

# IN VİTRO FERTİLİZASYON'DA GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: PROTEOMİKLER, SEKRETOMİKLER, METABOLOMİKLER VE IN VİTRO MATURASYON

Ercan BAŞTU, Gülşah KESKİN, Hasan SERDAROĞLU

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul

## ÖZET

1978'de insanlarda yapılmış olan ilk başarılı in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamasından beri, IVF'nin etkinliğini ve güvenliğini geliştirme çabaları uzmanlar tarafından sürdürülmektedir. Teknolojideki gelişmeler ve insan üremesi hakkında artan bilgiler ışığında, IVF başarı oranları artarken, çoklu gebelik (üçüz, dördüz ve üstü) oranları düşmüştür. Çoğu çift 'açıklanamayan infertilite' yaşarken, IVF'e bağlı ikiz gebelik oranları halen yüksek olduğu için kat edilecek çok mesafe vardır. Ancak son dönemdeki teknolojik ve bilimsel gelişmeler, IVF'te ciddi iyileşme ihtimali vaat etmektedir.

Bu derlemenin amacı, proteomikler, sekretomikler, metabolomikler ve oosit kültürü ile ilgili son gelişmeleri irdelemek, embriyo seçimi ve in vitro maturasyon (IVM) üzerindeki klinik yansımalarına ışık tutmaktır. Ayrıca yakın gelecekte, bu gelişmelerin IVF'in etkinliğini ve güvenliğini nasıl etkileyebileceği de tartışılacaktır.

**Anahtar kelimeler:** in vitro fertilizasyon, in vitro maturasyon, metabolomikler, proteomikler, sekretomikler

**Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Cilt: 10, Sayı: 1 Sayfa: 1- 8**

## RECENT ADVANCES IN IN VITRO FERTILIZATION: PROTEOMICS, SECRETOMICS, METABOLOMICS AND IN VITRO MATURATION

### SUMMARY

Since its first successful result in 1978, clinicians and researchers have been working on increasing the efficiency and safety of in vitro fertilization (IVF). As a result of advances in technology and understanding of human reproduction, IVF success rates have increased while high-order multiple pregnancy (triplets and more) rates have decreased. On the other hand, there is still opportunity for further improvement as many couples face 'unexplained infertility' and high rates of twin pregnancies. Latest technologic and scientific improvements in IVF are promising. The aim of this review is to present the latest advances in the fields of proteomics, secretomics, metabolomics and oocyte culture, how they can potentially improve embryo selection and in vitro maturation (IVM) and subsequently their possible impact on the safety and efficacy of IVF.

**Keywords:** in vitro fertilization, in vitro maturation, metabolomics, proteomics, secretomics

**Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Vol: 10, Issue: 1 Pages: 1- 8**

---

**Yazışma adresi:** Uzm. Dr. Ercan Baştu, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, 34093, İstanbul  
Tel.: (532) 413 41 95

e-posta: ercan.bastu@istanbul.edu.tr

Alındığı tarih: 03.02.2012, revizyon sonrası alınma: 16.07.2012, kabul tarihi: 22.08.2012, online yayın tarihi: 23.08.2012

## GİRİŞ

İnfertilite insidansı tüm dünyada arttıkça, bu hasta popülasyonunun ihtiyaçlarını karşılamak adına yardımcı üreme teknikleri (YÜT) gündeme gelmiştir. Öte yandan, 35 yaş altı kadınlarda canlı doğum oranı halen %40 civarındadır<sup>(1)</sup>. Düşük oranlara sebep, başarılı embriyo gelişimi ve implantasyonu hakkındaki kısıtlı bilgilerimizdir. Gene de, son dönemdeki teknolojik ve bilimsel gelişmeler, IVF'te ciddi iyileşme sağlamıştır.

YÜT dalındaki gelişimler iki ana kategoridedir: etkinliği arttırmaya yönelik olanlar ve güvenliği arttırmaya yönelik olanlar. Son yıllardaki gelişmelerin çoğu özetle embriyo gelişimindeki mekanizmaları ve infertilitenin patofizyolojisini anlamamıza katkı sağlamıştır. İmplantasyon öncesi genetik tanı alanındaki gelişmeler embriyoda genetik bozukluk taramasında (bu derlemenin kapsamı dışındadır), proteomikler alanındaki gelişmeler ise normal embriyoya karşın anormal embriyonun büyüme ortamı ve salgıları hakkında bilgilerimizi derinleştirmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, transfer için 'en iyi' embriyonun seçiminde fayda sağlarken, IVF başarı oranını arttıracığı düşünülmektedir. Embriyo seçiminde hassasiyetin artması, daha az sayıda ama implantasyon potansiyeli yüksek embriyo transferi ile sonuçlanacağı için hem maternal hem fetal tedavi güvenliği yükselecektir.

Güncel bir teknik olarak sayılabilecek olan oositlerin fertilizasyon öncesi IVM'u sayesinde hiperstimülasyon riski olan hastalarda over stimülasyonu ortadan kalkabilir. Bu tekniğin yaygınlaşmasıyla, gelecekte benzer hastalarda (örnek: PKO) polikistik over sendromlu hastalar) IVF başarı oranı artacağı öngörülmektedir. Son olarak, oosit kriyoprezervasyonundaki gelişmeler, fertilitate prezervasyonunun daha yaygın hale gelmesinde önemli rol oynayacaktır. Bu derlemenin amacı yukarıda bahsi geçen gelişmelerin IVF'e nasıl katkı sağlayacağını irdelemektir.

## PROTEOMİKLER, SEKRETOMİKLER VE METABOLOMİKLER

İmplantasyon öncesi genetik tanı testleri embriyonun genetik yapısı hakkında bilgi sunsa da, embriyonun gelişimi ve implantasyon potansiyeli ile ilgili kısıtlı fayda sağlar. Hangi embriyonun transfer edileceği konusunda uzmanlar halen embriyo kalitesini morfolojik kriterlerle

sınıflandırma yoluna gitmektedirler. Ancak, morfoloji tek başına implantasyon oranını tahminde yeterli bir parametre değildir<sup>(2)</sup>. Embriyo gelişim potansiyelini değerlendirecek güvenilir, etkin ve noninvazif bir metot, sadece IVF başarı oranlarını arttırmakla kalmaz, tek embriyo transferini optimize ederek, çoklu gebelik insidansını da düşürür.

Embriyo hücre fonksiyonunu daha iyi anlamak adına araştırmacılar proteomikler üzerine çalışmalarına ağırlık vermişlerdir. Proteomik araştırmalar, embriyonun protein içeriğinin ve protein profilinin analizini kapsar. Değişik embriyoların protein profilleri IVF ya da kriyoprezervasyon v.b. uygulanan yöntemlerin etkileri hakkında bilgi verebilir. Proteomik analizi hücre lizisi gerektirdiğinden, transfer öncesi embriyoda uygulamak mümkün değildir. Bu sebeple, IVF kültür medyasına salgılanan proteinler (sekretomikler) incelenmeye başlanmıştır. Böylelikle herhangi bir embriyonun salgı profili reproduktif başarı oranıyla korele edilebilir. Mesela, başarılı implante olan veya olamayan embriyoların profilleri incelenerek, transfer edilecek optimum embriyo için biomarkerlar bulunabilir. Hatta transfer edilecek embriyoların genetik profilleri non-invaziv yollarla incelenebilir. McReynolds ve arkadaşlarının çalışmalarında göstermiş olduğu gibi lipocalin-1 blastokistlerin bir sekretomudur ve anöploidilerle ilişkilidir<sup>(3)</sup>.

Son dönemde kültür medyasında proteinlerin yanı sıra metabolitler de incelenmektedir (metabolomikler). Metabolitler, embriyonun fizyolojik ve metabolik durumunu yansıtır. Sekretomiklerde olduğu gibi, implante olan ve olamayan embriyo profilleri karşılaştırılarak, reproduktif potansiyeli iyileştirmeye yönelik markerlar bulunabilir. Bu sayede, IVF sikluslarında hangi embriyonun transfer edileceği konusunda daha kesin metotlar geliştirilebilir. Yine sekretomiklerde olduğu gibi; anöploid embriyolar hakkında yardımcı olabilir. Anöploid embriyolar genetik olarak normal olan embriyolara göre *in vitro* değişik amino asit turn overi gösterdikleri için amino asit profillemeye embriyonun genetik sağlığı hakkında fikir verebilir<sup>(4)</sup>.

### ***Proteomikler ve sekretomiklerde analiz teknikleri***

İlk çalışmalarda protein tanımlamak için fare embriyolarında iki boyutlu jel elektroforezi<sup>(5)</sup>, Western blot<sup>(6)</sup> ya da eliza testi<sup>(7)</sup> yaklaşımları kullanılmıştır. Ancak bu tekniklerde, çok fazla miktarda örnek

materyal gerekirken, ya duyarlılık limitasyonu (elektroforezi) ya da tek seferde tanımlanabilecek protein sayı limitasyonu (Western blot, eliza testi) mevcuttu.

Ancak son zamanlarda embriyo proteomikleri araştırmalarında mass spektrometri, çalışmalara büyük ivme kazandırmıştır. Mass spektrometri sayesinde birçok protein aynı anda tanımlanabilmektedir. En sık kullanılan yüzey destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon tekniği (SELDI surface-enhanced laser desorption/ionization) sayesinde ('time-of-flight' (TOF) analiziyle beraber), bağlı proteinler lazerle iyonize olmaktadır. Ortaya çıkan gaz iyonları vakumlu TOF tüpünden geçerek, detektör plakaya ulaşır. İyonların ebatları farklı olduğundan tabakaya ulaşma hızları da farklıdır. Bu sayede, iyonlar kitle-şarj oranlarına göre ayrılırlar ve profilleri incelenebilir. Bu metotla Katz-Jaffe ve arkadaşları, gelişen ve dejenere olan embriyoların protein profillerini karşılaştırmıştır<sup>(8)</sup>. Aynı araştırmacılar, benzer morfolojiye sahip embriyoların protein farklılıklarını da ortaya koyarak, embriyo seçiminde morfolojik değerlendirmenin yetersizliğini göstermişlerdir. Bazı proteinler embriyoyu saran etrafındaki medyaya da salındığından, araştırmacılar embriyo sekretom profili oluşturmak için embriyo kültür medyasında da protein incelemişlerdir. Yüzey destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon tekniği (TOF analiziyle beraber) ile araştırmalar yapan Katz-Jaffe ve arkadaşları embriyonun değişik gelişim evrelerinde farklı sekretomik profiller tanımlamışlar ve blastosist gelişimi ile ilintili ubikuitini protein biomarkeri olarak bulmuşlardır<sup>(9)</sup>. Ubikuitin; proteinleri degradasyon için yönlendiren ubikuitin bağımlı bir proteozom sisteminin parçasıdır. Bu sistem proliferasyon ve apoptozu içeren bir dizi işlemler içerisinde rol oynar. Protein yıkımının artmış olduğu çeşitli hastalık durumlarında vücut sıvılarında arttığı gösterilmiştir<sup>(10)</sup>. Ayrıca implantasyon sürecinde anahtar sinyal moleküllerin aktiviteleri ve yıkımları aşamasında kritik bir oynamaktadır<sup>(11)</sup>.

Protein mikrodizi teknolojisi son zamanlarda implante olmuş blastosistlerle olamamış blastosistlerin kültür medyalarındaki sekretomik profillerini karşılaştırmak için kullanılmıştır. Bulgular başarılı implante olmuş embriyolarda granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ve kemokin (C-X-C motif) ligand 13 (CXCL13) seviyelerinin arttığı yönündedir<sup>(12)</sup>. Mass spektrometrede bilinmeyen

proteinler önce analiz edilip sonra tanımlanırken, mikrodizi teknolojisinde incelenecek spesifik proteinin antikorlarının kullanılması gerekmektedir. Bu sebeple, mikrodizi teknolojisi, protein profili ortaya çıkarmak yerine bireysel markerlar tanımlamada daha faydalı olabilir.

### ***Metabolomiklerde analiz teknikleri***

IVF esnasında ortaya çıkan atık kültür medyası değişik metotlarla incelenebildiği gibi, metabolitlerle de incelenebilir. Bu sayede, embriyonun metabolik durumu hakkında bilgi edinilebilir. Örnekleri karşılaştırmak ve tanımlamak için birçok spektroskopik teknik kullanılmaktadır.

Yakın kızılötesi ve Raman spektroskopilerinin her ikisi de vibrasyonel spektroskopik tekniklerdir. Örnekteki moleküllerin vibrasyonel karakteristikleri sayesinde metabolit profili çıkarılır. Üretilen sinyalin yoğunluğu ve spesifik örnek bileşenlerini tanımlama açısından iki tekniğin de avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Seli ve arkadaşları, her iki tekniği de kullanarak, implante olmuş ve olmamış embriyoların metabolit profillerindeki farkları tanımlamışlardır<sup>(13)</sup>. Sonrasında elde edilen bilgileri, diğer embriyoların reproduktif potansiyelini ölçmede faydalı viyabilite indeksleri oluşturmak için kullanmışlardır. Retrospektif olsa da, her iki teknikle de embriyo viyabilitesini başarılı şekilde değerlendirebilmiştir.

Manyetik alanda moleküler davranışa göre metabolitleri tanımlamak amaçlı manyetik rezonans spektroskopisi de kullanılmıştır. Bu sayede, değişik reproduktif potansiyeli olan embriyoların metabolit profillerindeki farklar tanımlanmaya çalışılmıştır. Seli ve arkadaşlarının manyetik rezonans spektroskopisi ile yaptığı bir çalışmada, implante olan embriyoların implante olmayan embriyolara göre kültür medyalarında daha yüksek glutamat konsantrasyonlarına sahip olduğu bulunmuştur<sup>(14)</sup>. Ayrıca, istatistiki olarak anlamlı olmasa da, implante olan embriyonun medyasında daha düşük oranda alanin, piruvat ve glukoz rastlanmıştır. Araştırmacılar, bu sonuçların ışığında reproduktif başarıyı tahmin edebilecek viyabilite indeksi oluşturmuşlardır (hassasiyeti %88,2'dir). Manyetik rezonans spektroskopisi sonuçları Raman spektroskopiyeye eş değer de olsa, manyetik rezonans spektroskopisi klinik uygulamada veri toplama ve analizi açısından daha pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir<sup>(15)</sup>. Klinik

uygulamada, embriyo kültür medyasının metabolomik profillemesi için ideal analitik teknik henüz bulunmamıştır. Birden fazla testin kombinasyonu, başarılı tahmin değerini vermek için gerekli olabilir. Ayrıca, bugüne kadarki araştırmalarda kültür medya örnekleri dondurularak, başka bir laboratuvara analiz için taşınmıştır. Bu sebeple, metabolomik profillemenin IVF merkezlerinde birebir yapıldığında ne kadar hassas ve başarılı sonuçlar vereceği halen belirsizdir. Ek olarak, çeşitli IVF merkezlerinde değişik tip kültür medyaları kullanılmakta ve transferler implantasyon öncesi gelişimin değişik evrelerinde yapılmaktadır. Metabolik profillemeye, normalizasyon sonrası, bu faktörlerden bağımsız sonuç verme yetisine sahip görünmesine karşın, ilgili faktörlerin profillemeye hassasiyetini ne kadar etkilediğine dair daha kapsamlı çalışmalara halen ihtiyaç vardır. Son olarak, anöploidlik (aneuploidy), IVF tedavisinde görülen embriyo kayıplarında büyük rol oynadığından, metabolomik profillemenin başarısı belli ölçüde anöploid embriyoları belirleyebilmesine de bağlı olacaktır.

#### ***Klinik Uygulamalar***

Kültür medyasının sekretomik analizi embriyo açısından invazif olmadığından, klinik uygulamalarda yerini şimdiden almaya başlamıştır. 2002'de Fuzzi ve arkadaşları, IVF kültür medyasındaki eriyebilir human lökosit antijeni G (HLA-G) ile başarılı embriyo implantasyonu arasında korelasyon bulmuşlardır<sup>(16)</sup>. Bu veriler ışığında, Sher ve arkadaşları transfer için embriyo seçimini HLA-G durumuna göre yapmışlardır<sup>(17)</sup>. HLA-G pozitif olan embriyoların implantasyon ve sonrasında gebelik oranları, HLA-G negatif embriyolara göre anlamlı seviyede yüksek çıkmıştır. Bu nedenle, embriyo seçiminde HLA-G tahmin değeri yüksek bir biomarker olabilir.

Transfer için embriyo seçiminde, metabolomiklerin henüz prospektif kullanımı olmamıştır. Yakın zamanlı araştırmalar potansiyel klinik uygulamaları adına umut vermektedir. Scott ve arkadaşları hesaplanmış bir viyabilite indeksini baz alarak, 3. gün ve 5. gün embriyolarının reproduktif potansiyelini prospektif olarak Raman spektroskopisi ile tahmin edebilmişlerdir<sup>(18)</sup>. Araştırmacılar başarılı gebelik sonucunu veya başarısız implantasyonu %80,5 tanı hassasiyetiyle bulmuşlardır. Bu teknikle, kültür medyada bulunan metabolitler hızlı değerlendirilebildiğinden, transfer öncesi embriyo seçiminde potansiyel

kullanıma sahiptir.

Tek embriyo transferinde geleneksel morfolojik sınıflandırmanın yanı sıra embriyo kalitesinin metabolomik değerlendirmesi iki araştırmanın konusu olmuştur<sup>(19,20)</sup>. Her iki araştırma grubu da metabolomik profillemenin tahmin değerini gösterirken, 2. gün veya 3. gün embriyolarının metabolomik viyabilite indeksleri ile morfolojik sınıflandırmaları arasında korelasyon bulamamışlardır. Araştırmalar retrospektif olmasına rağmen, Seli ve arkadaşları gebelik sonuçlarını görmeden embriyonun reproduktif potansiyelini tahmin edebildiklerini göstermişlerdir<sup>(20)</sup>. Tüm bu veriler embriyo seçim sürecine metabolomik değerlendirmeyi katmanın potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır. Araştırmacıların da belirttiği üzere, özellikle tek embriyo transferinde, morfolojik sınıfı aynı olan iki embriyo arasında, reproduktif potansiyeli daha fazla olanı tahminde bu metot uygulanabilir.

#### **IN VİTRO MATURASYON (IVM)**

Oositlerin toplanması, fertilizasyonu ve oluşan embriyonun rahim boşluğuna yerleşmesiyle IVF süreci tamamlanır. Klasik yöntemde eksojen gonadotropinler hastaya uygulanarak, çok sayıda oosit gelişimi stimüle edilir ve sonrasında bu oositler transvajinal yolla aspire edilir. Follicle-stimulating hormone (FSH) sayesinde ortaya çıkan antral folliküller, toplama işlemi öncesi Graafian evreye kadar olgunlaşır. Bu metodun en büyük faydası, foliküllerin normal *in vivo* gelişimini taklit etmesidir (suprafizyolojik ortamda olmasına rağmen). Gene de, kontrollü over stimülasyon sürecinin birçok negatif yanı da mevcuttur. İlaçların yüksek maliyeti ve risk altındaki popülasyonun yaklaşık %10'nunda görülebilen over hiperstimülasyon sendromu<sup>(21)</sup>. bu negatif yanlardan sadece birkaçıdır.

Alternatif bir yöntem olan IVM'de, stimüle olmamış antral foliküller kullanıldığından gonadotropin tedavisine ihtiyaç kalmaz. Antral folikülleri içeren oositler profazın mayoz I evresinde yakalanarak, metafazın mayoz II evresine kadar 24-48 saat boyunca *in vitro* kültürde tutulur. Bu süre sonunda olgunlaşan oositler ya standart inseminasyon ya da daha sıklıkla intrasitoplazmik sperm enjeksiyon yöntemiyle fertilize olur<sup>(22,23)</sup>.

IVM ile doğan ilk canlı bebek Cha ve arkadaşları tarafından 1991'de bildirilmiştir<sup>(24)</sup>. 90'ların başından

günümüze kadar olan süreçte, folikülogenez sürecini daha iyi anladıkça, IVM tekniğinde ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunlara örnek, kültür ortamları ve oosit toplama (öncesinde FSH veya hCG ile hazırlama gibi) verilebilir. Günümüzde araştırmacılar over dokusundan *in vitro* foliküler büyümeyi (IVM) ve beraberinde IVF öncesi geliştirme üzerine çalışmaktadırlar. Öte yandan, bugüne kadar yayımlanmış IVM ile ilgili literatürün çoğu olgu sunumu olup, genelde az sayıda hasta içermektedir. Bu sebeple, elde edilmiş data halen yetersizdir. Daha kapsamlı çalışmalar sonrası optimize edilmesi halinde IVM, hem infertil hastalarda hem fertilitate prezervasyonunda, over stimülasyonuna göre daha hasta-dostu bir alternatif sunabilir.

### **Kültür Medyası**

IVM sırasında oositlerin kültür ortamları, gelişimlerinde büyük rol oynar. Oositlerin maturasyonu için gereken birçok kültür medyası bugüne kadar karşılaştırılmış<sup>(25)</sup>, ancak uzmanlar arasında fikir birliği halen oluşmamıştır. Öte yandan, seçilen medyanın oosit maturasyon oranı ve enerji tüketimi üzerinde etkili olduğu ortadadır<sup>(26)</sup>.

Araştırma sonuçları IVM esnasında oositlerin enerji kaynağının piruvat olduğunu göstermiştir<sup>(26)</sup>. Oositlerin IVM'da gonadotropinlerin rolünden dolayı, IVM kültür medyasına genelde rekombinant FSH ve luteining hormone (LH) veya hCG eklenir. Bu yaklaşımla ilgili yapılmış araştırmalar kısıtlı olmakla beraber<sup>(27,28)</sup>, oosit IVM'u sürecinde gonadotropinlerin rolü üzerine ileri düzey çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Kültür medyada genelde bulunan serum, albumin kaynağı ve steroid öncüsüdür. Hem de hücreler için büyüme faktörüdür. Medyada serum yoksa, ek albumin desteği önemlidir<sup>(22)</sup>.

Maturasyon sürecinde, oositlerde epigenetik modifikasyonlar yaşandığından, kültür koşulları ve IVM'in gen imprinting üzerindeki potansiyel etkileri önemlidir<sup>(22,29)</sup>. IVM'in epigenetik modifikasyona etkisini net ortaya çıkaracak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Gelecekte fertilizasyon ve transfer öncesi oositlerin epigenetik profillemesi gerekli olabilir.

### **Oosit Toplama**

IVM'deki oosit toplama tekniği IVF'e oldukça benzerdir. Ancak, toplama öncesi tedavideki iyileştirmeler başarı oranını arttırmıştır. Birçok çalışma

sonucu, oosit toplama öncesi *in vivo* hCG uygulamasının oositlerin IVM oranını arttırdığını göstermiştir<sup>(30-32)</sup>. Bu yaklaşım günümüzde hastalarda PKO olsun olmasın uygulanmaktadır<sup>(33,34)</sup>.

Oosit maturasyonu öncesi *in vivo* FSH tedavisinin, gebelik oranlarına yansımaları gösteren bulgular tutarsızdır. Birçok araştırmacı, FSH tedavisinin, toplanan oosit sayısını ve bu oositlerin maturasyon potansiyelini hem sağlıklı kadınlarda<sup>(35)</sup>, hem PKO hastalarında<sup>(36)</sup> arttırdığını göstermiştir. Ancak, başka çalışmalar bu iki grupta FSH tedavisinin maturasyonu, fertilizasyonu veya gebelik oranını arttırmadığını ortaya koymuştur<sup>(37,38)</sup>. Yakın zamanda Fadini ve arkadaşları, oosit toplama işlemi öncesi değişik gonadotropinleri prospektif olarak uygulamışlardır<sup>(32)</sup>. Çalışmada hiçbir gonadotropinin uygulanmadığı kontrol grubunun yanı sıra, bir gruba sadece FSH, bir gruba sadece hCG ve bir gruba FSH ve hCG verilmiştir. Hem sadece hCG verilen grupta hem hCG ve FSH verilen grupta, oosit maturasyon oranları daha yüksek bulunmuştur. Klinik olarak en değerli bulgu ise, FSH ve hCG verilen grubun en yüksek klinik gebelik oranına (%29,9) sahip olmasıdır. Bu çalışma sonucundan, gonadotropinlerin kombine kullanımlarından fayda sağlanabileceği çıkarımı yapılabilir.

IVM başarısı için oosit toplamanın zamanlaması da çok önemlidir. Son ve arkadaşları PKO hastalarında, dominant folikülün ebadının toplama anındaki ölçüsüyle IVM sonuçlarını karşılaştırmıştır<sup>(39)</sup>. Araştırma sonucu, 14mm'den küçük foliküllerin 14mm'den büyük foliküllere göre daha yüksek implantasyon ve klinik gebelik oranına sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçların, ek prospektif çalışmalarla teyit edilmesi gerekse de, IVM protokollerini iyileştirmek için önemli bir yaklaşım olarak gözükmektedir.

### **Klinik Uygulamalar**

Over hiperstimülasyon sendromu riski olan hastalarda, *in vitro* oosit maturasyonu kapsamlı gonadotropin stimülasyonu gerektirmediğinden büyük avantaj sağlar. Bu sebeple, IVM'in klinik uygulamasıyla ilgili birçok çalışma PKO gibi over hiperstimülasyon sendromu riski yüksek hasta gruplarında yapılmıştır. Çalışma sonuçları, fertilizasyon oranını %73,3<sup>(34)</sup>, implantasyon oranını %21,6 (36), klinik gebelik oranını %40,3<sup>(39)</sup> ve canlı doğum oranını %15,9<sup>(40)</sup> olarak ortaya koymuştur.

Over stimülasyonuna zayıf cevap veren hastalarda

da IVM başarıyla uygulanmaktadır<sup>(39)</sup>. Genelde yeterli oosit büyümesi olmadığında veya eksojen gonadotropinlere cevap veren oosit sayısının yetersizliği sebebiyle siklus iptal olabilmektedir. Ancak Liu ve arkadaşları bu tip hastalarda olgunlaşmamış oositlerin (çapı  $\leq 14$ mm) aspire edilip, *in vitro* olgunlaşabileceğini göstermişlerdir<sup>(41)</sup>. Bu çalışmanın sonucunda, fertilizasyon oranı %78,8, implantasyon oranı %20 ve toplam 8 siklusa 2 canlı doğum (1 devam eden gebelik) verileri ortaya çıkmıştır. Tüm bu nedenlerle IVM, hiper cevap verenler kadar, zayıf cevap verenler için de ilginç bir seçenek olabilir.

### ***In Vitro Foliküler Gelişim***

Hiperstimülasyon riski olanlar veya gonadotropinlere zayıf cevap verenler için oositlerin IVM'u heyecan verici bir seçenek sunsa da, foliküllerin antral evrede olması gerekmektedir. Öte yandan, *in vitro* gelişimde foliküller, primordial veya preantral evrelerde toplanır. Bu tekniğin ana amacı foliküllerin antral evreye kadar gelişimini sağlamaktır. Kemoterapi ya da radyasyon tedavisi gören hastalarda fertilité prezervasyonu için *in vitro* gelişim sonrası IVM'de başarı sağlanması çığır açıcı bir gelişme olur. Henüz başarılı bir gebelik bildirilmemiş olmasına rağmen, araştırmacılar hem insanlar hem hayvanlar üzerinde çalışmalarına devam etmektedir.

Bu işlem için öncelikle over kortikal dokunun biyopsisi gerekir. İnsanlar üzerindeki çalışmalarda biyopsi genelde jinekolojik ameliyat ya da sezaryan esnasında yapılmıştır<sup>(42-44)</sup>. Kültüre konmadan önce, foliküller ya mekanik olarak<sup>(45)</sup> ya da etraf over stromasının enzimatik eritilmesiyle<sup>(42)</sup> izole edilir. Genelde yeterli sayıda folikül izole edilse de, büyük ihtimalle over stroma desteğinden uzak kaldığından foliküller kültürde birkaç gün içinde atreziye uğrarlar. Bu sebeple araştırmacılar primordial foliküllerin *in situ* kaldığı over korteks şeritlerini kültürde saklamaya başlamışlardır<sup>(43,44)</sup>. Bu metodun uygulandığı bir çalışmada, over korteksindeki foliküllerin %66'sı kültürde 4 hafta bozulmadan kalmış ve çoğu primer veya sekonder gelişim evrelerine girmiştir<sup>(44)</sup>. Bu metotla elde edilen oositlerin, yeterli maturasyonu sağlayıp, başarıyla fertilize olma oranı hakkında daha fazla çalışma gerekmektedir.

İki basamaklı kültür sistemiyle, Telfer ve arkadaşları *in vitro* olarak primordiyal/primer folikülleri antral evreye kadar olgunlaştırmışlardır<sup>(43)</sup>. Serum

içermeyen medyada over kortikal doku biyopsileri 6 gün kültüre edilmiş ve sonrasında preantral folikülleri izole edilip, activin A ile tekrar kültüre edilmiştir. Antral formasyona sadece %30 oosit ulaşabilmiş olsa da, bu teknik IVM öncesi foliküllerin *in vitro* gelişimi için bir alternatif oluşturabilir.

IVM öncesi *in vitro* gelişim için kullanılan teknikten bağımsız, oositler enerji kaynağı olarak piruvat kullanırken, somatik hücreler (folikül içinde oositi çevreleyen granuloza ve teka hücreler gibi) glukozu ihtiyaç duymaktadır. Bu sebeple, medyaya eklenecek maddeler doğru gelişim ortamını yaratmak için özenle seçilip, ayarlanmalıdır.

### **Sonuç**

Yukarıda bahsi geçen gelişmelerin farklılıklarına rağmen, ortak amaç aynı olup; başarı oranını arttırırken, hasta güvenliğini de iyileştirmektir. YÜT'de çoklu gebelik önemli bir konu iken, tek embriyo transferi ikiz veya çoklu gebelik insidansını düşürmek için tek çözümdür. Ancak, tek embriyo transferi, çoklu embriyo transferine eş değer sonuçlar sağlamadığı sürece, kullanımı bizdeki gibi ancak konuyla ilgili zorunlu yasalar koyan devletlerle sınırlı olacaktır. Sekretomikler ve metabolomikler sayesinde en yüksek reproduktif potansiyeli olan, genetik olarak da sağlıklı embriyoları seçebilme yetimiz artarsa, tek embriyo transferi optimize hale gelebilir. IVM tekniği ise over hiperstimülasyon sendromu riskini azaltarak, hasta güvenliğini arttırabilir. Ayrıca IVM, zayıf cevap veren veya fertilité prezervasyonuna ihtiyaç duyan hastalarda ilginç bir alternatif olabilir. Rutin klinik uygulamalara geçmeden önce kapsamlı araştırmalara gerek olsa da, yukarıda bahsi geçen yakın dönemli gelişmeler YÜT sonuçlarını iyileştirmede büyük umut vaat etmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Society for Assisted Reproductive Technology IVF database. <http://www.sart.org>
2. Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C and Coticchio G. Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 653- 68.
3. McReynolds S, Vanderlinden L, Stevensens J, Hansen K, Schoolcraft W, Katz- Jaffe M. Lipocalin-I: a potential marker for noninvasive aneuploidy screening. *Fertil. Steril* 2011; 95: 2631- 3.
4. Picton H, Elder K, Houghton F. Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *Molecular Human Rep.* 2010: 557- 69.
5. Latham KE, Garrels JI, Chang C, and Solter D. Analysis of embryonic mouse development: construction of a high-resolution, two-dimensional gel protein database. *Appl Theor Electrophor* 1992; 2: 163- 170.
6. Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S and Fischer B. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction* 2004; 128: 503- 16.
7. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A and Baricordi OR. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005; 20: 138- 46.
8. Katz-Jaffe MG, Gardner DK and Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 2006; 85: 101- 7.
9. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB and Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2006; 86: 678- 85.
10. Sandoval JA, Hoelz DJ, Woodruff HA, Powell RL, Jay CL, Grosfeld JL, Hickey RJ, Malkas LH. Novel peptides secreted from human neuroblastoma: useful clinical tools? *J Pediatr Surg* 2006 ;41: 245- 51.
11. Wang Y, Puscheck EE, Lewis JJ, Trostinskaia AB, Wang F, Rappolee DA. Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and P38MAPK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media. *Fertil Steril* 2005; 1: 1144- 54.
12. Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A and Simón C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008; 23: 1993- 2000.
13. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM and Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007; 88: 1350- 7.
14. Seli E, Botros L, Sakkas D and Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008; 90: 2183- 9.
15. Botros L, Sakkas D and Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2009; 14: 679- 90.
16. Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A and Baricordi OR. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002; 32, 311- 315.
17. Sher G, Keskinetepe L, Fisch JD, Acacio BA, Ahlering P, Batzofin J and Ginsburg M. Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 2005; 83: 1410- 3.
18. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K and Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 2008; 90: 77- 83.
19. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, Burns DH and Lambalk CB. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 2008; 23: 1499- 1504.
20. Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, Yamashita N, Kato O and Sakkas D. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010; 94(2): 535- 42.
21. MacDougall MJ, Tan SL, Balen A and Jacobs HS. A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1993; 8: 233- 237.
22. Picton HM, Harris SE, Muruvi W and Chambers EL. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction* 2008; 136: 703- 15.
23. Loutradis D, Kiapekou E, Zapanti E and Antsaklis A. Oocyte maturation in assisted reproductive techniques. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1092: 235- 46.

24. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY and Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro, and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109- 13.
25. Filali M, Hesters L, Tachdjian G, Tachdjian G, Frydman R and Frydman N. Retrospective comparison of two media for in-vitro maturation of oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 250- 6.
26. Roberts R, Franks S and Hardy K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod* 2002; 17: 2950- 6.
27. Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, Jones GM and Trounson AO. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15: 1140- 8.
28. Ge HS, Huang XF, Zhang W, Zhao JZ, Lin JJ and Zhou W. Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008; 89: 98-103.
29. Huntriss J and Picton H. Epigenetic consequences of assisted reproduction and infertility on the human preimplantation embryo. *Hum Fertil* 2008; 11: 85- 94.
30. Chian RC, Gulekli B, Buckett WM and Tan SL. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1999; 341: 1624- 6.
31. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T and Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 165- 170.
32. Fadini R, Dal Canto MB, Mignini Renzini M, Brambillasca F, Comi R, Fumagalli D, Lain M, Merola M, Milani R and De Ponti E. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2009; 19: 343- 51.
33. Holzer H, Scharf E, Chian RC, Demirtas E, Buckett W and Tan SL. In vitro maturation of oocytes collected from unstimulated ovaries for oocyte donation. *Fertil Steril* 2007; 88: 62- 7.
34. Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R and Frydman N. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005; 20: 420- 4.
35. Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH and Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod* 1998; 13: 3132- 8.
36. Mikkelsen AL and Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122: 587- 92.
37. Mikkelsen AL, Smith SD and Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 1999; 14: 1847- 51.
38. Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, Hsieh BC, Huang SC, Chen CY and Chen PH. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 2003; 18: 1632- 6.
39. Son WY, Chung JT, Herrero B, Dean N, Demirtas E, Holzer H, Elizur S, Chian RC and Tan SL. Selection of the optimal day for oocyte retrieval based on the diameter of the dominant follicle in hCG-primed in vitro maturation cycles. *Hum Reprod* 2008; 23: 2680- 5.
40. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B and Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 665- 70.
41. Liu J, Lu G, Qian Y, Mao Y and Ding W. Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 80: 447- 9.
42. Rice S, Ojha K and Mason H. Human ovarian biopsies as a viable source of pre-antral follicles. *Hum Reprod* 2008; 23: 600- 5.
43. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C and Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod* 2008; 23: 1151- 8.
44. Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K and Winston RM. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum Reprod* 1999; 14: 2519- 24.
45. Abir R, Franks S, Mobberley MA, Moore PA, Margara RA and Winston RM. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 1997; 68: 682- 8.