle diyetin bir parçası olarak gerekli değildir. Koşullu esansiyel olmayan amino asitler ise vücut tarafından üretilabilir, ancak belirli şartlı gereksinimlerden daha düşük oranlarda sadece belirli zamanlarda (örneğin hamilelik veya bebeklik döneminde) esansiyeldirler.

Tablo 2.4. Aminoasit grupları.

Esansiyel amino asitler	Esansiyel olmayan amino asitler	Koşullu esansiyel olmayan amino asitler
Histidin	Alanin	Arjinin
İzolösin	Asparajin	Sistin
Lösin	Aspartik Asit	Glutamin
Lizin	Glutamat	Glisin
Metiyonin	Serin	Prolin
Fenilalanin	Tirozin	
Treonin		
Triptofan		
Valin		

Amino asitler, döllenmiş yumurtaların blastokist aşamasına ulaşması için kültür ortamında bulunan temel bileşenlerdir. Bu tür ortamların kullanımı, rahime transfer edildikten sonra implante olan embriyoların oranında önemli bir artışı beraberinde getirmektedir. Yani amino asitler embriyo gelişimine destek olduğu gibi aynı zamanda da embriyoların rahime tutunmasını ve rahimde gelişimlerine devam etmesine olanak sağlar. Bu gelişmeler hamileliği sağlamak için nakledilmesi gereken embriyo sayısında azalmayı da beraberinde getirir<sup>213-216</sup>.

Amino asitlerin sağlıklı insan blastokistlerinin gelişimini desteklediği mekanizmalar hakkında çok fazla şey bilinmemektedir. Bununla birlikte, bu mekanizmaların birçoğunun insan ve fare embriyolarında aynı olduğu görülmektedir. Hem esansiyel hem de esansiyel olmayan amino asit taşınması, farklı aşamalarda da olsa, preimplantasyon fare embriyo gelişimine fayda sağlar. Esansiyel olmayan amino asit taşınması, öncelikle bölünme sırasında gelişimi artırırken, esansiyel amino asit taşınması, özellikle sekiz hücreli aşamadan sonra, daha canlı embriyoların gelişimini destekler<sup>213,217</sup>.

Amino asit gruplarının ve bazı seçilmiş amino asitlerin, çeşitli türlerden kültürlenmiş memeli embriyolarında implantasyon öncesi in vitro embriyo gelişimi iyileştirdiği gösterilmiştir <sup>218</sup>. Esansiyel olmayan amino asitlerin embriyoların 8-16 hücre aşamasına kadar gelişimini desteklediği düşünülmektedir. Esansiyel amino asitlerin iç hücre kütlelerinin gelişimini uyardığı, esansiyel olmayan amino asitlerin ise blastokist ekspansiyonunu ve tomurcuklanmayı (Hatching) uyardığı saptanmıştır <sup>219</sup>. Memeli embriyo kültüründe embriyoların yaşayabilirliğini, sağlığını geliştirmek ve implantasyonu takiben canlı doğum beklentilerini iyileştirmek için uzun yıllar iki aşamalı veya sıralı ortam kültürleri tercih edilmiştir <sup>220-223</sup>. İnsan embriyo kültüründe de 2000'lerin başında büyük oranda iki aşamalı kültür sistemleri kullanılıyor iken gelişen teknoloji ile birlikte bu yaklaşım yerini embriyoların kültür ortamını değiştirmeden zigot aşamasından blastokist evresine kadar büyütülmesine imkan sağlayan yeni kültür sistemlerine bırakmaya başlamıştır <sup>224</sup>.

L-glutamin (L-Gln), bireysel amino asitler arasında üzerinde en fazla araştırma yapılan aminoasitlerdir. Amonyumun kültür ortamında kendiliğinden ve metabolik aktivite sonucu artışı embriyolar için toksik olabilir. Bununla birlikte ortamı değiştirerek/tazeleyerek ya da L-Gln'yi bir dipeptid formu veya glisil - L Gln ile değiştirerek ortamdaki amonyumun azaltılmasının, birçok farklı türde 2 - 8 hücreli embriyo aşamalarında gelişimi desteklediği gösterilmiştir <sup>220,225-227</sup>. Daha yakın zamanlardaki çalışmalarda, L-prolin, betain ve glisin dahil olmak üzere seçilen amino asitlerin, hiperozmotik koşullarda (>300 mOsm/kg) kültürün zararlı etkilerine karşı koruma sağlayan fare embriyoları için ozmolitler olarak hareket ettiği gösterilmiştir <sup>220,228</sup>.

## **2.7 Esansiyel Olmayan Amino Asitlerin Embriyo Gelişimine Faydası**

Çalışmalar, embriyo kültüründe esansiyel olmayan amino asitlerin karışımlarının blastokistlerin oluşma hızını, miktarını ve implantasyon oranlarını arttırdığına işaret etmektedir. Diğer taraftan embriyoların esansiyel olmayan amino asitleri içermeyen

ortama yaklaşık 5 dakikalık kısa süreli maruz kalmasının bile, in vitro olarak morula ve blastokistlere dönüşen zigotların oranını ve bu şekilde oluşan blastokistlerdeki toplam hücre sayısını önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir <sup>213,229</sup>.

Esansiyel olmayan amino asitlerin embriyo gelişimi üzerine olan olası etkileri bireysel veya amino asit gruplarının embriyo kültür ortamındaki konsantrasyon değişimlerinin incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir <sup>213,229-231</sup>. Van Winkle ve arkadaşları, in vivo gelişen embriyolarda taurin, glisin ve aspartat için Na<sup>+</sup> ya bağlı taşıma aktivitelerindeki gelişimsel değişiklikler ile bu amino asitlerin embriyo kültür içeriğindeki değişiklikleri bildirmişlerdir <sup>213,232</sup>. Preimplantasyon embriyolarında glisin, taurin veya anyonik amino asitler için seçici olan ayrı Na<sup>+</sup> ya bağımlı sistemlerin aktivitelerindeki değişiklikler, aynı taşıma özelliklerine sahip proteinleri kodlayan mRNA'ların ekspresyonu ile ilişkili olduğu aynı çalışmayla gösterilmiştir <sup>232</sup>. Embriyolarda gelişimsel olarak (4-8 hücreli aşamada) benzer bir taşıma sisteminin glutamin için de düzenlendiği görülmektedir <sup>233</sup>.

## **2.8 Esansiyel Amino Asitlerin Embriyo Gelişimine Faydası**

Esansiyel amino asitler, sekiz hücreli aşamadan sonra embriyolarda bölünme hızını artırır ve böylece iç hücre kitlelerinde daha fazla hücre bulunan blastokistlerin gelişimine olanak sağlar. Esansiyel amino asit kültürüne maruz bırakılan embriyolar esansiyel amino asitlerin varlığında gelişmeyen embriyolara oranla daha fazla canlı fetuslara yol açtığı çalışmalarla saptanmıştır. Esansiyel amino asitleri içeren ortamda blastokistler geliştiğinde fetusların da daha büyük olduğu gözlenmiştir <sup>213,231</sup>.

Esansiyel amino asitlerin bariz işlevi besin olarak hücresel büyümeyi ve gelişmeyi teşvik etmek olsa da çalışmalar bu maddelerin önemli sinyal işlevlerini de yerine getirmekte olduklarını ve taşınmalarının diğer peri-implantasyon süreçleri düzenlemeye yardımcı olabileceğine işaret etmektedir. Bu süreçlerin basitçe eksojen esansiyel amino asitlerin varlığından ziyade taşınmaya bağlı olduğu sonucuna varmak

için, taşıma süreçlerinin kavramların içerdiği esansiyel amino asit miktarlarını düzenlemeye yardımcı olduğunu göstermek önemlidir <sup>213,231</sup>. Fare yumurtaları ve blastokistlerinin esansiyel amino asit metionin (100 µM) ile 1 veya 2 saat inkübe edilmesi, içerdikleri bu amino asit miktarını büyük ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Esansiyel amino asit taşınmasının gelişimsel düzenlenmesi, muhtemelen ilgili taşıyıcının veya yardımcı protein mRNA'larının ifadesine bağlı olduğu düşünülmektedir <sup>213,234</sup>.

## **2.9 Protein Sentezi ve Birikimi**

Fare üzerine yapılan çalışmalar protein sentezi ve birikimi konularında yol göstermektedir. Esansiyel amino asit taşınması ve düzenlenmesi, sekiz hücreli gelişim aşamasından sonra embriyolarda birbirine bağlı birçok fonksiyondan kaynaklanıyor olabilir. İlk olarak, implantasyon öncesi 10 saat boyunca in vivo olarak blastokistlerde meydana gelen net protein birikimi için muhtemelen esansiyel amino asitlere ihtiyaç vardır. In vitro, esansiyel amino asitler, daha hızlı hücre bölünmesi ve iç hücre kitlelerinde daha fazla hücreye sahip blastokistlerin gelişimi ile bağlantılı olarak, gelişimde biraz daha erken net protein birikimini destekliyor gibi görünmektedir. Bu blastokistlerin, taşıyıcı anne adaylarına transfer edildiklerinde, esansiyel amino asitlerin varlığında gelişmeyenlere göre fetüs oluşturma olasılığı daha yüksektir ve blastokistler bu besinlerin varlığında geliştiğinde fetüsler daha büyüktür. Ayrıca, izolösin hariç her esansiyel amino asit, in vitro olarak trofoblast büyümelerini oluşturan fare blastokistlerinin oranını arttıracakları düşünülmektedir <sup>213,231,235-237</sup>.

## **2.10 Embriyo Proteomik ve Metabolomik Analizlerinde Kullanılan Teknikler**

### **2.10.1 Kütle spektrometrisi (MS)**

Kütle spektrometrisi metabolomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde kullanılan etkin, duyarlılığı ve seçiciliği nedeniyle tercih edilen analitik bir tekniktir. Kütle spektrumu manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri

kütle/yük ( $m/z$ ) değerlerinin iyonun detektöre ulaşan miktarı ile orantılı olan yoğunluk değerine karşı sıralanması ile elde edilir. Kısaca, yüklü partikülleri  $m/z$  oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek çalışan cihazlardır.

Bir bileşiğe ait kütle spektrumu bileşiğin moleküler kütlesi cinsinden ifade edildiğinden kimyasal yapı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu sayede karmaşık karışımların nicel tayinini belirlemede kullanılan çok etkin bir yöntemdir<sup>238</sup>. Kütle spektrometresi; iyonlaştırma kaynağı, kütle analizörü, kütle detektör iyon kaynağı, numune girişi, vakum sistemi ve veri kayıt sistemi kısımları olmak üzere altı kısımdan oluşur. Kütle spektrometresinde analiz örneğinin buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve sonrasında oluşan iyonların  $m/z$  oranlarına göre ayrılarak kaydedilmesi ile işlemler gerçekleştirilir<sup>238</sup>.

### **2.10.2 Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi**

NMR organik moleküllerin yapıları ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi veren spektroskopik bir tekniktir. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisinin kullanımının yaygın olmasının nedeni, birçok çalışma kolaylığını beraberinde getirmesidir. Herhangi bir ayırım işlemine gerek olmaksızın, çok sayıda metabolitin aynı anda analizine olanak sağlaması, bunlardan bir tanesidir. Ayrıca numune hazırlama kolaylığı ve yüksek tekrarlanabilirlik diğer avantajları arasında gösterilebilir. Zengin veri bankalarına ve diğer tekniklere oranla düşük işletim maliyetine sahip olması sayesinde, analizlerde sıklıkça kullanılan bir ölçüm tekniğidir. NMR spektroskopisinin en önemli dezavantajı ise MS ile kıyaslandığında daha düşük duyarlılığa sahip olmasıdır. Bu da tayin edilen metabolit sayısının daha az olmasına neden olabilmektedir<sup>239,240</sup>.

### 2.10.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, ortak ve uygun bir çözücü ortamına konan bir karışımın içerdiği maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrıldığı işlemdir. Teknik ilk olarak Rus botanikçisi Mikhail Tswett tarafından 1906'da bitki pigmentlerinin (klorofil) ayrımında kullanılmış olup günümüzde biyokimyasal moleküllerin tanımlanmasında ve ölçümünde tercih edilen bir teknik olarak kullanılmaktadır <sup>241</sup>.Kromatografinin ana amacı, hedeflenen numunenin ayrımı ve miktarının ölçülmesidir.

Sıvı kromatografisi (Liquid chromatography, LC) yönteminde, metabolitlerin sıvı veya katı bir sabit faz ile sıvı hareketli faz arasındaki etkileşimine dayanarak ayırım yapılmaktadır. LC diğer ayırım yöntemlere göre daha sağlam ve hızlı bir tekniktir. Ayrıca tekrarlanabilir bir analiz olanağı sunmaktadır. Metabolomik çalışmalarda analiz edebileceği metabolit çeşitliliği bakımından zengin bir yöntemdir. Ayrıca kütle spektrometrisi veya diğer ölçüm cihazları ile kombine edilmesi nispeten daha kolaydır <sup>242</sup>. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (High performance Liquid Chromatography, HPLC) bir sıvıda çözülmüş bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan sabit faz ile değişik etkileşimlere girerler. Bunun sonucunda çözülmüş bileşenler kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeye başlarlar ve farklı zamanlarda kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılırlar. HPLC'de sınıflandırma ya durgun fazın tipine göre ya da ayırma mekanizmasına göre olur. Katı-sıvı kromatografisi, sıvı sıvı kromatografisi, afinite kromatografisi veya iyon-değişimi kromatografisi en sık tercih edilen HPLC metodları arasındadır.

HPLC'nin birden çok ve farklı branşlarda kullanım alanları mevcuttur. Antibiyotikleri, sedatifleri veya analjezikleri analiz etmek için ilaç alanında; karbonhidratlar, amino asitler, proteinler, lipitler, vitaminler ve hormonları analiz etmek için biyokimya laboratuvarında sıklıkla kullanılır. Gıda, çevre kirleticileri ve

endüstriyel analizlerde sıkça başvurulan bir yöntemdir. Ayrıca adli tıp ve toksikolojide de sıklıkla kullanılmaktadır<sup>243</sup>.

#### 2.10.4 Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS)

Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS), sıvı kromatografi temeline dayanan bir cihaz ve aynı zamanda bir yöntemdir. Laboratuvarlarda ekstra önem kazanmasının sebebi, kullanılan kütle detektörünün çalışma kolaylığı ve kesinliğidir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının bir alt türü gibi tanımlanabilmesine karşın kütle detektörünün yüksek özellikleri sayesinde farklı bir yöntem veya cihaz olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çalışmalarda HPLC-MS, HPLC-FLD veya HPLC-UV şeklinde kısaltmalarına da rastlanmaktadır<sup>244</sup>.

LC-MS/MS temel olarak üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar iyon detektör sistemi, kütle detektörü iyon kaynağı ve kütle analizörüdür. Numunenin iyonlaştırılarak cihaza gönderildiği kısım iyon kaynağıdır. Electrospray ionization (ESI) ya da atmospheric pressure chemical ionization (APCI) teknikleri analizi yapılacak numunenin özelliklerine göre tercih edilir. Polar bileşikler, örneğin aminler, peptidler veya proteinler ESI tekniği ile çalışılırken, apolar bileşikler örneğin steroidler APCI tekniği ile analiz edilir<sup>244</sup>. MS iyon dedektörü iyonları kütle ve yüklerine göre analiz edebilen yüksek duyarlılığa sahip bir sistemdir. Kuadropoller sayesinde iyon kaynağından gelen iyonlar, değişen elektromanyetik bir alana tabi tutularak m/z oranlarına göre ayrılır bu kısım kütle analizörü olarak adlandırılır. LC-MS/MS diğer yöntemlerden ayıran en önemli özelliği çok düşük konsantrasyonlarda bile maddenin miktar tayininin yapılabilmesini olanak sağlar. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek yoktur. MS/MS ise kantitatif uygulamalar için yüksek kesinlik ve duyarlılık sağlar<sup>241,242</sup>.

Kütle Spektrometresi her türlü bilinen bileşiğin kantitatif analizinin ölçülebildiği bir tekniktir. Organik ve inorganik moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve

bilinmeyen bileşiklerin tanımlanmasını yüksek özgüllük ve duyarlılıkla yapar. Molekülleri m/z oranına göre ayırıştırır ve ölçer. İlk olarak moleküller iyonlarına dönüştürülür. Sonrasında gaz fazına geçirilerek cihaza gönderilir. LC-MS de her molekül için bir m/z değeri ve bir retansiyon zamanı vardır. Doğada aynı m/z oranına sahip pek çok molekül mevcuttur. Ancak aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı çok düşüktür (1/10000).

Çalışma kolaylığı, keskinlik gibi etkenler sebebiyle laboratuvarlarda kullanımı yaygınlaşan LC-MS/MS, yeni doğan taramalarında sıklıkça başvurulanan bir tekniktir. Ayrıca amino asit metabolizması bozuklukları, üre siklusu enzim defektleri, yağ asidi oksidasyon defektleri gibi birçok metabolik hastalığa bu teknik ile aynı anda ve çok kısa sürede tanı koymak mümkündür. Bunların yanı sıra hormon (steroid hormonlar; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, progesteron, testesteron vb.) ve vitamin (D Vitamini; D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> vb.) ölçümlerinde de kullanılabilirdiğinden klinik uygulamaların önünü açmaktadır. LC-MS/MS ile insülin, DNA baz hasarı ölçümü, protein ve peptit ölçümlerini de gerçekleştirebilmektedir. Farmasötik uygulamalarda da ayrıca bu tekniğe ihtiyaç duyulmaktadır. İlaç metabolizması, ilaç geliştirme ve ilaç seviyelerinin belirlenmesinde etkin rol oynar. Eser seviyedeki analitlerin hassas miktar tayini ile doku ve kan gibi biyolojik örneklerde ilaç ve metabolitlerinin ölçümüne olanak sağlar. Uyuşturucu ilaçlara tanı koyarak adli tıpta, zehirleri belirleyerek ise toksikolojide kullanılmaktadır. Ayrıca gıda numuneleri ve su analizlerinde de kullanılmaktadır <sup>241-</sup>

244.

### **3 GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Bahçeci Sağlık Grubu Altunizade Şubesi Umut Tüp Bebek Merkezi laboratuvarında Nisan 2019 ile Nisan 2022 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı, ileri anne yaşı ve monogenik rahatsızlıklar için PGT uygulanan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Embriyoları blastokist aşamasına kadar gelişmeyen hastalar çalışmadan çıkartılmıştır. Çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi ve Acıbadem Sağlık Kuruluşları Tıbbi Araştırma Etik Kurulu tarafından 18.04.2019 tarih, 2019-8 sayılı toplantısında görüşülerek 2019-8/5 karar numarası ile tıbbi etik yönünden uygun bulunmuştur.

#### **3.1 Gereçler**

##### **3.1.1 Yumurta toplama için kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler**

Yumurtalar uyarıldıktan sonra mikroenjeksiyon için yumurtaların toplanması sırasında kullanılan demirbaş ve sarf malzemelerin listesi Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te belirtildiği gibidir.

##### **3.1.2 Döllenme ve embriyo kültürü için kullanılan demirbaş, sarf ve kimyasal malzemeler**

Steril ortamda toplanan yumurtalar mikroenjeksiyon işlemi için olgunluk derecelerine göre sınıflandırılır. Aynı zamanda erkek partnerden alınan semen örneği kademeli olarak yıkanarak en iyi spermler ayrıştırılır. Çevresindeki hücreleri uzaklaştırılan olgun oositler mikroenjeksiyon yöntemiyle sperm hücreleriyle birleştirilir (Şekil 2.6). Bu işlemler sırasında kullanılan kimyasallar, sarflar ve demirbaşlar Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te belirtildiği gibidir.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar

Malzeme Adı	Üretici Firma
CALCIUM IONOPHORE (C7522- 1MG)	SIGMA
PENICILIN-G POTASSIUM CELL CULTURE (P7794-1MU)	SIGMA
RBCLYSIS SOLUTION	QIAGEN
EARLE'S BALANCED SALT SOLUTION	SIGMA
HYALURONIDASE SOLUTION (90101-5X1ML)	IRVINE
ISOLATE SPERM SEPERATION (99264-2X50ML)	IRVINE
CONTINUOS SINGLE CULTURE COMPLETE (GENTAMICIN) 90165-2X20ML	IRVINE
MODIFIED HTF MEDIUM (90126-100ML)	IRVINE
OIL FOR EMBRYO CULTURE (9305-500 ML)	IRVINE
PURESPERM WASH-100 ML	IRVINE
PVP (%10) (90123-5X0,5ML)	IRVINE
SPERM FREEZING MEDIUM GENT (90128-20X5ML)	IRVINE
SPERM WASHING MEDIA (9983-100ML)	IRVINE
PURESPERM 100-250ML	NIDACON
HUMAN SERUM ALBUMIN 12x 5ml	IRVINE
VITRIFICATION FREZEE KIT	KITAZATO
VITRIFICATION THAWING KIT	KITAZATO
AMİNOASİT PLASMA/SERUM KONTROLLER	CHROMSYSTEM
5- SULFOSALİSİLİK ASİT HİDRAT (%95)	SİGMA-ALDRİCH
HİDROJEN KLORİT	SİGMA-ALDRİCH
AMİNOASİT REFERANS STANDART	CAMBRİDGE İSOTOPE LABS
METANOL	SİGMA-ALDRİCH
SU (HPLC PLUS)	SIGMA
ASETONİTRİL	SİGMA-ALDRİCH
FORMİK ASİD (%100)	MERCK

GONADOTROPİN (GnRH)	MERCK
MENAPOZAL GONADOTROPİNİ (hMG)	FERRING
REKOMBİNANT FLOKÜL UYARICI HORMON (rFSH)	GONAL-F
hCG	MSD
TRİPTORELİN	FERRING
ION TORRENT REPROSEQ PGS KIT	THERMO FISHER SCIENTIFIC
dNTP	THERMO FISHER SCIENTIFIC

Tablo 3.2. Sarf malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma
ALİMİNYUM CANE (5 PLACE CANE)	OOSAFE
ALİMİNYUM CANE ETİKETİ	OOSAFE
CRYO TUBE 1,8 mL	NUNC
CRYO VIAL 2ML BIOSYSTEM (121261)	BIOSYSTEM
ENJEKTÖR (1705LT 50 MİKRON)	HAMILTON
DISH IVF TC TREAT (353652)	FALCON
FİLİTRE (MILLIPORE MILLEX) SLGV033RS	PAL
FLASK (50 mL)	FALCON
LAM 26X76 mm	THERMO
LAMEL 22X22mm (100 PER PACK)	THERMO
FİLİTRE IVF TECH (OOSAFE)	OOSAFE
OOSAFE DEZENFEKTAN WIPES	OOSAFE
PETRI DISH (4WELL-176740)	NUNC
PETRI DISH (100X20mm)	FALCON
PETRI DISH (CENTER WELL)	FALCON
PETRI DISH CELL CULTURE 60X15mm	FALCON
PIPET HOLDING	SUNLIGHT
PİPET ICSI	SUNLIGHT
PİPET PASTÖR (CAM) 15cm.	PAUL HENZEIR
PIPET SEROLOGICAL 5mL, 10mL, 25mL	FALCON
PİPET UCU SARI	CAPP

PİPET UCU STERİL (0,5 ML)	EPPENDORF
PİPET UCU STERİL (2-200ul)	EPPENDORF
ŞEFFAF KILIF(CRYOSLEEVES)	OOSAFE
TÜP FALCON 5 mL	FALCON CORNING
TÜP KONİK (15mL)	FALCON CORNING
PİPET MICROCAP	DRUMMOND
SOLUSYON PH 7.00, 9.21, 4.01	METTLER TOLEDO
EMBRIYOSCOPE SLIDE	VITRO LIFE
DISH REPRO PLATE	OOSAFE
BLASTOMERE BIOPSY PIPET	SUNLIGHT
PETRI DISH 60X15 mm	NUNC
PIPETTE DENUING 275ul (STRIPPER UC)	GYNETIC
EMBRIYO TRANSFER KATATERİ	WEIGO
VITRIFICATION STRAW	KİTAZATO
PIPETTE DENUING 140ul (STRIPPER UÇ)	GYNETIC
PETRI DISH CELL CULTURE	FALCON
NEVPARIN FLK 25.000 IU/5 mL	SIGMA
RİBON BMP71-R4300	BRADY
BM71-32-427 STRAW ETİKETİ	BRADY
PİPET UCU MAVİ NON STERİL	LABOCELL
ELDİVEN STERİL PUDRASIZ	BABY
ENJEKTÖR İNSÜLİN	HAYAT
TÜP 1,5 ML EPPENDORF	EPPENDORF
PİPET UCU 20µl	EPPENDORF
PİPET UCU BEYAZ	EPPENDORF
MASKE LASTİKLİ	BENT

Tablo 3.3. Demirbaş listesi

Demirbaş Adı	Marka	Model	Seri No
İNKÜBATÖR	IKS	VS-9000GC-TC	E24396ML0011
INVERTED MİKROSKOP	ZEISS	AXIO OBSERVER Z1	3851002025
ANTİVİBRASYON MASA	TMC	63-541	192093
MİKROMANİPULATÖR	NARISHIGE	MM92B	15024-15011
LAMİNER FLOW KABİNİ	IVF TECH	120	12009258

STEREO MİKROSKOP	OLYMPUS	SZ61	5F02115
EMBRİYOSKOP	UNISENSE FERTILITECH	ES-D	ES-D2.143
LAMİNER FLOW KABİNİ	IVF TECH	120	12009365
İNKÜBATÖR	LABOTECT	C16	14209-0444
LAZER SİSTEMİ	OCTAX	LASER SHOT	20150221- LASER-6752
PH METRE	METTLER TOLEDO	SEVEN EASY	1230165754
MEDİKAL BUZDOLABI	LIEBHERR	PROFILINE	261324
STEREO MİKROSKOP	ZEISS	STEMI 2000	17778
HASSAS TERAZİ	DENVER INSTRUMENT	TB-224A	18706844
İNKÜBATÖR BENCHTOP	ESCO	MIRI	1275
IŞIK KAYNAĞI	OLYMPUS	TL3-220P	49506
FAZ KONTRAST MİKROSKOPU	OLYMPUS	CX-31	6B22791
SANTRİFÜJ	NÜVE	NF400	01-0096
LAMİNER FLOW KABİNİ	THERMO	82032000	306050447
STEREO MİKROSKOP	NIKON	SMZ1500	1002478
IŞIK KAYNAĞI	ZEISS	KL1500	245382
MEDİKAL BUZDOLABI	DOMESTIC	MP305C	6362110
SIVI AZOT TANKI	MVE	XC47/11-6	ATC05L237
BLOK TERMOSTAT	LABOTECT	BT070	10719-0228
ETÜV	ELEKTROMAG	M420B	5031514
İNKONTROL CİHAZI	LABOTECT	INCONTROL 1050	13873-2203
PİPET	GILSON	PIPETMAN	T54453K
VORTEX	IKA	GENIUS3	1.438.699
HASSAS TERAZİ	OHAUS	PIONEER	B819827134
VORTEX	VELP SCIENTIFICA	ZX3	SYNLAB, ANKARA
SANTRİFÜJ	NÜVE	NF048	SYNLAB, ANKARA
SHAKER	THERMO	PTS-60HL-4	SYNLAB, ANKARA
LC-MS/MS CİHAZI	SHIMADZU	8030 LC-MS	SYNLAB, ANKARA

96 KUYUCUKLU TERMAL DÖNGÜLEYİCİ	THERMO FISHER SCIENTİFİC	VERİTİ	IGENOMICS İSTANBUL
ION CHEF SİSTEMİ	THERMO FISHER SCIENTİFİC	LIFE TECH	IGENOMICS İSTANBUL
ION GENE STUDIO	THERMO FISHER SCIENTİFİC	S5	IGENOMICS İSTANBUL

### 3.1.3 TE biyopsisi ve biyopsi materyallerinin tüplere aktarımı

Trofektoderm biyopsisi yapılması planlanan embriyolara gelişimlerinin üçüncü günü ZP'lerini açmak üzere lazer işlemi uygulanmıştır. Embriyonik gelişimin beşinci ya da altıncı gününe kadar kültürü yapılan embriyolar, biyopsi işlemi uygulandıktan sonra dondurularak saklanmıştır. Biyopsi materyali tüplere aktarılarak genetik incelenmeye alındı. Bu işlemler sırasında kullanılan demirbaş ve kimyasallar Tablo 3.2 ve Tablo 3.4.'te belirtildiği gibidir.

### 3.1.4 Anöploidinin belirlenmesi

Tüplere aktarılan biyopsi materyalleri genetik olarak incelenmek üzere genomik DNA elde etme işlemlerine tabi tutularak, anormal değişimler gözlemlendi. Bu işlemler sırasında kullanılan sarf ve kimyasal malzemeler Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.'te belirtildiği gibidir.

### 3.1.5 Kültür medyumunun toplanması

Beş ya da 6 gün boyunca kültürü yapılan embriyolar biyopsi işlemi için uzaklaştırıldıktan sonra, içinde büyüdükleri kültür sıvısı analiz için toplanarak, PCR tüplerinde dondurularak saklanır. Bu işlemler sırasında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.3'te belirtildiği gibidir.

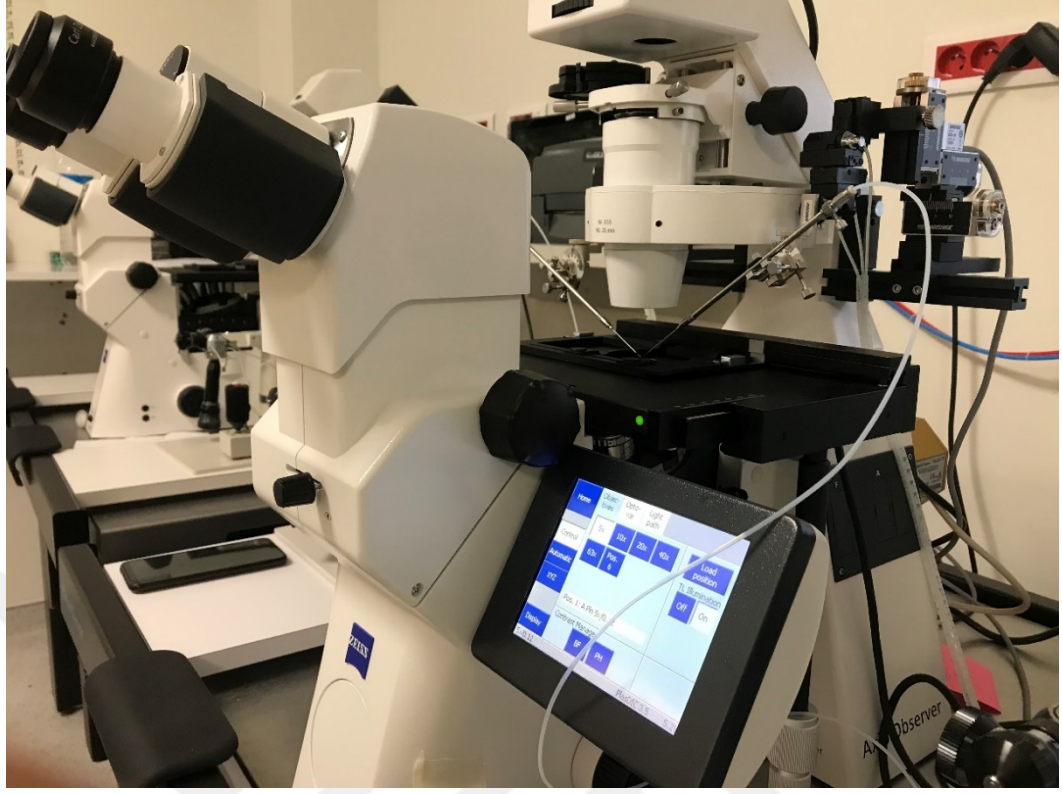
## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Ovaryum uyarılması ve yumurta toplama

Ovaryum uyarılması protokolü grubumuz tarafından önceki çalışmalarda anlatılmıştır<sup>245</sup>. Kısaca, busurelin burun spreyi (Suprecur, Hoeschst, Almanya) ile uzun protokol ya da gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonisti (Cetrotide, Merck Serono, Almanya) ile kısa protokol uygulanmıştır. Günlük olarak 150-450 IU dozlarda yüksek saflıkta insan menapozal gonadotropini (hMG) (Menopur, Ferring, USA) ya da rekombinant folükül uyarıcı hormon (rFSH, Gonal-F, Serono, İsviçre; ya da Puregon, MSD, USA) kullanılmıştır. 3 ya da daha fazla follikül  $\geq 18$  mm çapa ulaştığında 5000 IU hCG (Pregnyl, MSD, USA) ya da 0,2 mg triptorelin (Decapeptyl, Ferring, İsveç) enjeksiyonuyla ovulasyon tetiklenmiştir. hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra transvajinal olarak yumurtalar toplanmış ve ICSI işlemi uygulanmıştır. Tez çalışmasının bu aşamasında kullanılan demirbaş ve sarf malzemeler Tablo 3.3. ve Tablo 3.4'te belirtilmiştir.

### 3.2.2 Döllenme ve embriyo kültürü

Yumurtalar toplandıktan yaklaşık doksan dakika sonra hyaluronidase (Ref. 90101, Irvine Scientific, CA, USA) enzimi yardımıyla kümülüs hücreleri uzaklaştırıldı. Tüm olgun yumurtalar denudasyon işleminden sonra yaklaşık 1 saat kültür sıvısında dinlendirildi. ICSI işlemi yumurta toplanmasından yaklaşık 3-4 saat sonra uygulanmıştır.

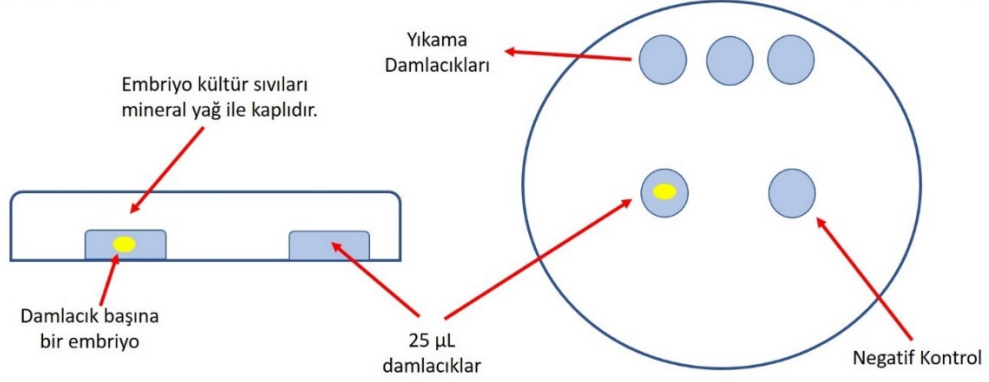


Resim 3.1. Invert mikroskop ve mikromanipul tor

ICSI işleminden yaklaşık 16-18 saat sonra döllenme kontrolü yapılarak her kültür kabında her biri 25  $\mu$ L'lik beş damlacık ( c adet yıkama damlacığı, bir adet embriyo kültür damlacığı ve bir adet negatif kontrol damlacığı) ve her bir kültür kabında tek embriyo olacak şekilde CSCM-C (Ref. 90165, Irvine Scientific, CA, USA) medyumu kullanılarak kültürü yapıldı (şekil 10). Embriyonik gelişimin  c nc  gününde embriyolar skorlandıktan sonra lazer yardımıyla yaklaşık 0,9  $\mu$ m çapında olacak şekilde ZP üzerinde delik açıldı (Octax, Vitrolife, Goteborg,  sve ). Bu çalışmada tüm embriyolar yağ altında (Oil for Embryo Culture, Ref. 9315, Irvine Scientific, CA, USA), tek aşamalı kültür medyumu (CSCM-C, Ref. 90165, Irvine Scientific, CA, USA) kullanılarak 37  $^{\circ}$ C, %6 CO<sub>2</sub> ve %5 O<sub>2</sub> ortamında MIRI yatay inkübatörler de (Esco Medical, Singapore) ya da EmbryoScope (Vitrolife, Göteborg, Sweden) TLS'de inkübe edildi (pH 7.28-7.35).

A) Yandan Görünüm

B) Üstten Görünüm



Şekil 3.1. niPGT için embriyo kültür kabı şeması.

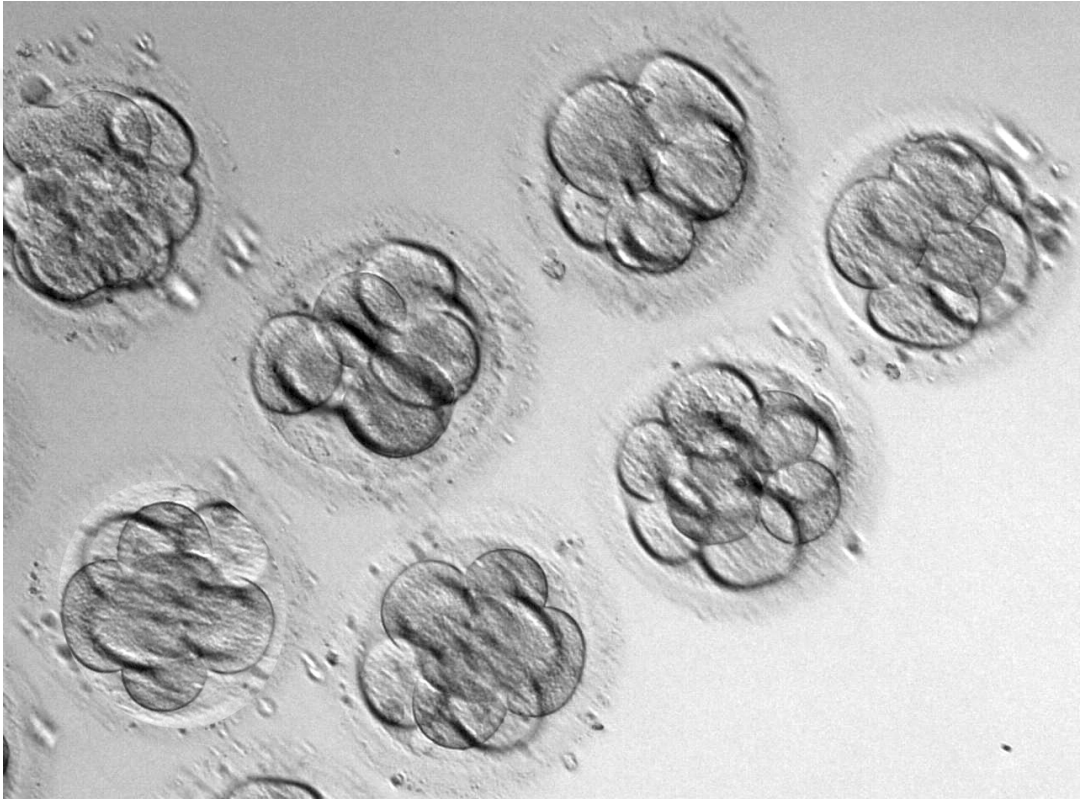


Resim 3.2. Benchttop inkübatör

### 3.2.3 Embriyoların skorlanması

ICSI işlemi yumurta toplanmasından yaklaşık 3-4 saat sonra uygulanmıştır. ICSI işleminden yaklaşık 16-18 saat sonra döllenme kontrolü yapılarak döllenmeyen ya da anormal döllenmiş embriyolar kültür kabından uzaklaştırılmıştır. Döllenme evresinden sonra iki gün daha inkübe edilen embriyolar tekrar kontrol edilmiş ve üçüncü gün

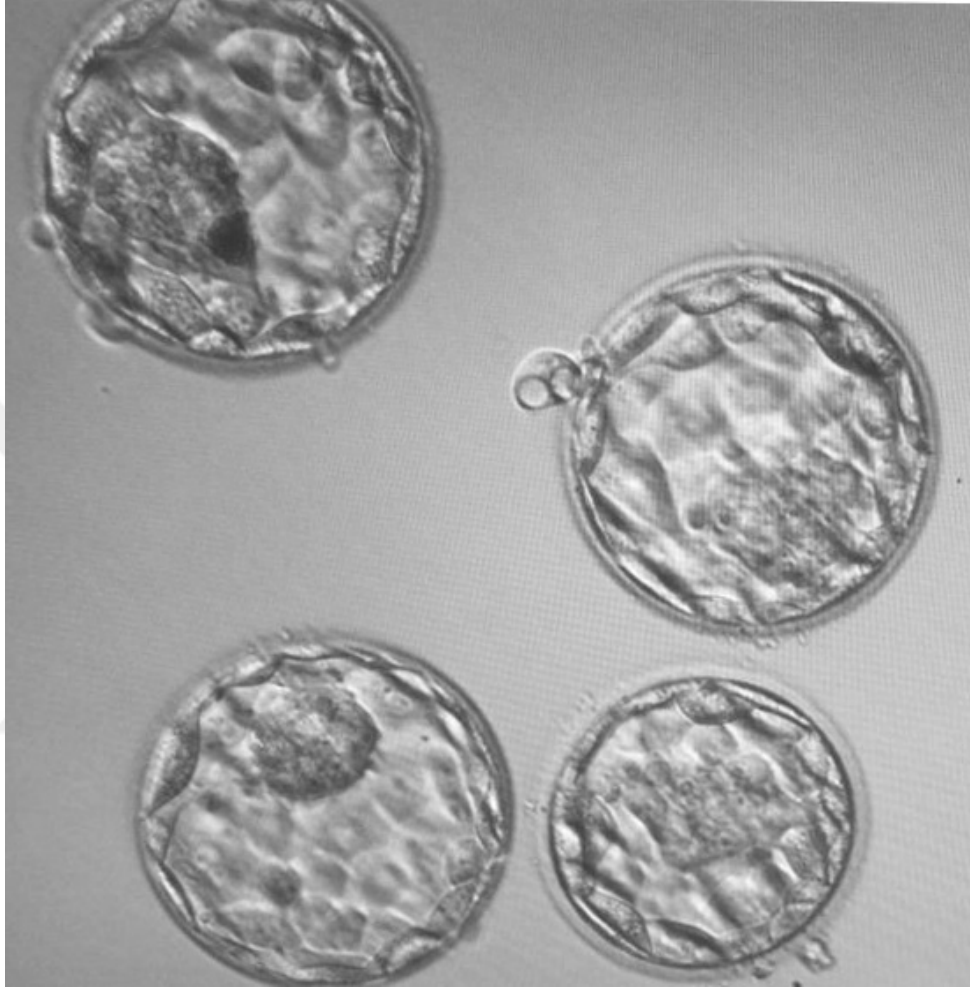
skorlaması yapılmıştır. Üçüncü gün skorlamasında embriyoların sırasıyla hücre sayısı, çekirdek oluşumu, fragmentasyon düzeyi, blastomer büyüklük oranı ve granülasyon seviyeleri tek tek bakılarak skorlama işlemi yapılmıştır. Embriyonik gelişimin üçüncü gününde embriyolar skorlandıktan sonra lazer yardımıyla yaklaşık 0,9 µm çapında olacak şekilde ZP üzerinde delik açıldı (Resim 3.5) (Octax, Vitrolife, Goteborg, İsveç) ve iki gün daha inkübe edilmek üzere inkübatördeki yerlerine bırakıldı.



Resim 3.3. Üçüncü gün embriyo gelişimleri ve skorlanması

Embriyonik gelişimin beşinci gününde embriyolar tekrar skorlanmak üzere inverted mikroskoba kısa süreliğine alındı (Resim 3.1.). Blastokist sınıflaması Tablo 2.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Blastokistler iyi, orta ve düşük kalite olacak şekilde basitleştirilmiş Gardner skorlama sistemi kullanılarak skorlandı. İyi kalite ICM/TE

AA ya da AB olduğunda, orta kalite BA, BB ya da BC olduğunda, düşük kalite ise CB ya da CC olarak skorlandı.

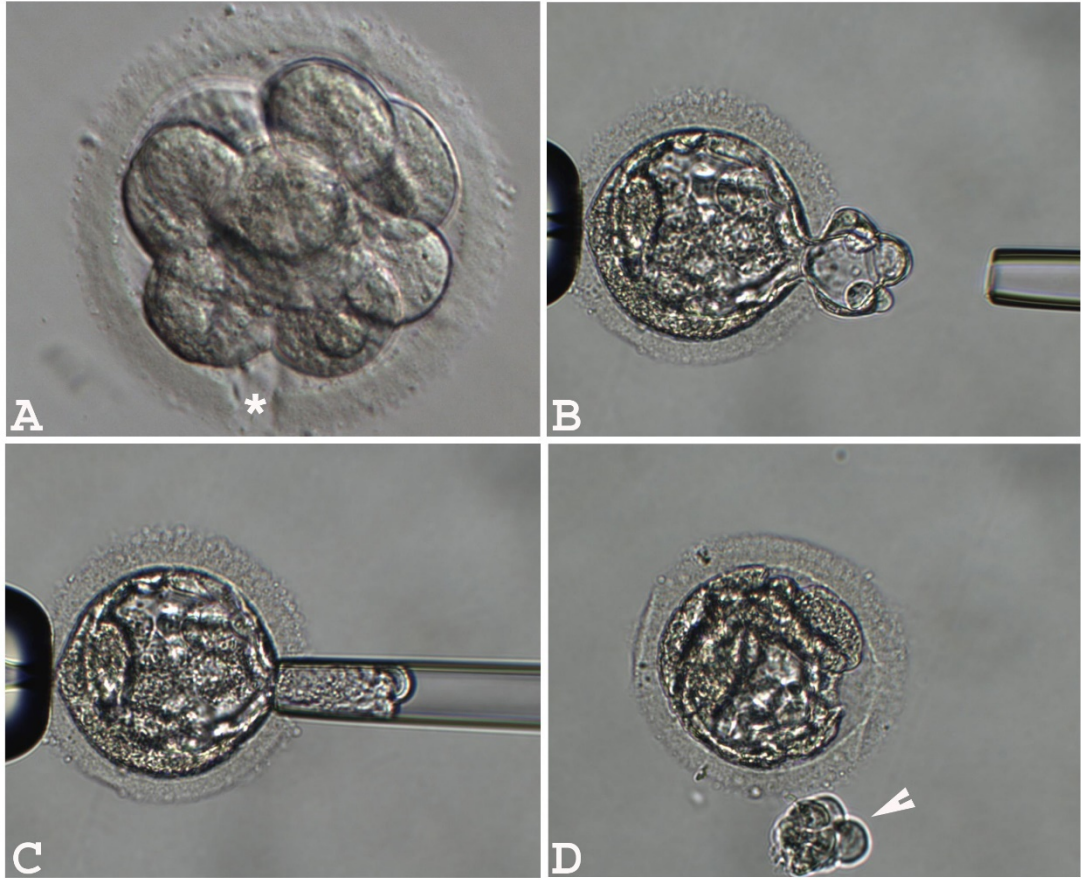


Resim 3.4. Beşinci gün blastokist gelişimleri ve skorlanması

### 3.2.4 Trofoektoderm (TE) biyopsisi

Blastokist sınıflaması Tablo 1.1’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Kısaca bahsedecek olursak, blastokistler iyi, orta ve düşük kalite olacak şekilde Gardner skorlama sistemi kullanılarak yapıldı (Tablo 2.1) [15]. İyi kalite ICM/TE AA ya da AB olduğunda, orta kalite BA, BB ya da BC olduğunda, düşük kalite ise CB ya da CC olarak skorlandı. TE biyopsisi, embriyonik gelişimin 5. gününde ya da 6. gününde iyi ve orta kaliteli

embriyolara uygulandı. CC olarak skorlanmış blastokistlere biyopsi işlemi hastanın iyi kalite blastokisti olmadığı, tek blastokisti olduğu ya da hasta isteği olduğu durumlarda uygulandı (Resim 3.5). Biyopsi yapılan blastokistler genetik sonucu çıkana kadar açık sistem Cryotop vitrifikasyon çubuklarına (KITAZATO, #81115, Minato-ku, Tokyo, Japan) özel dondurma medyumunu ile (KITAZATO, #91101, Minato-ku, Tokyo, Japan) yüklenerek  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.



Resim 3.5. Biyopsi işlemi tamamlanmış blastokist ve biyopsi örneği

Biyopsi uygulanacak embriyoya 3. Gelişim gününde lazer yardımıyla tıraşlama yapılmıştır. A mikrografında yıldız (\*) tıraşlanan bölgeyi göstermektedir. B, C ve D mikrograflarında 5. Gelişim gününde blastokist aşamasına ulaşmış embriyo

gözükmektedir. Holding pipet (solda) yardımıyla sabitlenen blastokistin trofoektoderm hücrelerinden biyopsi pipeti (sağda) yardımıyla 3-5 adet hücre alınır.

### **3.2.5 Biyopsi sonrası örneklerin tüplere aktarımı**

Tipik bir biyopsi işleminde TE'den lazer yardımıyla yaklaşık 5-8 hücre uzaklaştırıldı. Elde edilen biyopsi örnekleri yıkama tamponunda 3-5 defa al-ver yapılarak yıkandıktan sonra genetik incelemenin yapılabilmesi için 125 µm çaplı pipet yardımıyla (EZ-Strip, #7-72-2125/1, CooperSurgical Fertility & Genomic Solutions, Måløv, Denmark), stereomikroskop (ZEISS SteREO Discovery.V12, Oberkochen, Germany) altında 0.2 mL'lik PCR tüplerine (BrandTech, 0.2 mL PCR Tube, USA) aktarıldı.

### **3.2.6 NGS yöntemiyle anöploidinin belirlenmesi**

Embriyolardan alınan biyopsiler NGS yöntemi kullanılarak incelenmek üzere IGENOMIX İspanya genetik merkezine gönderildi. Burada Ion Reporter v5.6 (Thermo Fisher Scientific) programı kullanılarak uygulanan yöntem temel olarak DNA'nın enzimatik reaksiyonlarla kesilmesiyle birlikte ortaya çıkan DNA parçalarından bir kütüphane oluşturulması ve kütüphanedeki DNA parçalarının çoğaltılması prensibine dayandığı bildirilmiştir. Bu işlemde milyonlarca küçük DNA parçasının paralel sekanslama ile eş zamanlı olarak dizilenmesi gerçekleştirilmiştir. Böylece genomdaki her bir baz çiftinin birçok kez okunması olanaklı hale gelmiştir. Bu da oluşabilecek varyasyonların daha net bir şekilde saptanmasına olanak sağlamıştır <sup>92</sup>.

Blastokistin TE hücrelerinden biyopsi yapılarak uzaklaştırılan yaklaşık 5-10 hücre grubu sırasıyla;

- 1- Genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

- 2- Genomik DNA enzimatik yöntemlerle kesilerek ufak parçalara ayrıştırılmıştır.
- 3- Elde edilen DNA fragmentleri ile kütüphane oluşturulmuştur.
- 4- Kütüphaneyi oluşturan gen fragmentleri çoğaltılmıştır.
- 5- DNA parçaları dizilendi ve dizileme sonrası ham veri oluşturulmuştur.
- 6- Bu ham veri üzerine haritalama yapılarak olası kopya sayısı değişiklikleri tanımlanmıştır.
- 7- Kopya sayısı değişiklikleri belirlenerek raporlanmıştır.

### 3.2.7 Kültür medyumu toplanması

Bu tez çalışmasında kültür medyumu toplanması embriyo kültürü son bulduktan sonra yapıldı. Embriyolar 25 µL'lik damlacıklarından ya da EmbryoScope slaytlarından taşındı. Kültür medyumu toplama öncesinde olası kontaminasyonları önlemek için çalışma alanı (Laminer Flow Kabin, IVF Tech, Danimarka) ve mikroskoplar, DNA Away (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) yüzey temizleyici ile silindi.

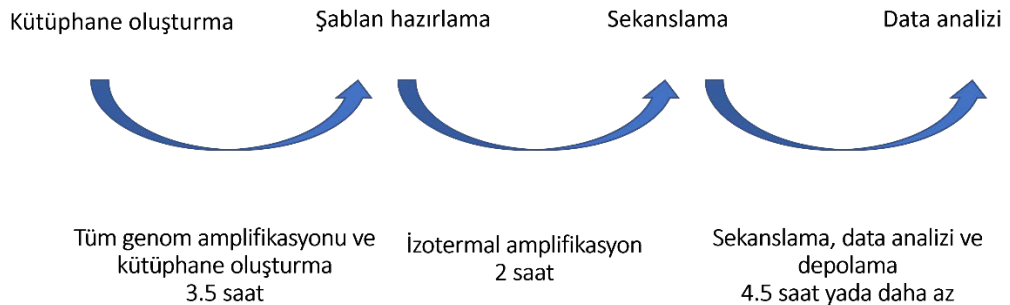


Resim 3.6. Çalışma alanı (Laminar flow hood)

Tüm kültür medyumları yağ altında olduğundan, kültür medyumunu toplanması sırasında yağ bulaşmasını engellemek için azami özen gösterildi. Embriyo kültür medyumları 290 µm çaplı pipetler yardımıyla (EZ-Strip, #7-72-2290/1, CooperSurgical Fertility & Genomic Solutions, Målov, Denmark ), her embriyo için ayrı pipet kullanılarak toplandı. Toplanan kültür medyumları 0.2 mL'lik PCR tüplerine aktarıldı. Tüplerin üst kapaklarına ait oldukları hastaların baş harfleri ve embriyo numaraları, yan taraflarına da eş isimleri ve embriyo numaraları silinmez kalem (Cryo Marker Pen Set, #4000222, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) ile yazıldı ve -20 °C'de (MR30SS-SARE-TS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) saklandı. Embriyo kültürü yapılmamış aynı miktarda kültür medyumunu negatif kontrol olarak işaretlenerek aynı koşullarda saklandı.

### 3.2.8 Kullanılmış kültür medyumları genomik analizi

Kullanılmış kültür medyumlarından genomik analiz Avrupa Laboratuvarı, Şişli İstanbul merkezinde gerçekleştirildi. Örnekler -20 C° muhafaza edildikten sonra uygun koşullar yerine getirilerek teslim edildi. Çalışılacak örnekleri 13000 rpm de 30 sn santrifüj ettikten sonra pre-amplifikasyon için gerekli hazırlıklar yapıldı. Çalışmada Ion Torrent™ ReproSeq™ PGS Kit (ThermoFisher Scientific) kullanıldı. PCR tüplerinde TF hücreleri olmadığı için parçalama (lysis) protokolü çalışmaya dahil edilmedi. İşlem Şekil 3.2'de gösterilen 4 ana adımda gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Tüm genom çoğaltma, template hazırlığı, sekanslama ve analiz

### 3.2.8.1 Tüm genom çoğaltma işlemi

Pre-amplifikasyon için master mix hazırlandı ve her bir örneğe 5µl (4.8 µl Pre-Amp. Buffer ve 0.2 µl Pre-Amp. Enzim) olacak şekilde toplam örnek sayısı ile çarpılarak hesaplanan miktarlar ile (Tablo 3.5.) master mix oluşturuldu.

Tablo 3.4. Pre-amplifikasyon için master mix hazırlığı

Bileşen	Reaksiyon başına miktar	Hasta sayısı (N) miktar
pre amplifikasyon buffer	4.8 µL	N x 4.8 µL x 1.1
pre amplifikasyon enzim	0.2 µL	N x 0.2 µL x 1.1

Hazırlanan örnekler pre-amplifikasyon için 96 kuyucuklu termal döngüleyici (Thermo Fisher Scientific-Veriti; Resim 3.7.) cihazına yüklendi. Cihazda örnekler, Tablo 3.6.'da belirtilen sıcaklık ve sürelerde çalıştı.

Tablo 3.5. Preamplifikasyon polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
1	95 °C	2 dakika	1
2	95°C	15 saniye	12
	15 °C	50 saniye	
	25°C	40 saniye	
	35°C	30 saniye	

	65°C	40 saniye	
	75°C	40 saniye	
3	4°C	∞	1

Pre-amplifikasyon evresi yaklaşık 1 saatte tamamlandı. Örnekler daha sonra amplifikasyon için cihazdan çıkarıldı ve her bir örneğe 30µl (2.5 µl Nuc-free H<sub>2</sub>O, 27 µl Amp. Buffer ve 0.5 µl Pre-Amp. Enzim) master mix eklendi. Hazırlanan örneklere Şekil 3.3'te bir kısmı gösterilen barkod tabağı'ndan 5'er µl her biri farklı olan özel barkod dizileri eklendi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17									
B	2	10	18									
C	3	11	19									
D	4	12	20									
E	5	13	21									
F	6	14	22									
G	7	15	23									
H	8	16	24									

Şekil 3.3. Barkod tabağı

Ardından amplifikasyon işlemi için örnekler 96 kuyucuklu termal döngüleyici (Thermo Fisher Scientific-Veriti) cihazına yüklendi. Cihazda örnekler, Tablo 3.7.'de belirtilen sıcaklık ve sürelerde çalıştı.

Tablo 3.6. Amplifikasyon polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
1	95 °C	3 dakika	1
2	95°C	20 saniye	4
	50 °C	25 saniye	
	72°C	40 saniye	
3	95°C	20 saniye	12
	72°C	55 saniye	
4	4°C	∞	1



Resim 3.7. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan cihaz

Amplifikasyon evresi tamamlandıktan sonra örnekler son evre olan saflaştırma ve miktar tayini için hazırlandı (Resim 3.8.). Cihazdan alınan örneklere vortex uygulandıktan sonra her bir örnekten 5 µl alınarak bir tüpte birleştirildi. Pre beads işlemi için oluşturulan havuzdan 50 µl alındı ve PCR cihazına yerleştirildi. 70 C° iki dakika inkübasyon işlemi için beklendi. Sonrasında 40 µl beads ve 40 µl havuz karışımı karıştırıldı ve dibe çökmesi için vortex uygulandı. Oda ısısında beş dakika daha inkübasyon işlemi için beklendi. Hazırlanan PCR tüpündeki karışım magnete yerleştirildi ve beadlerin magnette toplanması için beş dakika daha beklendi.

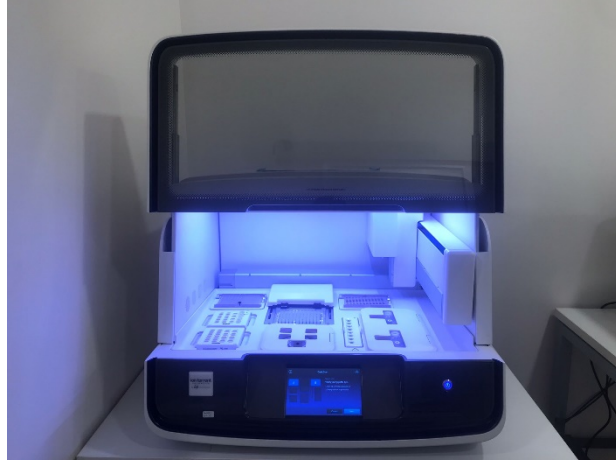


Resim 3.8. Saflaştırma ve miktar tayini için hazırlığı

Magnete toplanma işlemi gözlemlendikten sonra supernatant kısmı atıldı. 250 µl %70 lik etanol tüpe eklendi ve 30 saniye beklendi. Supernatant tekrar atıldıktan sonra aynı işlem tekrar yapıldı ve sonrasında 3-4 dakika kurutma işlemi için beklendi. Kurutma işleminden sonra 40 µl tris-edta buffer eklendikten sonra oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi ve akabinde 3 dakika magnette tekrar bekletildi.

### 3.2.8.2 Template hazırlığı

Birleştirilip saflaştırılan örneklerin template haline getirilip çipe aktarılmasını Ion Chef sistemi gerçekleştirdi. Bu işlem bir gece boyunca devam etti.



Resim 3.9. Ion chef sistemi

### 3.2.8.3 Dizileme

Sonra ip alındı ve data aktarımı ve sekanslama yapılması için Ion Gene Studio S5'e yerleştirildi. Sekanslama suresi örnek sayısına gore değişmektedir. Bu çalışmada 96 örnek olması dolayısıyla yaklaşık 6 saat kadar surd.



Resim 3.10. Ion Gene Studio S5

#### 3.2.8.4 Sekanslama kimyası

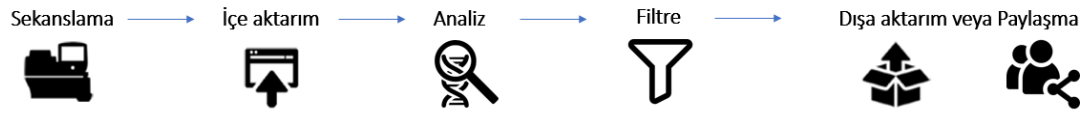
Ion torrent sisteminin kullandığı dizileme teknolojisi, DNA'nın polimerizasyonu sırasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının saptanmasına dayanmaktadır. Bu dizileme yöntemi "sentez yoluyla dizileme" yöntemidir.

Dizilenecek bir şablon DNA zinciri içeren bir mikro kuyu, tek bir tür deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) ile doldurulur. Her döngüde yeni bir dNTP ile yıkanan kuyucuklarda, şablon zincirde karşılık gelen ilgili nükleotidin tamamlayıcısıysa, büyüyen tamamlayıcı diziyeye dahil edilir. Bu reaksiyon iyon sensörünü tetikleyen bir hidrojen iyonunun salınmasına neden olur. Şablon dizisinde homopolimer tekrarları mevcutsa, tek bir döngüde birden fazla dNTP molekülü dahil edilecektir. Bu, karşılık gelen sayıda salınan hidrojene ve orantılı olarak daha yüksek bir elektronik sinyale yol açar.

Bu teknoloji, modifiye edilmiş nükleotid veya optik kullanılmaması bakımından diğer sentez yoluyla dizileme teknolojilerinden farklıdır. İyon yarı iletken dizilimi ayrıca İyon Torrent dizilimi, pH aracılı dizileme veya yarı iletken dizilimi olarak da ifade edilebilir.

#### 3.2.8.5 Analiz

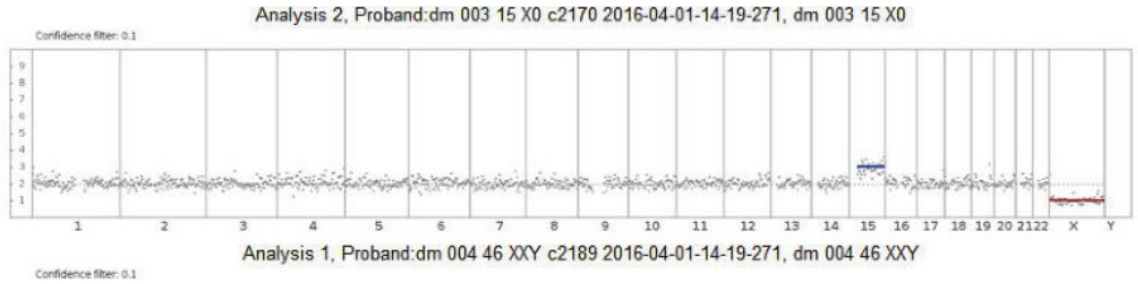
Örnekler, Ion Reporter (v5.6) adlı yazılım programında (Thermo Fisher Scientific) analiz edildi. Ion Reporter™ Yazılımı, Ion Torrent™ yarı iletken sıralama verilerinin veri analizini, açıklamasını ve raporlanmasını kolaylaştıran bir biyoinformatik yazılımdır. Dizilenen örneklerin analizi Şekil 3.4.'te belirtilen sıra ile server'a ya da cloud sistemine yüklenerek çalışma şekline ve örneklere göre özel olarak belirlenen filtreler kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.4. NGS iş akışında iyon raportör yazılım işlevleri

Anöploidi tespiti için ve verilerin analizi bir “Hidden Markov modeli”ne (HMM) dayalı bir algoritma kullanılarak yapıldı. Algoritma özetle, okuma sayısını kullanarak genom boyunca kromozomlara ait kopya sayısını tahmin etmek için okumaların taban çizgisinden uzaklıkların bir ortalamasını alır. Bu çalışmada algoritma parametreleri, düşük geçişli (low pass), tüm genom (whole genome) parametreleri için ayarlanmış bir şekilde kullanıldı. Yazılımın anöploidi tespiti için önermiş olduğu “Reproseq-aneuploidy workflow” analiz yöntemi olarak kullanıldı.

Yazılım, Resim 3.11.’de gösterildiği şekilde her bir kromozoma ait sonucu görselleştirerek sunmaktadır.



Resim 3.11. İnceleme sonucunun grafiksel gösterimi

### 3.2.9 Kullanılmış kültür medyumları metabolomik analizi

#### 3.2.9.1 Kültür medyumu amino asit ölçüm çalışmaları

Beş farklı lota sahip on beş adet CSCM-C (Ref. 90165, Irvine Scientific, CA, USA) kültür medyumu (her lottan üç örnek olacak şekilde) kullanılarak amino asit ölçüm çalışması yapıldı.

#### 3.2.9.2 Kültür medyumu bileşen miktarlarının belirlenmesi

Kültür medyumu bileşen miktarının belirlemek için sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) (SHIMADZU 8030 LC-MS) sistemi kullanıldı (Resim 3.12.).



Resim 3.12. SHIMADZU 8030 LC-MS/MS cihazı.

Çalışmada 25µL kullanılmış embriyo kültür medyumunu, kalibratör ve kontrollerden 100µL alınarak, Ependorf 1,5 mL'lik gödelere konuldu. Üzerlerine 25µL %10'luk 5-sulfosalisilik asit eklendi ve örnekler bir dakika boyunca vortexlendi (Velp scientifica ZX3). Yirmi beş dakika 2-8 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitikten sonra örnekler 13500 rpm'de beş dakika santrifüj (Nüve NF 048) edildi. Daha sonra örneklerin üst fazından 96'luk ELİSA plate 5µL alınıp üzerine 100µL iç standart eklendi. Shakerda (Thermo- Shaker PTS-60HL-4) beş dakika karıştırıldı. Daha sonra 96'luk ELISA plate uçurma bloğuna alındı ve örnekler azot gazı kullanılarak uçurma işlemine tabi tutuldu. Uçurma işlemi bittikten sonra örneklerin üzerine 60µL hyogen cholorida- 1- butanol solüsyonu eklendi ve tekrardan beş dakika shakera konuldu. Sonrasında numuneler yirmi beş dakika 65 °C'lik etüve (Elektromag, M420B, 5031514) konularak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bittikten sonra tek uçurma bloğunda azot gazı ile uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işleminin bitmesi ile örnekler 100µL mobil faz b ile çözdürüldü ve beş dakika shakera konuldu. Daha sonra numuneler viallere alınıp ve cihaza yerleştirildi.

Embriyo kültürü yapılmış kültür medyumundaki (T120) farklılıkların T0 (kültür öncesi duruma) zamanına göre anlamlı derecede değişip değişmediğinin hesaplanmasında Wilcoxon-Mann-Whitney individual comparisons yöntemi kullanıldı.

### **3.2.10 PGT-A sonuçlarının yorumlanması**

Standart raporlama için PGT-A sonuçları TE biyopsisi kullanılarak elde edildi. Segmental anöploidi ve kopya sayısı varyasyonları için tespit etme limiti  $\geq 10\text{Mb}$ 'dır. Segmental ya da sayısal anöploidiler tespit edildiğinde sapmalar her zaman raporlandı ve o embriyo transfer edilmedi. Mozaisizm  $\geq \%30$ 'un üzerindeyse embriyo mozaik olarak raporlandı. Bu değer, öploidi ve anöploidi hücre soylarının yedi yapay mozaik oranları kullanılarak valide edildi:  $\%0$ ,  $\%16,7$ ,  $\%33,3$ ,  $\%50$ ,  $\%66,7$ ,  $\%83,3$  ve  $\%100$ . Hücre soylarının  $\%33,3$  oranındaki karışımı tekrarlanabilir sonuçlar verdiği için

dolayı mozaik tespiti limiti olarak %30 kullanıldı. Mozaik olarak raporlanan embriyolar transfer edilmedi.

### **3.2.11 Öploid embriyo transferi**

Öploid embriyolar Irvine çözme medyumunu (Ref.90137, Vit Kit –Thaw, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) kullanılarak çözüldükten en az iki saat sonra, inverted mikroskop altında kontrol edildi. Canlı olduğu belirlenen blastokistler, önceden hormon tedavisi uygulanan endometriyuma transfer edildi. Tüm embriyo transferleri ultrason yardımıyla jinekolog, embriyolog ve işlem hemşiresi gözetiminde gerçekleştirildi. Hamilelik testi embriyo transferinden 12 gün sonra yapıldı.  $\beta$ -hCG (human Chorionic Gonadotropin) değeri  $\geq 50$  IU/L pozitif olanlar gebe olarak kabul edildi. Hastalara luteal faz desteği olarak Prolutex (IBSA, İsviçre) günde iki defa olacak şekilde 6-8 hafta boyunca kullanıldı.

### **3.2.12 Metabolomik data analizi için kullanılan istatistik**

Tüm hücre kültür medyumları gruplara ayrılarak Kruskal-Wallis varyant analizini takiben Wilcoxon-Mann-Whitney individual comparisons testi ile yapıldı ve  $p < 0.05$  istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Makalede, genel öploid / anöploid karşılaştırması için binary logistic regression model Backward Stepwise Likelihood Ratio ile yapıldı ve  $p < 0.05$  istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

## 4 BULGULAR

### 4.1 Hasta Demografisi

Nisan 2019 – Nisan 2022 tarihleri arasında Bahçeci Umut Tüp bebek Merkezinde infertilite tedavisi gerçekleştirilen ve PGT-A tekniği uygulanan 149 hastaya ait 392 TE biyopsisi yapılmış embriyo ve embriyoya ait kullanılmış kültür mediumu (SCM; genomik analiz için 49 hasta ve 142 adet biyopsi yapılmış embriyo ile metabolomik analiz amaçlı olarak 100 hasta ve 250 adet embriyo) prospektif olarak örneklendi. Hastalara ait demografik parametreler Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hastalara ait demografik parametreler

<b>Hasta Yaşı (sene)</b>	37.33 ± 4.07
<b>VKİ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.7 ± 2.6
<b>Yumurta Sayısı</b>	10.75 ± 5.8
<b>Olgun Oosit Sayısı (M2)</b>	8.2 ± 4.7
<b>Sperm Motilitesi (%)</b>	29.4
<b>2PN (%)</b>	82.17
<b>Blastokist (%)</b>	48.34

Hastaların %39’u ileri anne yaşı (İAY), %16’sı tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), %43’ü tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) ve %2’lik kısmı da bu grupların dışında “diğer” olarak tanımlanan endikasyonlara bağlı olarak tedavi gören çiftlerden oluşmakta idi. Bu hastalar ve örnekler daha sonra “Gereç ve Yöntem” kısmında belirtilen çalışmaya dahil etme ve hariç tutma kriterlerine uygunluk bakımından değerlendirilerek çalışmaya dahil edildi.

## 4.2 Genomik Analiz Sonuçları

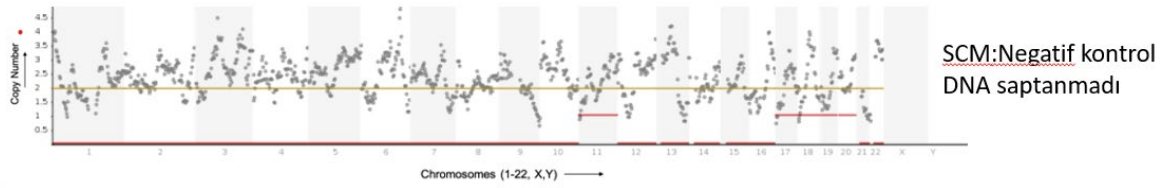
Genomik analiz çalışması kapsamında değerlendirilen 49 hastanın 142 embriyosu arasından TE Biyopsi sonucu normal (n:11) ve anormal (n:11) olarak tespit edilmiş toplam 22 embriyo ve SCM örneği rastlantısal olarak analiz amaçlı seçildi. Tablo 4.2.'de Genomik analiz kapsamında değerlendirilen embriyoların blastosist dönemi skorları, Biyopsi/örnek toplama günü ile TE biyopsi ve SCM analiz sonuçları verilmiştir. Şekil 4.1.'de ise negatif kontrol ve embriyoların TE biyopsi-SCM örneklerine ait NGS profilleri gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Genomik analiz kapsamında değerlendirilen embriyolar ve sonuçlar

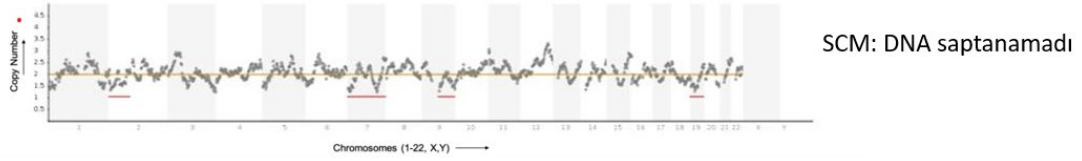
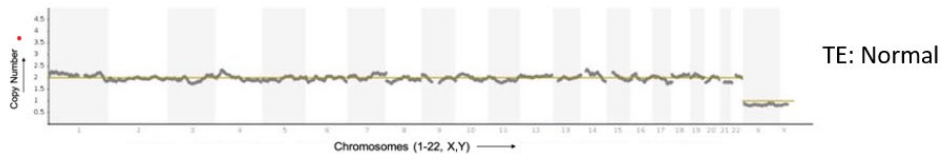
Embriyo No	Embriyo Kalite	Örnek Toplama Günü	TE Sonuç	SCM Sonuç
1	5BC	5	Normal	DNA saptanmadı
2	5BB	5	Normal	DNA saptanmadı
3	5BB	5	Normal	DNA saptanmadı
4	5BB	5	Normal	DNA saptanmadı
5	5BC	6	Normal	Normal
6	5BC	6	Normal	Kaotik
7	5BC	5	Normal	Kompleks anopluidi
8	5BB	5	Normal	DNA saptanmadı
9	5BB	5	Normal	Kompleks anopluidi
10	5BB	5	Normal	Parsiyel uyumlu-cinsiyet kromozomları yok
11	5BB	6	Normal	Normal

12	5BC	6	Kaotik +2, +7, +9, +20, +22	Parsiyel uyumlu-Kaotik
13	5BC	6	Monozomi 18	Monozomi 18
14	5BC	5	Kompleks anoploidi +6, +15, +21	DNA saptanmadı
15	5BB	5	Kompleks anoploidi +4, -19, -20	Parsiyel uyumlu-Kaotik
16	5BC	5	Kaotik +10, +15, - 17,+20, -22	DNA saptanmadı
17	5BC	5	Kompleks anoploidi -2, -19, X0	DNA saptanmadı
18	5BC	5	Kompleks anoploidi -8, -15, -21	DNA saptanmadı
19	5BB	6	Monozomi 14	Monozomi 14
20	5BC	6	Kompleks anoploidi +9, -15, XXY	Parsiyel uyumlu -XXY

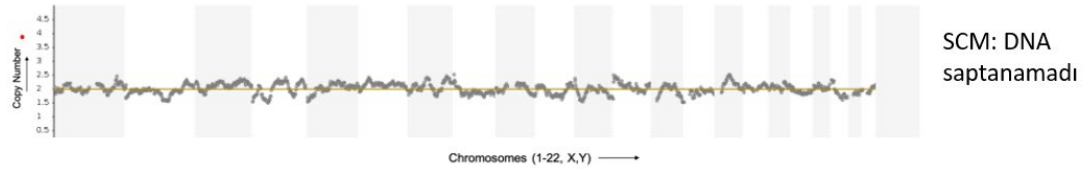
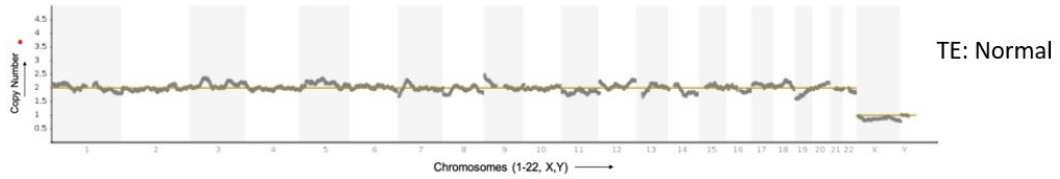
21	5BC	5	Kaotik	DNA saptanmadı
22	5BC	6	Kompleks anoploidi -13, +15	DNA saptanmadı



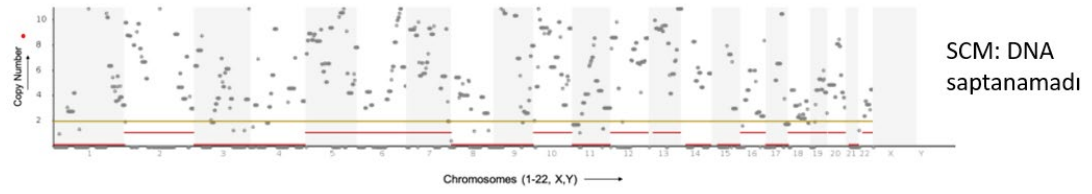
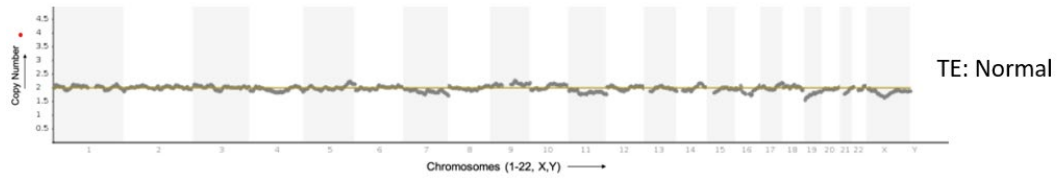
Embriyo No:1



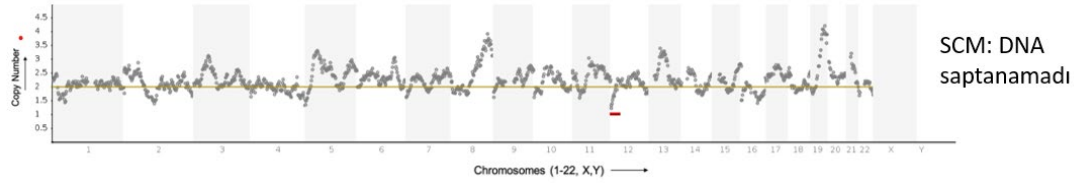
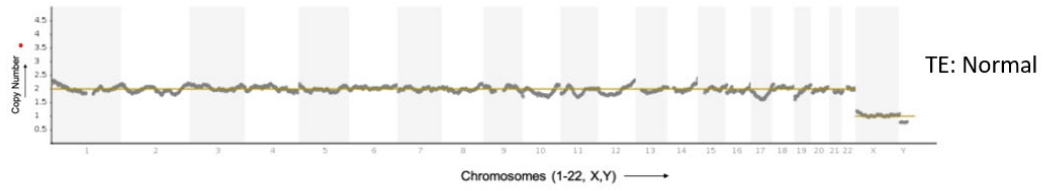
Embriyo No:2



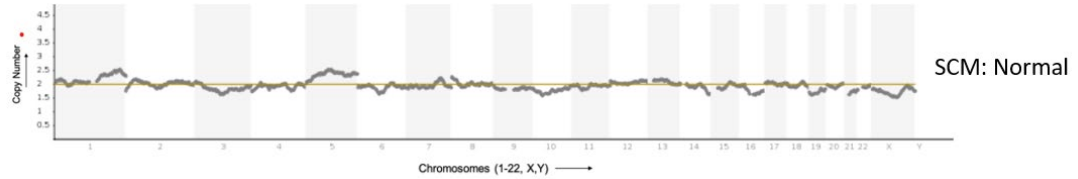
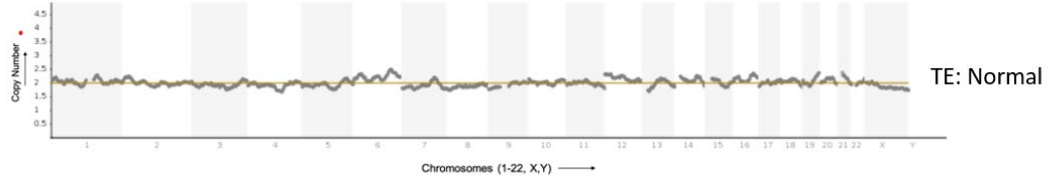
Embriyo No:3



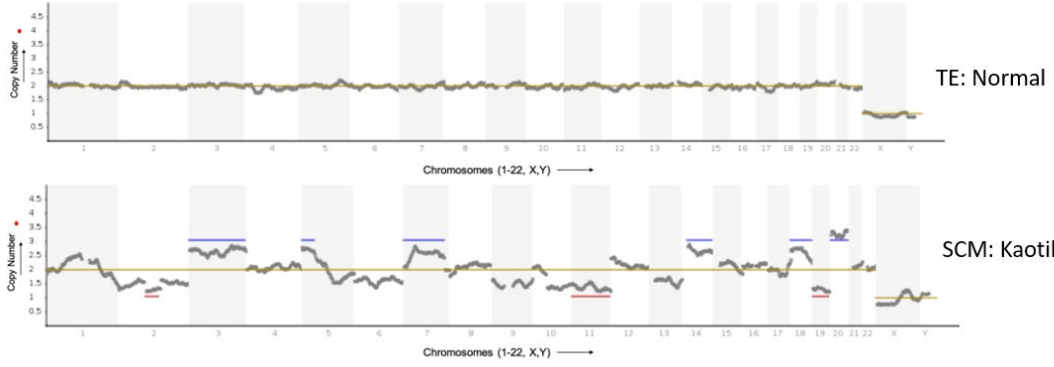
Embriyo No:4



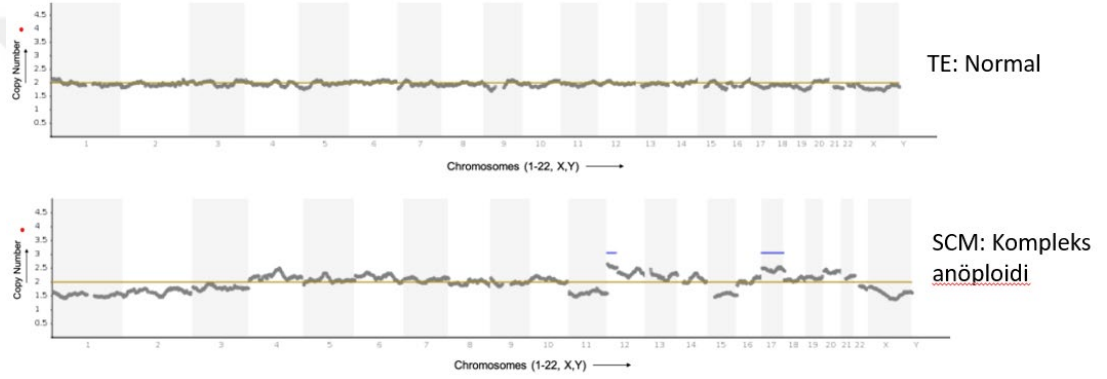
Embriyo No:5



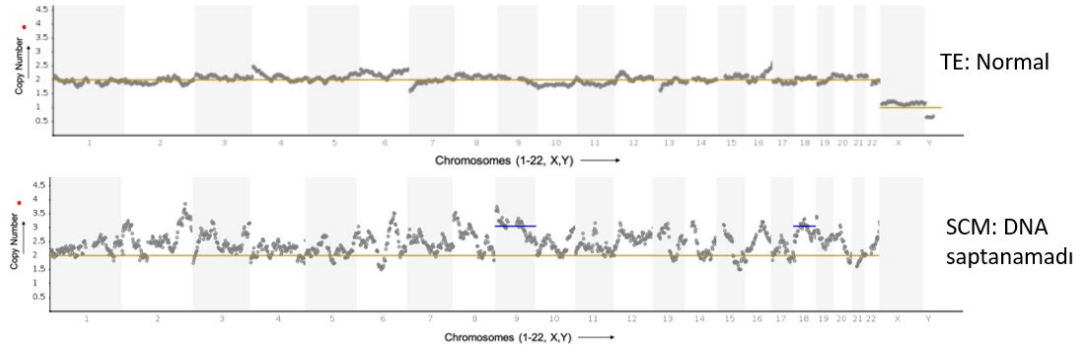
Embriyo No:6



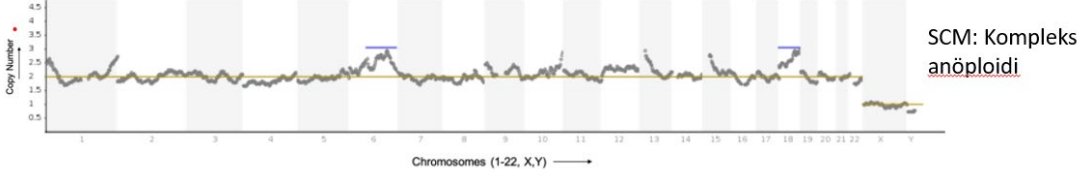
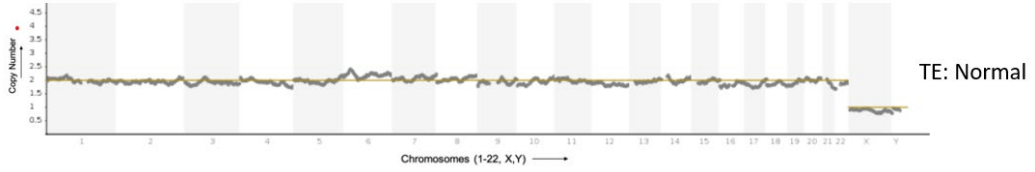
Embriyo No:7



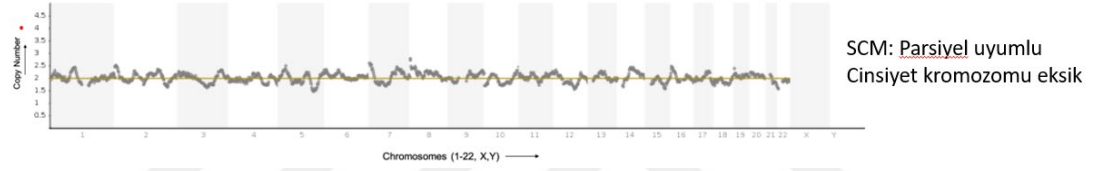
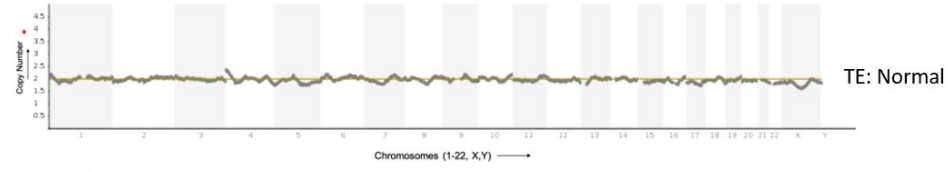
Embriyo No:8



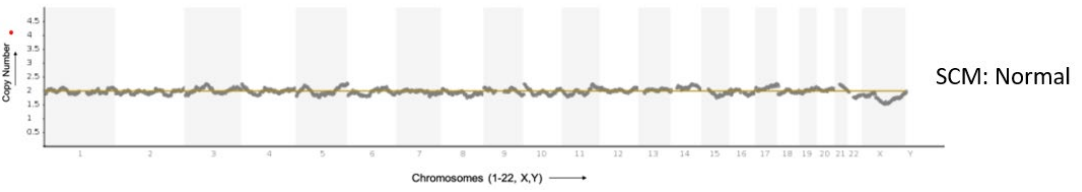
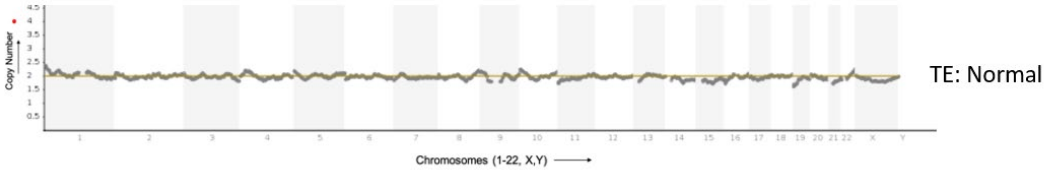
Embriyo No:9



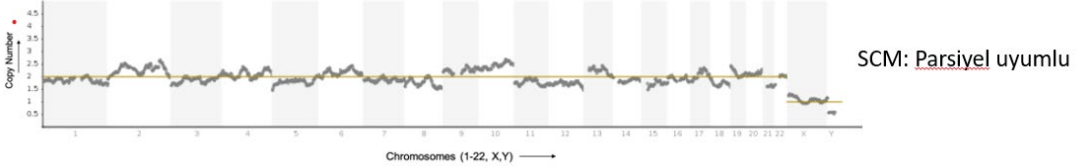
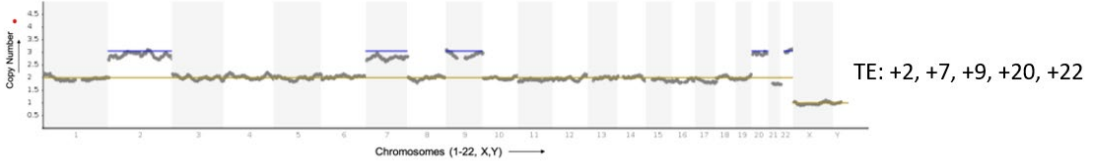
Embriyo No:10



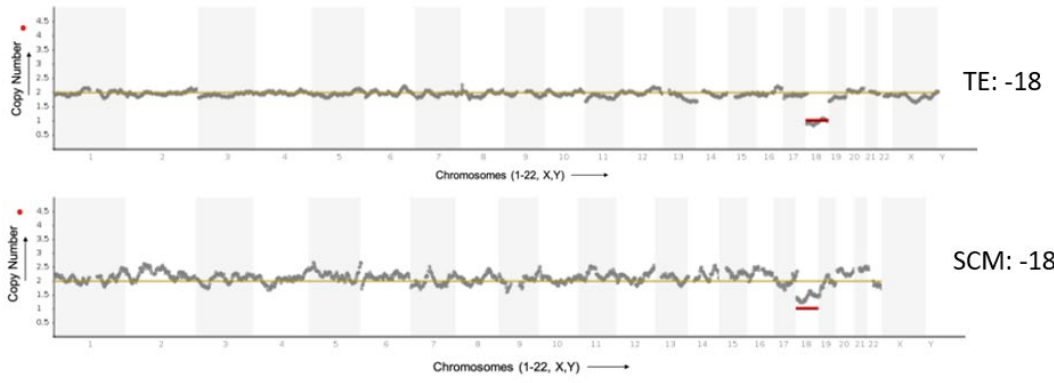
Embriyo No:11



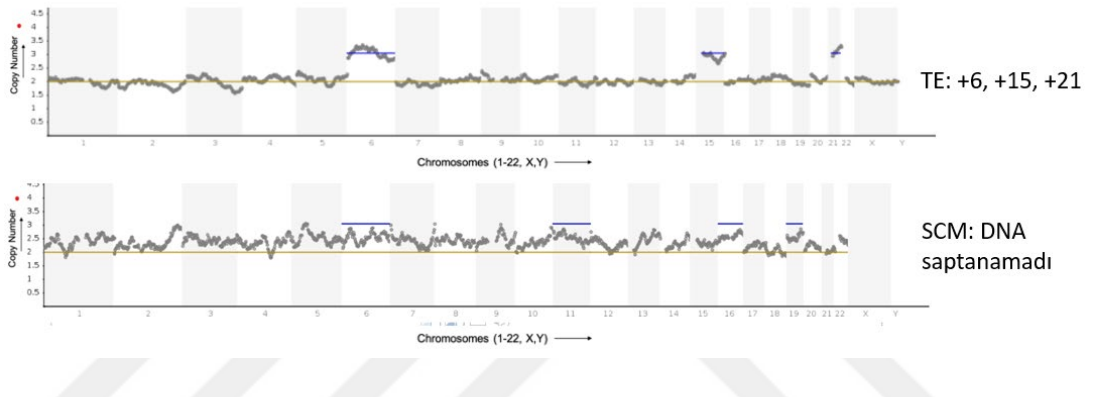
Embriyo No:12



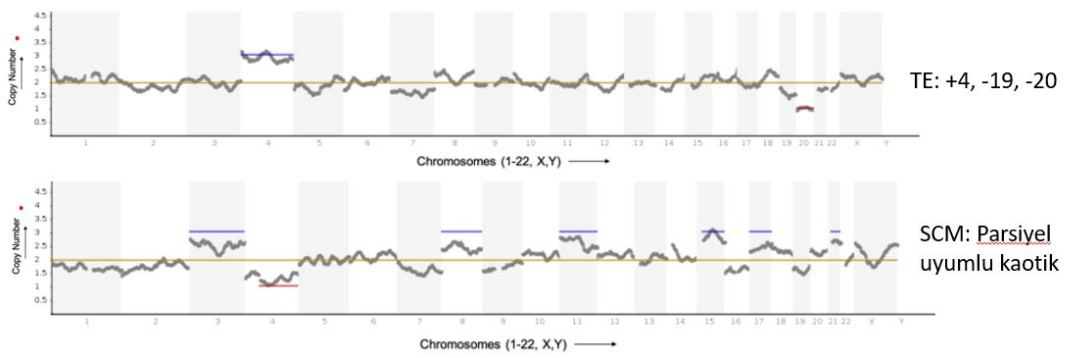
Embriyo No:13



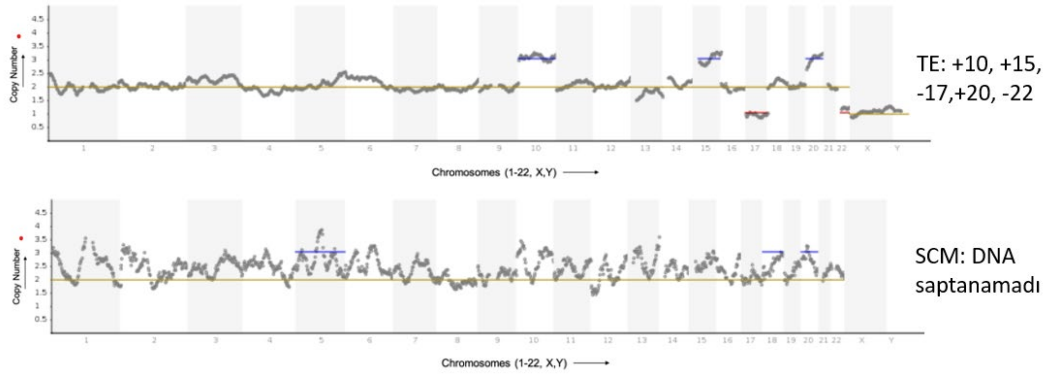
Embriyo No:14



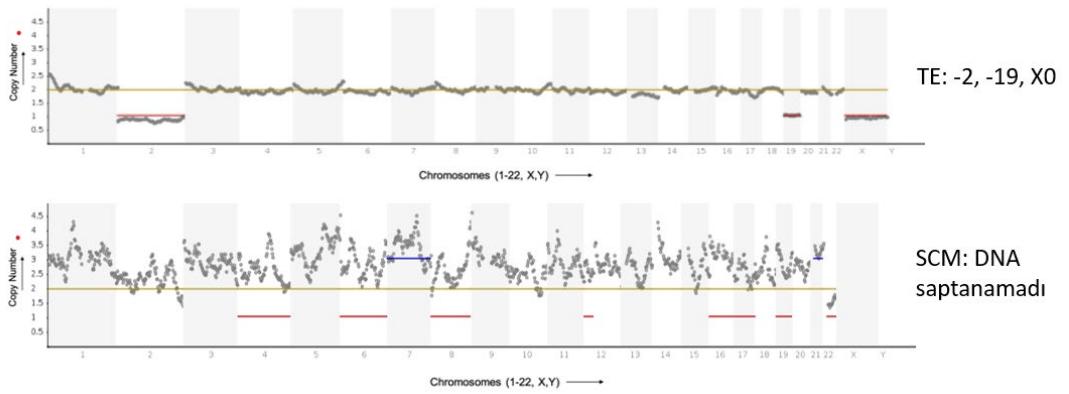
Embriyo No:15



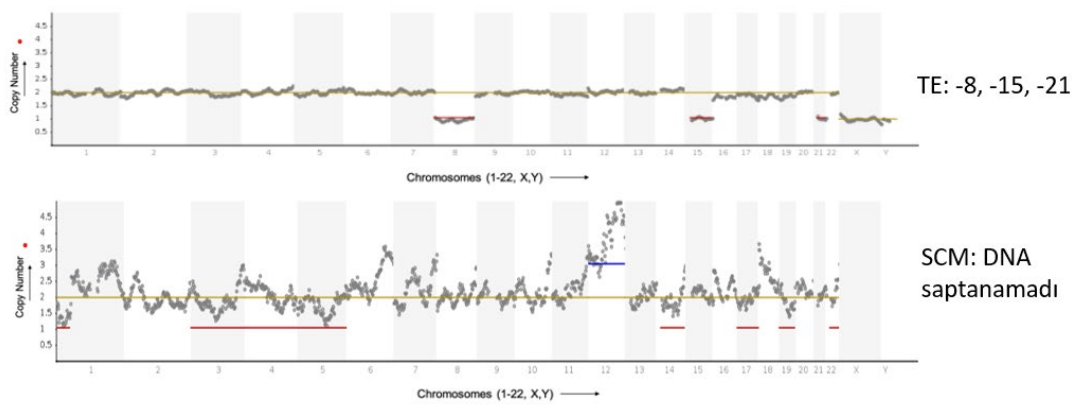
Embriyo No:16



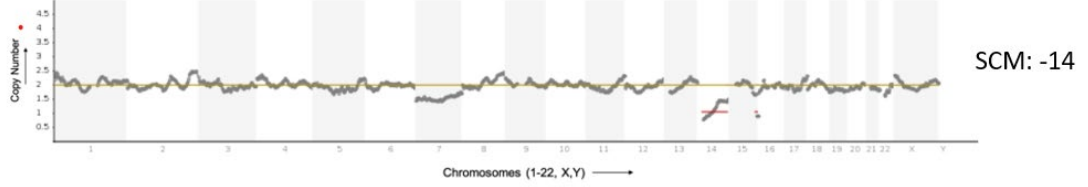
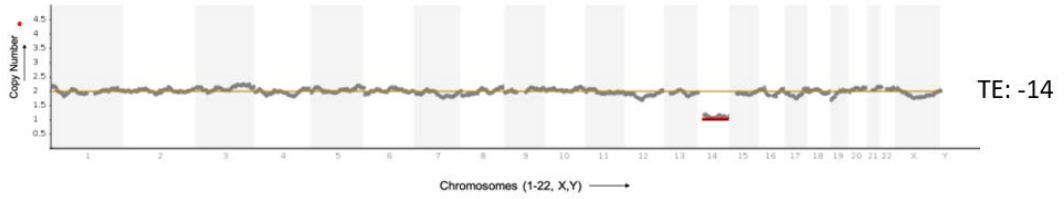
Embriyo No:17



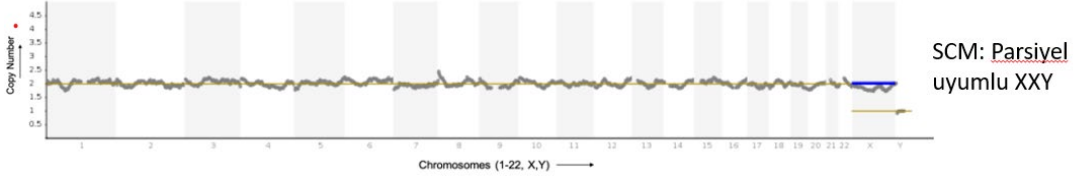
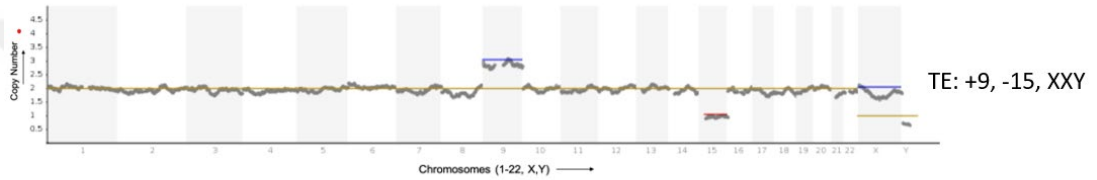
Embriyo No:18



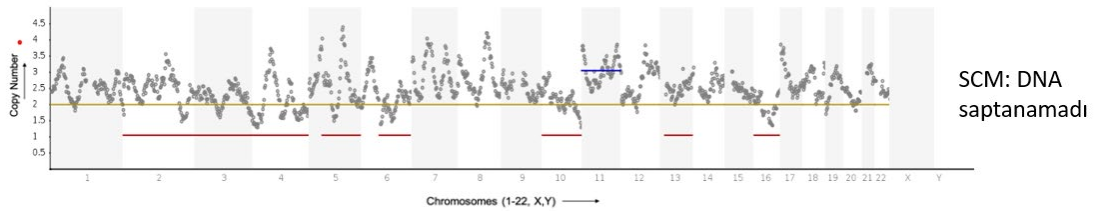
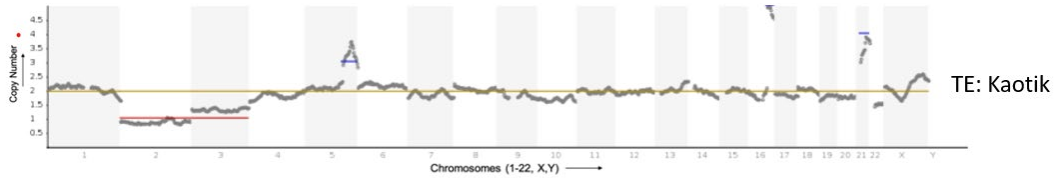
Embriyo No:19

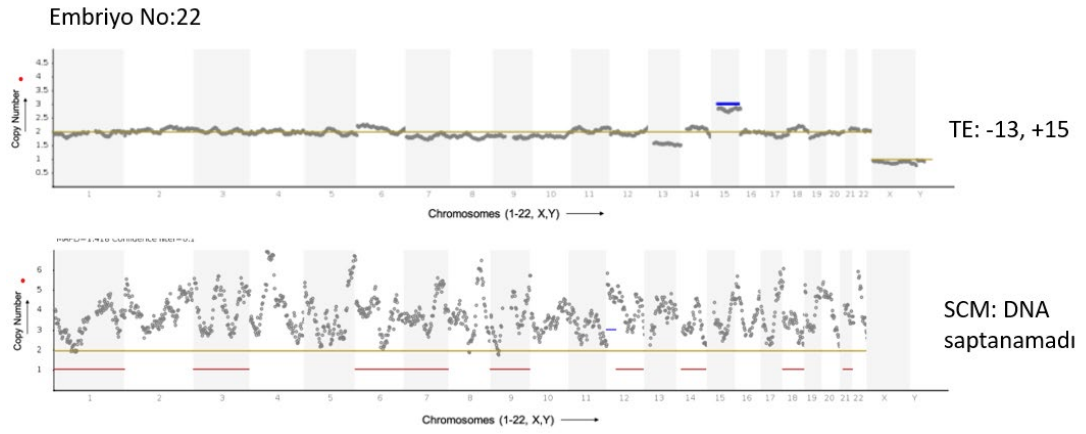


Embriyo No:20



Embriyo No:21





Şekil 4.1. TE biyopsi-SCM örneklerine ait NGS profilleri

İncelemeye alınan 22 SCM örneğinin 11'inde DNA amplifikasyonu başarılı oldu (%50). Amplifikasyonu başarılı olan örnekler arasında 4 örneğin TE Biyopsi sonucu ile uyumlu olduğu (%36,4), 4 örneğin ise parsiyel uyumluluk (%36,4) gösterdiği tespit edildi. Tam uyum gösteren örneklerin çalışmaya dahil edilen örnek sayısı üzerinden değerlendirilen uyum oranı %18 olarak hesaplandı.

SCM analiz sonuçlarının örneklem gününe (TE biyopsi gününe) göre dokümantasyonu Tablo 4.3.'te gösterilmiştir. Toplam 22 örneğin 14'ü embriyo gelişiminin 5. Gününde, 8'i ise 6. Gününde örneklendi. Sonuçlar örneklem gününe göre incelendiğinde 5.günde toplanan 14 SCM örneğinin 4'ünde sonuç alındı (%28,5) ve sonuç alınan 2 örnekte TE biyopsi sonucuna göre kısmi uyumluluk gözlemlendi. 6.günde toplanan 8 SCM örneğinin 7'sinde sonuç alındı (%87,5) ve bu örneklerin 4'ünde TE biyopsi sonucu ile tam uyum (%57,2), 2'sinde ise kısmi uyum gözlemlendi.

Tablo 4.3. Örnekleme gününe göre SCM Sonuçları

Örnekleme günü	SCM’de sonuç alınan	TE-SCM uyumlu	TE-SCM parsiyel uyumlu
5.Gün (n:14)	4 (%28,5)	-	2
6.Gün (n:8)	7 (%87,5)	4	2

SCM analiz sonuçlarının TE biyopsi öncesi skorlanan embriyo kalitesine göre dokümantasyonu Tablo 4.4.’te gösterilmiştir. Toplam 22 örneğin 9’unda TE biyopsisi öncesindeki embriyo kalitesi 5BB, 13’ünde 5BC olarak değerlendirildi. Embriyo kalitesine göre SCM analizinde sonuç alma başarısı ve TE biyopsi sonuçları ile uyumluluk durumu açısından belirgin bir farklılık gözlenmedi.

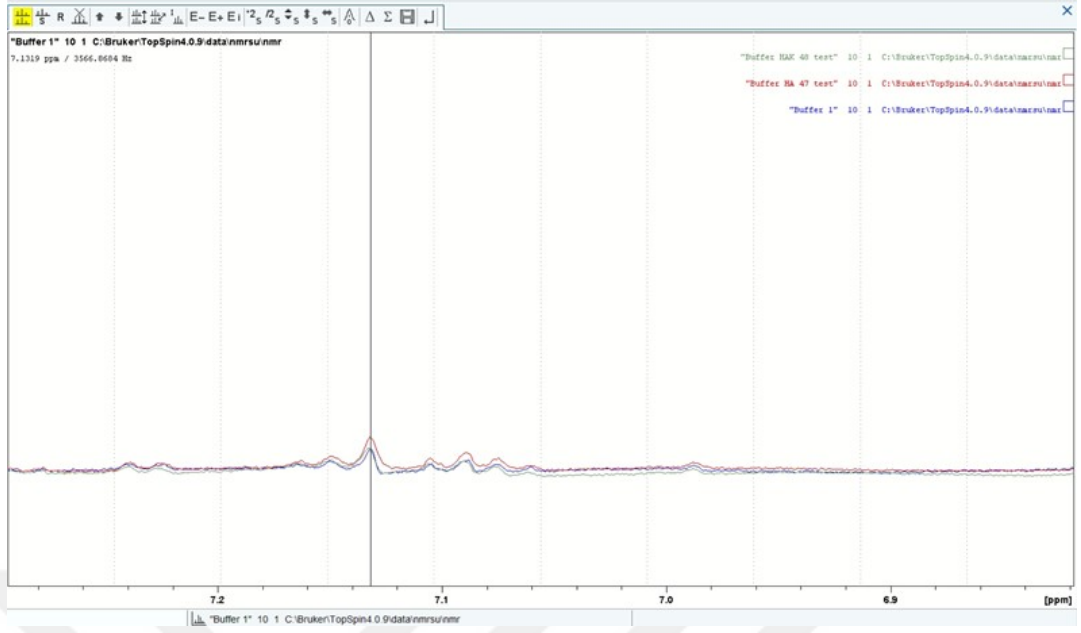
Tablo 4.4. Embriyo kalitesine göre SCM Sonuçları

Embriyo kalitesi	SCM’de sonuç alınan	TE-SCM uyumlu	TE-SCM parsiyel uyumlu
5BB (n:9)	5 (%55,5)	2	2
5BC (n:13)	6 (%46,2)	2	2

### 4.3 Metabolomik Analiz Sonuçları

#### 4.3.1 Preliminer çalışmalar

Preliminer çalışma kapsamında biyopsi sonucu bilinen embriyo kültürü yapılmış üç adet kültür sıvısını bir adet kontrol, bir adet öploide ve bir adet anöploide olacak şekilde örnekler, Koç Üniversitesi NMR ünitesine teslim edildi. NMR yöntemi kullanılarak spektrumlar, on altı saatte toplanarak detaylı bir şekilde incelendi. Örnekler arasında bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. SCM örneklerine ait NMR spektrum sonuçları

Preliminer çalışmamızın ikinci basamağında ise örnekler (bir adet kontrol, bir adet öploid ve bir adet anöploid) Ankara Synlab Merkezine teslim edildi. LC-MS/MS yöntemi kullanılarak detaylı analiz yapıldı. Öploid ve anöploid gruplar arasında bazı amino asitlerde farklılaşma trendi gözlemlediğimizden bu sonuçların sağlamlasını yapmak için tekrar aynı merkeze aynı grup örnekler analiz edilmek üzere gönderildi. Yapılan detaylı analizler sonucunda farklılaşma trendi tekrar yakalandığından Ankara Synlab Merkezi ve LC-MS/MS metoduyla örneklerin çalışılması ve projenin tamamlanması kararı verildi.

#### 4.3.2 LC-MS/MS sonuçları

Metabolomik çalışma kapsamında toplamda 35 hastaya ait TE biyopsisi yapılmış 49 adet öploid (n:17) ve anöploid (n:32) embriyo ve SCM örneği çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın bu ayağına dahil edilen hastalara ve siklulara ait demografik özellikler Tablo 4.5. 'te gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Çalışmaya dahil edilen hastalara ait özellikler

	<b>Normal</b>	<b>Anormal</b>	<b>p</b>
<b>n</b>	17	32	
<b>Yaş</b>	36,25±3,91	39,294±3,881	<0,006
<b>VKİ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,3±2,9	22,7±2,6	ns
<b>Yumurta Sayısı</b>	12,16±1,29	7,62±0,96	<0,003
<b>% 2PN</b>	82,22±0,038	77,32±0,031	ns
<b>%Blastokist Eldesi</b>	47,97	39,33	ns

Anöploid embriyoların kromozomal anomali dağılımı sırasıyla %16 kaotik, %28 kompleks anöploid, %25, monozomik ve %22 trizomikti. Bu embriyolarda gözlenen kromozomal anomali çeşitleri Tablo 4.6’de listelenmiştir.

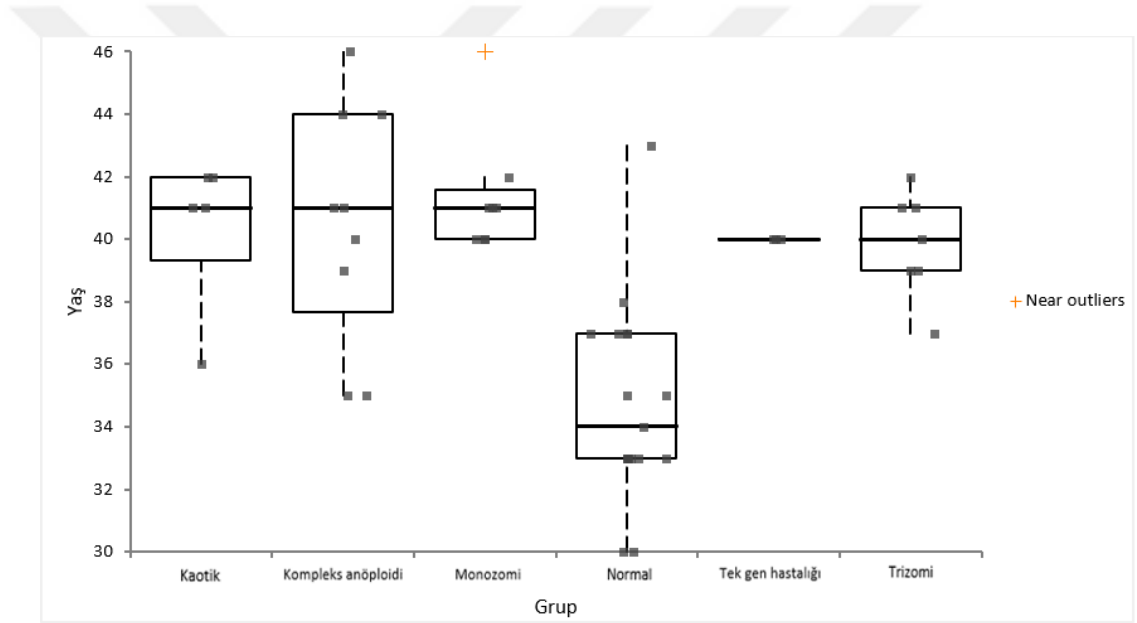
Tablo 4.6. Anöploid embriyoların kromozomal dağılımı

<b>Monozomi</b>	<b>Trizomi</b>	<b>Kompleks Anöploidi</b>
8-	3+	1-,8+,14+
13-	4+	16+,20-,22+
15-	6+	13-,21+
16-	7+	20+,22+
20-	13+	4-,8+
X0	19+	3+,10+
	22+	4q-,10+,12+
		10-,15+
		13-, XXX

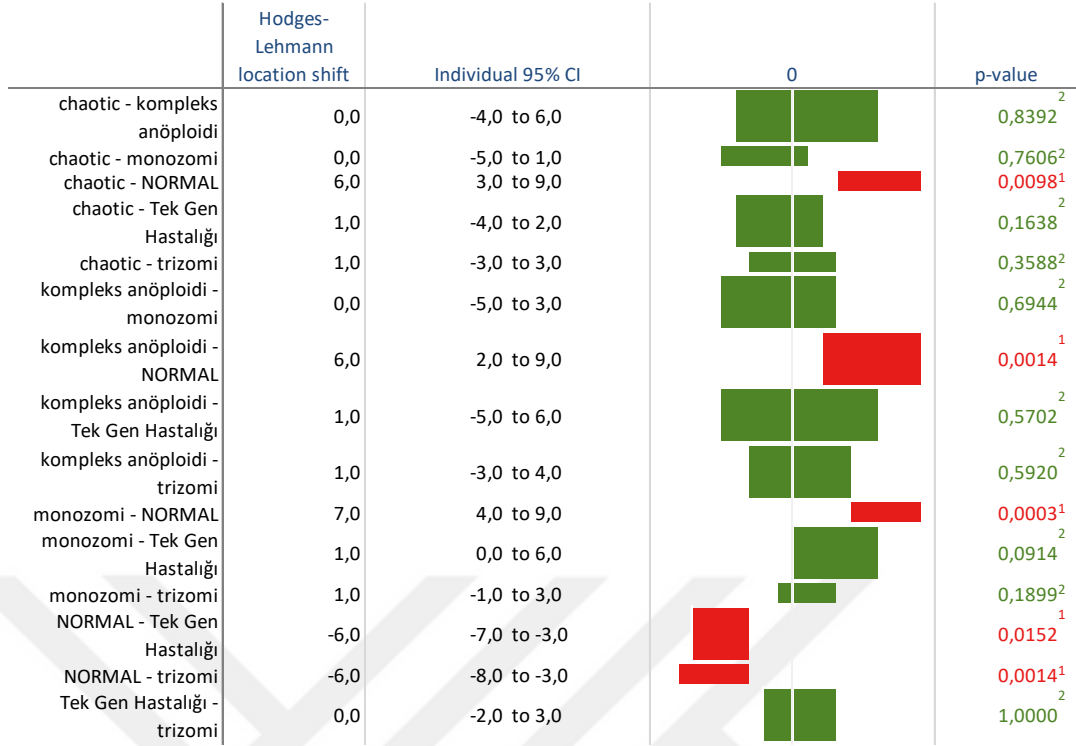
### 4.3.3 Anöplöidilerin hasta yaşına göre dağılımı

Çalışmada genetik sonucu anormal olan embriyoların anne yaşlarının normal embriyo anne yaşlarına göre tüm gruplarda (monozomik, kaotik, kompleks ve trizomi) istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.;  $p < 0.05$ ).

Buna ek olarak anöplöid embriyo grupları arasında yaş bakımından istatistiksel bir anlamlılığa rastlanmamıştır (Şekil 4.4.;  $p > 0.05$ ). Tek gen hastalığına sahip örneklerde sayı yetersiz olduğundan, istatistiki bir anlam elde edilememiştir.



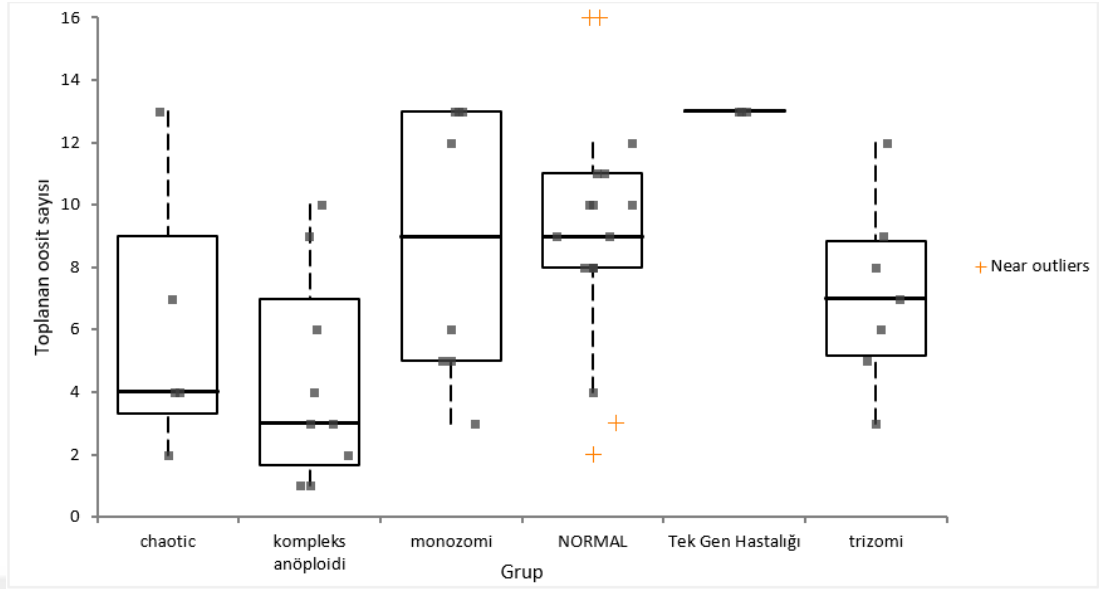
Şekil 4.3. Anöplöidilerin hasta yaşına göre dağılım grafiği



Şekil 4.4. Anöploidilerin hasta yaşına göre istatistiksel analizi

#### 4.3.4 Anöploidilerin toplanan oosit sayısına göre dağılımı

Yapılan çalışmada normal ve monozomik gruplarda elde edilen oosit sayısının kompleks anöploid grubunda elde edilen oosit sayısına göre istatistiki olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.;  $p < 0.05$ ). Bununla birlikte monozomik, trizomik ve kaotik gruplarda toplanan oosit miktarı normal grupta toplanan oosit miktarıyla karşılaştırıldığında, istatistiki olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 4.6.;  $p > 0.05$ ). Tek gen için örnek sayısı yetersiz olduğundan, istatistiki bir anlam elde edilememiştir.



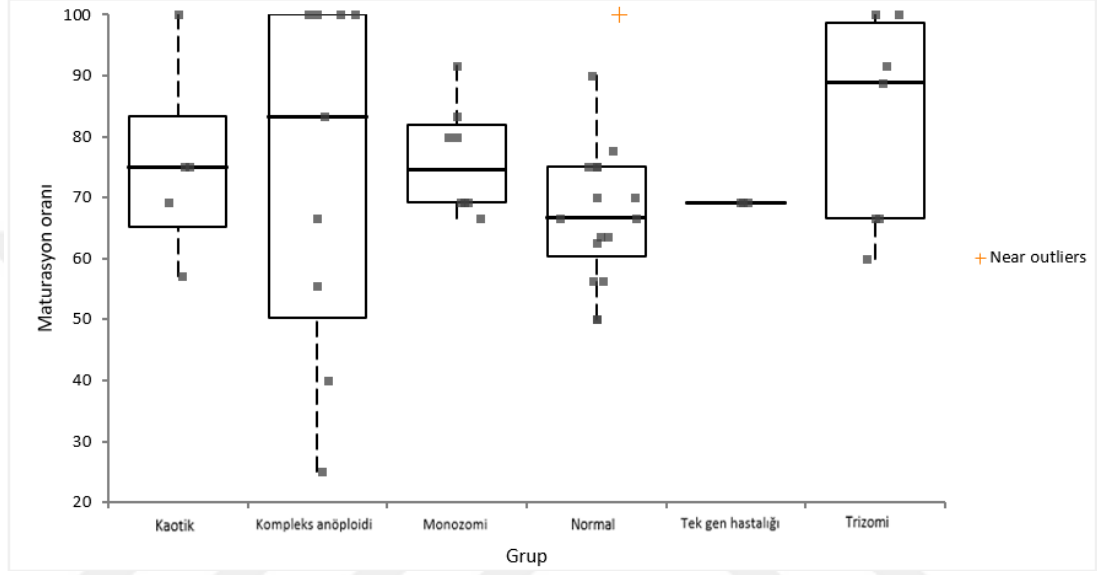
Şekil 4.5. Anöploidilerin toplanan oosit sayısına göre dağılım grafiği

Contrast	Mean difference	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	1,7	-2,5 to 5,8		0,4196 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-2,8	-7,0 to 1,5		0,1953 <sup>2</sup>
chaotic - NORMAL	-3,1	-6,9 to 0,6		0,1019 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-7,0	-12,4 to -1,6		0,0123 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	-1,1	-5,5 to 3,2		0,5973 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-4,4	-8,0 to -0,8		0,0172 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	-4,8	-7,8 to -1,7		0,0028 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-8,7	-13,6 to -3,7		0,0010 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-2,8	-6,5 to 0,9		0,1357 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	-0,4	-3,5 to 2,8		0,8162 <sup>2</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	-4,3	-9,3 to 0,8		0,0941 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	1,6	-2,2 to 5,4		0,4017 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-3,9	-8,5 to 0,7		0,0981 <sup>2</sup>
NORMAL - trizomi	2,0	-1,3 to 5,3		0,2370 <sup>2</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	5,9	0,8 to 11,0		0,0255 <sup>1</sup>

Şekil 4.6. Anöploidilerin toplanan oosit sayısına göre istatiktiksel analizi

### 4.3.5 Anöplidilerin oosit maturasyon yüzdesine göre dağılımı

Oosit maturasyon yüzdesi incelendiğinde tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8.;  $p>0,05$ ). Oosit maturasyon oranları tüm gruplarda normal standartlar içerisindeydir.



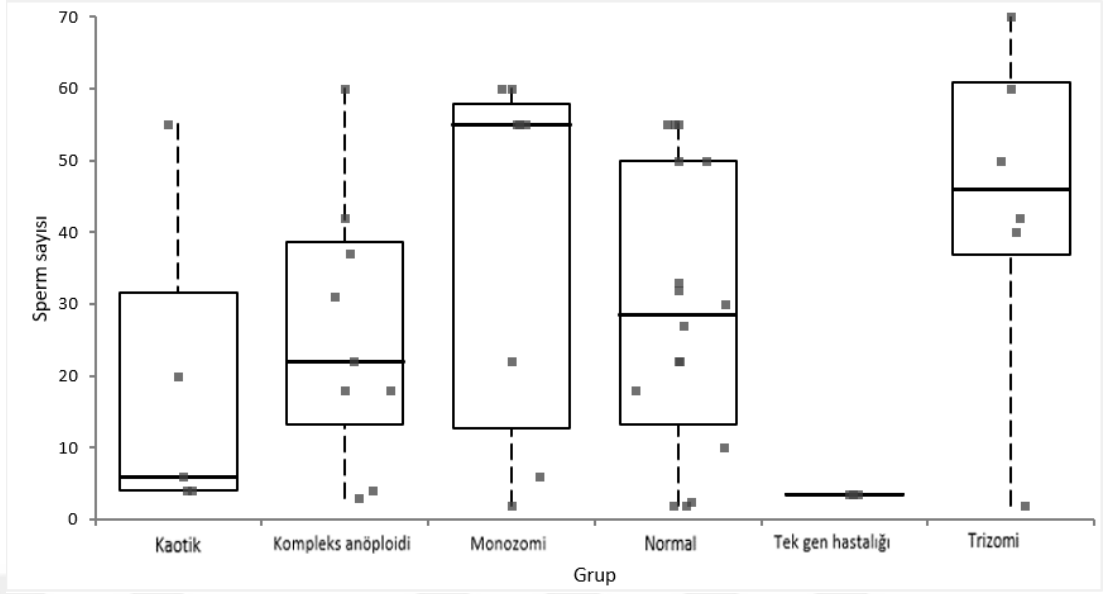
Şekil 4.7. Anöplidilerin oosit maturasyon yüzdesine göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	0,000000000	-30,769230769 to 35,000000000		0,9456 <sup>1</sup>
chaotic - monozomi	-2,500000000	-16,666666667 to 16,666666667		0,8233 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	5,594405594	-6,493506494 to 25,000000000		0,3436 <sup>1</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	5,769230769	-12,087912088 to 30,769230769		0,3373 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	-9,523809524	-30,769230769 to 11,111111111		0,6816 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	5,833333333	-29,230769231 to 30,769230769		0,7705 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	10,000000000	-16,250000000 to 30,000000000		0,4320 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	14,102564103	-44,230769231 to 30,769230769		0,7761 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	0,000000000	-36,111111111 to 23,333333333		0,7852 <sup>1</sup>
monozomi - NORMAL	6,730769231	-0,769230769 to 16,666666667		0,1017 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	5,384615385	-2,564102564 to 22,435897436		0,3152 <sup>1</sup>
monozomi - trizomi	-8,333333333	-22,435897436 to 13,333333333		0,6825 <sup>1</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-2,564102564	-12,980769231 to 8,547008547		0,8732 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-13,888888889	-30,000000000 to 3,333333333		0,1179 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	-19,658119658	-30,769230769 to 9,230769231		0,7276 <sup>1</sup>

Şekil 4.8. Anöploidilerin oosit maturasyon yüzdesine göre istatistiksel analizi

#### 4.3.6. Anöploidilerin sperm sayısına göre dağılımı

Yapılan çalışmada gruplar (monozomik, kaotik, kompleks ve trizomi) arası sperm sayısı istatistiki olarak anlamlı bir fark göstermemektedir (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.;  $p>0,05$ ). Sadece tek gen ve kaotik grupta anlamlılık gözlemleniyse de, tek gen grubundaki örneklem sayısı az olduğundan, istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir. Bu sonuçlar bize sperm sayısının anomali tayini için ayırt edici bir seçenek olarak kullanılamayacağını düşündürmektedir.



Şekil 4.9. Anöploidilerin sperm sayısına göre dağılım grafiği

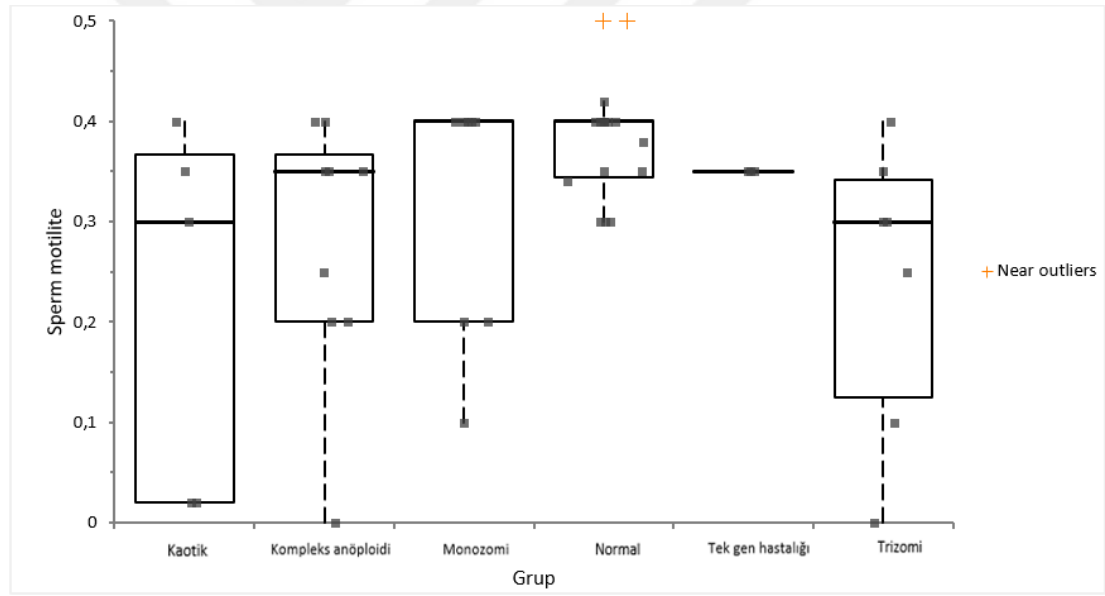
Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	-12,00	-33,00 to 17,00		0,4609 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-26,50	-51,00 to 2,00		0,1360 <sup>2</sup>
chaotic - NORMAL	-13,50	-35,00 to 5,00		0,3401 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	2,50	0,50 to 51,50		0,0211 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	-36,00	-56,00 to 5,00		0,2002 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-18,00	-38,00 to 12,00		0,2655 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	-3,00	-19,00 to 15,00		0,8204 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	18,50	-0,50 to 56,50		0,0502 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-22,00	-42,00 to 2,00		0,1245 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	5,00	-8,00 to 33,00		0,1836 <sup>2</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	51,50	-1,50 to 56,50		0,0607 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	0,00	-38,00 to 18,00		0,9480 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	25,00	-1,00 to 51,50		0,0919 <sup>2</sup>
NORMAL - trizomi	-17,50	-38,00 to 8,00		0,1598 <sup>2</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	-42,50	-66,50 to 1,50		0,1151 <sup>2</sup>

Şekil 4.10. Anöploidilerin sperm sayısına göre istatistiksel analizi

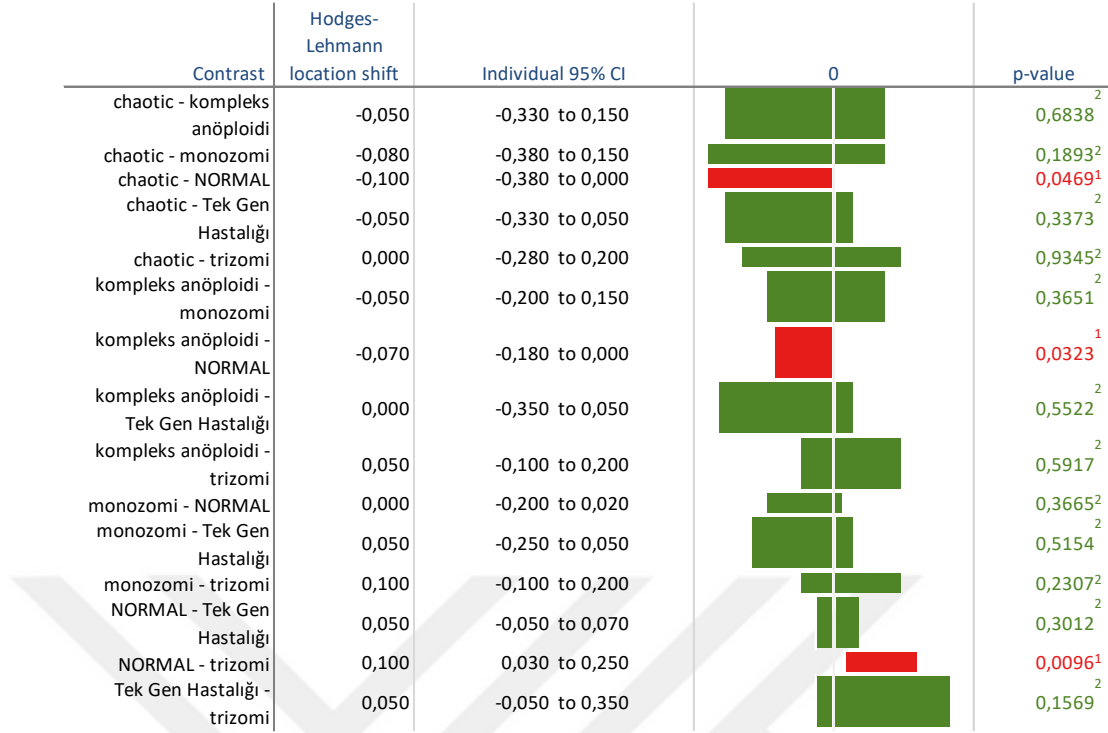
#### 4.3.7. Anöploidilerin sperm hareketliliğine göre dağılımı

Yapılan çalışmada sperm hareketliliği normal grupta kaotik, kompleks anöploidi ve trizomi gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olarak gözlenmiş olsa da normal ve monozomik gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.;  $p>0.05$ ).

Yüksek sperm hareketliliğinin normal embriyo üretimiyle doğru orantılı olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte bu sonuçlar 3 ya da daha fazla kromozomal anomalinin olduğu embriyolarda, sperm hareketliliğinin belirleyici olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.11. Anöploidilerin sperm hareketliliğine göre dağılım grafiği

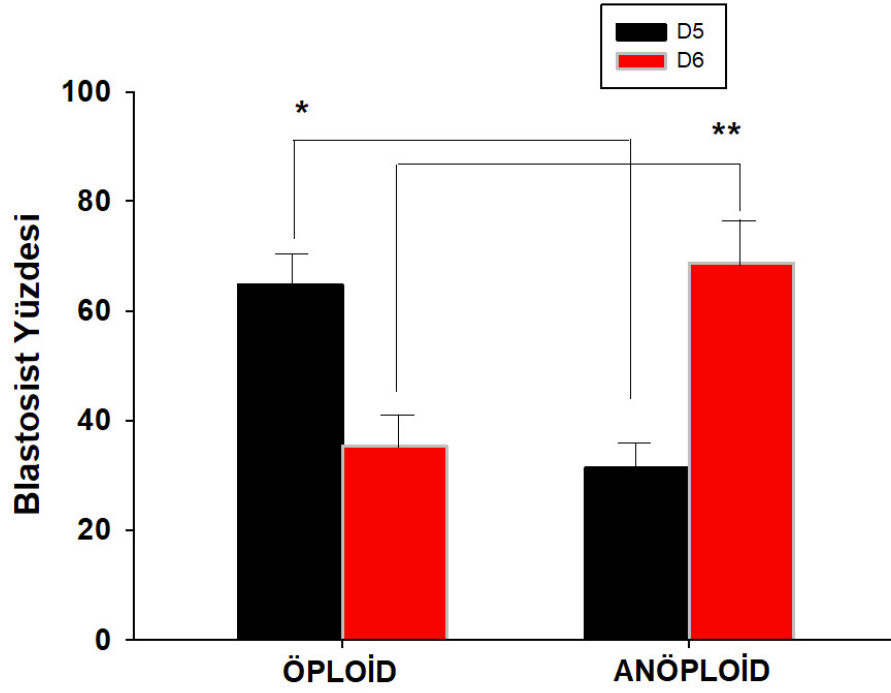


Şekil 4.12. Anöploidilerin sperm hareketliliğine göre istatistiksel analizi

#### 4.3.8 PGT-A sonucu normal embriyoların gebelik sonuçları

Trofoektoderm biyopsisi yapılarak NGS ile tüm kromozom analizi yapılan ve transferi gerçekleştirilen on yedi adet embriyonun on altı tanesi transfer edilmiştir. Bunlardan bir hasta spontan gebe kaldığından embriyo transferi istememiştir. Bu hastalardan %69'unda (11/16) klinik gebelik görülmüş %31'inde (5/16) ise gebelik elde edilememiştir. Gebe kalan hastaların %45'inde (5/11) klinik gebelik sonrası kayıp gözlenmiş ve %55'inde (6/11)'de canlı doğum gözlenmiştir.

Buna ek olarak beşinci günde blastokist aşamasına gelen embriyoların istatistiksel olarak anlamlı şekilde öploid olduğu gözlemlenmiştir (p=0,0258) (Şekil 4.12.).



Şekil 4.13. Öploïdi durumunun blastokist gelişim gününe göre dağılım grafiği

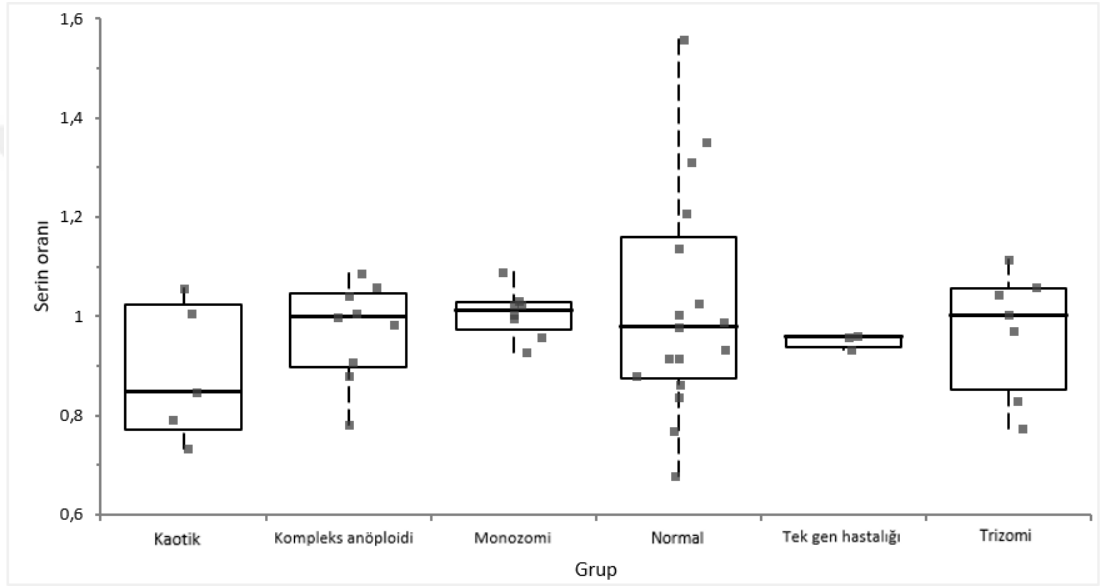
\* ve \*\*  $p < 0,05$

#### 4.3.9 Embriyo öploïdi durumu ve aminoasit tüketimi ilişkisinin LC-MS/MS yöntemiyle analizi

Embriyolara ait öploïdi/anöploïdi durumlarının biyopsi öncesi toplanan SCM örneklerindeki tüketilen aminoasit miktarları ile olası korelasyonu LC-MS/MS yöntemi ile her bir aminoasit için ayrı ayrı incelenmiştir ve aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur. Amino asit profillemesi yapılması için kullanılmış kültür medyumundan elde edilen değerler ile, kullanılmamış kültür medyumundan elde edilen değerler arasındaki oran incelenmiş ve her bir aminoasit için grafiksel olarak sunulmuştur.

#### 4.3.9.1 Serin

İncelenen embriyo kültür sıvılarında, serin amino asit tüketiminde ve seviyesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (sırasıyla normal, monozomik, trizomik, kompleks anöploid ve kaotik;  $p>0,05$ ). Yapılan analiz sonucunda serin amino asidinin anomali tespiti için kullanılamayacağı saptanmıştır (Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.).



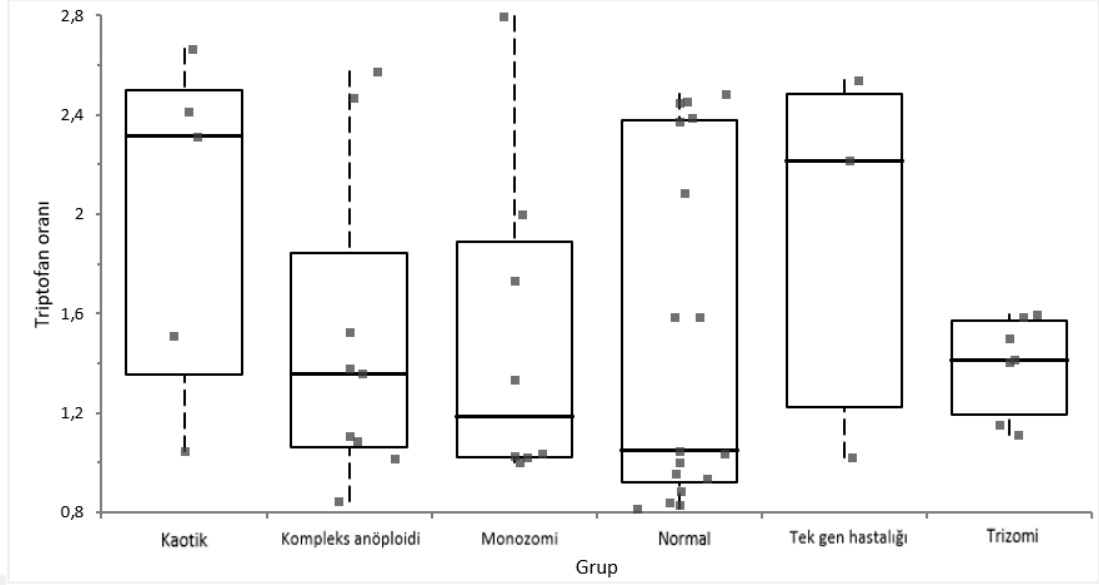
Şekil 4.14. Serin amino asidinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	-0,081068489	-0,249728219 to 0,066625252		0,2571 <sup>1</sup>
chaotic - monozomi	-0,151343376	-0,261375990 to 0,034166796		0,1877 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	-0,124242895	-0,306258736 to 0,079515453		0,2902 <sup>1</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,111507998	-0,226587979 to 0,124087591		0,6547 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	-0,058238857	-0,268054046 to 0,072682093		0,3718 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,019645908	-0,115545892 to 0,055288088		0,5637 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,003571983	-0,166796086 to 0,113061034		0,9356 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	0,045814567	-0,152352850 to 0,126261842		0,4054 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,002329554	-0,122379251 to 0,133095201		0,8738 <sup>1</sup>
monozomi - NORMAL	0,038825905	-0,134492934 to 0,132629290		0,4489 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	0,062897966	-0,004969716 to 0,128280789		0,1025 <sup>1</sup>
monozomi - trizomi	0,009395869	-0,075166951 to 0,173474142		1,0000 <sup>1</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	0,019412952	-0,122534555 to 0,378630222		0,8323 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	0,008386395	-0,132163379 to 0,205000777		0,9747 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	-0,044416835	-0,156546048 to 0,184190092		0,3051 <sup>1</sup>

Şekil 4.15. Serin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.2 Triptofan

Normal grup diğer gruplarla karşılaştırıldığında (monozomik, trizomik, kompleks anöploid ve kaotik) triptofan amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.;  $p > 0,05$ ). Yapılan analiz sonucunda triptofan amino asidinin anomali tespiti için kullanılamayacağı saptanmıştır.



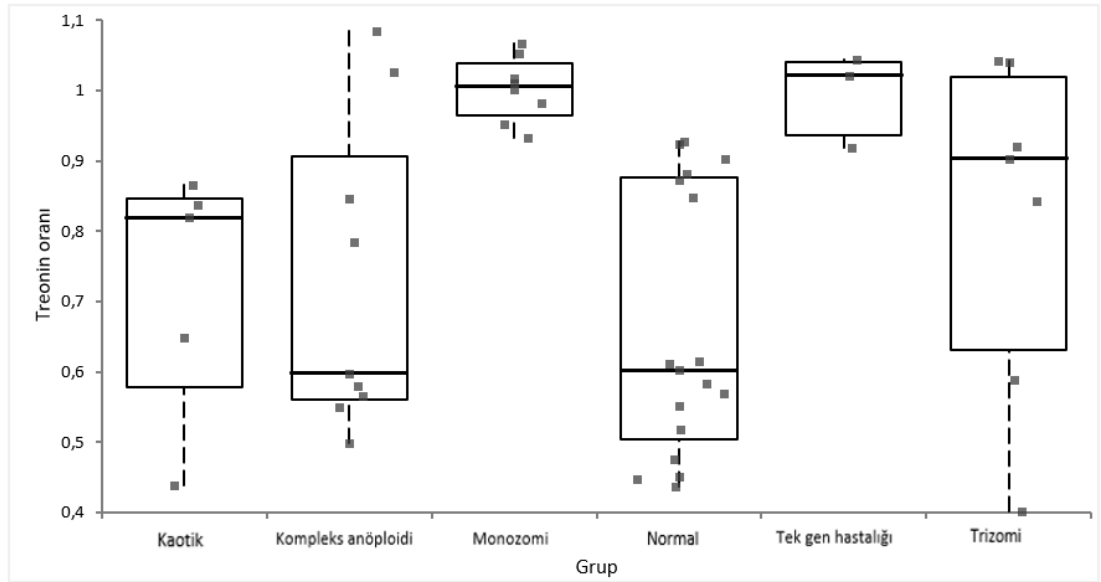
Şekil 4.16. Triptofan amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	0,494819726	-0,261085785 to 1,326978864		0,2571 <sup>1</sup>
chaotic - monozomi	0,498135102	-0,384583506 to 1,387484459		0,1432 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	0,461665976	-0,075424782 to 1,454620804		0,1704 <sup>1</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	0,096974720	-1,491918773 to 1,642768338		0,6547 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	0,817239950	-0,106920845 to 1,251554082		0,1675 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	0,032324907	-0,628263572 to 0,503108164		0,8474 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,079569001	-0,740157480 to 0,441773726		0,5354 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-0,687940323	-1,452963116 to 0,504765852		0,5175 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,067136345	-0,416079569 to 0,881060920		0,3683 <sup>1</sup>
monozomi - NORMAL	0,072938251	-0,639867385 to 0,423539163		0,6412 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	-0,510567758	-1,513468711 to 0,710319105		0,4142 <sup>1</sup>
monozomi - trizomi	-0,099461252	-0,465810195 to 0,585163697		0,5628 <sup>1</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,183174472	-1,535847493 to 0,562784915		0,2664 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-0,109407377	-0,543721508 to 0,871943639		0,6566 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	0,801491919	-0,562784915 to 1,384997928		0,4250 <sup>1</sup>

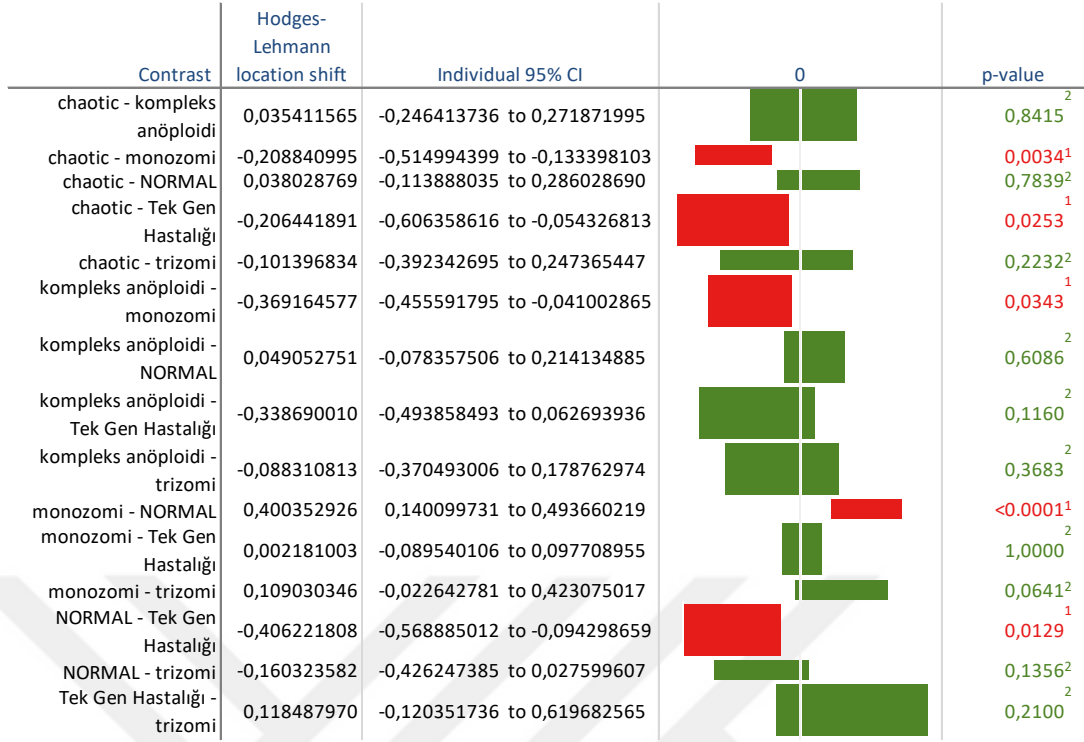
Şekil 4.17. Triptofan amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

### 4.3.9.3 Treonin

Çalışmada SCM örneklerindeki treonin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.;  $p < 0,0001$ ). Bu fark anöploid embriyolar kendi içlerinde incelendiğinde de (kaotik, kompleks anöploid ve trizomik embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ( $p < 0,05$ ). Ayrıca normal, kaotik, kompleks anöploid ve trizomik embriyoların treonin tüketim seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ( $p > 0,05$ ). Tek gen hastalığı grubunda da normal embriyolara göre treonin amino asit seviyesinde fark gözlemlense de ( $p < 0,05$ ) bu gruptaki örnek sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



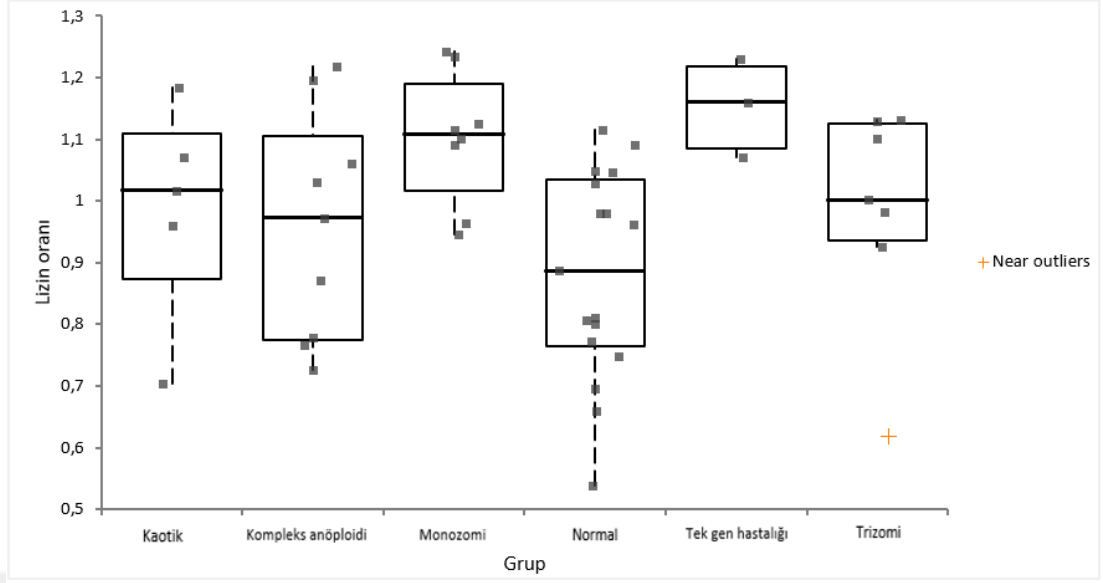
Şekil 4.18. Treonin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.19. Treonin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.4 Lizin

Çalışmada SCM örneklerindeki lizin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.;  $p < 0,0003$ ). Ancak kaotik, kompleks anöploid ve trizomik embriyolarda normal embriyolara göre lizin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Ayrıca tek gen hastalığında da normal embriyolara göre lizin amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



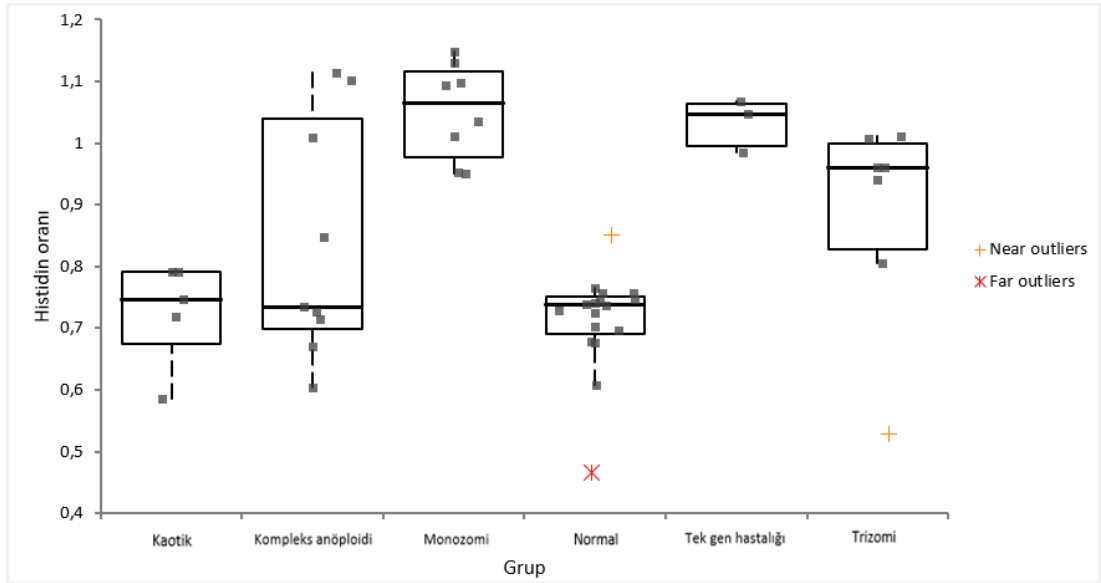
Şekil 4.20. Lizin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	0,010956573	-0,201845597 to 0,290402362		0,9468 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-0,092067122	-0,282743398 to 0,070473101		0,1877 <sup>2</sup>
chaotic - NORMAL	0,109033854	-0,074355769 to 0,300082440		0,2902 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,144031061	-0,526181422 to 0,112756961		0,1797 <sup>2</sup>
chaotic - trizomi	0,014945616	-0,221418504 to 0,201686036		0,9353 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,160412733	-0,336675265 to 0,064994814		0,0833 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,069356168	-0,077334255 to 0,228332846		0,4035 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-0,200249980	-0,450974656 to 0,057814536		0,0790 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,054836050	-0,255937026 to 0,160412733		0,7110 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,205169800	0,077706566 to 0,352684626		0,0030 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	-0,051963939	-0,214504162 to 0,081589235		0,6831 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	0,106879770	-0,031008164 to 0,252639417		0,2976 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,264234237	-0,481876446 to -0,069675292		0,0129 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-0,114565327	-0,293646784 to 0,048028083		0,1197 <sup>2</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	0,129936441	-0,058825094 to 0,541605723		0,0874 <sup>2</sup>

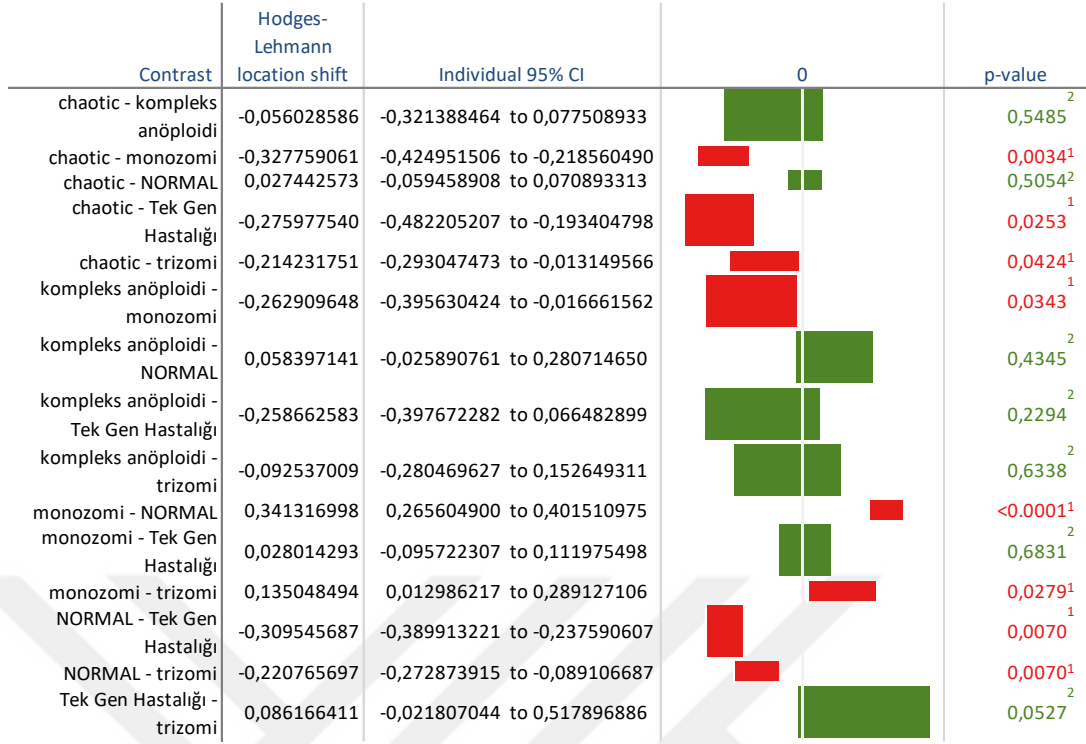
Şekil 4.21. Lizin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.5 Histidin

Çalışmada SCM örneklerindeki histidin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.;  $p < 0,0001$ ). Bununla birlikte hem kaotik hem de kompleks anöploid embriyolarda normal embriyolara göre histidin amino asit tüketiminde ve seviyesinin de anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bunlara ek olarak kompleks anöploid ve kaotik embriyolarda histidin tüketimi normal embriyolara göre anlamlı fark göstermese de ( $p > 0,05$ ) monozomik embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre histidin amino asit seviyesinde fark gözüksede tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



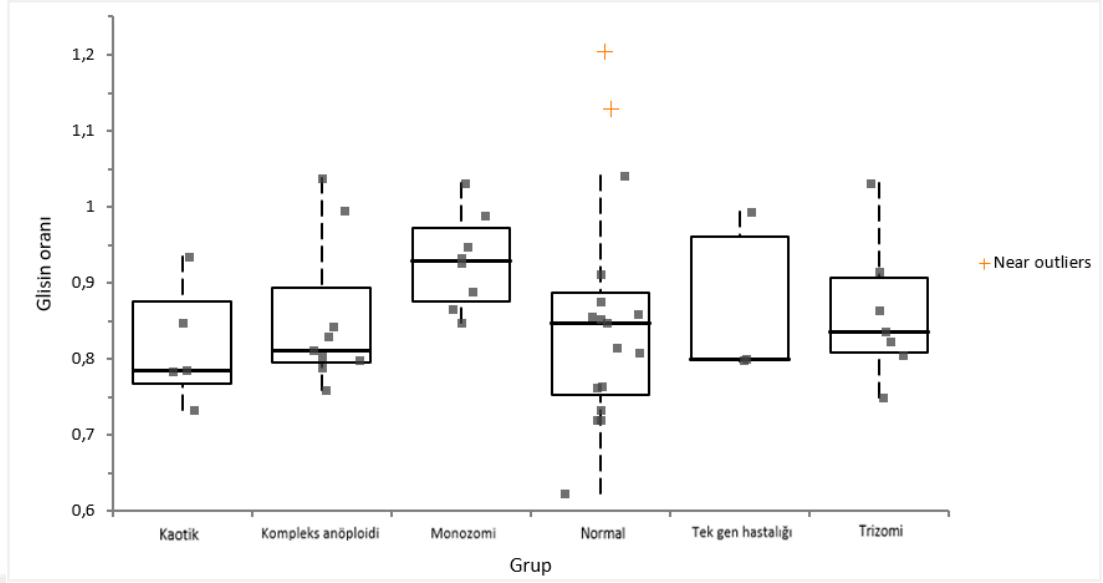
Şekil 4.22. Histidin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.23. Histidin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.6 Glisin

Çalışmada SCM örneklerindeki glisin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.;  $p < 0,05$ ). Bununla birlikte kaotik, kompleks anöploid ve trizomik embriyolarda normal embriyolara göre glisin amino asit tüketiminde anlamlı bir fark görülme de ( $p > 0,05$ ) Bu embriyolardaki glisin miktarının monozomik embriyolara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ).



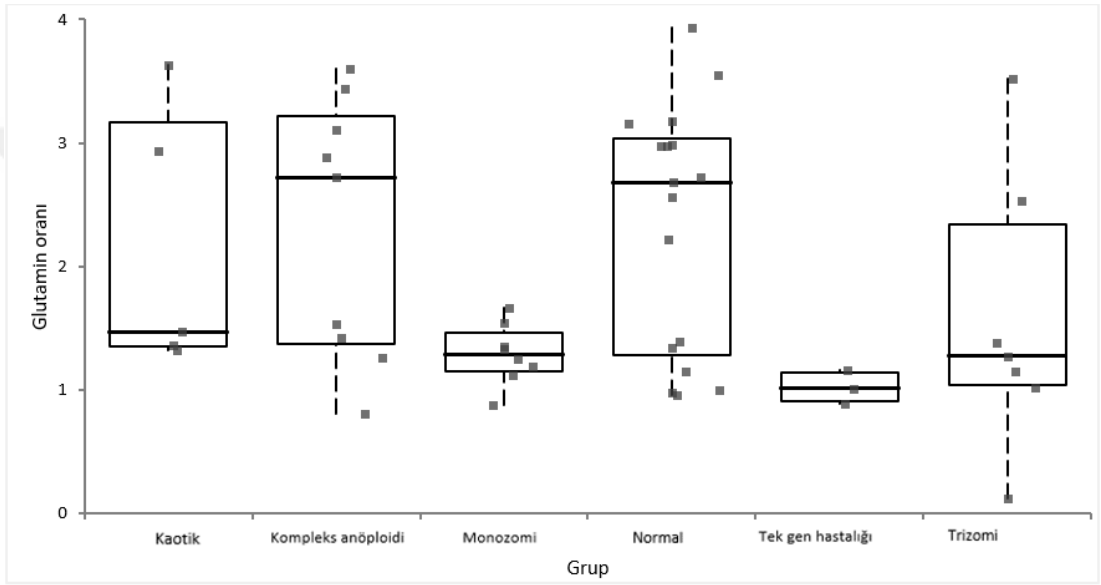
Şekil 4.24. Glisin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	-0,026027722	-0,147897109 to 0,088250246		0,3861 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-0,109601112	-0,204154946 to -0,014233911		0,0281 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	-0,023994306	-0,126885146 to 0,082692243		0,6665 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,015318399	-0,260548344 to 0,135967736		0,2967 <sup>2</sup>
chaotic - trizomi	-0,038634900	-0,131087539 to 0,069813942		0,3718 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,093604907	-0,159962043 to -0,005693564		0,0433 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	-0,005286881	-0,069542820 to 0,091639272		0,8504 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	0,001626733	-0,195072356 to 0,197241333		0,7815 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,019791914	-0,102890839 to 0,080658827		0,5604 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,098010642	0,009489274 to 0,175144881		0,0360 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	0,078354289	-0,104653133 to 0,191141085		0,3074 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	0,078760972	0,000406683 to 0,153319551		0,0491 <sup>1</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,033348019	-0,184634155 to 0,209984072		0,9578 <sup>2</sup>
NORMAL - trizomi	-0,015725082	-0,115769140 to 0,076049751		0,6797 <sup>2</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	-0,023316501	-0,230996035 to 0,187616498		0,5688 <sup>2</sup>

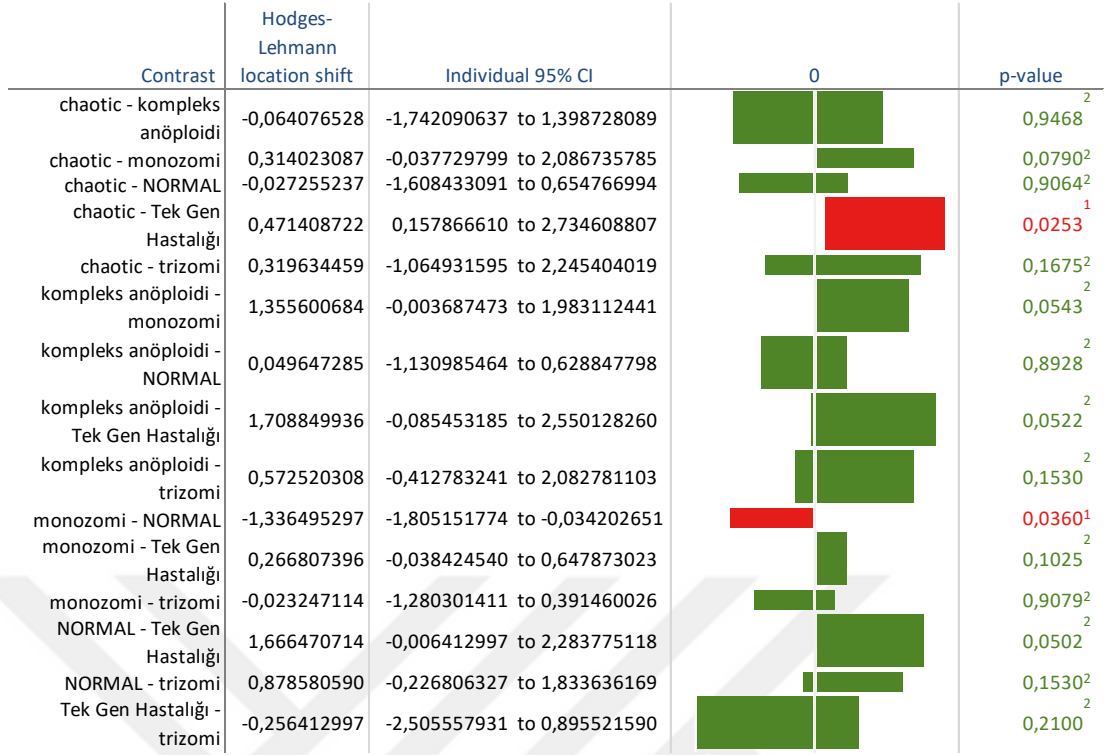
Şekil 4.25. Glisin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.7 Glutamin

Çalışmada SCM örneklerindeki glutamin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.25. ve Şekil 4.26.;  $p < 0,05$ ). Bununla birlikte kaotik, kompleks anöloid ve trizomik embriyolarda normal ve monozomik embriyolara göre glutamin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ).



Şekil 4.26. Glutamin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

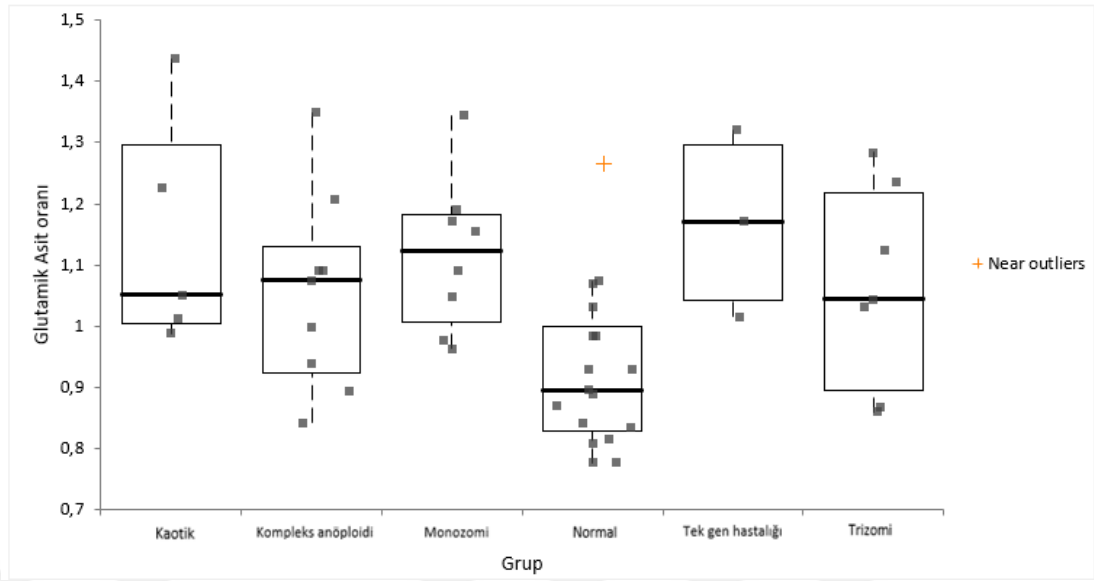


Şekil 4.27. Glutamin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.8 Glutamik asit

Çalışmada SCM örneklerindeki glutamik asit tüketimi tüm gruplarda normal embriyolara göre istatiktiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Şekil 4.27. ve Şekil 4.28.;  $p < 0,05$ ).

Ayrıca tek gen hastalığında da normal embriyolara göre glutamik asit seviyesinde fark gözüksede, bu grupta embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



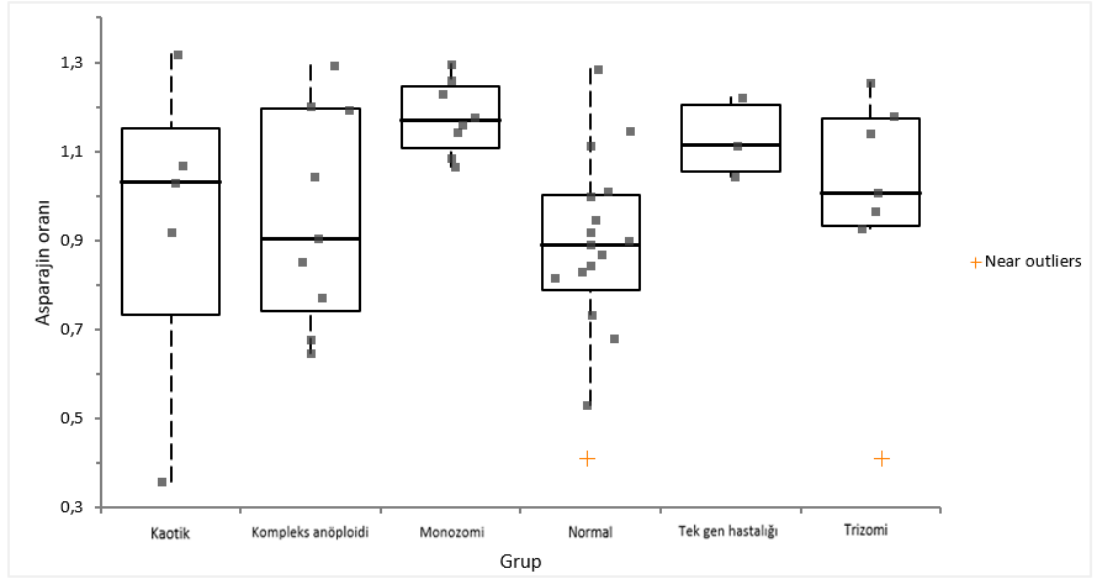
Şekil 4.28. Glutamik asit amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	0,087601078	-0,102650494 to 0,345687332		0,4634 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	0,017632525	-0,167789757 to 0,263701707		0,7697 <sup>2</sup>
chaotic - NORMAL	0,180817610	0,059523810 to 0,405884996		0,0168 <sup>1</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,027178796	-0,332659479 to 0,421159030		0,6547 <sup>2</sup>
chaotic - trizomi	0,103548967	-0,185085355 to 0,359838275		0,6847 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,081199461	-0,234052111 to 0,111185984		0,3603 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,116127583	0,009209344 to 0,256289308		0,0253 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-0,112982929	-0,382973944 to 0,178346810		0,3092 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,025606469	-0,193396226 to 0,207322552		0,8738 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,191823899	0,086702606 to 0,313342318		0,0043 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	-0,044811321	-0,273360288 to 0,173405211		0,6831 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	0,059074573	-0,112084456 to 0,223495058		0,4875 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,241913747	-0,450584007 to -0,032120395		0,0299 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-0,143980234	-0,289308176 to 0,010557053		0,0609 <sup>2</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	0,126460018	-0,220799641 to 0,453504043		0,4250 <sup>2</sup>

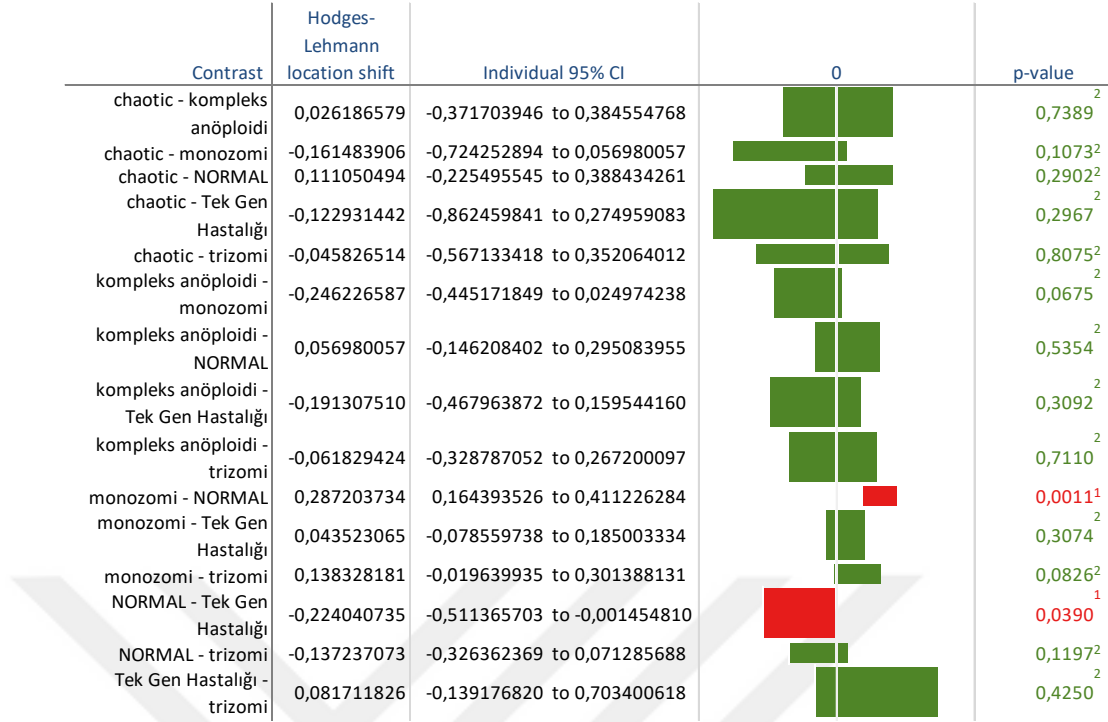
Şekil 4.29. Glutamik asit amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.10 Asparajin

Çalışmada asparajin amino asit seviyesi incelendiğinde monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olarak bulunmuştur (Şekil 4.29. ve Şekil 4.30.;  $p < 0,05$ ). Bununla birlikte kaotik, kompleks anöploid ve trizomik embriyolarda normal embriyolara göre asparajin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Ayrıca tek gen hastalığında da normal embriyolara göre asparajin amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



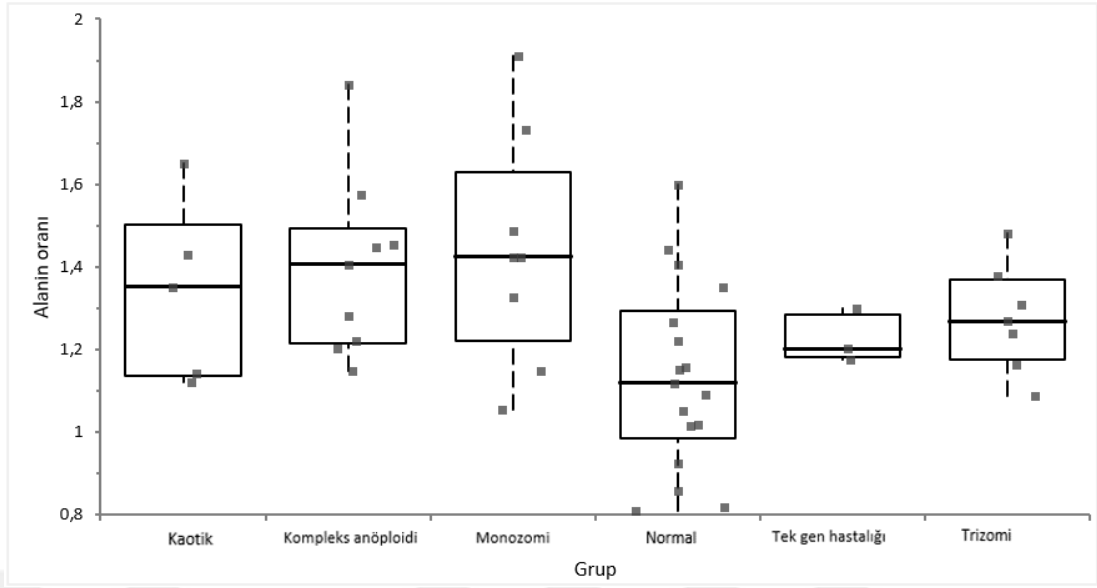
Şekil 4.30. Asparajin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.31. Asparajın amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.11 Alanin

Çalışmada alanin amino asit miktarları monozomik ve kompleks embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur (Şekil 4.31. ve Şekil 4.32.;  $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem kaotik hem de trizomik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre alanin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ).



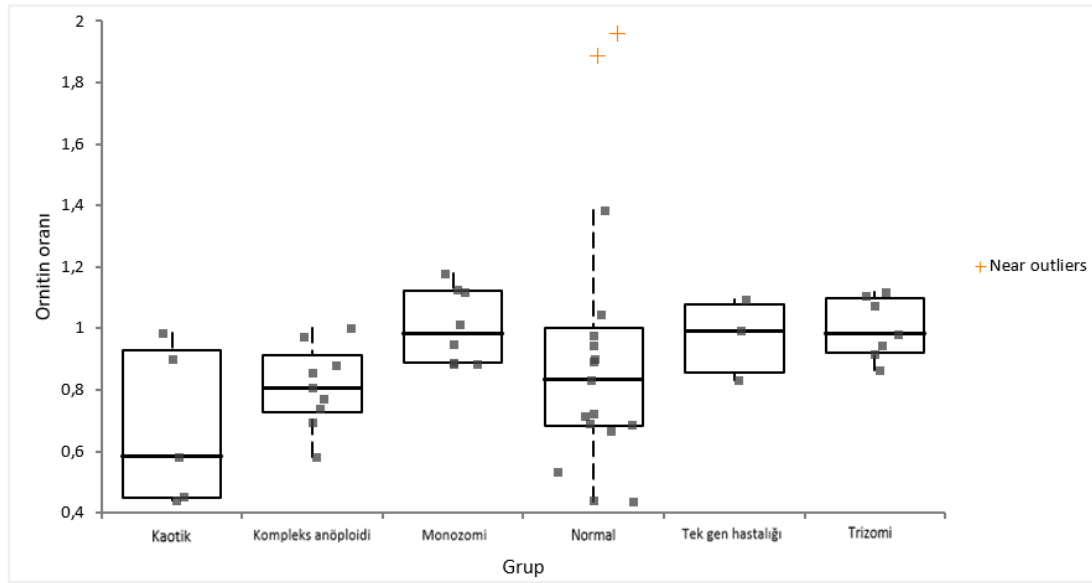
Şekil 4.32. Alanin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	-0,058249800	-0,326806774 to 0,208433522		0,4634 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-0,072552020	-0,379227430 to 0,226878598		0,5582 <sup>2</sup>
chaotic - NORMAL	0,208516795	-0,031061008 to 0,493811739		0,0921 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	0,130364634	-0,178913073 to 0,475408300		0,6547 <sup>2</sup>
chaotic - trizomi	0,050338819	-0,164590034 to 0,341462907		0,6847 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,026647514	-0,283754385 to 0,228210973		0,8474 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,263852023	0,060831278 to 0,433396829		0,0089 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	0,147893701	-0,078068888 to 0,542235268		0,1655 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	0,097180152	-0,086812603 to 0,317022140		0,3146 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,305051578	0,057167244 to 0,560139067		0,0169 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	0,205435676	-0,147435697 to 0,611310620		0,2207 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	0,155783864	-0,091392645 to 0,422904371		0,2030 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,110462272	-0,365395705 to 0,202895835		0,3146 <sup>2</sup>
NORMAL - trizomi	-0,149267714	-0,330012803 to 0,042427838		0,0924 <sup>2</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	-0,063745849	-0,280256899 to 0,137609427		0,5688 <sup>2</sup>

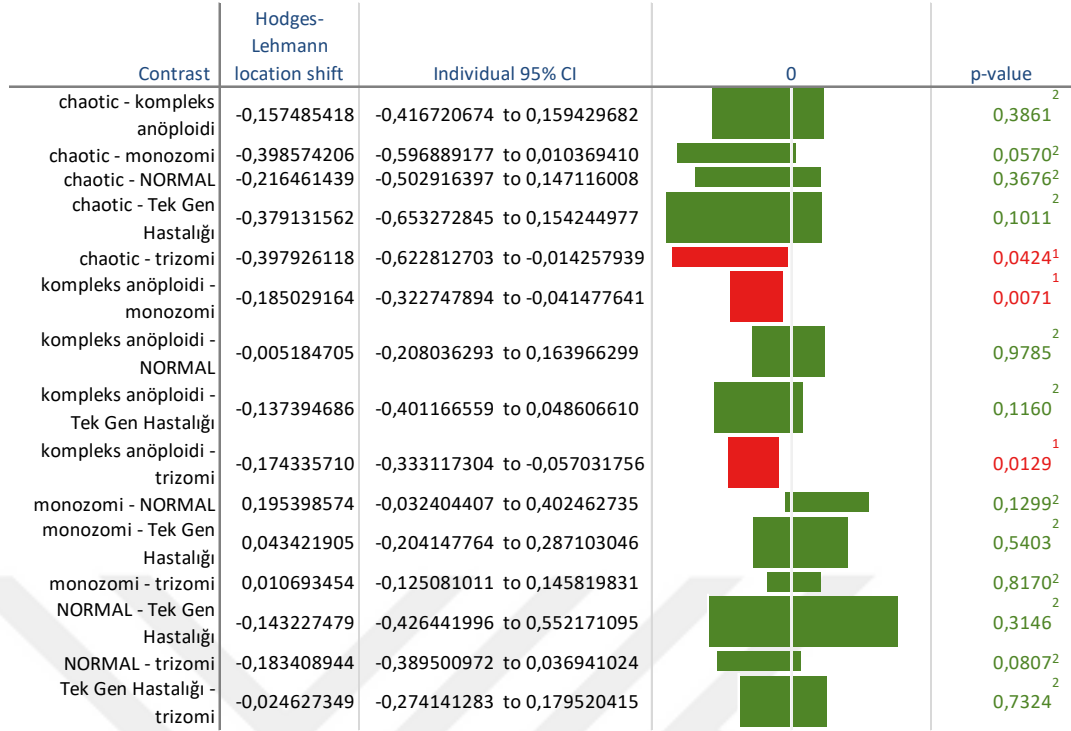
Şekil 4.33. Alanin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.12 Ornitin

Çalışmada ornitin amino asiti açısından monozomik, kompleks, trizomik ve kaotik embriyolarda normal embriyolara göre ornitin miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.33. ve Şekil 4.34.;  $p>0,05$ ). Dolayısıyla ornitin amino asit tüketiminde ve seviyesinin de anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak anormal gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde kaotik grupta trizomik gruba göre, kompleks anöploid grupta monozomik gruba göre ve de kompleks anöploid grupta trizomik gruba kıyasla ornitin amino asit seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük olarak gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bu da bize kromozomal anomali sayısı  $>4$  kromozom olduğu durumlarda ornitin amino asit seviyesinin  $\leq 3$  kromozom anomalisine sahip olanlara göre anlamlı şekilde düşük olduğunu göstermiştir.



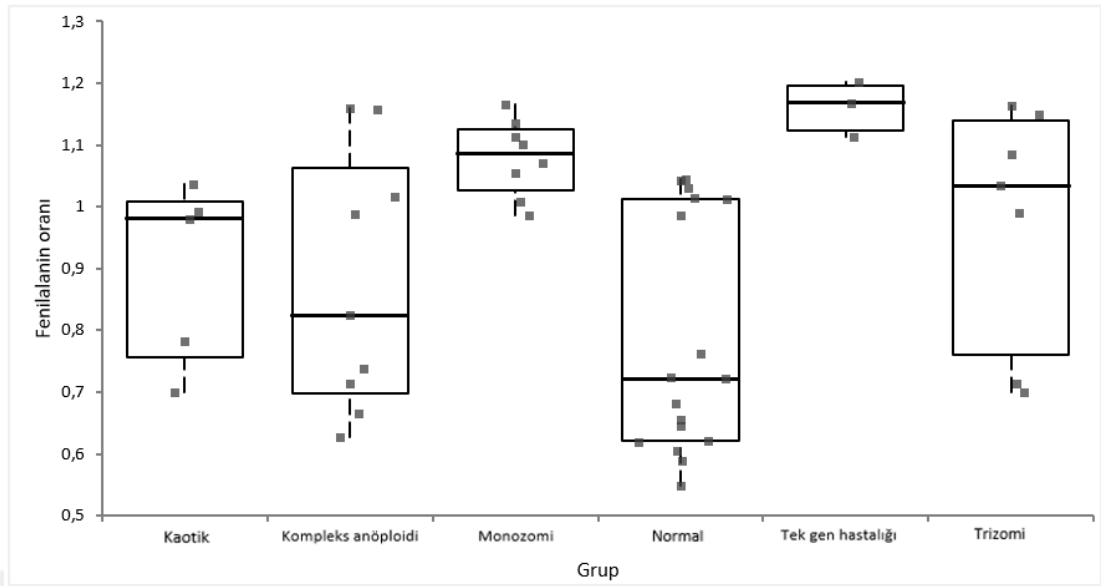
Şekil 4.34. Ornitin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.35. Ornitin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.13 Fenilalanin

Çalışmada fenilalanin amino asit seviyesini incelediğimizde normal embriyolarda monozomik embriyolara göre ileri derecede anlamlı olacak şekilde ( $p < 0,0009$ ) ve trizomik embriyolar da ise anlamlı ( $p < 0,05$ ) derecede yüksek olarak bulunmuştur (Şekil 4.35. ve Şekil 4.36.). Bununla birlikte hem kaotik hem de kompleks anöploid embriyolarda normal embriyolara göre fenilalanin amino asit tüketiminde ve seviyesin de anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ).



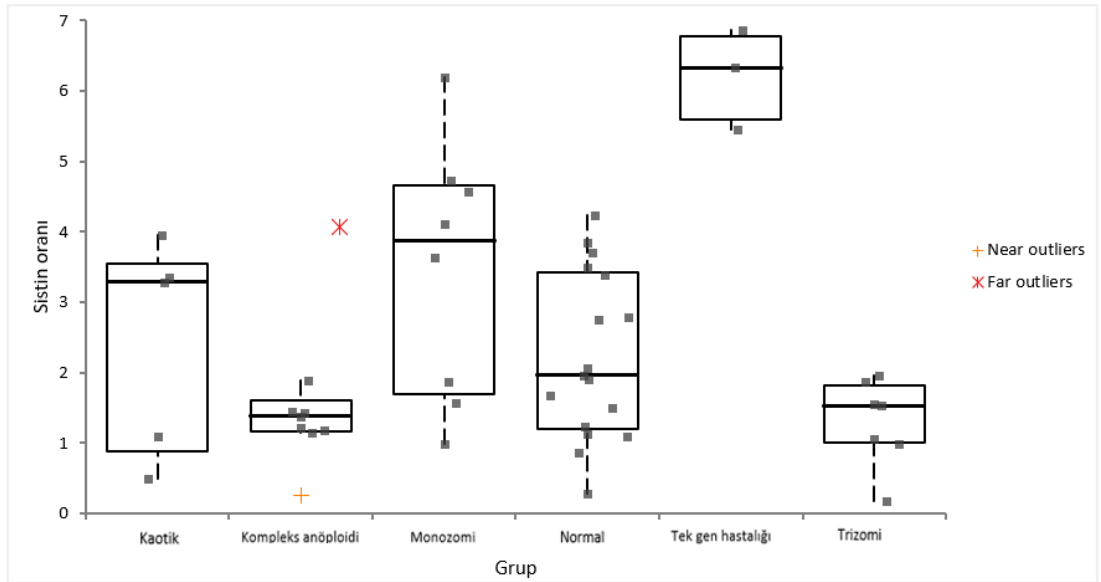
Şekil 4.36. Fenilalanin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	0,021303576	-0,206036013 to 0,299568856		0,8415 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-0,137610956	-0,354146589 to -0,027288866		0,0128 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	0,101749937	-0,049404007 to 0,356276946		0,2559 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,209383718	-0,501547045 to -0,075881309		0,0253 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	-0,093025615	-0,333654578 to 0,266801927		0,3718 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,247983769	-0,397869642 to 0,008115648		0,0675 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,093532843	-0,041186914 to 0,275120467		0,1867 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-0,343799138	-0,537053005 to -0,008217094		0,0335 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,072736495	-0,369160538 to 0,124067969		0,3683 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,364341872	0,097895004 to 0,454577733		0,0009 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	-0,077656607	-0,181486178 to -0,000608674		0,0412 <sup>1</sup>
monozomi - trizomi	0,043875222	-0,050621354 to 0,340552879		0,4179 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,446766422	-0,579152929 to -0,124778088		0,0070 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-0,151052498	-0,429114887 to -0,019173218		0,0284 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	0,124067969	-0,037027644 to 0,487953335		0,0527 <sup>2</sup>

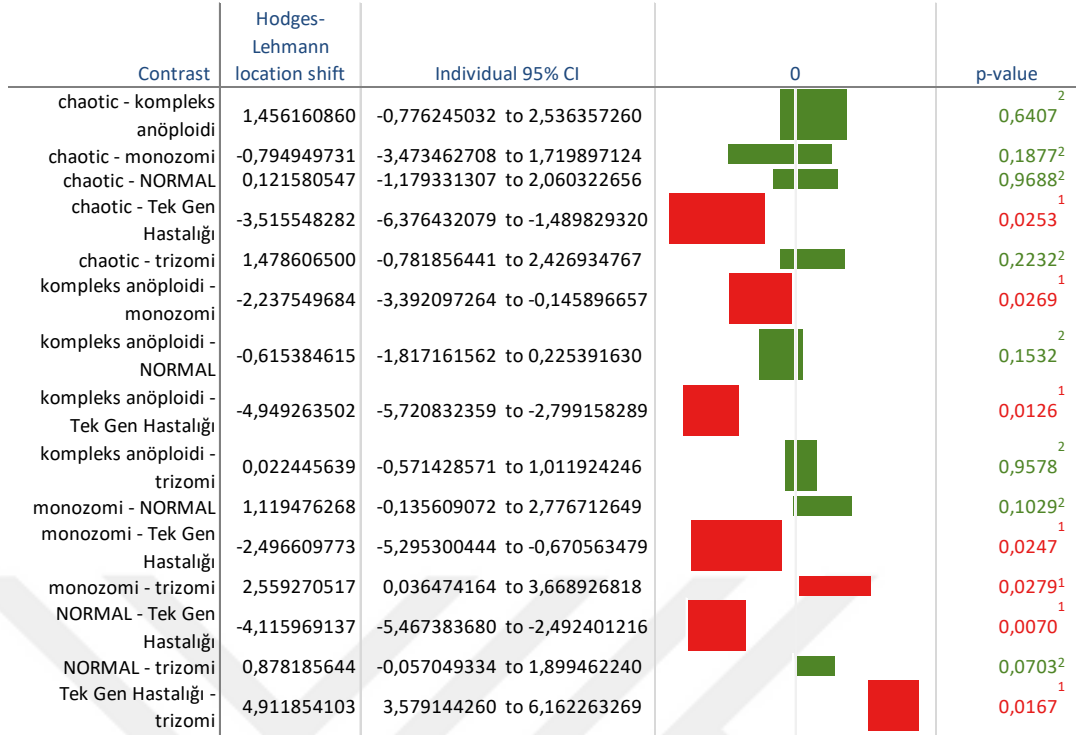
Şekil 4.37. Fenilalanin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.14 Sistin

İncelenen embriyo kültür sıvılarında, serin amino asit tüketiminde ve seviyesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.37. ve Şekil 4.38.;  $p>0,05$ ). Bu bulgulara ek olarak; kompleks anöploidi ve trizomik embriyolarda sistin amino asit tüketimi monozyk embriyolar göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olarak bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre sistin amino asit seviyesinde fark gözükmemekte ve hatta diğer anomali gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı sonuç vermesine rağmen tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan, değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 4.38. Sistin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

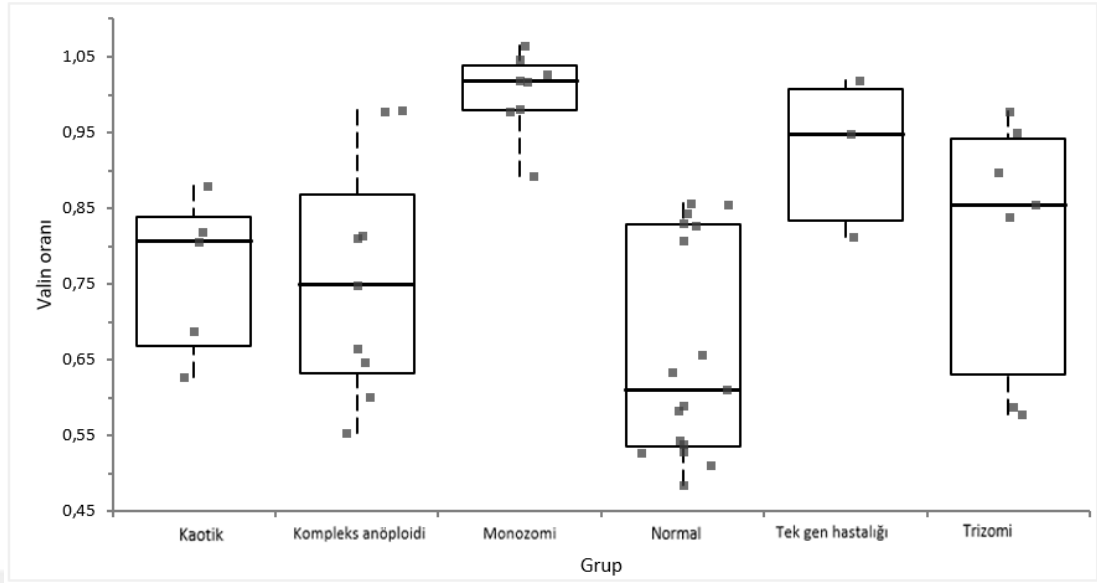


Şekil 4.39. Sistin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.15 Valin

Çalışmada SCM örneklerindeki valin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatiktiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.39. ve Şekil 4.40.;  $p < 0,0001$ ). Ayrıca trizomik embriyolarda normal embriyolara göre valin miktarı istatiktiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem kompleks hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre valin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ).

Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre valin amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



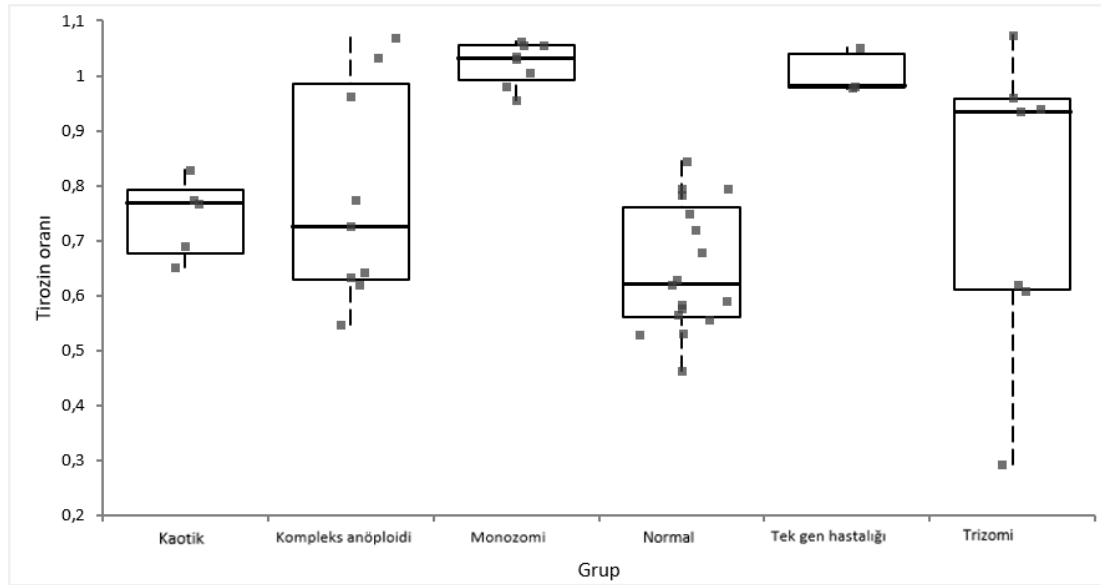
Şekil 4.40. Valin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	0,022495883	-0,171515572 to 0,205197253		0,7389 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-0,217356630	-0,359726984 to -0,140278195		0,0034 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	0,100465039	-0,028254498 to 0,274383486		0,1704 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,142349639	-0,391710081 to 0,067239076		0,1011 <sup>2</sup>
chaotic - trizomi	-0,071837682	-0,226698843 to 0,217708776		0,3718 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,253151184	-0,382222867 to -0,082029187		0,0018 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,115918012	-0,032397386 to 0,220857371		0,1383 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-0,199231494	-0,394692960 to 0,030533086		0,1160 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,044121759	-0,253586188 to 0,124493791		0,4914 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,385185032	0,200184359 to 0,470507815		<0,0001 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	0,070035525	-0,041884600 to 0,215927334		0,2207 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	0,146181811	0,053153256 to 0,398711562		0,0055 <sup>1</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,282669263	-0,463713478 to -0,091143541		0,0300 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-0,135969591	-0,327702458 to -0,011641516		0,0334 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	0,093960705	-0,139076757 to 0,431108948		0,4250 <sup>2</sup>

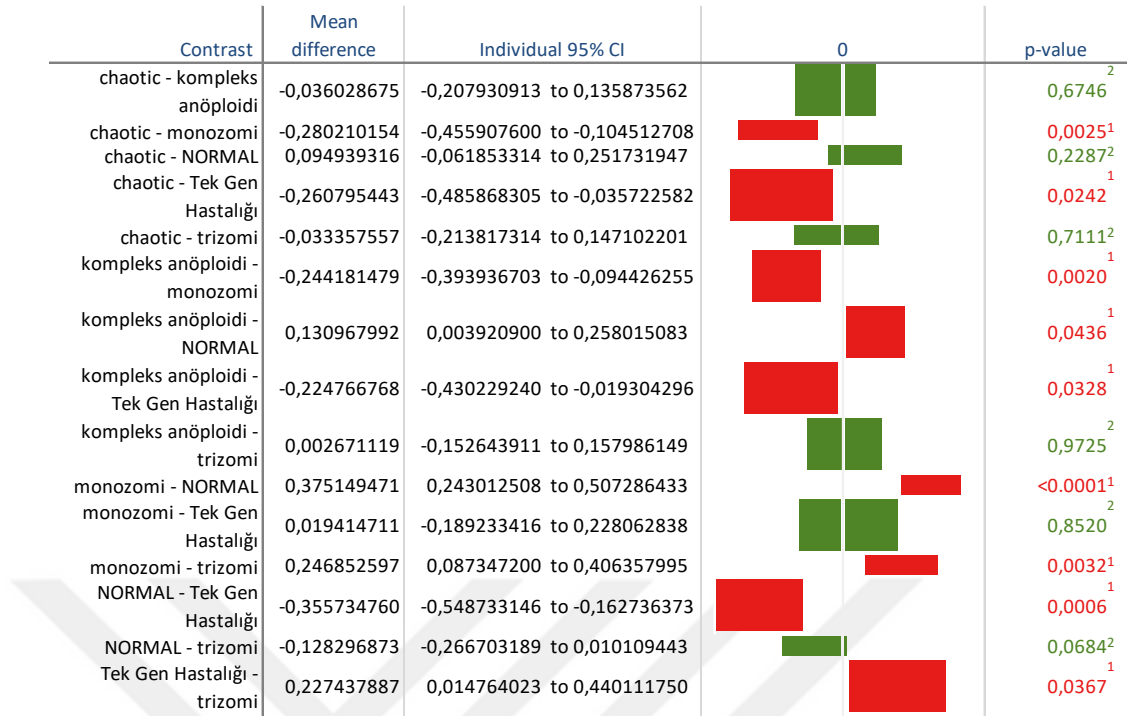
Şekil 4.41. Valin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.16 Tirozin

Çalışmada SCM örneklerindeki tirozin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.41. ve Şekil 4.42.;  $p < 0,0001$ ). Ayrıca kompleks anöploid embriyolarda normal embriyolara göre tirozin miktarı istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem trizomik hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre tirozin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Buna ek olarak trizomik embriyolarda tirozin amino asit seviyesi monozomik embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük olarak bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre tirozin amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



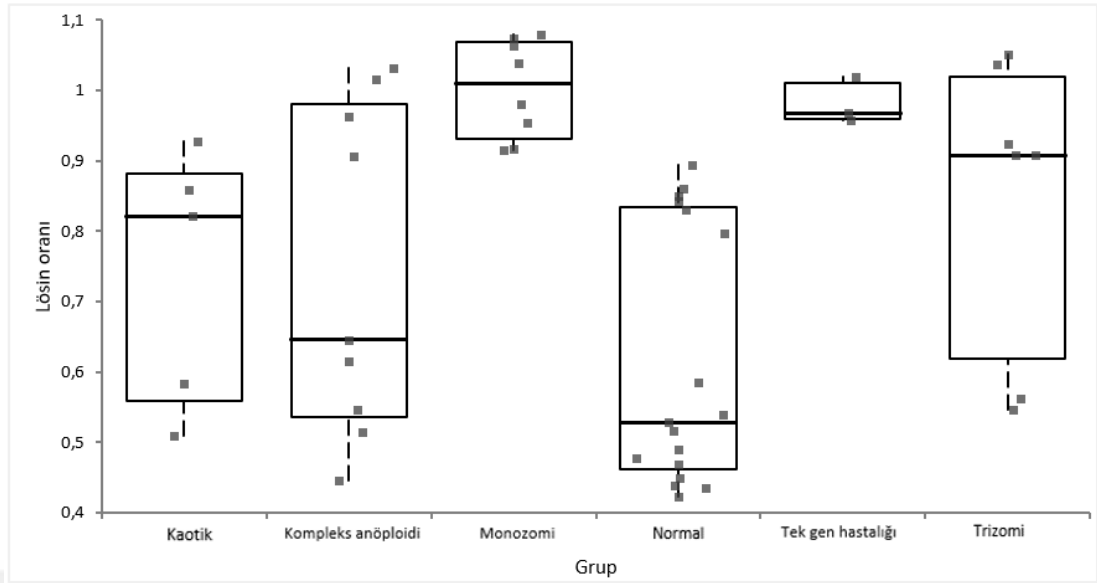
Şekil 4.42. Tirozin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.43. Tirozin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.17 Lösün

Çalışmada SCM örneklerindeki lösün miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatiktiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca trizomik embriyolarda lösün miktarı normal embriyolara göre istatiktiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem kompleks hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre lösün amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre lösün amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır ( $p < 0,05$ ).



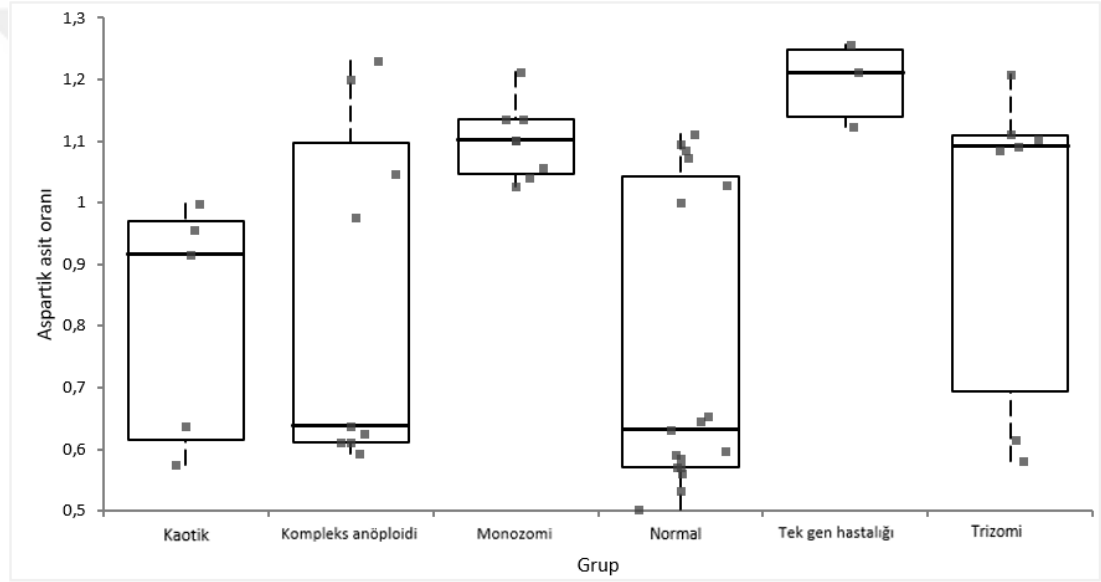
Şekil 4.44. Lösin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	-0,035211337	-0,323454816 to 0,312322981		0,7389 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-0,219182679	-0,480090002 to -0,093594260		0,0084 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	0,086015139	-0,028974351 to 0,382271960		0,1472 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,161016866	-0,510761761 to -0,029369097		0,0253 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	-0,086804630	-0,399206561 to 0,259663874		0,2912 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,304882020	-0,469668709 to -0,022500518		0,0161 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,113410506	-0,013500311 to 0,378442925		0,0710 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-0,322152155	-0,512617067 to 0,058501347		0,1655 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,046974766	-0,405246173 to 0,107844589		0,3146 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,450484057	0,213715447 to 0,545223081		<0,0001 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	0,021336018	-0,065883096 to 0,111792048		0,6831 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	0,094462701	0,000986865 to 0,392140609		0,0491 <sup>1</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,441799647	-0,541472994 to -0,117397440		0,0070 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-0,207123190	-0,469076591 to -0,063119874		0,0039 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	0,059567161	-0,083094019 to 0,458023704		0,3051 <sup>2</sup>

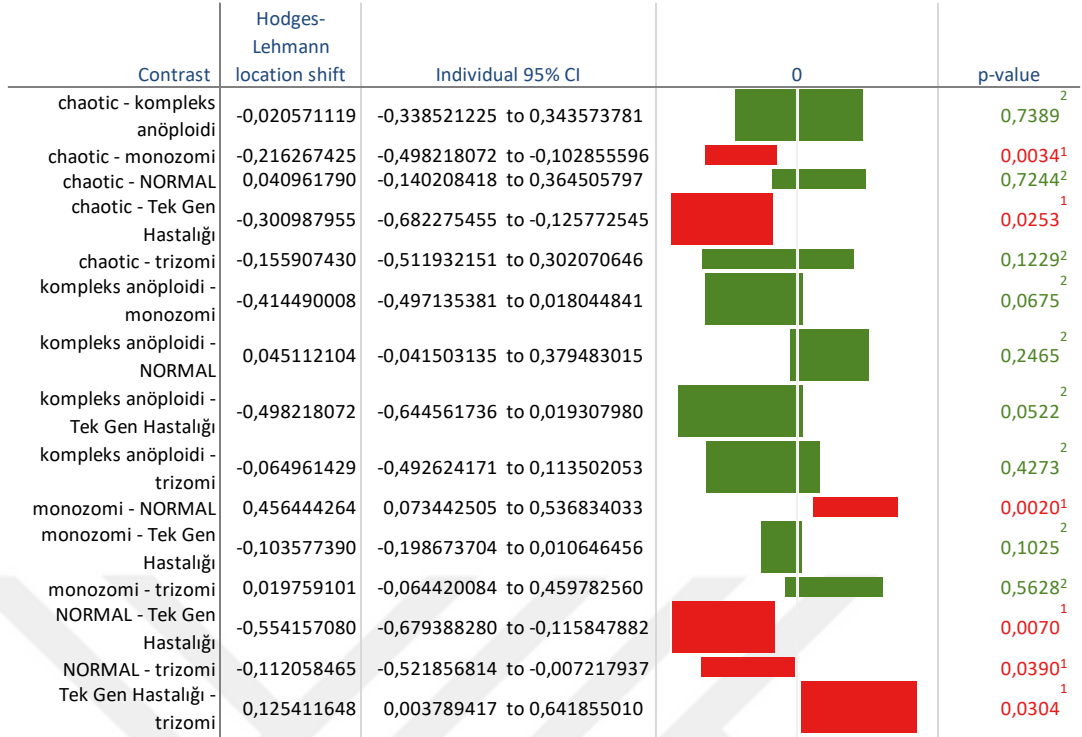
Şekil 4.45. Lösin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.18 Aspartik asit

Çalışmada SCM örneklerindeki aspartik asit miktarı monozomik ve trizomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem kompleks hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre aspartik asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre aspartik asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



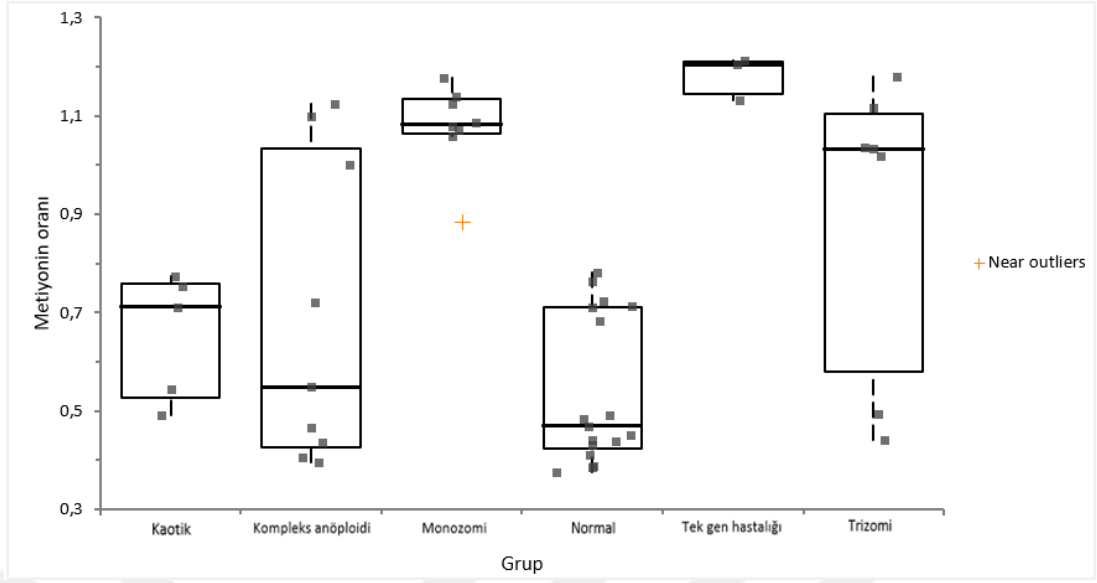
Şekil 4.46. Aspartik asit amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.47. Aspartik asit amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.19 Metiyonin

Çalışmada SCM örneklerindeki metiyonin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatiktiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca trizomik embriyolarda normal embriyolara göre metiyonin miktarı istatiktiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem kompleks hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre metiyonin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre metiyonin amino asit seviyesinde, fark gözüksede tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



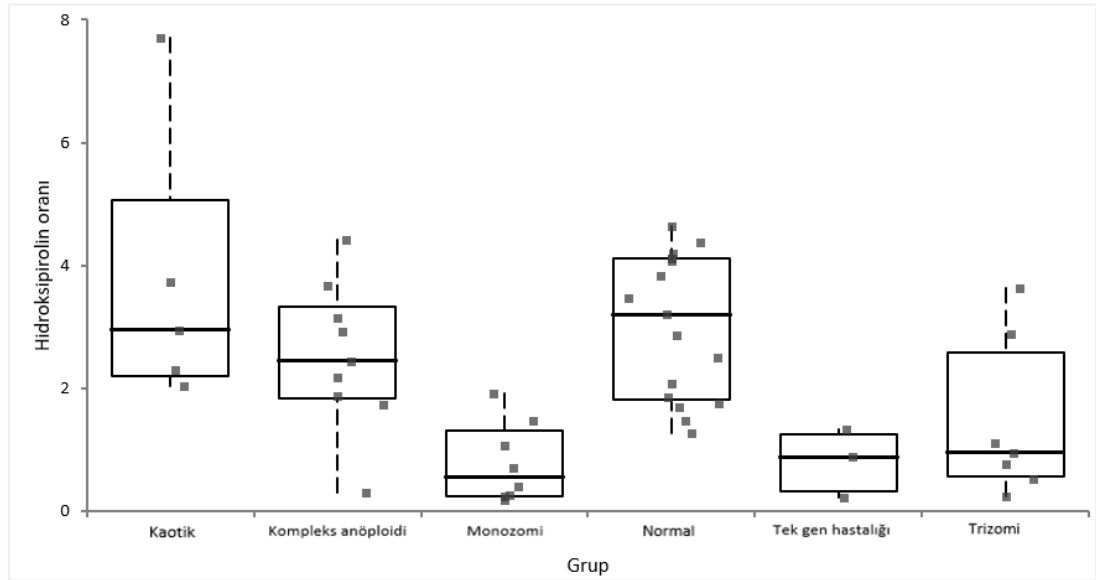
Şekil 4.48. Metiyonin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	0,052058190	-0,387631287 to 0,306738861		0,7389 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	-0,389262183	-0,588557636 to -0,306477918		0,0034 <sup>1</sup>
chaotic - NORMAL	0,103333551	-0,007697828 to 0,313262444		0,0779 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	-0,492791441	-0,720725422 to -0,359318938		0,0253 <sup>1</sup>
chaotic - trizomi	-0,321090743	-0,542240198 to 0,218540022		0,1675 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	-0,482027530	-0,673364212 to -0,053362907		0,0161 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	0,057016113	-0,047361211 to 0,375888838		0,3187 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	-0,655359123	-0,806314828 to -0,080501011		0,0126 <sup>1</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	-0,116902603	-0,627829604 to 0,081675256		0,1530 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	0,602648575	0,397025246 to 0,684715246		<0,0001 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	-0,083110444	-0,249070389 to -0,007175941		0,0412 <sup>1</sup>
monozomi - trizomi	0,057342292	-0,045012721 to 0,585948203		0,1649 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	-0,712375236	-0,799530302 to -0,430947877		0,0070 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	-0,433296366	-0,632526584 to -0,062756866		0,0063 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	0,171700698	0,014743297 to 0,764433427		0,0304 <sup>1</sup>

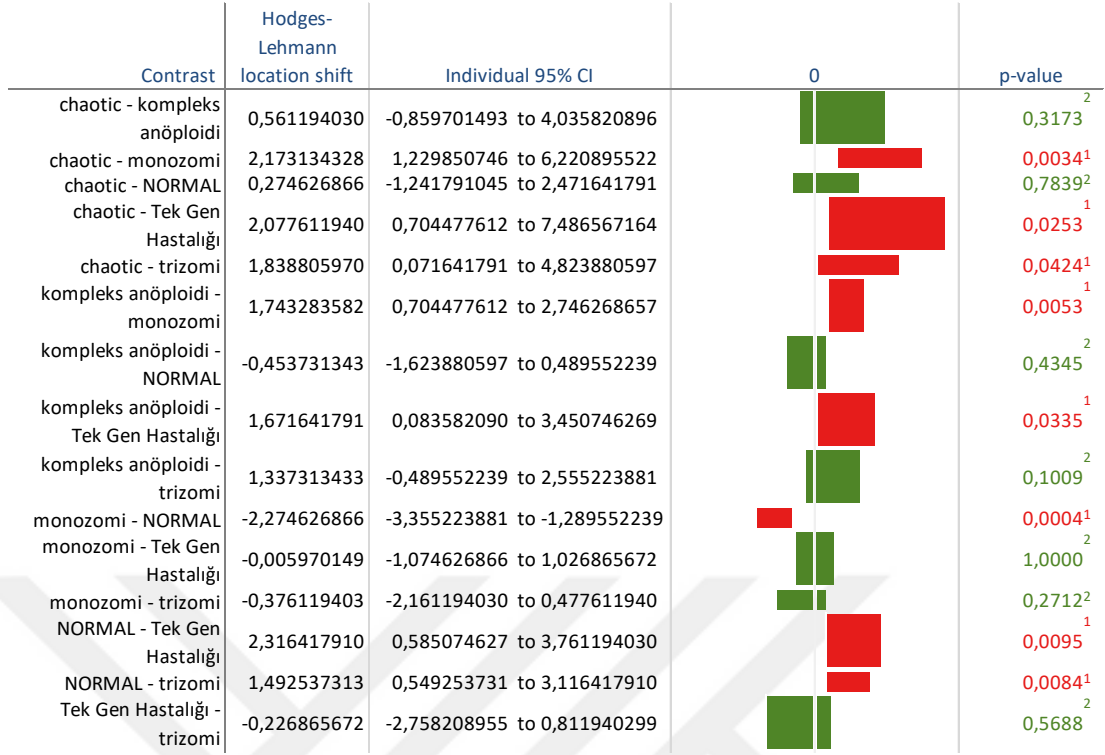
Şekil 4.49. Metiyonin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.20 Hidroksipirolin

Çalışmada SCM örneklerindeki hidroksipirolin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ayrıca trizomik embriyolarda da normal embriyolara göre hidroksipirolin miktarı istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte hem kompleks hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre hidroksipirolin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre hidroksipirolin amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



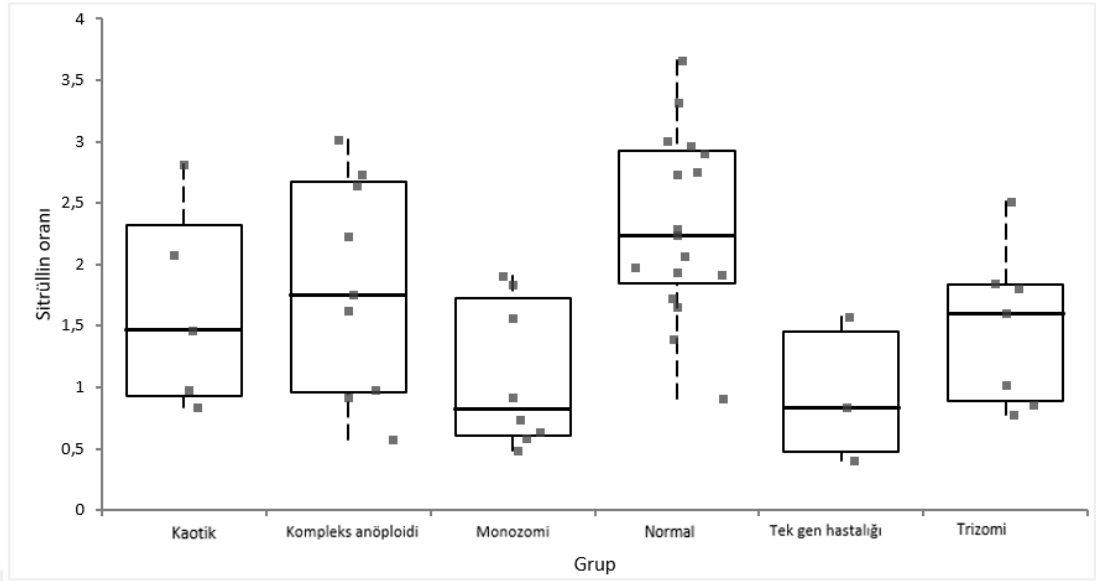
Şekil 4.50. Hidroksipirolin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.51. Hidroksipirolin amino asitinin gruplara göre istatiktiksel analizi

#### 4.3.9.21 Sitrülin

Çalışmada SCM örneklerindeki sitrulin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatiktiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p < 0,0009$ ). Ayrıca trizomik embriyolarda da normal embriyolara göre sitrulin miktarı istatiktiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem kompleks hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre sitrulin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Tek gen hastalığında normal embriyolara göre sitrulin amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 4.52. Sitrülin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği

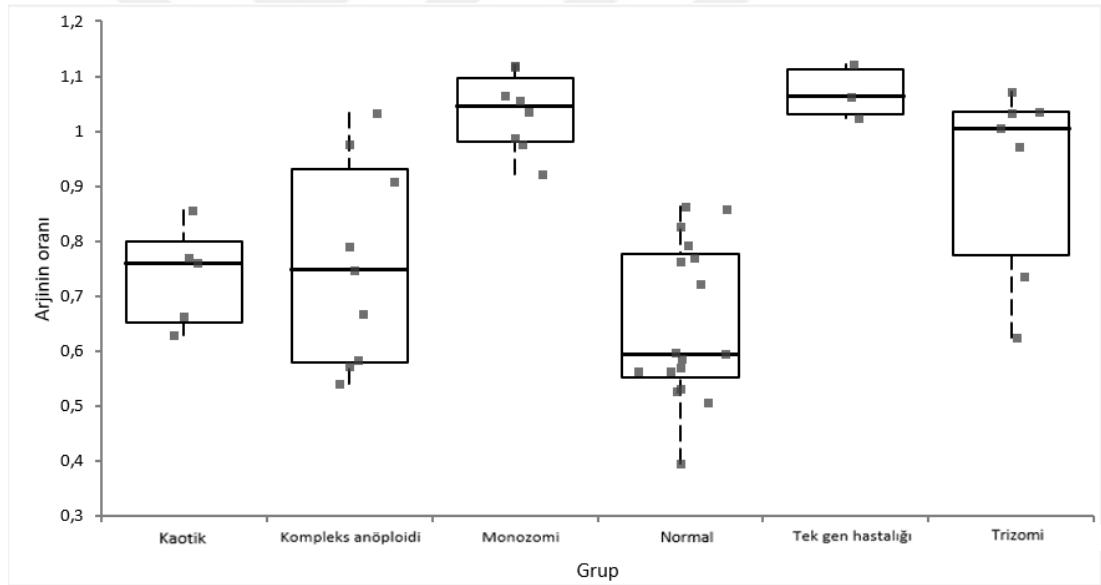
Contrast	Hodges-Lehmann location shift	Individual 95% CI	0	p-value
chaotic - kompleks anöploidi	-0,152380952	-1,390476190 to 1,066666667		0,6888 <sup>2</sup>
chaotic - monozomi	0,442857143	-0,438095238 to 1,485714286		0,1432 <sup>2</sup>
chaotic - NORMAL	-0,771428571	-1,542857143 to 0,095238095		0,1266 <sup>2</sup>
chaotic - Tek Gen Hastalığı	0,580952381	-0,733333333 to 2,419047619		0,2302 <sup>2</sup>
chaotic - trizomi	0,123809524	-0,866666667 to 1,219047619		0,8075 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - monozomi	0,819047619	-0,066666667 to 1,733333333		0,0675 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - NORMAL	-0,466666667	-1,209523810 to 0,266666667		0,1778 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - Tek Gen Hastalığı	0,914285714	-0,590476190 to 2,247619048		0,0790 <sup>2</sup>
kompleks anöploidi - trizomi	0,219047619	-0,676190476 to 1,209523810		0,4273 <sup>2</sup>
monozomi - NORMAL	-1,242857143	-1,838095238 to -0,657142857		0,0009 <sup>1</sup>
monozomi - Tek Gen Hastalığı	0,138095238	-0,933333333 to 1,161904762		0,6831 <sup>2</sup>
monozomi - trizomi	-0,290476190	-1,114285714 to 0,133333333		0,1649 <sup>2</sup>
NORMAL - Tek Gen Hastalığı	1,390476190	0,361904762 to 2,476190476		0,0129 <sup>1</sup>
NORMAL - trizomi	0,904761905	0,123809524 to 1,457142857		0,0145 <sup>1</sup>
Tek Gen Hastalığı - trizomi	-0,457142857	-1,676190476 to 0,714285714		0,1385 <sup>2</sup>

Şekil 4.53. Sitrülin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

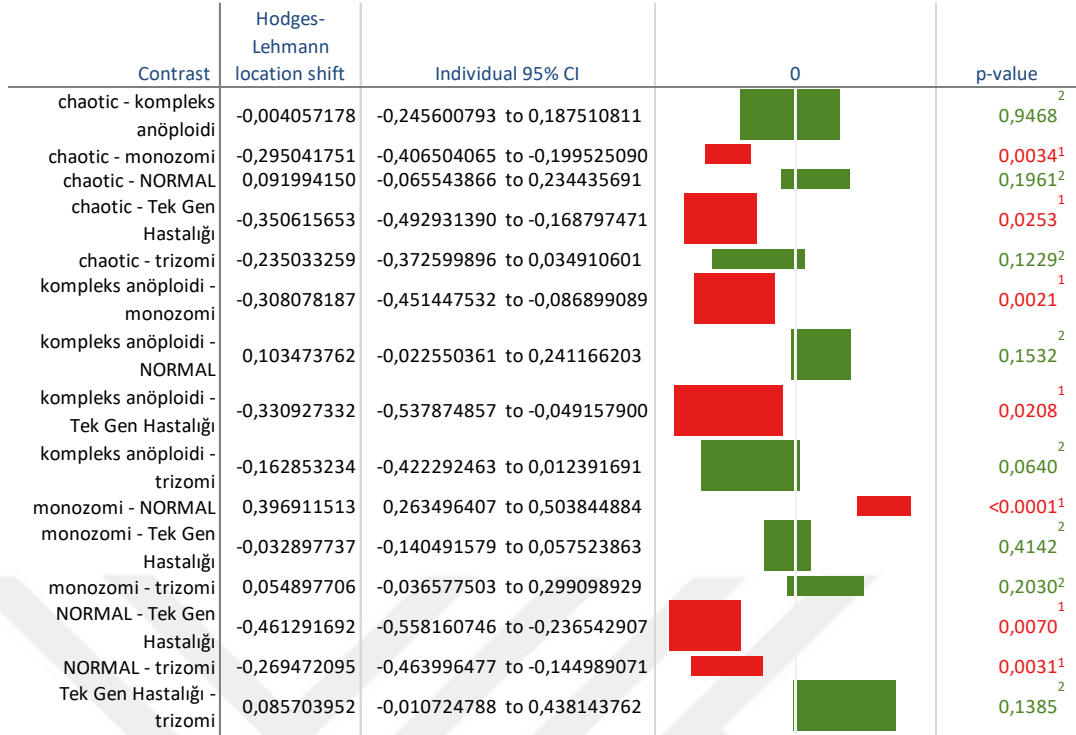
#### 4.3.9.22 Arjinin

Çalışmada SCM örneklerindeki arjinin miktarı monozomik embriyolarda normal embriyolara göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca trizomik embriyolarda da normal embriyolara göre arjinin miktarı istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte hem kompleks hem de kaotik anöploid embriyolarda normal embriyolara göre arjinin amino asit tüketiminde ve seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ).

Tek gen hastalığında da normal embriyolara göre arjinin amino asit seviyesinde fark gözüksede, tek gen embriyo sayısı düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.



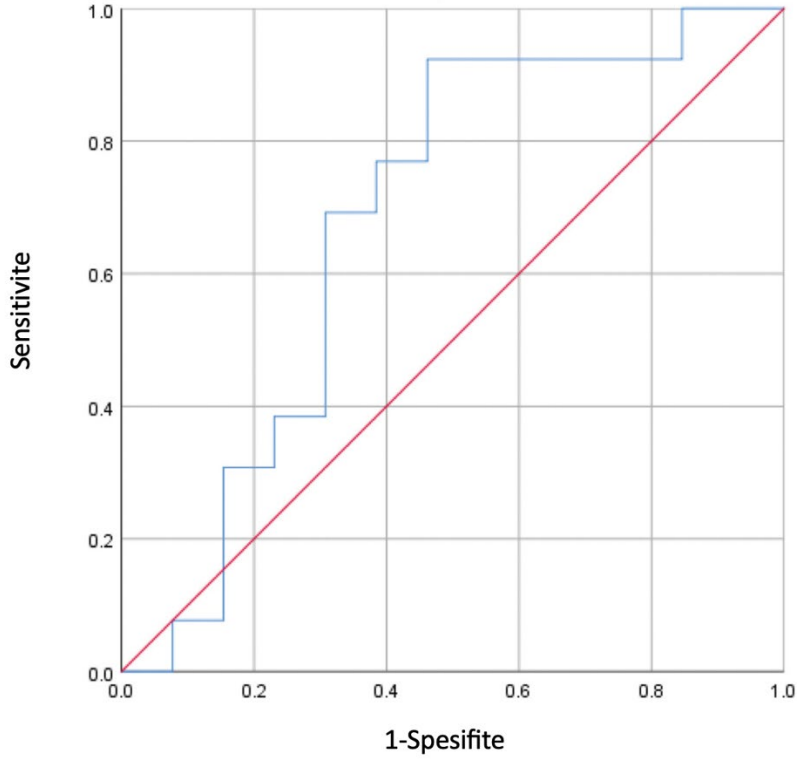
Şekil 4.54. Arjinin amino asitinin gruplara göre dağılım grafiği



Şekil 4.55. Arjinin amino asitinin gruplara göre istatistiksel analizi

#### 4.3.9.23 SCM amino asit miktarı vs. embriyonik anöploidi ilişkisi

Çalışmada metabolomik çalışması kapsamında incelenen öploid ve anöploid SCM örneklerinde elde edilen sonuçlar, incelenen aminoasitler arasından sadece tirozin aminoasit konsantrasyonunun öploid ve anöploid örnekler için istatistiki olarak anlamlı olarak farklı olduğunu göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Yapılan ROC eğrisi analizine ait görsel Şekil 4.55.'te sunulmaktadır. Analize göre tirozin aminoasite ait etkin bir şekilde öploid/anöploid ayrımının yapılabileceği konsantrasyon değerinin 0,538 AUC değeri ile 76,38 umol/L olduğu tespit edilmiştir. Bu eşik değeri kullanılarak TE sonucu anöploid olan SCM örneklerinin %87,5'i, öploid olan örneklerin ise %66,67'si doğru şekilde tanımlanabilmiştir.



Şekil 4.56. Anöploid embriyolara ait ROC eğrisi

Her bir aminoasitin bireysel değerlendirme sonuçlarının derlenmesi ile oluşturulan ve anöploidi alt grubu ayırımı amaçlı olarak hazırlanan veriler Tablo 4.7. 'de sunulmaktadır. Tabloda görüldüğü üzere 16 farklı aminoasidin SCM'deki miktarı monozomik ile, 8 farklı aminoasidin miktarı ise trizomi ile ilişkili olduğu ve bu sonuçların birlikte öploidi/anöploidi tespiti için kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca 6 farklı aminoasit (Treonin, histidin, glisin, ornitin, sistin ve tirozin) analizi sonrası elde edilen sonuçlar, anöploidiler için istatistiksel olarak anlamlı derecede altgrup tanımlaması yapılabileceğine işaret etmektedir.

Tablo 4.7. Normal 7vs. Anöploidi amino asit alt grubu tablosu

	Kaotik	Kompleks	Monozomi	Trizomi	
Serin					p<0,001 Yüksek
Triptofan					p<0,05 Yüksek
Treonin	*	*	p<0,001	*	p>0,05
Lizin			p<0,001		p<0,05
Histidin	*	*	p<0,001	*	p<0,001
Glisin	*	*	p<0,05	*	
Glutamin			p<0,001		
Asparajin			p<0,05		
Alanin			p<0,05		
Ornitin	*	*	*	*	
Fenilalanin			p<0,001	p<0,05	
Sistin		*		*	
Valin			p<0,001	p<0,05	
Tirozin		p<0,05	p<0,001	*	
Lösin			p<0,001	p<0,05	
Aspartik Asit			p<0,05	p<0,05	
Metiyonin			p<0,001	p<0,05	
Hidroksipirolin			p<0,05	p<0,05	
Sitrülin			p<0,001	p<0,05	
Arjinin			p<0,001	p<0,05	

Anöploidi

(\*): Anöploid gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur (p<0,05). Tablonun sol üst tarafında yer alan “yüksek/düşük” olarak belirtilen ifadeler, amino asit tüketimini göstermektedir.

## 5 TARTIŞMA

Günümüzde halen pek çok ÜYTE merkezinde gerçekleştirilen tedavilerde gebelik ve canlı doğum potansiyeli en yüksek embriyonun seçilmesi amacıyla, ışık mikroskobu altında embriyo morfolojisinin gözlemlenmesine dayalı “statik görüntüleme” yaklaşımı kullanılmaktadır. Son yıllarda seçim başarısını arttırabilmek amaçlı olarak embriyoların morfokinetik gözlemlenmesine dayalı “dinamik görüntüleme sistemlerinin kullanımı da kullanılmaya başlanmış olsa da bu yeniliğin laboratuvar ve klinik başarı oranlarına etkisi halen oldukça sınırlıdır <sup>128,129,246</sup>. Yeni çalışmalar, embriyoların mikroskoba dayalı görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilmesi yönündeki yaklaşımlardaki yapay zekâ tabanlı yeni uygulamaların yanında, embriyoların içinde büyütüldükleri kültür sıvılarındaki genomik ve metabolik moleküllerin/yapıların girişimsel olmayan teknikler ile değerlendirilmesi yönünde de oldukça hızlı ve heyecan verici şekilde ilerlemektedir <sup>247-249</sup>. Bu yeni yaklaşımların embriyoyu ve çevresini koruması ve dolayısıyla girişimsel süreçlerin olası etkisi nedeniyle embriyonun gelişme potansiyelini olumsuz yönde etkileme şansını belirgin olarak azaltması sebebiyle tedavi süreçlerinde belirgin bir etkinlik ve başarı artışı sağlaması beklenmektedir <sup>250</sup>. Benzer yaklaşımların ayrıca girişimsel bir biyopsi ihtiyacını ortadan kaldırması, etkinliklerinin artırılması ile sağlıklı canlı doğuma ulaşmak için gerekli tedavi sayısını azaltması, böylece maliyetleri de önemli ölçüde düşürmesi diğer olumlu beklentilerdir. Ayrıca girişimsel olmayan yaklaşımlarda doğrudan embriyo üzerinde bir müdahale ihtiyacı gerekmediğinden, dünya genelinde bazı ülkelerde mevcut olan yasal sınırlar ve etik tartışmalar için de oldukça önemli bir katkı sağlaması beklenmektedir. Bu ve benzer özellikler/beklentiler, niPGT-A yaklaşımlarını geleneksel PGT-A uygulamalarına göre oldukça önemli bir avantajlı kılmaktadır.

SCM örneklerinin genomik analizine dayalı olarak gerçekleştirilen güncel çalışmaların sonuçları, niPGT-A’da kullanılan mevcut teknoloji ve elde edilen sonuçların henüz kesin bir tanı testi olarak değerlendirilemeyeceğini, bununla birlikte embriyonun viabilitesini, genetik yapısını ve canlı doğum potansiyelinin aynı anda

oldukça verimli bir şekilde belirlenebilmesinin sağlanabildiği, klinikte elektif tek embriyo transferi (eSET) için en uygun embriyonun “önceliklendirilmesi” bakımından faydalı olabilecek bir araç olabileceğine işaret etmektedir <sup>145,146,251</sup>.

niPGT-A yaklaşımının güncel ÜYTE laboratuvarları ve kliniklerinde rutin süreçlerde uygulanabilmesi veya kullanılabilmesi için halihazırda çözülmesi/iyileştirilmesi gereken bazı önemli aşamalar mevcuttur <sup>252</sup>. Mevcut çalışmamız bu aşamaların gerçek zamanlı olarak ÜYTE tedavi süreçlerindeki etkilerini ve laboratuvar/klinik pratiği içerisinde uygulanabilirliğini test etmek ve rutin tedavilerde kullanılacak girişimsel olmayan yeni bir embriyo seçim aracı oluşturma amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Geçmiş çalışmaların ışığında mevcut genomik ve metabolomik teknolojiler ile verimli ve etkin analiz yapılabilmesi için gerekli SCM volüm ve konsantrasyonu her iki yaklaşımın da (genomik ve metabolomik) aynı örnekte kombine uygulanmasına olanak vermediğinden, çalışma kapsamında değerlendirilen hastalar ve bu hastalara ait TE biyopsi ve SCM örnekleri “Gereç ve Yöntem” kısmında da belirtildiği şekilde çalışma süreci içerisinde farklı altgruplara ayrılarak ayrı ayrı incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

## 5.1 Genomik İnceleme

niPGT-A yaklaşımlarının rutin ÜYTE laboratuvar ortamında pratik olarak gerçekleştirilebilmeleri için öncelikli ve ideal şart, uygulamaların konvansiyonel ÜYTE laboratuvar pratiği ile uyumlu bir şekilde gerçekleştirilebilmesidir. Diğer bir deyiş ile, niPGT-A uygulamalarında gerek örnekleme gerekse analiz sürecinin mevcut günlük iş planına uygun olması (embriyo kültürü, günlük embriyo takipleri ve karar süreçleri, embriyo biyopsi zamanı vb.) önemli bir önkoşuldur. Günümüze kadar gerçekleştirilen genomik-tabanlı niPGT-A çalışmaları, SCM örneklerindeki DNA miktarlarının ve kalitesinin bu yaklaşımın etkin ve verimli olarak kullanılabilmesi için

embriyonun örneklenecek ortamda belirli bir süre inkübasyonunu gerekli kılmakta, bu süreden az inkübe edilen embriyolardan elde edilen örneklerde oldukça değişken ve verimsiz bir sonuç elde edildiğini göstermektedir <sup>253,254</sup>. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, numunenin 4. Günden 5. Güne kadar embriyolar ile temas halinde olması durumunda, 3. Gün ile 5. Gün arasındaki numunelere kıyasla, kullanılmış kültür ortamından hücresiz DNA'ya dayalı anöploidi testinin doğruluğunun arttığını göstermiştir <sup>253</sup>. Yazarlar ayrıca, 4. Günden 5. Güne kadar harcanan kültür ortamında, 3. Günden 5. Güne kadar olan örneklere kıyasla, cinsiyet kromozomlarında yüksek bir uyum ve daha düşük bir yanlış negatif sonuç oranı bildirmiştir. Yazarların bu durum ile ilgili varsayımları embriyonik DNA'nın maternal DNA'ya oranının, embriyonik hücrelerin sayısı gelişimle katlanarak arttıkça sonraki aşamalarda artmasıdır. Günümüzde farklı çalışmalarda etkin ve tekrarlanabilir bir protokol oluşturabilmek adına araştırmacılar farklı inkübasyon süresi ve manipülasyon seçeneklerini (Embriyo gelişiminin 3.gününde Assisted Hatching uygulaması vb.) değerlendirmektedirler ve güncel yaklaşım, blastosist kültür sürecini öncesinde herhangi bir zona manipülasyonu gerçekleştirilmeksizin 5. veya 6.güne uzatarak SCM örnekleme yönündedir <sup>255-259</sup>.

Çalışmamız kapsamında 22 SCM numunesi üzerinde gerçekleştirilen pilot çalışmada, yukarıda belirtilen çalışmalardaki sonuçlara paralel olarak, 6.gün toplanan SCM örneklerindeki DNA amplifikasyon başarısı (%87,5) 5.günde toplanan örneklere kıyasla (%28,5) daha başarılı gözlenmiştir. Benzer bir iyileşme, adı geçen günlerde toplanan SCM sonuçlarının TE biyopsi sonuçları ile uyumu konusunda da gözlenmekle birlikte örnek sayısının kısıtlı olması nedeniyle istatistiki değerlendirmeye alınmamıştır.

Mevcut çalışma protokolünün iyileştirilmesi amaçlı olarak bir sonraki aşamada SCM örneğinin alındığı kültür damlacığının hacminin azaltılması (5.gündeki DNA amplifikasyon başarısının artırılabilmesi amaçlı) ve SCM örnekleme sürecinin embriyo gelişiminin 3.gününden başlaması (maternal/paternal kontaminasyon riskinin azaltılması) yaklaşımı planlanmaktadır <sup>255,256</sup>. Pilot çalışmamız aynı zamanda gerek

DNA amplifikasyonu gerek se TE biyopsi-SCM sonuçlarının uyum başarısının örneklenen embriyonun kalite skorundan bağımsız olduğunu da göstermesi açısından da önemlidir. Genomik niPGT-A yaklaşımı kullanılarak bugüne kadar bildirilen en yüksek sayıda TE biyopsi-SCM örneğinin karşılaştırıldığı prospektif ve çok merkezli çalışmada, çalışmaya katılan merkezler, farklı inkübatör kullanımı ve kültür ortamı türleri ile yapılan karşılaştırma analizlerinde de oldukça yüksek tutarlılık bildirilmiştir

255

Mevcut sonuç ve pratik gözlemlerimiz literatür ile birlikte değerlendirildiğinde, uygun değişikliklerin sağlandığı koşullarda genomik tabanlı niPGT-A yaklaşımının embriyo seçiminde “önceliklendirme” amaçlı kullanılabilecek bir yaklaşım olduğunu göstermekle beraber tekniğin ÜYTE laboratuvar ve klinik pratiğinde kullanılabilmesi için çözülmesi/iyileştirilmesi gerekli bazı önemli noktalar mevcuttur. Öncelikli olarak örneklem ve analiz süreçlerinin harici DNA kaynaklı kontaminasyonun engellenmesi amacıyla son derece titiz yapılması, görevli personelin bu konuda eğitilerek valide edilmesi gerekmektedir. Bu koşulların yanında en önemli konulardan bir diğeri yöntemin özellikle analiz aşamasında cihaz, işgücü ve sarf maliyetlerinin yüksekliğidir. Günümüz koşullarında birden fazla embriyosu gelişen aday çiftlerde genomik-tabanlı niPGT-A maliyeti ÜYTE tedavisinin kendisinden bile çok daha maliyetli olabilmektedir. Çalışmamızın pilot çalışma olarak 22 örnek üzerinden gerçekleştirilmiş olması da bu yüksek maliyet nedeniyledir. Son olarak, teknik açıdan maternal/paternal kontaminasyon riski yanında embriyonik mozaicism de kültür ortamındaki serbest DNA'nın bileşimi üzerindeki potansiyel etkisi nedeniyle dikkate alınması gereken önemli bir faktör olmaya devam etmektedir. Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen genomik analizlerde mozaicism ayrıca raporlanmamış, belirli bir oranın altındaki mozaicism öploid, üstündeki ise anöploid olarak değerlendirilmiştir.

## 5.2 Metabolomik İnceleme

İn vitro olarak büyütülen insan embriyolarında zigotik evre sonrası genetik hatalarda gözlenen artışın birçok nedene bağlı olması muhtemeldir. Erken embriyoların yüksek mitotik aktivitelerinden dolayı hücre siklus kontrol noktalarında daha esnek olduğu düşünülmektedir <sup>260</sup> ve bu embriyolarda mitotik iğ kusurları da yaygındır <sup>261</sup>. Fakat mozaisizmdeki artışın doğal bir fenomen mi yoksa in vitro olarak optimal olmayan ortam koşullarına mı veya optimal olmayan yumurtalık stimülasyon protokollerine mi bağlı olabileceği tam olarak anlaşılmamıştır. Ovaryen hiperstimülasyonun insanlarda <sup>262</sup> ve farelerde <sup>263</sup> kromozom anormallikleri dahil olmak üzere düşük oosit kalitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir <sup>264-266</sup>. Diğer taraftan natürel sikluslarda (hormon kullanılmadan folikül gelişimi takibi) dahi yüksek anöploidi oranlarına sahip insan embriyolarının oluştuğu bildirilmektedir <sup>267</sup>; bu da ovaryen hiperstimülasyonun kromozom anormalliklerinin tek nedeni olmadığını düşündürmektedir. İlerleyen anne yaşının oosit ve embriyo kromozom anormalliklerinin insidansı üzerindeki etkisi çok iyi bilinmektedir <sup>268-270</sup>. Bu tez çalışmasında genetik yapısı normal olan embriyoların anne yaşları ile anormal olan embriyoların anne yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. İlerleyen anne yaşına bağlı olarak amino asit metabolizmasında gençlere göre azalma ilk defa bu çalışma ile tespit edilmiştir.

İnsan ve memeli embriyolarının, supra-fizyolojik oksijen gerilimlerinin in vitro etkilerine duyarlı oldukları bilinmektedir <sup>271,272</sup>. %5 CO<sub>2</sub> içeren hava, in vitro üretilen insan embriyoları için hala en yaygın kullanılan kültür ortamıdır, ancak in vivo oksijen gerilimi havada %21'e kıyasla %5 civarındadır. Hayvan ve insan embriyoları üzerinde yapılan çok sayıda çalışma, muhtemelen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna bağlı olarak oksijen gerilimi ile düşük embriyo kalitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Fakat aynı şartlarda kültürü yapılan genç ve yaşlı annelere ait embriyolarda anöploidi oranlarının farklı olmasından dolayı ROS'a bağlı kromozomal anomali oluşumu göz ardı edilebilir.

Amino asitler kadın üreme sisteminde bulunan biyolojik sıvıların önemli içeriklerinden biridir ve embriyo kültür ortamlarına tek tek veya kombinasyon şeklinde katılmalarının embriyo gelişimini desteklediği, in vivo'ya yakın bir fenotip oluşturma amaçlı gen ekspresyonunun indüklendiği gösterilmiştir <sup>273,274</sup>. In vivo ortamda üretilmiş olan embriyoların bu molekülleri buldukları dış ortamdan aldıkları bilinmektedir. Amino asitlerin hücre protein sentezine ek olarak erken embriyo gelişiminde sayısız rolü vardır <sup>231,275</sup>.

Glisin, embriyo hücre hacmindeki değişiklikleri dengeleyen bir ozmoregülatör olarak bilinir <sup>276-278</sup>. Çalışmamızda monozomik embriyolarda glisin kullanım miktarı normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.

Arjinin ve lösin biyolojik ve metabolik açıdan genellikle birbirleriyle bağlantılı olarak değerlendirilirler, zira diğer aminoasitlerden farklı olarak embriyo gelişim ve farklılaşmasında (özellikle blastosist aşamasında) vazgeçilmez bir öneme sahiptirler <sup>279</sup>. Arjinin tüketimi, memeli hücreleri tarafından artan nitrik oksit (NO) üretimine bağlanmıştır <sup>280</sup>. NO (nitrik oksit) normal memeli embriyo gelişiminde önemli bir rol üstelense de <sup>281,282</sup>, yüksek NO seviyesi apoptoz ve düşük embriyo kalitesi ile ilişkilidir <sup>283-285</sup>. İnsan embriyoları tarafından daha yüksek arjinin tüketiminin kötü embriyo gelişimi ile ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir <sup>286</sup>. Diğer taraftan lösin üzerine somatik hücre kültüründe gerçekleştirilen araştırmalar, bu aminoasitin temel anabolik rolünün protein sentezini başlatmak olarak olduğunu göstermiştir <sup>287</sup>

Yapılan son çalışmalar, hamilelikle sonuçlanma olasılığı daha düşük olan insan embriyolarının yüksek glutamik asit çıkışına sahip olduğunu göstermektedir <sup>288</sup>. Mevcut çalışmadaki glutamik asit analizine ait bulgular literatürdeki bu bulgularla paralellik göstermekte olup tüm anöploid (monozomik, trizomik, kompleks anöploid ve kaotik) embriyo kültür sıvılarında glutamik asit seviyesi yüksek olarak bulunmuştur. Böylece bu çalışmada elde edilen sonuçlar Seli ve arkadaşlarının

çalışmalarındaki çıktıları daha da ileriye taşıyarak glutamik asit seviyesindeki artış ile genetik kaynaklı implantasyon başarısızlığı ilişkili olabileceğini düşündürmektedir<sup>211,288</sup>.

Güncel literatürde metiyonin amino asitinin kullanımındaki azalmanın insan embriolarında embriyonik kök hücrelerinin çoğalmasını engellediğini göstermiştir ve ICM gelişimini olumsuz etkileyerek, düşüğe sebep olabileceğini düşündürmüştür<sup>289</sup>. Çalışmamızda monozomik embriolarda metiyonin amino asit kullanımının normal embriyolara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunması durumu, monozomik kaynaklı implantasyon başarısızlıkları ile ilişkilendirilebilir ve bu açıdan güncel literatür sonuçları ile de uyumluluk göstermektedir. Bununla birlikte literatürde belirtilen embriyonik gelişim bozukluklarının mevcut çalışmada implantasyon öncesi dönemde blastosist morfolojisi üzerinde belirgin bir farklılık yaratmadığı görülmektedir. Bu durum adı geçen etkinin nedenleri olarak gelişim problemlerinin peri-implantasyon aşaması ve sonrasında daha etkin olması veya mevcut çalışmadaki örnek sayısının sınırlı olması varsayılabilir.

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda embriyo gelişiminde ve özellikle de blastokist gelişiminde amino asitlerin rolleri kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır. Metabolik olarak amino asit tüketimi yeterli olmayan embriyoların hem gelişim hem de implantasyon başarılarının düşük olacağı, yapılan farklı çalışmalarda gösterilmiştir<sup>290</sup>. Bu aminoasitlerin içerisinde de histidin metabolizması oldukça önemlidir zira çalışmalar klivaj embriyosundan kompaksiyona geçişte ve özellikle de blastokist oluşumunda histidin önemli bir rol oynadığını göstermiştir<sup>291</sup>. Çalışmamızın sonuçları bu bilgiler doğrultusunda incelendiğinde, normal embriyolara kıyasla anlamlı derecede düşük histidin kullanımı gözlenen monozomik embriolarda kompaksiyon ve blastosist oluşumunda gruplar arasında belirgin morfolojik bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu durum, kompleks kültür şartlarının mevcudiyetine, TE biyopsi sonucu tespit edilen monozomilerin embriyo genelinde mozaik bir yapıda olabilmesi ve (ve normal kromozom yapısına sahip embriyonik hücrelerin

embriyodaki histidin metabolizmasındaki bu eksikliği kompanse edebilmesine) vs bağı olarak oluşmuş olabilir.

Oositlerde mayoz bölünmenin tamamlanması, kromozomların birleştirilmesi, ayrışması, ayrılması ve polar cisim oluşumu gibi enerji gerektiren süreçleri içerir. Dolayısıyla oosit ve erken embriyo, müteakip embriyo büyümesi ve hücre replikasyonu için enerji üretmek üzere enerji metabolitlerinin mitokondriyal solunumuna büyük ölçüde bağımlıdır <sup>292-296</sup>. Azalan oosit mitokondriyal fonksiyonu yaşlanma ile bağlantılıdır <sup>297-299</sup> ve bunun oositleri mayotik hatalara yatkın hale getirebileceği düşünülmektedir <sup>297,300</sup>.. Oosit özellikle piruvata bağımlıdır, ancak amino asitler dahil diğer substratlar da mitokondriyal solunum yoluyla enerji üretimi için metabolize edilir. Glutamik asit ve lizin amino asitlerinin de mitokondriyal solunumda çok önemli olduğu bilinmektedir <sup>301</sup>. Bu tez çalışmasında göstermiş olduğumuz monozomik embriyolardaki bu amino asitlerin metabolizmasının düşük olması da bu hipotizi doğrulamaktadır.

Amino asit döngüsünün daha önce insan embriyo gelişim potansiyelini öngördüğü gösterilmiştir <sup>205,286</sup>. Bu tez çalışması, amino asit metabolizmasıyla insan embriyosu genetik sağlığı arasındaki ilişkiyi en güvenilir şekilde ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu amino asitlerin gelecekteki in vitro embriyo gelişiminin blastokist aşamasına ve sonraki aşamalarına ilişkin tahminde değerli olduğu gösterildiğinden, normal ve monozomik embriyolar karşılaştırıldığında asparajin ve glisin metabolizmasında farklılıkların saptanması özellikle ilgi çekicidir. Bu amino asitlerin, blastokist aşamasına kadar in vitro embriyo gelişimi ve embriyo transferini takiben sonraki gebelik potansiyelinin tahmininde değerli oldukları gösterilmiştir. Fazladan veya eksik kromozom kopyaları ile nükleer gen dozajı bozulur ve bu da transkripsiyon düzenlemesinin değişmesine neden olabilir <sup>302,303</sup>. Ayrıca, değiştirilmiş kopya numaralarına sahip kromozomların nükleer konumu değiştirdiği daha önce bildirilmiştir ve ek olarak anormal çekirdeklerde, tüm kromozomlar (kopya sayısından bağımsız olarak) nükleer dağılımı değiştirme eğilimindedir <sup>304</sup>. Kromozom ve nükleer

mimarinin gen ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir <sup>305,306</sup>, bu nedenle anormal hücrelerde birden fazla kromozomdan transkripsiyonun değiştirilmesi mümkündür. Amino asit taşınması ve metabolizmasının farklı unsurları, çoklu kromozomlardaki çoklu genler tarafından kodlanır. Bu nedenle, kromozom içeriğinin değişmesinin, hücre altı mekanizmayı değiştirdiği varsayılabilir ve bu değişiklikler, blastomer metabolizmasındaki bir değişiklik ile kendini gösterecektir. Bu fikri desteklemek için, trizomi 21'li bireylerde, lizin ve serin dahil olmak üzere plazma amino asit seviyeleri değiştirilmiştir <sup>307</sup>. Bu tez çalışmasında da lizin aminoasit seviyesinde değişim gözlenmekle birlikte, istatistiksel anlamlılık gözlemlenmemiştir.

Sunulan veriler, amino asit tüketiminin/üretiminin blastokist potansiyelini öngördüğünü ve tamamen normal ve anormal embriyolarda amino asit profili ile genetik sağlık arasındaki bağlantının klinik öneme sahip olduğunu açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak, embriyonik öploidi/anöploidi tanısının girişimsel olmayan şekilde amino asit metabolizması üzerinden karakterize etmek için yapılan bu çalışmamızda elde edilen sonuçlar kompleks anöploidi, kaotik, monozomik ve trizomik embriyoların gruplar arasında istatistiksel olarak ayırt edebileceğini göstermektedir. Amino asitlerin kullanımı, rahime transfer edildikten sonra implante edilen embriyoların oranında önemli bir artışa ve hamileliği sağlamak için transfer edilmesi gereken sayıda azalmaya yol açmıştır. Amino asitlerin sağlıklı insan blastokistlerinin gelişimini desteklediği mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, göstergeler, bu mekanizmaların birçoğunun insan ve fare embriyolarında aynı olduğunu göstermektedir. Esansiyel olmayan amino asit taşınması, öncelikle bölünme sırasında gelişimi artırırken, esansiyel amino asit taşınması, özellikle sekiz hücreli aşamadan sonra daha canlı embriyoların gelişimini destekler. Tirozin esansiyel olmayan bir amino asit olup, embriyo gelişiminin birinci günden, üçüncü güne kadar olan gelişimi için önemlidir. Bununla birlikte, tirozin amino asit metabolizması hakkında mevcut olan yetersiz bilgi ve ayrıca bilinen metabolizma ve amino asit

taşıyıcı sistemleri karmaşıklığı nedeniyle, bu karşılıklı ilişkilerin yorumlanması zordur. Ancak bu ayırım/tanımlama sınırlı bireysel örnek bazında yapıldığından, tirozin gibi istatistiksel olarak anlamlı bir biyobelirteç olarak kullanılacak amino asit seviyelerinin tespiti için daha fazla sayıda SCM örneğinin analizine ihtiyaç vardır. Bununla birlikte yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre monozomik embriyolarla normal embriyolar kesin bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Ayrıca insan embriyosunun gelişiminde de çok önemli role sahip treonin, histidin, glisin, otnitin ve sistin amino asit tüketimlerinin farklı anöploid alt gruplarında ayırıştırıcı/tanımlayıcı ek belirteçler olarak değerlendirilebilir olması da yakın gelecekte bu sonuçların uygun bir matris-profil kapsamında kullanılabileceğini göstermektedir.



## 6 SONUÇ

Sosyoekonomik ve sosyokültürel şartlarda son yıllarda yaşanan değişimler nedeniyle dünya genelinde ÜYTE tedavilerine olan belirgin şekilde talep artmaktadır. Bu durum da beraberinde bu tedavilerin uygulama şekillerinde ve etkinliklerinde ciddi iyileştirmeler getirmektedir. Global istatistikler, eve bebek götürme oranlarında son yıllarda belirgin düzeyde artış olduğunu gösteriyor olsa da elde edilen sonuçlar halen beklenen/olması gereken oranların oldukça altındadır<sup>308</sup>. İleri anne yaşının embriyo anöploidisiyle doğrudan ilişkili olduğu, bu gruptaki kadınlar üzerinde gerçekleştirilen ÜYTE tedavilerinde artan yaş ile orantılı olarak embriyo anöploidisi kaynaklı siklus iptalleri ve başarısızlığın da göreceli olarak arttığı yapılan birçok çalışmada detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Gelişmekte olan embriyolardan/blastosistlerden embriyo biyopsi yöntemi ile hücrelerin örneklenmesi ve yeni nesil dizileme teknolojileri ile incelenmesi şeklinde gerçekleştirilen PGT-A yöntemi sonrası kromozomal olarak normal embriyoların seçilerek rahme nakli ile gebelik şansını arttırdığı bilinmektedir. Yaklaşım, embriyonik anöploidisi kaynaklı başarısızlıkların azaltılması amacıyla son zamanlarda tüp bebek tedavilerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bununla birlikte PGT-A yöntemini uygulamak için embriyoya biyopsi yapmak son derece invaziv ve (Uygun şartlarda ve şekilde yapılmadığı durumlarda) embriyoya zararı olabilecek bir yöntemdir. Bu nedenle gerek uygulama kolaylığı ve sunduğu olanaklar, gerekse embriyoya zarar verebilme ihtimalinin son derece düşük olmasından dolayı farklı alternatif non-invaziv yöntemler araştırılmaktadır.

Bu tez çalışması ile, güncel genomik ve metabolomik analiz teknikleri kullanılarak kültür sıvısından non-invaziv olarak embriyonun ploidi durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Serbest DNA varlığı, miktarı ve embriyonun bütünsel kromozomal yapısını temsil yeteneği ile amino asit metabolizmasındaki değişimler incelenerek embriyoların öploidi/anöploidisi ayırımının girişimsel olmayan bir şekilde tespitinin sağlanacağı bir test geliştirmeye çalışılmıştır.

Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar, embriyonun içinde büyütüldüğü kültür ortamının örneklenmesi ve genomik olarak incelenmesi şeklinde gerçekleştiren niPGT-A yaklaşımın embriyoların klasik morfoloji-tabanlı seçim yöntemlerine ek bir “önceliklendirme” avantajı sağlayabileceğini, fakat bu yaklaşımın hem maliyet hem de testin laboratuvar/klinik ortamında valide edilmesi konusunda halen çözülmesi gereken bazı sorunların varlığı nedeniyle günümüzde rutine kolay olarak giremeyeceğine işaret etmektedir. Diğer yandan çalışmanın metabolik niPGT-A yaklaşımının değerlendirildiği ikinci kısmında kültür ortamındaki aminoasitlerin varlığı ve miktarı incelenerek öploid/anöploid ayrımının yapılabileceği istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tirozin aminoasitinin adı geçen ayrımın etkin bir şekilde yapılabileceği önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesini göstermiştir ve çalışmanın bu kısmı diğer araştırmacılara yol gösterebilmesi ve literatüre katkı sağlayabilmesi açısından SCI-expanded bir dergide yayınlanmıştır.

Sonuç olarak çalışmada elde edilen bulgu ve değerlendirmeler hem maliyet hem de rutin uygulamalara uyarlanabilir olması açısından metabolik niPGT-A yaklaşımının genomik niPGT-A yaklaşımına kıyasla yakın gelecekte yeni ve etkin bir embriyo seçim aracı olarak kullanılabilmesini göstermektedir.

Çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda yakın gelecekte planlanan çalışmalar 3 ana başlık altında değerlendirilmiştir:

1. Genomik niPGT-A alt çalışması “tartışma” kısmında belirtilen ek düzenlemeler sonrasında DNA amplifikasyon ve uyumluluk verilerinin iyileştirilmesi amacıyla daha yüksek sayıda örnekte incelenecek ve değerlendirilecektir.
2. Metabolomik niPGT-A alt çalışmasında elde edilen ayrıştırıcı eşik değer(ler)i daha fazla sayıda örnekte incelenerek hem pilot çalışmanın sonuçları valide

edilecek hem de farklı anöploidide alt gruplarında ayrıştırıcı bir seçim modeli oluşturulması açısından değerlendirilecektir.

3. Son olarak geliştirilen niPGT-A testinin klinik etkinliği prospektif ve randomize çalışma ile araştırılacaktır.



## 7 KAYNAKLAR

1. Kovacs P. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):124. doi:10.1186/1477-7827-12-124
2. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. 2018;62:2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
3. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction*. 2010;25(12):2944-2954. doi:10.1093/humrep/deq275
4. Sharara FI, Beatse SN, Leonardi MR, Navot D, Scott RT. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test\*. *Fertility and Sterility*. 1994;62(2):257-262. doi:10.1016/S0015-0282(16)56875-7
5. Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and Management of Infertility. *JAMA*. 2021;326(1):65. doi:10.1001/jama.2021.4788
6. Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. Reduced Fertility Among Overweight and Obese Men. *Epidemiology*. 2006;17(5):520-523. doi:10.1097/01.ede.0000229953.76862.e5
7. Oliva R, Castillo J, Estanyol J, Balleascà J. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian Journal of Andrology*. 2015;17(4):601. doi:10.4103/1008-682X.153302
8. Anderson RA, Themmen APN, -Qahtani AA, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Human Reproduction*. 2006;21(10):2583-2592. doi:10.1093/humrep/del201
9. Howell SJ. Spermatogenesis After Cancer Treatment: Damage and Recovery. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2005;2005(34):12-17. doi:10.1093/jncimonographs/lgi003
10. Huddart RA, Norman A, Moynihan C, et al. Fertility, gonadal and sexual function in survivors of testicular cancer. *British Journal of Cancer*. 2005;93(2):200-207. doi:10.1038/sj.bjc.6602677
11. Wheatcroft NJ, Salt C, Milford-Ward A, Cooke ID, Weetman AP. Identification of ovarian antibodies by immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay or immunoblotting in premature ovarian failure. *Human Reproduction*. 1997;12(12):2617-2622. doi:10.1093/humrep/12.12.2617
12. Fishel S, Lisi F, Rinaldi L, et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus high insemination concentration (HIC) for human conception in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995;7(2):169. doi:10.1071/RD9950169
13. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, Sixth Edition*. WHO; 2021.
14. Joris H, Nagy Z, van de Velde H, de Vos A, van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human Reproduction*. 1998;13(suppl 1):76-86. doi:10.1093/humrep/13.suppl\_1.76
15. Muthigi A, Jahandideh S, Bishop LA, et al. Clarifying the relationship between total motile sperm counts and intrauterine insemination pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. 2021;115(6):1454-1460. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.01.014
16. Magli MC, van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, van der Elst J, Gianaroli L. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Human Reproduction*. 2008;23(6):1253-1262. doi:10.1093/humrep/den068
17. Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertility and Sterility*. 2014;102(1):19-26. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.05.027

18. Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Human Reproduction Update*. 2015;21(1):39-55. doi:10.1093/humupd/dmu040
19. Youssef MM, Mantikou E, van Wely M, et al. Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Published online November 20, 2015. doi:10.1002/14651858.CD007876.pub2
20. Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2007;21(1):83-100. doi:10.1016/j.bpobgyn.2006.09.009
21. Lu J, Stewart AJ, Sadler PJ, Pinheiro TJT, Blindauer CA. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochemical Society Transactions*. 2008;36(6):1317-1321. doi:10.1042/BST0361317
22. Elder K, Dale B, eds. *In Vitro Fertilization*. Third Edition. Cambridge University Press; 2001.
23. Larose H, Shami AN, Abbott H, Manske G, Lei L, Hammoud SS. Gametogenesis: A journey from inception to conception. In: ; 2019:257-310. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.12.006
24. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CLR. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction Update*. 2015;21(6):711-726. doi:10.1093/humupd/dmv042
25. Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*. 2013;140(22):4471-4479. doi:10.1242/dev.090613
26. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *Journal of Reproductive Immunology*. 2002;55(1-2):85-100. doi:10.1016/S0165-0378(01)00136-X
27. Wolpert L, Beddington R, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E, Smith J, eds. *Principles of Development*. Third Edition. Oxford University Press; 2006.
28. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;35(5):494-510. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.015
29. Cutting R, Morroll D, Roberts SA, Pickering S, Rutherford A, on behalf of the BFS and ACE. Elective Single Embryo Transfer: Guidelines for Practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Human Fertility*. 2008;11(3):131-146. doi:10.1080/14647270802302629
30. Balaban B, Brison D, Calderon G, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*. 2011;26(6):1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037
31. Veeck LL, ed. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. CRC Press; 1999.
32. Rijnders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 1998;13(10):2869-2873. doi:10.1093/humrep/13.10.2869
33. Rehman KS, Bukulmez O, Langley M, et al. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertility and Sterility*. 2007;87(5):1041-1052. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.014
34. Guerif F, le Gouge A, Giraudeau B, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: A prospective study based on 4042 embryos. *Human Reproduction*. 2007;22(7):1973-1981. doi:10.1093/humrep/dem100
35. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012;139(5):829-841. doi:10.1242/dev.060426
36. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Current Opinion in Obstetrics and Gynaecology*. 1999;11(3):307-311. doi:10.1097/00001703-199906000-00013
37. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2008;23(1):91-99. doi:10.1093/humrep/dem339

38. Mizobe Y, Ezono Y, Tokunaga M, et al. Selection of human blastocysts with a high implantation potential based on timely compaction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017;34(8):991-997. doi:10.1007/s10815-017-0962-y
39. Majumdar G, Majumdar A, Verma IC, Upadhyaya KC. Relationship Between Morphology, Euploidy and Implantation Potential of Cleavage and Blastocyst Stage Embryos. *J Hum Reprod Sci*. 10(1):49-57. doi:10.4103/0974-1208.204013
40. Tannus S, Cohen Y, Son WY, Shavit T, Dahan MH. Cumulative live birth rate following elective single blastocyst transfer compared with double blastocyst transfer in women aged 40 years and over. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;35(6):733-738. doi:10.1016/j.rbmo.2017.07.017
41. Herbemont C, Sarandi S, Boujenah J, et al. Should we consider day-2 and day-3 embryo morphology before day-5 transfer when blastocysts reach a similar good quality? *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;35(5):521-528. doi:10.1016/j.rbmo.2017.07.014
42. Bouillon C, Celton N, Kassem S, Frapsauce C, Guérif F. Obstetric and perinatal outcomes of singletons after single blastocyst transfer: is there any difference according to blastocyst morphology? *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;35(2):197-207. doi:10.1016/j.rbmo.2017.04.009
43. Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*. 2003;112(4):423-440. doi:10.1016/s0092-8674(03)00083-7
44. Compton DA. Mechanisms of aneuploidy. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;23(1):109-113. doi:10.1016/j.ceb.2010.08.007
45. Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet*. 1996;59(1):176-184.
46. 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):382-391.
47. Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, Jacobs PA. Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction. *Am J Hum Genet*. 1995;56(3):669-675.
48. Zaragoza M v, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S, Hassold T. Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum Genet*. 1994;94(4):411-417. doi:10.1007/BF00201603
49. Antonarakis SE. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med*. 1991;324(13):872-876. doi:10.1056/NEJM199103283241302
50. May KM, Jacobs PA, Lee M, et al. The parental origin of the extra X chromosome in 47,XXX females. *Am J Hum Genet*. 1990;46(4):754-761.
51. Hassold T, Jacobs PA, Leppert M, Sheldon M. Cytogenetic and molecular studies of trisomy 13. *J Med Genet*. 1987;24(12):725-732. doi:10.1136/jmg.24.12.725
52. Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S. Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet*. 1995;57(4):867-874.
53. Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update*. 4(6):842-855. doi:10.1093/humupd/4.6.842
54. Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod*. 2000;15(8):1781-1786. doi:10.1093/humrep/15.8.1781
55. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn*. 1995;15(1):41-49. doi:10.1002/pd.1970150109

56. Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet.* 1997;99(6):755-760. doi:10.1007/s004390050443
57. Harrison RH, Kuo HC, Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM. Lack of cell cycle checkpoints in human cleavage stage embryos revealed by a clonal pattern of chromosomal mosaicism analysed by sequential multicolour FISH. *Zygote.* 2000;8(3):217-224. doi:10.1017/s0967199400001015
58. McCoy RC. Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. *Trends Genet.* 2017;33(7):448-463. doi:10.1016/j.tig.2017.04.001
59. Huang J, Yan L, Lu S, Zhao N, Qiao J. Re-analysis of aneuploidy blastocysts with an inner cell mass and different regional trophoctoderm cells. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(4):487-493. doi:10.1007/s10815-017-0875-9
60. Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophoctoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2013;28(8):2298-2307. doi:10.1093/humrep/det245
61. Popovic M, Dheedene A, Christodoulou C, et al. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate challenge of preimplantation genetic testing? *Hum Reprod.* 2018;33(7):1342-1354. doi:10.1093/humrep/dey106
62. Liu J, Wang W, Sun X, et al. DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic. *Biol Reprod.* 2012;87(6):148. doi:10.1095/biolreprod.112.103192
63. Spinella F, Fiorentino F, Biricik A, et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. *Fertility and Sterility.* 2018;109(1):77-83. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.09.025
64. Munné S, Blazek J, Large M, et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril.* 2017;108(1):62-71.e8. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.002
65. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *New England Journal of Medicine.* 2015;373(21):2089-2090. doi:10.1056/NEJMc1500421
66. van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Human Reproduction Update.* 2011;17(5):620-627. doi:10.1093/humupd/dmr014
67. DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D, DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and Sterility.* 2008;90(4):1049-1054. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.07.1337
68. Hanson C, Hardarson T, Lundin K, et al. Re-analysis of 166 embryos not transferred after PGS with advanced reproductive maternal age as indication. *Human Reproduction.* 2009;24(11):2960-2964. doi:10.1093/humrep/dep264
69. Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human Reproduction.* 2013;28(1):256-264. doi:10.1093/humrep/des362
70. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility.* 2013;100(3):624-630. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.039
71. Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Wilson JM, Crain JL, Griffin DK. Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates between day 5 and day 6 blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online.* 2014;29(3):305-310. doi:10.1016/j.rbmo.2014.06.001

72. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Human Reproduction*. 2014;29(6):1173-1181. doi:10.1093/humrep/deu033
73. Su Y, Li JJ, Wang C, Haddad G, Wang WH. Aneuploidy analysis in day 7 human blastocysts produced by in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14:20. doi:10.1186/s12958-016-0157-x
74. Kovalevsky G, Carney SM, Morrison LS, Boylan CF, Neithardt AB, Feinberg RF. Should embryos developing to blastocysts on day 7 be cryopreserved and transferred: an analysis of pregnancy and implantation rates. *Fertility and Sterility*. 2013;100(4):1008-1012. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.06.021
75. Irani M, Zaninovic N, Canon C, et al. A rationale for biopsying embryos reaching the morula stage on Day 6 in women undergoing preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Human Reproduction*. 2018;33(5):935-941. doi:10.1093/humrep/dey053
76. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertility and Sterility*. 2011;95(2):520-524. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.04.003
77. Munné S, Wells D, Cohen J. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertility and Sterility*. 2010;94(2):408-430. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.02.091
78. Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*. 2005;20(2):437-442. doi:10.1093/humrep/deh626
79. Lu L, Lv B, Huang K, Xue Z, Zhu X, Fan G. Recent advances in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33(9):1129-1134. doi:10.1007/s10815-016-0750-0
80. de Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV–XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013†. *Human Reproduction*. 2017;32(10):1974-1994. doi:10.1093/humrep/dex265
81. Coonen E, van Montfoort A, Carvalho F, et al. ESHRE PGT Consortium data collection XVI–XVIII: cycles from 2013 to 2015†. *Human Reproduction Open*. 2020;2020(4). doi:10.1093/hropen/hoaa043
82. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Human Reproduction Update*. 2012;18(3):234-247. doi:10.1093/humupd/dmr052
83. Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertility and Sterility*. 2019;112(6):1071-1079.e7. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.07.1346
84. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertility and Sterility*. 2013;100(3):595-602. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.1965
85. Coonen E, Rubio C, Christopikou D, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations†. *Human Reproduction Open*. 2020;2020(3). doi:10.1093/hropen/hoaa017
86. DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D, DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and Sterility*. 2008;90(4):1049-1054. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.07.1337
87. Scriven PN, Kirby TL, Ogilvie CM. FISH for Pre-implantation Genetic Diagnosis. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(48). doi:10.3791/2570
88. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*. 2010;94(5):1700-1706. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.015

89. Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Molecular Human Reproduction*. 2008;14(12):703-710. doi:10.1093/molehr/gan062
90. Bejjani BA, Shaffer LG. Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2006;8(5):528-533. doi:10.2353/jmoldx.2006.060029
91. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33(7):823-832. doi:10.1007/s10815-016-0740-2
92. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertility and Sterility*. 2014;101(5):1375-1382.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.01.051
93. Ajduk A, Zernicka-Goetz M. Quality control of embryo development. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013;34(5):903-918. doi:10.1016/j.mam.2013.03.001
94. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Human Reproduction*. 2016;31(4):685-686. doi:10.1093/humrep/dew016
95. Oliva M, Briton-Jones C, Gounko D, Lee JA, Copperman AB, Sekhon L. Factors associated with vitrification-warming survival in 6167 euploid blastocysts. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021;38(10):2671-2678. doi:10.1007/s10815-021-02284-0
96. Sciorio R, Tramontano L, Catt J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecological Endocrinology*. 2020;36(1):6-11. doi:10.1080/09513590.2019.1641194
97. Viotti M, McCoy RC, Griffin DK, et al. Let the data do the talking: the need to consider mosaicism during embryo selection. *Fertility and Sterility*. 2021;116(5):1212-1219. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.09.008
98. Chow DJX, Wijesinghe P, Dholakia K, Dunning KR. Does artificial intelligence have a role in the IVF clinic? *Reproduction and Fertility*. 2021;2(3):C29-C34. doi:10.1530/RAF-21-0043
99. Wasielak-Politowska M, Kordowitzki P. Chromosome Segregation in the Oocyte: What Goes Wrong during Aging. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):2880. doi:10.3390/ijms23052880
100. Mantikou E, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(12):1921-1930. doi:10.1016/j.bbadis.2012.06.013
101. Alteri A, Corti L, Sanchez AM, Rabellotti E, Papaleo E, Viganò P. Assessment of pre-implantation genetic testing for embryo aneuploidies: A SWOT analysis. *Clinical Genetics*. 2019;95(4):479-487. doi:10.1111/cge.13510
102. Bellver J, Bosch E, Espinós JJ, et al. Second-generation preimplantation genetic testing for aneuploidy in assisted reproduction: a SWOT analysis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2019;39(6):905-915. doi:10.1016/j.rbmo.2019.07.037
103. Tocci A. The unknown human trophoctoderm: implication for biopsy at the blastocyst stage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020;37(11):2699-2711. doi:10.1007/s10815-020-01925-0
104. Berger JJ. Primum non nocere: are we closer to saying that the trophoctoderm biopsy does no harm? *Fertility and Sterility*. 2019;112(1):35-36. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.04.009
105. Gianaroli L, Magli MC, Pomante A, et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertility and Sterility*. 2014;102(6):1692-1699.e6. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.08.021
106. Poli M, Jaroudi S, Sarasa J, Spath K, Child T, Wells D. The blastocoel fluid as a source of DNA for preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility*. 2013;100(3):S37. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.1789

107. Perloe M, Welch C, Morton P, Venier W, Wells D, Palini S. Validation of blastocoele fluid aspiration for preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization (aCGH). *Fertility and Sterility*. 2013;100(3):S208. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.1384
108. Palini S, Galluzzi L, de Stefani S, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013;26(6):603-610. doi:10.1016/j.rbmo.2013.02.012
109. Tobler KJ, Zhao Y, Ross R, et al. Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertility and Sterility*. 2015;104(2):418-425. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.04.028
110. Huang G, Zhou C, Wei C ju, et al. Evaluation of in vitro fertilization outcomes using interleukin-8 in culture medium of human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility*. 2017;107(3):649-656. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.11.031
111. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoctoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertility and Sterility*. 2016;105(1):225-235.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.014
112. Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Molecular Human Reproduction*. 2009;15(5):271-277. doi:10.1093/molehr/gap012
113. Sánchez-Ribas I, Diaz-Gimeno P, Quiñonero A, et al. NGS Analysis of Human Embryo Culture Media Reveals miRNAs of Extra Embryonic Origin. *Reproductive Sciences*. 2019;26(2):214-222. doi:10.1177/1933719118766252
114. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and Sterility*. 2017;107(1):220-228.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.015
115. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Human Reproduction*. 2018;33(4):745-756. doi:10.1093/humrep/dey028
116. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Human Reproduction Update*. 2020;26(1):16-42. doi:10.1093/humupd/dmz033
117. Chen L, Sun Q, Xu J, et al. A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9. doi:10.3389/fcell.2021.708322
118. Sullivan EA, Wang YA, Hayward I, et al. Single embryo transfer reduces the risk of perinatal mortality, a population study. *Human Reproduction*. 2012;27(12):3609-3615. doi:10.1093/humrep/des315
119. Minasi MG, Greco P, Varricchio MT, Barillari P, Greco E. The clinical use of time-lapse in human-assisted reproduction. *Therapeutic Advances in Reproductive Health*. 2020;14:263349412097692. doi:10.1177/2633494120976921
120. Hernández-Vargas P, Muñoz M, Domínguez F. Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Human Reproduction Update*. 2020;26(2):264-301. doi:10.1093/humupd/dmz042
121. Dolinko A v., Farland L v., Kaser DJ, Missmer SA, Racowsky C. National survey on use of time-lapse imaging systems in IVF laboratories. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017;34(9):1167-1172. doi:10.1007/s10815-017-0964-9
122. Boueilh T, Reignier A, Barriere P, Freour T. Time-lapse imaging systems in IVF laboratories: a French national survey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018;35(12):2181-2186. doi:10.1007/s10815-018-1302-6
123. The Alpha Consensus Meeting on the professional status of the clinical embryologist: proceedings of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015;30(5):451-461. doi:10.1016/j.rbmo.2015.01.016

124. Balaban B, Brison D, Calderon G, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*. 2011;26(6):1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037
125. VerMilyea M, Hall JMM, Diakiw SM, et al. Development of an artificial intelligence-based assessment model for prediction of embryo viability using static images captured by optical light microscopy during IVF. *Human Reproduction*. 2020;35(4):770-784. doi:10.1093/humrep/deaa013
126. HLINKA D, KALÁTOVÁ B, UHRINOVÁ I, et al. Time-Lapse Cleavage Rating Predicts Human Embryo Viability. *Physiological Research*. Published online October 31, 2012:513-525. doi:10.33549/physiolres.932287
127. VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multi-centre study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014;29(6):729-736. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.005
128. Kovacs P, Matyas S, Forgacs V, Sajgo A, Molnar L, Pribenszky C. Non-invasive embryo evaluation and selection using time-lapse monitoring: Results of a randomized controlled study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2019;233:58-63. doi:10.1016/j.ejogrb.2018.12.011
129. Tran D, Cooke S, Illingworth PJ, Gardner DK. Deep learning as a predictive tool for fetal heart pregnancy following time-lapse incubation and blastocyst transfer. *Human Reproduction*. 2019;34(6):1011-1018. doi:10.1093/humrep/dez064
130. Khosravi P, Kazemi E, Zhan Q, et al. Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after in vitro fertilization. *npj Digital Medicine*. 2019;2(1):21. doi:10.1038/s41746-019-0096-y
131. Chawla M, Fakhri M, Shunnar A, et al. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015;32(1):69-75. doi:10.1007/s10815-014-0372-3
132. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, et al. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015;30(1):57-66. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.012
133. Ottolini C, Rienzi L, Capalbo A. A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014;28(3):273-275. doi:10.1016/j.rbmo.2013.10.015
134. Huang TT, Huang DH, Ahn HJ, Arnett C, Huang CT. Early blastocyst expansion in euploid and aneuploid human embryos: evidence for a non-invasive and quantitative marker for embryo selection. *Reproductive BioMedicine Online*. 2019;39(1):27-39. doi:10.1016/j.rbmo.2019.01.010
135. Rocafort E, Enciso M, Leza A, Sarasa J, Aizpurua J. Euploid embryos selected by an automated time-lapse system have superior SET outcomes than selected solely by conventional morphology assessment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018;35(9):1573-1583. doi:10.1007/s10815-018-1265-7
136. Reignier A, Lammers J, Barriere P, Freour T. Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;36(4):380-387. doi:10.1016/j.rbmo.2018.01.001
137. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013;27(2):140-146. doi:10.1016/j.rbmo.2013.04.013
138. de Gheselle S, Jacques C, Chambost J, et al. Machine learning for prediction of euploidy in human embryos: in search of the best-performing model and predictive features. *Fertility and Sterility*. 2022;117(4):738-746. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.11.029

139. Huang B, Tan W, Li Z, Jin L. An artificial intelligence model (euploid prediction algorithm) can predict embryo ploidy status based on time-lapse data. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021;19(1):185. doi:10.1186/s12958-021-00864-4
140. del Carmen Nogales M, Bronet F, Basile N, et al. Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. *Fertility and Sterility*. 2017;107(1):229-235.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.09.019
141. Yang Z, Zhang J, Salem SA, et al. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC Medical Genomics*. 2014;7(1):38. doi:10.1186/1755-8794-7-38
142. Swain JE. Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013;30(8):1081-1090. doi:10.1007/s10815-013-0048-4
143. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(17):1589-1597. doi:10.1056/NEJMoa1407349
144. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Human Reproduction Update*. 2020;26(1):16-42. doi:10.1093/humupd/dmz033
145. Chen L, Sun Q, Xu J, et al. A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9. doi:10.3389/fcell.2021.708322
146. Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reproductive BioMedicine Online*. Published online January 2022. doi:10.1016/j.rbmo.2022.01.012
147. Kuznyetsov V, Madjunkova S, Antes R, et al. Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. *PLOS ONE*. 2018;13(5):e0197262. doi:10.1371/journal.pone.0197262
148. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertility and Sterility*. 2019;112(3):510-519. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.04.038
149. Zmuidinaite R, Sharara FI, Iles RK. Current Advancements in Noninvasive Profiling of the Embryo Culture Media Secretome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):2513. doi:10.3390/ijms22052513
150. Zhang X, Sun Y, Dong X, et al. Mitochondrial DNA and genomic DNA ratio in embryo culture medium is not a reliable predictor for in vitro fertilization outcome. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5378. doi:10.1038/s41598-019-41801-1
151. Scott RT, Galliano D. The challenge of embryonic mosaicism in preimplantation genetic screening. *Fertility and Sterility*. 2016;105(5):1150-1152. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.01.007
152. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and Sterility*. 2017;107(1):220-228.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.015
153. Pan M, Shi H, Liu Z, Dong J, Cai L, Ge Q. The integrity of cfDNA in follicular fluid and spent medium from embryo culture is associated with embryo grade in patients undergoing in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021;38(12):3113-3124. doi:10.1007/s10815-021-02357-0
154. Brouillet S, Martinez G, Coutton C, Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*. 2020;40(6):779-796. doi:10.1016/j.rbmo.2020.02.002
155. Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy and the Mystery of Genetic Material: A Review Article. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(7):3568. doi:10.3390/ijms23073568

156. Liu W, Liu J, Du H, Ling J, Sun X, Chen D. Non-invasive pre-implantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium. *Annals of Medicine*. 2017;49(4):319-328. doi:10.1080/07853890.2016.1254816
157. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and Sterility*. 2017;107(1):220-228.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.015
158. Feichtinger M, Vaccari E, Carli L, et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;34(6):583-589. doi:10.1016/j.rbmo.2017.03.015
159. Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(42):11907-11912. doi:10.1073/pnas.1613294113
160. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertility and Sterility*. 2016;106(6):1312-1318. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.07.1112
161. Galluzzi L, Palini S, Stefani S de, et al. Extracellular embryo genomic DNA and its potential for genotyping applications. *Future Science OA*. 2015;1(4). doi:10.4155/fso.15.62
162. Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2014;20(12):1238-1246. doi:10.1093/molehr/gau086
163. Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction*. 2013;28(10):2652-2660. doi:10.1093/humrep/det314
164. Gahan PB, Swaminathan R. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137(1):1-6. doi:10.1196/annals.1448.050
165. Gianaroli L, Magli MC, Pomante A, et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertility and Sterility*. 2014;102(6):1692-1699.e6. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.08.021
166. Herrera C, Morikawa MI, Castex CB, et al. Blastocoele fluid from in vitro- and in vivo-produced equine embryos contains nuclear DNA. *Theriogenology*. 2015;83(3):415-420. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.10.006
167. Magli MC, Pomante A, Cafueri G, et al. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertility and Sterility*. 2016;105(3):676-683.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.018
168. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction*. 1997;3(10):919-925. doi:10.1093/molehr/3.10.919
169. Wu H, Ding C, Shen X, et al. Medium-Based Noninvasive Preimplantation Genetic Diagnosis for Human  $\alpha$ -Thalassemias-SEA. *Medicine*. 2015;94(12):e669. doi:10.1097/MD.0000000000000669
170. Tobler KJ, Zhao Y, Ross R, et al. Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertility and Sterility*. 2015;104(2):418-425. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.04.028
171. Hardy K, Handyside AH, Winston RM. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development*. 1989;107(3):597-604. doi:10.1242/dev.107.3.597
172. Bakri NM, Ibrahim SF, Osman NA, et al. Embryo apoptosis identification: Oocyte grade or cleavage stage? *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(1):S50-S55. doi:10.1016/j.sjbs.2015.10.023

173. Hammond ER, Shelling AN, Cree LM. Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use. *Human Reproduction*. 2016;31(8):1653-1661. doi:10.1093/humrep/dew132
174. Chi HJ, Koo JJ, Choi SY, Jeong HJ, Roh SI. Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. *Fertility and Sterility*. 2011;96(1):187-192. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.020
175. Krysko D v., vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008;44(3):205-221. doi:10.1016/j.ymeth.2007.12.001
176. Hardy K, Stark J, Winston RML. Maintenance of the Inner Cell Mass in Human Blastocysts from Fragmented Embryos. *Biology of Reproduction*. 2003;68(4):1165-1169. doi:10.1095/biolreprod.102.010090
177. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013;2(1):20677. doi:10.3402/jev.v2i0.20677
178. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. A historical and evolutionary perspective on the biological significance of circulating DNA and extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(23):4355-4381. doi:10.1007/s00018-016-2370-3
179. Qu P, Qing S, Liu R, et al. Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0174535. doi:10.1371/journal.pone.0174535
180. Pallinger E, Bognar Z, Bodis J, et al. A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Scientific Reports*. 2017;7(1):39927. doi:10.1038/srep39927
181. Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AET, Devor E, Christenson L, van Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertility and Sterility*. 2013;99(3):855-861.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.001
182. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoctoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertility and Sterility*. 2016;105(1):225-235.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.014
183. Hawke DC, Watson AJ, Betts DH. Extracellular vesicles, microRNA and the preimplantation embryo: non-invasive clues of embryo well-being. *Reproductive BioMedicine Online*. 2021;42(1):39-54. doi:10.1016/j.rbmo.2020.11.011
184. Battaglia R, Palini S, Vento ME, et al. Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoele fluid. *Scientific Reports*. 2019;9(1):84. doi:10.1038/s41598-018-36452-7
185. Vyas P, Balakier H, Librach CL. Ultrastructural identification of CD9 positive extracellular vesicles released from human embryos and transported through the zona pellucida. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2019;65(4):273-280. doi:10.1080/19396368.2019.1619858
186. Tesfaye D, Menjivar N, Gebremedhn S. Current knowledge and the future potential of extracellular vesicles in mammalian reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*. 2022;34(2):174. doi:10.1071/RD21277
187. Pallinger E, Bognar Z, Bodis J, et al. A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Scientific Reports*. 2017;7(1):39927. doi:10.1038/srep39927
188. Galluzzi L, Palini S, Stefani S de, et al. Extracellular embryo genomic DNA and its potential for genotyping applications. *Future Science OA*. 2015;1(4). doi:10.4155/fso.15.62
189. Hammond ER, Shelling AN, Cree LM. Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use. *Human Reproduction*. 2016;31(8):1653-1661. doi:10.1093/humrep/dew132

190. Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction*. 2013;28(10):2652-2660. doi:10.1093/humrep/det314
191. Chen Y, Gao Y, Jia J, et al. DNA methylome reveals cellular origin of cell-free DNA in spent medium of human preimplantation embryos. *Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(12). doi:10.1172/JCI146051
192. Orvieto R, Shimon C, Rienstein S, Jonish-Grossman A, Shani H, Aizer A. Do human embryos have the ability of self-correction? *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020;18(1):98. doi:10.1186/s12958-020-00650-8
193. Kuznyetsov V, Madjunkova S, Abramov R, et al. Minimally Invasive Cell-Free Human Embryo Aneuploidy Testing (miPGT-A) Utilizing Combined Spent Embryo Culture Medium and Blastocoel Fluid –Towards Development of a Clinical Assay. *Scientific Reports*. 2020;10(1):7244. doi:10.1038/s41598-020-64335-3
194. Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, et al. Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertility and Sterility*. 2018;110(5):870-879.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.05.031
195. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Human Reproduction*. 2018;33(4):745-756. doi:10.1093/humrep/dey028
196. Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(42):11907-11912. doi:10.1073/pnas.1613294113
197. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertility and Sterility*. 2019;112(3):510-519. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.04.038
198. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Human Reproduction Update*. 2020;26(1):16-42. doi:10.1093/humupd/dmz033
199. Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophoctoderm biopsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(28):14105-14112. doi:10.1073/pnas.1907472116
200. Yin B, Zhang H, Xie J, Wei Y, Zhang C, Meng L. Validation of preimplantation genetic tests for aneuploidy (PGT-A) with DNA from spent culture media (SCM): concordance assessment and implication. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021;19(1):41. doi:10.1186/s12958-021-00714-3
201. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and Sterility*. 2017;107(1):220-228.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.015
202. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2020;223(5):751.e1-751.e13. doi:10.1016/j.ajog.2020.04.035
203. Ferrick L, Lee YSL, Gardner DK. Reducing time to pregnancy and facilitating the birth of healthy children through functional analysis of embryo physiology†. *Biology of Reproduction*. 2019;101(6):1124-1139. doi:10.1093/biolre/iox005
204. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*. 2002;17(4):999-1005. doi:10.1093/humrep/17.4.999
205. Brison DR, Houghton FD, Falconer D, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2319-2324. doi:10.1093/humrep/deh409

206. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertility and Sterility*. 2006;86(3):678-685. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.05.022
207. Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertility and Sterility*. 2006;85(1):101-107. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.011
208. Katz-Jaffe MG, McCallie BR, Janesch A, Filipovits JA, Schoolcraft WB, Gardner DK. Blastocysts from patients with polycystic ovaries exhibit altered transcriptome and secretome. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010;21(4):520-526. doi:10.1016/j.rbmo.2010.05.010
209. Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Human Reproduction*. 2008;23(9):1993-2000. doi:10.1093/humrep/den205
210. Cortezzi SS, Garcia JS, Ferreira CR, et al. Secretome of the preimplantation human embryo by bottom-up label-free proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011;401(4):1331. doi:10.1007/s00216-011-5202-1
211. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2007;88(5):1350-1357. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.07.1390
212. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertility and Sterility*. 2008;90(1):77-83. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.058
213. van Winkle LJ. Amino Acid Transport Regulation and Early Embryo Development. *Biology of Reproduction*. 2001;64(1):1-12. doi:10.1095/biolreprod64.1.1
214. Gardner D. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction Update*. 1997;3(4):367-382. doi:10.1093/humupd/3.4.367
215. Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM, Doody KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*. 1999;72(6):1035-1040. doi:10.1016/S0015-0282(99)00409-4
216. Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*. 1998;13(suppl 3):148-159. doi:10.1093/humrep/13.suppl\_3.148
217. Hammer MA. Glycine transport by single human and mouse embryos. *Human Reproduction*. 2000;15(2):419-426. doi:10.1093/humrep/15.2.419
218. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Molecular Reproduction and Development*. 1995;41(2):232-238. doi:10.1002/mrd.1080410214
219. Lane M, Hooper K, Gardner DK. Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *J Assist Reprod Genet*. 2001;18(9):519-525. doi:10.1023/a:1016657228171
220. Morris MB, Ozsoy S, Zada M, et al. Selected Amino Acids Promote Mouse Pre-implantation Embryo Development in a Growth Factor-Like Manner. *Front Physiol*. 2020;11:140. doi:10.3389/fphys.2020.00140
221. Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update*. 2003;9(6):557-582. doi:10.1093/humupd/dmg039
222. Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 2003;6(4):470-481. doi:10.1016/s1472-6483(10)62170-0
223. Steeves TE, Gardner DK. Temporal and Differential Effects of Amino Acids on Bovine Embryo Development in Culture1. *Biology of Reproduction*. 1999;61(3):731-740. doi:10.1095/biolreprod61.3.731

224. Swain JE. Controversies in ART: considerations and risks for uninterrupted embryo culture. *Reproductive BioMedicine Online*. 2019;39(1):19-26. doi:10.1016/j.rbmo.2019.02.009
225. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *Reproduction*. 1989;86(2):679-688. doi:10.1530/jrf.0.0860679
226. Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. Differential Growth of the Mouse Preimplantation Embryo in Chemically Defined Media1. *Biology of Reproduction*. 1994;50(5):1027-1033. doi:10.1095/biolreprod50.5.1027
227. Lane M, Gardner DK. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1997;14(7):398-403. doi:10.1007/BF02766148
228. Baltz JM, Tartia AP. Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media. *Human Reproduction Update*. 2010;16(2):166-176. doi:10.1093/humupd/dmp045
229. Gardner DK, Lane M. Alleviation of the “2-cell block” and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod*. 1996;11(12):2703-2712. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019195
230. Lane M, Gardner DK. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil*. 1994;102(2):305-312. doi:10.1530/jrf.0.1020305
231. Lane M, Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil*. 1997;109(1):153-164. doi:10.1530/jrf.0.1090153
232. van Winkle LJ, Campione AL. Amino acid transport regulation in preimplantation mouse embryos: Effects on amino acid content and pre- and peri-implantation development. *Theriogenology*. 1996;45(1):69-80. doi:10.1016/0093-691X(95)00356-D
233. van Winkle LJ, Dickinson HR. Differences in Amino Acid Content of Preimplantation Mouse Embryos that Develop in Vitro Versus in Vivo: In Vitro Effects of Five Amino Acids that are Abundant in Oviductal Secretions1. *Biology of Reproduction*. 1995;52(1):96-104. doi:10.1095/biolreprod52.1.96
234. Kaye PL, Schultz GA, Johnson MH, Pratt HPM, Church RB. Amino acid transport and exchange in preimplantation mouse embryos. *Reproduction*. 1982;65(2):367-380. doi:10.1530/jrf.0.0650367
235. Weitlauf HM. Changes in the protein content of blastocysts from normal and delayed implanting mice. *The Anatomical Record*. 1973;176(1):121-123. doi:10.1002/ar.1091760109
236. Spindle AI, Pedersen RA. Hatching, attachment, and outgrowth of mouse blastocysts in vitro: Fixed nitrogen requirements. *Journal of Experimental Zoology*. 1973;186(3):305-318. doi:10.1002/jez.1401860308
237. Booth PJ, Humpherson PG, Watson TJ, Leese HJ. Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro. *Reproduction*. 2005;130(5):655-668. doi:10.1530/rep.1.00727
238. Lietz CB, Gemperline E, Li L. Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(8):1074-1085. doi:10.1016/j.addr.2013.04.009
239. Emwas AHM. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. In: ; 2015:161-193. doi:10.1007/978-1-4939-2377-9\_13
240. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*. 2007;2(11):2692-2703. doi:10.1038/nprot.2007.376
241. van den Broek I, Sparidans RW, Schellens JHM, Beijnen JH. Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2008;872(1-2):1-22. doi:10.1016/j.jchromb.2008.07.021

242. Xiao JF, Zhou B, Ressom HW. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;32:1-14. doi:10.1016/j.trac.2011.08.009
243. Gault VA, McClenaghan NH, eds. *Understanding Bioanalytical Chemistry: Principles and Applications*. First edition. Wiley-Blackwell; 2009.
244. Aguilar MI, ed. *HPLC of Peptides and Proteins Methods and Protocols*. Humana Press; 2004.
245. Boynukalin FK, Serdarogullari M, Gultomruk M, Coban O, Findikli N, Bahceci M. The impact of endometriosis on early embryo morphokinetics: a case-control study. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2019;65(3):250-257. doi:10.1080/19396368.2019.1573275
246. Meng Q, Xu Y, Zheng A, et al. Noninvasive embryo evaluation and selection by time-lapse monitoring vs. conventional morphologic assessment in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a single-center randomized controlled study. *Fertility and Sterility*. 2022;117(6):1203-1212. doi:10.1016/j.fertnstert.2022.02.015
247. Chen L, Li W, Liu Y, et al. Non-invasive embryo selection strategy for clinical IVF to avoid wastage of potentially competent embryos. *Reproductive BioMedicine Online*. Published online March 2022. doi:10.1016/j.rbmo.2022.03.006
248. Huang B, Tan W, Li Z, Jin L. An artificial intelligence model (euploid prediction algorithm) can predict embryo ploidy status based on time-lapse data. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021;19(1):185. doi:10.1186/s12958-021-00864-4
249. Motiei M, Vaculikova K, Cela A, et al. Non-Invasive Human Embryo Metabolic Assessment as a Developmental Criterion. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(12):4094. doi:10.3390/jcm9124094
250. Sanchez T, Seidler EA, Gardner DK, Needleman D, Sakkas D. Will noninvasive methods surpass invasive for assessing gametes and embryos? *Fertility and Sterility*. 2017;108(5):730-737. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.10.004
251. Ferrick L, Lee YSL, Gardner DK. Reducing time to pregnancy and facilitating the birth of healthy children through functional analysis of embryo physiology†. *Biology of Reproduction*. 2019;101(6):1124-1139. doi:10.1093/biolre/ioz005
252. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Human Reproduction Update*. 2020;26(1):16-42. doi:10.1093/humupd/dmz033
253. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Human Reproduction*. 2018;33(4):745-756. doi:10.1093/humrep/dey028
254. Belandres D, Shamonki M, Arrach N. Current status of spent embryo media research for preimplantation genetic testing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019;36(5):819-826. doi:10.1007/s10815-019-01437-6
255. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2020;223(5):751.e1-751.e13. doi:10.1016/j.ajog.2020.04.035
256. Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reproductive BioMedicine Online*. 2022;44(5):817-828. doi:10.1016/j.rbmo.2022.01.012
257. Feichtinger M, Vaccari E, Carli L, et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;34(6):583-589. doi:10.1016/j.rbmo.2017.03.015
258. Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(42):11907-11912. doi:10.1073/pnas.1613294113

259. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertility and Sterility*. 2016;106(6):1312-1318. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.07.1112
260. Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, et al. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Human Reproduction*. 2005;20(5):1339-1348. doi:10.1093/humrep/deh778
261. Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N, Prapas Y, Handyside AH. Spindle abnormalities in normally developing and arrested human preimplantation embryos in vitro identified by confocal laser scanning microscopy. *Human Reproduction*. 2005;20(3):672-682. doi:10.1093/humrep/deh652
262. Akagbosu F, Marcus S, Abusheikha N, Avery S, Brinsden P. Does ovarian hyperstimulation syndrome affect the quality of oocytes? *Human Reproduction*. 1998;13(9):2583-2584. doi:10.1093/humrep/13.9.2583
263. van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*. 2001;16(6):1237-1243. doi:10.1093/humrep/16.6.1237
264. Dursun P, Gultekin M, Yuce K, Ayhan A. What is the underlying cause of aneuploidy associated with increasing maternal age? Is it associated with elevated levels of gonadotropins? *Medical Hypotheses*. 2006;66(1):143-147. doi:10.1016/j.mehy.2004.10.022
265. Baart EB, Martini E, van den Berg I, et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Human Reproduction*. 2006;21(1):223-233. doi:10.1093/humrep/dei291
266. Simón C, Rubio C, Vidal F, et al. Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reproduction, Fertility and Development*. 1998;10(1):87. doi:10.1071/R98030
267. Verpoest W, Fauser BC, Papanikolaou E, et al. Chromosomal aneuploidy in embryos conceived with unstimulated cycle IVF. *Human Reproduction*. 2008;23(10):2369-2371. doi:10.1093/humrep/den269
268. Munné S, Chen S, Colls P, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007;14(5):628-634. doi:10.1016/S1472-6483(10)61057-7
269. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenetic and Genome Research*. 2005;111(3-4):206-212. doi:10.1159/000086891
270. Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet*. 1996;59(1):176-184.
271. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Human Reproduction*. 2000;15(suppl 2):199-206. doi:10.1093/humrep/15.suppl\_2.199
272. Orsi NM, Leese HJ. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: Role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. *Molecular Reproduction and Development*. 2001;59(1):44-53. doi:10.1002/mrd.1006
273. Tarahomi M, Vaz FM, Straalen JP van, et al. The composition of human preimplantation embryo culture media and their stability during storage and culture. *Human Reproduction*. 2019;34(8):1450-1461. doi:10.1093/humrep/dez102
274. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Molecular Reproduction and Development*. 1995;41(2):232-238. doi:10.1002/mrd.1080410214
275. Leese HJ, McKeegan PJ, Sturmey RG. Amino Acids and the Early Mammalian Embryo: Origin, Fate, Function and Life-Long Legacy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(18):9874. doi:10.3390/ijerph18189874
276. Hammer MA. Glycine transport by single human and mouse embryos. *Human Reproduction*. 2000;15(2):419-426. doi:10.1093/humrep/15.2.419

277. Baltz JM. Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. In ; 2001:55-106. doi:10.1016/S0070-2153(01)52009-8
278. Steeves CL, Baltz JM. Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *Journal of Cellular Physiology*. 2005;204(1):273-279. doi:10.1002/jcp.20284
279. González IM, Martin PM, Burdsal C, et al. Leucine and arginine regulate trophoblast motility through mTOR-dependent and independent pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*. 2012;361(2):286-300. doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.021
280. Cendan JC, Souba WW, Copeland EM, Lind DS. Increased l-arginine transport in a nitric oxide-producing metastatic colon cancer cell line. *Annals of Surgical Oncology*. 1996;3(5):501-508. doi:10.1007/BF02305770
281. Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. Nitric Oxide Synthase Production and Nitric Oxide Regulation of Preimplantation Embryo Development. *Biology of Reproduction*. 2003;68(5):1538-1544. doi:10.1095/biolreprod.102.009282
282. Manser RC, Leese HJ, Houghton FD. Effect of Inhibiting Nitric Oxide Production on Mouse Preimplantation Embryo Development and Metabolism. *Biology of Reproduction*. 2004;71(2):528-533. doi:10.1095/biolreprod.103.025742
283. Lee TH, Lee MS, Huang CC, et al. Nitric oxide modulates mitochondrial activity and apoptosis through protein S-nitrosylation for preimplantation embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013;30(8):1063-1072. doi:10.1007/s10815-013-0045-7
284. Lee TH, Wu MY, Chen MJ, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*. 2004;82(1):126-131. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.02.097
285. Lee TH, Wu MY, Chen MJ, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*. 2004;82(1):126-131. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.02.097
286. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*. 2002;17(4):999-1005. doi:10.1093/humrep/17.4.999
287. Mitchell WK, Phillips BE, Hill I, et al. Human skeletal muscle is refractory to the anabolic effects of leucine during the postprandial muscle-full period in older men. *Clinical Science*. 2017;131(21):2643-2653. doi:10.1042/CS20171230
288. Seli E, Botros L, Sakkas D, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2008;90(6):2183-2189. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.07.1739
289. Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, et al. Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metabolism*. 2014;19(5):780-794. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.017
290. Gardner DK, Harvey AJ. Blastocyst metabolism. *Reproduction, Fertility and Development*. 2015;27(4):638. doi:10.1071/RD14421
291. Paria BC, Das N, Das SK, Zhao X, Dileepan KN, Dey SK. Histidine Decarboxylase Gene in the Mouse Uterus Is Regulated by Progesterone and Correlates with Uterine Differentiation for Blastocyst Implantation\*. *Endocrinology*. 1998;139(9):3958-3966. doi:10.1210/endo.139.9.6173
292. Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1967;58(2):560-567. doi:10.1073/pnas.58.2.560
293. Hardy K, Hooper MAK, Handyside AH, Rutherford AJ, Winston RML, Leese HJ. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 1989;4(2):188-191. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136869

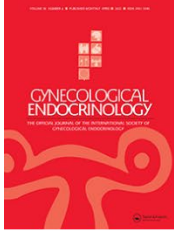
294. Wilding M, Dale B, Marino M, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 2001;16(5):909-917. doi:10.1093/humrep/16.5.909
295. Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Molecular Reproduction and Development*. 2002;62(1):113-123. doi:10.1002/mrd.10067
296. Johnson MT, Freeman EA, Gardner DK, Hunt PA. Oxidative Metabolism of Pyruvate Is Required for Meiotic Maturation of Murine Oocytes In Vivo1. *Biology of Reproduction*. 2007;77(1):2-8. doi:10.1095/biolreprod.106.059899
297. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004;8(1):45-58. doi:10.1016/S1472-6483(10)60497-X
298. Wilding M, Dale B, Marino M, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 2001;16(5):909-917. doi:10.1093/humrep/16.5.909
299. Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Molecular Human Reproduction*. 1996;2(10):717-724. doi:10.1093/molehr/2.10.717
300. Schon EA, Kim SH, Ferreira JC, et al. Chromosomal non-disjunction in human oocytes: is there a mitochondrial connection? *Human Reproduction*. 2000;15(suppl 2):160-172. doi:10.1093/humrep/15.suppl\_2.160
301. Malecki M, Kamrad S, Ralser M, Bähler J. Mitochondrial respiration is required to provide amino acids during fermentative proliferation of fission yeast. *EMBO Rep*. 2020;21(11). doi:10.15252/embr.202050845
302. Veitia RA, Bottani S, Birchler JA. Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends in Genetics*. 2008;24(8):390-397. doi:10.1016/j.tig.2008.05.005
303. Rachidi M, Lopes C. Mental retardation in Down syndrome: From gene dosage imbalance to molecular and cellular mechanisms. *Neuroscience Research*. 2007;59(4):349-369. doi:10.1016/j.neures.2007.08.007
304. McKenzie LJ, Carson SA, Marcelli S, et al. Nuclear chromosomal localization in human preimplantation embryos: correlation with aneuploidy and embryo morphology. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2231-2237. doi:10.1093/humrep/deh391
305. Simonis M, de Laat W. FISH-eyed and genome-wide views on the spatial organisation of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2008;1783(11):2052-2060. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.020
306. Finlan LE, Sproul D, Thomson I, et al. Recruitment to the Nuclear Periphery Can Alter Expression of Genes in Human Cells. *PLoS Genetics*. 2008;4(3):e1000039. doi:10.1371/journal.pgen.1000039
307. Heggarty HJ, Ball R, Smith M, Henderson MJ. Amino acid profile in Down's syndrome. *Archives of Disease in Childhood*. 1996;74(4):347-349. doi:10.1136/adc.74.4.347
308. Chambers GM, Dyer S, Zegers-Hochschild F, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014. *Human Reproduction*. 2021;36(11):2921-2934. doi:10.1093/humrep/deab198

## **8 EKLER**

### **8.1 Etik Kurul Raporu**



## 8.2 Tez Yayını



Gynecological Endocrinology



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/igye20>

### Noninvasive amino acid turnover predicts human embryo aneuploidy

I. Orcun Olcay, Berkay Akcay, Mustafa Bahceci, Aydin Arici, Kubra Boynukalin, Cengiz Yakicier, Aysel Ozpinar & Murat Basar

To cite this article: I. Orcun Olcay, Berkay Akcay, Mustafa Bahceci, Aydin Arici, Kubra Boynukalin, Cengiz Yakicier, Aysel Ozpinar & Murat Basar (2022): Noninvasive amino acid turnover predicts human embryo aneuploidy, Gynecological Endocrinology, DOI: [10.1080/09513590.2022.2068520](https://doi.org/10.1080/09513590.2022.2068520)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09513590.2022.2068520>



Published online: 28 Apr 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=igye20>

## Noninvasive amino acid turnover predicts human embryo aneuploidy

I. Orcun Olcay<sup>a,b</sup>, Berkay Akcay<sup>a</sup>, Mustafa Bahceci<sup>c</sup>, Aydin Arici<sup>d</sup>, Kubra Boynukalin<sup>c</sup>, Cengiz Yakicier<sup>b</sup>, Aysel Ozpinar<sup>b</sup> and Murat Basar<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Bahceci Umut Assisted Reproduction Center, IVF Laboratory, Istanbul, Turkey; <sup>b</sup>Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University, School of Medicine, Dept. Medical Biochemistry, Istanbul, Turkey; <sup>c</sup>Bahceci Health Group, Fulya Istanbul, Turkey; <sup>d</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA; <sup>e</sup>Medical Faculty, Department of Histology & Embryology, Biruni University, Istanbul, Turkey

### ABSTRACT

Assisted reproduction technology has two significant problems: low success rates and multiple pregnancies. Because of these problems, the priority in IVF clinics is to develop a potential diagnostic test that can be used to select the embryos with the ultimate developmental competence. Aneuploidy screening as embryo selection criteria will ensure that the transferred embryos are euploid and high implantation rate. We hypothesize that aneuploidy in human preimplantation embryos could be discriminated by their amino acid metabolism profile in the spent culture media. Preimplantation genetic testing for aneuploidy results and spent embryo culture medium amino acid content were analyzed for 58 couples. The next-generation sequencing technique was used and coupled with TE biopsy. Forty euploid and 71 aneuploid blastocysts were evaluated. Embryos were cultured individually until day 5 or 6 of embryo development. Spent culture medium was collected after finishing the culture. There was no statistical difference between D3 and D5 embryo morphology between euploid and aneuploid embryos ( $p > .05$ ). Eight amino acids, including SER, GLY, HIS, ARG, THR, ALA, PRO, and TYR, were detected in the culture medium from the blank control group, euploid group, and aneuploid group. Only TYR amino acid concentration was found significantly higher in the aneuploid group compared to the euploid group ( $p < .003$ ). Tyrosine amino acid levels equal to and above  $76.38 \mu\text{mol/L}$  could be considered aneuploid. Aneuploid embryos demonstrate altered amino acid turnover *in vitro* relative to euploid counterparts. A noninvasive method of amino acid profiling will be of value as a tool for routine preimplantation embryo selection among all patient groups.

### ARTICLE HISTORY

Received 17 December 2021  
Revised 12 April 2022  
Accepted 18 April 2022  
Published online 27 April 2022

### KEYWORDS

Aneuploidy; amino acid turnover; embryo culture media

### Introduction

Assisted reproduction technologies (ART) have two significant problems: (i) low success rates and (ii) multiple pregnancies [1,2]. Because of these problems in ART, the priority in medically assisted conception clinics is to develop a trustworthy diagnostic test that can be used to select the embryos with the ultimate developmental competence. More sophisticated methods must be employed to improve the IVF success rate by 40%, even with a limited number of embryo transfers [3–7]. Meiotic and mitotic errors in the oocyte and pre-implantation embryo can lead to different patterns of aneuploidy involving polyploidy and chaotic mosaics. Indeed, the latter account for ~30% of aneuploidies in which multiple chromosomes are affected in each cell [8]. Unfortunately, it is impossible to distinguish morphologically between euploid embryos and those with aneuploids. Thus, many of these embryos are graded as suitable for transfer [9–11]. Overall, it is well known that subjective scoring systems based on embryo morphology are an ineffective means of selecting developmentally competent embryos. Therefore, developing an alternative approach that can be used to determine the best embryos for transfer and cryopreservation is crucial.

For decades, embryo selection for transfer/cryopreservation has been based on the subjective evaluation of embryo morphology [10,12–16]. Lately, these methods have been extended to

include pro-nucleate scoring of zygotes [17,18], and cumulative scoring systems [19–22]. The development of new generation embryo culture media, which promoted blastocyst development *in vitro* with blastocyst grading [23,24] and elective single blastocyst transfer, has also been proposed as a means of improving the success of ART while at the same time minimizing multiple pregnancies [24,25]. However, these approaches have proved difficult to incorporate into the clinical practice.

Aneuploidy screening as embryo selection criteria will ensure that the transferred embryos are euploid [6]. Although some of the chromosomal errors can be assigned to suboptimal culture environments and oocyte aging [26], it is well known that the genetic composition of embryos created by IVF has identified two groups of patients who have a high risk of chromosomally abnormal embryos [4,5]. These involve (i) patients of advanced maternal age [27] and (ii) patients with repeated implantation failure [4,5]. Because an increasing proportion of women undergoing medically assisted reproduction are over 35 years old, these observations are become vital [28]. Although this evidence supports the use of aneuploidy screening in defined patient groups, together with the invasive nature of the biopsy procedure and the extra time and expense incurred, it may not justify the widespread application of this technique as a routine method for embryo selection across all patients' groups. Indeed, the use of

aneuploidy screening for this purpose has been questioned [29–34].

A noninvasive strategy that has consistently been shown to be of value in predicting the developmental potential of human embryos *in vitro* is the measurement of the metabolomic changes in the embryo's culture environment [9,11,35]. Noninvasive metabolic profiling methods are based on the analysis of spent embryo culture media. These include NMR-infrared and Raman spectroscopy and scanning electrochemical microscopy [36,37]. The measurement of amino acid turnover in spent embryo culture media by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) has proven best for detecting [35,38]. Based on the amino acid turnover, it is possible to discriminate accurately cleavage-stage embryos which can form blastocysts [38]. However, although amino acid turnover appears to be predictive of embryo developmental potential *in vitro* [38], it is unclear whether the regulation of amino acid metabolism is linked to the genetic health of the embryo.

Therefore, this study was conducted to discriminate aneuploidy in human preimplantation embryos about their amino acid metabolism profile.

## Materials and methods

Spare human embryos donated to research were obtained with informed consent from patients undergoing IVF at Bahceci Health Group Umut IVF Laboratory, Istanbul. This study was approved by the Ethics Committee of the Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University (No. 2019-8/5), and written informed consent was signed by each patient.

### Study population

In this study, preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) results and spent embryo culture medium amino acid content were analyzed for 58 couples in the Bahceci Umut IVF Center. Conventional karyotype analysis was conducted on cultured peripheral blood lymphocytes for all teams before treatment, and patients who had abnormal karyotype were excluded. Trophectoderm (TE) biopsy was used and coupled with the next-generation sequencing (NGS) technique. A total of 111 blastocysts were evaluated (euploid 40, and complex aneuploid (more than three chromosomal abnormalities) 71).

Inclusion criteria were: (i) age between 25–42 years old, (ii) body mass index between 18–26 kg/m<sup>2</sup>, (iii) male with normozoospermic, (iv) women with fallopian tube problems and required IVF for pregnancy, and (v) the couples had no abnormalities in the chromosomes. Exclusion criteria were (i) patients with a history of recurrent pregnancy loss, (ii) patients with impaired ovulation, and (iii) any secondary disorder along with infertility.

### Ovarian stimulation, oocyte retrieval, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), embryo culture, and TE biopsy

Ovarian stimulation (OS) began on day 2 of the menstrual period by employing antagonist protocol. The dosage of gonadotropins was attended based on the physician's preferences. Patients received 250 µg of human chorionic gonadotropin (hCG; Ovitrelle, Serono) or 0.2 mg of triptorelin (Gonapeptyl, Ferring) for the final oocyte maturation when at least two

follicles reached 18 mm in diameter, and TV-USG-guided follicle aspiration was performed for oocyte retrieval after 35 h [39].

As previously described, the oocyte retrieval, denudation, and ICSI procedures were performed [40]. After microinjection, oocytes were cultured individually in a unique, pre-equilibrated culture dish. In our study, single-step media—namely, single continuous culture complete (CSCM-C) with human serum albumin (Irvine Scientific, CA, USA)—was used for the embryo cultures throughout the culture period.

All embryos were kept in benchtop incubators (MIRI, ESCO Medical, Singapore) and cultured until day 5 or 6 of embryo development. On day 3, embryos were instantly taken out of the incubator. The zona pellucida was breached by assisted hatching (AH; a hole with a diameter of approximately 20 µm was created) using laser pulses (OCTAX). Embryo biopsy was performed in modified human tubal fluid (mHTF) with gentamicin (mHTF, Irvine Scientific, CA, USA) containing 10% serum substitute supplement (SSS) (Irvine Scientific, CA, USA) using the pulling method. All embryos with proper blastocoele expansion and showing trophectoderm herniation underwent a biopsy on day five and day 6. The biopsied material consisted of five to eight cells. After the biopsy, each biopsied material was individually transferred into a PCR tube and kept frozen at –20 °C until genetic analysis.

### Morphologic grading

On day 3 of embryo development, a cleavage-stage morphologic score was assigned based on a three-point grading system using features including cell number, fragmentation, symmetry, and shape [14]. At the blastocyst stage, the morphologic score was based on the expansion stage, quality of inner cell mass (ICM), and quality of TE [23]. At the time of day 3 and blastocyst morphological scoring embryologists were blinded to the study groups.

### Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A)

The analysis of the TE biopsies was performed using NGS. Whole-genome amplification (WGA) and DNA barcoding were performed using the Ion ReproSeqTMPGS kit for 24 chromosome aneuploidy screening (Thermo Fisher Scientific, USA). WGA products were pooled, purified, and quantified with Qubit™ (Qubit dsDNA HS Assay Kit ThermoFisher). The library, templates, and chip loading were prepared using Ion Chef™, and sequencing was completed using the Ion S5 System instrument (Thermo Fisher Scientific, USA). The workflow from sample processing to reporting was completed in 12–14 h, depending on the number of samples processed simultaneously. An internally validated algorithm was applied for the automated diagnosis of whole chromosome aneuploidies and partial deletions/duplications ≥ 6 Mb.

### Spent medium collection

The culture medium of embryos was collected after finishing the culture. Single culture droplets had been overlaid with oil; thus, pipetting the medium had to be made to avoid taking the oil. Embryo spent media were collected with gel pipette tips. Media were collected into 0.2 ml PCR tubes. Single embryo spent medium tubes were stored at –80 °C. As negative controls, the same amount of embryo culture medium, but without being

used for embryo culture, were collected from the same dishes. The embryo spent media samples were collected.

**The amino acid content of the spent medium**

All solvents used were HPLC grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, United States). The 24 individual amino acid standards, including histidine (His), serine (Ser), arginine (Arg), glycine (Gly), aspartate (Asp), glutamate (Glu), threonine (The), alanine (Ala), proline (Pro), cysteine (Cys), lysine (Lys), tyrosine (Tyr), methionine (Met), valine (Val), isoleucine (Ile), leucine (Leu), glutamine (Gln), asparagine (Asp), citrulline (Cit), hydroxyproline (Hyp), ornithine (Orn), Taurine (Tau), tryptophan (Trp), and phenylalanine (Phe), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, United States).

The amino acids were analyzed by reverse-phase LC-MS/MS as previously described [41], but using a Kontron 500 series automated HPLC system fitted with a Jasco F920 fluorescence detector and a 4.5 × 250 mm Hypersil ODS-16 column (Jones Chromatography, Hengoed, Mid Glamorgan, UK). Derivatization was achieved by the automated reaction of a 25 µl sample with an equal volume of reagent [10 µl 2-mercaptoethanol and 5 ml ophthalaldehyde (OPA) reagent]. The elution gradient operated at a flow rate of 1.3 ml/min. Solvent A consisted of 18 ml tetrahydrofuran (Fisher Scientific, Loughborough, Leics, UK), 200 ml methanol, and 800 ml sodium acetate (83 mmol/l, pH 5.9). Solvent B consisted of 800 ml methanol and 200 ml sodium acetate (83 mmol/l, pH 5.9). Using this method, it was not possible to detect isoleucine. Results were expressed as amino acid depletion/appearance in pmol/embryo/h ± SEM. The term ‘turnover’ has been used to describe the sum in pmol/embryo/h of amino acid depletion from, and appearance in, the culture medium.

**Statistical analysis**

Statistical analyses were made with SigmaPlot Windows version 11.0 software using an independent t test or ANOVA (*p* value <.05) and binary logistic regression with entering and Backward Stepwise Likelihood Ratio model (*p* <.05).

**Results**

**Embryo morphology**

Morphological parameters of embryo quality, the average blastomere number, the percentage of fragmentation, and symmetry on day 3 (D3), and blastocyst utilization rate (D5) (52.6 ± 0.99 vs. 50.3 ± 0.63, respectively; *p* > .05) were not statistically significant between euploid and aneuploid embryos (Table 1 and Figure 1).

**Detection of amino acids in the culture medium**

In the present study, eight amino acids, including SER, GLY, HIS, ARG, THR, ALA, PRO, and TYR, were detected in the

culture medium from the blank control group, euploid group, and aneuploid group. Mean values of detected amino acids were all determined per group (Table 2).

**Determine threshold value to select euploid embryos**

To evaluate the utility of amino acid levels in spent culture media as a marker for aneuploidy, Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated and the area under curve (AUC) for each ROC was calculated. The maximal Youden index for distinguishing aneuploid embryos from euploid embryos were achieved at a Tyrosine (Tyr) level of 76.38 µmol/L with an AUC of 0.462. Using this threshold, 87.5% of aneuploid embryos and 66.67% of euploid embryos were correctly detected (Figure 2).

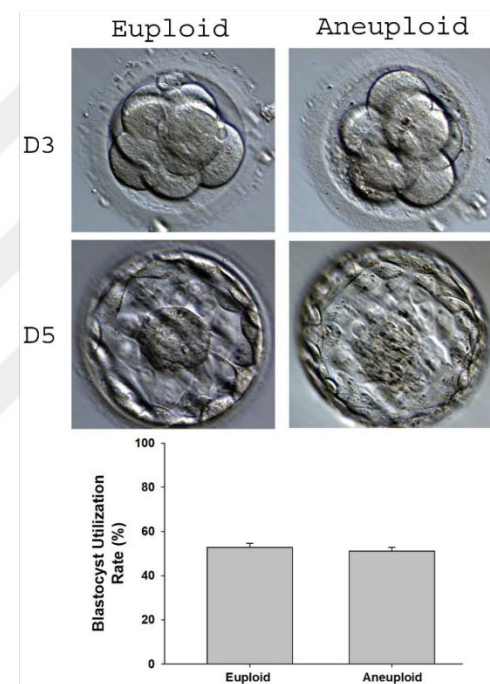


Figure 1. D3 and blastocyst utilization rate. No statistical significance between groups.

Table 1. D3 embryology parameters of analyzed embryos.

	Euploid	Aneuploid	
Number of embryos	40	71	
D3 cells (mean ± SD)	8.0 ± 0.6	8.2 ± 1.1	NS
% Fragmentation (mean ± SD)	4.2 ± 3.3	3.8 ± 2.1	NS
Symmetry	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.6	NS

NS: not significant.

Table 2. The concentration of amino acids in the recruited subjects (µmol/L).

	Euploid	Aneuploid	<i>p</i> Values
ALA	291.83 ± 12.8	315.57 ± 10.9	.171
ARG	197.19 ± 11.9	218.8 ± 8.5	.154
GLY	64.69 ± 3.2	60.94 ± 1.68	.412
HIS	85.40 ± 2.80	87.28 ± 3.18	.758
PRO	52.06 ± 3.62	55.86 ± 2.78	.124
SER	67.36 ± 4.55	58.67 ± 2.78	.259
THR	161.68 ± 12.38	158.75 ± 10.69	.798
TYR	75.15 ± 1.90	87.01 ± 2.95	.003*

\*Significant.

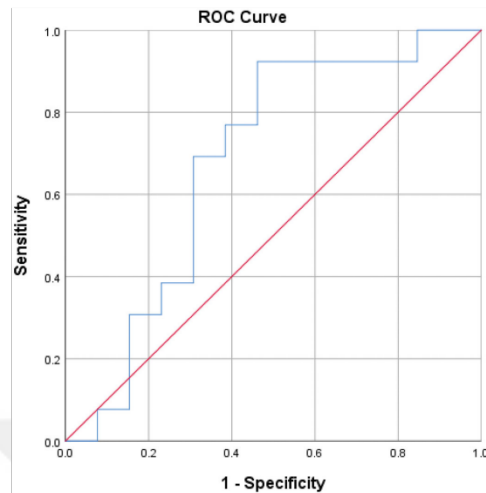


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curves for the aneuploid embryos.

## Discussion

It is now possible to base embryo selection criteria on quantifiable biological characteristics of the blastocyst rather than on subjective measures like morphology. The results of this study confirm and extend previous measurements of the turnover of a physiological mixture of eight amino acids by human preimplantation embryos [38,42]. In addition, this is the first report to directly compare the amino acid turnover of euploid and aneuploid D5 embryos and link aspects of amino acid profile with 24 chromosome assessments of embryo health.

Amino acids have vast roles in pre-implantation embryo development in addition to protein synthesis. Glycine is an osmoregulator, balancing changes in embryo cell volume [43–45]. In this context, glycine was consumed significantly by embryos cryopreserved on day 2 that lost cells during thawing. However, it is unclear from the present study whether the increased glycine consumption occurred in response to cell loss or whether it was the cause of cell swelling and subsequent lysis. Arginine consumption has been linked to increased production of nitric oxide (NO) by mammalian cells [46]. Although NO is necessary for mammalian pre-implantation embryo development [47,48], high NO is associated with apoptosis triggers [49,50]. It has previously been shown that higher rates of arginine consumption by human pre-implantation embryos are related to inadequate development [38].

Amino acid turnover has previously been shown to predict human embryo developmental potential [38,51]. The current paper represents the first association between amino acid turnover and the human D5 embryo ploidy situation. It is of particular interest that a difference was detected in tyrosine metabolism when euploid versus aneuploid embryos were compared, as this amino acid is of value in predicting pregnancy potential following embryo transfer. There are multiple possible explanations for the current observations. With extra or missing chromosomes, nuclear gene dosage becomes perturbed, leading to altered regulation of transcription [52,53]. Also, it has previously been

reported that chromosomes with altered copy numbers have altered nuclear location [54]. Additionally, all chromosomes tend to have altered nuclear distribution [54]. Chromosome and nuclear architecture are known to regulate gene expression [55,56], so it is possible that in abnormal cells, transcription from multiple chromosomes may be altered. Various chromosomes code the other amino acid transport and metabolism elements. Alteration of chromosome content can therefore be hypothesized to change the subcellular machinery, and these changes would be manifest by an alteration in blastocyst metabolism. The data presented in this paper clearly show that the link between amino acid profile and genetic health in euploid versus aneuploid embryos is of clinical importance. Additionally, amino acid turnover could be used as an index to predict the genetic health of pre-implantation human embryos. This study assessed any demonstrable links between embryo amino acid profile and aneuploidy. We determined the concentrations of amino acids in the spent embryo culture medium. SER, GLY, HIS, ARG, THR, ALA, PRO, and TYR were detected in the culture medium. There was only significance in TYR level between euploid, and aneuploid embryo spent culture media.

We have two concerns in this study: (i) one type of media was utilized in study (ii) day 5 and day 6 spent culture media were not separated (iii) the small volume of embryo culture medium (25  $\mu$ L). First, all culture media has different kinds of recipes and amino acid percentages. So, with different kinds of embryo culture media, TYR levels for detection of aneuploidy could differ. Additionally, day 5 and day 6 media could have different amino acid profiles due to prolonged time in the culture environment. For further study, we are planning to utilize percentages according to basal amino acid levels of the media and time spent in the culture environment. To detect amino acid levels, we used LC-MS/MS technique which needs more volume. To work properly, we diluted the sample accordingly with a dilution buffer. It could be feasible for a busy ART clinic and could lead to wrong or no results. We are working on an easier and more sensitive method to detect aneuploidy from the spent culture medium.

In conclusion, grossly aneuploid embryos demonstrate altered amino acid turnover *in vitro* relative to euploid counterparts. These data suggest that the noninvasive method of amino acid profiling will be of value as a tool for routine preimplantation embryo selection among all patient groups, as this technology can provide insight into human pre-implantation embryo genetic health.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

The author(s) reported there is no funding associated with the work featured in this article.

## ORCID

Berkay Akcay  <http://orcid.org/0000-0003-0585-1077>

Aysel Ozpinar  <http://orcid.org/0000-0002-7399-4929>

## References

- [1] Adamson D, Baker V. Multiple births from assisted reproductive technologies: a challenge that must be met. *Fertil Steril*. 2004;81(3):517–522.
- [2] The ESHRE Capri Workshop Group. Multiple gestation pregnancy. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum Reprod*. 2000;15(8):1856–1864.
- [3] Delhanty JDA, Harper JC, Ao A, et al. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet*. 1997;99(6):755–760.
- [4] Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril*. 1999;72(5):837–844.
- [5] Kahraman S, Bağçe M, Samli H, et al. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod*. 2000;15(9):2003–2007.
- [6] Márquez C, Sandalinas M, Bağçe M, et al. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod BioMed Online*. 2000;1(1):17–26.
- [7] Munné S, Magli C, Bağçe M, et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn*. 1998;18(13):1459–1466.
- [8] Munné S, Wells D. Questions concerning the suitability of comparative genomic hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*. 2003;80(4):871–872.
- [9] Nagy ZP, Sakkas D, Behr B. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reprod BioMed Online*. 2008;17(4):502–507.
- [10] Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod BioMed Online*. 2005;10(5):669–681.
- [11] Sturmey RG, Brison DR, Leese HJ. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reprod BioMed Online*. 2008;17(4):486–496.
- [12] Hardarson T. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*. 2001;16(2):313–318.
- [13] Puissant F, van Rysselberge M, Barlow P, et al. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod*. 1987;2(8):705–708.
- [14] Racowsky C, Combelles GM, Nureddin A, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod BioMed Online*. 2003;6(3):323–331.
- [15] Steer CV, Mills CL, Tan SL, et al. SHORT COMMUNICATION: the cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod*. 1992;7(1):117–119.
- [16] van Royen E, Mangelschots K, de Neubourg D, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod*. 1999;14(9):2345–2349.
- [17] Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod BioMed Online*. 2003;6(2):201–214.
- [18] Tesarik J. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*. 1999;14(5):1318–1323.
- [19] Chen C, Kattera S. Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertil Steril*. 2006;85(2):347–352.
- [20] Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, et al. Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2005;84(5):1411–1416.
- [21] Lan K-C. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. *Hum Reprod*. 2003;18(6):1299–1306.
- [22] Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 1998;13(4):1003–1013.
- [23] Balaban B, Brison D, Calderon G, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011;26(6):1270–1283.
- [24] Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, et al. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*. 2004;81(3):551–555.
- [25] Cutting R, Morroll D, Roberts SA, et al. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British fertility society and association of clinical embryologists. *Hum Fertil*. 2008;11(3):131–146.
- [26] Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ, et al. Karyotyping of human metaphase II oocytes by multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril*. 2003;80(4):1003–1011.
- [27] Hook EB, Cross PK, Schreinemachers DM. Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *JAMA*. 1983;249(15):2034–2038.
- [28] Medical Research International, Society for Assisted Reproductive Technology (SART), The American Fertility Society. In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1990 results from the IVF-ET Registry. *Fertil Steril*. 1992;57(1):15–24.
- [29] Anderson RA, Pickering S. The current status of preimplantation genetic screening: British Fertility Society Policy and Practice Guidelines. *Hum Fertil*. 2008;11(2):71–75.
- [30] Harper J, Sermon K, Geraedts J, et al. What next for preimplantation genetic screening? *Hum Reprod*. 2008;23(3):478–480.
- [31] Jansen RPS, Bowman MC, de Boer KA, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod*. 2008;23(7):1476–1478.
- [32] Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, et al. Preimplantation genetic screening. *Reprod BioMed Online*. 2008;17(2):293.
- [33] Platteau P, Staessen C, Michiels A, et al. Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening. *Reprod BioMed Online*. 2006;12(3):334–339.
- [34] Yakin K, Urman B. What next for preimplantation genetic screening? A clinician's perspective. *Hum Reprod*. 2008;23(8):1686–1690.
- [35] Brison DR, Hollywood K, Arnesen R, et al. Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod BioMed Online*. 2007;15(3):296–302.
- [36] Scott R, Seli E, Miller K, et al. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril*. 2008;90(1):77–83.
- [37] Seli E, Sakkas D, Scott R, et al. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007;88(5):1350–1357.
- [38] Houghton1 FD. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*. 2002;17(4):999–1005.
- [39] Borm G, Mannaerts B. Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. *Hum Reprod*. 2000;15(7):1490–1498.
- [40] Serdarogullari M, Coban O, Boynukalin FK, et al. Successful application of a single warming protocol for embryos cryopreserved by either slow freezing or vitrification techniques. *Syst Biol Reprod Med*. 2019;65(1):12–19.
- [41] Lamb VK, Leese HJ. Uptake of a mixture of amino acids by mouse blastocysts. *Reproduction*. 1994;102(1):169–175.
- [42] Stokes PJ, Hawkhead JA, Fawthrop RK, et al. Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. *Hum Reprod*. 2007;22(3):829–835.
- [43] Baltz JM. 2001. Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. p. 55–106.
- [44] Hammer MA. Glycine transport by single human and mouse embryos. *Hum Reprod*. 2000;15(2):419–426.
- [45] Steeves CL, Baltz JM. Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *J Cell Physiol*. 2005;204(1):273–279.
- [46] Cendan JC, Souba WW, Copeland EM, et al. Increased l-arginine transport in a nitric oxide-producing metastatic colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol*. 1996;3(5):501–508.
- [47] Manser RC, Leese HJ, Houghton FD. Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biol Reprod*. 2004;71(2):528–533.
- [48] Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol Reprod*. 2003;68(5):1538–1544.
- [49] Brüne B, Meßmer U K, Sandau K. The role of nitric oxide in cell injury. *Toxicol Lett*. 1995;82–83:233–237.

- [50] Nicotera P, Bonfoco E, Brüne B. Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol.* 1995;5(4):411–420.
- [51] Brison DR, Houghton FD, Falconer D, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2319–2324.
- [52] Rachidi M, Lopes C. Mental retardation in down syndrome: from gene dosage imbalance to molecular and cellular mechanisms. *Neurosci Res.* 2007;59(4):349–369.
- [53] Veitia RA, Bottani S, Birchler JA. Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends Genet.* 2008;24(8):390–397.
- [54] McKenzie LJ, Carson SA, Marcelli S, et al. Nuclear chromosomal localization in human preimplantation embryos: correlation with aneuploidy and embryo morphology. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2231–2237.
- [55] Finlan LE, Sproul D, Thomson I, et al. Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet.* 2008;4(3):e1000039.
- [56] Simonis M, de Laat W. FISH-eyed and genome-wide views on the spatial organisation of gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(11):2052–2060.



## 9 ÖZGEÇMİŞ



