

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EMBRYO ATIK KÜLTÜR SIVISININ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE
ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe Pınar ÖZTÜRK

Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı

Fizik Mühendisliği Programı

MAYIS 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EMBRYO ATIK KÜLTÜR SIVISININ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE
ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe Pınar ÖZTÜRK

(509111123)

Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı

Fizik Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Günay BAŞAR

MAYIS 2015

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü' nün 509111123 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi **TUĞÇE PINAR ÖZTÜRK** ilgili yönetmeliklerin belirlediği tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**EMBRYO ATIK KÜLTÜR SIVISININ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE ANALİZİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Günay BAŞAR**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Fatma Gülay ACAR**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. İpek Kanat Öztürk

İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi: 28 Nisan 2015
Sunum Tarihi: 26 Mayıs 2015

Canım annem, anneannem ve dedem için,

ÖNSÖZ

Danışman hocam Prof. Dr. Günay Başar'a, laboratuvar arkadaşlarım Uğur Parlatan ve Nima Bavili'ye, anneannem, dedem ve annem Hatem Öztürk' e destekleri için teşekkür ederim.

Mayıs 2015

Tuğçe Pınar Öztürk
(Fizik Mühendisliği)

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖNSÖZ | vii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| KISALTMALAR | xi |
| ÇİZELGE LİSTESİ | xiii |
| ŞEKİL LİSTESİ | xv |
| SEMBOL LİSTESİ | xix |
| ÖZET | xxi |
| ABSTRACT | xxiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Raman Spektroskopisi | 3 |
| 1.1.1. Raman spektroskopisinin teorisi | 3 |
| 1.1.2. Lazerin çalışma prensibi ve lazerin ışını odaklaması..... | 8 |
| 1.2. İn Vitro Fertilizasyonunun Tarihsel Gelişimi ve Yöntemi | 10 |
| 1.3. Protein Metabolizması | 13 |
| 1.3.1. Amino asitlerin yapısal özellikleri | 14 |
| 1.3.2. Bovin serum albümin (BSA) | 15 |
| 1.3.3. Embriyo sıvısı bileşenleri | 16 |
| 1.3.3.1. Tirozin | 22 |
| 1.3.3.2. Glisin ve glutamin | 22 |
| 1.3.3.3. Valin | 24 |
| 1.3.3.4. Fenilalanin | 24 |
| 1.3.3.5. Glikoz | 25 |
| 1.3.3.6. Beta karoten | 26 |
| 1.3.3.7. Lösin | 27 |
| 1.3.3.8. Histidin | 28 |
| 2. DENEY | 29 |
| 2.1. Deneysel Düzenek | 29 |
| 2.2. Deneyin Yapılışı | 31 |
| 2.3. Önlemler | 34 |
| 2.3.1. Kozmik ışın temizleme | 35 |
| 2.3.2. Kalibrasyon | 36 |
| 2.3.3. Arka plan düzeltme | 39 |
| 2.3.4. Taban çizgisi düzeltme | 40 |
| 2.3.5. Normalizasyon | 43 |
| 3. ÖLÇÜMLER VE ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN İNCELENMESİ | 45 |
| 3.1. Embriyo Atık Kültür Sıvısı Ölçümleri ve Embriyo Atık Kültür Sıvısı Ölçümlerinin Raman Bant Konumları | 45 |
| 3.2. Histidin ve Bovin Serum Albümin Sıvı Çözeltileri Karışımlarının Farklı Konsantrasyonlarının Ölçümleri | 46 |
| 3.3. Arka Plan Ölçümleri | 48 |
| 3.4. Efektif Raman Uzunluğunun Belirlenmesi | 49 |
| 3.5. Raman Işın Çapının Hesaplanması | 50 |
| 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Temel Bileşenler Analizi: PCA (Principle Component Analysis) | 55 |
| 4.2. Doğrusal Ayırt Etme Analizi: LDA (Linear Discriminant Analysis)..... | 59 |
| 4.3. Embriyo Atık Kültür Sıvısı Ölçümlerinin Temel Bileşenler Analizi: PCA (Principle Component Analysis) ve Doğrusal Ayırt Etme Ölçütleri: LDA (Linear Discriminant Analysis) ile Analizi | 61 |
| 4.4. Histidin ve Bovin Serum Albümin Sıvı Çözeltileri Karışımlarının Farklı Konsantrasyonları Ölçümlerinin Temel Bileşenler Analizi: PCA (Principle Component Analysis) ve Doğrusal Ayırt Etme Ölçütleri: LDA (Linear Discriminant Analysis) ile Analizi | 64 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 73 |
| KAYNAKLAR | 75 |
| ÖZGEÇMİŞ | 77 |

KISALTMALAR

| | |
|------------|--|
| IR | : Kızılötesi (İnfrared) |
| REF | : Raman Kenar Filtresi (Raman Edge Filter) |
| CCD | : Charge Coupled Device |
| PCA | : Temel Bileşenler Analizi (Principle Component Analysis) |
| LDA | : Doğrusal Ayırt Etme Analizi (Linear Discriminant Analysis) |

ÇİZELGE LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 1.1 : Embriyo sıvısı amino asit ve lipit değerleri değişimleri ile ilgili yapılmış çalışmalar. | 18 |
| Çizelge 1.2 : İnsan metabolomundan alınmış metabolit örnekleri ve özellikleri..... | 19 |
| Çizelge 1.3 : Raman bant tahsisi. | 21 |
| Çizelge 1.4 : Glisin element özellikleri. | 22 |
| Çizelge 1.5 : Glutamin element özellikleri. | 23 |
| Çizelge 1.6 : Valinin element özellikleri. | 24 |
| Çizelge 1.7 : Fenilalaninin element özellikleri. | 25 |
| Çizelge 1.8 : Glikozun element özellikleri. | 26 |
| Çizelge 1.9 : Beta karotenin element özellikleri. | 27 |
| Çizelge 1.10 : Lösinin element özellikleri. | 27 |
| Çizelge 1.11 : Histidin element özellikleri. | 28 |
| Çizelge 2.1 : Histidin ve bovin serum albüminin 3 farklı konsantrasyondaki çözeltilerinin karışım miktarları. | 34 |
| Çizelge 2.2 : Toluenin referans bant değerleri ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$). | 37 |
| Çizelge 2.3 : Histidin ile bovin serum albümin ve histidin-bovin serum albümin çözeltilerinin 3 farklı karışımının taban çizgisi noktaları. | 42 |
| Çizelge 4.1 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden G1 ile G2' nin toplam ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı. | 63 |
| Çizelge 4.2 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden G1 ile G2' nin doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları..... | 63 |
| Çizelge 4.3 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı. | 67 |
| Çizelge 4.4 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları. | 68 |
| Çizelge 4.5 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %10 konsantrasyonunun ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı. | 69 |
| Çizelge 4.6 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %10 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları. | 69 |
| Çizelge 4.7 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı. | 71 |
| Çizelge 4.8 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları. | 71 |
| Çizelge 5.1 : LDA sonuçlarına göre embriyo atık kültür sıvısının hassasiyet ve ayırt edilebilirlik oranları. | 76 |
| Çizelge 5.2 : LDA sonuçlarına göre histidin ve bovin serum albümin karışımı konsantrasyonlarının hassasiyet ve ayırt edilebilirlik oranları..... | 76 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 1.1 : Bir elektromanyetik dalgayla etkileşen dipolün davranışlarının şematik grafiği. | 3 |
| Şekil 1.2 : Jablonski diyagramı. | 8 |
| Şekil 1.3 : Gauss ışın demetinin şemasal gösterimi. | 9 |
| Şekil 1.4 : Embriyo transferinin şematik gösterimi. | 11 |
| Şekil 1.5 : Bovin serum albümininin kimyasal yapısı. | 16 |
| Şekil 1.6 : 600-1040 cm^{-1} arası Raman spektrumları için bant atamaları. | 20 |
| Şekil 1.7 : 1040-1380 cm^{-1} arası Raman spektrumları için bant atamaları. | 20 |
| Şekil 1.8 : 1380-1800 cm^{-1} arası Raman spektrumları için bant atamaları. | 21 |
| Şekil 1.9 : Tirozinin kimyasal yapısı. | 22 |
| Şekil 1.10 : Glisinin kimyasal yapısı. | 23 |
| Şekil 1.11 : Glutaminin kimyasal yapısı. | 23 |
| Şekil 1.12 : Valinin kimyasal yapısı. | 24 |
| Şekil 1.13 : Fenilalaninin kimyasal yapısı. | 25 |
| Şekil 1.14 : Glikozun kimyasal yapısı. | 26 |
| Şekil 1.15 : Beta karotenin kimyasal yapısı. | 27 |
| Şekil 1.16 : Lösinin kimyasal yapısı. | 28 |
| Şekil 1.17 : Histidinin kimyasal yapısı. | 28 |
| Şekil 2.1 : Raman deney düzeneğinde ışığın ölçüm sırasında izlediği yol. | 30 |
| Şekil 2.2 : Raman deney düzeneğinde ışığın ölçüm sırasında izlediği yolun şematik grafiği. | 32 |
| Şekil 2.3 : Ölçüm hücresi olarak kullanılan diskin şematik gösterimi. | 33 |
| Şekil 2.4 : Disk konstrüksiyonu. | 34 |
| Şekil 2.5 : Kozmik ışın içeren ve içermeyen art arda alınmış iki su spektrumu. | 35 |
| Şekil 2.6 : Kozmik ışın temizlenmiş ve temizlenmemiş su spektrumunun yakından gösterimi. | 36 |
| Şekil 2.7 : Toluenin kalibrasyon işlemi uygulanmadan önceki Raman spektrumları. | 38 |
| Şekil 2.8 : Toluenin kalibrasyon işlemi uygulandıktan sonraki Raman spektrumları. | 38 |
| Şekil 2.9 : Kalibre edilmiş bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışım spektrumu ve arka plan düzenlemesi. | 39 |
| Şekil 2.10 : Arka plan düzenlemesi yapılmış bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımın Raman spektrumu. | 40 |
| Şekil 2.11 : Arka plan düzenlemesi yapılmış bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımlarının farklı ölçümlerinin Raman spektrumları. | 41 |
| Şekil 2.12 : Bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımlardan birine ait taban çizgisi noktaları. | 41 |
| Şekil 2.13 : Taban çizgisi düzeltilmiş bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımın Raman spektrumu. | 42 |
| Şekil 2.14 : Normalize edilmiş ortalama bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımın Raman spektrumu. | 43 |

| | |
|--|----|
| Şekil 2.15 : Normalize edilmiş ortalama embriyo atık sıvısı Grade1 örneklerinin Raman spektrumu..... | 44 |
| Şekil 3.1 : Embriyo atık kültür sıvısının taban çizgisi düzeltilmiş spektrumlarının bant ataması. | 45 |
| Şekil 3.2 : Embriyo atık kültür sıvısının taban çizgisi düzeltilmiş spektrumları. | 46 |
| Şekil 3.3 : Bovin serum albümin-histidin karışımları %50 konsantrasyonlu çözeltilerinin taban çizgisi düzeltilmiş ortalama spektrumu içerisindeki histidin Raman bantları. | 47 |
| Şekil 3.4 : Bovin serum albümin-histidin karışımlarının %50, %10 ve %2 konsantrasyonlu çözeltilerinde histidin konsantrasyonunda gözlenen değişim. | 47 |
| Şekil 3.5 : Boş disk ölçümleri ve boş diskler arası farklar(60 boş disk için). | 48 |
| Şekil 3.6 : Arka plan ölçümü olarak alınan su spektrumunda gözlenen su ve kuvars cam bantları. | 48 |
| Şekil 3.7 : Efektif Raman uzunluğunun belirlenmesi deneyi. | 49 |
| Şekil 3.8 : Ölçüm küveti konstrüksiyonu. | 50 |
| Şekil 3.9 : Raman ışın çapının hesaplanması deneyi. | 51 |
| Şekil 3.10 : Efektif Raman uzunluğunun hesaplanması ve Raman ışın çapının hesaplanması deneylerinin şemasal gösterimleri. | 52 |
| Şekil 3.11 : Toluen ölçülerek Raman ışın çapının hesaplanması deneyi. | 53 |
| Şekil 4.1 : Temel bileşenler analizinin: PCA (Principle Component Analysis) işlem adımlarının şematik gösterimi. | 58 |
| Şekil 4.2 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden gelişmesini devam ettirme ihtimali yüksek olan sınıf G1 ile düşük oranda kaliteli embriyo yetiştirme ihtimali olan sınıf G2'nin temel bileşenler analizi (PCA). | 62 |
| Şekil 4.3 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden gelişmesini devam ettirme ihtimali yüksek olan sınıf G1 ile düşük oranda kaliteli embriyo yetiştirme ihtimali olan sınıf G2' nin doğrusal ayırt etme analizi (LDA). | 62 |
| Şekil 4.4 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden G1 ile G2'nin doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı. | 63 |
| Şekil 4.5 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının 3 farklı konsantrasyonunun temel bileşenler analizi (PCA). | 64 |
| Şekil 4.6 : Taban çizgisi düzeltilmiş bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin çözeltilerinin %50 konsantrasyonlu karışımının Raman spektrumunun temel bileşenler analizi (PCA). | 65 |
| Şekil 4.7 : Taban çizgisi düzeltilmiş bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin çözeltilerinin %10 konsantrasyonlu karışımının Raman spektrumunun temel bileşenler analizi (PCA). | 65 |
| Şekil 4.8 : Taban çizgisi düzeltilmiş bovin serum albümin ile histidin bovin serum albümin çözeltilerinin %2 konsantrasyonlu karışımının Raman spektrumunun temel bileşenler analizi (PCA). | 66 |
| Şekil 4.9 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA). | 66 |
| Şekil 4.10 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı. | 67 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.11 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %10 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA). | 68 |
| Şekil 4.12 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %10 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı. | 69 |
| Şekil 4.13 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA)..... | 70 |
| Şekil 4.14 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı. | 70 |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|-------------------------|---|
| ν | : Frekans |
| ν_0 | : Gelen Işığın Frekansı |
| ν_m | : Molekülün Titreşim Frekansı |
| $\bar{\nu}$ | : Dalga sayısı |
| ν^0 | : Kuantum Titreşim Frekansı |
| ν' | : Sanal Geçiş Sonrası Kuantum Titreşim Frekansı |
| ν'' | : Bir Diğer Sanal Geçiş Sonrası Kuantum Titreşim Frekansı |
| \hbar | : İndirgenmiş Planck Sabiti |
| h | : Planck Sabiti |
| ω | : Açısal Frekans |
| w | : Faz Terimi |
| n | : Foton Sayısı |
| f | : Odak Uzaklığı |
| N_1 | : Temel Durumdaki Atom Sayısı |
| N_2 | : Uyarılmış Durumdaki Atom Sayısı |
| $\frac{dn}{dt}$ | : Foton Üretme Debisi |
| W | : Geçiş Olasılığı Terimi |
| W' | : Kendiliğinden Geçiş Olasılığı Terimi |
| t_0 | : Lazer İçinde Bulunan Fotonun Yaşam Süresi |
| E_0 | : Başlangıçtaki Elektrik Alanı |
| E | : Elektrik Alan |
| α | : Kutuplanabilirlik Katsayısı |
| α_0 | : Molekülün Kutuplanabilirliği |
| W | : Geçiş Olasılığı Terimi |
| W | : Geçiş Olasılığı Terimi |
| p | : Dipol Moment |
| q | : Nükleer Yer Değiştirme Terimi |
| q_0 | : Titreşim Genliği |
| I | : Şiddet |
| $I_{\text{antistokes}}$ | : Anti Stokes Çizgilerinin Şiddeti |
| I_{stokes} | : Stokes Çizgilerinin Şiddeti |
| I_i | : Gelen Işığın Şiddeti |
| P | : Elektrik Dipol Momentumu |
| c | : Işık Hızı |
| λ | : Dalga Boyu |
| ΔE | : Molekülün İki Enerji Seviyesi Arasındaki Fark |
| E_2 | : Üst enerji seviyesi |
| E_1 | : Alt enerji seviyesi |
| nm | : Nanometre |
| mm | : Milimetre |
| cm | : Santimetre |
| μ | : Mikrometre |

N : Newton
 Σ : Kovaryans Matrisi
 Σ' : Kovaryans Matrisinin Tersi
 δ : Standart Sapma

EMBRİYO ATIK FOLİKÜLER SIVISININ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE ÖLÇÜMÜ VE ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Raman spektroskopisi, moleküllerin titreşim spektrumlarını inceleyerek ışığın elastik olmayan saçılma yapmasına dayanan spektroskopik bir yöntemdir. Işık saçılırken büyük bir kısmının enerjisi maddeyle etkileşen ışığın enerjisiyle aynı olmaktadır. Bu saçılma elastik bir saçılmadır ve Rayleigh saçılması olarak bilinmektedir. Işığın çok küçük bir kısmının ise saçılırken edindiği enerji maddeyle etkileşirken sahip olduğu enerjiden farklıdır. Bu durumda ışık elastik olmayan bir saçılma yapmaktadır. Bu saçılmaya Raman Saçılması denir. Gelen ışık ve saçılan ışık arasındaki enerji farkı, molekülün titreşim enerji seviyeleri arasındaki enerji farkına bağlıdır. Bu yüzden Raman saçılma bantları moleküllerin karakteristiğini açıklar ve parmak izi niteliğindedir. Raman spektroskopisi biyolojik sistemler için yapılan ölçümlerde iyi sonuçlar vermektedir.

Bu tez çalışması kapsamında biyolojik moleküler yapıda olan embriyo atık kültür sıvısının içerdiği proteinler, lipitler ve amino asitler hakkında bilgi edinebilmek için Raman spektroskopisi ile ölçümler alınmıştır. Embriyo atık kültür sıvısı örneklerinin Raman spektrumları ölçülerek, Raman bantları literatürdeki bantlarla karşılaştırılarak amino asit bantları ve lipit bantlarının hangileri olduğuna dair tahmini bir belirleme yapılmıştır. Tez çalışmasının bir basamağını oluşturan bilimsel araştırma projesinin genel amacı embriyoyu çevreleyen atık kültür ortamının Raman spektroskopisi ile değerlendirilmesi ve embriyo etrafındaki kültür ortamının spektroskopik yöntemle incelenmesi ile embriyo seçimi yapılmasıdır. Embriyo atık kültür sıvısı örnekleri İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Tüp Bebek Kliniği'nden alınmış ve sıvı azot içerisinde İstanbul Teknik Üniversitesi Lazer Spektroskopi Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Tüp Bebek Kliniği'nde iki farklı gruba ayrılarak gelişmesini devam ettirme ihtimali yüksek olan örnekler Grade1 (G1), daha az ihtimali olan örnekler de Grade2 (G2) olacak şekilde mikroskopik yöntemlerle sınıflandırılmışlardır. Embriyo atık kültür sıvısı örneklerinin Raman spektrumları 786 nm dalga boyuna sahip bir diyod lazer kullanılarak ölçülmüş ve önışlemler uygulandıktan sonra istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Aynı ölçüm hücresi ile her bir hastaya ait örnek ölçümleri ve arka plan (su) ölçümleri alınmıştır. Her hasta için farklı ölçüm hücresi ile ölçüm alınmıştır. Farklı ölçüm hücreleri ile ölçüm yapmanın etkisini test etmek için embriyo atık kültür sıvısı örneklerini ölçtüğümüz disklerin her birinin boşken spektrumları alınarak farklılıklar incelenmiştir.

Embriyo atık kültür medyası bileşenlerinin hangi konsantrasyona kadar istatistiksel analizlerde ayrışabilir olduğunu anlamak için model bir çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiyi oluştururken amino asitlerden histidin ile birkaç amino asit karışımından oluşan ve biyolojik sistemlerle yapılan ölçümlerde protein konsantrasyonu standardizasyonu için kullanılan bovin serum albümin kullanılmıştır. Histidin doymuş sıvı çözeltisinin farklı konsantrasyonları ile bovin serum albümin doymuş sıvı çözeltisinin karıştırılmasıyla 3 farklı karışım elde edilmiştir. Bovin serum albümin ve histidin sıvı çözeltilerinin %50, %10 ve %2 konsantrasyondaki karışımları ölçüm hücresi ile ölçülmüştür. Ölçümlere embriyo atık kültür sıvısı örneklerine yapılan

önişlemler uygulanmıştır. Konsantrasyondaki farklılıkların istatistiksel analizler uygulandıktan sonraki gözle görünür ayrıştırılabilirliği bize embriyo atık kültür sıvısı bileşenlerinden olan amino asit ve lipitlerin çok düşük oranlarda var olduklarında da tespit edilebildikleri fakat daha düşük konsantrasyona sahip olduklarında ayırışamadıkları konusunda yol gösterici olmuştur.

Embriyo atık kültür sıvısının önişlemler uygulanmış Raman ölçümlerine temel bileşenler analizi (PCA) uygulanmıştır. Temel bileşenler analizi (PCA) skorlarına göre elde edilen grafiğin x ve y eksenleri olan PC1 ve PC2 dataları kullanılarak elde edilen doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonuçlarına göre hassasiyet ve ayırt edilebilirlik oranları elde edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre hassasiyet oranı %75, ayırt edilebilirlik oranı ise %73 olmaktadır.

Histidin ve bovin serum albümin çözeltilerine de temel bileşenler analizi (PCA) ve doğrusal ayırt etme analizi (LDA) uygulanmıştır. Doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonuçlarına göre hassasiyet oranları; %50, %10 ve %2 konsantrasyondaki ölçümler için %100 oranındadır. Ayırt edilebilirlik oranları da %50, %10 ve %2 konsantrasyondaki ölçümler için %100 olmaktadır. Konsantrasyon oranlarını bildiğimiz ve embriyo atık kültür sıvısıyla aynı yöntemle ölçüp analiz ettiğimiz çözeltiler başarılı şekilde ayırışmışlardır. Buna göre ölçtüğümüz sıvı içerisinde herhangi bir bileşen %2 oranına kadar bulunduğunda Raman bantları gözlenebilmekte ve ayırt edilebilmektedir.

WASTE LIQUID EMBRYO SAMPLES' MEASUREMENTS AND ANALYSIS OF MEASUREMENT TECHNIQUES WITH RAMAN SPECTROSCOPY

ABSTRACT

Raman spectroscopy is a spectroscopic method which is based on measuring the scattered light from the molecules of samples. It focuses on the vibrational transitions of the molecules in the sample. Raman spectroscopy is based on the measurement of light scattered from molecules that were exposed by an intense monochromatic light source. A superior property of Raman spectroscopy is, because it does not obstruct the spectra with glass and quartz, water can be used as solvent. Thus, both qualitative and quantitative examinations of organic and inorganic samples can be measured. Raman spectroscopy provides an intense beam of monochromatic light source to measure the carrying out of the scattered molecules.

By studying the vibration spectrum of the molecule is based on a spectroscopic method not inelastic scattering of light. This is a scattering of elastic scattering and is known as Rayleigh scattering. A very small portion of the light makes inelastic scattering. This scattering is called Raman scattering. The energy difference between the incident beam and the scattered beam depends on the energy difference between the vibrational energy levels of molecules. This explains why the band Raman scattering characteristics of the molecule and are part of the fingerprint.

Raman spectroscopy gives very good results in biological systems. Infrared spectroscopy and Raman spectroscopy is one of the vibrational spectroscopic techniques. Were studied to identify differences in profiles with different reproductive potential of embryos. This technique has been implanted with embryos differences in profiles. Datum were used to measure the reproductive potential of embryos after the other.

Evaluation by the Raman spectroscopy of this study surrounds overall objective of embryo for scientific research project, which is a stage of the measurements we did in the culture medium for embryo waste culture medium and maturation for each embryo is the comparison of pregnancy and live birth rates. Embryo culture medium surrounding the embryo is to make the selection by examination with spectroscopic methods.

In this study, we measured Raman spectra of embryo culture liquids and compared Raman spectra of embryo liquids in different grades after spectral analysis. In the spectrum of scattered light, there has been a frequency shift observed with respect to the incoming light.

This situation has been correlated with the chemical structure of the molecules and accordingly vibrational and rotational frequencies. Embryo culture liquid samples are prepared for the Raman measurements in IVF clinics of Istanbul University Faculty of Medicine. In Laser Spectroscopy Laboratory of Istanbul Technical University embryo culture liquid waste samples' Raman spectras were measured by using discs. In IVF clinics, embryo culture liquid samples are classified as Grade1 (G1) and Grade2 (G2). G1 has a high potential to give birth more successfully than G2. Components in the samples are compared with the value measured on the Raman spectrum and statistical procedures as principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) have been performed. The same measuring cell is used

for the sample and back ground (water) measurements of each patient measurements.

Measurements were taken for each patient with different measuring cell. Taking into account the differences in the spectrum of the disc to test the effect of making measurements with different measuring cells, empty discs were examined. Consisting of a mixture of several amino acid to form a model waste embryo culture media and biological systems with standardized protein concentrations used for the measurements made on the bovine serum albumine was used. Embryo waste follicle test the reliability of the results we obtained from the analysis of the liquid and mix with the lowest measurements in order to determine which models could be observed until the konsantasyo Raman band is made in reducing the amount of amino acids that we prepared.

The amino acid sequence of bovine serum albumine and histidine aqueous solutions at %50, %10, %2 concentrations were measured as a model for the susceptibility of the statistical analysis of embryo culture liquid waste samples by using discs. Individual components in the examples are compared with the value measured on the Raman spectrum and statistical procedures have been performed.

A data graph is reduced by principal component analysis (PCA) is carried out to the smaller size of data a simple classification. Actions that have made a mathematical analysis of the components is to associate with each other variables with this method to determine priorities and a matrix to calculate the covariance matrix. Then finds the eigenvalues and eigenvectors of the covariance matrix and is the average of the covariance matrix. The average of the covariance matrix with the eigenvectors of the covariance matrix is able to analyze multiplying.

Linear discrimination analysis (LDA) is an analysis method that uses statistical data of objects or events to find the linear combination of two or more classes. The resulting combinations are used as a linear classifier to make size reduction in advance to distinguish objects. Linear discriminant analysis, measurement of linear analysis is a variable that refers to a method of expression, while analysis of variance dependent. However categorical independent variables and the dependent variables are continuous use. The difference between the data classes has been working explicitly modeling the post.

After statistical analysis PCA and LDA, we compared the sensitivity and susceptibility ratios for embryo culture liquid samples. Analysis showed that sensitivity ratio is %75 and susceptibility ratio is %73. This difference is not essential for class G1 and G2.

As a model of embryo culture liquid waste samples, bovine serum albumine and histidine aqueous solutions at %50, %10 and %2 concentrations, we also had statistical analysis as PCA and LDA. As a conclusion sensitivity ratios for %50 concentration is %100, also for %10 and %2 concentrations is %100. Susceptibility ratios is also %100 for all concentrations.

When histidine component %2 increase, it can be distinguished according to the statistical analysis of the Raman spectroscopic measurements. Observed after administration of 2% variation in concentration appears, while the separation of the embryos waste follicular fluid analysis measurement. They gave full decomposition concentration measurements up to 2%. PCA and LDA analyse methods could discriminate component comprises a compound of up to 2% concentration for our measurements. It shows that very low concentrations of changes in the components of the waste follicular fluid appears. For Grade1 and Grade2 classes of embryo waste samples, we had difficulties to discriminate with statistical analysis, because they are

so similar to each other. The difference was not essential. As a result of our study, the microscobic classification in IVF clinic is not satisfaction, so that it would be investigated with Raman spectroscopy before transferring the samples.

1. GİRİŞ

Spektroskopi elektromanyetik ışınımı ve ışınının atom, molekül ya da iyon ile etkileşimini incelemektedir. Elektromanyetik ışınım, yayılma yönüne ve birbirine dik elektrik alan ve manyetik alanların titreşmesiyle oluşmaktadır. Maddenin bir elektromanyetik ışınla etkileşmesi ile elektrik alan bileşenleri maddenin elektriksel özelliklerine, manyetik alan bileşenleri ise manyetik özelliklerine etki etmektedir. Madde ile ışının etkileşmesi molekülün iç enerjisinde değişimler oluşturmaktadır. Işın ile etkileşen moleküller kararsız bir duruma geçerler ve kararsız durumlarından üzerlerindeki fazla enerjiyi atarak kurtulmaya çalışırlar. Üzerlerindeki enerjiden kurtulmaya çalışırken moleküllerinin simetrisi, bağ uzunlukları, bağları arasındaki açılar ve kuvvetler, molekül içi kuvvetler, moleküller arasındaki kuvvetler ve elektronik dağılımları hakkında bilgi edinilebilmektedir. Spektroskopi yöntemleri ile maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini incelemek ve analiz etmek mümkündür. Moleküldeki titreşim enerji seviyeleri ve dönme enerji seviyeleri arası geçişler ile molekülün titreşim frekansı kızıl ötesi bölgede spektrum verebilmektedir. Kızılötesi soğurma spektroskopisi ve Raman spektroskopisi dönme ve titreşimi konu alan spektroskopi teknikleridir.

Maxwell teorisi ivmelenen yüklerin enerji yaydığını, ışığın yayılmasının yüklerin yüksek frekansta titreşmesinin sonucu olduğunu ve soğurma ile saçılmanın elektromanyetik dalganın osilatörleri zorlaması sonucu ortaya çıktığını göstermektedir. Optik spektroskopi; *soğurma*, *yansıma*, *ışınım* ve *saçılma* olmak üzere 4 bölümde incelenebilmektedir. Saçılmalar, Rayleigh Fraunhofer spektroskopisi ve Raman spektroskopisi olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

Moleküller uygun enerjilerdeki fotonlarla etkileşime girdiğinde bu fotonları *soğurabilir* ve uyarılmış enerji seviyesine geçebilirler. Bir maddenin temel haldeyken sahip olduğu enerji ve uyarılmış haldeyken sahip olduğu enerji arasındaki farklılıklar her maddede değişik olduğu için, her birinin kendine ait bir soğurma spektrumu bulunmaktadır. Eğer molekülün taban enerji seviyesi ve uyarılmış enerji seviyesi arasındaki enerji farkı ile gelen fotonun enerjisi eşitse, foton soğurulmakta

ve molekül üst uyarılmış enerji seviyesine geçebilmektedir. *Soğurma*, elektronik düzeyler arası geçişlerinde dönme ve titreşim enerji düzeyleri arasında geçiş olan molekülerin soğurulması ve atomik soğurma olmak üzere iki çeşittir.

Elektromanyetik ışınlarını soğurarak temel enerji seviyesinden uyarılmış enerji seviyesine geçen moleküller tekrar temel enerji seviyesine dönüşleri sırasında ultraviyole veya görünür bölgede *ışınma* enerjilerini saçmaktadır. Bu şekilde her atom için *ışınma* spektrumu belirlenmektedir.

Yansıma ile bir nokta, yansıma düzlemine dik olan ve eşit uzaklıkta bulunan bir başka noktaya hareket ettirilebilmektedir. Yansıma düzlemi, simetri düzlemi ya da ayna düzlemi olarak bilinmektedir. Çok atomlu moleküllerde x eksen ve y eksen ile uyumlu yansıma simetrisi bulunmaktadır. Düzlemsel olmaya yakın moleküllerin tüm atomları x ve y düzlemine yerleştirilebilmektedir. Molekülün de z eksen ile uyumlu bir yansıma simetrisi olabilmektedir.

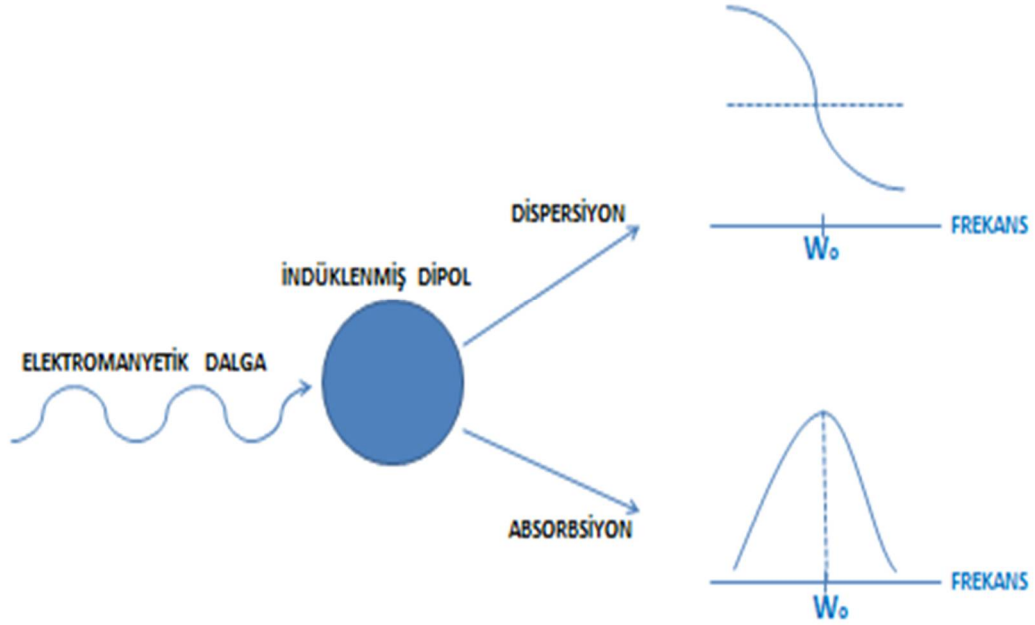
Fotonun molekülle etkileşip, molekül tarafından *saçılması* da mümkündür. Fotonun çarptığı parçacıklardan yön değiştirmesine saçılma denir. Fotonun enerjisiyle molekülün iki enerji seviyesi arasındaki fark saçılma durumunda eşit ya da farklı olabilmektedir. Üzerine ışık gönderilerek uyarılmış moleküller kararsız durumlarından fazla enerjilerini saçarak kurtulabilmektedir.

Görünür bölge ışınması için kolloidal veya bulanık çözeltilerde gözlenen saçılmaya Tyndall saçılma denilmektedir. Çözünmüş moleküller ya da çok atomlu iyonlar için Rayleigh saçılması görülmektedir. Parçacıklarla etkileşmekte olan ve dalga boyunun ışığın saçılmasına neden olan moleküllerin titreşim enerji düzeylerine göre değiştiği durumlarda Rayleigh saçılması ile birlikte Raman saçılması olmaktadır [1].

Işığın saçılma, soğurma ve ışınma hareketleri ile molekülün fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi edinilebilmektedir. ‘Embriyo atık kültür sıvısının Raman spektroskopisi ile analizi’ başlıklı yüksek lisans tezi kapsamında spektroskopi yöntemi kullanarak molekül bileşenleri hakkında bilgi edinilmiştir.

Ölçüm yapılan örneklerin Raman bantlarının literatürde bantları bilinen aminoasit, lipit, karbonhidrat ve diğer farklılaşmış yapılardan hangilerine karşılık geldikleri amino asit lipit ve diğer yapıların literatürdeki Raman kayması değerlerine bakılarak tahmini olarak belirlenmiştir.

Şekil 1.1’ de elektromanyetik dalgayla etkileşime giren bir dipolün davranışları gösterilmektedir. Elektrik dipole ait saçılma ve soğurma hareketini ifade eden grafikler gösterilmiştir.



Şekil 1.1 : Bir elektromanyetik dalgayla etkileşen dipolün davranışlarının şematik grafiği.

1.1 Raman Spektroskopisi

1.1.1 Raman spektroskopisinin teorisi

Adolf Gustav Stephan Smekal 1923 yılında fotonlardaki elastik olmayan saçılmayı öngörmüştür. 1928 yılında, Sir Chandrasekhra Venkata Raman, Rayleigh’ in 1910 yılında ortaya attığı düşüncüyü bir gemi yolculuğunda deneysel olarak gözlemlemiştir. Rayleigh’ in düşüncesine göre, denizin mavi rengi gökyüzünün mavisinin yansması sonucu mavi görünmektedir. Sir C. V. Raman 1931 yılında evinde gaz molekülleri üzerine ışık göndererek yaptığı deneyiyle Nobel Ödülü kazanmıştır. Raman spektroskopisi, molekülün titreşim spektrumunu incelemektedir. Raman spektroskopisi ışık kaynağıyla taşınan ve molekül üzerinden saçılan ışığın yaptığı elastik olmayan saçılmaları inceleyen spektroskopik bir metoddur. Işık kaynağı olarak daha çok lazer kaynağı tercih edildiğinden dolayı bu yöntem ‘Lazer Raman Spektroskopisi’ adını almaktadır. Saçılma esnasında ışığın büyük kısmının sahip olduğu enerji maddeyle etkileşen ışığın enerjisiyle aynı olmaktadır. Bu elastik

saçılmaya Rayleigh saçılması denir. Işığın çok küçük bir kısmıysa elastik olmayan saçılma yapmaktadır. Bu saçılmaya Raman saçılması denir. Saçılan ışıklardan 10^7 tanesinden yalnızca bir tanesi Raman saçılmasına uğramaktadır. Saçılan bu foton elastik olmayan saçılma yapmaktadır. Raman saçılmasına uğrayan ışık, gelen ışıkla aynı frekansa sahip değildir. Saçılan foton gelen ışıktan daha yüksek bir enerjiye de daha düşük bir enerjiye de sahip olabilmektedir. Rayleigh saçılması bir tek pik vermektedir ve titreşim spektroskopisi geçişleri hakkında bilgi verememektedir. Rayleigh saçılmasına uğrayan bir ışık, Raman saçılmasının tersine, gelen ışıkla aynı frekansta saçılır.

Molekülle etkileşime giren ışığın dalga boyu saçılan ışığın dalga boyuna göre farklılık göstermektedir. Işığın dalga boyunda gözlenen bu kaymalara Raman kayması denir. Raman spektroskopisi ile ölçüm yapıldığında, ultraviyole görünür bölgede yoğun lazer ışını ν_0 ve $\nu_0 \pm \nu_m$ frekansları ile saçılmaktadır. Raman saçılmanın frekansı $\nu_0 \pm \nu_m$ kadardır. Burada ν_m molekülün titreşim frekansını göstermektedir. $\nu_0 - \nu_m$ ve $\nu_0 + \nu_m$ frekans çizgilerine Stokes ve anti Stokes çizgileri denir. Raman spektroskopisinde ν_m titreşim frekansı, ν_0 gelen ışının frekansındaki kayma olarak hesaplanmaktadır. Frekans kaymaları, gelen ışığın frekansına bağlı olmaksızın üzerinden saçılan molekülün özelliğiyle ilgilidir [1].

Gelen ışın ve saçılan ışın arası enerji farkları, moleküllerin iki titreşim enerjisi seviyeleri arası enerji farklarıyla ilişkilidir. Bu yüzden Raman saçılma bantları moleküllerin karakteristiğini açıklar ve moleküllerin parmak izleri niteliğindedir.

ΔE , iki kuantize durum arasındaki enerji farkıdır. Enerji taban durumundan üst seviyelere geçerken h terimi Planck sabitini vermek üzere seviyeler arası fark için $\Delta E = h\nu_0$ şartı sağlanırsa, ışık moleküller tarafından soğurulmakta ya da aynı dalga boyuyla saçılmaktadır.

Bunun yanı sıra ışık başka dalga boyunda da saçılarak yani Raman saçılmasına da uğrayarak sistemden çıkabilmektedir. Raman spektroskopisi ışığın $\Delta E = h\nu_0$ şartını sağlamadığı ve pertürbasyona uğradığı durumları incelemektedir. Bu durumda saçılan ışığın frekansı da enerjisi de dalga boyu da gelen ışıktan farklı olur. Raman spektroskopisi ışığın saçıldıktan sonraki frekansının ν_0 değil, $\nu = \nu_0 \pm \nu_m$ olduğu durumları inceler [3]. Raman saçılmaya uğrayan ışık $\Delta E = h\nu$ şartını sağlamaktadır **(1.1)**.

$$E=E_0 \cos(2\pi \nu t)$$

$$\Delta E=h\nu = hc\bar{\nu}$$

$$\Delta E=E_1 -E_2 =hc\bar{\nu}$$

$$\bar{\nu}=\frac{1}{\lambda}$$

$$\nu= \nu_0 \pm \nu_m \quad (1.1)$$

Bu denklemlerdeki dalga sayısını ifade eden $\bar{\nu}$ terimi geçiş enerjisine birebir bağlıdır. E_0 , dalga denkleminde genliği ifade etmektedir. Moleküllerin yoğunluğu $\nu= 0$ frekans değerinde $\nu= 1$ frekans değerine göre oldukça fazladır. Bu yüzden Stokes çizgileri normal şartlar altında anti Stokes çizgilerinden daha şiddetlidir. Bu durum Maxwell - Boltzmann dağılım ilkesini sağlamaktadır. Klasik teoride Stokes ve anti Stokes çizgileri aynı şiddette kabul edilmektedir. Bu yüzden klasik mekanik yaklaşım Stokes Raman saçılmasını ve anti Stokes Raman saçılmasını açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kuantum mekanik yaklaşımla açıklanmasına gerek duyulmaktadır.

Stokes çizgileri için frekans değerleri, küçük ν titreşim kuantum sayılı seviyeyle başlayarak yüksek ν kuantum sayılı seviyeyle bitmektedir. Özellikle $\nu =0$ seviyesiyle başlayan durumda Stokes çizgileri gözlenmektedir. Anti Stokes çizgileri durumunda tersine bir oluşum söz konusudur. Stokes çizgileri ile anti Stokes çizgileri arası şiddet farkı başlangıç enerji seviyelerinin n doluluk yoğunluğuyla ilişkilidir. Isıl dengede Maxwell -Boltzmann dağılımına sahiptir.

Başlangıç durumunda molekülün uyarılmış halde olması gerektiği için ve molekül sayısı sıcaklıkla doğru orantılı olarak azalacağı için anti Stokes çizgilerinin şiddeti azalacaktır. Stokes çizgileri ve anti Stokes çizgileri arasındaki şiddet ilişkisi aşağıda görüldüğü gibidir (1).

$$\frac{I_{\text{antistokes}}}{I_{\text{stokes}}} = \frac{n_{(\nu=1)}}{n_{(\nu=0)}} = e^{\frac{-h\nu_m}{kT}} \quad (1.2)$$

Burada n terimi doluluk yoğunluğunu, k terimi fiziksel bir sabit olan $1,3807 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ değerindeki Boltzmann sabitini ifade etmektedir. T sıcaklığı ifade etmektedir ve birimi Kelvin boyutundadır.

Raman etkisi ν_0 frekansıyla gelen fotonun q_a kuantum sayısına sahip elektronik taban halinden, q_i kuantum sayısına sahip ara bir uyarılmış hale geçmesine neden olmaktadır. Geçiş sırasında ν^0 kuantum titreşim frekansındaki başlangıç durumundan, ν'' frekansına geçerek değişebilir. Bu geçişe sanal geçiş denir ve enerji korunumu zorunluluğu yoktur. Molekül sanal ara uyarılmış halden başlangıç halindeki elektronik kuantum sayısına sahip farklı bir ν' kuantum sayılı hale ikinci bir geçiş yapabilmektedir [3].

Titreşim enerjisi başlangıç halindeki değerinden büyük ise enerji farkı soğurulan fotonlarla salınan fotonların farkından elde edilmektedir. Salınan fotonlar gelen foton frekansından düşük frekansa yani küçük bir $\hbar\omega$ kuantum enerjili ν_1 ($\nu_1 < \nu_0$) frekansına sahip olmaktadır **(1.3)**. Bu duruma Stokes kayması denir.

$$E = \hbar\omega$$
$$\nu = 2\pi \omega \quad (1.3)$$

Rayleigh saçılması ve Raman saçılması, ışık saçılma hareketi yaptığında aynı anda oluşmaktadır. Klasik teoriye göre, elastik Rayleigh saçılması, elektrik alan vektörü nedeniyle elektronik kabuk üzerine etkiyen kuvvet terimleriyle açıklanabilmektedir **(1.4)**.

$$E = E_0 \cos(2\pi \nu t)$$
$$P = \alpha E \quad (1.4)$$

Elektrik alana konulan bir molekülde, çekirdek elektrik alan yönünde itilirken elektronlar da elektrik alana zıt bir yönde itilmektedir.

Bu iki zıt kuvvetin etkisi, elektronlar ve çekirdeği ayırarak şekilde iten elektrik alanla, onları bir araya getirmek için çeken çekim kuvvetini dengeye ulaştırmaktadır. Bu sayede yüklerden pozitif olan yük bir tarafa, negatif olan yük diğer bir tarafa kayarak molekül kutuplaşmaktadır [2]. İkili şekilde arasında apolar bağ olan atomlara sahip bir molekül polarize bir ışık kaynağı tarafından ışınlanırsa, bir P dipol momenti indüklenmektedir. Burada α kutuplanabilirlik katsayısıdır.

Bu dipol, üzerine düşen ışığın sahip olduğu frekansla titreşerek aynı frekansa sahip kendi ışık dalgasını dışarıya salmaktadır. Elektronik olarak izotropik olmayan bir molekül için indüklenmiş dipol moment, elektrik alan bileşeni boyunca farklı olmaktadır. Molekül titreşim hareketi boyunca denge konumundan uzaklaştıkça, her yer değiştirmesi için α ile ifade edilen kutuplanabilirlik katsayısı ve q mesafesi birbirinin lineer fonksiyonu olacak şekilde yazılabilir [3]. Kutuplanabilirlik molekülün şekli ve boyutunun fonksiyonudur ve genellikle uzaysal yönelimle değişmektedir. α kutuplanabilirliğinin hesaplanması kuantum mekanik pertürbasyon teorisi ile mümkündür **(1.5)**.

$$I_{\text{stokes}} = K I_i \alpha^2 2\pi (v_0 - v_m)^4 \quad (1.5)$$

Burada K sabit bir sayı, I_i gelen ışığın şiddeti, v_0 gelen ışığın frekansı, v_m molekülün titreşim frekansı, α molekülün kutuplanabilirliğini ifade etmektedir. Nükleer yer değiştirme q terimi aşağıda gösterildiği gibi ifade edilmektedir [4]. $(\frac{dx}{dq})_0$ İfadesi sıfır oluyorsa titreşim Raman aktif değildir.

Raman aktif olmak demek kutuplanabilirliğin değişim oranının titreşimlerin etkisiyle sıfır olmaması demektir. Titreşimdeki küçük genleşmeler ve dipol moment aşağıdaki formüllerle ifade edilebilmektedir **(1.6)**.

$$q = q_0 \cos(2\pi v_m t)$$

$$\alpha = \alpha_0 + (\frac{d\alpha}{dq})_0 q + \dots$$

$$E = E_0 \cos(2\pi v_0 t)$$

$$q = q_0 \cos(2\pi v_0 t)$$

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi v_0 t) = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi v_0 t) + (\frac{d\alpha}{dq})_0 q E_0 \cos(2\pi v_0 t) \quad [4]$$

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi v_0 t) + \frac{1}{2} (\frac{d\alpha}{dq})_0 q_0 E_0 [\cos(2\pi(v_0 + v_m)t) + \cos(2\pi(v_0 - v_m)t)] \quad (1.6)$$

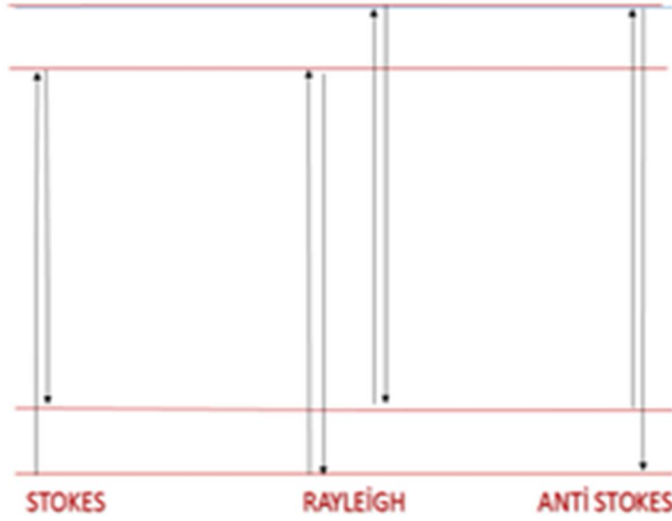
Ryleigh Terimi

Anti Stokes Terimi

Stokes Terimi

Bu ifadeye göre birinci terimde v_0 Rayleigh saçılmasını, ikinci terimde $v_0 + v_m$ anti Stokes saçılmasını, üçüncü terim de $v_0 - v$ Stokes saçılmasını vermektedir [3]. Şekil 1.2 ' de görüldüğü gibi Stokes saçılmasıyla daha küçük bir frekans, anti Stokes

saçılmasıyla da daha yüksek bir frekans elde edilmektedir. Buna karşılık Stokes saçılmanın dalga boyu daha büyük, anti Stokes saçılmanın dalga boyu daha küçüktür.



Şekil 1.2 : Jablonski enerji diyagramı.

1.1.2 Lazerin çalışma prensibi ve lazerin ışını odaklaması

Radyasyonun uyarılmış emisyonu ile kuvvetlendirilen ışına lazer denir. Lazer demeti elektromanyetik bir dalgadır. Monokromatik ve sabit genliklidir. Çoğu lazer sistemlerinde olduğu gibi deney için kullandığımız lazer ışın demeti de Gauss dalga profiline sahiptir.

Taban seviyesinden uyarılmış seviyeye geçişlerde atomlar enerji soğururken, uyarılmış durumdan taban duruma geçişlerde enerji salınmaktadır. Lazerin iki çeşit davranışı gözlenebilmektedir. Bunlardan birincisi herhangi bir uyarma olmadan olan kendiliğinden geçişler, diğeri ise bir dış alan etkisiyle olan atomik geçişler yani zorlamalı geçişlerdir. Lazerin çalışma prensibi pompalama üzerine kuruludur. Temel ve uyarılmış seviyelerde pompalama oranı Maxwell -Boltzmann dağılım yasasına uygundur. Geçiş enerjisi arttıkça uyarılmış seviyedeki yoğunluk azalmaktadır. Denge korunumu için uyarılmış seviyedeki moleküller foton yayarak taban seviyesine yığılırlar. Taban seviyesinde her zaman yoğunluk daha fazla olmaktadır (1.7).

$$\frac{dn}{dt} = -N_1 W_n + N_2 W_n + N_2 W' - \frac{n}{t_0}$$

$$\frac{dn}{dt} > 0 \quad (1.7)$$

Burada n foton sayısı, N_1 temel durumdaki atom sayısı, N_2 uyarılmış durumdaki atom sayısı olmak üzere $\frac{dn}{dt}$ foton üretme debisini göstermektedir. $-N_1 W$ n terimi soğurmaya ait terimdir. $N_2 W$ n terimi zorlamalı salınım, $N_2 W'$ terimi kendiliğinden salınım $-\frac{n}{t_0}$ terimi ise lazerde oluşan kayıpları ifade etmektedir.

W geçiş olasılığı terimi, W' kendiliğinden geçiş olasılığı terimi ve t_0 lazer içinde bulunan fotonun yaşam süresini ifade etmektedir. Lazer sistemine etki etmeyen terim kendiliğinden salınım terimidir. $\frac{dn}{dt} > 0$ şartı lazer olma şartıdır [5]. Lazer ışın demetimiz Gauss benzeri dalga profiline sahiptir. Burada w faz terimidir. Şekil 1.3' te $R(z)$, w , w_0 , w_{input} faz ifadeleri gösterilmektedir **(1.8)**.

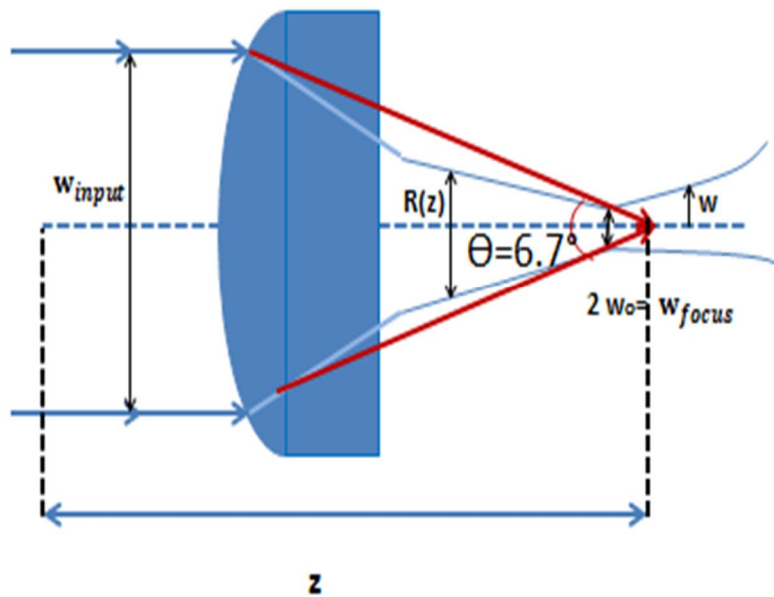
$$E(x, y, z, t) = E_0 e^{-\frac{x^2+y^2}{w^2}} e^{i(kz-wt)} e^{-\frac{t^2}{\Delta t^2}} e^{-i\frac{\pi x^2+y^2}{\lambda R(z)}}$$

$$R(z) = z + \frac{z_R^2}{z}$$

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

$$w_0 \sim \frac{\lambda f}{\pi w_{input}} \quad [5]$$

$$w = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (1.8)$$



Şekil 1.3 : Gauss demetinin şemasal gösterimi.

1.2 İn Vitro Fertilizasyonunun Tarihsel Gelişimi ve Yöntemi

İnfertilite, üreme kapasitesinin istek dışı azalması, koruyucu bir yöntem uygulanmadan yaklaşık bir yıl süreyle gebelik oluşamamasıdır.

Normal gebeliklerde yeni döllenmiş yumurtaya *zigot* denilmektedir. Birinci gün zigot iki hücreye bölünerek *embriyo* olmaktadır. Embriyonun ikinci gün 4 hücresi, üçüncü gün 6 ile 9 hücresi, dördüncü gün 16 ile 32 hücresi bulunmaktadır. Dördüncü gün embriyo *morula* adını almaktadır. Beşinci gün farklılaşmalar başlamaktadır ve 12 ile 16 hücreli yapılardan olan blastomerlerin ortasında sıvı dolu blastosel denilen bir yapı oluşmaktadır. Morula çevresi hücreler *plasenta*, morula içi hücreler *fetusu* oluşturmak için birleşmektedir. Bu yapıya *blastosist* denmektedir ve embriyonun rahim duvarına yapışmadan önceki halidir. Beşinci gün sonrasında implantasyon başlamaktadır.

Tüp bebek yönteminde uygun sayılan yumurtalar toplandıktan sonra uygun ısıda iki ile dört saat bekletilip erkekten alınan spermle fertilizasyon işlemi yani dışarıdan dölleme işlemi uygulanmaktadır. Fertilizasyondan sonraki iki ile üç gün içinde, 4 ile 8 hücreli olan embriyo rahime yerleştirilmektedir. Fertilizasyondan sonraki beş altı gün sonrasında embriyo, içerisinde boşluk bulunduran etrafı hücrelerle çevrili bir şekil almaktadır. Sonrasında altı ile sekiz gün içinde implantasyon başlamaktadır. Şekil 1.4' te yumurtaların alınıp dışarıdan dölleme sağlanması ile embriyo transferi şema olarak gösterilmektedir.

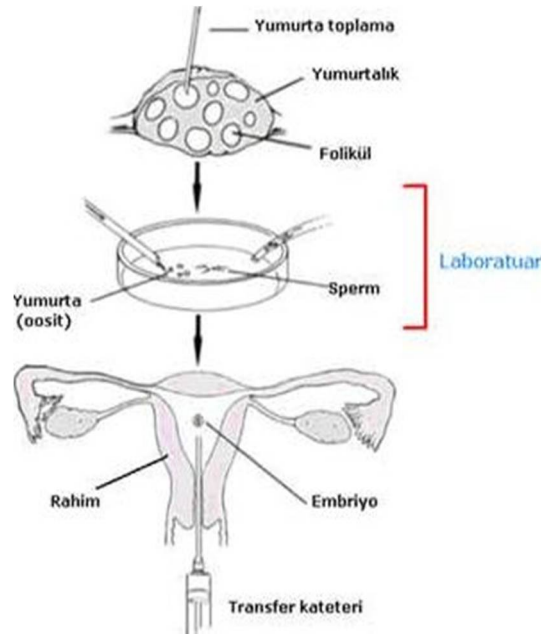
Fertilizasyondan sonra beş ile altı güne kadar yaşayan embriyolarda kaliteli olma oranı iki ile üç güne kadar yaşayanlardan yüksektir. İlerleyen teknikler sayesinde daha fazla sayıda blastosist elde edilebilmektedir [7].

Yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) amacı, infertilite insidansı arttıkça, hasta popülasyonunun ihtiyaçlarını karşılamaktır. Embriyonun başarılı bir gelişim izlemesi ve implantasyonu hakkında bilgiye sahip olmamız nedeniyle, yöntem gelişim aşamasını hızla sürdürmektedir.

İn vitro fertilizasyonu da bir yardımcı üreme tekniği yaklaşımıdır. Yapılan araştırmalara göre canlı doğum oranı 35 yaş üstü kadınlarda halen %40 dolaylarındadır. Embriyo seçim hassasiyetinin artması daha az sayılı ve

implantasyon potansiyeli daha fazla olan embriyo transferleriyle sonuçlanacağından dolayı tedavi güvenliğinde artış gözlenecektir.

Emre Seli ve grubu gebelik sonuçlarını incelemekten embriyo reproduktif potansiyellerini tahmin edebildiklerini göstermişlerdir [6]. Sekretomikler ve metabolomiklerle en yüksek oranlı reproduktif potansiyeline sahip embriyoları seçme yetimizin artması ve tek embriyo transferinin yaygınlaşması amaçlanmaktadır. Bu amaçların gerçekleşmesi ile sadece zorunlu yasalar koyarak uygulama sağlayan devletlerde değil, dünya üzerinde de tek embriyo transferi yaygınlaşabilecektir.



Şekil 1.4 : Embriyo transferinin şematik gösterimi (Url-1).

IVF kültür medyasına hormon salgılanmakta olan proteinler yani *sekretomikler*, embriyonun hücre fonksiyonu araştırması için incelenmektedir. Bu şekilde embriyo salgı profilleri reproduktif başarı oranı ile korele edilebilecektir. İmplant olmuş ve olmamış embriyolar incelenecek ve transfer için en uygun embriyoya biomarkerlar bulunabilecektir.

Metabolomikler, embriyonun fiziksel ve metabolik durumunu yansıtırlar. *Metabolitler*, vücutta meydana gelen tepkimeler sonucu vücutta oluşan ve vücutta birikmeden başka bir bileşiğe dönüşen kimyasal yapıları bileşiklerdir. Belirli bir zaman aralığı içinde doku, hücre ve fizyolojik sıvılarda lipit, karbohidrat, vitamin, hormon ve diğer hücre bileşenlerinde küçük moleküllü metabolitler ortaya çıkmaktadır. Metabolitlerin ilk aşamada kültür medyası içerisinde bulunma oranlarının

belirlenmesi ve tanımlanması IVF yönteminin gelişimine katkı sağlayacaktır. Salgıları tanımlayabilmek için yapılmış olan ilk çalışmalar fare embriyosundaki iki boyutlu jel elektroforezi Western blot veya eliza yöntemi ile yapılmıştır. Son zamanlarda kütle spektroskopisi ile araştırmalara devam edilmektedir. Bununla birlikte pek çok sekretom tanımlanabilmiştir. Proteinlerin lazerle iyonizasyonu yüzey destekli lazer iyonizasyon tekniği ve TOF (time of flight) analizleriyle yapılabilmektedir. İmplant olmuş ve olmamış blastosistler için protein mikro dizi teknolojisi ile kültür medyasındaki sekretomiklerin profilleri karşılaştırılabilmektedir [8].

Kızılötesi soğurma spektroskopisi ve Raman spektroskopisi vibrasyonel spektroskopik tekniklerdendir. Moleküllerin titreşim karakteristikleri ile metabolit profili çıkarılabilmektedir. Üretilen sinyal yoğunluğu ve ölçüm yapılacak örnek bileşenlerini tanımlayabilmek için iki tekniğin de hem avantajları hem de dezavantajları bulunmaktadır.

Emre Seli ve grubu, bu iki teknikle implante olmuş embriyo metabolit profilindeki farklılıkları tanımlamışlardır [8]. Sonrasında verileri diğer embriyo reproduktif potansiyelini ölçmek için kullanmışlardır. Sonuçlar her iki teknikle de başarılı değerlendirme yapılabileceğini göstermiştir.

Manyetik rezonans spektroskopisi de metabolitleri tanımlamada kullanılmaktadır. Değişik reproduktif potansiyeline sahip embriyo metabolit profillerindeki farklılıkların tanımlanabilmesi üzerinde çalışılmıştır. Seli ve grubunun manyetik rezonans spektroskopisiyle ilgili çalışmalarına göre, implante olmuş embriyoların olmayanlara göre kültür medyalarının daha yüksek oranda glutamat konsantrasyonuna sahip oldukları ve embriyo medyasında daha düşük oranlarda alanin, piruvat ve glikoza rastlandığı görülmüştür [8]. Manyetik rezonans spektroskopisi ile Raman spektroskopisi karşılaştırıldığında manyetik rezonans spektroskopisi daha zaman alıcı ve pahalıdır fakat alınan sonuçlar eş değerlidir.

Embriyo değerlendirmesinde spektroskopiden faydalanılarak dünya üzerinde IVF tedavisinin halen çözümlenememiş yüksek çoklu gebelik ve düşük implantasyon oranlarının önüne geçilebilmesi istenmektedir. Kliniklerin amacı, morfolojisinde sorun olmayan ve yüksek fertilizasyon potansiyeline sahip olan embriyolar seçebilmektir. İVF tedavisinin ve gebelik testinin bitiminden sonra hastaların

implantasyon oranları sınıflandırılacaktır. Embriyo atık kültür sıvısı içindeki proteinler, amino asitler, lipitler ve yağ asitlerinin tahsis edilmesi İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ile İstanbul Teknik Üniversitesi'nin beraber yürüttükleri ÖNAP projesinin bir adımını oluşturmaktadır. ÖNAP – 22501 numaralı 'Atık Foliküler Sıvı ve Embriyo Kültür Medyasında Metabolomiklerin ve İmplantasyonda Etkili Olabilecek Markerların Spektroskopik ve Elisa Yöntemlerle Analizi ve IVF Başarı Sonucuna Etkileri' başlıklı Bilimsel Araştırma Projesine (BAP) göre yapılması amaçlanan, embriyo etrafındaki kültür ortamını spektroskopik yöntemle araştırarak embriyo seçmektir. Projenin uygulanışı, embriyoyu çevreleyen kültür ortamı için fertilizasyonun başlangıç sürecinde her bir embriyo atık kültür ortamı Raman spektroskopisi ile değerlendirilmesi ve her embriyo için maturasyon, gebelik ve canlı doğum oranının karşılaştırılmasıdır. Embriyo kültür sıvısı örnekleri Tüp Bebek Kliniği'nde iki farklı gruba ayrılmıştır. Kaliteli embriyo yetiştirme ihtimali yüksek olan örnekler Grade1 (G1), düşük olan örnekler ise Grade 2 (G2) olacak şekilde sınıflandırılarak Raman spektrumları ölçülmüştür.

1.3 Protein Metabolizması

Protein yapılarının incelenmesi aşamalı bir çalışma gerektirmektedir. Karışık yapıli proteinlerin incelenmesi sonucu, öncelikli yapının 'protein katlanması' denilen yöntemle sınıflandırılması kararlaştırılmıştır. Proteinler aminoasitlerin bağlanmasıyla oluşan yüksek yapıli organik bileşiklerdir. Genetik kod 22 aminoasit tanımlamaktadır fakat bazıları karmaşık yapıli oluşturarak şekil değiştirmişlerdir. Proteinlerin oluşumunda en çok kullanılan 20 aminoasit vardır. Peptit bağlar aminoasitlerin karboksil grupları ile zincirdeki amino gruplarının bağlanmasıyla oluşmaktadır. Polipeptitler 10 ve 100 arası aminoasit içerirler. Tekli polipeptit yapısı farklı bir biyolojik aktiviteye sahiptir ve birden fazla kararlı katlanma içeriyor olabilir. Fakat sınıflandırma yapılırken göze alınan özellikler aktif olup olunmadığı ve doğal yapısalıktır. Bu sınıflandırmaya göre dört çeşit protein yapısı belirlenmiştir.

Birincil yapı, polipeptit zincirindeki aminoasit dizisidir. Bu yapı proteinlerdeki genlere karşılık gelen tekli yapıdır. Proteinlerdeki iki sistin amino asiti sülfidril grupları arası disülfid bağı oluşur. Disülfid bantları, glikozilasyon ve fosforilasyon gibi kopyalanabilir modifikasyonlarda birincil yapının temel bileşenlerini oluşturmaktadırlar. Protein biyo sentez süreci boyunca devam etmektedirler.

İkincil yapının altyapısı, α -sarmal yapısı ve β -yaprak yapısıdır. bu yapılar protein oluşturan atomlar arası hidrojen bağı örüntüleridir. Bant uzunlukları ve açılar, temel iki element olarak ele alınmıştır. Peptit gruplarının ana zincirleri arası hidrojen bandı izleri, ikincil yapıyı ifade etmek için kullanılır. Düzenli bir geometri yapıları vardır. Ana zincirin bazı bölgeleri proteinler içinde yakılır ve polar atomlar arası hidrojen bantlarını şekillendirir.

Üçüncül yapı, tekli bir proteinin üç boyutlu yapıdaki ikili molekül yapısıdır. Üçüncül yapı ve erimiş kürecikler birlikteyken yapısal olarak özel olmayan etkileşimlere sahiptirler. Üçüncül yapının farklılığı ve özelliği yandaki zincirlerin uygun sarmal yapılarının yanmış hidrofobik kalıntıları, iyonik etkileşimler ve hidrojen bantlarının etkileşimleridir. Protein yapısı stabilizasyonunda disülfid bantları önemli rol oynamaktadır fakat hücrenin kristalleşmiş kısımları azalan dış çevre olarak bilinmektedir. Bu kısımlarda disülfid bantları bir yardım sağlamamaktadır. Bu yüzden üçüncül yapı, bütün kovalent olmayan etkileşimleri kapsamaktadır.

Dördüncül yapı, fonksiyonel kompleks yapılar oluşturmak için protein ya da peptit zincirlerinin birleşmesiyle oluşmaktadır ve tüm proteinler dörtlü yapıya ulaşamamaktadır. Özel zincirler alt birim olarak adlandırılmaktadırlar. Kovalent olarak birleşmiş olmak zorunda olmasalar da disülfid bantlarıyla bağlı olabilmektedirler. İki ya da daha fazla polipeptit kompleks karışımı multimer olarak adlandırılmaktadır. İçerdikleri alt birim sayısına göre dimer, trimer, tetramer gibi isimler almaktadırlar. Kendilerine özgü bir altyapıya sahiplerse 'homo', farklı altyapılardan türetilmişse 'hetero' takısını almaktadırlar [9]. Protein data banklarındaki kristalize olmuş protein yapıları, elektronların üç boyutlu yoğunluk profillerinin ölçümlerine dayanan X ışını kristografisi ile X ışını kırınım desenleri izlenerek belirlenebilmektedirler. Nükleer Manyetik Rezonans yöntemi de (NMR), ikincil yapıdaki proteinlerin belirlenmesinde kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem için proteinler çözelti içinde incelenebilmektedirler [10]. Optik spektroskopi yöntemleri, moleküllerin bağ enerjilerini soğurma ve emisyon mekanizmalarıyla belirler. Bu yöntem atomik çözünürlükler hakkında bilgi verebilmektedir.

1.3.1 Amino asitlerin yapısal özellikleri

Amino asitler proteinleri oluşturan temel yapıtaşlarıdır ve bütün hayat formları için büyük fiziksel önemleri vardır. Aminoasitler hayati faaliyetlerde moleküller arası

bağlayıcı model olarak kullanılmaktadırlar. Raman spektroskopisi, peptit ve proteinler gibi daha karmaşık yapıların moleküler uygunluğu açısından inceleme sağlamaktadırlar. Katıların spektrumları çözeltilere oranla daha keskin bantlar vermektedirler. Bütün türler içinde proteinler 20 amino asit seti tarafından türetilmektedirler. Protein formları, enzimler ve vücuttaki diğer uzamlar geniş kimyasal reaksiyon değişimleri sonucu hayati önem taşıyan, enerji üreten, enerji transfer eden ve kas aktivitelerini düzenleyen kısımlar olarak aminoasitler tarafından oluşturulmuşlardır. Aminoasitler aynı zamanda ilaç, kozmetik ve endüstriyel uygulamalarda da önemli rol oynamaktadır.

Direkt kimyasal sentezlerin yanı sıra mikroorganizmalar tarafından yapılan fermantasyon, proteinlerden hidrolizasyon çıkarma uygulaması, çevre dostu süper kritik su hidrolizi (moleküllerin sürtünmesiz hareket ettiği su sistemi) ile biyo kütle atıklarının geri dönüşümü ve enzimatik metotlar aminoasitlerin diğer uygulandığı alanlardır.

Amino asitlerden 8 tanesi esansiyel amino asit olmaktadır. Bunlardan bazıları halkalı yapıda yani *aromatik amino asitler*, diğer kısmı da halkasız yapıda yani *alifatik amino asitler* olarak adlandırılmaktadır. Ölçtüğümüz embriyo atık kültür sıvısında 4 esansiyel 1 yarı esansiyel amino asit bulunduğunu saptadık. Bunların yanısıra lipid yapıları ve diğer yapılara da rastladık.

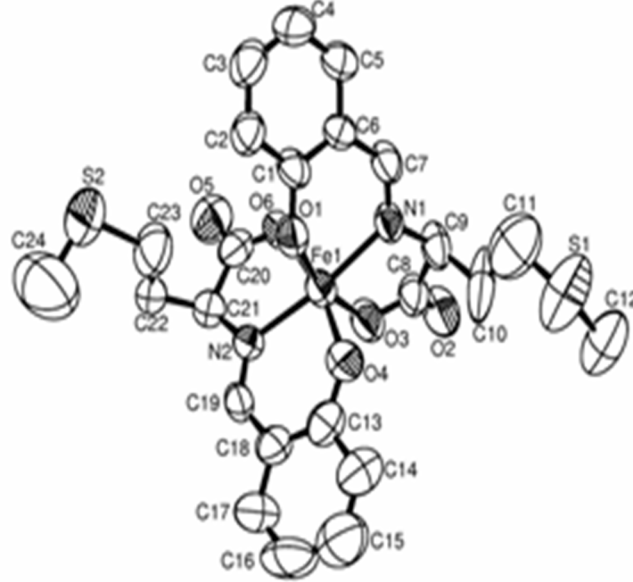
1.3.2 Bovin serum albümin (BSA)

Bovin serum albümin, deneylerde protein konsantrasyonunu standardize etmek için kullanılmaktadır. Öncü protein 607 amino asit uzunluğundadır. N terminali, amino asit tarafından sonlandırılmış bir protein ya da polipeptiti bir serbest amino asit grubuna bağlamakla görevli bir sistemdir.

Bir N terminali, 18 artık peptit sinyaline, öncü bir protein salgılanması üzerine oluşmuştur. Bu yüzden başlangıç proteini 589 amino asit kalıntısı bileşeninden oluşmaktadır. Ayrıca 4 amino asit olgunlaşmış bovin serum albümin proteinini 583 amino asite ayırtırmayla da görevlidir.

Bovin serum albümin ayrıca hücre içinde ve mikrobiyal kültür içinde besin maddesi olarak kullanılır ve DNA sindirimi boyunca etkili olan bazı enzimleri stabilize etmekle de görevlidir. Bu protein diğer enzimlerle etkileşime girmez. Bu yüzden

kendisinin stabilize edilmesine gerek yoktur. Diğer proteinlerin miktarlarının saptanmasında da kullanılmaktadır. Sinyal tahlilinde verimliliği artırmak için stabilizasyonda kullanılabilir olduğundan ve biyokimyasal reaksiyonlarda reaksiyonu olumlu ya da olumsuz etkilemiyor olmasından dolayı da kullanılabilir (Url-4). Şekil 1.5 ' te bovin serum albüminin kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.5 : Bovin serum albüminin kimyasal yapısı (Url-2).

1.3.3 Embriyo sıvısı bileşenleri

Embriyo atık sıvısı protein yapılarını, lipid yapılarını, glikoz, piruvat ve laktat yapılarını ve diğer kompleks yapıları içermektedir. Her bir hastadan alınarak hazırlanmış olan örneklerin protein yapıları, içerdikleri amino asitler, lipid bantları ve diğer bileşenleri, alınan Raman ölçümlerinin bant tahsisi yapıldıktan sonra sınıflandırılmıştır.

Adenozin trifosfat (ATP), canlılık için gerekli olan temel moleküldür ve her hücre kendi ATP' sini kendisi üretmektedir. İçeriğinde adenin, riboz ve üç fosfat bulunmaktadır. Adeninle riboz arasında glikozit bağ, riboz ile fosfat arasında ester bağı ve fosfatlar arasında yüksek enerjili bağlar vardır. Bu yüksek enerjili bağlar ATP'nin enerji kaynağı olmaktadır [13].

Embriyonun hücre metabolizması için gerekli olan ATP üretimi iki ana yolla sağlanmaktadır. Blastosist evresinden morula evresine geçişte önemli ölçüde glikoz artmaktadır ve bu durum aynı zamanda embriyo gelişim potansiyeline ve canlılığa da

yansımaktadır [14]. Hardy ve Gott' un 1990 yılında yaptıkları araştırmaya göre embriyonun içeriğine piruvat alımı, embriyo canlılığı ve büyüme potansiyeli için olası bir belirteçdir. Blastokist evresinde embriyo gelişimi için yüksek piruvat alımının önemli olduğu o dönemde ortaya konulmuştur.

Blastokist evresinde gelişme ile ilgili olarak en son 2001 yılında Gardner, 4 günlük embriyolar üzerinde piruvat alımını değerlendirmiştir [15]. Piruvat alımı ile ilgili alınan ilk raporlar tutarlı blastokistlerin geliştirilmesinde anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir. Genel olarak piruvat alımı embriyo gelişimi ve canlılığı için öngörü olup olmadığı sonucu netleştirilememiştir.

Üretilenler Embden - Meyerhof' un deneyleri sonucunda bulunduğu üzere aerobik glikoliz ya da trikarboksilik asit (krebs) ve anaerobik glikolizdir [16]. Karboksilik asit, piruvat ve laktat embriyonun ana enerji kaynaklarıdır ve erken implantasyon döneminde glikoz alımı minimum düzeydedir [17]. İnsan embriyolarından alınan amino asitler klinik ortamında gebelik ve canlı doğum oranları ile kültür ortamında glisin ve lösin ve çeşitli amino asit düzeylerinin azaldığını görmüştür [18].

Gardner ve Leese 1987 yılında blastokist dönemindeki glikoz tüketimini ölçmüştür [19]. Bu çalışmalarında embriyo metabolizmasını değerlendirmek için kullandığı kültür medyası piruvat, laktat, aminoasitler ve vitaminler içermektedir. Gardner önce fare embriyosunda sonrasında insan embriyosunda glikoz tüketimini ölçerek ve yüksek dozda glikoz tüketimi saptamıştır.

Houghton tarafından 2002 yılında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography) (HPLC) kullanılarak blastokist evresinde preimplantasyon süreci incelenmiştir [19]. Araştırması sonucundaki bulguları Çizelge 1.1' de verilmiştir. Yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak metabolit ve sekretomiklerin incelenmesi üzerinedir.

Bizim çalışmamız embriyo sıvısı bileşenlerinin, kaliteli embriyo yetiştirme ihtimali yüksek olan sınıf Grade1 sınıfı ile daha düşük ihtimal verilen sınıf Grade2 sınıfının birbiriyle ne kadar farklı olduğunu görmek adına bileşenlerdeki bulunma oranlarını incelemek üzerinedir. Klinik ortamında yapılmış olan sınıflandırma işleminin tam tamına doğru bir sınıflandırma olmadığı ise yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz istatistiksel ayırma yöntemleri sonucunda elde ettiğimiz yüzdelerden anlaşılmaktadır.

Çizelge 1.1 : Embriyo sıvısı amino asit ve lipit değerleri değişimleri ile ilgili yapılmış çalışmalar [21].

| Çalışma | Embriyo Evresi | Metabolit Şekil | Ölçüm Yöntemi | Sonuç |
|----------------------|---|--|----------------------|--|
| Houghton et al. 2002 | 2 ve 3 günlük 8 hücreli moruna evresindeyken | Amino asit dönüşümü: Glutamin, arginin, methionin üretimi. Alanin asparjin tüketişi Serin üretimi başlangıcı Alanin ve glisin tüketişi | HPLC HPLC | Blastosis Gelişimi Blastosis Gelişimi |
| Brison et al. 2004 | Day2 | Kültür Medyası İçindeki Glisin ve Lösin Değişimi | HPLC | Klinikte Gebelik Başlangıcı ve Canlı Doğum |
| Seli et al. 2008 | Day3 | Glutamin Azalışı ve Artışı | Proton NMR | Canlı Doğum |

Çizelge 1.2' de insan metabolomundan alınmış metabolit örnekleri ile yapılan bir çalışma sonucu metabolit özellikleri verilmektedir [19]. Yapılmış çalışmalarda metabolit sınıfından olan üre, piruvik asit, alanin, glikoz, oleik asit, laktoz, kolesterol, adenzin trifosfat (ATP), glikojen ve oksitosin yapılar incelenmiştir.

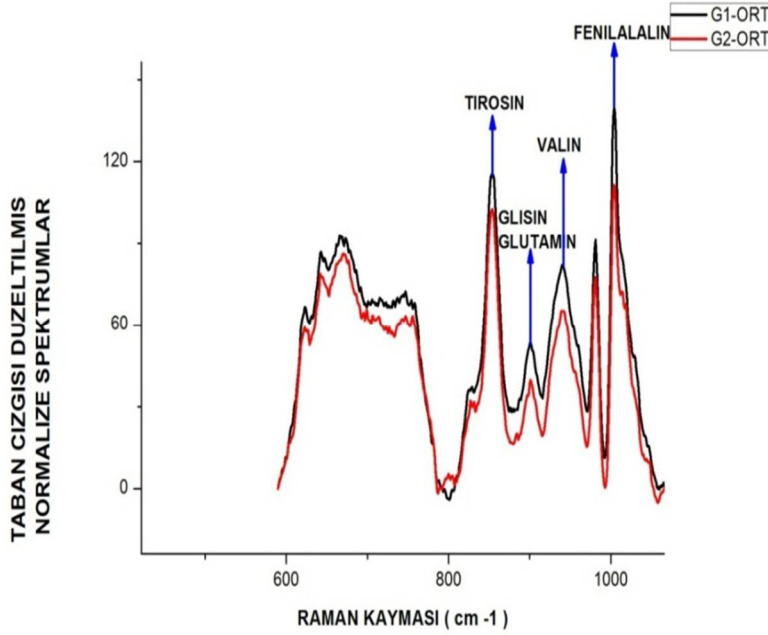
Kimyasal sınıflandırılmaları yapıldıktan sonra 1 ile 3 güne kadar bekletilmiş transfere hazır yumurtalarda günden güne değerlerin değişimi incelenmiştir. Bu şekilde artış ve azalışın ne yönde olduğuna göre, hangi metabolik artışında daha sağlıklı embriyo oluşma ihtimalinin artabileceği incelenmiştir.

Çizelge 1.2 : İnsan metabolomundan alınmış metabolit örnekleri ve özellikleri [21].

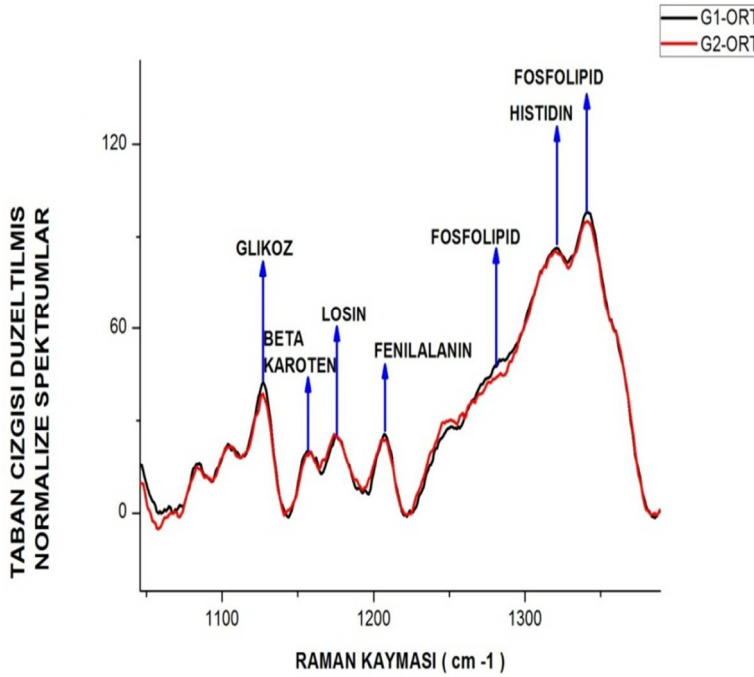
| Metabolit | Kimyasal Sınıflandırma | Kimyasal Sembolü | Moleküler Ağırlık |
|-----------------------|----------------------------------|--|--------------------------|
| Üre | Organik Bileşen - Amino Keton | CH ₄ N ₂ O | 60,06 |
| Piruvik Asit | Organik Bileşen - Keto asit | C ₃ H ₄ O ₃ | 88,06 |
| Alanin | Amino Asit | C ₃ H ₇ NO ₂ | 89,09 |
| Glikoz | Karbonhidrat- Monosakkarit | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,16 |
| Oleik asit | Lipit- Yağ Asiti | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | 282,46 |
| Laktoz | Karbonhidrat- Disakkarit | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | 342,3 |
| Kolesterol | Lipit-steroid | C ₂₇ H ₄₆ O | 386,65 |
| Adenozin Trifosfat | Nükleotit- Ko enzim | C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ | 507,18 |
| Glikojen | Karbonhidrat- Polisakkarit | C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁ | 666,58 |
| Oksitosin | Peptit | C ₄₃ H ₆₆ N ₁₂ O ₁₂ S ₂ | 1007,19 |

Şekil 1.6, Şekil 1.7 ve Şekil 1.8' de embriyo atık sıvısının 600 cm⁻¹ ile 1800 cm⁻¹ arası bölgelerde Raman bantlarının belirlenmesiyle şiddete göre en yüksek noktalarının hangi amino asit lipit karbonhidrat ve diğer karmaşık yapılara ait olduğu

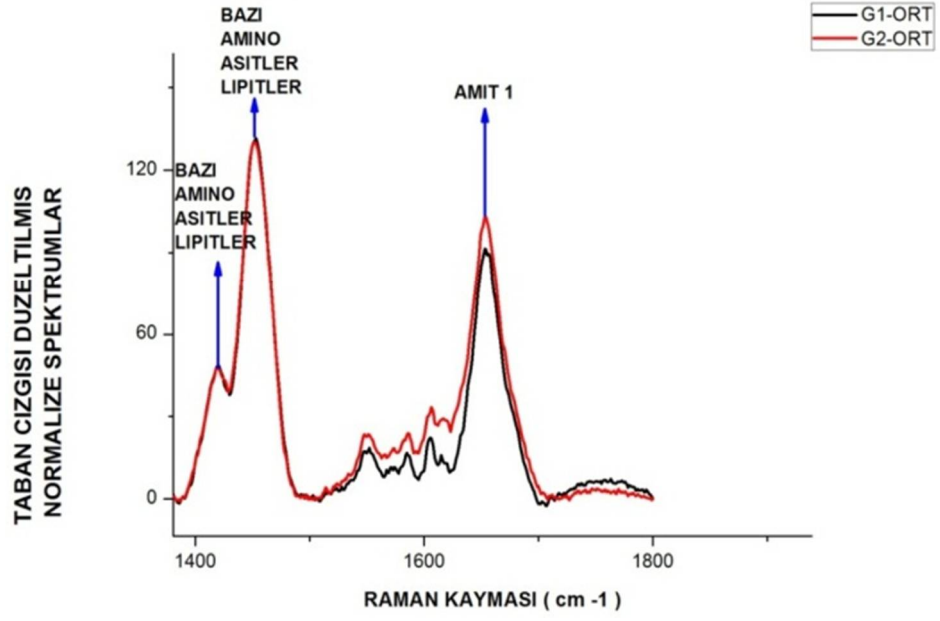
saptanmıştır. Raman kayması değerleri literatürdeki amino asit, lipit ve diğer yapılardan hangisine denk geliyorsa içeriği hakkında tahmini bir belirleme yapılmıştır. Data grafiklerinden ölçümlerin Raman bantlarının neler olduğu Çizelge 1.3’ te tablo şeklinde görüldüğü gibi tahmini olarak belirlenmiştir.



Şekil 1.6: 600-1040 cm^{-1} arası Raman spektrumları için bant atamaları.



Şekil 1.7 : 1040-1380 cm^{-1} arası Raman spektrumları için bant atamaları.



Şekil 1.8 : 1380-1800 cm^{-1} arası Raman spektrumları için bant atamaları.

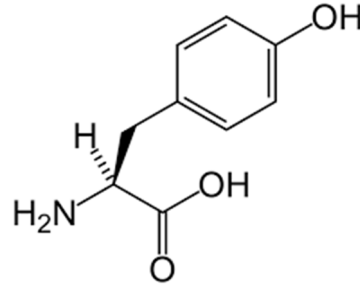
Çizelge 1.3 : Raman bant tahsisi

| Raman Kayması(cm^{-1}) | Bant Tahsisi |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| 850 | Tirozin |
| 897 | Glisin, Glutamin |
| 937 | Valin |
| 1003 , 1204 | Fenilalanin |
| 1126 | Glikoz |
| 1156 | Beta Karoten |
| 1176 | Lösin |
| 1271, 1341 | Fosfolipid |
| 1314 | Histidin |
| 1419 ,1449 | Bazı amino asit ve lipitler |
| 1647 | Amit 1 Bandı |

Şekil 1.9 ile Şekil 1.17 arasındaki şekiller embriyo atık sıvısının içerdiği amino asit ve diğer yapıların kimyasal gösterimleridir. Çizelge 1.4 ile Çizelge 1.11 arasında embriyo atık sıvısının içeriğindeki yapıların kimyasal formülleri ve kimyasal özellikleri tablolarla gösterilmektedir (Url-3).

1.3.3.1 Tirozin

Proteinleri oluşturan 20 amino asitten birisidir. 4 hidroksi fenilalanin veya amino propanoik asit olarak bilinmektedir. Yan zincirinde amit fonksiyonel grubu içerdiği için polardır ve pH' ı yüksüzdür. Şekil 1.9' da görüldüğü gibi benzen halkası taşımaktadır (Url-5).



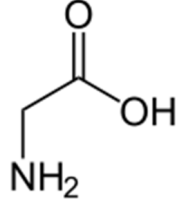
Şekil 1.9 : Tirozinin kimyasal yapısı (Url-5).

1.3.3.2 Glisin ve glutamin

Glisin ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) apolar bir aminoasittir ve yapı olarak proteinlerdeki 20 amino asitten en basitidir. Yan zincirinde bir hidrojen atomu bulunmaktadır. Glisindeki α -karbon atomu bir hidrojene bağlıdır. Glisin optik olarak aktif değildir (Url-5). Şekil 1.10, Şekil 1.11, Çizelge 1.4 ve Çizelge 1.5' te yapıları görülmektedir.

Çizelge 1.4 : Glisinin element özellikleri (Url-5).

| | Özellikleri |
|--------------------|-----------------------------------|
| Kimyasal Formülü | $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ |
| Molekül Ağırlığı | 75,07 gr/mol |
| Yoğunluk | 1,607 gr/cm ³ |
| Erime Noktası | 233 °C (parçalanır) |
| Sudaki Çözünürlüğü | 24,99 gr/100 mL (25 °C) |
| Çözünürlük | Alkol ve piridinde çözünür. |

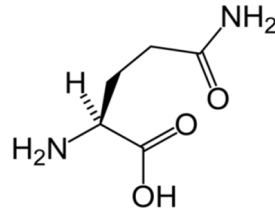


Şekil 1.10 : Glisinin kimyasal yapısı (Url-5).

Glutamin proteinleri oluşturan 20 aminoasitten birisidir ve yan zincirinde karboksamit grubu bulunan bir polar aminoasittir. Glutamin amino asiti vücutta tükendiği zaman nitrojen içeren amonyak moleküllerine bağlanıldığında üretilebilmektedir. Bir tür nitrojen emici olarak düşünülebilir. Amonyacı temizleyerek hücre gelişiminde doku onarımında kullanılarak dokular arası nitrojen taşımaktadır. Glutamin alfa amino asitleri gibi protein sentezi ve kırılmasında etkindir. Belirgin şekilde BCAA (Branched - Chain Amino Asit) metabolizması, bağırsak çeperinin onarılması, normal bağışıklık sistemi, glikoz oluşumu, su taşınması, nörotransmisyon, purin pirimidin sentezi ile amino gruplarının plazma içinde taşınmasında etkindir. Amino şeker sentezi sırasında amino grup vericisi olarak yer almaktadır.

Çizelge 1.5 : Glutaminin element özellikleri (Url-5).

| | Özellikleri |
|--------------------|--------------------------------|
| Kimyasal Formülü | $C_5H_{10}N_2O_3$ |
| Molekül Ağırlığı | $117,15 \text{ g mol}^{-1}$ |
| Yoğunluk | $1,316 \text{ g/cm}^3$ |
| Sudaki Çözünürlüğü | Çözünebilir. |
| Çözünürlük | 2,32 (karboksil), 9,62 (amino) |



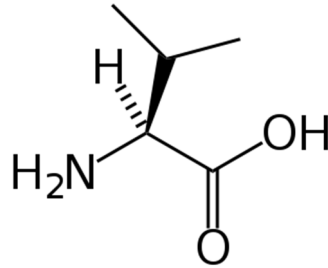
Şekil 1.11 : Glutaminin kimyasal yapısı (Url-5).

1.3.3.3 Valin

Valin (Val) proteinleri oluşturan 20 aminoasitten birisidir. Beslenme açısından dışarıdan alınması zorunlu (esansiyel) bir besin maddesidir. Valinin yan zinciri yük taşımadığından dolayı nötr amino asitlerdendir. Şekil 1.12 ve Çizelge 1.6' da yapısı görülmektedir.

Çizelge 1.6 : Valinin element özellikleri (Url-5).

| | Özellikleri |
|--------------------|--|
| Kimyasal Formülü | C ₅ H ₁₁ NO ₂ |
| Molekül Ağırlığı | 117,15 g mol ⁻¹ |
| Yoğunluk | 1,316 g/cm ³ |
| Erime Noktası | 298 °C (568 °F, 571 K) |
| Sudaki Çözünürlüğü | Çözünebilir. |
| Çözünürlük | 2,32 (karboksil), 9,62 (amino) |



Şekil 1.12 : Valinin kimyasal yapısı (Url-5).

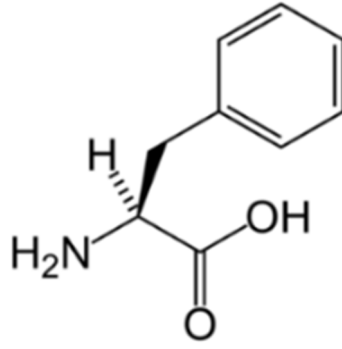
1.3.3.4 Fenilalanin

Fenilalaninin (Phe, F) moleküllerinin aynada yansıması olan optik izomerleri doğada iki formda bulunabilmektedir. Bunlar D- fenilalanin ve L-fenilalanindir ve yan zinciri bir benzil grubundan oluşmaktadır. Bu amino asitin fenilalanin olarak adlandırılma nedeni kimyasal ki hidrojenlerden birinin fenil grubuyla değiştirilmesi ile oluşmuş olmasıdır. İnsan vücudunda üretilmez bu yüzden dışarıdan alınması zorunludur. Şeker içermeyen ürünlere eklenen aspartam büyük oranda fenilalanin içerir.

Oda sıcaklığında toz şeklindedir ve beyaz renktedir. Fenilalanin anne sütünde bulunmaktadır. Doğrudan salgılara etki eden bir amino asit olduğu için alımı çok önemlidir. Şekil 1.13 ve Çizelge 1.7’ te yapısı görülmektedir.

Çizelge 1.7 : Fenilalaninin element özellikleri (Url-5).

| | Özellikleri |
|------------------|--|
| Kimyasal Formülü | C ₉ H ₁₁ NO ₂ |
| Molar Kütlesi | 165,19 g mol ⁻¹ |
| Çözünürlük | 1,83 (karboksil), 9,13 (amino) |



Şekil 1.13 : Fenilalaninin kimyasal yapısı (Url-5).

1.3.3.5 Glikoz

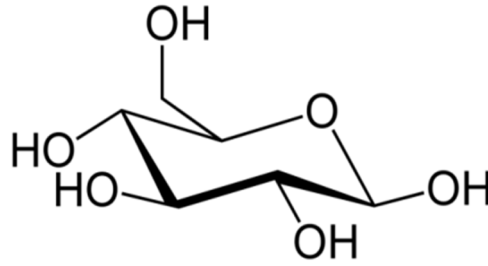
Bir monosakkarit olan glikoz yaşam için çok önemli bir karbonhidrattır. Hücreler için bir enerji kaynağı ve metabolik reaksiyonlarda bir ara ürün olarak kullanılmaktadır. Glikoz böbreklerde tümüyle emilmektedir. Yapısal olarak 6 şekerli bir heksozdur. sindirilmeden kullanılabilir olduğundan dolayı beyinin ihtiyaç duyduğu temel yapılardandır.

Glikoz fotosentezin ana ürünlerindedir ve hücre solunumu onunla başlamaktadır. Doğal halde bulunan (D-glikoz) dekstroza glikozun D biçimidir. Molekülün ayna görüntüsüne L-glikoz denilmektedir. Düz bir zincir şeklinde de halkalı yapıda da bulunabilmektedir.

Glikozun altı karbon atomu bulunan aldehit grubuna sahip bir aldoheksoz olarak açık halkalı ya da halkalı şekilde olabilmektedir. Suda bu iki biçim birbiri ile denge halindedir (Url-6). Şekil 1.10 ve Çizelge 1.4’ te yapısı görülmektedir.

Çizelge 1.8 : Glikozun element özellikleri (Url-6).

| | Özellikleri |
|------------------|---|
| Kimyasal Formülü | $C_6H_{12}O_6$ |
| Molar Kütlesi | $180,16 \text{ g mol}^{-1}$ |
| Yoğunluğu | $1,54 \text{ g/cm}^3$ |
| Erime Noktası | α -D-glikoz: $146 \text{ }^\circ\text{C}$ β -D-glikoz: $150 \text{ }^\circ\text{C}$ |



Şekil 1.14 : Glikozun kimyasal yapısı (Url-6).

1.3.3.6 Beta karoten

Beta karotenin askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi antioksidanlar tarafından oluşan serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonu önlediği yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Karoten birbiriyle ilişkisi olan birkaç bileşik için kullanılmaktadır. Soğurduğu ışığın klorofile aktarılmasıyla fotosentezde önemli rol oynayan fotosentetik bir pigmenttir. İki türü bulunmaktadır. Bunlar alfa-karoten (α -karoten) ile beta-karotendir (β -karoten). Kimyasal yapısına bakıldığında karoten bir terpendir. Birbiriyle ilişkili birkaç bileşikten oluşan karmaşık bir yapısı vardır.

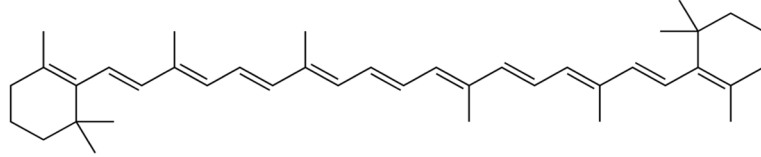
Beta karoteni iki retinil gruptan oluşmaktadır ve ince bağırsakta mukozada dioksijenaz tarafından yıkıma uğrayarak retinol denilen A vitaminine dönüşmektedir.

Karaciğerde depolanarak gerekli zamanlarda A vitaminine dönüşebildiği için pro vitamin sayılmaktadır. Karotenin başlıca izomerleri olan α karoten ile β karotenin farkı uçlardaki halkalı grupların çift bağlarının konumlarından dolayıdır. β karoten sarı, turuncu yeşil yapraklı, havuç, ıspanak, domates ve kavun

gibi meyve ve sebzelerde bulunmaktadır ve karotenin daha yaygın olan biçimidir (Url-7). Şekil 1.15 ve Çizelge 1.9' da yapısı gösterilmektedir.

Çizelge 1.9 : Beta karotenin element (Url-7).

| | Özellikleri |
|--------------------|-----------------------------|
| Kimyasal Formülü | $C_{40}H_{56}$ |
| Molar Kütlesi | $536,87 \text{ g mol}^{-1}$ |
| Yoğunluğu | $0,941 \text{ g/cm}^3$ |
| Sudaki Çözünürlüğü | Çözünebilir. |



Şekil 1.15 : Beta karotenin kimyasal yapısı (Url-7).

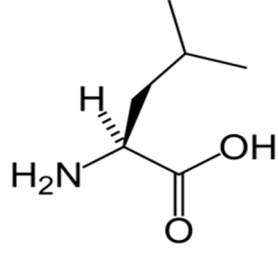
1.3.3.7 Lösin

Lösin proteinleri oluşturan ve DNA'nın kodladığı 20 aminoasitten birisidir. İzölösin ile izomerdirler. Beslenme açısından dışarıdan alınması esansiyel olan aminoasitlerdendir.

Bebeklerde ve çocuklarda optimal gelişim ve yetişkinlerde azot dengesinin kurulması için gereklidir. Tahıllarda ve baklagillerde bulunmaktadır. Kas yapımında dışarıdan alınması ile protein sentezinde görev alır. Kaslardaki amino asitlerin büyük kısmını oluşturur. Kaslarda protein sentezinde ve protein yıkımında etkindir (Url-5). Şekil 1.16 ve Çizelge 1.10' da yapısı görülmektedir.

Çizelge 1.10 : Lösinin element özellikleri (Url-5).

| | Özellikleri |
|------------------|--------------------------------|
| Kimyasal Formülü | $C_6H_{13}NO_2$ |
| Molar Kütlesi | $131,17 \text{ g mol}^{-1}$ |
| Çözünürlük | 2,36 (karboksil), 9,60 (amino) |



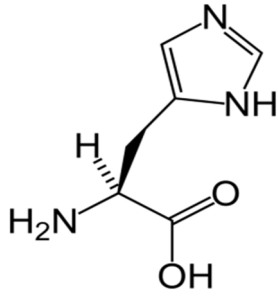
Şekil 1.16 : Lösinin kimyasal yapısı (Url-5).

1.3.3.9 Histidin

Histidin L Histidin ile D Histidin formlarında amino asitleri oluşturmaktadır. Histidinin pH değerindeki küçük değişiklikler elektrik yükünü değiştirebilmektedir (Url-5).

Çizelge 1.11 : Histidin element özellikleri (Url-5).

| | Özellikleri |
|-------------------|---|
| Kimyasal Formülü | $C_6H_9N_3O_2$ |
| Molar Kütlesi | $155,15 \text{ g mol}^{-1}$ |
| Sudaki Çözünürlük | $4,19\text{g}/100\text{g } 25 \text{ }^\circ\text{C}$ |



Şekil 1.17 : Histidin kimyasal yapısı (Url-5).

2. DENEY

2.1 Deneysel Düzenek

Hazırladığımız deney düzeneği için diyod lazer, Faraday izolatörü, lazer çizgi filtresi, Raman kenar filtreleri, spektrograf, lensler, aynalar ve ölçüm hücresinden oluşan elemanlar kullanılmıştır. Deney düzeneği 1,2 m x 2,4 m optik masa üzerine kurulmuştur.

Embriyo atık kültür sıvısı örneklerinin Raman spektrumlarının ölçümü 786 nm dalga boyundaki 100 mW güçteki *diyod lazer (TEM00)* (temel enine mod) kullanılarak yapılmıştır. Diyod lazerin önüne *Faraday izolatörü* yerleştirilmiştir. Faraday izolatörü kullanılarak, lazer kaynağından çıkarak optik elemanlara çarpıp geri dönen istenmeyen ışınların lazere geri dönmeleri engellenebilmektedir. Bu şekilde lazerin ölçümler boyunca mod atlaması ve her bir pike karşılık gelen dalga sayısı yerinde kaymalar oluşması önlenmektedir.

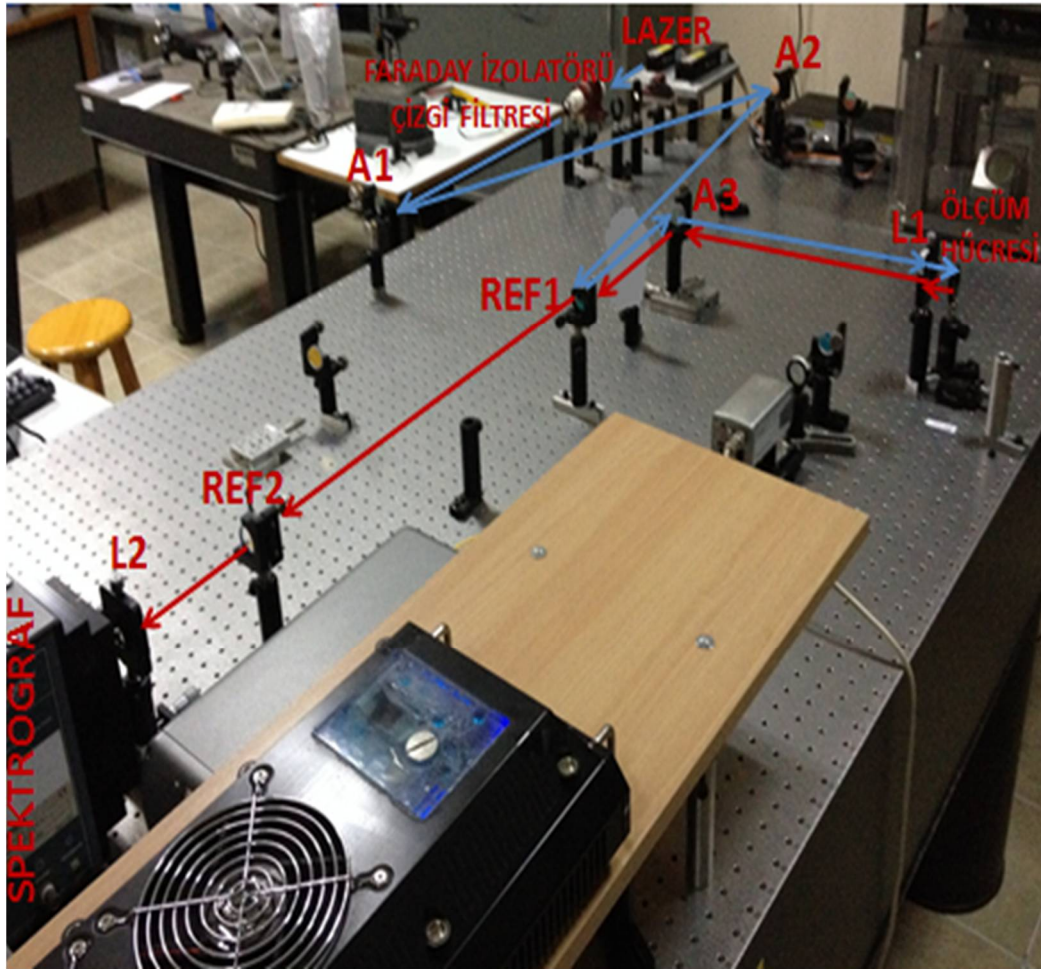
Lazer çizgi filtresi, lazer ışını, çizgi filtresinden geçirek spektral yan bantlarını ve zayıf floresans emisyonunu 10^{-6} mertebesinde filtrelemektedir. Lazer çizgi filtresinin açısı çok küçük açılarda değiştirilmiştir ve lazerin filtreden geçiş gücü maksimuma getirilmiştir.

Optik masaya paralele yakın uzanan lazer ışınının optik masaya olan yüksekliği 12,35 cm'dir. Lazer ışını %99 yansıtılmalı ve dielektrik kaplamalı aynalar A_1 , A_2 ve A_3 ile taşınmaktadır. Birinci lens L_1 ile lazer ışını odaklanarak yüksekliği spektrografın giriş yüksekliği olan 12,75 cm' ye yükseltilmiş ve paralellik sağlanmıştır.

Raman Kenar Filtreleri (REF_1 ve REF_2) saçılan ışıklardan belirli dalga boyunun altındaki ışınları filtrelemektedirler. Lazerden çıkan monokromatik ışınlar örnek üzerine düşürüldükten sonra geri dönüş yolunda her dalga boyunda saçılırlar. Dönüş yolunda A_3 aynasından gelen farklı dalga boylarına sahip ışınlar, birinci Raman kenar filtresi REF_1 ile Rayleigh ışınlarından %99 oranında arındırılmaktadırlar. REF_1 ile özdeş ve geçirgenliği 10^{-6} ' dan küçük olan ikinci Raman kenar filtresi

REF_2 , filtrelenerek gelen ışınları tekrar filtrelemektedir. REF_2 , filtrelenmiş ışınlardan 786 nm' den küçük dalga boyundakileri yaklaşık %99 oranında tekrar filtreleyerek 790 nm' den daha uzun dalga boyundaki ışınları yaklaşık %98 oranında geçirmektedir. Şekil 2.1' de deney düzeneği görülmektedir.

Kullandığımız spektrograf -90 C°' ye kadar soğutma kapasitesindeki CCD(*Charge Coupled Devices*)' ye sahiptir. Ölçümlerimiz -60 C° de alınmıştır. CCD' nin özelliklerinden dolayı 200-1900 cm^{-1} bölgesi için Raman spektrumları ölçülebilmektedir. CCD kamera spektal eksen boyunca 1024 pikselden oluşmaktadır. Spektrografın odak uzaklığı 0,303 m' dir. 600, 1200, 1800 çizgi/mm olmak üzere üç farklı kırınım ağıyla çalışabilmektedir. Spektrograf içerisinde toroid aynalardan kurulu bir sistem ve grating denilen ışığı dalga boylarına göre ayırıştıran bir sistem bulunmaktadır. Dalga boylarına göre ayırışan ışınlar CCD üzerine düşürülmektedir. Daha sonra datalar Andor iDus software işletim sistemiyle bilgisayar sistemine aktarılmaktadır.



Şekil 2.1 : Raman deney düzeneğinde ışığın ölçüm sırasında izlediği yol.

2.2 Deneyin Yapılışı

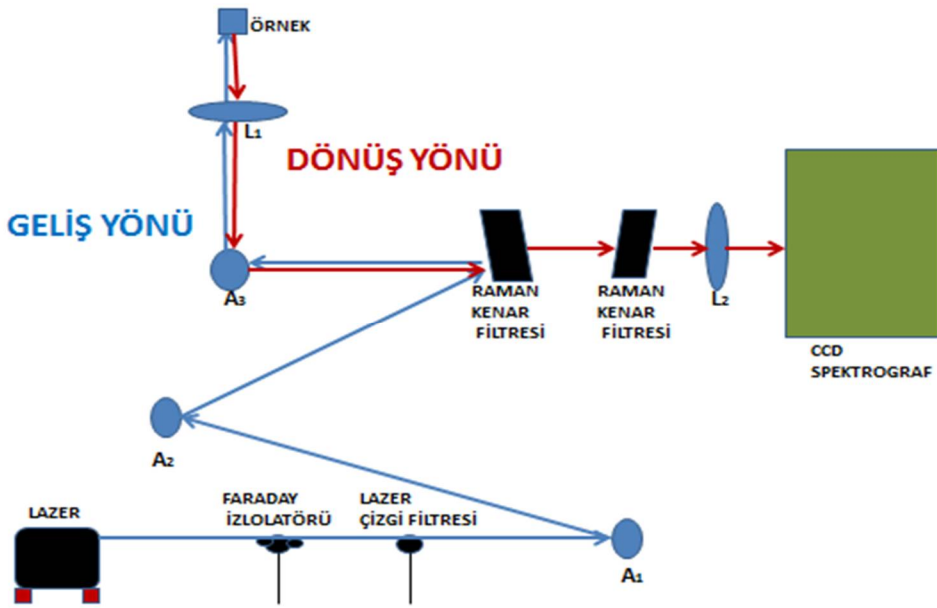
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden aldığımız embriyo atık kültür sıvısının Raman ölçümleri alınmıştır. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ile İstanbul Teknik Üniversitesi'nin beraber yürüttükleri Bilimsel Araştırma Projesi'nin (BAP) amacı, embriyo atık sıvısı örneklerinin Raman spektrumlarındaki farklılıkların belirlenmesiyle embriyo maturasyonu, gebelik ve canlı doğum oranlarının belirlenmesidir. Yaptığımız tez çalışması, projenin bir basamağını oluşturmaktadır. Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında yapılmak istenen embriyo etrafındaki kültür ortamından transfere hazırlık için güvenle ayrılan atık kültür ortamının incelenmesidir. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Kliniği'nde kriyoviyallere konularak tek tek etiketlenen atık kültür sıvısı anında dondurularak -80 C° de sıvı nitrojen içerisinde saklanmıştır. Embriyo atık kültür sıvısı Tüp Bebek Kliniği'nden alınarak sıvı azot içerisinde İstanbul Teknik Üniversitesi Lazer Spektroskopi Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Ölçüm anına kadar sıvı azot içerisinde saklanmıştır.

Ölçüm öncesi, sıvı azottan çıkarılan örnekler önce buzdolabında bir süre tutulmuş daha sonra da oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir(25 ± 1 C°). Ölçülecek kültür ortamı ölçüm hücresine konulmuştur. Ölçüm için bize verilen embriyo atık kültür sıvısı yaklaşık 25 - 30 µ lt miktarındadır. Raman ölçümleri 786 nm dalga boyuna sahip diyod lazer kullanılarak toluen, su ve örnek ölçümleri olmak üzere ardışık olarak 10'ar dakikalık sürelerle alınmıştır. Embriyo atık kültür sıvısı örneklerinden 10 dakika boyunca 30'ar saniye süren ardışık 20 ölçüm alınmıştır. Buna bir kinetik ölçüm denilmektedir. Toluene spektrumları ise 0,2 saniye süreyle birer kez ölçülmektedirler. Toluene kolay uçabilen bir kimyasaldır ve şiddetli Raman pikleri vermektedir. Bu yüzden ölçümlerinin de 0,2 saniye süreyle alınması yeterli olmaktadır.

Toluene spektrumlarını ölçme nedenimiz dalga sayısı kalibrasyonu yapmak ve lazerin dalga boyunda zaman içinde oda sıcaklığı ve optik elemanların sıcaklıklarının değişiminden kaynaklanabilecek bir kayma olup olmadığını kontrol edebilmektir. Su spektrumunun ve ölçüm diski üzerine yapıştırılan cam kuvarların spektruma katkısını ortadan kaldırmak için saf su spektrumları ölçülerek embriyo atık kültür sıvısı spektrumlarından çıkarılmışlardır.

Ölçümler sonrasında ölçüm kuvveti, örnekler arası kontaminasyonun önlenmesi için aseton, alkol ve saf suyla temizlenmiştir. Toluen ölçtüğümüz diske temizleme işlemi uygulanmamaktadır. Embriyo atık sıvısı bileşenlerinin tahmini olarak belirlenmesi ve istatistiksel yöntemlerin ayırt etmedeki başarısı incelenmiştir.

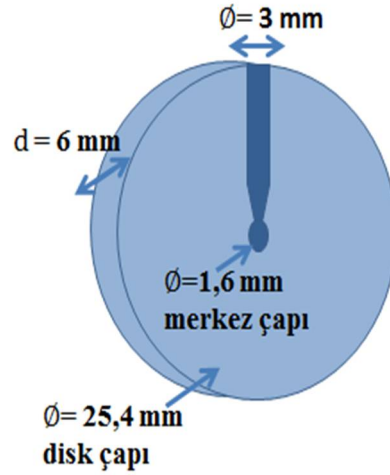
Deney düzeneği, Şekil 2.2' de şemasal olarak gösterilmektedir. Lazer kaynağından çıkan 786 nm dalga boyundaki ışın demeti *Faraday İzolatörü* ve *Lazer Çizgi Filtresinden* geçerek birinci ve ikinci aynaya (A_1 ve A_2) yansıtılmaktadır. Faraday izolatörü lazer ışınının geliş ve dönüş yolunda optik elemanlardan saçılan ışınların lazere geri dönmesini ve lazere mod atlatmasını önlemek için kullanılmaktadır. Lazer çizgi filtresi ise lazere çıkan ışının spektral yan bantlarını ve zayıf floresans emisyonunu filtrelemektedir. Aynalardan yansıtılan ışınlar birinci *Raman Kenar Filtresinden* ($REF 1$) üçüncü aynaya (A_3) geçerek, 45 mm odak uzaklığına sahip lensle odaklanmaktadır (L_1). Odaklanan ışınlar örnek üzerine düşürülmektedirler. Dönüş yolunda örnek üzerinden saçılan ışınlar lensle (L_1) odaklanarak üçüncü ayna üzerinden (A_3), birinci ve ikinci Raman Kenar Filtresine ($REF 1$ ve $REF 2$) geçmektedir. Raman kenar filtreleri ışığın dönüş yolunda, örnek üzerinden her dalga boyunda saçılan ışınları belli mertebelerde filtrelemektedirler. Daha sonra 45 mm odak uzaklığına sahip ikinci bir lensten (L_2) geçen ışınlar spektrograf içerisine gönderilmektedirler.



Şekil 2.2 : Raman deney düzeneğinde ışığın ölçüm sırasında izlediği yolun şematik grafiği.

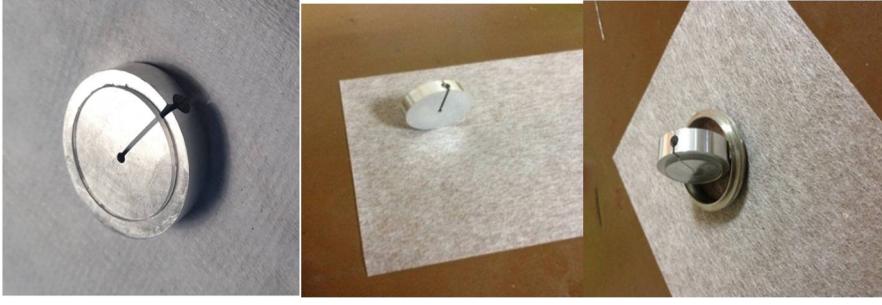
Ölçüm hücresi mekanizması olarak Şekil 2.3' te görüldüğü gibi, bize verilmiş olan embriyo atık sıvısı miktarına en uygun boyutlarda hazırlanmış olan ölçüm diskleri kullanılmıştır. Bize gönderilmiş olan embriyo atık sıvısı miktarı yaklaşık 25 μ lt olduğu için ölçüm hücresine yerleştirme sırasında çeşitli zorluklarla karşılaşmıştır. Yerleştirme sırasında ölçüm sıvısı bazen ölçüm hücresinin çeperine bulaşarak ölçülecek sıvı miktarını azaltabilmektedir. Bazen de ölçüm sıvısı ölçüm hücresine bırakılırken baloncuk oluşabilmektedir.

Ölçümler esnasında bu gibi zorluklar yaşanmıştır ve bazı ölçümler işleme alınmamıştır. Disklerin giriş kısmında 3mm çapında bir delik bulunmaktadır. Ortasında ise lazer ışığının odaklanacağı 1,6 mm çapında bir delik bulunmaktadır. Alt kısmı daralan silindir bir boruya benzemektedir. Örnekleri alırken kullandığımız mikro pipetlere uygun yapıda modellenmiş bir şekli vardır. Ölçülen embriyo atık sıvısı miktarı yaklaşık olarak 25-30 μ lt' dir. Toluene spektrumlarının ölçümleri için ayrı bir disk kullanılmıştır. Toluene için kullanılan disk üzerine kuvars camlar asetonla çözülmeyen dayanıklı bir yapıştırıcı ile yapıştırılmıştır.



Şekil 2.3 : Ölçüm hücresi olarak kullanılan diskin şematik gösterimi.

Şekil 2.4' te ölçüm disklerinin yapısı ve boyutları gösterilmektedir. Hazırlanan ölçüm disklerinin ortasındaki deliğin iki tarafına kuvars camlar entellan ile yapıştırılıp sabitlenmiştir. Toluene ölçümleri için hazırlanan diskin ortasındaki delik çözünmeyen bir yapıştırıcı olan epoksi kullanılarak iki kuvars cam ile yapıştırılmıştır.



Şekil 2.4 : Disk konstrüksiyonu.

Embriyo atık kültür sıvısı örneklerine model oluşturması için aynı ölçüm diskleriyle ölçülen histidin ve bovin serum albümin karışımının 3 farklı konsantrasyondaki çözeltilerinin her ölçüm için kullanılan miktarı yaklaşık 50 μ lt'dir. Histidin ve bovin serum albümin sıvı çözeltilerinin %50, %10 ve %2 konsantrasyondaki karışımlarının Raman spektrumları ölçülmüştür. Ölçümlere embriyo atık kültür sıvısı ölçümleriyle aynı ön işlemler uygulanmıştır. 32 miligram histidinin 2 mililitre filtrelenmiş saf su ile karıştırılmasıyla ve 80 miligram bovin serum albüminin 2 mililitre filtrelenmiş saf su ile karıştırılmasıyla her iki karışımın doymuş çözeltileri elde edilmiştir. Çizelge 2.1' de histidin ve bovin serum albümin doymuş çözeltilerinin konsantrasyon oranlarına göre hangi miktarlarda karıştırıldıkları gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 : Histidin ve bovin serum albüminin 3 farklı konsantrasyondaki çözeltilerinin karışım miktarları.

| Konsantrasyon Oranı | Histidin Doymuş Sıvı Çözeltisi Miktarı | BSA Doymuş Sıvı Çözeltisi Miktarı |
|---------------------|--|-----------------------------------|
| %50 | 250 μ lt | 250 μ lt |
| %10 | 50 μ lt | 450 μ lt |
| %2 | 20 μ lt | 980 μ lt |

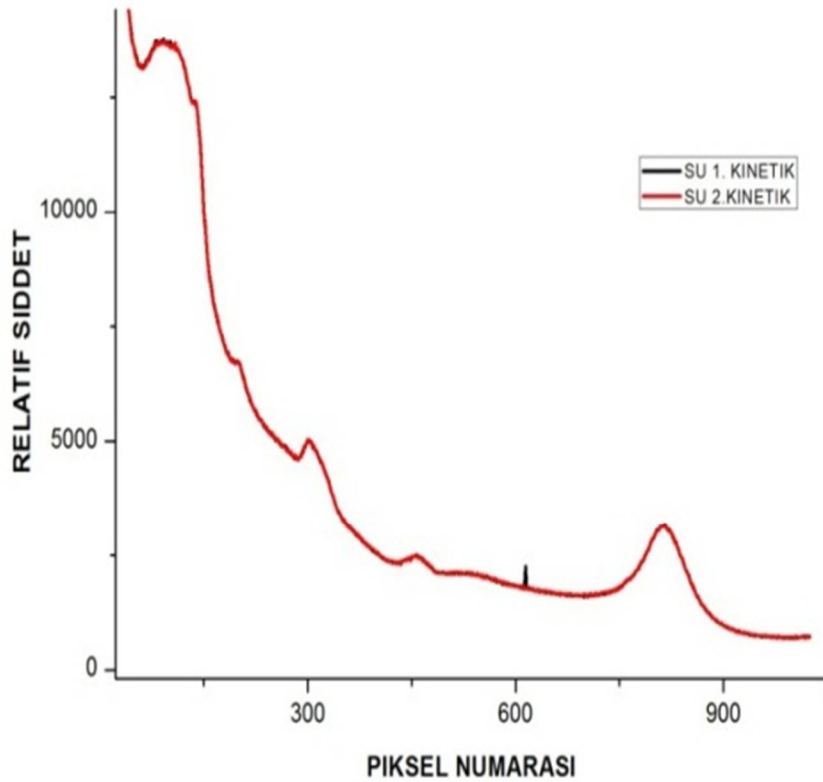
2.3 Ön işlemler

Embriyo atık kültür sıvısı, embriyo atık kültür sıvısının besi ortamı ve saf su Raman spektrumları alınmıştır. Raman ölçümleri alındıktan sonra embriyo atık kültür sıvısı spektrumlarına sırasıyla kozmik ışınların temizlenmesi, dalga sayısı kalibrasyonu, arka plan düzenlenmesi, taban çizgisi düzeltilmesi ve normalizasyon işlemleri

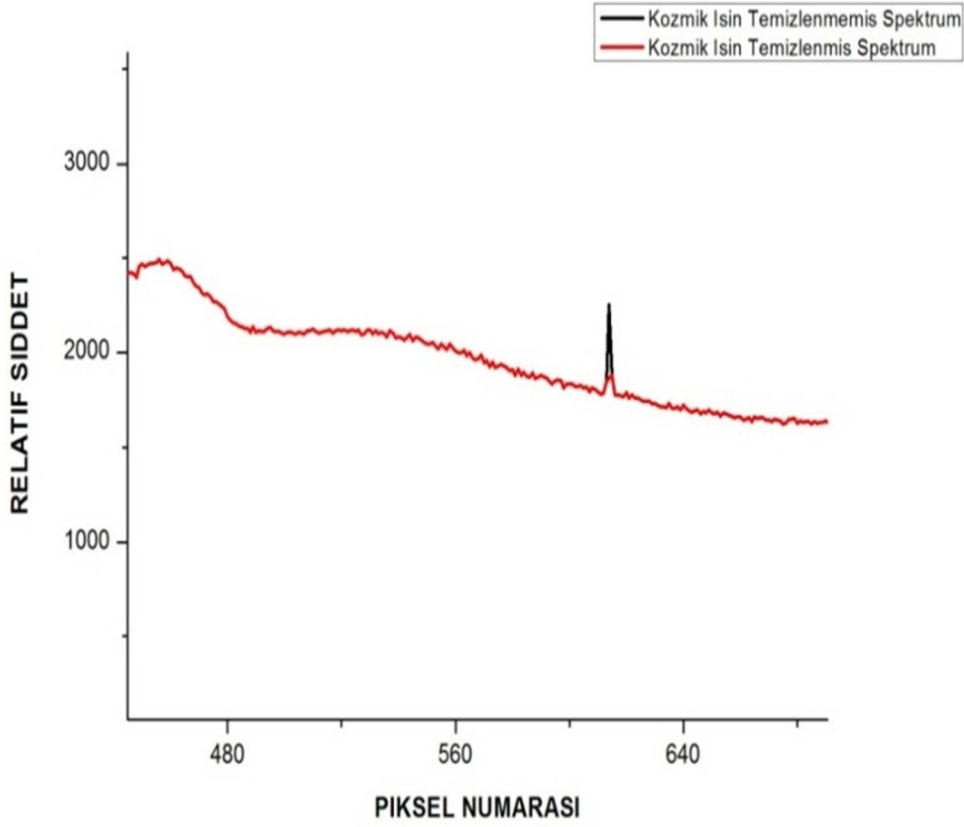
uygulanmıştır. Daha sonra embriyo atık kültür sıvısı modellemesi için ölçümlerini aldığımız histidin ve bovin serum albümin sıvı çözeltilerinin üç farklı konsantrasyonuna önışlemler uygulanmıştır.

2.3.1 Kozmik ışın temizleme

Uzaydan Dünya atmosferine giren ve genelde yeryüzüne ulaşabilen farklı atom altı parçacıklara kozmik ışınlar denir. Şekil 2.5' te kozmik ışın içeren ve içermeyen art arda alınmış iki su spektrumu gösterilmektedir. Şekil 2.6' da ise bir su spektrumunun kozmik ışın temizlenmiş ve temizlenmemiş halinin yakından gösterimi verilmektedir. Ölçümlere istemsiz katılan ve Raman spektrumlarında gözlenebilen kozmik ışınlar, uygun bir algoritmayla temizlenmiştir. Bu temizleme işlemi için ANDOR programı kullanılmıştır. Kozmik ışınları temizlemek için, istenmeyen ışın bandının en düşük değerdeki iki ucunun ortalaması alınmaktadır. Işın bandının en yüksek değeri, bulunan ortalama değer ile değiştirilmektedir. Bu işlem sonrasında daha temiz bir ölçüm edilmektedir ve yapılacak olan istatistiksel analizlere etki edebilecek istenmeyen ışın spektrumları önlenmektedir.



Şekil 2.5: Kozmik Işın İçeren ve İçermeyen Art Arda Alınmış İki Su Spektrumu.



Şekil 2.6: Kozmik ışın temizlenmiş ve temizlenmemiş su spektrumunun yakından gösterimi.

2.3.2 Kalibrasyon

Raman ölçümleri alınmış spektrumlar ‘.sif’ uzantısına sahiptirler. ANDOR programı kullanılarak ORİGIN, GRAMS AI ve MATLAB programlarında işlem yapılabilmesi için bütün spektrumların dosya uzantıları ‘.sif’ uzantısından ‘.asc’ çevrilmiştir. GRAMS AI programıyla her örnekten sonra piksel numarası olarak aldığımız toluen spektrumlarının bant merkezleri bulunmuştur. MATLAB kullanılarak oluşturulan kalibrasyon kodunun içerisine bulunan bant merkezleri konulmuştur.

Embriyo atık kültür sıvısı ve su spektrumlarından sonra lazerin her örnek ölçümü sonrasında aynı modda çalıştığından emin olmak ve mod atlamış ise bunu fark edebilmek için toluen spektrumları alınmıştır. Lazer mod atladıysa embriyo ve toluen spektrumlarının her ikisi de lazer aynı modda çalışırken alındığı için zamanlama olarak birbirleri ile uygun olacak şekilde kalibre edilmektedirler.

Ölçülmüş toluen spektrumları için, referans bant değerleri Çizelge 2.2’ de görüldüğü gibi K. Nakamoto’ nun toluen bantlarından alınmıştır. Bant merkezleri belirlenirken, bu referans değerlerine bakılarak en belirgin piklerin yaklaşık yerleri belirlenmiştir. MATLAB programı kullanılarak önce toluen spektrumlarına kalibrasyon işlemi uygulanmıştır.

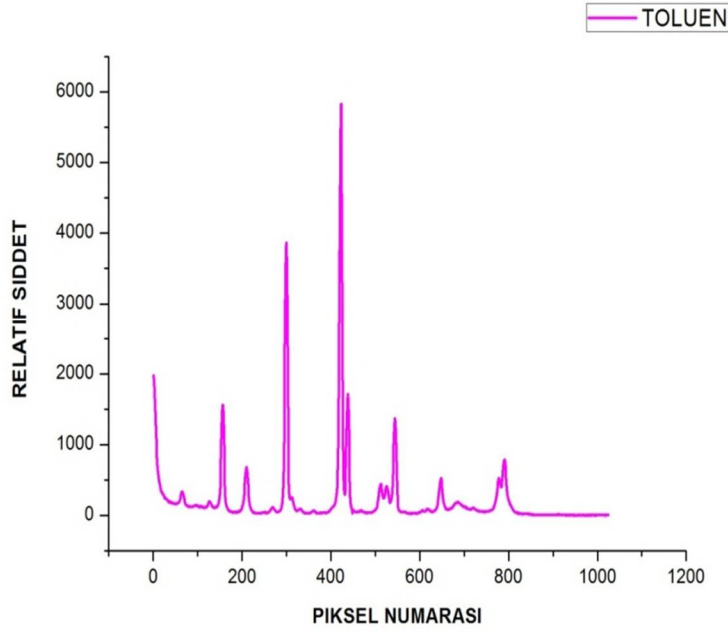
Daha sonra her bir örnek spektrumu toluen spektrumları ile kalibre edilmiştir. Toluene ve örnek spektrumlarının dalga sayısı kalibrasyonu sonrasında Raman kayması biriminde (cm^{-1}) spektrumlar elde edilmiştir.

MATLAB programı kullanılarak kalibrasyon işlemi için yazılan kodun içerisine her bir toluen bandına karşılık gelen Raman kayması değerleri yazılmıştır. Toluene spektrumlarının bant merkezi değerleri x eksenini olarak, bunlara karşılık referans bantları y eksenini olarak kullanılmıştır. Kalibrasyon işlemi bu şekilde tamamlanmaktadır.

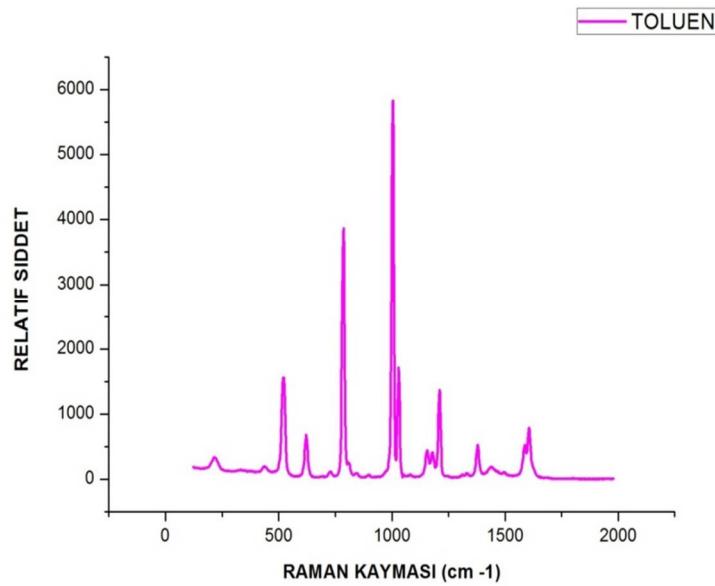
Çizelge 2.2 : Toluenin referans bant değerleri ($\pm 1 cm^{-1}$) [1].

| RAMAN KAYMASI (cm^{-1}) |
|--------------------------------|
| 218.1 |
| 521.1 |
| 621.1 |
| 785.3 |
| 1003.6 |
| 1029.8 |
| 1210.5 |
| 1379 |
| 1605 |

Şekil 2.7 ve Şekil 2.8’ de kalibrasyon işlemi uygulanmış örneğin ortalaması alınmış Raman spektrumu verilmektedir. Spektrumundaki gürültüyü azaltmak amacıyla alınan 20 kinetik ölçüme ortalama alma işlemi yapılmıştır. Kalibrasyon sonucunda y eksenini yine şiddet değerini gösterirken, x eksenini piksel numarasından Raman kaymasına çevrilmiştir. Bu işlem matematiksel olarak 3. Dereceden bir polinomun katsayılarını bularak bu katsayıları x değeriyle çarpma işlemi yapılmıştır.



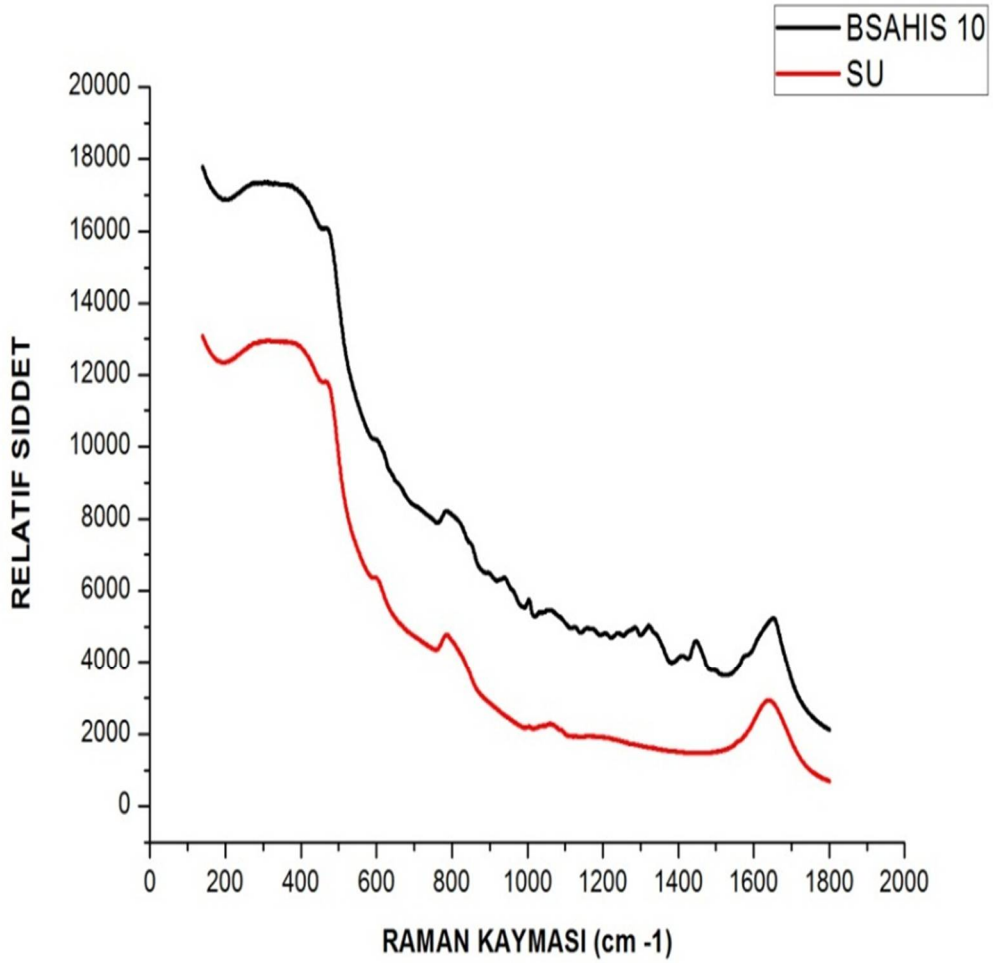
Şekil 2.7 : Toluenin Kalibrasyon İşlemi Uygulanmadan Önceki Raman Spektrumları.



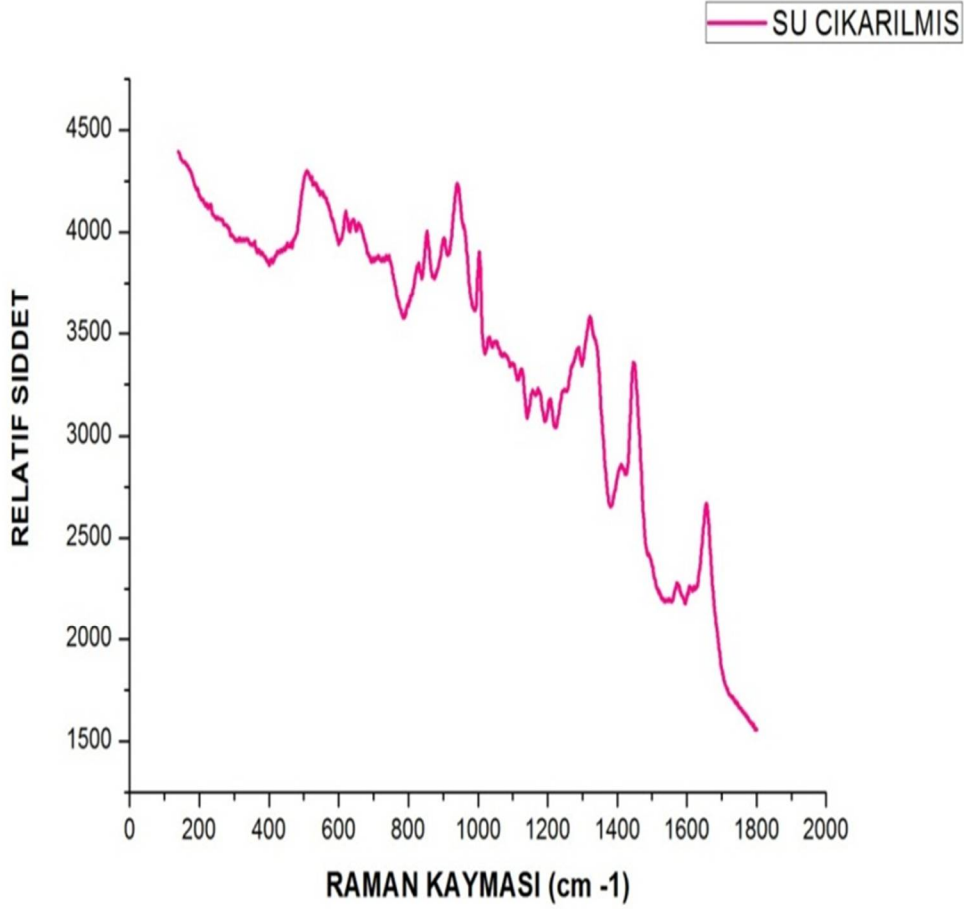
Şekil 2.8 : Toluenin kalibrasyon uygulandıktan sonraki Raman spektrumları.

2.3.3. Arka plan düzeltme

Arka plan düzenlenmesi için su ölçümleri kullanılmıştır. Ölçtüğümüz sıvı örneklerinin içerisinde bir miktar su spektrumu da bulunduğu için alınan ölçüm spektrumları, arkasından alınan su spektrumlarından çıkarılarak örneklerin içeriğindeki bileşenler daha görülebilir hale getirilmektedir. Optik düzenekten gelen saçılmalar ve su spektrumlarından gelen katkıları yok etmek için arka plan düzeltmeye ihtiyaç duyulmuştur. Her örnek spektrumundan saf suyun ortalamasının spektrumunu çıkartılmıştır. Böylece çözelti içeriğindeki su spektrumları ortadan kaldırılarak bileşen spektrumları net şekilde ortaya çıkarılmıştır. Şekil 2.9’ da kalibre edilmiş ortalama bsa-histidin %10 konsantrasyondaki karışım spektrumu ve arka plan düzeltme için ölçülmüş olan su spektrumu bir arada verilmiştir. Şekil 2.10’ da bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımının su çıkarılmış spektrumu verilmektedir.



Şekil 2.9 : Kalibre edilmiş bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışım spektrumu ve arka plan düzenlemesi.

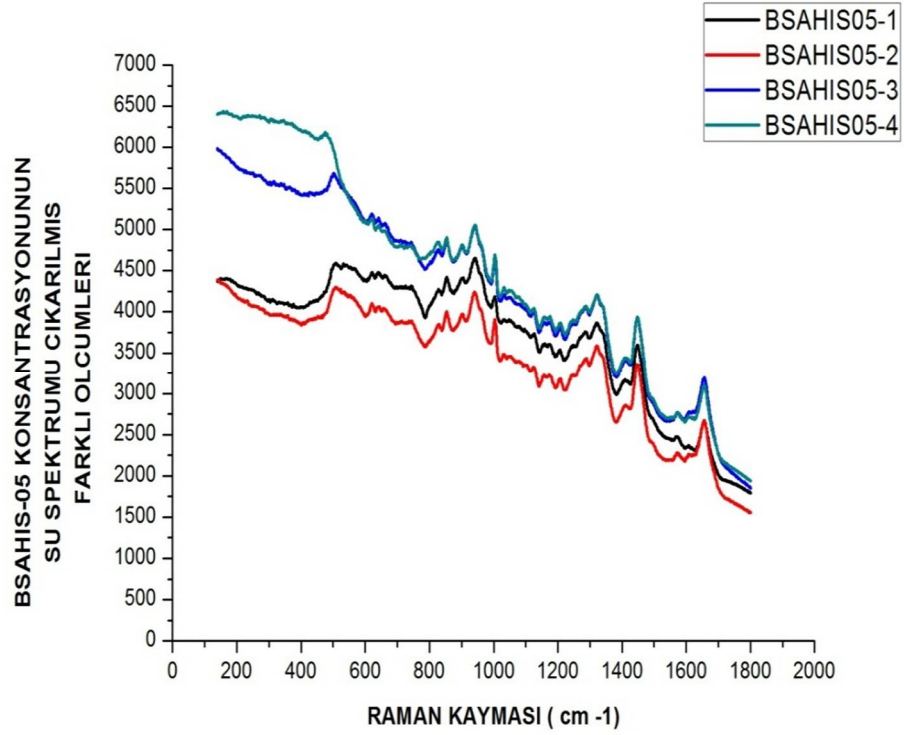


Şekil 2.10 : Arka plan düzenlemesi yapılmış bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımın Raman spektrumu.

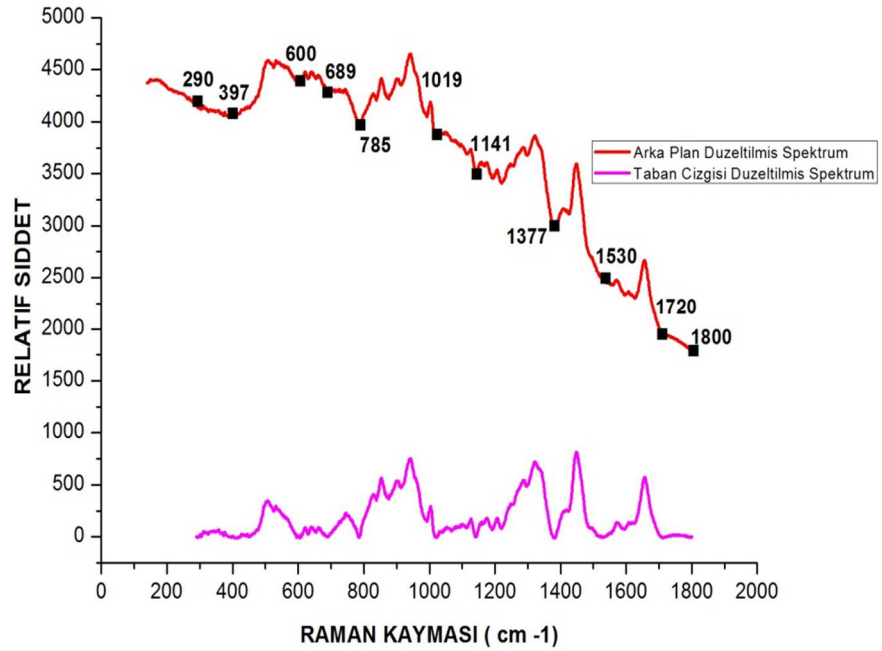
2.3.4. Taban çizgisi düzeltme

Kalibrasyon uygulanmış ve su spektrumları çıkarılmış örnek spektrumlarında Şekil 2.11' de görüldüğü gibi floresans ve saçılmalardan kaynaklanan taban farklılıkları bulunmaktadır. Şekil 2.12' de belirlenmiş taban çizgisi merkezleri gösterilmektedir. Taban çizgisi merkezleri GRAMS AI programında Çizelge 2.3' te gösterildiği gibi belirlenmiştir.

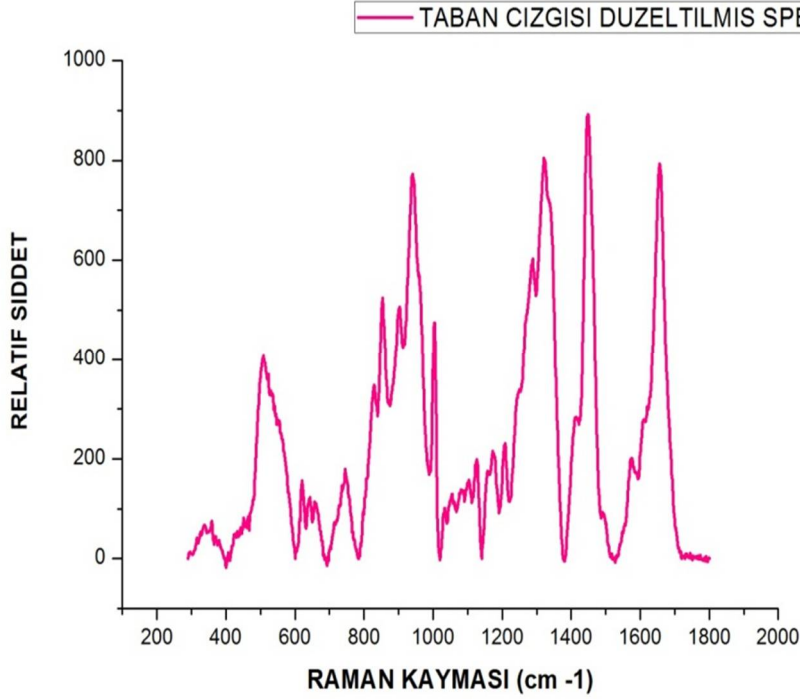
Daha sonra belirlenmiş noktalar MATLAB programında kullandığımız koda eklenerek taban düzeltme işlemi yapılmıştır. Şekil 2.13' te taban çizgisi düzeltilmiş spektrum gösterilmektedir. Taban çizgisi düzeltme işlemi, spektrumlara çok noktalı kübik bir eğri kullanarak 3. dereceden polinomial fit uygulamak demektir. Bu şekilde taban farklılıkları ortadan kaldırılmaktadır.



Şekil 2.11 : Arka plan düzenlemesi yapılmış bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımlarının farklı ölçülerinin Raman spektrumları.



Şekil 2.12: Bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımlardan birine ait taban çizgisi noktaları.



Şekil 2.13 : Taban çizgisi düzeltilmiş bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımın Raman spektrumu.

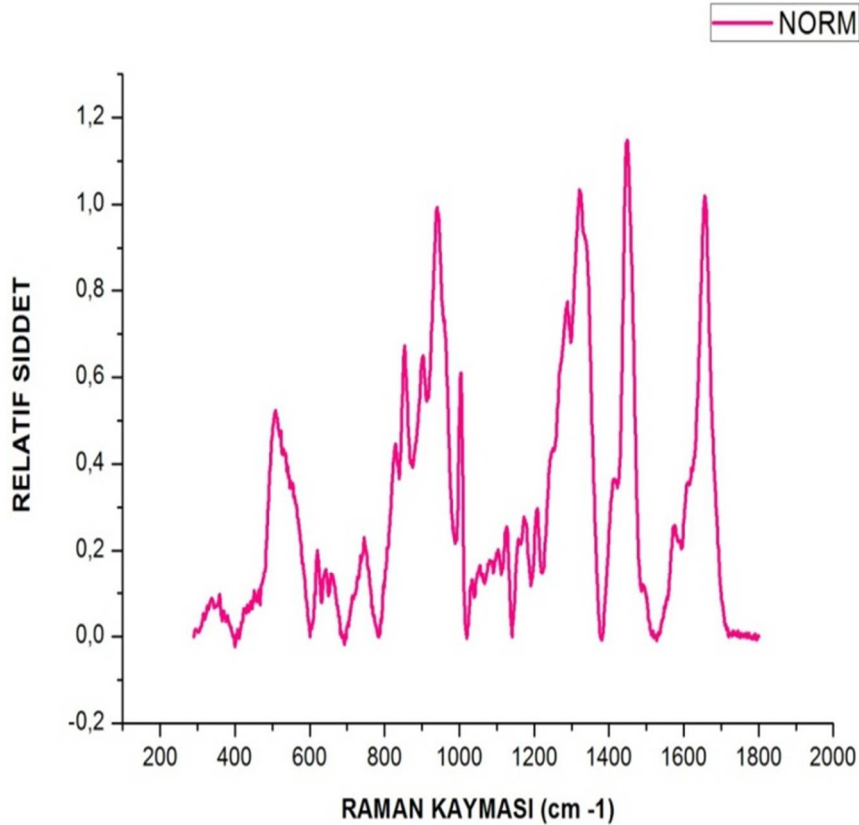
Taban çizgisi merkezleri GRAMS AI programında Çizelge 2.3' te gösterildiği gibi belirlenmiştir.

Çizelge 2.3 : Histidin ile bovin serum albümin ve histidin-bovin serum albümin çözeltilerinin 3 farklı karışımının taban çizgisi noktaları.

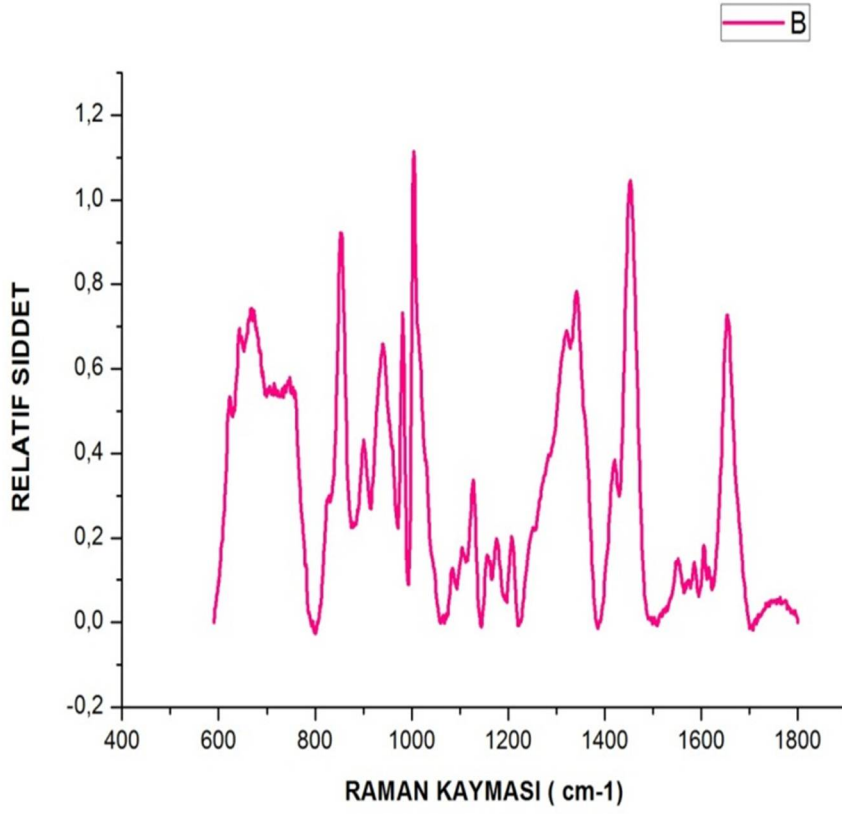
| BSA | BSAHİSTİDİN50 | BSAHİSTİDİN10 | BSAHİSTİDİN02 | HİSTİDİN |
|------|---------------|---------------|---------------|----------|
| 290 | 290 | 290 | 290 | 290 |
| 397 | 405 | 397 | 397 | 409 |
| 606 | 598 | 600 | 600 | 580 |
| 689 | 693 | 689 | 689 | 690 |
| 785 | 785 | 785 | 785 | 786 |
| 1019 | 1019 | 1019 | 1019 | 1024 |
| 1141 | 1139 | 1141 | 1141 | 1382 |
| 1377 | 1380 | 1377 | 1377 | 1530 |
| 1530 | 1530 | 1530 | 1530 | 1700 |
| 1720 | 1720 | 1720 | 1720 | 1800 |
| 1800 | 1800 | 1800 | 1800 | |

2.3.5. Normalizasyon

Taban çizgisi düzeltme işlemi yapıldıktan sonra elde ettiğimiz spektrumlara, en şiddetli Raman bandının belirlenmesiyle MATLAB programı kullanılarak şiddet normalizasyonları yapılmıştır. Şekil 2.14 ve Şekil 2.15’ te görülen spektrumlar elde edilmiştir. Embriyo atık sıvısı örnekleri için en şiddetli bant 1450 bandı olarak belirlenerek normalizasyon işlemi yapılmıştır. Histidin ve bovin serum albümin çözeltileri karışımları için, konsantrasyonu sabit tutulan bileşen olan bovin serum albümin baz alınarak, bu bileşenin en şiddetli Raman bandı ile normalizasyon yapılmıştır. Bu bant 1320 bandı olarak belirlenmiştir. Bu şekilde daha kolay ayırt edilebilir spektrumlar elde edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonucunda relatif şiddetin 1 civarında olması beklenirken şekillerde görülen artış ve yükselişin nedeni alınan 20 ölçümün her birinde oluşan şiddet farklılıklarının alınan ortalamayı değiştirmesidir.



Şekil 2.14 : Normalize edilmiş ortalama bsa-histidin %10 konsantrasyonlu karışımın Raman spektrumu.



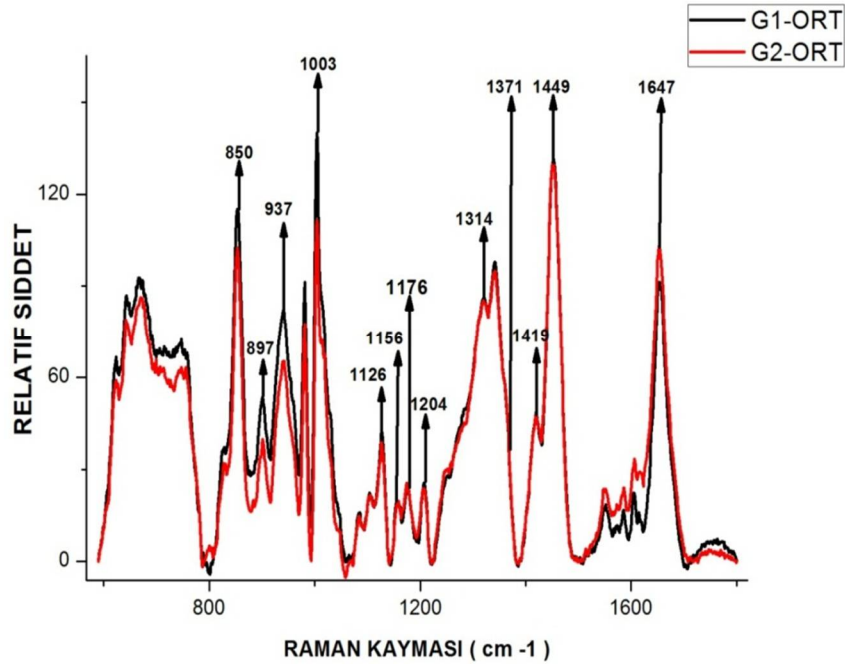
Şekil 2.15 : Normalize edilmiş ortalama embriyo atık sıvısı Grade1 örneklerinin Raman spektrumu.

3. ÖLÇÜMLER VE ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN İNCELENMESİ

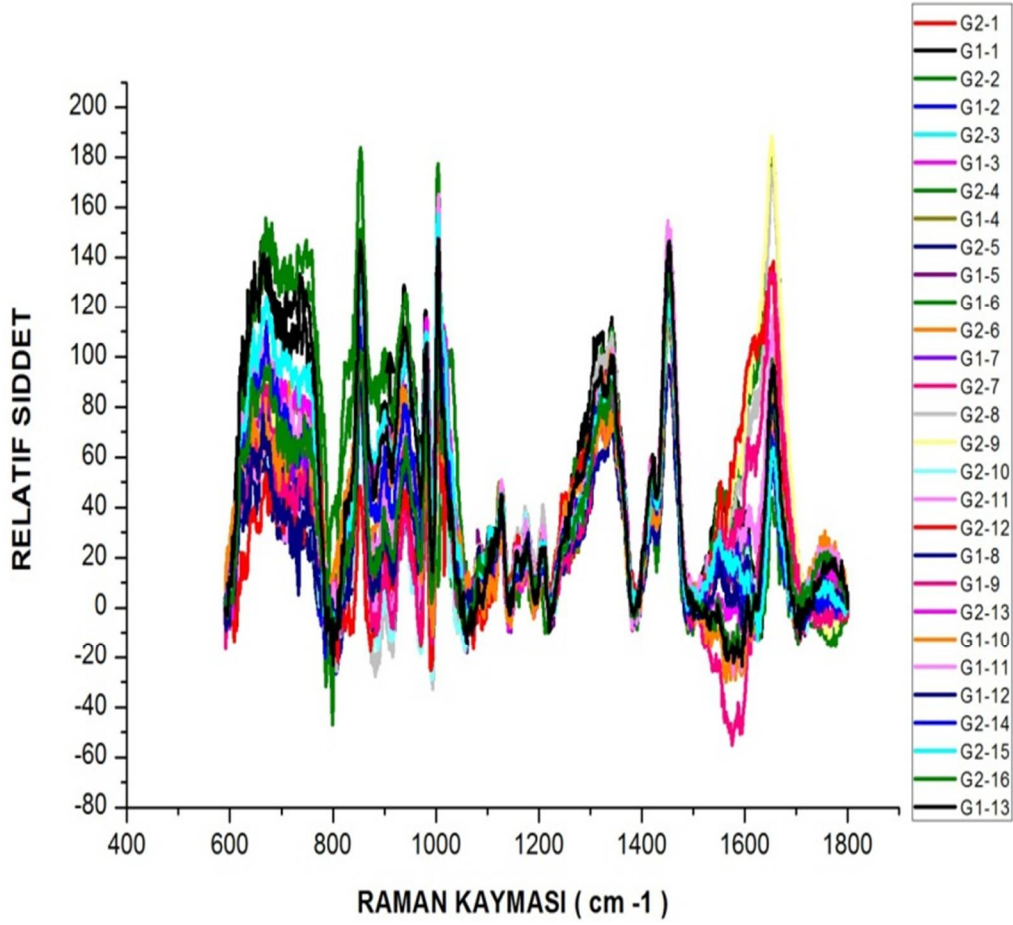
3.1. Embriyo Atık Kültür Sıvısı Ölçümleri ve Embriyo Atık Kültür Sıvısı

Ölçümlerinin Raman Bant Konumları

Raman ölçümlerine dalga boyu kalibrasyonu, arka plan temizlenmesi, taban çizgisi düzeltilmesi işlemleri uygulanmıştır. Önışlemler uygulanan ölçümlerin Raman bantları Şekil 3.1’ de görüldüğü gibi tahmini olarak belirlenmiştir. Raman bantlarının literatürde [3] bantları bulunan amino asitler ve lipitlerden hangilerini içerdiği belirlenmiştir. Raman bantlarından; 850 bandı tirozin, 897 bandı glisin glutamin, 937 bandı valin, 1003 bandı fenilalanin, 1126 bandı glikoz, 1156 bandı beta karoten, 1176 lösin, 1204 bandı fenilalanin, 1271 bandı fosfolipid, 1314 bandı histidin, 1341 bandı fosfolipid, 1419 ve 1449 bandı bazı amino asitler ve lipitler, 1647 bandı amit 1 bandıdır. Şekil 3.2’ de embriyo atık kültür sıvısının taban çizgisi düzeltilmiş spektrumları verilmektedir.



Şekil 3.1 : Embriyo atık kültür sıvısının taban çizgisi düzeltilmiş spektrumlarının bant ataması.



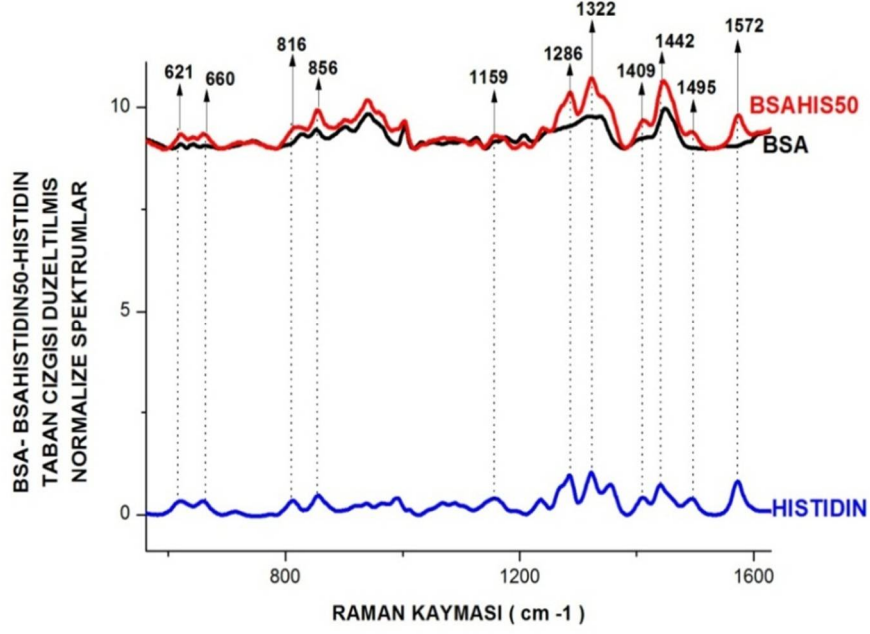
Şekil 3.2 : Embriyo atık kültür sıvısının taban çizgisi düzeltilmiş spektrumları.

3.2. Histidin ve Bovin Serum Albümin Sıvı Çözeltileri Karışımlarının Farklı

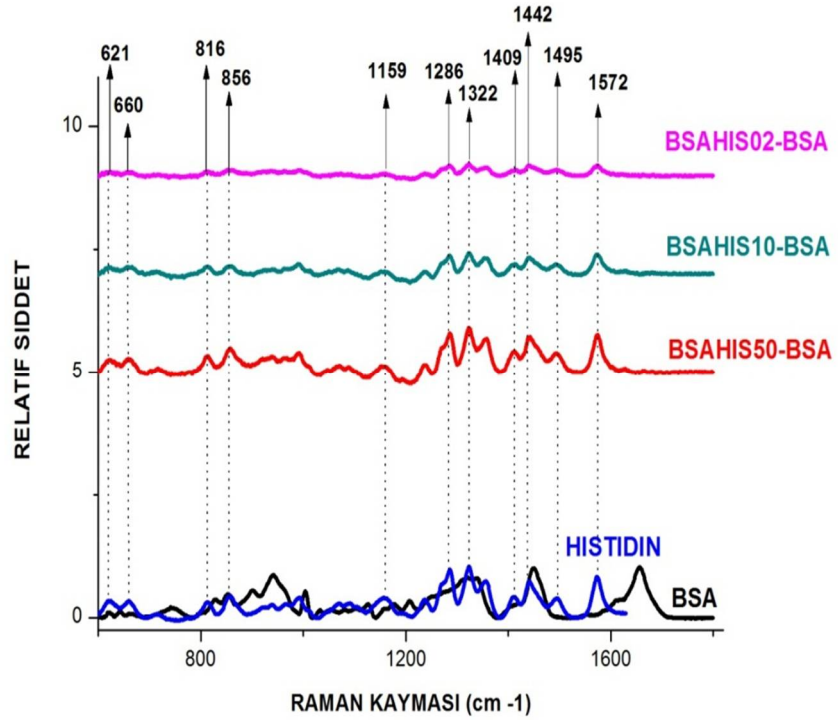
Konsantrasyonlarının Ölçümleri

Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerine bir model oluşturmak amacıyla içeriğini bildiğimiz bir amino asite sahip sıvı çözelti karışımları hazırlanmıştır. Histidin ve bovin serum albümin sıvı çözeltisi karışımının farklı konsantrasyonlarda ölçümleri alınmıştır.

Hazırlanan model ölçüm embriyo atık kültür sıvısı örneklerinin ölçülürken kullanıldığı aynı yöntemle ölçülmüştür. En yüksek oranda bulunduğu %50 histidin konsantrasyonuna sahip karışımdan Şekil 3.3' te görüldüğü gibi histidin bantları belirlenmiştir. Şekil 3.4' te %50, %10 ve %2 konsantrasyonlu çözeltilerdeki histidin konsantrasyonunda gözlenen değişimin grafiği verilmektedir.



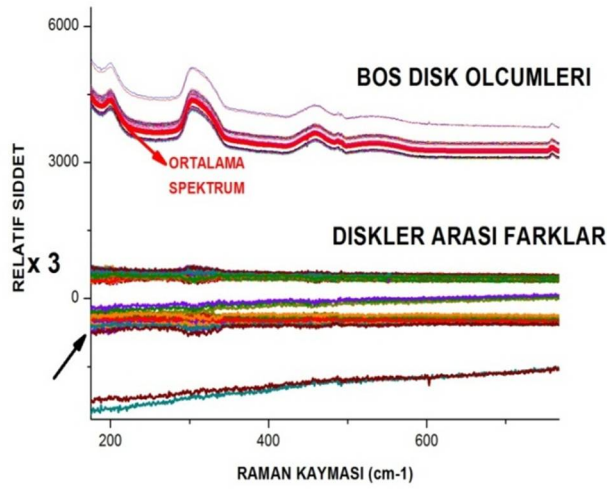
Şekil 3.3 : Bovin serum albümin-histidin karışımları %50 konsantrasyonlu çözeltisinin taban çizgisi düzeltilmiş ortalama spektrumu içerisindeki histidin Raman bantları.



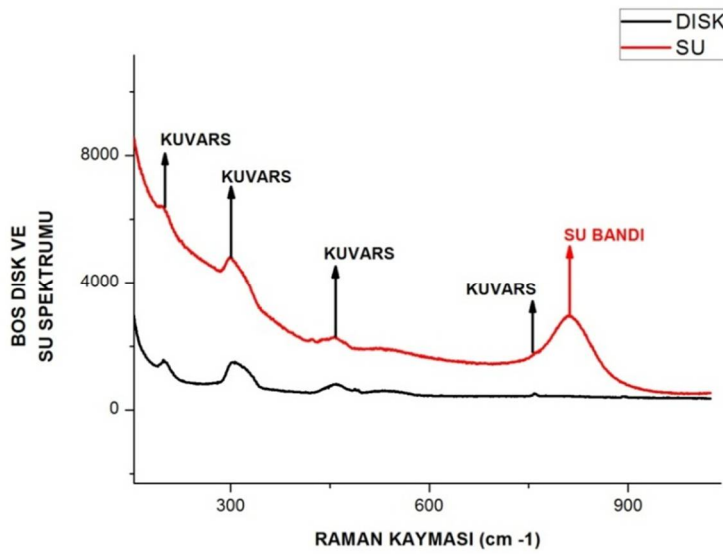
Şekil 3.4 : Bovin serum albümin-histidin karışımlarının %50, %10 ve %2 konsantrasyonlu çözeltilerinde histidinin konsantrasyonunda gözlenen değişim.

3.3. Arka Plan Ölçümleri

Farklı disklerle ölçüm yapmanın etkisini test etmek için disklerin her birinin boş spektrumları alınarak farklılık gözlenme ihtimali incelenmiştir. Boş disk ölçümleri alınmış ve boş diskler arası farklılıklar hesaplanmıştır. Şekil 3.5’ te boş disk ölçümleri verilmektedir. Arka plan ölçümü olarak su ölçülmüştür. Arka plan ölçümleri toplam ölçümden çıkarılarak kuvars camın Raman bantları ve su spektrumlarının etkisi ortadan kaldırılmıştır. Şekil 3.6’ da arka plan olarak ölçümler gösterilmektedir.



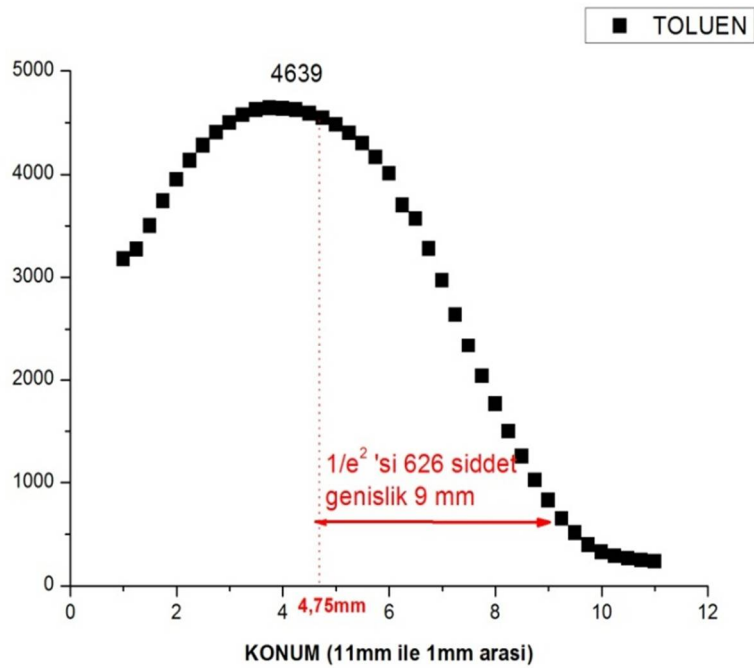
Şekil 3.5 : Boş disk ölçümleri ve boş diskler arası farklar (60 boş disk için).



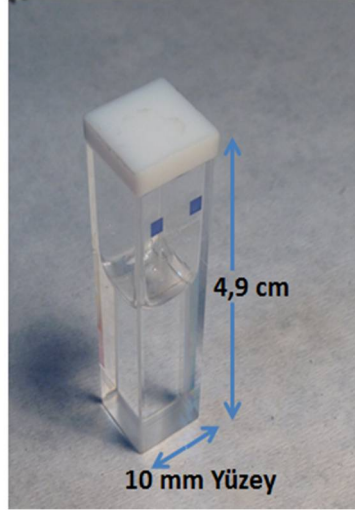
Şekil 3.6 : Arka plan ölçümü olarak alınan su spektrumunda gözlenen su ve kuvars cam bantları.

3.4. Efektif Raman Uzunluğunun Belirlenmesi

Efektif Raman uzunluğunun belirlenmesi deneyi, örneğin hangi uzaklığa kadar aktif Raman hacminde bulunduğunu belirlemek için yapılmıştır. Bu şekilde, kullandığımız ölçüm hücresinin boyutlarının ölçümler için ne kadar uygun olduğu ve hangi konumda iken aktif Raman bölgesi içerisinde bulunduğumuz görülecektir. Deney için ölçüm küveti kullanılarak şiddetli pikler veren toluen ölçülmüştür. Lazerin odak noktası sabit olacak şekilde küvetin konumu 0,25 mm adımlarla değiştirilmiştir. Aktif Raman uzunluğunu bulmak için toluenin konumu 11 mm uzaklıktan başlanarak azalacak şekilde değiştirilmiştir. Toluene 1003 bandı için şiddet konum grafiği çıkarılmıştır. Şekil 3.7' deki grafik elde edilmiştir. Konuma göre en yüksek şiddete sahip 6 değer standart sapma değerinin içerisinde kalmaktadır. Maksimum şiddet bölgesi merkez konum 4 mm olmak üzere 3,25 mm ile 4,75 mm arasındadır. Maksimum şiddetin $1/e^2$ sine karşılık gelen konum 9.25 mm ve maksimum konum 4.75 mm alındığında yarı genişlik 4,5 mm olarak tam genişlik ise 9 mm olarak bulunmaktadır. Şekil 3.8' te ölçüm küveti konstrüksiyonu verilmektedir. Şekil 3.9' da ise Gauss dalga profiline sahip lazer ışınımızda spektrograf girişine ışınları hangi açıda gönderdiğimiz ve ışın çapımızın genişliği şematik olarak gösterilmiştir. Bizim ölçüm hücremiz 10 mm uzunlukta kenara sahiptir. Efektif Raman uzunluğu ise yaklaşık 9 mm bulunmaktadır.



Şekil 3.7 : Efektif Raman uzunluğunun belirlenmesi deneyi.



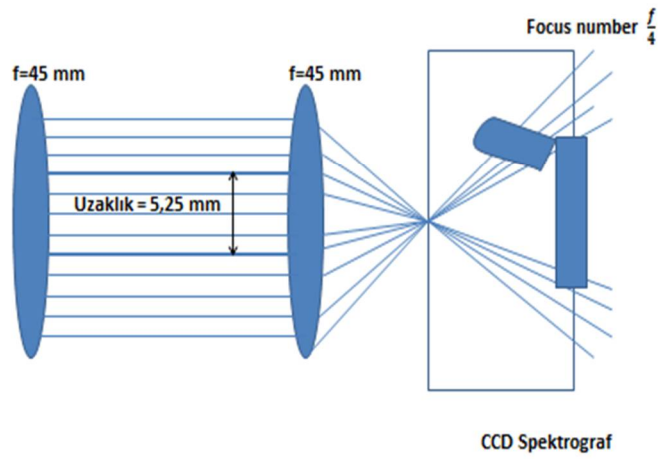
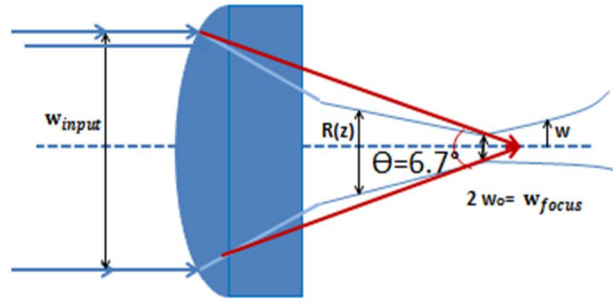
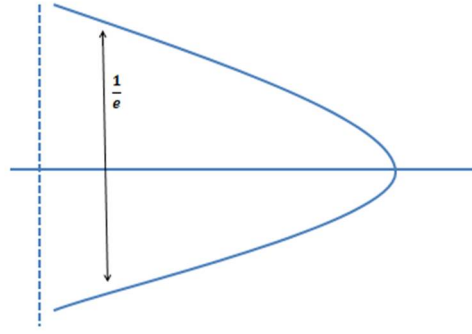
Şekil 3.8 : Ölçüm küveti konstrüksiyonu.

3.5. Raman Işın Çapının Hesaplanması

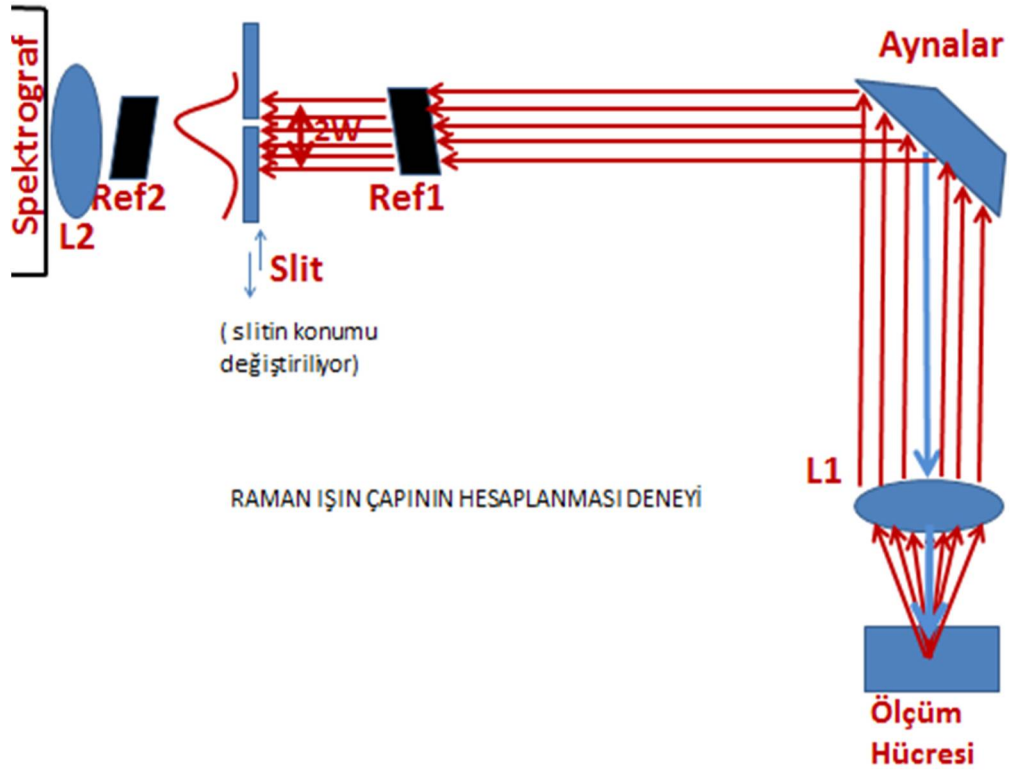
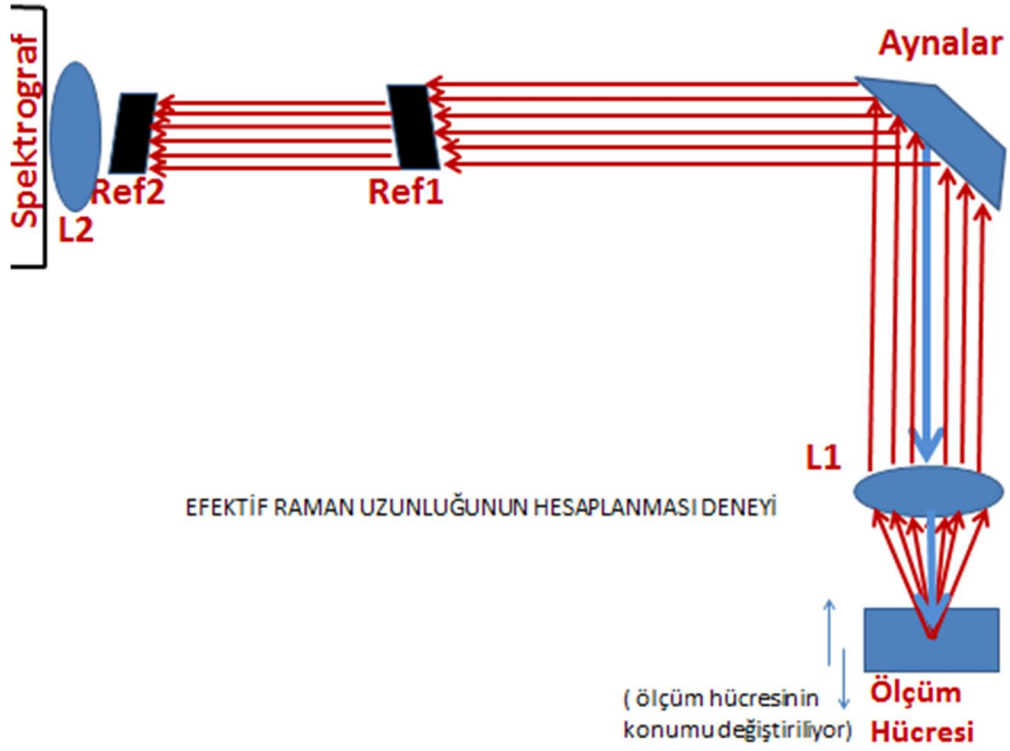
Raman ışın çapının hesaplanması için Şekil 3.10' da şematik olarak gösterilen ikinci deney düzeneği kullanılmıştır. Bu deney için de ölçüm küveti kullanılarak toluen ile ölçüm alınmıştır. Kullandığımız lenslerin odak uzaklığı 45 mm'dir. Kolime edilerek toplanan Raman saçılmaları konumu değiştirilebilir bir yarıktan geçirilmiştir. Yarığın konumu değiştirilerek toluenin Raman spektrumları alınmıştır. Toluenin 1003 cm^{-1} bandındaki şiddeti her bir konum için belirlenmiştir. Konuma göre şiddet büyüklükleri Şekil 3.11' de verilmektedir. Grafik üzerinde en şiddetli noktanın $\frac{1}{e^2}$ katı, yani %13,5 katı hesaplanmıştır. Bu şiddetteki konum aralığı Raman ışın çapını vermektedir.

Şekil 3.11' de elde ettiğimiz grafiğe göre toluen 6512' de konuma en şiddetli yerdedir. $\frac{1}{e^2}$ (%13,5 katı) 'si 880 noktasındadır. 880 noktası grafiğimizde $6 - (0,75) = 5,25$ mm noktasını göstermektedir. Raman ışın çapı 5,25 mm bulunmaktadır. Şekil 3.10' da efektif Raman uzunluğunun hesaplanması ve Raman ışın çapının hesaplanması deneyleri şema olarak gösterilmektedir.

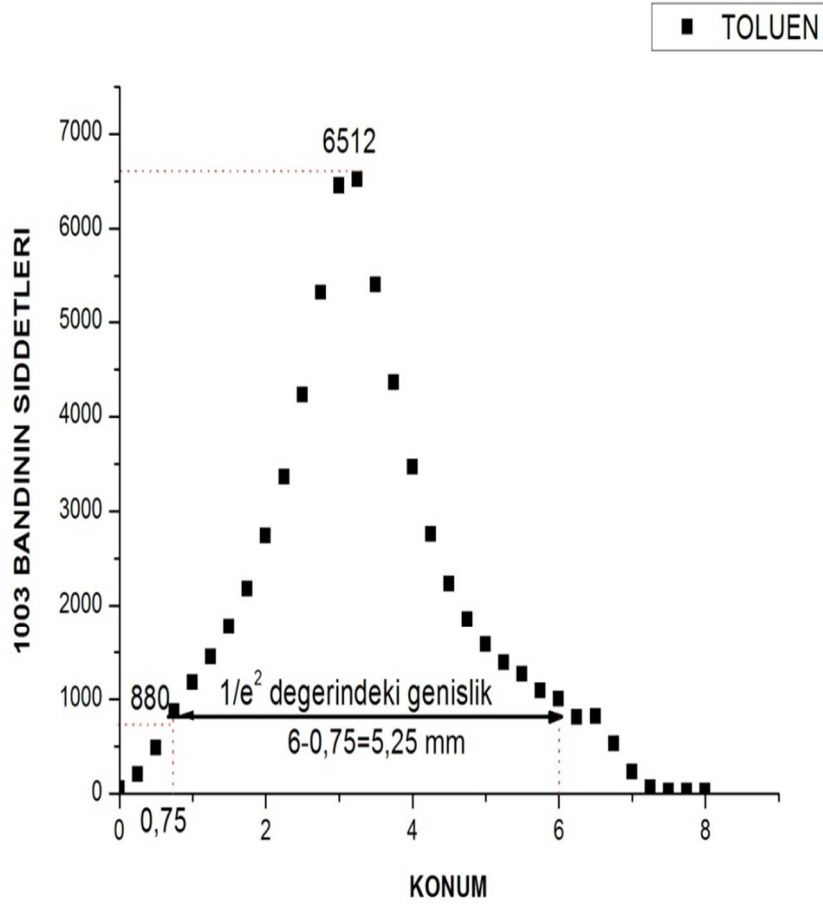
Kolime edilerek toplanmış olan Raman saçılmaları spektrografın odaklama numarasına (f number) uygun büyüklükte bir odaklama numarasına sahip olmalıdır [20]. Kullandığımız spektrografın sahip olduğu f number $\frac{f}{4}$ tür. Saçılmış ışınları spektrografın içerisine gönderdiğimiz açı ve spektrograf girişine olan uzaklık spektrografın odaklama noktası olan $\frac{f}{4}$ e uygun olmalıdır.



Şekil 3.9 : Raman ışın çapının hesaplanması deneyi [21].



Şekil 3.10 : Efektif Raman uzunluğunun hesaplanması ve Raman ışın çapının hesaplanması deneylerinin şemasal gösterimleri.



Şekil 3.11 : Toluen ölçülerek Raman ışın çapının hesaplanması deneyi.

Deney sonucu Raman ışın çapı 5,25 mm bulunmuştur. Spektrografın odak uzaklığı 303 mm' dir. Spektrograf içerisinde bulunan ayna 68x68 boyutunda grating bir aynadır.

Spektrografın odaklama numarası yani f number denilen büyüklük, odak uzaklığı ile uzunluğun oranlanmasıyla 4,45 bulunmaktadır. Bu değer manuel olarak 4 alınmaktadır. Spektrografın girişinde lensle odakladığımız Raman ışın çapını 5,25 mm bulmuştuk. Kullandığımız lensin odak uzaklığı 45 mm' dir.

Aynı bağıntıyı kullanılarak, spektrografın içerisine gönderilen ışının odaklanma numarası 8,57 bulunmaktadır. Bu değer manuel olarak 8 alınmaktadır. Spektrografın sliti üzerine düşürdüğümüz açı $6,7^\circ$ dir. $\frac{f}{4}$ sayısı ile ışınlar spektrograf içerisinde 10° açığa kadar toplanabilmektedir.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ

4.1. Temel Bileşenler Analizi: PCA (Principle Component Analysis)

Temel bileşenler analizi ile bir data grafiği daha küçük boyutlara indirgenerek data basit bir sınıflandırma yapılmaktadır. Bu yöntemle değişkenleri birbirleriyle ilişkilendirmek mümkün olmaktadır. Faktör analizinde data modelleme yaparken izleyeceğimiz yol k alt uzayında bulunan bir x konumu seçmektir. Aynı uzayda k boyutunda bir $z_{(i)}$ noktasından, $x_{(i)}$ gibi bir nokta üretilmiş olsun. ($x \in \mathbb{R}^n$ ve $k \ll n$) ($\forall z \in \mathbb{R}^k$; $z \in \mathbb{R}^k$) Bir de ölçümlerden kaynaklı gürültü oranımız olsun [22].

Faktör analizi olasılık modellemesine dayanmaktadır ve tahmini parametreler oluşturulurken EM (elektromanyetik) algoritmalar kullanılmaktadır. Temel bileşenler yöntemi, tahmini data yaklaşımları yaptığımız bir alt uzay tanımlamaktadır. Sadece öz vektör hesaplama işlemiyle MATLAB programının öz fonksiyonlarından faydalanılarak bileşenlere ayırma analizi yapılabilmektedir.

Bir örnekle açıklayacak olursak, radyo kontrollü helikopter pilotları arasında yapılan ankete göre oluşturulmuş bir data set için i pilotlarının yetenekleri $x_{(i)}^1$, uçuştan aldıkları keyif $x_{(i)}^2$ ile gösterilmiş olsun. Radyo kontrollü helikopterlerin uçuşu zor olduğu için sadece kararlı bir karaktere sahip olan pilotlar hem yetenekli hem de uçmaktan zevk alan pilotlar olabilmektedirler. Bu yüzden x_1 ile x_2 birbiriyle yakından ilişkili iki parametredir. Bu örneğe bakıldığında temel bileşenler analizinin iki grubu ayırabilmesi için öncelikle parametreler arası ilişki kurabilmeli ve parametreleri birbirleriyle ilişkilendirebilmelidir. Daha sonra ayırt etme işlemi gerçekleştirilebilmektedir [22].

Değişkenlerin ana eksenini, tahmini dataların içinde yer aldığı u birim vektörü olsun. Datalar u yönünün tam üzerinde ise bu dataların değişimi maksimumdur. Verdiğimiz örnek için datalar diyagonal bir eksen üzerindedirler ve gürültü oranları azdır. Pilotların karakterini gösteren parametre u_1 yönünü temsil etsin.

Temel bileşenler analizi ile data'lara önişlemler uygulanarak değişkenler normalize edilebilir. Önişlem adımlarını uygularken ilk olarak; $\mu = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_{(i)}$, ikinci adım olarak $x_{(i)}$ ile $x_{(i)} - \mu$ ' nin yerinin değiştirilmesi, üçüncü olarak $\sigma_{(j)}^2 = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_{(i)}$ standart sapmanın karesinin alınması, dördüncü olarak ta $x_{(i)}^j$ ile $\frac{x_{(i)}^j}{\sigma}$ ' nin yer değiştirmesi işlemleri uygulanmaktadır. Şekil 4.1' de temel bileşenler analizinin işlem adımları şematik olarak gösterilmiştir.

x' in u üzerindeki iz düşüm uzunluğu $x^T u$ çarpımı ile gösterilmektedir. Bu örnekte pilotların yetenekleri ve işlerinden aldıkları keyif olarak belirlediğimiz iki parametrenin gürültü hesaplarından, pilotların içsel karması tahmin edilebilmektedir. Bu şekilde yetenekli ve yeteneksiz pilotlar ayırt edilebilmektedirler.

Grafiklerdeki noktalar, datanın çizgi üzerindeki izdüşümlerini göstermektedir. İz düşüm data'lari büyük değişimler içerirler ve grafiklerde nokta şeklinde gösterilirler. Noktalar orijinden uzaklaşan bir eğilime sahiptirler. İzdüşümlerin gözle görülür şekilde değişimlere sahip olduklarını ve orijine daha da yaklaştıklarını grafiklere bakarak söyleyebiliriz. $x_{(i)}$ ' nin u birim vektörü üzerindeki izdüşümü; x, u ' nun orijine olan uzaklığıdır. İzdüşüm değişkenini maksimize etmek için u 'nun birim uzunluğu en büyük değerde seçilmektedir.

$\|u\|^2 = 1$ ' i maksimize etmek ise, $\sum = \frac{1}{m} x_{(i)} x_{(i)}^T$ ' nin deneysel kovaryans matrisi olan temel özvektörünü verir. u ' nun \sum ' in temel özvektörü olacak şekilde seçilmesi gerekmektedir [23].

Sonuç olarak, tahmini data yaklaşımıyla bir boyutlu bir alt uzay bulunmaktadır. Ortogonal bazdaki ikinci data seti için, u_i yeni bir form almaktadır. Yeni bir vektör oluşturursak $x_{(i)}$ ' nin baz vektörlerini matris cebriyle aşağıdaki şekilde ifade edebiliriz [23]

$$\begin{pmatrix} u_1^T x_{(i)} \\ u_2^T x_{(i)} \\ \vdots \\ u_k^T x_{(i)} \end{pmatrix} \quad (4.1)$$

Sonuç olarak temel bileşenlere ayırma yöntemi $x_{(i)}$ değerlerine k boyutsalında daha düşük bir yaklaşım vermektedir. Temel bileşenlerine ayırma yöntemiyle, boyutsal

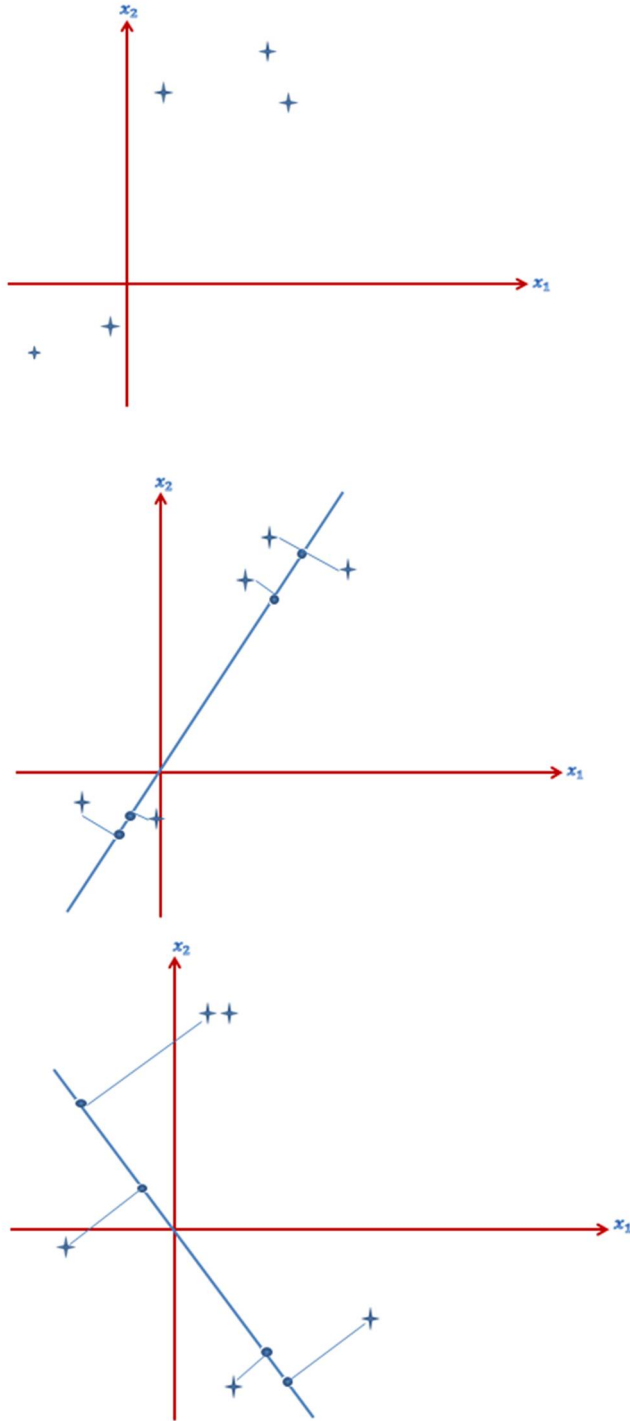
azalma sağlayan veriler elde edilebilmektedir. u_1, u_2, \dots, u_k birim vektörleri, datanın k temel bileşenleri olarak adlandırılmaktadırlar.

Verilen örnekte $k=1$ olduğu durum incelenmektedir. Diğer öz vektörlerle ilgili bilgimiz olduğu takdirde, mümkün olan bütün ortogonal bazlara ulaşabiliriz. u_1, u_2, \dots, u_k bazlarından biri seçilerek $\sum \|y_{(i)}\|^2$ mümkün olan en yüksek değere getirilebilmektedir. Bunu yapmaktaki amacımız bulacağımız temel bileşenlerin iki koordinat arasındaki sistematik ve sıra dışı değişkenlerini belirlemektir. Daha sonra i ve j yüzlerinin arasındaki mesafeyi hesaplarız. $\|y_{(i)} - y_{(j)}\|^2$, yi bularak düşürülmüş boyutlar üzerinde çalışabiliriz. Temel bileşenler analizi anket çalışmalarında, yüz tanıma çalışmalarında ve haritalarda kontrast renklerin gruplandırılmasında da kullanılmaktadır. Temel bileşenler analizinin en bilinen uygulaması en düşük boyutta $x_{(i)}$ 'leri $y_{(i)}$ 'ler ile karşılaştırmaktır. Yüksek boyuttaki dataları $k=2$ veya $k=3$ gibi düşük boyutlara çektiğimizde $y_{(i)}$ 'lerin görülebilir datalarının grafiğini de çizdirebiliriz [23].

Bir başka standart uygulama ise verilmiş olan $x_{(i)}$ değerleriyle ilgili geniş bir algoritma bilgisi gerekmeksizin data setine ön işlem uygulayarak boyutunu indirgemektir. Tahmini iz düşün datalarının gürültü oranlarını en aza indirmek için de temel bileşenler analizi uygulanabilmektedir. Ölçümlerimize uygulayacağımız kullanımında çok boyutlu dataları iki boyuta indirme işlemini kullanacağız. Art arda birbiriyle ilişkili iki istatistiksel analiz yöntemi kullanacağız.

Temel bileşenler analiziyle boyut indirgemesi yapılmış datalar artık kullanacağımız ikinci analiz yöntemi için kullanılmak üzere hazırdır. Alınan temel bileşenler analizi datalarının birinci ve ikinci eksenleri, doğrusal ayırt etme analizinin datalarını oluşturmak üzere kullanılacaktır. Temel bileşenler analizi sonucunda iki boyutlu datalar elde edeceğiz. Bu iki boyutlu dataları bir matris düzleminde düşünersek, bu dataların kendi içlerinde etkileşimleri ve birbirleriyle etkileşimleri, aralarında doğrusal bir bağın kurulmasını sağlayacaktır.

Oluşturulan matriste her bir elemanın kendisi ve birbirleriyle analizlerinden kovaryans matrisleri elde edilecektir. Kovaryans matrisine dönüştürme işlemiyle matris simetri özelliği kazandırılarak özdeğer ve özvektörlerinin daha kolay bulunması sağlanacaktır.



Şekil 4.1 : Temel bileşenler analizinin: PCA (Principle Component Analysis) işlem adımlarının şematik gösterimi.

Temel bileşenler analizinin matematiksel olarak yapmış olduğu işlem öncelikle bir matris belirleyerek bu matrisin kovaryans matrisini hesaplamaktır. Sonra kovaryans matrisin öz değerlerini ve öz vektörlerini bulmaktadır ve kovaryans matrisin ortalamasını almaktadır.

Kovaryans matrisin öz vektörleri ile kovaryans matrisin ortalamasını çarparak analiz edebilmektedir. Formüllerde M ölçüm datalarından oluşacak bir matrisi ifade etmektedir [3]. Σ oluşturulan bu matrisin kovaryans matrisini ifade etmektedir. Kovaryans matrisin elemanları olan $\delta_{11}, \delta_{12}, \delta_{21}, \delta_{22}$, M matrisi elemanları olan dataların birbirleriyle ilişkilerinden oluşan standart sapmalarını ifade eden elemanlardır. (4.2)

$$M = \begin{vmatrix} a & b \\ c & d \end{vmatrix}$$

$$\text{KOVARYANS } M = \Sigma = \begin{vmatrix} \delta_{11} & \delta_{12} \\ \delta_{21} & \delta_{22} \end{vmatrix}$$

$$\text{ORTALAMA } \Sigma = (M) - (\text{ORTALAMA } M)$$

$$\text{PCA} = (\text{ÖZVEKTÖR } \Sigma) \times (\text{ORTALAMA } \Sigma) \quad (4.2)$$

Temel bileşenler analizi yöntemi kullanılarak ölçtüğümüz embriyo atık kültür sıvısının Grade1 ve Grade2 sınıfları ayrıştırılmıştır. Embriyo atık kültür sıvısı örneklerinin Raman spektrumları $800-1150 \text{ cm}^{-1}$, $1220-1490 \text{ cm}^{-1}$ ve $1625-1700 \text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde alınarak PCA analizleri yapılmıştır. Embriyo atık kültür sıvısının tam olarak ayrışamamasının içeriğindeki bileşenlerin hangi oranların altında olduğundan kaynaklandığı hakkında bilgi sağlamak için, histidin ve bovin serum albümin karışımlarının farklı konsantrasyonları ölçülmüştür. Bu ölçümlere de temel bileşenler analizi yöntemi uygulanmıştır. Histidin ve bovin serum albümin karışımı örneklerinin Raman spektrumları $1140-1800 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde alınarak PCA analizleri yapılmıştır.

4.2. Doğrusal Ayırt Etme Analizi: LDA (Linear Discriminant Analysis)

Doğrusal ayırt etme analizi (LDA) nesnelere veya olayları iki veya daha fazla sınıfa ayıran özelliklerin doğrusal kombinasyonunu bulmak için istatistiksel veriler kullanan bir analiz yöntemidir. Elde edilen kombinasyon, nesnelere ayırt etmenin öncesinde boyut indirgemesi yapabilmek için doğrusal bir sınıflandırıcı olarak kullanılmaktadır. Doğrusal ayırt etme analizi, ölçümlerin lineer bağımlı bir değişkenini ifade ederken varyans analizi yöntemine başvuran bir analiz yöntemidir. Bununla birlikte kategorik bağımsız değişkenleri ve bağımlı sürekli değişkenleri kullanılmaktadır. Sonrasında da veri sınıfları arasındaki farkı açıkça modellemeye çalışılmaktadır.

Doğrusal ayırt etme analizi (LDA) ve temel bileşenler yöntemi (PCA) doğru veri açıklamak, değişkenlerin doğrusal kombinasyonlarına bakmak, temel bileşenleri analiz etmek ve faktör analizi yapmak ile ilgilenmektedirler. Bu analiz yöntemlerinin her ikisi de normal sırasıyla ortalama ve kovaryans parametreleri ile dağılım göstermektedir. Temel bileşenlerine ayırma yöntemi (PCA) ile faktör analizi yapılırken farklılıklardan ziyade benzerliklere dayalı özelliklerin kombinasyonları oluşturulmaktadır.

Doğrusal ayırt etme analizi ise, koşullu olasılık yoğunluk fonksiyonları olduğunu varsayarak analiz yapmaya çalışan bir yöntemdir. Her gözlem için bağımsız değişkenler üzerinde yapılan ölçümlerin miktarları sürekli olduğunda doğrusal ayırt etme analizi yöntemi daha iyi çalışmaktadır. Elimizde ne kadar fazla sayıda ölçüm varsa doğrusal ayırt etme yöntemi ile analiz etmek daha kolaylaşacaktır.

Doğrusal ayırt etme analizinin matematiksel olarak yapmış olduğu işlem öncelikle bir olasılık yoğunluğu fonksiyonu tanımlamaktır. Daha sonra bu fonksiyona logaritma alma işlemi yaparak lineer bağlı bir denklemin katsayılarını belirlemektedir [3].

Fonksiyonun logaritması, belirlenen eşik değerinden küçükse birinci sınıfa, eşit veya küçükse ikinci sınıfa ayrılmaktadır. Bir sınıfın elemanları matrisin bir sütununu, diğer sınıfın elemanları ise matrisin ikinci sütununu oluşturmak üzere kovaryans matris oluşturulmaktadır. Daha sonra bütün elemanların birbiriyle ilişkilendirildiği bir istatistiksel analiz işlemi yapmaktadır.

LDA yöntemini MATLAB programı kullanarak uygularken hazırladığımız kodda Bayesian yöntemini kullandık. Ayırmak istediğimiz iki grup olduğu için Bayesian yöntemi bizim için kullanışlı olmaktadır. Bu yöntem sonucunda iki farklı grubun datalarının birbirleriyle yüzde kaç oranında ayrıştığı görülebilmektedir.

Bayesian yöntemi, olasılık yoğunluğu fonksiyonunun logaritmasına uygun bir eşik değeri atamaktadır. Bu eşik değerinin üstünde kalan dataları sınıf 1, eşik değerine eşit ve eşik değeri altında kalan dataları sınıf 2 olarak ayırmaktadır.

Aşağıda verilmiş olan formüllere göre, \sum kovaryans matrisi ifade etmektedir. Kovaryans matrisin elemanları olan $\delta_{11}, \delta_{12}, \delta_{21}, \delta_{22}$, M matrisinin elemanları olan dataların standart sapmalarını ifade etmektedirler [3]. μ tüm dataların ortalama

değerlerini göstermektedir. Olasılık yoğunluğu fonksiyonu elemanları oluşturulurken, olasılık değişkeni x , μ ortalama değerinden çıkarılmaktadır. n_1 , elimizdeki ikili data grubundan birinci grubun eleman sayısını n_2 ise ikinci grubun eleman sayısını göstermektedir. T , olasılık yoğunluğu fonksiyonunun logaritmasının eşik değerini göstermektedir (4.3).

$$\Sigma = \begin{vmatrix} \delta_{11} & \delta_{12} \\ \delta_{21} & \delta_{22} \end{vmatrix}$$

$$f(x) = 2\pi^{-\frac{k}{2}} |\Sigma|^{-\frac{1}{2}} e^{-\frac{1}{2}(x-\mu)' \Sigma^{-1}(x-\mu)}$$

$$\Sigma = \frac{(n_1-1)\Sigma_1 + (n_2-1)\Sigma_2}{n_1+n_2-2}$$

$$\ln(f(x)) = -\frac{k}{2} \ln(2\pi) - \frac{1}{2} \ln \Sigma - \frac{1}{2} (x - \mu)' \Sigma^{-1} (x - \mu)$$

$$\ln(f(x)) > T \text{ ise } C=1 \text{ (sınıf 1)}$$

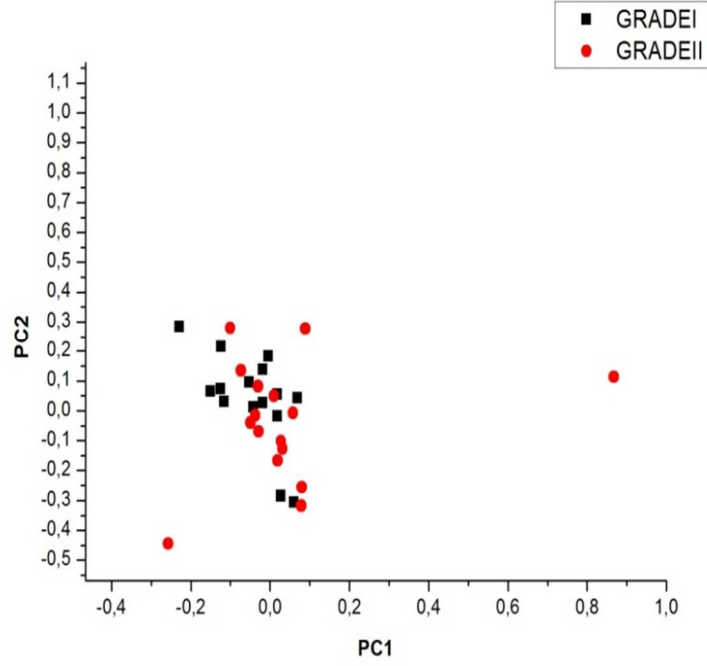
$$\ln(f(x)) \leq T \text{ ise } C=2 \text{ (sınıf 2)} \quad (4.3)$$

4.3. Embriyo Atık Kültür Sıvısı Ölçümlerinin Temel Bileşenler Analizi: PCA (Principle Component Analysis) ve Doğrusal Ayırt Etme Ölçütleri: LDA

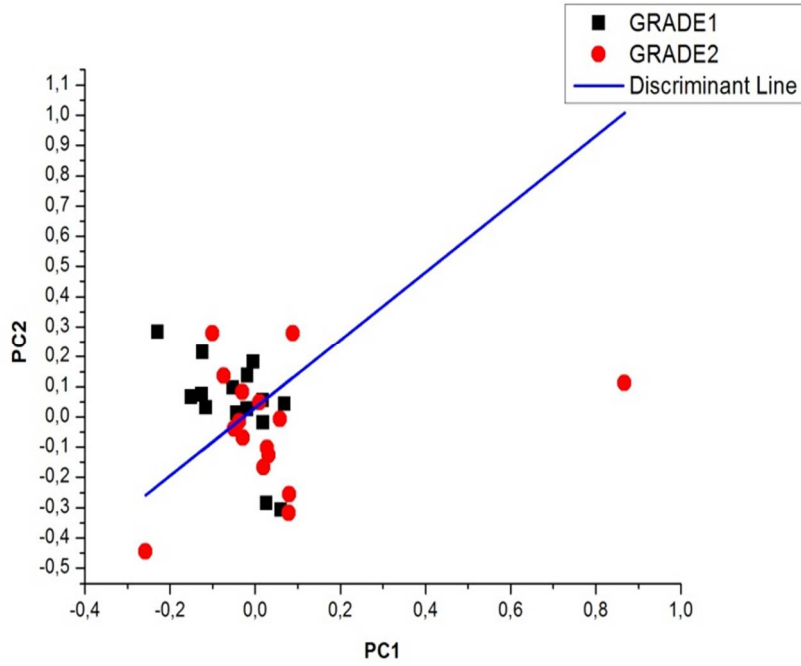
(Linear Discriminant Analysis) ile Analizi

Embriyo atık kültür sıvısının Raman spektrumları temel bileşenler analizi (PCA) ve doğrusal ayırt etme ölçütleri (LDA) ile incelenmiştir. İstatistiksel analizler, Tüp Bebek Kliniğ'in' de iki farklı gruba ayrılmış olan gelişmesini devam ettirme ihtimali yüksek olan örnekler Grade 1 sınıfı (G1) ve daha az ihtimaldeki örnekler Grade 2 sınıfı (G2) 'nin birbiriyle ne kadar ayrıştığını göstermektedir.

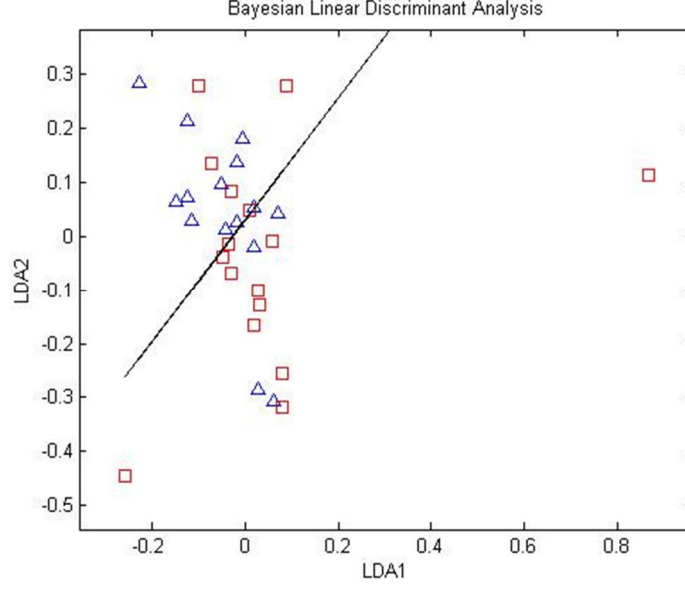
Doğrusal ayırt etme analizi (LDA) ile temel bileşenler analizi PCA' in (PC1) ve (PC2) olarak belirlenen x ve y eksenlerinin değerlerine göre, embriyo atık sıvısının Grade1 sınıfı ile Grade2 sınıfı analiz edilmiştir. Gelişmesini devam ettirme ihtimali yüksek olan Grade1 sınıfı (G1) ile daha az ihtimaldeki Grade2 sınıfı (G2) ölçümleri ayrıştırılmıştır.Şekil 4.2 ve Şekil 4.3' te embriyo atık kültür sıvısının PCA ve LDA analizleri yapılmıştır. Şekil4.4' te ise embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinin doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şemasal ayrılışı verilmektedir.



Şekil 4.2 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden gelişmesini devam ettirme ihtimali yüksek olan sınıf G1 ile düşük oranda embriyo yetiştirme ihtimali olan sınıf G2' nin temel bileşenler analizi (PCA).



Şekil 4.3 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden gelişmesini devam ettirme ihtimali yüksek olan sınıf G1 ile düşük oranda embriyo yetiştirme ihtimali olan sınıf G2' nin doğrusal ayırt etme analizi (LDA).



Şekil 4.4 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden G1 ile G2'nin doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı.

Çizelge 4.1' de embriyo atık kültür sıvısı örneklerden her iki sınıfta kaç hastadan ölçüm aldığımız ve analiz sonucunda iyi ayrışım vermeyen ölçümlerin sayısı verilmiştir. Çizelge 4.2' de ise embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinin doğrusal ayırt etme analizi (LDA) yüzdeleri verilmektedir.

Çizelge 4.1 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden G1 ile G2' nin toplam ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı.

| | Grade 1 | Grade 2 |
|-----------|---------|---------|
| Toplam | 15 | 16 |
| Farklılık | 4 | 4 |

Çizelge 4.2 : Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinden G1 ile G2' nin doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları.

| Ayırt Edilebilirlik | Hassasiyet | Ayırt Edilebilirlik Oranı | Hassasiyet Oranı |
|---------------------|-------------|---------------------------|------------------|
| $(15-4)/15$ | $(16-4)/16$ | %73 | %75 |

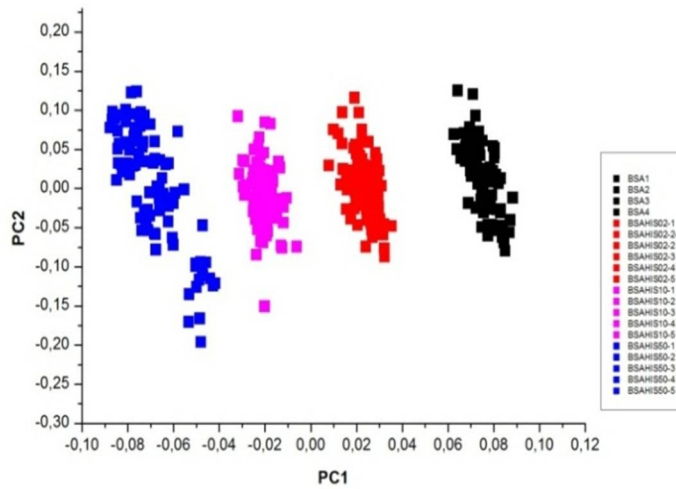
4.4. Histidin ve Bovin Serum Albümin Sıvı Çözeltileri Karışımlarının Farklı

Konsantrasyonları Ölçümlerinin Temel Bileşenler Analizi: PCA (Principle

Component Analysis) ve Doğrusal Ayırt Etme Ölçütleri: LDA (Linear

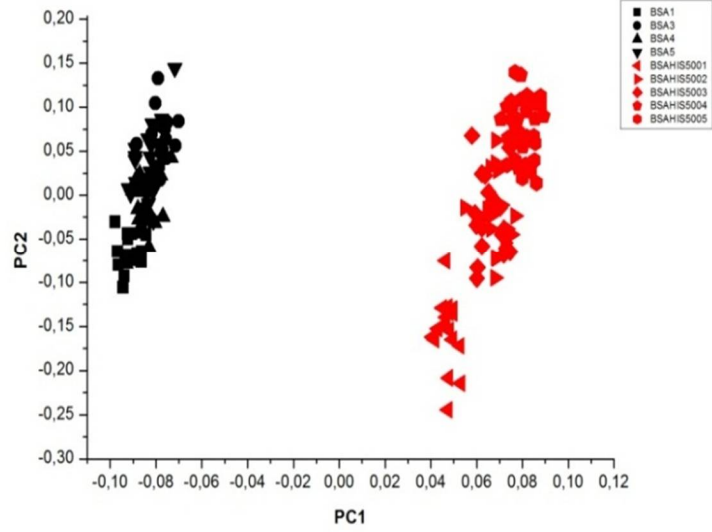
Discriminant Analysis) ile Analizi

Embriyo atık kültür sıvısının PCA analizlerinin çok iyi ölçüde ayrışamama nedeninin, atık sıvısı içerisindeki bazı bileşenlerin hangi yüzdelik oranın altında olduğunu tahmini olarak belirlemek için model bir ölçüm yapılmıştır. Bu modeli oluşturmak için herhangi bir amino asitle karışım hazırlanarak, amino asitin konsantrasyonun adım adım düşürüldüğü çözeltiler hazırlanmıştır. Embriyo ölçümleri ile aynı ölçüm mekanizması kullanılarak ölçtüğümüz histidin ve bovin serum albümin sıvı çözeltisi karışımından 3 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin PCA analizleri yapılmıştır. Konsantrasyonu hangi değere kadar düşürdüğümüzde, çözeltilerin Raman spektrumunu alabileceğimizi görebilmek için %2 konsantrasyona kadar çözeltiler hazırlanmıştır. %2 konsantrasyondaki karışımda da histidin ayırt edilebilir olduğu görülmüştür. Hazırladığımız model ölçümlerin analiz sonuçlarına göre, embriyo atık sıvısı içeriğindeki bileşenlerden ayrışamamış olan bileşenlerin %2 oranının altında bir oran içerdikleri söylenebilmektedir. Şekil 4.5' te bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının konsantrasyonlarının PCA ile analizi gösterilmiştir.

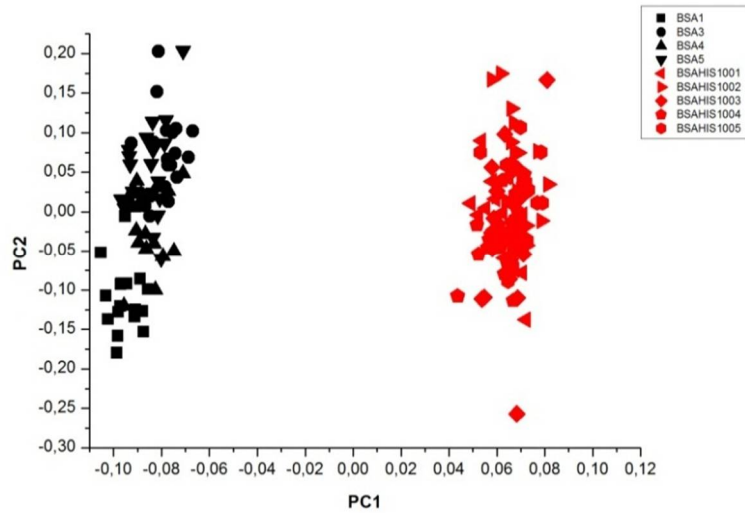


Şekil 4.5 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının 3 farklı konsantrasyonunun temel bileşenler analizi (PCA).

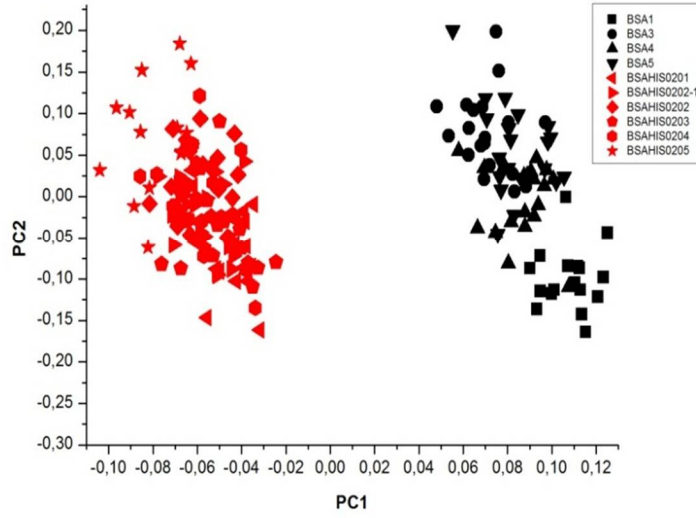
Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’ de bovin serum albümin ölçümleri ve histidin ile bovin serum albümin karışımlarının %2, %10 ve %50 konsantrasyonlarının ölçümlerinin PCA analizi gösterilmektedir. PCA yöntemi ile konsantrasyondaki artış analiz verilerine etkisi açıkça gözlenebilmektedir.



Şekil 4.6 : Taban çizgisi düzeltilmiş bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonlarının Raman spektrumunun temel bileşenler analizi (PCA).

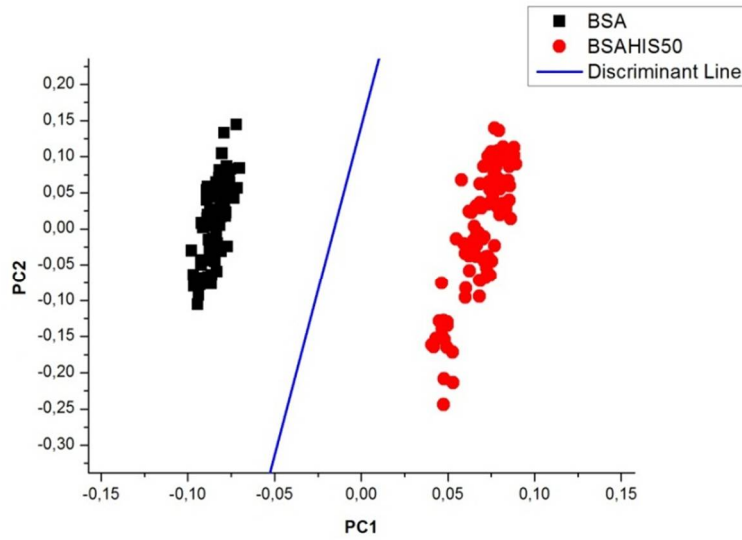


Şekil 4.7 : Taban çizgisi düzeltilmiş bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin çözeltilerinin %10 konsantrasyonlu karışımının Raman spektrumlarının temel bileşenler analizi (PCA).



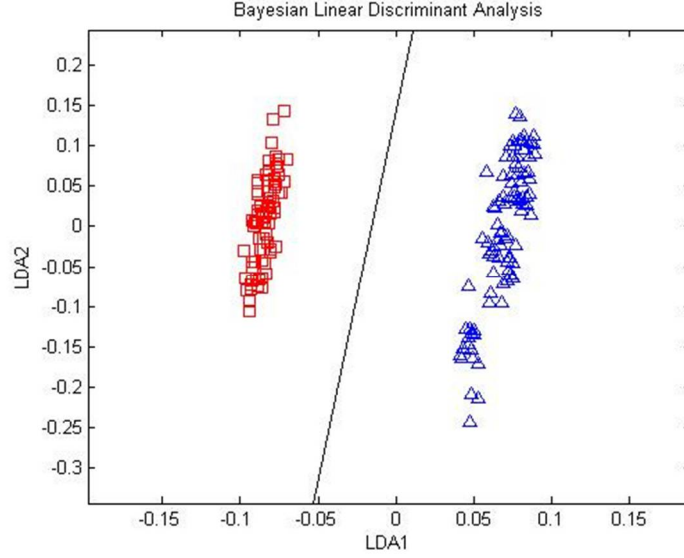
Şekil 4.8 : Taban çizgisi düzeltilmiş bovin serum albümin ile histidin bovin serum albümin çözeltilerinin %2 konsantrasyonlu karışımının Raman spektrumlarının temel bileşenler analizi (PCA).

Şekil 4.9, Şekil 4.11 ve Şekil 4.13’ te gösterildiği gibi LDA analizleri yapılmıştır. Bovin serum albümin ve histidin ile bovin serum albümin karışımlarının farklı konsantrasyonlarının doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirliği ve hassasiyet oranları hesaplanmıştır.



Şekil 4.9 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA).

Şekil 4.10’ da MATLAB programında %50 konsantrasyondaki ölçümlerin nasıl ayrışım verdikleri gösterilmektedir. MATLAB programından alınan PCA datalarına LDA analizi uygulandıktan sonra ORİĞİN programıyla grafiklerini elde ettik.



Şekil 4.10 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı.

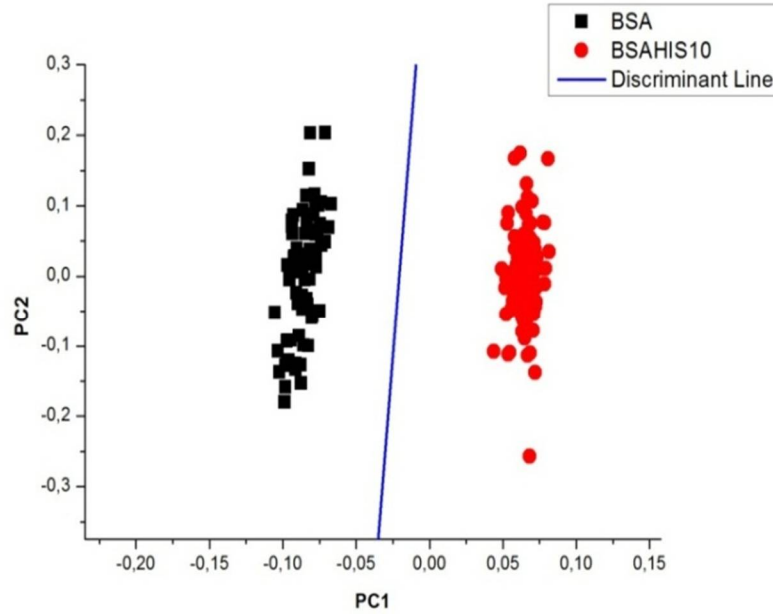
Doğrusal ayırt etme yöntemi kullanılarak embriyo atık kültür sıvısı ile aynı yöntemle ölçülmüş olan histidin ve bovin serum albümin sıvı çözeltisi karışımlarının %2, %10 ve %50 histidin oranlarındaki konsantrasyonlarının bovin serum albümin ile ayırt edilebilirliği incelenmiştir. Çizelge 4.4, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.8’ de 3 farklı konsantrasyondaki karışımların ayırt edilebilirlik ve hassasiyet yüzdeleri hesaplanmıştır. Diğer çizelgelerde yani Çizelge 4.3, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.7’ de kaçar örnek ölçüldüğü verilmiştir.

Çizelge 4.3 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı.

| | Bsa | Bsahistidin50 |
|-----------|-----|---------------|
| Toplam | 76 | 93 |
| Farklılık | 0 | 0 |

Çizelge 4.4 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %50 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları.

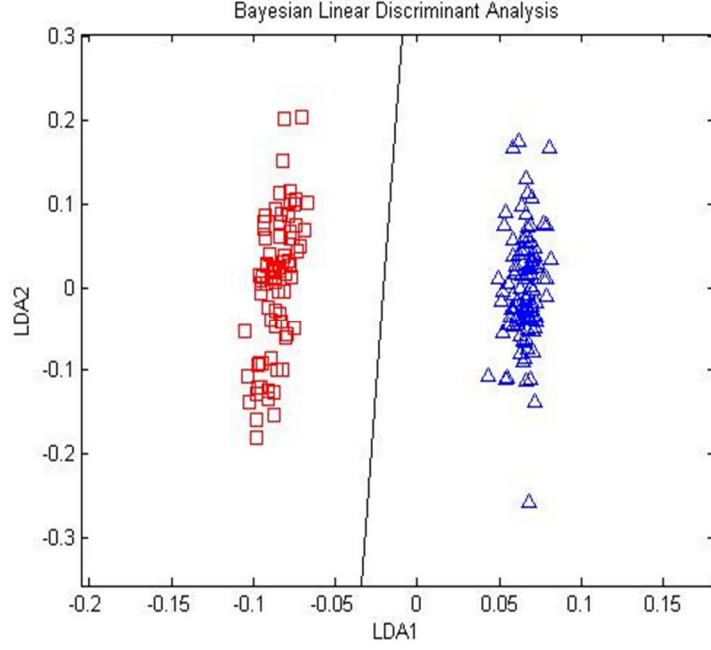
| Ayırt Edilebilirlik | Hassasiyet | Ayırt Edilebilirlik Oranı | Hassasiyet Oranı |
|---------------------|------------|---------------------------|------------------|
| (76-0)/76 | (93-0)/93 | %100 | %100 |



Şekil 4.11 : Bovin Serum Albümin ile Histidin-Bovin Serum Albümin Karışımının %10 Konsantrasyonunun Doğrusal Ayırt Etme Analizi (LDA).

Şekil 4.12 ve Şekil 4.14' te de diğer iki düşük konsantrasyonda histidin içeren ölçümler olan %10 ve %2 konsantrasyonlu ölçümlerin MATLAB sonuçları verilmektedir. Aynı ölçeklere sahip MATLAB datalarının sonucuna baktığımızda, dataların ağırlık merkezler hesaplanırsa, konsantrasyon düştükçe ağırlık merkezlerinin birbirine yaklaştığı görülmektedir.

Deneylemlerin sonucuna tümüyle bakıldığında en düşük konsantrasyondaki ölçümün de tam ayrışım verdiği görülmektedir. Ölçümlerimiz MATLAB datalarında da görüldüğü gibi %2 konsantrasyona kadar tam ayrışım vermiştir.



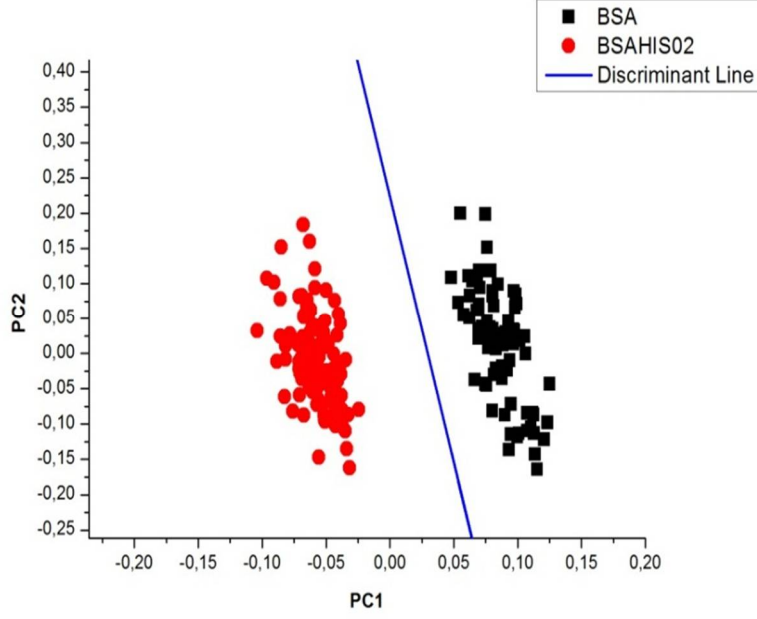
Şekil 4.12 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %10 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı.

Çizelge 4.5 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %10 konsantrasyonunun ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı.

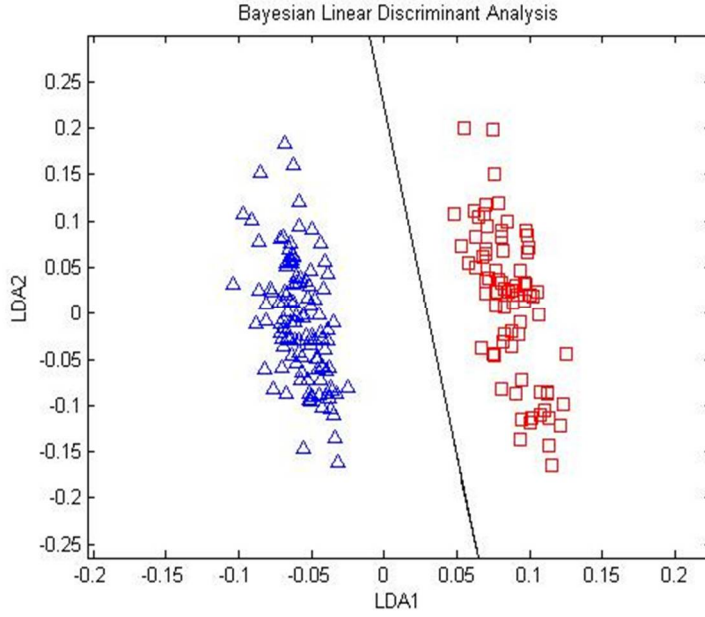
| | Bsa | Bsahistidin10 |
|-----------|-----|---------------|
| Toplam | 76 | 100 |
| Farklılık | 0 | 0 |

Çizelge 4.6 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %10 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları.

| Ayırt Edilebilirlik | Hassasiyet | Ayırt Edilebilirlik Oranı | Hassasiyet Oranı |
|---------------------|---------------|---------------------------|------------------|
| $(76-0)/76$ | $(100-0)/100$ | %100 | %100 |



Şekil 4.13 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA).



Şekil 4.14 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizinin (LDA) MATLAB programında şematik olarak ayrılışı.

Ağırlık noktalarını hesapladığımızda en düşük histidin konsantrasyonuna sahip iki ölçümden %10 konsantrasyonlu ölçümde 0,17 ölçekli bir ağırlık merkezi varken, %2 konsantrasyonlu ölçümde 0,15 ölçekli bir değişim olmuştur.

Çizelge 4.7 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun ölçüm sayısı ve farklı çıkan ölçümlerin sayısı.

| | Bsa | Bsahistidin02 |
|-----------|-----|---------------|
| Toplam | 76 | 114 |
| Farklılık | 0 | 0 |

Çizelge 4.8 : Bovin serum albümin ile histidin-bovin serum albümin karışımının %2 konsantrasyonunun doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonrası ayırt edilebilirlik ve hassasiyet oranları.

| Ayırt Edilebilirlik | Hassasiyet | Ayırt Edilebilirlik Oranı | Hassasiyet Oranı |
|---------------------|---------------|---------------------------|------------------|
| $(76-0)/76$ | $(114-0)/114$ | %100 | %100 |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Farklı bireylerden alınmış ve mikroskopik yöntemlerle iki farklı kalitede sınıflandırılmış embriyo atık kültür sıvısı örneklerinin içeriğini incelemek için örneklerin Raman spektrumları ölçülmüştür. Embriyo atık kültür sıvısı örneklerinin temel bileşenler analizi (PCA) ve doğrusal ayırt etme analizi (LDA) yöntemleriyle istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Daha sonra amino asit grubundan histidin ile birkaç amino asitin karışımından oluşan bovin serum albümin karışımı çözeltilerinin %50, %10 ve %2 konsantrasyondaki karışımlarının Raman spektrumları ölçülmüştür. Embriyo atık kültür sıvısı örneklerine uygulanan PCA ve LDA yöntemleri histidin ve bovin serum albümin karışımlarına da uygulanmıştır. İki farklı sınıf olarak belirlenmiş olan Grade1 (G1) ve Grade2 (G2) sınıflarından gelişmesine devam etme ihtimali yüksek olan örnek sınıfı olan G1' in G2 ile ne kadar ayrıştığı istatistiksel analizlerle incelenmiştir. Bunun sonucunda G1 ve G2 örneklerinin birbirleriyle çok benzer oluşlarına, bu yüzden de analizlerden önce tahmin ettiğimiz ayrışım oranının altında ayrışma gösterdiğini gördük. Daha sonra tam ayrışım alabileceğimiz farklı bir ölçüm modeli oluşturduk.

Histidin ve bovin serum albümin çözeltileri karışımlarına uyguladığımız istatistiksel analiz sonuçlarına göre, histidin bileşeninde %2 oranında artış olduğunda Raman ölçümlerinin istatistiksel analizine göre ayırt edilebilmektedir. %2 oranında konsantrasyon değişiminin istatistiksel analiz uygulandıktan sonraki gözle görülür ayrışabilirliği, buna karşın embriyo atık kültür sıvısı ölçümleri analizlerinin histidin ve bovin serum albümin konsantrasyonlarının analizleri kadar iyi ayrıştırma vermemesi, atık kültür sıvısının bileşenlerinde çok düşük konsantrasyon değişiklikleri olduğunu göstermektedir. Embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinin doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonuçlarına göre hassasiyet oranı %75 iken ayırt edilebilirlik oranı %73 olmaktadır. Çizelge 5.1' de embriyo atık kültür sıvısı ölçümlerinin hassasiyet ve ayırt edilebilirlik oranları görülmektedir.

Ölçtüğümüz histidin ve bovin serum albümin çözeltilerinin doğrusal ayırt etme analizi (LDA) sonuçlarına göre ayırt edilebilirlik hassasiyet oranları %50, %10 ve %2 konsantrasyondaki ölçümler için %100' dür. Çizelge 5.2' de histidin ve bovin serum albümin çözeltilerinin hassasiyet ve ayırt edilebilirlik oranları görülmektedir.

| | |
|----------------------------|---------------|
| Embriyo Atık Kültür Sıvısı | Grade1-Grade2 |
| Hassasiyet | %75 |
| Ayırt Edilebilirlik | %73 |

Çizelge 5.2 : LDA sonuçlarına göre histidin ve bovin serum albümin karışımı konsantrasyonlarının hassasiyet ve ayırt edilebilirlik oranları.

| Histidin ve Bovin Serum Albümin Karışımı Konsantrasyonları | %50 | %10 | %2 |
|--|------|------|------|
| Hassasiyet | %100 | %100 | %100 |
| Ayırt Edilebilirlik | %100 | %100 | %100 |

KAYNAKLAR

- [1] **Nakamoto, K.** (1986). *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley and Sons, New York, 5. Baskı, ISBN: 0471010669.
- [2] **Şeninak Ş.** (2010). *Preeklampsi Hastalığının Raman Cımbızlama Yöntemiyle İncelenmesi*, İstanbul Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- [3] **Başar G., Parlatan U., Şeninak Ş., Günel T., Benian A. and Kalelioğlu İ.** (2012). Investigation of Preeclampsia Using Raman Spectroscopy, *An International Journal*, vol.27 , pp.239-252.
- [4] **Erdaş G.** (2014). *Embryo Liquid Waste Samples' Raman Measurements and Analysis*, İstanbul Technical University, Graduation Project.
- [5] **Er E.** (2010). *Konfokal Raman Yöntemleri*, Trakya Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- [6] **Seli E., Sakkas D., Scott R., Kwok S. C., Rosendahl S. M., and Burns D. H.** (2007). Noninvasive metabolomics profiling of human embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization, *Fertil Steril.* 2007 Nov;88(5):1350-7. Epub 2007 Oct 17. PMID:17923129, Elsevier.
- [7] **Scott R., Seli E., Miller K., Sakkas D., Scott K. and Burns D. H.** (2008). Noninvasive metabolomics profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study, *Fertil Steril.* 2008 Jul;90(1):77-83. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.058. Epub 2008 Feb 20. PMID: 18281045, Elsevier.
- [8] **Botros L., Sakkas D. and Seli E.** (2008). Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF, *Mol Hum Reprod.* 2008 Dec;14(12):679-90. doi: 10.1093/molehr/gan066, PMID: 19129367, PMCID:PMC2639446.
- [9] **Hashimoto S., Minami N., Yamada M. And Imai H.** (2000). Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: *Mol Reprod Dev.* 2000 Aug;56(4):520-6, PMID:10911402.
- [10] **Nagy Z. P.** (2014). *HCLD/CC(ABB) Informational biometrics in human gametes and embryos*. Annual Meeting and Educational Conference. USA.
- [11] **Wu G.** (2013). *Amino Acids Biochemistry and Nutrition*. CRC Press.
- [12] **Gilbert S. F.** (2000). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, 6th edition.
- [13] **Creery, R. L. M.** (1985). *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, J. D. Winefordner, Serier v. 157.

- [14] **Guangyong Z., Xian Z., Qi F., Xueliang W.** (2010). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, Elsevier B. V.
- [15] **Wartewig, S.** (2003). IR and Raman Spectroscopy, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN 3-527-30245-X.
- [16] **Jianan Y. Q., Brian C. W., and David S.** (1999). Concentration measurements of multiple analytes in human sera by near-infrared laser Raman spectroscopy, Optical Society of America.
- [17] **Pichardo Molina J. L. & Frausto-Reyes C. & Barbosa-García O. & Huerta-Franco R. & González-Trujillo J. L. & Ramírez-Alvarado C. A. & Gutiérrez-Juárez G. & Medina-Gutiérrez C.** (2007). Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients, Springer-Verlag London Limited.
- [18] **Gargaud M., Amils R., Quintanilla J. C., Henderson J., Irvine M. W., Pinti D. L., VisoM.** (2011). Encyclopedia of Astrobiology, ISBN: 978-3-642-11271-3 (Print) 978-3-642-11274-4 , p 485.
- [19] **Lane M. and Gardner D. K.** (1996). Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion, Human Reproduction vol 11 no 9 pp 1975-1978.
- [20] **Griot M.** (1990). Optics Guide 5, Irvine, California.
- [21] **Griot M.** (1990). The Practical Application of Light, Barloworld Scientific, Irvine, California.
- [22] **Andrew N.** (t.y.). CS229 Lecture notes, Part XI Principal Components Analysis.
- [23] **Jackson J.E.** (1991). A user's guide to principal components, John Wiley and Sons, A. Wiley, Interscience Publications.
- Url-1**<<http://www.renkliultrason.com/51/Tup-bebek-nedir-kimlere-ugulanir>>, alındığı tarih: 17.04.2015.
- Url2**<http://www.niscair.res.in/sciencecommunication/researchjournals/rejour/ijca/ijcak9/ijca_apr09_files/image002.gif>, alındığı tarih: 02.05.2015.
- Url-3** <MCCREERY Raman group, <http://www.chemistry.ohio-sate.edu/rmc-creer>>, alındığı tarih: 02.05.2015.
- Url-4** <http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin>, alındığı tarih: 10.05.2015.
- Url-5**<http://en.wikipedia.org/wiki/Essential_amino_acid>, alındığı tarih: 10.05.2015.
- Url-6** <<http://tr.wikipedia.org/wiki/Glukoz>>, alındığı tarih: 10.05.2015.
- Url-7** <<http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-Carotene>>, alındığı tarih: 10.05.2015.



ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Tuğçe Pınar Öztürk
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 1989
E-Posta : tugcozturk@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2011, Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik
- **Yükseklisans** : 2015, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Fizik Mühendisliği

YAYINLAR

Öztürk T. P., 2010, Nanomalzemeler, NANOKON (1. Ulusal Nanoteknoloji Kongresi), Poster Sunumu, 2010, İstanbul, Türkiye.

Öztürk T. P., 2010, Vortex Dynamics, Models for Tunneling, Pancake Windings and Josephson Effect, 5. Ulusal Süperiletkenler Sempozyumu, Poster Sunumu, 2010, İzmir, Türkiye.

Öztürk T. P., 2012, Süpersimetri Cebrine Katkı Sağlayan Teoriler ve Monte Carlo Yaklaşımı, Bildiri No: 133, İZYEF (İzmir Yüksek Enerji Fiziği Uygulamaları Çalıştayı), 2012, İzmir, Türkiye.

