T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BLASTOKİST KALİTESİNİN EMBRİYO ANÖPLOİDİSİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE UYANIK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. TÜLAY İREZ

İSTANBUL, 2026

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BLASTOKİST KALİTESİNİN EMBRİYO ANÖPLOİDİSİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE UYANIK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülay İREZ
Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Nurten DAYIOĞLU
Jüri Üyesi: Doç. Dr. Asiye İzem SANDAL

İSTANBUL, 2026

T.C.

İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ONAY BELGESİ

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı 23111102002 numaralı öğrencisi Merve UYANIK 'ın **"Blastokist Kalitesinin Embriyo Anöploidisine Etkisi"** adlı tez çalışması, Enstitümüz Yönetim Kurulunu 09.03.2026 tarih ve 2026/10 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından oy birliğiyle Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.03.2026

Prof. Dr. Tülay İREZ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Asiye İzem SANDAL

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Nurten DAYIOĞLU

Jüri Üyesi

ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tezde;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

05/ 01/ 2026

Merve Uyanık

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması sürecinde bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her aşamada destek olan değerli danışmanım **Prof. Dr. Tülay İrez**'e içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca tez izleme ve değerlendirme sürecinde katkı sunan tüm jüri üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tüm öğretim üyelerine; tez yazım sürecinde bilgi ve emeklerini esirgemeyen **Embriyolog Turan Aksoy**'a ve **Momart Tüp Bebek Merkezi** ailesine teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiren, sabırları ve anlayışlarıyla yanımda olan sevgili aileme ve çok sevgili eşim **Furkan Uyanık**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İSTANBUL, 2026 Merve UYANIK

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN i

ÖNSÖZ ii

TABLOLAR LİSTESİ v

ŞEKİLLER LİSTESİ vi

KISALTMALAR LİSTESİ vi

ÖZET viii

ABSTRACT ix

1.GİRİŞ….. 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. İnfertilite 4

2.2. İnfertilite Nedenleri 4

2.3. Yardımla Üreme Teknikleri 5

2.3.1. In Vitro Fertilizasyon 5

2.3.2. IVF Uygulamaları 6

2.3.2.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyonu 7

2.3.2.2. Oosit Toplama 7

2.3.2.3. Fertilizasyon 8

2.4. Erken Embriyonik Gelişme ve Bölünme 11

2.4.1. Blastokist Kalitesinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi 12

2.4.2. Embriyo Gelişimini Etkileyen Faktörler 14

2.4.2.1. Sperm Kaynaklı Faktörler 15

2.4.2.2. Embriyonun Metabolik Aktivitesi ve Hücresel Düzenlenmesi 16

2.4.2.3. Kültür Ortamı ve Laboratuvar Koşullarının Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi 16

2.4.2.4. Sıcaklık ve Osmolalitenin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi 18

2.4.2.5. Laboratuvar Ortamı ve Fiziksel Faktörlerin Etkisi 18

2.4.3. Genetik ve Kromozomal Faktörler 19

2.5. Embriyo Anöploidisi 20

2.5.1. Sayısal Kromozom Anomalileri (Anöploidi) 21

2.5.1.1. Monozomi 22

2.5.1.2. Trizomi 23

2.5.2. Yapısal Kromozom Anomalileri 27

2.5.2.1. Dengeli Yapısal Kromozom Anomalileri 28

2.5.2.2. Dengesiz Yapısal Kromozom Anomalileri 29

2.5.3. Mozaiklik 30

2.5.4. Anöploidiyi Belirlemede Kullanılan Yöntemler 32

2.5.4.1. FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) 33

2.5.4.2. Array CGH Tekniği (Array Comparative Genomic Hybridization) 34

2.5.4.3. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) Yöntemi . 35

3. GEREÇ VE YÖNTEM 39

3.1. Araştırmanın Türü ve Deseni 39

3.2. Araştırmanın Örneklemi 39

3.3. Veri Toplama Yöntemi 39

3.4. Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri 40

3.5. Etik Kurul Onayı 40

3.6. Blastokist Morfolojik Değerlendirme Kriterleri 41

3.7. PGT-A Uygulama Yöntemi ve NGS Protokolü 42

3.7.1. Trofektoderm Biyopsisi 42

3.7.2. DNA Amplifikasyonu ve Kütüphane Hazırlığı 42

3.7.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS) ve Veri Analizi 43

3.8. İstatistiksel Analiz 43

4.BULGULAR 45

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 49

6. KAYNAKLAR 52

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Hastaların Demografik Özellikleri 45
Tablo 2. Blastokistlerin Gardner Morfolojik Sınıflamasına Göre Kalite Gruplarına Dağılımı 46
Tablo 3. Blastokist Kalitesi İle Anöploidi Durumu Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi 46
Tablo 4. Anne Yaşı ve Blastokist Kalite Gruplarına Göre Ploidite Dağılımı 47
Tablo 5. Anne Yaşı ve Blastokist Kalitesinin Anöploidi Riski Üzerine Etkisini Gösteren Çok Değişkenli Lojistik Regresyon Analizi 48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İyi morfolojik kalite grubunu temsil eden blastokist örnekleri (Gardner ve Schoolcraft sınıflamasına göre ICM ve/veya TE derecesi A ve B olan blastokistler). 14

Şekil 2. Gardner ve Schoolcraft sınıflamasına göre düşük kalite blastokist morfolojisi örnekleri (ekspansiyon evresi 3–5, ICM ve TE derecesi C). 14

Şekil 3. Blastokist kalite gruplarında öploid ve anöploid embriyoların yüzdesel dağılımı. 47

KISALTMALAR LİSTESİ

Acgh : Dizi Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

ART : Yardımcı Üreme Teknikleri

CNV : Kopya Sayısı Varyasyonu

DNA : Deoksiribonükleik Asit

ET : Embriyo Transferi

FISH : Floresan İn Situ Hibridizasyon

GIFT : Gamet İntrafallopiyan Transfer

GV : Germinal Vezikül

ICM : İç Hücre Kitlesi

ICSI : İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IUI : İntrauterin İnseminasyon

IVF : İn Vitro Fertilizasyon

MI : Metafaz I

MII : Metafaz II

NGS : Yeni Nesil Dizileme

PGT : Preimplantasyon Genetik Test

PGT-A : Anöploidi İçin Preimplantasyon Genetik Test

PKOS: Polikistik Over Sendrom

POST : Peritoneal Oosit Ve Sperm Transferi

PZD : Parsiyel Zona Diseksiyonu

QPCR : Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA : Ribonükleik Asit

SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi

SUZI : Subzonal İnseminasyon

TE : Trofektoderm

TESA: Testiküler Sperm Aspirasyonu

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

TET : Tubal Embriyo Transferi

WGA : Tüm Genom Amplifikasyonu

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

ZIFT : Zigot İntrafallopiyan Transfer

ZP : Zona Pellusida

ÖZET

BLASTOKİST KALİTESİNİN EMBRİYO ANÖPLOİDİSİNE ETKİSİ

Embriyo seçimi, yardımcı üreme tekniklerinde gebelik başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Embriyolardaki kromozomal anomaliler implantasyon başarısızlığı ve erken gebelik kayıplarının başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Bu çalışmada blastokist morfolojik kalitesi ile embriyo anöploidisi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu retrospektif çalışmada preimplantasyon genetik test (PGT-A) uygulanan 221 blastokist incelenmiştir. Blastokistler Gardner sınıflama sistemine göre iyi, orta ve kötü kalite olarak gruplandırılmış ve kromozomal durumları yeni nesil dizileme (NGS) yöntemi ile belirlenmiştir. Blastokistlerin %55,7'si iyi kalite, %32,1'i orta kalite ve %12,2'si kötü kalite olarak sınıflandırılmıştır. Öploidi oranı iyi kalite blastokistlerde %54,5, orta kalite blastokistlerde %39,4 ve kötü kalite blastokistlerde %7,4 olarak bulunmuştur. Blastokist kalitesi azaldıkça anöploidi oranının anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır ($p < 0,001$). Çok değişkenli analizde kötü kalite blastokistlerin anöploid olma riskinin iyi kalite blastokistlere göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (OR = 12,33; $p < 0,001$). Anne yaşı ≥35 olan olgularda anöploidi oranı daha yüksek bulunmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Sonuç olarak blastokist morfolojik kalitesi ile embriyo anöploidisi arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Bununla birlikte iyi kalite blastokistlerde de anöploidi görülebilmesi nedeniyle embriyo seçiminde morfolojik değerlendirmenin genetik analizlerle desteklenmesi önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Blastokist Kalitesi, Anöploidi, Preimplantasyon Genetik Tarama, Yeni Nesil Dizileme, İnfertilite.

Merve UYANIK, 2026

ABSTRACT

THE IMPACT OF BLASTOCYST QUALITY ON EMBRYO ANEUPLOIDY

Embryo selection is a critical step affecting pregnancy success in assisted reproductive technologies. Chromosomal abnormalities are one of the main causes of implantation failure and early pregnancy loss. This study aimed to evaluate the relationship between blastocyst morphological quality and embryo aneuploidy.

In this retrospective study, 221 blastocysts that underwent preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) were analyzed. Blastocyst morphology was classified as good, moderate, or poor according to the Gardner grading system, and chromosomal status was determined using next-generation sequencing (NGS). Among the analyzed blastocysts, 55.7% were good quality, 32.1% moderate quality, and 12.2% poor quality. Euploidy rates were 54.5% in good-quality, 39.4% in moderate-quality, and 7.4% in poor-quality blastocysts. Aneuploidy rates increased significantly as blastocyst quality decreased ($p < 0.001$). Multivariate analysis showed that poor-quality blastocysts had a significantly higher risk of aneuploidy compared to good-quality blastocysts (OR = 12.33; $p < 0.001$). Maternal age ≥35 years was associated with a higher aneuploidy rate, although this relationship was not statistically significant.

In conclusion, blastocyst morphological quality is associated with embryo aneuploidy. However, since aneuploidy can also occur in good-quality blastocysts, combining morphological evaluation with genetic analysis may improve embryo selection.

Keywords: Embryo development, Blastocyst quality, Aneuploidy, Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A), Next-generation sequencing (NGS), Infertility.

Merve UYANIK, 2026

1. GİRİŞ

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT), infertilite tedavisinde son yıllarda önemli gelişmeler göstermiş ve çocuk sahibi olamayan çiftler için gebelik elde etme olasılığını artıran temel tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır. Özellikle in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrastoplazmik sperm injeksiyon (ICSI) uygulamaları sayesinde infertil çiftlerin önemli bir kısmında başarılı klinik sonuçlar elde edilebilmektedir. Bununla birlikte, yardımcı üreme tekniklerindeki teknolojik ilerlemelere rağmen elde edilen embriyoların önemli bir bölümü implantasyon başarısızlığı, erken gebelik kaybı veya embriyonik gelişimin duraklaması ile sonuçlanabilmektedir. Bu durum, yalnızca embriyo elde edilmesinin yeterli olmadığını; aynı zamanda gelişim potansiyeli yüksek ve genetik açıdan sağlıklı embriyoların seçiminin klinik başarı açısından büyük önem taşıdığını göstermektedir (Gardner & Schoolcraft, 1999; Sunkara vd., 2011).

Embriyo gelişimi; oosit ve sperm kalitesi, döllenme mekanizmaları, kültür koşulları ve genetik faktörler gibi çok sayıda değişkenin etkileşimi ile şekillenen oldukça karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreçte embriyonun kromozomal bütünlüğü, gelişim kapasitesini ve implantasyon potansiyelini belirleyen en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. İnsan embriyolarında yaygın olarak görülen genetik anomalilerden biri olan anöploidi, kromozom sayısındaki sayısal değişikliklerle karakterize olup embriyonik gelişim sürecinde gelişimsel arrest, blastokist oluşumunun engellenmesi veya gebelik kaybı gibi olumsuz klinik sonuçlara yol açabilmektedir (Fragouli & Wells, 2011; Hassold & Hunt, 2001).

Bununla birlikte, bazı anöploid embriyoların blastokist evresine kadar gelişebildiği ve morfolojik olarak yüksek kalite gösterebildiği bildirilmiştir. Bu durum, embriyo seçiminde kullanılan morfolojik değerlendirmenin embriyonun genetik yapısını her zaman doğru şekilde yansıtmayabileceğini düşündürmektedir (McCoy, 2017; Greco vd., 2015).

Klinik uygulamalarda embriyo seçimi büyük ölçüde blastokist morfolojisinin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Blastokist değerlendirmesi; blastokistin ekspansiyon derecesi, iç hücre kitlesi (inner cell mass, ICM) ve trofoektoderm (trophectoderm, TE) yapısı gibi morfolojik kriterlere temel alınarak yapılmaktadır (Gardner & Lane, 2000). Ayrıca embriyo değerlendirme kriterlerinin

standardizasyonu amacıyla gerçekleştirilen İstanbul Konsensusu, embriyo morfolojisinin klinik uygulamalarda sistematik ve karşılaştırılabilir şekilde değerlendirilmesine önemli katkı sağlamıştır (Alpha Scientists in Reproductive Medicine & ESHRE, 2011). Bununla birlikte, blastokist morfolojisi ile embriyonun kromozomal durumu arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konulamamış olması, embriyo seçiminde yalnızca morfolojik değerlendirmenin yeterli olmayabileceğini göstermektedir.

Bu nedenle son yıllarda embriyo seçiminde genetik değerlendirme yöntemlerinin kullanımı giderek önem kazanmıştır. Preimplantasyon genetik testleri, embriyoların kromozomal yapısının değerlendirilmesine olanak sağlayarak kromozomal olarak normal (öploid) embriyoların transfer edilmesini hedeflemektedir. Bu amaçla kullanılan preimplantasyon genetik test- anöploidi (PGT-A), embriyolarda kromozom sayısal anomalilerinin tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2018). Özellikle yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) teknolojilerinin kullanıma girmesi ile birlikte embriyolardaki kromozomal anomalilerin yüksek çözünürlükle analiz edilmesi ve düşük düzeyli mozaik anöploidilerin saptanabilmesi mümkün hale gelmiştir (Treff & Zimmerman, 2017; Fiorentino vd., 2014).

Bununla birlikte literatürde blastokist morfolojisi ile embriyonun kromozomal durumu arasındaki ilişkiye dair farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bazı çalışmalar yüksek kaliteli blastokistlerin öploid olma olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir (Capalbo vd., 2014; Hill vd., 2013). Buna karşın diğer çalışmalar morfolojik olarak iyi kaliteye sahip embriyolarda da anöploidi oranlarının önemli düzeyde olabileceğini ortaya koymuştur (Irani vd., 2018). Bu çelişkili bulgular, blastokist kalitesi ile embriyo anöploidisi arasındaki ilişkinin daha ayrıntılı şekilde incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasının amacı; embriyo gelişim sürecini ve bu süreci etkileyen temel faktörleri incelemek, embriyo anöploidisinin oluşum mekanizmalarını değerlendirmek ve blastokist morfolojik kalitesi ile embriyonun kromozomal durumu arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Bu kapsamda özellikle NGS tabanlı PGT-A uygulamalarının embriyo seçimindeki yeri ve klinik önemi ele alınarak yardımcı üreme tekniklerinde

embriyo seçiminin daha etkin hale getirilmesine ve tedavi başarı oranlarının artırılmasına katkı sağlanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

Sağlıklı çiftlerde gebelik ortalama 8 aylık düzenli ilişki sonrası elde edilirken, Dünya Sağlık Örgütüne göre 12 aylık korunmasız ve düzenli ilişki sonrası klinik gebelik olamaması durumuna infertilite denmektedir. Dünyada özellikle çevresel etkiler sonucu olmak üzere birkaç farklı faktör sebebi ile doğurganlık oranları giderek azalmasıyla infertilite, çiftlerin %9 ila %30'unu etkilemektedir (Starc, 2019. Petraglia, 2013).

2.2. İnfertilite Nedenleri

Literatürde infertiliteye yol açan nedenlerin büyük çoğunluğunu kadın ve erkek faktörleri oluşturmaktadır. Kadına bağlı faktörler %40–50 oranında, erkeğe bağlı faktörler ise %30–40 oranında infertiliteden sorumlu bulunmuştur. Geriye kalan yaklaşık %15'lik grup ise açıklanamayan infertilite olarak değerlendirilmektedir (Yumru vd., 2011). Kadın kaynaklı infertilite nedenlerinin oldukça çeşitli olduğu bildirilmektedir. İleri yaş, cinsel ilişkinin sıklığı ve zamanlaması, sigara ve alkol kullanımı, ağır egzersiz ve kilo değişimleri, aşırı stres, yetersiz beslenme, diyabet, hipertansiyon, astım gibi kronik hastalıklar; çevresel veya mesleki faktörler (kurşun, cıva, arsenik, radyasyon gibi toksik maddelere maruz kalma), bazı ilaçların (antidepresan, antihipertansif) düzenli kullanımı ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar infertiliteye yol açabilmektedir (Speroff, 2013).

Çalışmalarda özellikle kadının yaşı ilerledikçe infertilite oranının arttığı vurgulanmıştır (Enilo, 2012).

Obezite sorunu yaşayan kadınlarda ise, beden kitle indeksi 30 kg/m²'nin altında olan kadınlara kıyasla gebe kalma sürecinin uzadığı gösterilmiştir (Bolumar, 2000).

Stres faktörü hem kadın hem de erkeklerde cinsel ilişki sıklığının ve libido düzeyinin azalmasına neden olmakta ve infertilite üzerinde olumsuz etki göstermektedir (Anderson, 2010).

Kadınlarda infertiliteye sebep olan diğer faktörler arasında ise; konjenital anomaliler, anovülasyon, polikistik over sendromu gibi overian bozukluklar; uterin ve servikal

faktörler; tubal ve peritoneal patolojiler ile vulva ve vajene ait faktörler yer almaktadır (Duvan, 2003).

Erkek kaynaklı infertiliteye neden olan faktörler arasında varikosel, inmemiş testis (kriptorkidizm), hipospadias, düşük testosteron seviyeleri, orşit gibi yapısal ve hormonal bozukluklar; spermin yapısında meydana gelen değişiklikler, sperm sayısında azalma, libido kaybı ve erektil disfonksiyon yer almaktadır. Ayrıca stres, iş ortamında radyasyon veya kurşun, cıva, X-ray gibi toksik maddelere maruz kalma ve skrotumun yüksek ısıya maruz kalması da infertilite üzerinde olumsuz etkiye sahiptir (Perk vd., 2005).

Yapılan çalışmalarda erkek infertilitesi nedenleri arasında açıklanamayan infertilitenin %75.1, varikoselin %12.6 ve üriner enfeksiyonların %66.6 oranında etkili olduğu bildirilmiştir (Famurewa, 2017).

2.3. Yardımla Üreme Teknikleri

Yardımla üreme teknikleri (ÜYTE), infertilite tedavisinde kullanılan ileri laboratuvar uygulamalarıdır. Bu teknikler arasında klasik *in vitro* fertilizasyon (IVF), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), gamet intrafallopiyan transfer (GIFT), zigot intrafallopiyan transfer (ZIFT), intrauterin inseminasyon (IUI), parsiyel zona diseksiyonu (PZD), subzonal inseminasyon (SUZI), peritoneal oosit ve sperm transferi (POST) ve tubal embriyo transferi (TET) yer almaktadır. Günümüzde embriyo gelişiminin laboratuvar ortamında daha kontrollü ve başarılı şekilde sürdürülebilmesi nedeniyle en yaygın kullanılan yöntemler IVF ve özellikle ICSI'dir (McKnight, 2000). Bu yöntemlerle elde edilen embriyolar, blastokist aşamasına kadar kültüre edilmekte ve morfolojik ile genetik kalite değerlendirmeleri yapılarak transfer için en uygun embriyo seçilmektedir. Bu süreç, embriyo anöploidisi riskinin azaltılması ve implantasyon başarısının artırılması açısından büyük önem taşımaktadır (Kamel, 2013).

2.3.1. In Vitro Fertilizasyon

İlk tüp bebek uygulamasının gerçekleştirilmesinden bu yana geçen yıllar içerisinde *in vitro* fertilizasyon (IVF) teknolojileri büyük bir ilerleme göstermiştir. Başlangıçta

yalnızca tubal faktör infertilitesi olan kadınlarda uygulanabilen bu yöntem, günümüzde farklı infertilite nedenlerinde, özellikle diğer tedavi yaklaşımlarının yetersiz kaldığı durumlarda yaygın olarak tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Oosit ve embriyonun gelişim sürecinde gereksinim duyduğu çevresel ve metabolik koşulların daha iyi anlaşılmasıyla birlikte, kültür ortamlarının optimize edilmesi mümkün olmuş ve bu da IVF tedavilerinde gebelik oranlarının artmasına katkı sağlamıştır. Bununla birlikte, yöntemin yüksek maliyeti, zaman alıcı doğası ve çoklu gebelik riskini artırabilmesi, klinik uygulamalarda embriyo seçimini daha da kritik hale getirmiştir. Günümüzde hedef, yüksek implantasyon potansiyeline sahip tek bir embriyonun seçilerek transfer edilmesi ve böylece hem gebelik başarısının korunması hem de sağlıklı tekil doğumların sağlanmasıdır (Goldberg vd., 2007).

2.3.2. IVF Uygulamaları

İlk dönem *in vitro* fertilizasyon (IVF) uygulamaları, spontan menstrual sikluslarda gelişen tek bir dominant folikülden elde edilen oosit ile gerçekleştirilmekteydi. Ancak bu yaklaşımın düşük verimliliği ve sınırlı gebelik başarısı, tedavi protokollerinde yeni düzenlemeleri gerekli kılmıştır. Bu doğrultuda, parenteral gonadotropinlerin kullanıldığı kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (süperovülasyon) protokolleri geliştirilmiş ve kısa sürede dünya genelinde standart uygulama haline gelmiştir. Bu yöntem sayesinde aynı siklus içerisinde birden fazla folikülün olgunlaşması sağlanarak daha fazla sayıda oosit elde edilmekte, böylece laboratuvar koşullarında gelişen embriyolar arasından morfolojik olarak en kaliteli olanların seçilmesine imkân tanınmaktadır. Ayrıca, transfer sonrası artan embriyoların kriyoprezervasyon teknikleriyle saklanabilmesi, ilerleyen dönemlerde yeni bir stimülasyon sürecine gerek kalmadan embriyo transferinin tekrarlanabilmesini sağlamaktadır. Bu gelişmeler, embriyo seçiminin hem klinik başarı hem de genetik açıdan sağlıklı gebeliklerin elde edilmesindeki önemini artırmıştır (Wang vd., 2006).

2.3.2.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyonu

İn vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında birden fazla folikülün olgunlaşmasını sağlamak amacıyla farklı süperovülasyon protokolleri geliştirilmiştir. Standart bir protokol temel olarak üç aşamadan oluşur.

İlk aşamada, erken ovülasyonu önlemek amacıyla hipofiz bezinin baskılanması sağlanır. Bu amaçla genellikle gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları, örneğin leuprolid asetat, siklusun luteal fazında (yaklaşık 21. gün civarında) subkutan enjeksiyon şeklinde uygulanır. GnRH analogları, spontan luteinize edici hormon (LH) artışını engelleyerek oosit toplama işlemi öncesinde istenmeyen ovülasyonu önler. Yaklaşık 10–14 günlük baskılama sürecinden sonra doz azaltılarak tedaviye devam edilir.

İkinci aşamada, rekombinant folikül stimüle edici hormon (FSH) tedavisi başlanır. FSH, çoklu folikül gelişimini indüklemek amacıyla genellikle 150–300 IU/gün doz aralığında uygulanır. Bu süreçte over yanıtı, transvajinal ultrasonografi ve serum östradiol düzeyleriyle yakından izlenir ve doz hastaya özgü şekilde ayarlanır.

Üçüncü aşamada, lider foliküllerin yaklaşık 18–20 mm çapa ulaşmasıyla birlikte insan koryonik gonadotropini (hCG) uygulanır. hCG, endojen LH dalgalanmasını taklit ederek oositin son olgunlaşmasını ve metafaz II evresine geçişini uyarır (Goldberg, 2013).

Son yıllarda geliştirilen GnRH antagonistleri, GnRH agonistlerine kıyasla hipofiz baskılanmasını daha kısa sürede sağlaması ve enjeksiyon gereksinimini azaltması nedeniyle avantaj sağlamaktadır. Ancak, bu protokollerin gebelik oranları üzerindeki etkisine ilişkin bulgular halen tartışmalıdır. Benzer şekilde, idrar kökenli gonadotropin preparatları (FSH ve LH içeren) ile rekombinant FSH formları arasındaki etkinlik farkı konusunda net bir görüş birliği bulunmamaktadır. Rekombinant LH'nin saf FSH protokollerine eklenmesi bazı araştırmacılar tarafından önerilse de, bu yaklaşımı destekleyen klinik kanıtlar sınırlıdır (Muasher, 2006).

2.3.2.2. Oosit Toplama

İn vitro fertilizasyonun (IVF) ilk yıllarında olgun oositlerin elde edilmesi laparoskopik yöntemlerle gerçekleştirilmekteydi. Ancak bu yöntem zamanla yerini, günümüzde

standart uygulama haline gelen transvajinal ultrason eşliğinde iğne aspirasyonu tekniğine bırakmıştır. Bu işlem, hCG uygulamasından yaklaşık 34–38 saat sonra, genellikle hafif sedasyon altında yapılmaktadır. Aspirasyon ile elde edilen folikül sıvısı, embriyolog tarafından hemen incelenerek kümülos ooforus kompleksi içerisinde yer alan oositlerin varlığı değerlendirilir.

Bir hastadan toplanan oosit sayısı bireysel yanıt ve uyarı protokolüne bağlı olarak değişmekle birlikte, genellikle 10–20 oosit aralığında olur. Elde edilen oositler, insan fallop tüpü sıvısını taklit eden özel kültür ortamlarına yerleştirilir ve 37°C'de inkübe edilir. Döllenme için her oositin bulunduğu ortama yaklaşık 100.000–200.000 sperm eklenebilir ya da tek bir spermin doğrudan oosit içine enjekte edilmesi esasına dayanan mikroenjeksiyon (ICSI) yöntemi uygulanabilir.

Fertilizasyon, genellikle 12–20 saat içinde erkek ve dişi pronükleusların gözlenmesiyle doğrulanır. Döllenme oranının yaklaşık %65 civarında olması beklenir; bu oranın altında kalması durumunda, oosit veya sperm kaynaklı yapısal ya da fonksiyonel problemler söz konusu olabilir (Goldberg, 2007).

2.3.2.3. Fertilizasyon

Döllenme süreci, spermin oosit ile birleşmesini, pronükleilerin oluşumunu ve maternal ile paternal kromozomların düzenli bir şekilde etkileşime girmesini kapsayan koordineli moleküler olaylar zinciridir (Georgadaki, 2016).

İn vitro koşullarda gerçekleştirilen döllenme sürecinde, kümülus hücreleri oosit ile sperm etkileşimini kolaylaştırarak fertilizasyon oranlarını olumlu yönde etkiler (Okabe, 2013. Fujiwara, 2011).

Spermler ejakülasyon sonrası fertilizasyon yeteneği kazanması için gerekli olan fiziksel ve biyokimyasal olarak değişiklikleri içeren çok aşamalı bir olgunlaşma süreci geçirirler (Takei, 2024).

Sperm kapasitsayonu adı verilen bu sürecin ilk adımlarından biri sperm plazma membranındaki kolesterol ve diğer sterollerin uzaklaştırılmasıdır. Kolesterolün hücre dışına taşınması, membran akışkanlığını artırır, membran lipit düzenini değiştirir; bu da spermatozoonun dış ortama yanıt verebilme kapasitesinin artmasına olanak tanır.

Kolesterol uzaklaştığında, membran yapısı daha esnek hâle gelir bu da iyon kanalları ve taşıyıcılarının işlevini kolaylaştırır.

İyonik ortam değişiklikleri kapasitasyonun bir diğer kritik düzenleyicisidir. Özellikle dış ortamda HCO_3^- ve Ca^{2+} konsantrasyonlarının artışı; sperm hücresine bu iyonların girişini tetikler. HCO_3^- hücre içi pH'i yükseltir, bu da hücre içi sinyal yolaklarını aktive eder. Ayrıca, sperm kuyruğunda spesifik bir kanal olan CatSper, Ca^{2+} girişinin asıl aracı olarak görev alır; bu kanalın işlevi, hiperaktif motilite (flagellar hareketin artışı) ve akrozom reaksiyonu için zorunludur.

Bu iyonik değişikliklerin ardından, hücre içi sinyal yolakları aktifleşir: özellikle çözünebilir adenil siklaz (sAC) yolu ile cAMP üretimi artar ve Protein kinase A (PKA) aktive olur. PKA aktivasyonu, sperm içinde gerçekleşecek olan pek çok olayı tetikler (Ickowicz, 2012).

Tirozin fosforilasyonu, sperm kapasitasyonunun karakteristik moleküler belirteçlerinden biridir. Özellikle sperm yüzey ve kuyruk yapılarındaki proteinlerin fosforilasyonu; sperm-oosit etkileşimi, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon yeteneği ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, kapasitasyon sırasında iç sinyalleşme, membran fizyolojisi, lipit dinamiği ve iyon dengesi birbirine geçmiş, karmaşık bir düzenleyici ağ ile sağlanır (Jin, 2017).

Kapasite olmuş spermler, oosit etrafındaki kümülos hücrelerini hiyaluronidaz enzimi ve mekanik kuyruk hareketi ile geçer (Seol, 2022).

Sperm başındaki reseptör proteinler zona pellusidanın ZP3 proteinine bağlanırlar. Bu bağlanmayı takiben akrozom reaksiyonu başlar.

Akrozom reaksiyonu, sperm başındaki akrozom kesesinin kontrollü bir şekilde açılması ve içindeki hidrolitik enzimlerin salınması ile sonuçlanan ekzositoz sürecidir. Bu süreç fertilizasyon için kaçınılmazdır; çünkü zona pellucida (ZP) ve oosit zarının (oolemma) aşılması için gerekli enzimatik aktiviteyi sağlar (Frasher, 1995).

Sperm ve oositin kaynaması oositin plazma zarının mikrovillus bakımından zengin kısmında geçekleşir. Gamet etkileşiminin başlamasından önce, sperm–zona pellucida bağlanması ile uyarılan akrozomal ekzositoz gerçekleşmesiyle, spermin oosit yüzeyine tutunmasını ve hücreler arası adezyonun sağlanmasını takiben iki gametin membran birleşmesine zemin hazırlar. Akrozom reaksiyonunu takip eden dönemde, spermin ortaya çıkan iç akrozomal zarı oosit membranı ile temas kurar (Gardner & Schoolcraft, 1999). Ardından spermin ekvatoryal segmenti oosit plazma membranına bağlanır ve bu bölgeden füzyon gerçekleşir (Georgadaki, 2016).

Sperm ile oosit membranlarının birleşmesini takiben spermin kuyruk hareketi hızla sona erer. Gamet membran füzyonunun, oosit yüzeyinde aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesini ve mikrovilli uzantılarının polimerizasyonunu tetiklediği düşünülmektedir. Bu süreçte sperm, aktif bir penetrasyon yerine, oosit mikrovillilerinin uzaması ve sperm başını sarması yoluyla oosit sitoplazmasına doğru çekilir. Böylece sperm çekirdeği ve beraberindeki hücresel yapılar oosit sitoplazması içerisine alınır. Spermin oosit içine internalizasyonunda aktin filamentlerinin kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu olay sırasında oosit sitoplazmasında lokal bir şişkinlik meydana gelir ve yaklaşık 7 µm uzunluğunda, 2 µm genişliğinde olan ve "döllenme konisi" olarak tanımlanan bir yapı oluşur. Bazı omurgasız türlerde ve amfibilerde, spermin bağlanması ve membran füzyonunun oosit zarının belirli, özelleşmiş bölgelerinde gerçekleştiği bildirilmektedir.

Fertilizasyonu takiben saniyeler içerisinde oosit plazma membran potansiyeli, hücre içine hızlı bir sodyum (Na^+) iyonu girişi sonucunda belirgin şekilde depolarize olur. Ardından potasyum (K^+) iyonlarının membran dışına sızması ile membran potansiyelinin yeniden kutuplaşması yaklaşık bir dakika içerisinde gerçekleşir. Bu geçici elektriksel değişim, polisperminin engellenmesini sağlayan hızlı blok mekanizması olarak tanımlanır; depolarize olmuş oosit membranı, yeni spermlerin füzyonunu geçici olarak engeller (Georgadaki, 2016).

Spermin oosit sitoplazmasına girişi, oosit aktivasyonunu başlatan temel uyarandır. Sperm kaynaklı faktörlerin etkisiyle fosfolipaz C (PLC) aktive olur ve fosfatidilinozitol 4,5-bifosfatın (PIP_2) hidrolizi sonucu inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) ve diasilgliserol (DAG) oluşur. IP_3, endoplazmik retikulum üzerindeki reseptörlerine bağlanarak sitoplazmaya Ca^{2+} salınımını tetikler. Salınan Ca^{2+} iyonları oosit korteksinde dalga şeklinde yayılır ve kortikal granül ekzositozuna yol açarak polisperminin engellenmesini sağlar. DAG aracılığıyla protein kinaz C (PKC)'nin aktivasyonu ise iyon değişim mekanizmalarını uyararak hücre içi pH'ın yükselmesine ve oositin metabolik olarak aktive olmasına katkıda bulunur (Abbott, 2001).

Oosit aktivasyonunun devamında, metafaz II'de durmuş olan mayoz yeniden başlar ve ikinci mayotik bölünmenin tamamlanmasıyla ikinci kutup cismi atılır. Bu süreç, zigotun ilk mitotik bölünmelerine zemin hazırlar. Aktivasyon sırasında maternal proteinlerin yıkımı, fosforilasyon ve post-translasyonel modifikasyonlar ile birlikte

seçilmiş maternal mRNA'ların translasyonu gerçekleşir. Erken embriyonik dönemde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde sitoplazmik poliadenilasyon önemli bir rol oynar ve bu mekanizma, oosit ve erken embriyolarda protein sentezinin kontrolünde evrensel bir düzenleyici yolak olarak kabul edilir (Sousa, 2016).

2.4. Erken Embriyonik Gelişme ve Bölünme

Spermin oosite girişi sonrası sitoplazmik organizasyon yeniden düzenlenir ve embriyonun eksenleri şekillenmeye başlar. Oosit sitoplazmasında bulunan sitoplazmik belirleyiciler, erken embriyoda hücresel kaderin belirlenmesinde rol oynar ve gen ekspresyonunu düzenler. Spermin giriş noktası, gelişmekte olan organizmanın bilateral simetrisinin belirlenmesinde referans kabul edilir (Gilbert, 2013). Fertilizasyonu izleyen dönemde zigot, art arda mitotik bölünmelerle erken embriyonik gelişime girer. Bölünme sırasında hücre sayısı artarken embriyonun hacmi değişmez ve oluşan hücreler blastomer olarak adlandırılır. İlk bölünme kutup eksenine paralel gerçekleşir ve bunu izleyen bölünmelerle dört ve sekiz hücreli evreler ile morula aşaması oluşur (Abbott, 2001).

Morula aşaması, blastomerler arasında hücre–hücre temasının artması ve hücresel organizasyonun belirginleşmesiyle karakterizedir.

Morula evresinin en önemli morfolojik ve fonksiyonel özelliği kompaktasyon sürecidir. Kompaktasyon sırasında blastomerler arasındaki sınırlar belirsizleşir ve hücreler birbirlerine daha sıkı şekilde bağlanır. Bu olay, hücre yüzeyinde bulunan adezyon moleküllerinin, özellikle E-kaderin aracılığıyla gerçekleşir. Kompaktasyon, embriyonun hücresel polaritesinin oluşmasını ve blastomerlerin fonksiyonel olarak farklılaşmasını başlatan kritik bir basamaktır. Bu süreçte dışta yer alan blastomerler apikal-bazal polarite kazanırken, içte kalan hücreler daha yuvarlak bir morfoloji sergiler.

Kompaktasyonu takiben blastomerler arasında ilk hücresel farklılaşma olayları gözlenir. Dış hücreler ilerleyen dönemde trofoektoderm soyuna yönelirken, içte yer alan hücreler iç hücre kitlesi (inner cell mass, ICM) olarak organize olur. Bu farklılaşma, embriyonun hem implantasyon yeteneğini hem de fetal dokuların oluşumunu belirleyen temel gelişimsel kararlardan biridir. Trofoektoderm hücreleri, ilerleyen aşamalarda plasenta ve ekstraembriyonik yapıların gelişiminde rol oynarken,

iç hücre kitlesi embriyonun esas fetal dokularını oluşturacak hücre popülasyonunu meydana getirir (Gardner & Schoolcraft, 1999).

Morula evresini takiben, trofoektoderm hücrelerinin aktif iyon transportu ve ozmotik mekanizmalar aracılığıyla hücreler arası boşluklara sıvı pompalaması sonucunda embriyo içinde blastosel adı verilen sıvı dolu bir kavite oluşur. Blastoselin oluşumu, embriyonun blastokist evresine geçişini tanımlar. Bu süreçte embriyo, yapısal olarak belirgin üç ana bileşen kazanır: iç hücre kitlesi, trofoektoderm ve blastosel.

Blastokist evresi, embriyonun implantasyon potansiyelinin ortaya çıktığı ve gelişimsel yeterliliğinin değerlendirilebildiği önemli bir aşamadır. Blastoselin genişlemesiyle birlikte blastokist, zona pellusida içerisinde genişler ve uygun koşullar altında zona pellusidadan çıkmaya (hatching) hazırlanır. Bu gelişimsel organizasyon, embriyonun uterin endometrium ile etkileşime girebilmesi ve başarılı implantasyonun gerçekleşmesi açısından kritik öneme sahiptir (Hardy, 2002). Blastokist gelişimi, embriyonun hem metabolik kapasitesini hem de genetik bütünlüğünü yansıtan önemli bir gelişimsel basamak olarak kabul edilir. Bu nedenle, blastokist evresine ulaşabilen embriyoların implantasyon ve klinik gebelik oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak blastokist gelişimi yalnızca embriyonun intrinsik kalitesine değil, aynı zamanda in vitro kültür koşullarına da büyük ölçüde bağlıdır (Gardner, 1998).

Embriyo kültür ortamının bileşimi, pH dengesi, osmolalite, oksijen konsantrasyonu ve kültür süresi blastokist oluşumunu doğrudan etkileyen faktörlerdir. Özellikle düşük oksijen konsantrasyonlarında (%5 O_2) kültürlenen embriyolarda blastokist gelişiminin ve hücresel organizasyonun daha fizyolojik olduğu gösterilmiştir (Swain, 2012). Ayrıca sekansiyel kültür medyumlarının kullanımı, embriyonun farklı gelişim evrelerindeki metabolik ihtiyaçlarını daha iyi karşılayarak blastokist oluşum oranlarını artırmaktadır (Thompson, 2007).

2.4.1. Blastokist Kalitesinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Blastokist evresine ulaşan embriyoların morfolojik değerlendirilmesi, embriyo seçimi ve implantasyon potansiyelinin öngörülmesi açısından büyük önem taşır. Günümüzde en yaygın kullanılan değerlendirme sistemi, Gardner ve Schoolcraft tarafından tanımlanan blastokist skorlama sistemidir. Bu sistem, blastokistin genişleme derecesi

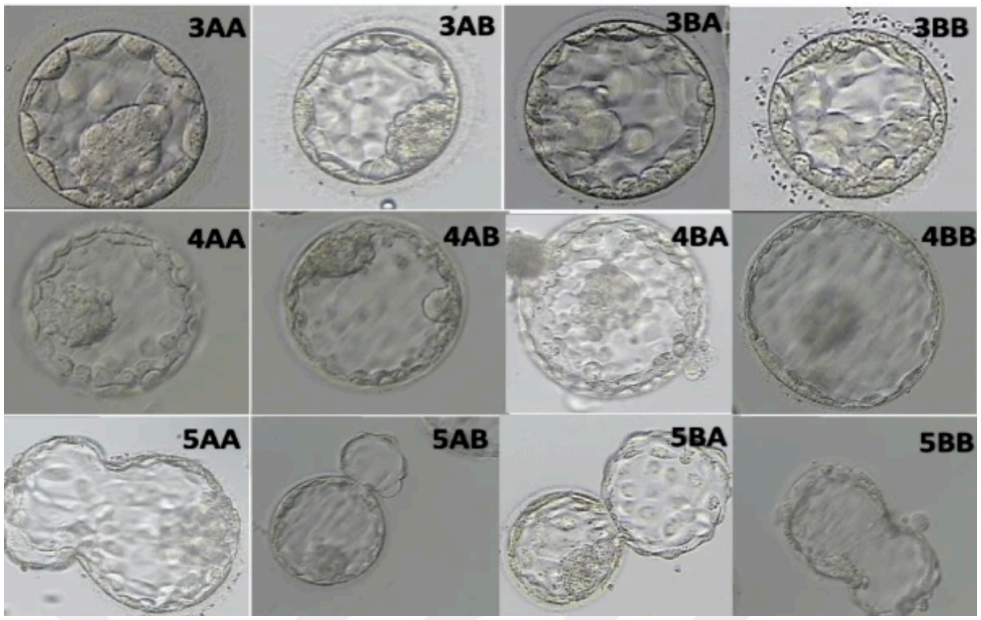
ile birlikte iç hücre kitlesi (ICM) ve trofektoderm (TE) morfolojisinin ayrı ayrı değerlendirilmesine dayanır (Gardner, 1999).

Blastokist genişleme derecesi, blastoselin hacmi ve zona pellucidanın durumu dikkate alınarak 1'den 6'ya kadar derecelendirilir. Erken blastokistte blastosel embriyonun küçük bir kısmını oluştururken, ileri evrelerde blastosel genişler, zona pellucida incelir ve blastokist zonadan çıkmaya başlar. Genişleme derecesinin artması, blastokistin implantasyona biyolojik olarak daha hazır olduğunu gösterir.

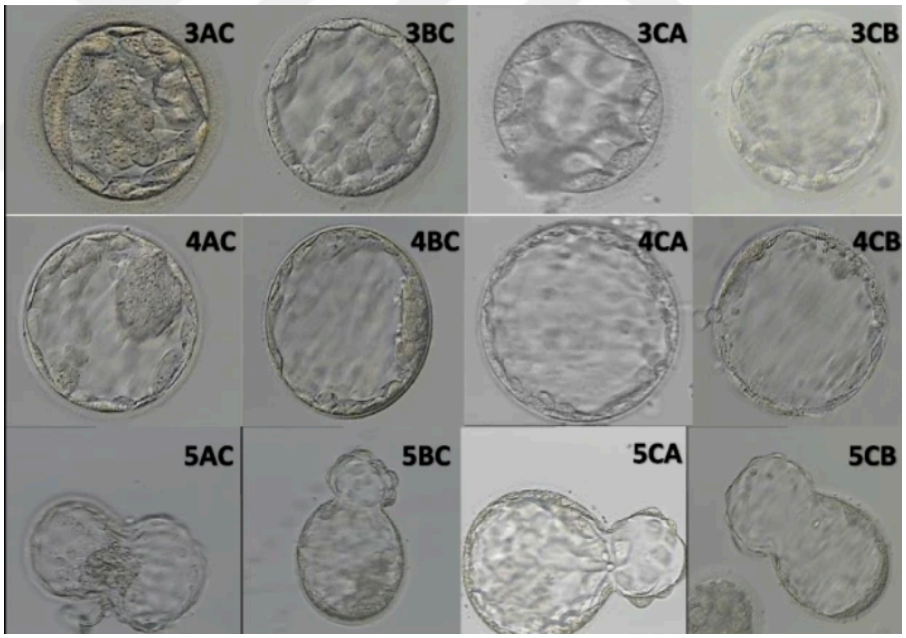
İç hücre kitlesi (ICM), embriyonun fetal dokularını oluşturacak hücre grubudur ve hücre sayısı, kompaktlığı ve organizasyonu esas alınarak değerlendirilir. A derecesi, yoğun, kompakt ve iyi organize hücrelerden oluşan ICM'yi tanımlarken; B derecesi, daha gevşek ve daha az hücre içeren yapıyı ifade eder. C derecesi ise hücre sayısı az, dağınık ve gelişim potansiyeli düşük ICM yapısını tanımlar (ESHRE Istanbul Consensus, 2011).

Trofektoderm (TE), blastokisti çevreleyen ve ilerleyen dönemde plasentayı oluşturacak hücre tabakasıdır. TE değerlendirmesi hücrelerin sayısı, sürekliliği ve epitelyal bütünlüğü temel alınarak yapılır. Çok sayıda, düzenli ve epitel yapısı iyi korunmuş hücreler A derecesi, daha az sayıda ve düzensiz hücreler B derecesi, az sayıda, dağınık ve düzensiz hücreler ise C derecesi olarak sınıflandırılır.

Blastokist skoru, genişleme derecesi ile birlikte ICM ve TE derecelerinin kombinasyonu şeklinde ifade edilir (örneğin 4AA, 3AB, 5BB). Yüksek kaliteli blastokistlerin, özellikle iyi derecelendirilmiş ICM ve TE yapısına sahip olanların, daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle blastokist skorlama sistemi, güncel IVF uygulamalarında embriyo transferi kararlarının verilmesinde önemli bir rehber olarak kullanılmaktadır (Gardner, 2000).



Şekil 1. İyi morfolojik kalite grubunu temsil eden blastokist örnekleri (Gardner ve Schoolcraft sınıflamasına göre ICM ve/veya TE derecesi A ve B olan blastokistler).



Şekil 2. Gardner ve Schoolcraft sınıflamasına göre düşük kalite blastokist morfolojisi örnekleri (ekspansiyon evresi 3–5, ICM ve TE derecesi C).

2.4.2. Embriyo Gelişimini Etkileyen Faktörler

Oosit, erken embriyonik gelişimin temel düzenleyicisi konumundadır. Zigotik genom aktivasyonu gerçekleşene kadar embriyonun bölünmesi, hücre döngüsünün ilerlemesi

ve metabolik düzenlenmesi büyük ölçüde oositten gelen maternal mRNA'lar, proteinler ve organeller aracılığıyla sağlanır. Bu nedenle oositin sitoplazmik olgunluğu, embriyo gelişiminin devamlılığı açısından kritik öneme sahiptir. Sitoplazmik olarak yeterince olgunlaşmamış oositlerden gelişen embriyolarda bölünme asenkronisi, blastomerler arası eşitsizlik ve gelişimsel duraklama daha sık gözlenmektedir (Lonergan, 2014).

Oosit içindeki mitokondri sayısı ve fonksiyonu da embriyo gelişiminin önemli belirleyicilerindendir. Mitokondriler, ATP üretimi yoluyla hücre bölünmesi ve blastosel oluşumu gibi enerji gerektiren süreçleri destekler. Mitokondriyal DNA kopya sayısındaki azalma veya mitokondriyal disfonksiyon, embriyonun blastokist evresine ulaşma kapasitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Özellikle ileri anne yaşı ile birlikte mitokondriyal fonksiyonlarda bozulma meydana gelmekte, bu durum embriyo gelişiminde gecikme ve artmış kromozomal anomali riski ile ilişkilendirilmektedir (Franasiak, 2014).

Anne yaşı, oosit kalitesini etkileyen en güçlü klinik faktörlerden biridir. İleri yaşla birlikte oositlerde meiotik iğ yapısında bozulmalar, kromozomal ayrılma hataları ve DNA hasarı sıklığı artmaktadır. Bu durum, embriyonun erken bölünme evrelerinde gelişimsel arrest ile sonuçlanabileceği gibi, blastokist evresine ulaşabilen embriyolarda da artmış anöploidi oranlarına yol açabilmektedir.

2.4.2.1. Sperm Kaynaklı Faktörler

Embriyo gelişimi yalnızca oosit kalitesiyle sınırlı olmayıp, sperm kaynaklı faktörlerden de önemli ölçüde etkilenmektedir. Sperm, paternal genomun yanı sıra embriyo aktivasyonunda rol oynayan faktörleri ve sentrozomu oosite taşır. Sperm DNA bütünlüğü, kromatin paketlenmesi ve epigenetik düzenlemeler embriyonun erken bölünme kinetiğini ve gelişim kapasitesini belirleyen önemli unsurlar arasında yer almaktadır.

Artmış sperm DNA fragmantasyonu, embriyo gelişiminin erken evrelerinde hücre döngüsü kontrol noktalarının aktive olmasına ve bölünme hızında yavaşlamaya neden olabilir. Literatürde, yüksek DNA fragmantasyonuna sahip spermlerle döllenen oositlerden gelişen embriyolarda blastokist oluşum oranlarının azaldığı ve implantasyon başarısının düştüğü bildirilmiştir (Munné, 2006). Bu durum, embriyo

morfolojisi normal görünse dahi altta yatan genetik veya moleküler bozuklukların gelişimi etkileyebileceğini göstermektedir.

2.4.2.2. Embriyonun Metabolik Aktivitesi ve Hücresel Düzenlenmesi

Embriyo gelişimi sırasında hücresel metabolizma, gelişim evresine özgü olarak değişkenlik gösterir. Erken bölünme evrelerinde embriyo daha düşük enerji gereksinimine sahipken, blastokist oluşumu sırasında artan hücre sayısı ve blastosel oluşumu nedeniyle metabolik aktivite belirgin şekilde artar. Bu süreçte embriyonun enerji dengesini sağlayabilme kapasitesi, gelişimin sürekliliği açısından belirleyicidir. Mitokondriyal fonksiyonun yetersiz olduğu embriyolarda ATP üretiminin azalması, hücre bölünmesinin aksamasına ve blastokist oluşumunun engellenmesine neden olabilir. Ayrıca metabolik stres altındaki embriyolarda reaktif oksijen türlerinin artışı, DNA hasarı ve hücresel apoptoz süreçlerini tetikleyerek gelişim potansiyelini düşürebilmektedir (Thompson, 2007).

2.4.2.3. Kültür Ortamı ve Laboratuvar Koşullarının Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi

İn vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında embriyonun sağlıklı bir şekilde gelişerek blastokist evresine ulaşabilmesi, büyük ölçüde kültür ortamının özellikleri ve laboratuvar koşullarının stabilitesine bağlıdır. İn vivo koşullarda embriyo, fallop tüpü ve uterus ortamında oldukça kontrollü bir fizyolojik çevrede gelişirken, in vitro koşullarda bu çevrenin mümkün olduğunca taklit edilmesi amaçlanmaktadır. Kültür medyumunun bileşimi, pH dengesi, karbondioksit (CO_2) ve oksijen (O_2) konsantrasyonları, sıcaklık ve osmolalite gibi parametreler embriyonun hücresel homeostazını doğrudan etkilemektedir.

Kültür Medyumunun Bileşimi

Embriyo kültür medyumları, embriyonun gelişim evresine özgü metabolik gereksinimlerini karşılayacak şekilde tasarlanmaktadır. Erken bölünme evrelerinde embriyo daha çok pirüvat ve laktat gibi enerji kaynaklarını kullanırken, blastokist

evresine yaklaşıldıkça glukoz metabolizması ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle günümüzde yaygın olarak kullanılan sekansiyel kültür medyumları, embriyonun gelişim basamaklarına göre değişen enerji ve aminoasit gereksinimlerini karşılamayı hedeflemektedir (Thompson, 2007).

Aminoasitler, yalnızca protein sentezi için değil, aynı zamanda osmotik denge, pH tamponlanması ve hücresel sinyalizasyon açısından da önem taşımaktadır. Kültür ortamında bulunan antioksidanlar ve albümin gibi protein kaynakları, embriyoyu oksidatif stresten koruyarak gelişim potansiyelini desteklemektedir.

pH Dengesi ve CO_2 Konsantrasyonu

Embriyo kültüründe pH, hücresel enzim aktivitesi, hücre döngüsü ilerlemesi ve mitokondriyal fonksiyon açısından kritik bir parametredir. İnsan embriyoları için ideal kültür pH'sı genellikle 7,2–7,4 aralığında kabul edilmektedir. Bu aralığın dışına çıkılması durumunda embriyonun metabolik aktivitesi bozulmakta ve hücre bölünmelerinde gecikme meydana gelebilmektedir.

Kültür medyumunun pH'sı büyük ölçüde CO_2 konsantrasyonu tarafından düzenlenmektedir. Çoğu kültür sistemi, bikarbonat tampon sistemi kullandığından, inkübatör içindeki CO_2 düzeyi doğrudan pH dengesini etkilemektedir. Genellikle embriyo kültürü için %5–6 CO_2 konsantrasyonu tercih edilmektedir. CO_2 düzeyindeki küçük dalgalanmalar dahi medyum pH'sında değişikliklere yol açabilmekte ve embriyo gelişimini olumsuz etkileyebilmektedir (Swain., 2012).

Embriyoların inkübatör dışına çıkarılması sırasında pH değişimleri yaşanabileceğinden, bu sürenin mümkün olduğunca kısa tutulması ve kapalı sistemlerin kullanılması önerilmektedir.

Oksijen (O_2) Konsantrasyonu

Oksijen konsantrasyonu, embriyo gelişimini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. İn vivo koşullarda fallop tüpü ve uterus ortamındaki oksijen düzeyi atmosferik oksijenden (%20–21) belirgin şekilde düşüktür ve yaklaşık %2–8 O_2 aralığındadır. Bu nedenle embriyo kültüründe fizyolojik oksijen konsantrasyonlarının taklit edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışmalar, %5 O_2 altında kültürlenen embriyolarda oksidatif stresin azaldığını, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin sınırlandığını ve blastokist gelişim oranlarının arttığını göstermiştir. Yüksek oksijen konsantrasyonlarında ise ROS üretiminin artması sonucu DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon ve hücresel apoptoz mekanizmalarının aktive olabildiği bildirilmektedir (Swain, 2012).

2.4.2.4. Sıcaklık ve Osmolalitenin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi

Embriyo kültürü sırasında sıcaklık stabilitesi, hücresel yapıların bütünlüğünün korunması açısından kritik öneme sahiptir. İnsan embriyoları için ideal kültür sıcaklığı 37°C olup, bu değerden sapmalar mikrotübül organizasyonu ile mitotik ve mayotik iğ yapısında bozulmalara yol açabilmektedir. Özellikle kısa süreli sıcaklık düşüşlerinin dahi kromozomal hizalanmayı ve hücre bölünme kinetiğini olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenle embriyoloji laboratuvarlarında inkübatör kapaklarının sık açılmaması ve sıcaklık kontrollü çalışma alanlarının kullanılması önerilmektedir (Swain, 2012; Gardner, 2005).

Osmolalite, embriyonun hücresel hacim regülasyonu ve iyon dengesi açısından önemli bir parametredir. Kültür medyumunun osmolalitesindeki değişiklikler, hücre içi-su dengesini bozarak blastomerlerde hücresel stres oluşturabilir ve embriyo gelişim potansiyelini azaltabilir. Artmış osmolalite, embriyoda metabolik aktivitenin baskılanması ve blastokist oluşum oranlarının düşmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle kültür ortamlarının osmolalite değerlerinin dikkatle izlenmesi ve stabil tutulması gerekmektedir (Baltz, 2012).

2.4.2.5. Laboratuvar Ortamı ve Fiziksel Faktörlerin Etkisi

Embriyoloji laboratuvarında embriyonun maruz kaldığı fiziksel ve kimyasal çevresel faktörler, embriyo gelişimini doğrudan etkileyebilmektedir. Özellikle uçucu organik bileşikler (VOC), temizlik maddeleri, plastik laboratuvar malzemelerinden salınan toksik bileşenler ve hava kalitesi embriyo gelişimi üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir. VOC maruziyetinin embriyo gelişiminde gecikme, blastokist oluşum oranlarında azalma ve implantasyon başarısında düşüş ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cohen, 2007).

Bu nedenle modern IVF laboratuvarlarında yüksek verimli hava filtrasyon sistemleri (HEPA filtreleri), düşük VOC içeren malzemeler ve kontrollü hava akışı sağlayan laboratuvar tasarımları tercih edilmektedir. Ayrıca inkübasyon sistemlerinin stabilitesi, titreşim ve ışık gibi fiziksel stres faktörlerinin minimize edilmesi, embriyo gelişiminin optimize edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Mortimer, 2015).

2.4.3. Genetik ve Kromozomal Faktörler

Embriyonun kromozomal bütünlüğü, gelişim kapasitesini ve implantasyon potansiyelini belirleyen en temel faktörlerden biridir. İnsan embriyolarında görülen kromozomal anomaliler, özellikle ileri maternal yaşla birlikte artış göstermekte olup, erken embriyonik dönemde gelişimsel arrestlerin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Anöploid embriyoların önemli bir kısmı zigot veya erken klivaj evrelerinde bölünme yeteneğini kaybetmekte ya da blastokist evresine ulaşamadan gelişimlerini sonlandırmaktadır.

Bununla birlikte, yapılan çalışmalar bazı anöploid embriyoların blastokist evresine kadar gelişebildiğini ve hatta morfolojik değerlendirme kriterlerine göre yüksek kaliteli blastokistler olarak sınıflandırılabildiğini göstermiştir. Bu durum, embriyo morfolojisinin kromozomal normaliteyi her zaman doğru bir şekilde yansıtmayabileceğini ortaya koymaktadır. Nitekim trofoektoderm ve iç hücre kitlesi açısından iyi derecelendirilmiş blastokistlerin dahi anöploid olabileceği bildirilmiştir (Munné, 2006).

Embriyolarda kromozomal mozaiklik de genetik değerlendirmeyi karmaşık hale getiren önemli bir faktördür. Mozaik embriyolar, hem öploid hem de anöploid hücre popülasyonlarını birlikte içerebilmekte ve bu embriyoların gelişim potansiyeli, mozaikliğin derecesine ve anormal hücrelerin dağılımına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bazı mozaik embriyoların blastokist gelişimini sürdürebildiği ve implantasyonla sonuçlanabildiği bildirilmiş olsa da, bu embriyoların klinik sonuçları halen tartışmalıdır (Fragouli, 2011).

Ayrıca embriyodaki kromozomal anomalilerin, hücre döngüsü regülasyonu, mitokondriyal fonksiyonlar ve apoptoz mekanizmaları üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu; bunun da embriyo gelişim hızında yavaşlama, blastomer sayısında azalma ve asenkron bölünmelere yol açtığı gösterilmiştir. Zaman atlamalı görüntüleme

sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, anöploid embriyoların bölünme kinetiklerinin euploid embriyolardan anlamlı şekilde farklı olduğu rapor edilmiştir (Campbell, 2013).

2.5. Embriyo Anöploidisi

Embriyo anöploidisi, embriyoda normal diploid kromozom sayısından sapma olması durumunu ifade eder ve insan üremesinde başarısız implantasyon, erken gebelik kayıpları ve tekrarlayan IVF başarısızlıklarının en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. İnsan embriyolarında anöploidinin görülme sıklığı diğer memelilere kıyasla oldukça yüksektir ve bu durum, insan gametogenezi ve erken embriyonik bölünmelerin kromozomal hatalara daha yatkın olduğunu göstermektedir. Anöploid embriyoların büyük bir kısmı döllenmeden sonraki erken bölünme evrelerinde gelişimsel arrest gösterir veya blastokist evresine ulaşamadan elimine edilir. Bununla birlikte, bazı anöploid embriyolar blastokist evresine kadar gelişimini sürdürebilmekte ve morfolojik değerlendirmede iyi kalite blastokist olarak sınıflandırılabilmektedir. Bu durum, yalnızca morfolojik kriterlere dayalı embriyo seçiminin genetik normaliteyi her zaman doğru yansıtmayabileceğini ortaya koymaktadır (Munné, 2006).

Embriyo anöploidisinin kökeni hem mayotik hem de mitotik hatalara dayanmaktadır. Özellikle oosit mayozu sırasında meydana gelen kromozom ayrılma hataları, maternal kaynaklı anöploidinin en önemli nedenidir. İleri maternal yaşla birlikte kohesin proteinlerinin zayıflaması ve iğ iplikçiği organizasyonundaki bozulmalar, kromozomların ayrılmama riskini artırmakta ve anöploid embriyo oranlarında belirgin artışa yol açmaktadır. Buna karşılık, erken embriyonik mitoz sırasında oluşan hatalar ise embriyo mozaikliğine neden olmaktadır (Fragouli, 2011).

Mozaik embriyolar, aynı embriyo içerisinde hem öploid hem de anöploid hücre popülasyonlarının bulunmasıyla karakterizedir. Mozaikliğin derecesi ve anormal hücrelerin dağılımı, embriyonun gelişim potansiyelini ve implantasyon başarısını doğrudan etkilemektedir. Düşük düzey mozaiklik içeren bazı blastokistlerin implantasyon ve canlı doğumla sonuçlanabildiği bildirilmiş olsa da, bu embriyoların klinik sonuçları halen tartışmalıdır.

Anöploidinin embriyo gelişimi üzerindeki etkileri, hücresel enerji metabolizması, mitokondriyal fonksiyonlar, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptoz mekanizmaları üzerinden gerçekleşmektedir. Kromozomal dengesizlikler, embriyolarda asenkron bölünmelere, anormal klivaj paternlerine ve gecikmiş blastokist oluşumuna yol açmaktadır. Zaman atlamalı görüntüleme sistemleriyle yapılan çalışmalar, anöploid embriyoların bölünme kinetiklerinin öploid embriyolardan anlamlı derecede farklı olduğunu göstermiştir (Campbell, 2013).

2.5.1. Sayısal Kromozom Anomalileri (Anöploidi)

Anöploidi, hücrede bulunan kromozom sayısının, tür için normal kabul edilen haploid setin tam katlarından sapması durumudur ve insan embriyolarında en sık karşılaşılan genetik anomaliler arasında yer almaktadır. Anöploid hücrelerde bir veya birden fazla kromozomun eksik (monozomi) ya da fazla (trizomi) olması söz konusudur. Bu durum, hücresel fonksiyonların bozulmasına, gen dozaj dengesizliğine ve embriyonik gelişimde ciddi aksamalara yol açabilmektedir.

İnsan embriyolarında anöploidinin temel kaynağı, mayoz veya mitoz sırasında meydana gelen kromozom ayrılma hatalarıdır. Özellikle maternal kaynaklı mayotik kromozom ayrılmama olayları, ileri kadın yaşı ile birlikte anöploidi sıklığının artmasında belirleyici rol oynamaktadır. Mayoz I veya Mayoz II evresinde gerçekleşen ayrılma kusurları sonucunda, anormal kromozom içeriğine sahip oositler oluşmakta ve bu oositlerin döllenmesiyle anöploid embriyolar meydana gelmektedir (Hassold, 2001).

Anöploidi yalnızca mayotik kökenli olmayıp, erken embriyonik bölünmeler sırasında meydana gelen mitotik hatalar sonucu da gelişebilmektedir. Bu tür hatalar, embriyoda kromozomal mozaikliğe yol açmakta ve embriyonun farklı hücrelerinde farklı kromozom dizilimlerinin bulunmasına neden olmaktadır. Mitotik kökenli anöploidiler, blastokist evresine kadar gelişebilen embriyolarda daha sık gözlenmekte olup, embriyo seçiminde morfolojik değerlendirmenin sınırlılıklarını ortaya koymaktadır (Fragouli, 2011).

Sayısal kromozom anomalileri embriyo gelişim dinamiklerini doğrudan etkilemektedir. Anöploid embriyolarda hücre bölünme hızının yavaşladığı, bölünmelerin asenkron hale geldiği ve blastomer sayısının azaldığı bildirilmiştir.

Bunun sonucunda, birçok anöploid embriyo erken gelişim evrelerinde gelişimsel arrest göstermekte veya blastokist evresine ulaşamamaktadır. Ancak bazı anöploid embriyolar, özellikle belirli trizomilerde, blastokist aşamasına kadar gelişim gösterebilmekte ve morfolojik olarak yüksek kaliteli blastokistler olarak değerlendirilebilmektedir (Munné, 2006).

2.5.1.1. Monozomi

Monozomi, diploid bir hücrede bulunması gereken kromozom çiftlerinden birinin eksik olmasıyla karakterize edilen bir sayısal kromozom anomalisi olup (2n–1), insan embriyolarında genetik dengenin en ciddi şekilde bozulduğu durumlar arasında yer almaktadır. Monozomik embriyolarda gen dozajındaki belirgin dengesizlik, hücresel fonksiyonların bozulmasına ve embriyonik gelişimin erken evrelerinde durmasına neden olmaktadır.

Preimplantasyon dönemde saptanan monozomilerin büyük bir kısmı otozomal kökenlidir ve bu embriyoların çoğu klivaj evresinde gelişimsel arrest göstermektedir. Otozomal monozomilerin blastokist evresine ulaşma olasılığı oldukça düşük olup, bu durum monozomilerin yaşamla bağdaşabilirliğinin sınırlı olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan genetik analizler, otozomal monozomilerin hücre döngüsü kontrol mekanizmalarını bozarak bölünme asenkronisi ve artmış apoptoz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Vanneste, 2009).

Gonozomal monozomiler ise otozomal monozomilere kıyasla embriyonik gelişim açısından daha tolere edilebilir kabul edilmektedir. Özellikle monozomi X (45,X), preimplantasyon dönemde blastokist gelişimine ulaşabilen nadir monozomi örneklerinden biridir. Bununla birlikte, monozomi X taşıyan embriyoların implantasyon ve canlı doğum oranları düşüktür ve önemli bir kısmı erken gebelik kayıpları ile sonuçlanmaktadır (Hook, 1983).

Monozomilerin embriyo gelişimi üzerindeki etkileri yalnızca kromozom eksikliğine bağlı gen kaybı ile sınırlı olmayıp, aynı zamanda mitotik stabilitenin bozulması ve embriyonik hücrelerde artan stres yanıtları ile ilişkilidir. Bu durum, morfolojik olarak iyi derecelendirilmiş embriyolarda dahi gelişim potansiyelinin sınırlı olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla monozomi, embriyo anöploidisinin klinik açıdan en

olumsuz sonuçlarla ilişkili alt gruplarından biri olarak kabul edilmektedir (McCoy, 2017).

2.5.1.2. Trizomi

Trizomi, diploid bir hücrede bulunması gereken kromozom çiftlerinden birinin fazladan bir kopyaya sahip olması durumu olup (2n+1), insan embriyolarında monozomiye kıyasla daha sık gözlenen bir sayısal kromozom anomalisidir. Trizomik embriyolarda kromozom fazlalığına bağlı gen dozaj dengesizliği meydana gelmekte ve bu durum embriyonik gelişim, implantasyon potansiyeli ve gebeliğin devamlılığı üzerinde belirgin etkiler oluşturmaktadır.

İnsan embriyolarında trizomilerin büyük bir bölümü mayotik ayrılma hatalarından kaynaklanmakta olup, özellikle maternal mayoz sırasında meydana gelen ayrılmama olayları trizomi oluşumunda temel mekanizma olarak kabul edilmektedir. İleri maternal yaş ile birlikte trizomi insidansının artması, oositlerdeki kohesyon kaybı ve iğ iplikçiği stabilitesindeki bozulmalarla ilişkilendirilmektedir (Hassold, 2001).

Trizomiler, monozomilere kıyasla embriyonik gelişim açısından daha tolere edilebilir olmakla birlikte, embriyoların önemli bir kısmı yine de erken gelişim evrelerinde gelişimsel arrest göstermektedir. Bununla birlikte, bazı trizomik embriyolar blastokist evresine ulaşabilmekte ve morfolojik değerlendirme kriterlerine göre yüksek kaliteli blastokistler olarak sınıflandırılabilmektedir. Bu durum, embriyo morfolojisinin kromozomal normaliteyi her zaman doğru yansıtmadığını göstermektedir (Munné, 2006).

Belirli trizomilerin embriyonik gelişim üzerindeki etkileri farklılık gösterebilmektedir. Örneğin trizomi 21, 18 ve 13 gibi bazı otozomal trizomiler, blastokist gelişimine ve hatta implantasyona izin verebilmekle birlikte, gebeliğin ileri dönemlerinde ciddi klinik tablolar veya gebelik kayıpları ile ilişkilidir. Buna karşın birçok otozomal trizomi, preimplantasyon veya erken postimplantasyon dönemde kayıpla sonuçlanmaktadır (Nagaoka, 2012).

Preimplantasyon dönemde yapılan genetik analizler, trizomik embriyolarda hücre bölünme kinetiklerinin genellikle yavaşladığını, bölünmelerin asenkron hale geldiğini ve mitotik hataların arttığını göstermiştir. Bu embriyolarda artmış metabolik stres ve

apoptoz oranları, blastokist kalitesini ve implantasyon potansiyelini olumsuz yönde etkilemektedir (Campbell, 2013).

Otozomal Trizomiler

Otozomal trizomiler, otozomlardan birinin fazladan bir kopyaya sahip olmasıyla karakterize edilen sayısal kromozom anomalileridir ve insan embriyolarında en sık karşılaşılan trizomi grubunu oluşturmaktadır. Bu anomalilerde gen dozajındaki artış, hücresel homeostazın bozulmasına yol açarak embriyonik gelişimi, implantasyon potansiyelini ve gebeliğin devamlılığını olumsuz yönde etkilemektedir. Otozomal trizomilerin büyük bir kısmı preimplantasyon veya erken postimplantasyon dönemde gelişimsel kayıpla sonuçlanmaktadır.

Preimplantasyon dönemde yapılan genetik tarama çalışmalarında, otozomal trizomi taşıyan embriyoların önemli bir bölümünün klivaj evresinde veya erken blastokist aşamasında gelişimsel arrest gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, bazı otozomal trizomiler blastokist evresine kadar gelişim gösterebilmekte ve morfolojik değerlendirme kriterlerine göre yüksek kaliteli blastokistler olarak sınıflandırılabilmektedir. Bu durum, embriyo morfolojisinin kromozomal normaliteyi her zaman doğru yansıtmadığını bir kez daha ortaya koymaktadır (Munné, 2006).

Otozomal trizomiler arasında embriyonik gelişim açısından kısmen tolere edilebilenler bulunmaktadır. Trizomi 21, trizomi 18 ve trizomi 13 gibi bazı trizomiler, blastokist gelişimine ve implantasyona izin verebilmekle birlikte, gebeliğin ilerleyen dönemlerinde ciddi klinik tablolar veya gebelik kayıpları ile ilişkilidir. Buna karşın, diğer otozomal trizomilerin büyük çoğunluğu embriyonik yaşamla bağdaşmamakta ve çok erken dönemlerde elimine edilmektedir (Nagaoka, 2012).

Otozomal trizomilerin embriyo gelişimi üzerindeki etkileri yalnızca kromozom fazlalığına bağlı genetik yük ile sınırlı değildir. Bu embriyolarda hücre döngüsü regülasyonunun bozulduğu, mitotik hata oranlarının arttığı ve metabolik stresin yükseldiği gösterilmiştir. Zaman atlamalı görüntüleme sistemleriyle yapılan analizler, otozomal trizomi taşıyan embriyolarda hücre bölünmelerinin genellikle yavaşladığını ve bölünme kinetiklerinin öploid embriyolardan belirgin şekilde farklı olduğunu ortaya koymuştur (Campbell, 2013).

Trizomi 21, insanlarda en sık görülen otozomal trizomi olup Down sendromu ile ilişkilidir. Preimplantasyon dönemde yapılan çalışmalar, trizomi 21 taşıyan embriyoların bir kısmının blastokist evresine kadar gelişebildiğini ve morfolojik olarak iyi kalite gösterebildiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, bu embriyolarda hücre bölünme kinetiklerinin genellikle yavaşladığı ve embriyo gelişiminde asenkron bölünmelerin daha sık görüldüğü bildirilmektedir (Munné, 2006).

Trizomi 18 (Edwards sendromu), trizomi 21'e kıyasla embriyonik ve fetal gelişim üzerinde daha ağır etkiler oluşturmaktadır. Trizomi 18 taşıyan embriyoların büyük bir kısmı preimplantasyon dönemde gelişimsel arrest göstermekte, blastokist evresine ulaşabilen embriyo oranı oldukça düşük kalmaktadır. Blastokist evresine ulaşabilen embriyoların ise implantasyon sonrası erken gebelik kayıpları ile sonuçlanma olasılığı yüksektir (Nagaoka, 2012).

Trizomi 13 (Patau sendromu), otozomal trizomiler arasında en ağır klinik sonuçlara yol açan anomalilerden biridir. Preimplantasyon dönemde trizomi 13 taşıyan embriyoların büyük çoğunluğu erken gelişim evrelerinde elimine edilmektedir. Blastokist evresine ulaşabilen embriyolar son derece nadir olup, bu embriyoların implantasyon potansiyeli oldukça düşüktür (Fragouli, 2011).

Trizomi 12, preimplantasyon genetik tarama çalışmalarında özellikle klivaj ve erken blastokist evresindeki embriyolarda saptanabilen otozomal trizomilerden biridir. Trizomi 12 taşıyan embriyoların büyük bir kısmı blastokist evresine ulaşamamakta, blastokist gelişimi gösterebilen embriyolar ise genellikle düşük implantasyon potansiyeline sahip olmaktadır. Bu kromozoma ait genetik materyalin fazlalığının, hücre döngüsü düzenleyici genlerin ekspresyonunu olumsuz etkileyerek embriyonik gelişimi sınırladığı düşünülmektedir (Munné, 2006).

Trizomi 9, embriyonik gelişim açısından oldukça ağır sonuçlara yol açan otozomal trizomilerden biridir. Bu anomaliye sahip embriyoların büyük çoğunluğu preimplantasyon dönemde gelişimsel arrest göstermekte ve blastokist evresine ulaşamamaktadır. Blastokist evresine ulaşabilen trizomi 9 embriyoları son derece nadir olup, implantasyon sonrası erken gebelik kayıpları ile ilişkilidir (Nagaoka, 2012).

Trizomi 8, diğer otozomal trizomilere kıyasla embriyonik gelişim açısından kısmen daha tolere edilebilir kabul edilmekte ve özellikle mozaik trizomi 8 olguları

preimplantasyon dönemde daha sık saptanmaktadır. Mozaik trizomi 8 taşıyan bazı embriyolar blastokist evresine ulaşabilmekte ve morfolojik olarak kabul edilebilir kalite gösterebilmektedir. Ancak bu embriyoların implantasyon ve canlı doğum oranları düşüktür (Fragouli, 2011).

Gonozomal Trizomiler

Gonozomal trizomiler, X ve Y kromozomlarının sayısal anomalileri sonucu ortaya çıkan ve otozomal trizomilere kıyasla embriyonik gelişim açısından daha iyi tolere edilebilen kromozom anomalileridir. Bu durumun temel nedeni, X kromozomu inaktivasyonu (lionizasyon) mekanizması ve Y kromozomunun sınırlı gen içeriğidir. Bu nedenle gonozomal trizomi taşıyan embriyolar, otozomal trizomilere kıyasla daha yüksek oranda blastokist evresine ulaşabilmekte ve bazı olgularda canlı doğumla sonuçlanabilmektedir (Hassold, 2001).

Preimplantasyon genetik test (PGT-A) çalışmalarında gonozomal trizomiler, özellikle blastokist evresindeki embriyolarda sık saptanan anöploidi türleri arasında yer almakta ve embriyo morfolojisi ile genetik yapı arasındaki uyumsuzluğu göstermesi açısından dikkat çekmektedir.

Trizomi X, preimplantasyon dönemde saptanan en yaygın gonozomal trizomilerden biridir. Bu anomaliye sahip embriyoların önemli bir kısmı blastokist evresine ulaşabilmekte ve morfolojik olarak iyi kalite gösterebilmektedir. Bununla birlikte, embriyonik gelişimin bu şekilde devam edebilmesi, X kromozomlarından birinin inaktive edilmesi sayesinde gen dozaj dengesinin kısmen korunabilmesine bağlanmaktadır (Munné, 2010).

Klinik açıdan bakıldığında, trizomi X olgularının büyük bir bölümü hafif fenotipik bulgularla seyretmekte veya asemptomatik olabilmektedir. Bu durum, preimplantasyon dönemde morfolojik olarak seçilen embriyoların genetik açıdan her zaman öploid olmayabileceğini ortaya koymaktadır. Trizomi X'in özellikle mozaik formlarının implantasyon potansiyelinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Fragouli, 2011).

47,XXY karyotipi ile karakterize Klinefelter sendromu, gonozomal trizomiler arasında klinik açıdan en iyi tanımlanmış olanlardan biridir. Preimplantasyon embriyolarında XXY anöploidisi taşıyan embriyoların bir kısmı blastokist evresine ulaşabilmekte ve

morfolojik olarak kabul edilebilir kalite gösterebilmektedir. Ancak bu embriyoların implantasyon oranlarının öploid embriyolara kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (Scott, 2012).

XXY trizomisinin embriyo gelişimi üzerindeki etkisi, otozomal trizomilere kıyasla daha sınırlı olmakla birlikte, özellikle hücresel proliferasyon ve gen ekspresyon profilleri üzerinde belirli düzeyde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu durum, embriyonun gelişimsel potansiyelini kısmen sınırlayabilmektedir.

Trizomi Y, diğer gonozomal trizomilere kıyasla daha nadir saptanan bir anomalidir. Y kromozomunun genetik içeriğinin sınırlı olması nedeniyle, bu anomaliye sahip embriyolar embriyonik gelişim açısından görece daha iyi tolere edilebilir kabul edilmektedir. Preimplantasyon çalışmalarda XYY embriyolarının blastokist evresine ulaşabildiği ve bazı durumlarda implantasyon potansiyeli gösterebildiği bildirilmiştir (Nagaoka, 2012).

2.5.2. Yapısal Kromozom Anomalileri

Yapısal kromozom anomalileri, kromozom sayısının normal olduğu ancak kromozomal DNA'nın bütünlüğünde meydana gelen kırılmalar, yeniden birleşmeler veya segmental yeniden düzenlenmeler sonucu ortaya çıkan genetik bozukluklardır. Bu anomaliler, mitoz veya mayoz sırasında oluşan çift zincir DNA kırıkları ve hatalı onarım mekanizmaları sonucunda gelişir. Embriyonik gelişim sürecinde gen dozajının bozulması, genlerin konumunun değişmesi (pozisyon etkisi) veya regülatuvar bölgelerin etkilenmesi yoluyla gelişimsel potansiyeli önemli ölçüde etkileyebilir (Nagaoka, 2012).

İnsan embriyolarında yapısal kromozom anomalilerinin görülme sıklığı, özellikle ileri anne yaşı, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü bulunan çiftlerde belirgin şekilde artmaktadır. Yardımcı üreme teknikleri kapsamında incelenen embriyolarda, yapısal anomalilerin önemli bir kısmı erken embriyonik dönemde gelişimsel arrest ile sonuçlanmakta ve blastokist evresine ulaşamadan elenmektedir (Vanneste, 2009).

Yapısal kromozom anomalileri genel olarak dengeli ve dengesiz anomaliler olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılır.

2.5.2.1. Dengeli Yapısal Kromozom Anomalileri

Dengeli yapısal kromozom anomalileri, kromozomal materyalin net kaybı veya kazanımı olmaksızın yeniden düzenlenmesi ile karakterizedir. Bu grupta yer alan bireyler çoğunlukla fenotipik olarak normaldir; ancak üreme hücreleri oluşurken kromozomların anormal segregasyonu sonucu genetik olarak dengesiz embriyolar oluşabilmektedir. Bu nedenle dengeli yapısal anomaliler, klinik olarak infertilite, düşük embriyo gelişim oranları ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile yakından ilişkilidir (Pellestor, 2014).

Resiprokal translokasyonlar, iki homolog olmayan kromozom arasında karşılıklı segment değişimi ile meydana gelir. Bu translokasyonlar dengeli yapıda olabilir ve taşıyıcı bireyler fenotipik olarak normal görünebilir. Ancak mayoz sırasında bu kromozomlar quadrivalent yapı oluşturur ve bu yapıdan kaynaklanan farklı segregasyon paternleri, genetik olarak dengesiz gametlerin oluşmasına neden olabilir. Sonuç olarak, resiprokal translokasyon taşıyıcılarında elde edilen embriyoların büyük bir kısmı genetik olarak dengesizdir ve bu embriyoların blastokist gelişim oranları ve implantasyon potansiyelleri düşüktür (Escudero, 2008).

Robertsonian translokasyonlar, akrosentrik kromozomlar (13, 14, 15, 21 ve 22) arasında meydana gelir ve kısa kolların kaybı ile uzun kolların birleşmesi sonucu oluşur. Bu translokasyonlar taşıyıcı bireylerde genellikle fenotipik anomaliye yol açmaz; ancak gamet oluşumu sırasında trizomi 13 veya trizomi 21 gibi ciddi sayısal kromozom anomalileri ile ilişkili olabilir. Preimplantasyon genetik testler, Robertsonian translokasyon taşıyıcılarında öploid embriyo oranlarının belirgin şekilde azaldığını ortaya koymuştur (McKinlay, 2018).

Marker kromozomlar, standart sitogenetik analizlerde kökeni net olarak belirlenemeyen, genellikle küçük boyutlu ve fazladan bulunan yapısal kromozom anomalileridir. Bu kromozomlar, küçük süpernümerer marker kromozomlar (sSMC) olarak adlandırılır ve çoğu zaman bir kromozomun sentromerik veya perisentromerik bölgesinden köken alır (Liehr, 2012).

Marker kromozomların klinik etkisi, içerdiği genetik materyalin miktarına ve hangi kromozomdan köken aldığına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bazı marker kromozomlar genetik olarak inaktif veya heterokromatik bölgelerden oluştuğu için minimal fenotipik etki yaratırken, ökromatik bölgeler içeren marker kromozomlar gen

dozajında artışa yol açarak embriyonik gelişimi olumsuz etkileyebilir. Preimplantasyon dönemde marker kromozom taşıyan embriyoların önemli bir kısmı gelişimsel arrest göstermekte veya blastokist evresine ulaşamamaktadır (Liehr, 2007). Marker kromozomların bir diğer önemli özelliği mozaik yapı sergileme eğilimidir. Mitotik bölünmeler sırasında marker kromozomun bazı hücrelerde bulunup bazı hücrelerde kaybolması, embriyoda genetik heterojeniteye neden olur. Bu durum, embriyo gelişiminin öngörülmesini zorlaştırmakta ve morfolojik değerlendirmenin genetik riski yansıtmasını engellemektedir (Crolla, 2014).

Klinik uygulamada marker kromozom taşıyıcı bireylerde PGT-SR ve ileri moleküler sitogenetik yöntemler (FISH, aCGH, NGS) kullanılarak embriyoların ayrıntılı genetik değerlendirilmesi önerilmektedir. Bu yaklaşım, genetik olarak dengeli embriyoların seçilmesine ve sağlıklı gebelik elde edilme olasılığının artırılmasına katkı sağlamaktadır (ESHRE PGT Consortium, 2020).

2.5.2.2. Dengesiz Yapısal Kromozom Anomalileri

Delesyonlar, bir kromozomun belirli bir bölümünün kaybı ile oluşan dengesiz yapısal kromozom anomalileridir. Kaybolan segmentin büyüklüğü ve içerdiği genler, embriyonik gelişim üzerindeki etkiyi belirleyen temel faktörlerdir. Özellikle erken embriyonik gelişimde rol oynayan genleri içeren delesyonlar, hücre proliferasyonu, metabolik regülasyon ve hücre döngüsü kontrolünü bozarak embriyolarda gelişimsel arrest ile sonuçlanabilmektedir (Stephenson, 2002).

Preimplantasyon dönemde delesyon taşıyan embriyoların önemli bir kısmı klivaj evresinde elenirken, bazı küçük segmental delesyonlar blastokist evresine kadar gelişim gösterebilmektedir. Ancak bu embriyoların implantasyon oranlarının düşük olduğu ve erken gebelik kayıpları ile daha sık ilişkilendirildiği bildirilmiştir. Bu durum, morfolojik olarak iyi görünen blastokistlerin genetik açıdan her zaman sağlıklı olmadığını ortaya koymaktadır (Greco, 2015).

Duplikasyonlar, kromozomal bir segmentin fazladan kopyalarının bulunması sonucu gen dozajında artışa yol açan yapısal anomalilerdir. Artmış gen ekspresyonu, erken embriyonik dönemde hücresel homeostazı bozarak hücre bölünme dinamiklerinde düzensizliklere neden olabilir. Bu durum, embriyo gelişiminin yavaşlaması ve hücreler arası asenkron bölünmelerle karakterizedir (Conlin, 2010).

Duplikasyon taşıyan embriyolar blastokist evresine ulaşabilse bile, artmış metabolik stres ve gen ekspresyon dengesizliği nedeniyle implantasyon potansiyelleri sınırlı kalmaktadır. Ayrıca mitotik bölünmeler sırasında segmental duplikasyonların hücreler arasında farklı oranlarda dağılım göstermesi, embriyolarda mozaiklik gelişimine zemin hazırlamaktadır (Greco, 2015).

İnversiyonlar, kromozomal bir segmentin koparak ters yönde yeniden yerleşmesi sonucu oluşan yapısal anomalilerdir ve parasantrik veya perisentrik olarak sınıflandırılır. İnversiyon taşıyıcı bireyler çoğunlukla fenotipik olarak normaldir; ancak mayoz sırasında homolog kromozomların eşleşmesi sırasında oluşan anormal yapılaşmalar, dengesiz gametlerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Kirkpatrick, 2010).

Bu durum, inversiyon taşıyıcı bireylerden elde edilen embriyolarda delesyon ve duplikasyon kombinasyonlarının daha sık görülmesine yol açar. Preimplantasyon dönemde bu embriyoların büyük bir kısmı gelişimsel olarak elenirken, blastokist evresine ulaşabilen bazı embriyolar morfolojik olarak normal değerlendirilebilmektedir. Bu nedenle inversiyon taşıyıcı çiftlerde PGT-SR uygulamaları klinik açıdan büyük önem taşımaktadır (Pellestor, 2014).

Ring kromozomlar, kromozom uç bölgelerinin kaybı sonrasında uçların birleşmesiyle oluşan nadir ancak klinik açıdan önemli yapısal kromozom anomalileridir. Ring kromozomların en belirgin özelliği, mitoz sırasında gösterdikleri yapısal instabilitedir. Bu instabilite, hücre bölünmeleri sırasında kromozomal kırılmaların ve düzensiz segregasyonun artmasına neden olmaktadır (Kosztolányi, 2009).

Embriyonik gelişim sürecinde ring kromozom taşıyan embriyolarda hücreler arası kromozomal heterojenite ve mozaiklik sık görülmektedir. Bu durum, erken embriyonik gelişimde düzensiz bölünmeler, artmış apoptoz ve düşük implantasyon potansiyeli ile ilişkilidir (Vanneste, 2009).

2.5.3. Mozaiklik

Mozaiklik, aynı embriyo içerisinde genetik olarak farklı iki veya daha fazla hücre hattının bir arada bulunması durumu olarak tanımlanmaktadır. Preimplantasyon embriyolarda mozaiklik genellikle postzigotik mitotik bölünme hataları sonucunda ortaya çıkmakta olup, embriyonun bazı hücrelerinin öploid, bazılarının ise anöploid

kromozom içeriğine sahip olmasıyla karakterizedir. Bu durum, embriyo gelişimi ve implantasyon potansiyeli üzerinde önemli etkiler yaratabilmektedir.

Embriyonik mozaikliğin en sık görülen mekanizması, erken mitotik bölünmeler sırasında meydana gelen kromozom ayrılma hataları veya anafaz gecikmesidir. Anafaz gecikmesi sonucunda kromozomun hücre çekirdeğine dahil olamaması, hücrelerden birinde monozomiye yol açarken diğer hücrede kromozom sayısının korunmasına neden olabilir. Bu süreç, embriyo içerisinde farklı kromozom sayılarına sahip hücre popülasyonlarının oluşmasına zemin hazırlar (Taylor, 2014).

Preimplantasyon dönemde mozaiklik insidansının, kullanılan genetik analiz yöntemine ve embriyonun gelişim evresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) temelli erken dönem çalışmalar mozaiklik oranlarını sınırlı sayıda kromozom üzerinden değerlendirirken, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin kullanıma girmesiyle mozaikliğin daha yüksek oranlarda saptanabildiği gösterilmiştir. NGS tabanlı PGT-A analizlerinde, blastokistlerin yaklaşık %5–20'sinde farklı derecelerde mozaiklik saptandığı bildirilmektedir (Fragouli, 2017).

Mozaik embriyoların gelişim potansiyeli, mozaikliğin derecesine ve etkilenen kromozomlara bağlı olarak değişmektedir. Düşük düzeyli mozaikliğe sahip embriyoların (genellikle <%30–40 anöploid hücre oranı) blastokist gelişimini sürdürebildiği ve implantasyon potansiyelinin tamamen anöploid embriyolara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, yüksek düzeyli mozaikli embriyolarda gelişimsel arrest, düşük implantasyon oranları ve artmış gebelik kaybı riski gözlenmektedir (Greco, 2015).

Embriyonun kendini düzeltme kapasitesi, mozaiklik bağlamında önemli bir biyolojik mekanizma olarak değerlendirilmektedir. Özellikle blastokist evresinde, anöploid hücrelerin apoptoz yoluyla elimine edilmesi veya trofektoderm ile iç hücre kitlesi arasında farklılaşma göstermesi, öploid hücrelerin baskın hale gelmesine katkıda bulunabilmektedir. Bu mekanizma, bazı mozaik embriyoların sağlıklı gebeliklerle sonuçlanabilmesini açıklayan olası biyolojik temellerden biri olarak kabul edilmektedir (Bolton, 2016).

Klinik açıdan bakıldığında, mozaik embriyoların transferi konusu halen tartışmalıdır. ESHRE ve PGDIS rehberleri, öploid embriyo bulunmayan durumlarda, düşük dereceli

mozaik embriyoların dikkatli genetik danışmanlık eşliğinde transfer edilebileceğini belirtmektedir. Ancak mozaiklik oranı, etkilenen kromozomun canlı doğumla uyumluluğu ve embriyonun morfolojik kalitesi gibi faktörler transfer kararında belirleyici olmaktadır (PGDIS, 2019; ESHRE PGT-A, 2020)

2.5.4. Anöploidiyi Belirlemede Kullanılan Yöntemler

İnsan embriyolarında kromozomal anöploidiler, implantasyon başarısızlığı ve erken gebelik kayıplarının en önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Özellikle yardımcı üreme teknikleri (ART) ile elde edilen embriyolarda anöploidi oranlarının yüksek olması, embriyonun genetik bütünlüğünün transfer öncesinde değerlendirilmesini gerekli kılmıştır. Bu doğrultuda geliştirilen preimplantasyon genetik test yöntemleri, embriyoların kromozomal durumlarının analiz edilmesine olanak tanımaktadır (Fragouli, 2011.).

Anöploidinin belirlenmesine yönelik ilk yaklaşımlar floresan in situ hibridizasyon (FISH) temelli yöntemler olmuştur. Ancak FISH, sınırlı sayıda kromozomun aynı anda analiz edilebilmesi ve sinyal yorumlamadaki sübjektiflik gibi nedenlerle yeterli kapsam sunamamıştır. Bu kısıtlılıklar, tüm kromozomların eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği daha ileri moleküler tekniklerin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır (Munné, 2018).

Bu gelişmeler doğrultusunda, genom çapında analiz yapılabilmesine imkân tanıyan dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array-CGH) ve kantitatif PCR (qPCR) yöntemleri klinik uygulamalara girmiştir. aCGH, embriyolarda tüm kromozomlar boyunca kopya sayısı değişikliklerini saptayabilme avantajı sunarken, mozaik anöploidilerin düşük düzeylerde tespit edilmesinde sınırlılıklar göstermektedir. Benzer şekilde qPCR yöntemi hızlı sonuç üretmesine rağmen, analiz kapsamının sınırlı olması nedeniyle yerini daha kapsamlı teknolojilere bırakmıştır (Scott, 2013).

Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) teknolojileri, bu noktada anöploidi taramasında önemli bir dönüm noktası oluşturmuştur. NGS, milyonlarca DNA fragmanının eş zamanlı olarak dizilenmesine dayanan paralel dizileme prensibi sayesinde, tüm kromozomların ve kromozomal segmentlerin yüksek çözünürlükle analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Bu teknoloji, embriyolarda hem sayısal

kromozom anomalilerinin hem de segmental delesyon ve duplikasyonların tespit edilmesini mümkün kılmıştır (Goodrich, 2016).

PGT-A uygulamalarında NGS'nin en yaygın kullanımı, blastosist evresinde gerçekleştirilen trofektoderm (TE) biyopsilerinin analizine dayanmaktadır. Bu yaklaşım, erken bölünme evrelerinde yapılan biyopsilere kıyasla daha fazla hücreden genetik materyal elde edilmesini sağlamakta ve sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır. Bununla birlikte, TE biyopsisinin blastosistin tamamını temsil etmemesi, iç hücre kitlesi ile TE arasındaki olası kromozomal farklılıkların klinik yorumlamayı zorlaştırabileceğini düşündürmektedir (Capalbo, 2017).

NGS teknolojilerinin önemli avantajlarından biri, mozaik anöploidilerin farklı düzeylerde saptanabilmesidir. Mozaik embriyolar, hem öploid hem de anöploid hücre popülasyonlarını birlikte içerebilmekte ve bu durum, embriyonun gelişim potansiyelinin değerlendirilmesini karmaşık hale getirmektedir. NGS, düşük oranlı mozaik hücre gruplarını tespit edebilme kapasitesine sahip olsa da, amplifikasyon yanlılıkları ve biyoinformatik analiz süreçlerinden kaynaklanan teknik gürültüler dikkatle değerlendirilmelidir (Greco, 2015).

Güncel çalışmalar, NGS tabanlı PGT-A uygulamalarının embriyo seçimini daha objektif hale getirdiğini ve özellikle tekrarlayan implantasyon başarısızlığı veya ileri anne yaşı gibi risk gruplarında klinik fayda sağlayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, mozaik embriyoların transferine ilişkin klinik sonuçlar hâlen tartışmalı olup, genetik sonuçların embriyo morfolojisi ve klinik parametrelerle birlikte değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (PGDIS, 2021).

2.5.4.1. FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), preimplantasyon genetik tanıda (PGT) anöploidinin saptanmasına yönelik geliştirilen ilk moleküler sitogenetik yöntemlerden biridir. Bu teknikte, hedef kromozomlara özgü olarak tasarlanmış floresan işaretli DNA probları kullanılarak hücre çekirdeği içerisinde belirli kromozomların varlığı ve sayısal durumu değerlendirilmektedir. FISH, embriyonik hücrelerden elde edilen nükleer DNA üzerinde doğrudan görselleştirme imkânı sunması nedeniyle, PGT uygulamalarının erken dönemlerinde yaygın olarak tercih edilmiştir (Munné, 1998).

PGT uygulamalarında FISH tekniği genellikle üçüncü gün embriyolardan elde edilen blastomerler veya daha sınırlı olmakla birlikte blastokist evresindeki trofektoderm hücreleri üzerinde uygulanmıştır. Klinik kullanımlarda, analiz edilebilen prob sayısının kısıtlı olması nedeniyle çoğunlukla klinik açıdan en sık anöploidi ile ilişkilendirilen 13, 18, 21, X ve Y kromozomları hedeflenmiştir. Ancak bu yaklaşım, yalnızca seçilmiş kromozomların değerlendirilmesine olanak tanıdığı için embriyonun tüm kromozomal bütünlüğü hakkında kapsamlı bilgi sunamamıştır (Harper, 2010).

FISH tekniğinin metodolojik sınırlılıkları arasında, aynı anda sınırlı sayıda kromozomun analiz edilebilmesi, floresan sinyallerin üst üste binmesi, zayıf veya non-spesifik hibridizasyon ve çekirdeğin üç boyutlu yapısından kaynaklanan sinyal kayıpları yer almaktadır. Ayrıca sinyal sayımının manuel olarak yapılması, gözlemciye bağlı sübjektif yorum farklılıklarına yol açabilmekte ve sonuçların tekrarlanabilirliğini olumsuz etkilemektedir. Bu durum özellikle düşük dereceli mozaikliğin saptanmasında yöntemin duyarlılığını sınırlandırmaktadır (Munné, 2018). Mozaik embriyolarda hücreler arası kromozomal farklılıkların yaygın olarak görülmesi, FISH tekniğinin klinik karar verme süreçlerindeki güvenilirliğini daha da azaltmıştır. Bir embriyodan sınırlı sayıda hücrenin analiz edilmesi, embriyonun genel kromozomal yapısının doğru şekilde temsil edilememesine neden olabilmektedir. Bu durum, yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuç riskini artırarak embriyo seçimini olumsuz etkileyebilmektedir (Harper, 2010).

Tüm bu teknik ve biyolojik sınırlılıklar, anöploidinin daha objektif, duyarlı ve tüm kromozomları kapsayacak şekilde değerlendirilebildiği kapsamlı kromozom tarama (comprehensive chromosome screening, CCS) yöntemlerinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır. Array tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array CGH), tek nükleotid polimorfizmi (SNP) dizileri ve yeni nesil dizileme (NGS) gibi ileri teknolojiler, FISH tekniğinin yerini alarak PGT-A uygulamalarında güncel standart yöntemler haline gelmiştir (Munné, 2018).

2.5.4.2. Array CGH Tekniği (Array Comparative Genomic Hybridization)

Array tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array CGH), preimplantasyon genetik testlerde (PGT) anöploidinin daha kapsamlı ve objektif biçimde değerlendirilmesini sağlayan ileri moleküler sitogenetik yöntemlerden biridir. Bu

teknik, embriyodan elde edilen genomik DNA'nın referans DNA ile birlikte floresan işaretlenerek mikroarray platformları üzerinde karşılaştırılmasına dayanır. Böylece embriyoya ait tüm kromozomlar eş zamanlı olarak analiz edilebilmekte ve kromozomal kazanç veya kayıplar yüksek duyarlılıkla saptanabilmektedir (Wells et al., 2014).

Array CGH tekniği, FISH yönteminin aksine, yalnızca seçilmiş kromozomlarla sınırlı kalmadan embriyonun tüm genomu hakkında bilgi sunması nedeniyle PGT-A uygulamalarında önemli bir gelişme olarak kabul edilmiştir. Özellikle 24 kromozomun tamamının aynı anda değerlendirilebilmesi, nadir anöploidilerin ve çoklu kromozomal düzensizliklerin saptanmasına olanak tanımıştır. Bu özelliği sayesinde array CGH, embriyo seçiminde daha güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır (Fragouli & Wells, 2011).

Tekniğin bir diğer önemli avantajı, sonuçların sayısal veri olarak elde edilmesi ve manuel sinyal sayımına ihtiyaç duyulmamasıdır. Bu durum, gözlemciye bağlı sübjektif yorum farklılıklarını azaltarak analizlerin standardizasyonuna katkı sağlamıştır. Ayrıca blastokist evresinde trofektoderm biyopsisi ile birlikte kullanıldığında, embriyonun kromozomal yapısının daha doğru temsil edildiği bildirilmiştir (Scott, 2013).

Bununla birlikte array CGH tekniğinin bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Özellikle düşük düzeyli mozaikliğin saptanmasında yöntemin duyarlılığı sınırlı olup, mozaik oranının belirli bir eşik değerin altında olması durumunda sonuçlar öploid olarak raporlanabilmektedir. Ayrıca bu yöntem, dengeli translokasyonlar veya inversiyonlar gibi yapısal kromozomal anomalilerin tespitinde yetersiz kalmaktadır (Fiorentino, 2014).

2.5.4.3. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) Yöntemi

Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS), DNA ve RNA moleküllerinin nükleotid dizilerinin yüksek doğruluk ve yüksek verimlilikle analiz edilmesini sağlayan ileri moleküler genetik teknolojiler bütünüdür. Birinci nesil dizileme yöntemlerinden en yaygın olan Sanger dizileme tekniği, yüksek doğruluk sağlamasına rağmen düşük verimlilik, yüksek maliyet ve sınırlı analiz kapasitesi gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle genom çapında analizlerin rutin olarak yapılması

uzun yıllar mümkün olmamıştır. NGS teknolojilerinin geliştirilmesiyle birlikte, milyonlarca DNA fragmanının eş zamanlı olarak dizilenmesine olanak tanıyan paralel dizileme prensibi benimsenmiş ve genomik analizlerde devrim niteliğinde bir ilerleme sağlanmıştır. Bu gelişme, hem temel bilim araştırmalarında hem de klinik tanı uygulamalarında genom çapında incelemelerin erişilebilir hale gelmesine katkı sağlamıştır (Metzker, 2010).

NGS teknolojilerinin temelini oluşturan paralel dizileme yaklaşımı sayesinde, tek bir deneyde milyonlarca kısa DNA okuması (read) elde edilebilmektedir. Bu durum, tüm genom dizileme (whole genome sequencing), tüm ekzom dizileme (whole exome sequencing) ve hedefe yönelik dizileme gibi farklı uygulamaların geliştirilmesine zemin hazırlamıştır. Ayrıca dizileme süresinin saatler ile sınırlı olması ve birim baz başına maliyetin önemli ölçüde azalması, NGS'yi klasik dizileme yöntemlerine kıyasla çok daha avantajlı hale getirmiştir. Günümüzde NGS, kanser genomikleri, nadir hastalıkların tanısı, prenatal ve preimplantasyon genetik analizler gibi pek çok alanda rutin olarak kullanılmaktadır (Shendure, 2017).

NGS tabanlı analizler genel olarak birkaç temel aşamadan oluşmaktadır: örnek hazırlığı, kütüphane oluşturulması, amplifikasyon, dizileme ve biyoinformatik veri analizi. Preimplantasyon genetik tarama (PGT-A) uygulamalarında bu süreç, blastosist evresinde gerçekleştirilen trofektoderm (TE) biyopsisinden elde edilen sınırlı sayıdaki hücrelerle başlatılmaktadır. Bu biyopsi materyali genellikle 5–10 hücre içerdiğinden, dizileme öncesinde DNA miktarının artırılması zorunludur. Bu amaçla tüm genom amplifikasyonu (whole genome amplification, WGA) yöntemleri kullanılmaktadır. WGA, mevcut DNA'nın rastgele veya yarı rastgele çoğaltılmasını sağlayarak dizileme için yeterli miktarda genetik materyal elde edilmesine olanak tanır (Handyside, 2010; ESHRE PGT Consortium, 2018).

WGA sonrasında elde edilen DNA, dizilemeye uygun uzunluklarda fragmanlara ayrılmakta ve her fragmana platforma özgü adaptör dizilerine bağlanmaktadır. Bu adaptörler, DNA parçalarının dizileme platformuna bağlanmasını ve aynı çalışmada yer alan farklı örneklerin birbirinden ayırt edilmesini mümkün kılar. Kütüphane hazırlama aşaması, NGS analizinin doğruluğunu ve güvenilirliğini doğrudan etkileyen en kritik basamaklardan biridir. Fragman boyut dağılımındaki düzensizlikler, adaptör ligasyonundaki yetersizlikler veya DNA kayıpları, dizileme verilerinde yanlılıklara

yol açabilmektedir. Bu nedenle PGT-A gibi klinik uygulamalarda kütüphane kalitesi titizlikle kontrol edilmelidir (Goodwin, 2014).

NGS platformlarında dizileme işlemi, kullanılan teknolojiye bağlı olarak farklı prensiplere dayanmaktadır. Illumina platformları, "sequencing by synthesis" olarak adlandırılan yöntemi kullanmakta ve floresan işaretli geri dönüşümlü nükleotidlerin eklenmesiyle dizileme gerçekleştirmektedir. Ion Torrent sistemleri ise nükleotid eklenmesi sırasında açığa çıkan hidrojen iyonlarını algılayan yarı iletken tabanlı bir teknolojiye sahiptir. Her iki sistemde de amaç, DNA dizisindeki bazların sırasını yüksek doğrulukla belirlemek ve milyonlarca kısa okuma üretmektir. Bu ham dizileme verileri, daha sonra biyoinformatik analizlerle referans genoma hizalanarak yorumlanabilir hale getirilmektedir (Rothberg, 2008).

PGT-A uygulamalarında NGS verilerinin değerlendirilmesi, kromozomlara ait okuma sayılarının kantitatif olarak karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Öploid embriyolarda her kromozomdan elde edilen okuma sayıları belirli bir denge içerisindeyken, anöploid embriyolarda bu dengede anlamlı sapmalar gözlenmektedir. Okuma sayısındaki artışlar kromozomal kazanımları (trizomi), azalmalar ise kromozomal kayıpları (monozomi) işaret etmektedir. NGS'nin sağladığı yüksek çözünürlük sayesinde, yalnızca tüm kromozomlara ait sayısal anomaliler değil, aynı zamanda daha küçük segmental delesyon ve duplikasyonlar da tespit edilebilmektedir (Treff, 2015).

NGS yönteminin PGT-A alanındaki en önemli avantajlarından biri, embriyonik mozaikliğin saptanabilmesidir. Mozaik embriyolar, aynı embriyo içerisinde öploid ve anöploid hücre popülasyonlarının birlikte bulunmasıyla karakterizedir. NGS, kromozomlara ait okuma oranlarında gözlenen ara düzey değişimleri analiz ederek, farklı mozaiklik oranlarının tanımlanmasına olanak tanır. Bu özellik, embriyoların genetik yapısının daha ayrıntılı değerlendirilmesini sağlamakla birlikte, klinik sonuçların yorumlanmasını da daha karmaşık hale getirmektedir. Özellikle düşük düzeyli mozaikliklerin klinik önemi konusunda literatürde halen tartışmalar devam etmektedir (Viotti, 2020).

Bununla birlikte, NGS tabanlı PGT-A analizlerinin bazı teknik sınırlılıkları bulunmaktadır. WGA sürecinde oluşabilecek amplifikasyon yanlılıkları, kromozomlara ait okuma oranlarında yapay sapmalara neden olabilmektedir. Ayrıca TE biyopsisinin yalnızca embriyonun dış hücre tabakasını temsil etmesi, iç hücre

kitlesindeki genetik durumun birebir yansıtılamamasına yol açabilir. Bu nedenle NGS sonuçları değerlendirilirken biyopsi tekniği, embriyonun gelişim evresi ve morfolojik özellikler birlikte ele alınmalıdır. Klinik kararların yalnızca genetik sonuçlara değil, bütüncül bir embriyo değerlendirmesine dayanması önerilmektedir (Greco, 2015; Capalbo, 2017).

Sonuç olarak NGS, PGT-A uygulamalarında günümüzde en yaygın kullanılan ve en kapsamlı genetik bilgiyi sağlayan yöntem olarak kabul edilmektedir. Yüksek analiz kapasitesi, segmental anomalilerin ve mozaikliğin saptanabilmesi gibi avantajları sayesinde embriyo seçiminin daha objektif kriterlere dayandırılmasına katkı sağlamaktadır. Ancak yöntemin teknik sınırlılıklarının bilinmesi ve sonuçların deneyimli multidisipliner ekipler tarafından yorumlanması, NGS verilerinin klinik uygulamalarda güvenilir şekilde kullanılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Harper, 2018; ESHRE PGT Consortium, 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Türü ve Deseni

Bu çalışma, retrospektif ve tanımlayıcı-analitik nitelikte planlanmıştır. Araştırmanın temel amacı, blastokist kalitesinin embriyo anöploidisi üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Bu kapsamda, preimplantasyon genetik test–anöploidi (PGT-A) uygulanmış blastokistlerin morfolojik kalite özellikleri ile kromozomal sayısal durumları arasındaki ilişki incelenmiştir.

Çalışma, 2023- 2025 yılları arasında Özel Momart Tüp Bebek Merkezi'nde IVF/ICSI tedavisi uygulanmış ve PGT-A analizi gerçekleştirilmiş embriyolara ait kayıtlar üzerinden yürütülmüştür. Araştırma, embriyoloji laboratuvarı kayıtları ve genetik analiz raporları kullanılarak retrospektif olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Örneklemi

Araştırmanın örneklemini, belirtilen tarih aralığında Özel Momart Tüp Bebek Merkezi'nde IVF/ICSI tedavisi uygulanmış ve PGT-A analizi yapılmış, dahil edilme kriterlerini karşılayan toplam 221 blastokist oluşturmaktadır. Çalışmaya yalnızca blastokist evresine ulaşmış ve trofektoderm biyopsisi uygulanmış embriyolar dahil edilmiştir.

3.3. Veri Toplama Yöntemi

Bu çalışmada veriler, Özel Momart Tüp Bebek Merkezi'nde Eylül 2025 – Aralık 2025 tarihleri arasında IVF/ICSI tedavisi uygulanmış hastalara ait embriyoloji ve genetik laboratuvar kayıtları incelenerek retrospektif olarak elde edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm veriler, hasta kimlik bilgileri gizli tutulacak şekilde anonimleştirilmiş kayıtlar üzerinden değerlendirilmiştir.

Araştırma kapsamında 98 hastaya ait toplam 221 blastokiste ilişkin veriler toplanmıştır.

Hastalara ait demografik veriler kapsamında anne ve baba yaşı klinik kayıtlar üzerinden elde edilerek analizlerde kullanılmak üzere kaydedilmiştir.

3.4. Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri

Dahil Edilme Kriterleri

- IVF/ICSI tedavisi uygulanmış hastalara ait embriyolar olması
- Blastokist evresine (gün 5 veya gün 6) ulaşmış embriyolar
- Trofektoderm biyopsisi uygulanmış olması
- PGT-A analiz sonucu bulunan blastokistler
- Blastokist morfolojik değerlendirmesi (genişleme derecesi, ICM ve TE skorları) kayıt altına alınmış embriyolar

Dışlanma Kriterleri

- Blastokist evresine ulaşmamış embriyolar
- Trofektoderm biyopsisi uygulanmamış embriyolar
- PGT-A analizi tamamlanmamış veya sonuç raporu bulunmayan blastokistler
- Morfolojik değerlendirme verileri eksik olan embriyolar

3.5. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için etik kurul onayı, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Araştırma, 11.12.2025 tarihli ve 2025/012-1726 sayılı toplantı kararı ile onaylanmıştır.

3.6. Blastokist Morfolojik Değerlendirme Kriterleri

Bu çalışmada blastokistlerin morfolojik değerlendirilmesi, embriyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan Gardner ve Schoolcraft blastokist sınıflandırma sistemi temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Tüm blastokistler, blastosöl genişleme derecesi ile iç hücre kitlesi (inner cell mass, ICM) ve trofektoderm (TE) morfolojileri açısından değerlendirilmiştir.

Blastosöl genişleme derecesi, blastokistin gelişim evresini yansıtacak şekilde 1'den 6'ya kadar sınıflandırılmıştır. Buna göre; erken blastokist (evre 1–2), tam blastokist (evre 3), genişlemiş blastokist (evre 4) ve kısmen veya tamamen zona pellusidadan çıkmış blastokistler (evre 5–6) olarak değerlendirme yapılmıştır.

İç hücre kitlesi (ICM), hücre sayısı, hücrelerin kompaktlığı ve düzenlenme özelliklerine göre A, B ve C olmak üzere üç kalite sınıfına ayrılmıştır. ICM-A, sıkı şekilde paketlenmiş ve hücre sayısı fazla olan yapıları; ICM-B, orta derecede kompakt ve hücre sayısı orta olan yapıları; ICM-C ise hücre sayısı az ve düzensiz yapıları tanımlamaktadır.

Trofektoderm (TE) değerlendirmesi ise hücre sayısı, hücrelerin düzenlenme biçimi ve epitel bütünlüğü dikkate alınarak A, B ve C şeklinde sınıflandırılmıştır. TE-A, çok sayıda, düzenli ve homojen hücrelerden oluşan yapıları; TE-B, orta sayıda ve kısmen düzensiz hücreleri; TE-C ise az sayıda ve düzensiz hücrelerden oluşan yapıları ifade etmektedir.

Her bir blastokist, genişleme derecesi ile ICM ve TE skorlarının kombinasyonu kullanılarak kalite açısından tanımlanmış; elde edilen morfolojik veriler, PGT-A sonuçları ile ilişkilendirilmek üzere analiz edilmiştir. Değerlendirmeler, rutin klinik uygulamalara uygun olarak deneyimli embriyologlar tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.7. PGT-A Uygulama Yöntemi ve NGS Protokolü

Bu çalışmada blastokistlerin kromozomal sayısal durumlarının değerlendirilmesi amacıyla Preimplantasyon Genetik Test–Anöploidi (PGT-A) uygulanmış olup, analizler yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) temelli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.1. Trofektoderm Biyopsisi

PGT-A işlemi kapsamında, blastokist evresine ulaşmış embriyolardan trofektoderm (TE) biyopsisi alınmıştır. Biyopsi işlemi, blastokistin iç hücre kitlesine (ICM) zarar vermeyecek şekilde, genişlemiş blastokist evresinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada trofektoderm tabakasından sınırlı sayıda hücre örneklenmiş ve genetik analiz için uygun koşullarda muhafaza edilmiştir.

Biyopsi işleminin ardından embriyolar, klinik uygulamalara uygun olarak vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş ve genetik analiz sonuçları elde edildikten sonra transfer planlaması yapılmıştır.

3.7.2. DNA Amplifikasyonu ve Kütüphane Hazırlığı

Trofektoderm biyopsisinden elde edilen hücrelerden izole edilen DNA örneklerine, sınırlı miktardaki genetik materyalin analiz edilebilmesi amacıyla tüm genom amplifikasyonu (Whole Genome Amplification, WGA) uygulanmıştır. Bu aşamada elde edilen amplifiye DNA, NGS analizine uygun hale getirilmiştir.

Amplifikasyon sonrasında DNA örnekleri, dizileme işlemi için kütüphane hazırlama aşamasına alınmıştır. Kütüphane hazırlığı sürecinde DNA fragmentasyonu, adaptör bağlanması ve dizilemeye uygun yapıların oluşturulması sağlanmıştır. Hazırlanan kütüphaneler kalite kontrol aşamalarından geçirilerek dizileme platformuna aktarılmıştır.

3.7.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS) ve Veri Analizi

Hazırlanan DNA kütüphaneleri, NGS platformu kullanılarak dizilenmiştir. Dizileme işlemi sonucunda elde edilen ham veriler, biyoinformatik analizler aracılığıyla değerlendirilmiş ve her bir embriyonun kromozomal kopya sayıları analiz edilmiştir.

NGS tabanlı analizler sayesinde tüm kromozomlar eş zamanlı olarak değerlendirilmiş; kromozomal kazanım veya kayıplar yüksek çözünürlükle tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre embriyolar;

- Öploid (kromozomal olarak normal),
- Anöploid (kromozomal sayısal anormallik içeren)

olarak sınıflandırılmıştır. Mozaik embriyolar, NGS verilerinde gözlenen kopya sayısı değişimlerine dayalı olarak değerlendirilmiştir.

NGS tabanlı PGT-A yöntemi; yüksek duyarlılığı, tüm kromozomları kapsayan analiz olanağı ve mozaik embriyoların tespitine izin vermesi nedeniyle bu çalışmada tercih edilmiştir. Elde edilen genetik analiz sonuçları, blastokist morfolojik kalite parametreleri ile ilişkilendirilerek değerlendirilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen verilerin istatistiksel analizi, blastokist morfolojik kalite parametreleri ile embriyo kromozomal durumu arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Analizlerde blastokistlerin genişleme derecesi, iç hücre kitlesi (ICM) ve trofektoderm (TE) kalite skorları ile PGT-A sonuçları (öploid ve anöploid) karşılaştırılmıştır.

Tanımlayıcı istatistikler, kategorik değişkenler için sayı (n) ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Blastokist kalite parametreleri ile kromozomal durum arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde ki-kare (χ^2) testi kullanılmıştır.

Blastokist morfolojik özelliklerinin öploid olma olasılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. Bu analizde bağımlı değişken olarak embriyonun kromozomal durumu (öploid / öploid olmayan), bağımsız değişkenler olarak ise blastokist genişleme derecesi, ICM ve TE kalite skorları ele alınmıştır.

İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tablolar halinde sunulmuş ve bulgular literatür eşliğinde yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya toplam 98 hastaya ait 221 blastokist dahil edilmiştir. Hastaların yaşları değerlendirilmiş olup, yaş değişkeni tanımlayıcı istatistikler ile analiz edilmiştir. Blastokistlerin PGT-A sonuçları öploid, anöploid ve mozaik olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 1. Hastaların Demografik Özellikleri

Yaş	**Ortalama** ± SS	**Minimum-Maksimum**
Anne	38,14 ± 6,29	24-48
Baba	40,53 ± 6,27	27-56

Hastaların (n=98) demografik özelliklerine ilişkin ortalama ve standart sapmalar Tablo 4.1' de verilmiştir.

Blastokistler Gardner ve Schoolcraft morfolojik sınıflamasına göre değerlendirilmiş; 4BA ve üzeri kaliteye sahip blastokistler iyi kalite, 3AA–4BC arası blastokistler orta kalite, 5CC ve altı blastokistler ise düşük kalite olarak gruplandırılmıştır.

Tablo 2. Blastokistlerin Gardner Morfolojik Sınıflamasına Göre Kalite Gruplarına Dağılımı

Blastokist Kalite Grubu	**Blastokist Kalitesi**	**n**	**%**
İyi	5AA, 5AB, 5BA, 5BB, 4AA, 4AB	123	55,7
Orta	5BC, 5CB, 4BB, 4BC, 4CB, 3AA	71	32,1
Kötü	5CC, 4CC, 3BC, 3CB, 3CC, 2BB	27	12,2
Toplam		221	100

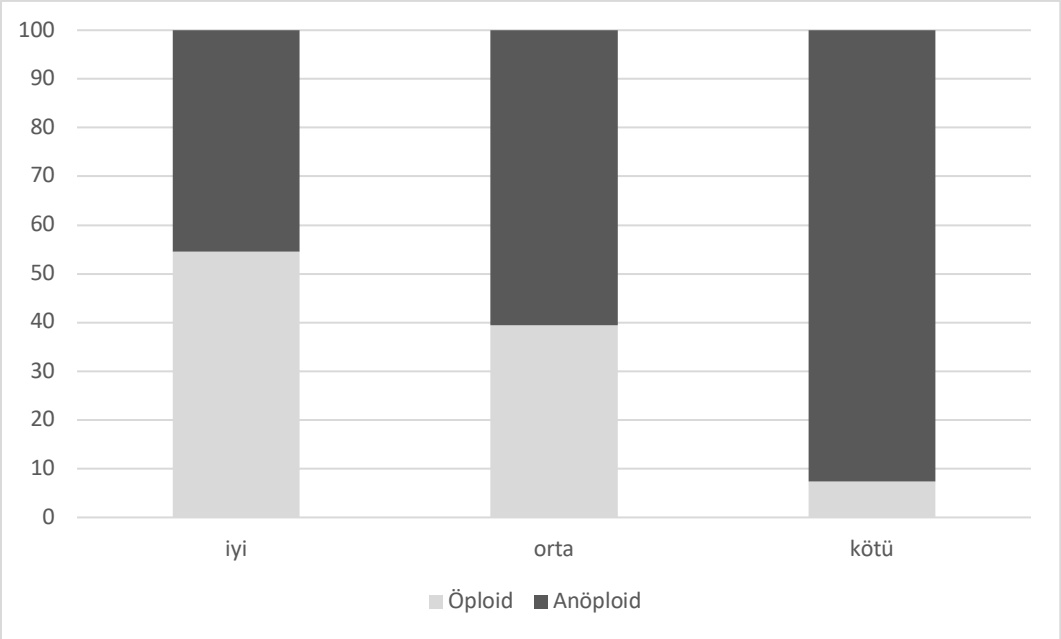
Çalışmaya dahil edilen 221 blastokistin %55,7'si iyi kalite, %32,1'i orta kalite ve %12,2'si düşük kalite blastokist olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 3. Blastokist Kalitesi İle Anöploidi Durumu Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Blastokist Kalite Grubu	**Öploid (n, %)**	**Anöploid (n, %)**	**Toplam (n)**	**χ^2**	**p**
İyi	67 (%54,5)	56 (%45,5)	**123**	**17,4**	**0,001**
Orta	28 (%39,4)	43 (%60,6)	**71**		
Kötü	2 (%7,4)	25 (%92,6)	**27**		
Toplam	97 (%43,9)	124 (%56,1)	**221**		

İyi kalite blastokistlerde öploidi oranı %54,5 iken, bu oran orta kalite blastokistlerde %39,4'e, düşük kalite blastokistlerde ise %7,4'e düşmüştür. Blastokist kalitesi azaldıkça anöploidi oranının belirgin olarak arttığı gözlenmiştir.

Blastokist kalite grupları ile kromozomal durum arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($\chi^2 = 17,4$; sd = 2; $p < 0,001$).



Şekil 3. Blastokist kalite gruplarında öploid ve anöploid embriyoların yüzdesel dağılımı.

Tablo 4. Anne Yaşı ve Blastokist Kalite Gruplarına Göre Ploidite Dağılımı

Anne Yaşı	**Kalite**	**Öploid (n, %)**	**Anöploid (n, %)**	**Toplam**
<35	İyi	39 (%55,7)	31 (%44,3)	**70**
	Orta	17 (%51,5)	16 (%48,5)	**33**
	Kötü	2 (%20,0)	8 (%80,0)	**10**
≥35	İyi	28 (%47,5)	31 (%52,5)	**59**
	Orta	11 (%34,4)	21 (%65,6)	**32**
	Kötü	0 (%0,0)	17 (%100)	**17**

Anne yaşı ≥35 olan grupta, blastokist kalite gruplarının tümünde anöploid blastokist oranlarının <35 yaş grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Özellikle kötü kalite blastokistlerde ≥35 yaş grubunda anöploidi oranı %100 olarak saptanmıştır.

Tablo 5. Anne Yaşı ve Blastokist Kalitesinin Anöploidi Riski Üzerine Etkisini Gösteren Çok Değişkenli Lojistik Regresyon Analizi

Değişken	OR	%95 Güven Aralığı	p
Blastokist Kalitesi			
İyi (Referans)	1,00	-	-
Orta	1,37	0,75- 2,50	0,311
Kötü	12,33	2,79- 54,44	**0,001**
Anne Yaşı			
<35 (Referans)	1,00	-	-
≥35	1,66	0,95- 2,90	0,078

Bağımlı değişken embriyonun kromozomal durumu (anöploid/öploid) olup, bağımsız değişkenler blastokist kalite grubu (iyi referans) ve anne yaşı (<35 referans, ≥35) olarak analize dahil edilmiştir. Sonuçlar odds oranı (OR), %95 güven aralığı (GA) ve p değeri olarak sunulmuştur.

Analiz sonuçlarına göre, kötü kalite blastokistlerin, iyi kalite blastokistlere kıyasla anöploid olma olasılığının anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (OR = 12,33; %95 GA: 2,79–54,44; $p < 0,001$). Buna karşılık, orta kalite blastokistlerde anöploidi riski iyi kalite blastokistlere göre artmış olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (OR = 1,37; %95 GA: 0,75–2,50; $p = 0,311$).

Anne yaşı değerlendirildiğinde, 35 yaş ve üzerindeki olgularda anöploid embriyo görülme olasılığı, 35 yaş altı olgulara göre daha yüksek olmakla birlikte bu ilişkinin istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görülmüştür (OR = 1,66; %95 GA: 0,95–2,90; $p = 0,078$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada blastokist morfolojik kalitesi ile embriyo anöploidisi arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve blastokist kalite düzeyinin anöploidi riski üzerinde belirleyici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, blastokist kalitesi azaldıkça anöploid embriyo oranlarının anlamlı biçimde arttığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, embriyo morfolojisinin yalnızca gelişimsel potansiyeli değil, aynı zamanda embriyonun kromozomal bütünlüğünü de yansıtabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda yapılan çok değişkenli lojistik regresyon analizi sonucunda, kötü kalite blastokistlerin anöploid olma olasılığının iyi kalite blastokistlere kıyasla yaklaşık 12 kat arttığı saptanmıştır. Bu bulgu, blastokist morfolojik değerlendirmenin yalnızca implantasyon potansiyelini değil, aynı zamanda embriyonun genetik yapısı hakkında da bilgi sağlayabileceğini göstermektedir. Literatürde yer alan birçok çalışmada da blastokist morfolojisi ile kromozomal durum arasında anlamlı bir ilişki bildirilmiştir. Özellikle iç hücre kitlesi (ICM) ve trofoektoderm (TE) kalitesinin düşük olduğu blastokistlerde anöploidi oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Capalbo vd., 2014; Hill vd., 2013; Irani et al., 2018). Benzer şekilde Capalbo ve arkadaşları (2014), blastokist morfolojik kalitesi arttıkça öploid embriyo oranlarının da arttığını bildirmiştir.

Anne yaşı ile embriyo anöploidisi arasındaki ilişki uzun süredir bilinmektedir ve ileri anne yaşının embriyolarda kromozomal anormallik riskini artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Hassold & Hunt, 2001; Fragouli & Wells, 2011). Bununla birlikte, çalışmamızda anne yaşının blastokist kalitesi ile birlikte modele dahil edildiği çok değişkenli analizlerde bağımsız bir risk faktörü olarak istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görülmüştür. Buna karşın, ≥35 yaş grubunda anöploidi oranlarının <35 yaş grubuna kıyasla daha yüksek olması, anne yaşının embriyo genetik bütünlüğü üzerindeki etkisini destekler niteliktedir. Bu durum, anne yaşının embriyo kalitesi ve blastokist morfolojisi üzerinden dolaylı bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Blastokist kalite gruplarına göre yapılan alt grup analizlerinde, her iki yaş grubunda da blastokist kalitesi düştükçe anöploidi oranlarının arttığı gözlenmiştir. Özellikle ≥35

yaş grubunda düşük kaliteli blastokistlerde anöploidi oranının %100 olarak saptanması, ileri anne yaşı ile birlikte kötü morfolojik özelliklerin birleştiğinde genetik riskin belirgin şekilde arttığını göstermektedir. Bu bulgu, ileri yaş olgularda embriyo seçiminde morfolojik değerlendirmenin önemini vurgulamaktadır. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda da ileri anne yaşına sahip hastalarda düşük morfolojik kaliteye sahip embriyolarda anöploidi oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Irani vd., 2018; McCoy, 2017).

Bununla birlikte, bazı çalışmalar blastokist morfolojisi ile kromozomal durum arasındaki ilişkinin sınırlı olduğunu veya morfolojik olarak iyi değerlendirilen embriyolarda da anöploidi görülebileceğini bildirmiştir (Munne vd., 2017; Greco et vd., 2015). Bu durum, embriyo seçiminde yalnızca morfolojik değerlendirmenin yeterli olmayabileceğini ve genetik değerlendirme yöntemlerinin klinik önemini ortaya koymaktadır. Özellikle yeni nesil dizileme (NGS) tabanlı preimplantasyon genetik testlerinin (PGT-A) kullanıma girmesi ile birlikte embriyolardaki kromozomal anomalilerin daha yüksek doğrulukla saptanabilmesi mümkün hale gelmiştir (Treff & Zimmerman, 2017; Fiorentino vd., 2014).

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Çalışmanın retrospektif tasarıma sahip olması, hasta sayısının tek merkezle sınırlı olması ve mozaik embriyoların ayrı bir analiz grubu olarak değerlendirilmemesi çalışmanın başlıca sınırlılıkları arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, tüm embriyolarda NGS temelli PGT-A analizinin uygulanmış olması ve blastokist morfolojisinin standardize edilmiş değerlendirme kriterlerine göre sınıflandırılması çalışmanın güçlü yönlerini oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, blastokist morfolojik kalitesinin embriyo anöploidisi ile anlamlı ve güçlü bir ilişki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle kötü kalite blastokistlerde anöploidi riskinin belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Anne yaşı anöploidi için önemli bir faktör olmakla birlikte, blastokist kalite düzeyinin embriyonun kromozomal durumunu öngörmede bağımsız ve güçlü bir belirleyici olduğu görülmüştür.

Elde edilen bulgular, yardımcı üreme tekniklerinde embriyo seçiminde blastokist morfolojik değerlendirmenin klinik önemini desteklemekte ve özellikle ileri yaş

olgularda düşük kaliteli blastokistlerin genetik risk açısından dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Gelecekte yapılacak daha geniş örneklemli ve prospektif çalışmaların blastokist morfolojisi ile embriyo kromozomal bütünlüğü arasındaki ilişkinin daha net ortaya konmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abbott, A. L., & Ducibella, T. (2001). Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience, 6*, D792–D806.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine, & ESHRE Special Interest Group of Embryology. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction, 26*(6), 1270–1283.

Anderson, K., Niesenblat, V., & Norman, R. (2010). Lifestyle factors in people seeking infertility treatment: A review. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology, 50*(1), 8–20.

Baltz, J. M. (2012). Media composition: Salts and osmolality. *Methods in Molecular Biology, 912*, 61–80.

Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., … Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature, 456*(7218), 53–59.

Bolton, H., Graham, S. J. L., Van der Aa, N., et al. (2016). Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal development. *Nature Communications, 7*, 11165.

Bolumar, F., Olsen, J., Rebagliato, M., & et al. (2000). Body mass index and delayed conception: A European multicenter study on infertility and subfecundity. *American Journal of Epidemiology, 151*(11), 1072–1079.

Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., et al. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Human Reproduction, 28*(3), 746–757.

Capalbo, A., & Rienzi, L. (2017). Mosaicism between trophectoderm and inner cell mass: Implications for preimplantation genetic testing. *Human Reproduction, 32*(3), 493–497.

Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., et al. (2014). Correlation between blastocyst morphology and chromosomal status: A comprehensive analysis of trophectoderm biopsies analyzed by next-generation sequencing. *Human Reproduction, 29*(11), 2559–2568.

Charlesworth, A., Meijer, H. A., & de Moor, C. H. (2013). Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 4*, 437–461.

Cohen, J., Gilligan, A., Esposito, W., et al. (2007). Ambient air quality and pregnancy outcome following IVF. *Human Reproduction, 22*(5), 1312–1319.

Conlin, L. K., et al. (2010). Mechanisms of duplication formation in the human genome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 154C*(1), 44–53.

Crolla, J. A., Long, F., Rivera, H., & Thompson, P. (2014). A FISH-based approach to defining the origin and content of marker chromosomes. *Journal of Medical Genetics, 51*(7), 417–423.

Duvan, C., Şatıroğlu, H., Berker, B., Çetinkaya, E., & Kahraman, K. (2003). Yardımla üreme tekniklerinde implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen faktörler. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik, 13*, 466–476.

Enilo, O. W., Adetola, A. A., & Abayomi, T. (2012). A review of female infertility: Important etiological factors and management. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 1*(2), 134–137.

Escudero, T., Lee, M., Stevens, J., Sandalinas, M., & Munne, S. (2008). Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: Detection of chromosomal abnormalities in embryos. *Fertility and Sterility, 90*(4), 1267–1274.

ESHRE PGT Consortium, Carvalho, F., Coonen, E., Goossens, V., Kokkali, G., Rubio, C., et al. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction Open, 2020*(3), hoaa017.

Famurewa, A. C., & Ugwuja, E. I. (2017). Association of blood and seminal plasma cadmium and lead levels with semen quality in non-occupationally exposed infertile men in Abakaliki, South East Nigeria. *Journal of Family and Reproductive Health, 11*(2), 97–103.

Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A., Cotroneo, E., Cottone, G., et al. (2014). Application of next-generation sequencing technology for comprehensive chromosome screening of embryos in in vitro fertilization cycles. *Human Reproduction, 29*(12), 2802–2813.

Fragouli, E., & Wells, D. (2011). Delayed implantation and chromosome abnormalities in human embryos. *Human Reproduction, 26*(6), 1537–1546.

Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., et al. (2017). The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Human Genetics, 136*(9), 1135–1146.

Franasiak, J. M., et al. (2014). The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner. *Fertility and Sterility, 101*(3), 656–663.

Fraser, L. R. (1995). Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction, 10*(Suppl. 1), 22–30.

Gardner, D. K., & Schoolcraft, W. B. (1999). Culture and transfer of human blastocysts. *Human Reproduction, 14*(6), 1284–1292.

Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., & Schoolcraft, W. B. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility, 73*(6), 1155–1158.

Gardner, D. K., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, T., & Schoolcraft, W. B. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility, 69*(1), 84–88.

Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine, 38*(4), 979–986.

Gilbert, S. F. (2013). *Developmental biology* (10th ed.). Sinauer Associates.

Goldberg, J. M., Falcone, T., & Attaran, M. (2007). In vitro fertilization update. *Cleveland Clinic Journal of Medicine, 74*(5), 329–338.

Goodrich, D., et al. (2016). Next-generation sequencing for aneuploidy screening: Clinical application. *Fertility and Sterility.*

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics, 17*(6), 333–351.

Greco, E., et al. (2015). Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *New England Journal of Medicine.*

Greco, E., et al. (2015). Segmental aneuploidies in human blastocysts. *Human Reproduction, 30*(4), 973–981.

Greco, E., Minasi, M. G., & Fiorentino, F. (2015). Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *New England Journal of Medicine, 373*(21), 2089–2090.

Handyside, A. H., Harton, G. L., Mariani, B., Thornhill, A. R., Affara, N., Shaw, M. A., & Griffin, D. K. (2010). Karyomapping: A universal method for genome-wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of Medical Genetics, 47*(10), 651–658.

Hardy, K., & Spanos, S. (2002). Growth factor expression and function in the human preimplantation embryo. *Journal of Endocrinology, 172*(2), 221–236.

Harper, J. C., Coonen, E., De Rycke, M., Harton, G., Moutou, C., Pehlivan, T., et al. (2010). What next for preimplantation genetic screening? *Human Reproduction, 25*(4), 821–823.

Harper, J. C., Coonen, E., De Rycke, M., Harton, G., Moutou, C., Pehlivan Budak, T., … Traeger-Synodinos, J. (2018). What next for preimplantation genetic screening? A position statement from the ESHRE PGT Consortium. *Human Reproduction, 33*(4), 1–9. h

Hassold, T., & Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics, 2*(4), 280–291.

Hook, E. B., & Warburton, D. (1983). Turner syndrome revisited: Review of cytogenetic studies. *American Journal of Human Genetics, 35*(4), 809–820.

Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: Role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology, 14*(6), 816–821.

Irani, M., O'Neill, C., Palermo, G. D., Xu, K., Zhang, C., & Rosenwaks, Z. (2017). Blastocyst morphology is associated with euploidy rate in women undergoing preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Fertility and Sterility, 108*(3), 491–497.e1.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., & Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108*, 4892–4896.

Jin, S. K., & Yang, W. X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: How are they regulated? *Oncotarget, 8*(2), 3600–3627.

Kamel, R. M. (2013). Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *Journal of Reproduction & Infertility, 14*(3), 96–109.

Kirkpatrick, M. (2010). How and why chromosome inversions evolve. *PLoS Biology, 8*(9), e1000501.

Kosztolányi, G. (2009). Ring chromosomes: Clinical and cytogenetic aspects. *Orphanet Journal of Rare Diseases, 4*, 4.

Krauchunas, A. R., & Wolfner, M. F. (2013). Molecular changes during egg activation. *Current Topics in Developmental Biology, 102*, 267–292.

Lai, Q., Zhang, H., Zhu, G., Li, Y., Jin, L., He, L., et al. (2013). Comparison of the GnRH agonist and antagonist protocol on the same patients in assisted reproduction during controlled ovarian stimulation cycles. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 6*(9), 1903–1910.

Liehr, T. (2012). *Small supernumerary marker chromosomes (sSMC): A guide for human geneticists and clinicians*. Springer.

Liehr, T., & Weise, A. (2007). Frequency and clinical impact of small supernumerary marker chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research, 119*(1–2), 52–57.

Lonergan, P., & Fair, T. (2014). The role of maternal environment in oocyte and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development, 26*(1), 3–13.

Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols, 12*(2), 213–218.

McCoy, R. C. (2017). Mosaicism in preimplantation human embryos: When chromosomal abnormalities are the norm. *Trends in Genetics, 33*(7), 448–463.

McKinlay Gardner, R. J., & Amor, D. J. (2018). *Chromosome abnormalities and genetic counseling* (4th ed.). Oxford University Press.

McKnight, K., & McKenzie, L. J. (2000). Evaluation of infertility, ovulation induction and assisted reproduction. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, & J. M. Hershman (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc.

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews Genetics, 11*(1), 31–46.

Mortimer, D., & Mortimer, S. T. (2015). *Quality and risk management in the IVF laboratory*. Cambridge University Press.

Muasher, S. J., Abdallah, R. T., & Hubayter, Z. R. (2006). Optimal stimulation protocols for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility, 86*, 267–273.

Munné, S. (2006). Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reproductive BioMedicine Online, 12*(2), 234–253.

Munné, S. (2018). Preimplantation genetic testing for aneuploidy: Challenges in clinical practice. *Fertility and Sterility, 109*(4), 587–589.

Munné, S. (2018). Status of preimplantation genetic testing and embryo selection. *Reproductive BioMedicine Online, 37*(4), 393–396.

Munné, S., Magli, C., Cohen, J., Morton, P., Sadowy, S., Gianaroli, L., et al. (1998). Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human Reproduction, 13*(6), 1599–1603.

Munné, S., Wells, D., & Fragouli, E. (2010). The origin and significance of aneuploidy in human embryos. *Reproductive BioMedicine Online, 20*(4), 445–454.

Nagaoka, S. I., Hassold, T. J., & Hunt, P. A. (2012). Human aneuploidy: Mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics, 13*(7), 493–504.

Okabe, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development, 140*, 4471–4479.

Pellestor, F., Anahory, T., Lefort, G., Puechberty, J., Liehr, T., Hédon, B., et al. (2014). Complex chromosomal abnormalities: Origin and meiotic behavior. *Human Reproduction Update, 20*(4), 476–494.

Pellestor, F., et al. (2014). Meiotic segregation of reciprocal translocations: Implications for preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction Update, 20*(6), 832–844.

Perk, H., Soyupek, S., & Oskay, T. (2005). Erkek infertilitesine neden olan fiziksel ajanlar, ilaçlar ve toksinler. *Androloji Bülteni, 23*, 305–310.

Petraglia, F., Serour, G. I., & Chapron, C. (2013). The changing prevalence of infertility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics, 123*(1), 4–8.

Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS). (2019). PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos. *Reproductive BioMedicine Online, 39*(2), e1–e5.

Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS). (2021). Position statement on the transfer of mosaic embryos. *Reproductive BioMedicine Online.*

Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., … Leamon, J. H. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature, 475*(7356), 348–352.

Scott, R. T., Jr., Upham, K. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Scott, K. L., Taylor, D., et al. (2013). Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates. *Fertility and Sterility, 100*(3), 697–703.

Scott, R. T., Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T., Treff, N. R. (2012). Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos. *Fertility and Sterility, 97*(4), 870–875.

Seol, D. W., Joo, S. H., Kim, Y. H., Song, B. S., Sim, B. W., Kim, S. U., Park, S., Wee, G., & Kim, E. (2022). Sperm hyaluronidase is critical to mammals' fertilization for its ability to disperse cumulus–oocyte complex layer. *Asian Journal of Andrology, 24*(4), 411–415.

Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology, 26*(10), 1135–1145.

Sousa Martins, J. P., Liu, X., Oke, A., Arora, R., Franciosi, F., Viville, S., Laird, D. J., Fung, J. C., & Conti, M. (2016). DAZL and CPEB1 regulate mRNA translation synergistically during oocyte maturation. *Journal of Cell Science, 129*, 1271–1282.

Speroff, L., & Fritz, M. A. (2013). Erkek infertilitesi. In S. Günalp (Çev. Ed.), *Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite* (8. baskı, ss. 1249–1292). Güneş Tıp Kitap Evleri.

Spinella, F., Fiorentino, F., Biricik, A., Bono, S., Ruberti, A., Cotroneo, E., … Greco, E. (2018). Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. *Fertility and Sterility, 109*(1), 77–83.

Starc, A., Trampuš, M., Pavan Jukić, D., Rotim, C., Jukić, T., & Mivšek, A. P. (2019). Infertility and sexual dysfunctions: A systematic literature review. *Acta Clinica Croatica, 58*(3), 508–515.

Stephenson, M. D., et al. (2002). Cytogenetic causes of recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction, 17*(9), 2266–2273.

Swain, J. E. (2012). Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: Impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online, 25*(1), 6–16.

Şimşek, S. (2017). Sociocultural effects of infertility. *Eurasian Academy of Sciences Social Sciences Journal*, (12), 55–56.

Takei, G. L. (2024). Molecular mechanisms of mammalian sperm capacitation, and its regulation by sodium-dependent secondary active transporters. *Reproductive Medicine and Biology, 23*(1), e12614.

Taylor, T. H., Gitlin, S. A., Patrick, J. L., Crain, J. L., Wilson, J. M., & Griffin, D. K. (2014). The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Human Reproduction Update, 20*(4), 571–581.

Thompson, J. G., Lane, M., & Gilchrist, R. B. (2007). Metabolism of the bovine cumulus–oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development, 19*(1), 91–95.

Treff, N. R., & Scott, R. T. (2015). Four-hour quantitative real-time polymerase chain reaction–based comprehensive chromosome screening. *Fertility and Sterility, 104*(3), 684–690. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.007

van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics, 30*(9), 418–426. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001

Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., et al. (2009). Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nature Medicine, 15*(5), 577–583.

Viotti, M. (2020). Preimplantation genetic testing for chromosomal abnormalities: Aneuploidy, mosaicism, and structural rearrangements. *Genes, 11*(6), 602.

Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry, 55*(4), 641–658.

Wang, J., & Sauer, M. V. (2006). In vitro fertilization (IVF): A review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and Clinical Risk Management, 2*(4), 355–364.

Wells, D., Kaur, K., Grifo, J., Glassner, M., Taylor, J. C., & Fragouli, E. (2014). Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *Journal of Medical Genetics, 51*(8), 553–562.

Yumru, A. E., & Öndeş, B. (2011). İnfertil çifte yaklaşım ve in vitro fertilizasyona doğru hasta seçimi. *Journal of Academic Research in Medicine, 1*(2), 57–60.

Zheng, H., Jin, H., Liu, L., Liu, J., Wang, W., & Wang, Y. (2015). Application of next-generation sequencing in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 32*(1), 27–34.