

Farklı Evrelerdeki Oositlerin Maturasyon-Fertilizasyon ve Bölünebilme İlişkisinin İncelenmesi

INSPECTION OF THE MATURATION-FERTILIZATION AND CLEAVAGE RELATIONSHIP OF THE OOCYTES IN DIFFERENT PHASES

Mehmet CINCIK*, Şaban SEZEN**, Tansu KÜÇÜK***

* Yrd.Doç.Dr., GATA, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,

** Uz.Dr., GATA, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,

*** Doç.Dr., GATA, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, ANKARA

Özet

İn-vitro fertilizasyon (IVF)'da başarısızlık oranının büyük bir kısmını oosit immatüritesi oluşturmaktadır. Bunların in-vitro matürasyon (IVM) sürecinden geçmeleri gerekmektedir. Çalışmada maturasyon, fertilizasyon ve bölünebilme ilişkisi irdelenerek, oositlerin in-vitro maturasyon ve fertilizasyon yeteneklerinin belirlenmesi amaçlandı.

GATA IVF merkezine farklı zamanlarda başvuran 32 hastadan follikül aspirasyonu yapılarak toplanan 150 immatür (PI), 176 intermediate (MI), 435 matür (MII) olmak üzere toplam 761 insan oositi incelendi. 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda insemine edilen matür oositlerde fertilizasyon oranı %92 iken, IVM için 6-48 saat süreyle inkübe edilen immatür oositler grubunda bu oran, profaz I (PI) olanlarda %48, metafaz I(MI)'lerde %74 olarak bulundu. Fertilize olan oositlerin bölünebilme oranları ise, olgun oositlerde (MII) %84 iken, PI oositlerde %34 MI oositlerde %62.5 olarak gözlemlendi. Sonuç olarak, matürasyon ilerledikçe fertilizasyon yeteneği artmaktadır. MII evresindeki oositler, fertilizasyon yeteneği en yüksek oositlerdir.

Anahtar Kelimeler: Oosit, İn-vitro maturasyon, Fertilizasyon

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:77-82

Summary

The big part of the unsuccessful rate at IVF is composed of oocyt immaturity. These must pass through IVM phase. In this study, it is aimed to explain the abilities of in-vitro maturation, fertilization and cleavage of oocytes by discussing the relationship between them.

Total 761 oocytes (150 immature, 176 intermediate, 435 mature) picked up by performing follicle aspiration from the 32 patients who applied to GATA IVF center in different periods were inspected. While the fertilization rate is 92% on inseminated mature oocytes at the end of a six hour incubation period, for IVM on the immature oocytes groups incubated 6-48 hours, this rate was found 48% on prophase I (PI), 74% on metaphase I (MI). The rate of cleavage of fertilized oocytes was found 84% on mature oocytes (MII), while it was seen 34% on PI oocytes and 62.5% on MI oocytes.

As a result, the more maturation proceeds the more fertilization ability increases. Oocytes on MII phase are the ones, which have the most fertilization ability.

Key Words: Oocyt, In-vitro maturation, Fertilization

T Klin J Med Sci 2001, 21:77-82

Yardımcı Ureme Teknikleri(YUT)'nde fertilizasyon, inseminasyondan 18-20 saat sonra 2 pronükleusun (2PN) görülmesi olarak tanımlanmaktadır (1,2). Fertilizasyonun olmayışı cins hücrelerinden birinde reseptör yokluğundan dolayı spermiumun zonaya bağlanamamasından kaynaklanabilir.

Geliş Tarihi: 11.02.2000

Yazışma Adresi: Dr.Mehmet CINCIK
GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD
Etlik, ANKARA

T Klin J Med Sci 2001, 21

Bağlandıktan sonra ise zonadaki glikozaminoglikanların yapısındaki bozukluklar nedeniyle zonayı geçememesine bağlı olabilir. Zonayı geçen spermium yapı bozukluklarından dolayı oosit zarını geçemeyebilir, hatta zarı geçse bile kromatin yapısındaki bozukluk ya da teması (dekondensasyonu) indükleyen oosit faktörlerinin olmayışı nedenleriyle 2PN oluşamayabilir.

YÜT'de fertilizasyonun olmaması, belli bir sürede 2PN görülememesi ile saptanır, ancak fertilizasyon mekanizmasının hangi basamağındaki

bozukluktan kaynaklandığını anlamak güçtür (3). IVF'deki fertilizasyon başarısızlıklarından bir kısmı da spermium faktörüne bağlıdır. Oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia ya da bunların birarada bulunması fertilizasyon oranını düşürür. Sadece akrozom reaktif spermiumlar oosit ile füzyon olabilir ve erkek pronükleusu oluşturabilirler.

Fertilizasyonda spermium kalitesinin yanısıra oosit kalitesi ve olgunluğu da önem taşır (4,5). YÜT'de induksiyonun arkasından genellikle çapı 16 mm.'den büyük olan folliküllerden ovulasyon öncesi (preovuluar) oositler aspire edilmektedir. Bunlardan fertilizasyon yeteneği yüksek olanlar 1.kutup hücresinin görülebildiği matür metafaz II (MII) oositlerdir. Toplanan oositlerden immatür ve intermediate olanların döllenebilme yeteneğinin olmayışı fertilizasyon oranının düşük olmasına neden olmaktadır. Bunların in-vitro matürasyon (IVM) sürecinden geçmeleri gerekmektedir.

Matürasyonunu in-vitro olarak tamamlayan germinal vezikül (GV) evresindeki profaz I (PI) ve metafaz I (MI-intermediate) oositlerin döllenildiği rapor edilmiştir (6-10). Oositin in-vitro maturasyonu konusunda başdöndürücü çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda hayvanlarda, in-vitro olarak RNA gen transferi ile oosit aktive edilerek, IVM'nu sağlanmaya çalışılmaktadır (11). Bu çalışmada maturasyon ve fertilizasyon ve bölünebilme ilişkisi irdelenerek, matür ve immatür oositlerin, in-vitro maturasyon ve fertilizasyon yeteneklerinin belirlenmesi ve bölünenlerin embriyo kalitelerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

GATA IVF merkezine farklı zamanlarda başvuran 32 hastadan follikül aspirasyonu yapılarak toplanan 150 immatür (PI), 176 intermediate (MI), 435 matür (MII) olmak üzere toplam 761 insan oositi incelendi.

Ayrıştırılan oositler inkübatöre (Salvis-Bio-center 2001) kaldırıldı. İnkübatör, sabit olarak, ısıyı 37°C, nemi %90 ve karbondioksit konsantrasyonunu %5 düzeyinde olacak şekilde düzenlendi. pH'nın 7.4 ve osmolaritenin 280-284 mOsmol olmasına özen gösterildi ve çalışmanın ayrı basamaklarında, pHmetre (PHU-92) ve Osmometre (Knauer) ile kontrol edildi.

Ham's F-10 tozu hazır alınarak kendi laboratuvar şartlarımızda besiyeri hazırlandı. Buna %10-15 maternal serum ya da fetal kordon serumu 56°C da filtre edilip eklendi. 500 ml içine 0.03mg penisillin G (Sigma-ABD), 0.025 mg streptomisin (Sigma ABD) katıldı.

Toplanan oositler, oosit maturasyon indeksindeki parametreler kullanılarak sınıflandırıldı. Oosit çevresindeki kumulus-korona hücre kompleksi (OKK)'nin histolojik yapısı, GV'ün parçalanıp parçalanmadığı ve birinci kutup hücresinin atılıp atılmadığına bakılarak olgunluk derecelerine göre ayrıldı. 4-6 saat inkübasyondan sonra, eşlerinin swim-up yöntemi uygulanmış spermiumları ile insemine edildi.

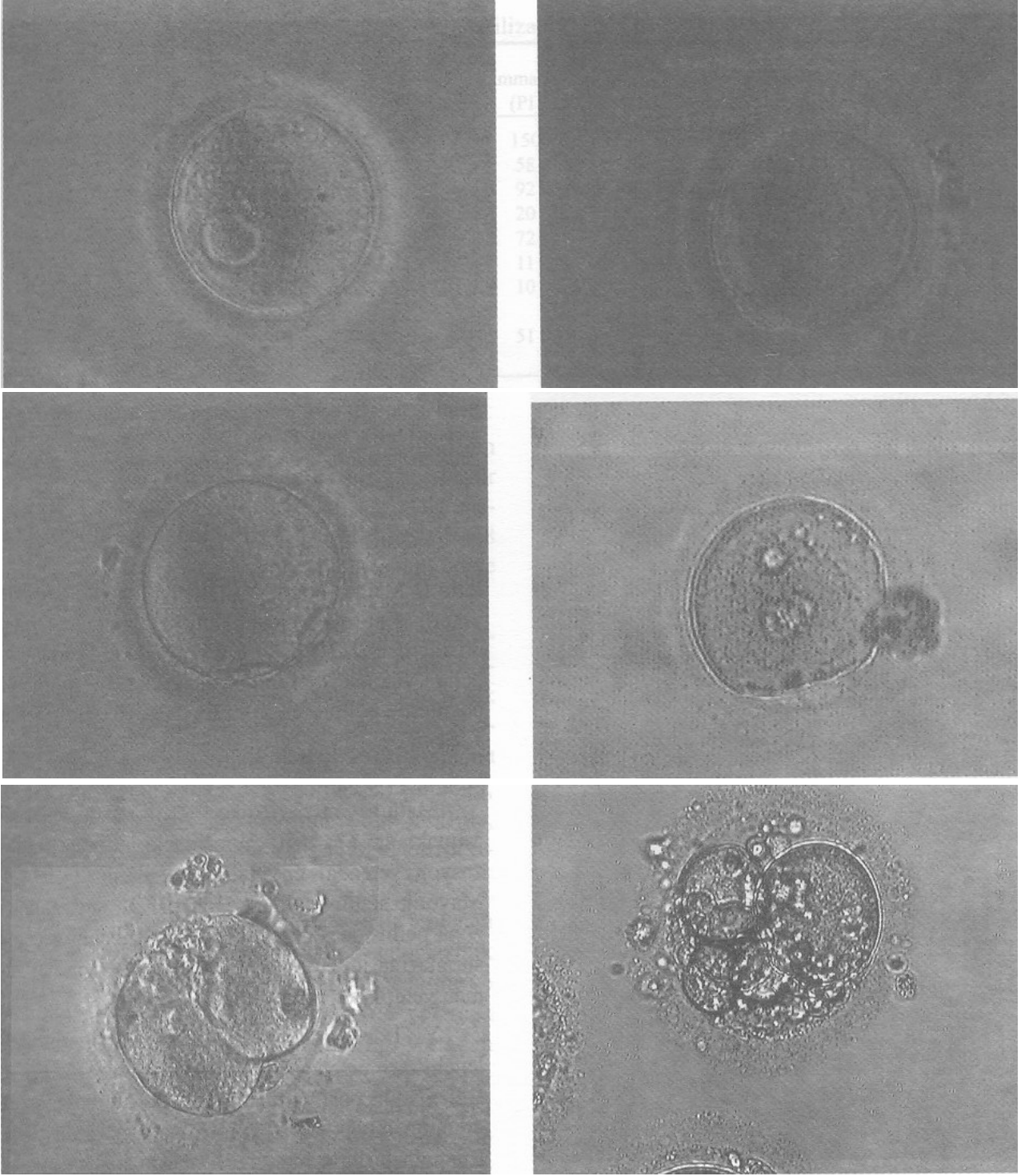
Mikroenjeksiyonu planlanan hastalardan alınan oositlerin olgun olanları, iki saatlik preinkübasyondan sonra, sitoplazmalarını görüntülemek ve çekirdek statülerini saptayabilmek için, bir dakika süreyle hyaluronidaz (Hyase-10x-Scandinavian IVF Science AB) enzimiyle muamele edildi. Bu yolla kimyasal temizliğin ardından, alevde inceltmiş Pasteur pipetleri yardımıyla kumulus ve korona hücreleri mekanik olarak uzaklaştırılıp denudasyon sağlandı. Böylece sitoplazmik olgunlaşma daha net değerlendirildi. Oositlerin IVM, fertilizasyon ve bölünme periyodundaki kaliteleri Sony Color Video Printer-Thermal Kamera kullanılarak görüntülendi.

Bulgular

IVM'nu sağlanmaya çalışılan, 150 immatür (PI) ve 176 intermediate (MI) oositin 435 matür (MII) oosite kıyasla, döllenebilirlik açısından bir karşılaştırması Tablo 1'de görülmektedir.

Tablodan da görüleceği üzere, 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda insemine edilen olgun (MII) oositlerde fertilizasyon oranı %92 iken, IVM için 6-48 saat süreyle inkübe edilen olgun olmayan oositler grubunda, bu oran, PI olanlarda %48, MI'lerde %74.4 idi ($t=9.96$; $p<0.001$).

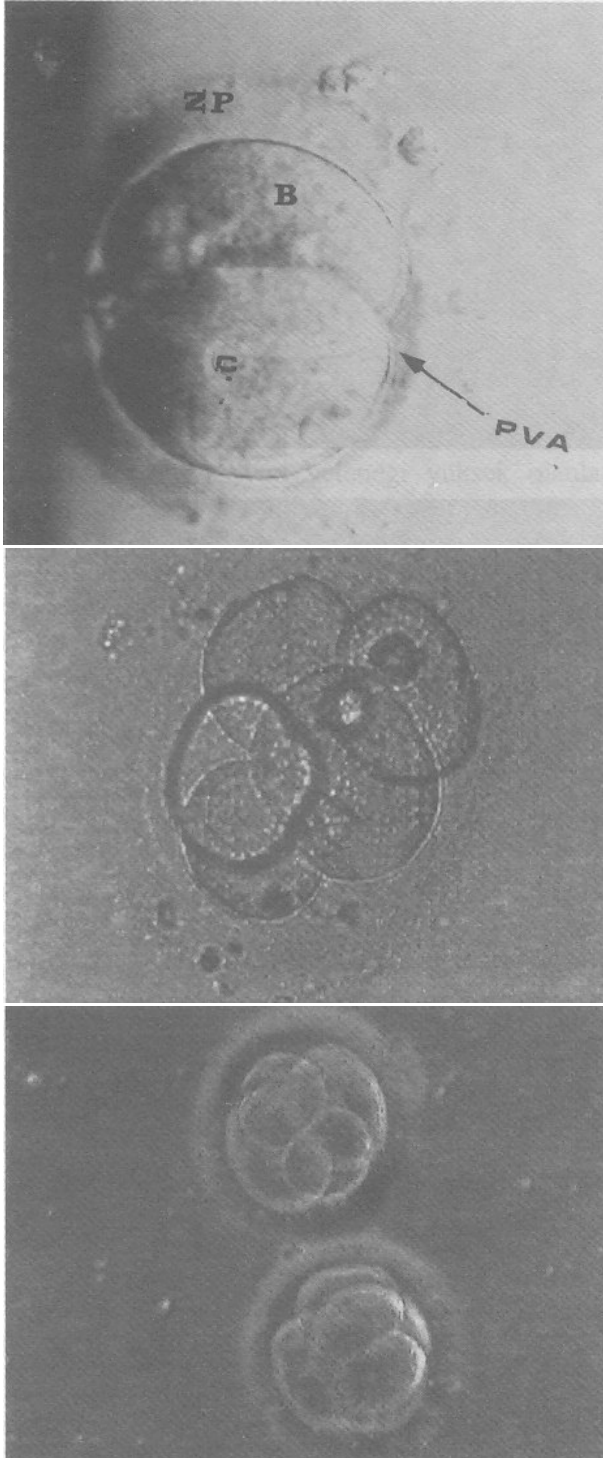
Fertilize olan oositlerin bölünebilme oranları ise, olgun oositlerde %84 iken, Profaz I oositlerde %34 Metafaz I oositlerde %62.5 olarak gözlemlendi. Olgun olmayan oositlerde, poliploidi oranı nisbeten daha yüksek bulundu ($t=10.55$; $p<0.001$).



Şekil 1. (a) PI oositi gösteren mikrograf. GV seçilmektedir. (b) MII oosit. Aynı oositin 28 saat sonraki olgun hali. 1. kutup hücresi atılmıştır. (c) Aynı oositin pick-up'tan 36, inseminasyondan 16 saat sonraki TII statüsü. İkinci kutup hücresi atılmıştır. (d) Aynı oositin pick up'tan 39, inseminasyondan ise 22 saat sonraki, fertilize olduğunu gösteren mikrofotoğraf. İki pronükleus seçilmektedir. (e) Aynı oositten gelişen iki blastomerli orta kalite (Grade III) embriyonun mikrofotoğraf. (f) Aynı oositten gelişen dört blastomerli kötü kalite (Grade IV) embriyonun mikrofotoğraf.

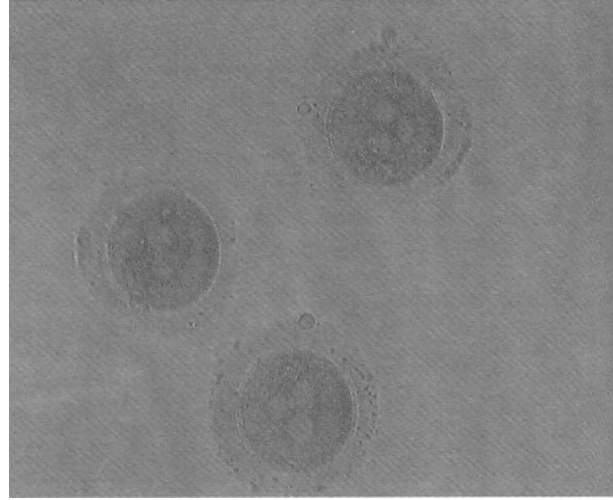
MI oositlerin fertilizasyon ve bölünebilme (yarıklanma=cleavage) oranlarının da göreceli

olarak PI oositlerden yüksek olduğu görüldü. PI oositlerin %62'si, MI oositlerin %86'sı, IVM'nu



Şekil 2. (a) MII oositin döllenmesi ile gelişen iyi kalite embriyo örneği. 2 blastomerli aşama. B: Blastomer, Ç: Blastomer çekirdeği, ZP: Zona pellusida, PVA: Perivitellin aralık (b) Işık mikroskobunda 5 blastomerli embriyo görüntüsü (c) Faz kontrast mikroskobunda 4 blastomerli embriyonun görüntüsü.

tamamladı ($t=5.059$; $p<0.01$). Gelişen embriyo kaliteleri açısından skorlandığında, PI ve MI oosit-



Şekil 3. (a) MII oositin döllenmesi ile gelişen normal fertilizasyon (2PN). (b-c) PI oositlerin IVM'dan sonra insemine edilmeleri sonucu gelişen anormal fertilizasyon örnekleri (3PN-poliploidi).

lerin IVM'ndan sonra gelişen embriyoların genelde yeterli kaliteye ulaşamadığı gözlemlendi. Olgun oositlerden (MII) gelişen embriyoların skorları ise daha yüksek bulundu (Şekil 1,2). İmmatür oositlerde poliploidi oranı da daha yüksekti (Tablo 1, Şekil 3).

Tartışma ve Sonuç

Matürasyon ilerledikçe fertilizasyon yeteneği artmaktadır (7). MII evresindeki oositler fertilizasyon yeteneği en yüksek olanlardır (6,12,13). Mayotik statünün MII'de olması ve spermiumun zona pellusida (ZP) ile oosit zarı engelini geçerek sitoplazma içine girmesi de döllenme için her zaman yeterli değildir (14-16).

YÜT'de toplanan PI ve MI oositlerin döllenme yeteneği bulunmamaktadır (6,10,17). Dolayısıyla oosit immatüritesi IVF'de başarısızlık oranının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (7,9). Bununla birlikte, matürasyonlarını in-vitro olarak tamamlayan PI ve MI oositlerin döllenmediği bildirilmiştir (10,18). Çalışmamız bu görüşü desteklemektedir.

Mandebaum ve arkadaşları(19) anfertile oositlerde 42 saat sonunda yaptıkları sitogenetik analizlerde, %26 oranında kromozom anomalisine rastlamışlardır (%38'i >35 yaş, %24'ü genç). YÜT'lerinde, en sık rastlanan fertilizasyon anoma-

Tablo 1. PI, MI ve MII oositlerin maturasyon-fertilizasyon ilişkisinin incelenmesi

Oositin Evresi	İmmatür (PI)	%	İnter-mediate (MI)	%	Matür (M II)	%
Toplam Oosit Sayısı	150		176		435	
In Vitro olarak matürasyonunu tamamlayamayanlar	58	38	24	15	-	-
In vitro olarak matürasyonunu tamamlayanlar	92	62	152	86	-	-
IVM'nunu tamamlayan ancak fertilize olmayanlar	20	13.3	21	11.9	351	8
Fertilize olanlar	72	48	131	74.4	400	92
Poliploidi gözlenenler	11	7.3	12	6.8	24	5.5
Döllenmelerine karşın bölünmeyip 2PN aşamasında kalanlar	10	6.6	9	5.1	10	2.5
Döllenip bölünerek (yarıklanma: cleavage) transfer edilenler	51	34	110	62.5	366	84

lilerini triploidi ve prematür spermium kromozom kondensasyonu (PCC) olarak bildirmişlerdir (20,21). Çalışmamızda, biz de fertilizasyon anomalisi olarak PI oositlerde %7.3, MI oositlerde %6.8 ve MII oositlerde ise %5.5 oranında poliploidiye rastladık.

Matürasyon, fertilizasyon ve bölünebilme ilişkisini irdelediğimiz çalışmamızda, YÜT'lerde döllenememenin olası nedenleri arasında; mayotik irregülarite (immatürite, nükleer defektler, sitoplazmik faktörler, kortikal granül reaksiyonunun olmayışı, GV'ün yıkılmaması, 1. kutup hücresinin atılmaması gibi), kromozom anomalileri (diploidi, triploidi, 2. kutup hücresinin atılmaması gibi) ile, sperm ve oositteki aktivasyon kaybının olabileceğini değerlendirmektediriz.

Blerkom ve arkadaşları stimülasyonla toplanan oositlerin, sitoplazmasında agranüler endoplazmik retikulum (AER) artışının gecikebileceğini ve dolayısıyla sitoplazmik matürasyon ile çekirdek matürasyonu arasındaki eşzamanlılığı ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir (22,23). Çalışmamızda 1. kutup hücresinin atılmış olsa bile MII oositlerin bir kısmının döllenememesinin nedeninin bu eşzamanlılıktan kaynaklandığı kanısındayız.

Fukui ve arkadaşlarının (24) %26-40 olarak bildirdiği IVM oranı, çalışmamızda PI oositler için %62, MI oositler için %86 olarak bulunmuştur ($t=5.059$; $p<0.01$). L. Veeck ve arkadaşlarının (25) IVM'nu sağlamış oositlerde %82 olarak bildirdiği fertilize olan oosit oranı da çalışmamızda, PI oositler için %48, MI oositler için %74.4 olarak bulunmuştur (Tablo 1).

MII oositlerde ise fertilizasyon oranı %92 bulunmuştur. Ancak, bunların fertilizasyondan sonra bölünebilme ve transfer edilebilme oranları, PI oositlerde %34, MI oositlerde %62.5'da kalmıştır. MII oositlerde bu oranın %84 olması, IVM ile matür hale getirilen oositlerden embriyon elde etme potansiyelinin daha düşük olduğunun kanıtıdır. IVM'ları sağlanan immatür oositlerin fertilize olmaları (2PN), bölünebilmeleri ve transfer edilebilmelerinin sağlanması, YÜT'lerin başarısını arttıracaktır. IVM sürecinden sonra fertilize olup embriyo gelişebilmekle birlikte bunların kalitesinin artırılmasına yönelik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Şeftalioğlu A. Genel İnsan Embriyolojisi, Ankara, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd Şti. 1996.
- Fulka J Jr, et al. Electrofusion of mammalian oocytes and embryonic cells Methods Mol Biol 1995; 48: 309-16.
- Ouna C, et al. Ultrastructurel studies on the fertilization of mammalian gametes. Int Rex Cytol 1990, No: 122: 105-51.
- Delilbaşı L. Tüp bebek, YÜT'de laboratuvar yöntemleri, Fırat Ofset, Ankara, 1997.
- Sathananthan AH. Human microinsemination by injection of single or multiple sperm: ultrastructure. Human Reproduction 1989; 4:574-83.
- Gruzinskas JG, Yovich JL. Gametes-The Oocytes. Cambridge Univ. Press Cambridge 1995.
- Plachot M., Mandebaum J. Oocyte maturation fertilization and embryonic Growth In Vitro. British Medical Bulletin 1990; 40(3): 675-94.
- Notta Pietro M., Nottola Stefania A. Ultrastructure of human unfertilized oocytes and polyspermic embriyos in an IVF - ET program In, The Text of IVF and Other Assisted Reproduction University Press Rome - 1987.

9. Galli C, et al. Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro Bull Assoc Anat 1991; 75: 67-71.
10. Tesarik J et al. Progression of oocyte maturation from metaphase I to metaphase II is disturbed by previous immunological interference with cumulus cell function. Exp Zool 1991; 260(1): 116-24.
11. Nelson Y, Marianne O, Gene M. Transforming efficiencies correlate with oocyte maturation and cytostatic factor activities, American Society For Microbiology, 1991.
12. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993.
13. Rowe PJ, Hargreave TB. Hand book of IVF Cambridge, Cambridge University Press, 1993.
14. Asch R, Simerly C. The stages at which human fertilization arrests microtubule and chromosom configuration in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans, Molecular Human Reproduction 1995; 1:1897-906.
15. Grandin N., Rolland JP. Changes in intracellular pH following egg activation and during the early cell cycle of the amphibian pleurodeles walt/ii. coincide with changes in mpf activity, Biol Cell Elseveier, Paris, 1991: 72,259-67.
16. Simerly CR, Hecht NB. Tracing the incorporiton of the sperm tail in the mouse zygote and early embriyo using an anti-testicular α -tubulin antibody, Developmental Biology 1993; (158),536-48.
17. Lopata A. The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation Ann NY Acad Sc: USA 1988; 541:324-36.
18. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes The Lancet I 1965; 926-9.
19. Tarin JJ, Ruiz A. Failed in vitro fertilization of human oocytes. A cytogenetical analysis - Fertility and Sterility. The American Fertility Society, 1991.
20. Eichenlaub-Ritter U. et al. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient; indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. Hum Reprod 1995; 10 (9): 2343-9.
21. Bos-Mikich A, et al. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. Biol Reprod. Oct; 53 (4): 1995; 780-5.
22. Prather RS, Eichen PA. Artificial activation of porcine oocytes matured in vitro, Molecular Reproduction And Development 1991; 28: 405-9.
23. Blerkom J.V., Motta P.M. Ultrastructure of human gametogenesis and early embriyogenezis. Kluwer Academic Publishers, 1989.
24. Fukui Y, Mc Gowan LT. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. Journals of Reproduction and Fertility 1991.
25. Veeck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus, Williams -Wilkins, Phila. 1992.