

# Farklı Kültür ve İnkübasyon Modellerinin Oosit İn-Vitro Maturasyonuna Etkileri

## THE EFFECTS OF DIFFERENT CULTURE AND INCUBATION MODELS ON OOCYT IN-VITRO MATURATION

Mehmet CINCIK \*, Şaban SEZEN\*\*, Ömer COŞKUN\*\*, Cem KORKMAZ\*\*\*, H. Mesut ÖZSOY\*\*\*\*

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

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

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

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

### Özet

İn-vitro maturasyon (IVM)'un başarısını araştırmak amacıyla, farklı kültür ve inkübasyon modelleri kombine edilerek oosit kültürü için en uygun kültür ortamı ve serum desteği bulunmaya çalışıldı.

GATA IVF merkezine bir yıl içinde farklı zamanlarda başvuran 120 hastadan, kontrollü ovarian hiperstimülasyon (KOH) uygulanarak alınan olgunlaşmamış profaz I (PI) ve metafaz I (MI) oositler (n=970) farklı koşullarda ve farklı zamanlarda kültüre edildi. Farklı kültür ve inkübasyon modellerinde metafaz II (MII)'ye ulaşan matür oositlerin sayısı ve oranları belirlendi.

37°C'de, %75-98 nem, %5 CO<sub>2</sub> inkübatör koşullarında (pH:7.4) farklı besi yerlerine, %10-15'lik fetal kordon serumu (FCS) eklenmesiyle oluşturulan kültür ortamlarının, olgunluğunu tamamlayabilen (MII) oosit sayısını arttırdığı için, en başarılı model olduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Oosit, İn-vitro maturasyon, Medium, İnkübasyon

T Klin Tıp Bilimleri 2000, 20:291-294

### Summary

The best culture models and serum support for oocyt culture by combining different incubation models to research in-vitro maturation (IVM) success have been tried to be found. By using controlled ovarian hyperstimulation (COH) immature prophase I (PI) and metaphase I (MI) oocytes (n=970) taken from 120 patients who applied to GATA IVF center in different periods in one year were cultured in various time and conditions. The number and rate of mature oocytes which could reach to metaphase II (MII) in different culture and incubation were determined.

At the incubator conditions of 37 °C, 75-98% humidity and 5% CO<sub>2</sub> (pH:7.4), the cultural environments produced by adding 10-15% fetal cord serum (FCS) to the different media are found as the most successful model, increasing the mature oocytes number that could complete their maturity.

**Key Words:** Oocyt, In-vitro maturation, Medium, Incubation

T Klin J Med Sci 2000, 20:291-294

Yardımcı üreme tekniklerin (YÜT)'de, kontrollü ovarian hiperstimulasyondan (KOH) sonra, genellikle 16-25 mm çapındaki folliküllerden toplanan olgun oositlerde, inseminasyon zamanı, oosit toplama (oocyte pick-up) işleminden sonraki ilk 4-6 saatler arasındadır. Bu zaman aralığı gebelik şansını arttıran bir faktördür (1,2).

**Geliş Tarihi:** 11.02.2000

**Yazışma Adresi:** Dr.Şaban SEZEN  
GATA Tıbbi Histoloji ve  
Embriyoloji AD, Etlik, ANKARA

T Klin J Med Sci 2000, 20

Genellikle 16 mm'den küçük çaplı folliküllerden toplanan germinal vezikül (GV)'ün görüldüğü immatür (Profaz I) ve intermediate (Metafaz I) oositlerin ise olgunlaşma süreleri, kültür ortamı içinde, in-vitro olarak devam eder. Matür olmayan bu oositlerin in-vitro maturasyon (IVM) sürecinden geçmeleri gerekmektedir. İn-vitro fertilizasyonda (IVF) başarısızlık oranının büyük bir kısmını oosit immatüritesi oluşturmaktadır (3-6).

IVM için kültür sistemlerinin başarısının farklı parametrelerin doğru kombinasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir (7). Bu amaçla, farklı kültür

ve inkübasyon modelleri kombine edilerek oosit kültürü için en uygun kültür ortamı ve serum desteği bulunmaya çalışıldı.

### Gereç ve Yöntem

GATA IVF merkezine 1997-1998 yıllarında farklı zamanlarda başvuran 72 hastadan, kontrollü ovarian hiperstimülasyon (KOH) uygulanarak alınan olgunlaşmamış oositlerden profaz I (PI) ve metafaz I (MI) oositler (n=970) farklı koşullarda ve farklı zamanlarda kültüre edildi.

Oositler, hCG uygulamasından 34-36 saat sonra ultrasonografi (Kretz-Müni) eşliğinde tek ya da çift lumenli aspirasyon iğnesi (Cook 1735 G) ile follikül aspirasyonu yapılarak toplandı. Embriyoloji laboratuvarına aspirasyon sıvısının içinde gelen oositler, laminar flowda (K-System-Holten, Danimarka), stereomikroskop (Leica Wild MZ8 - Almanya) altında incelendi. Hastanın tahmin edilen oosit sayısına göre bir gün önceden hazırlanmış Petri dishlerindeki dengelenmiş kültür sıvısına cam Pasteur pipeti yardımıyla alınan immatür oositler ayrıldı.

Oosit kültürü için, Ham's F-10 (Seromed-Berlin-Almanya) IVF-50 (Scandinavian IVF Science-AB, İsveç), Medi= Cult (Danimarka), Menezo B2 (Fransa) HTF (USA)v.b. gibi farklı besiyerleri (mediumlar) kullanıldı (Tablo 1). 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 kompleman inaktivasyonundan sonra filtre edilip eklendi. 500 ml içine 0.03mg penisillin G (Sigma-ABD), 0,025 mg streptomisin (Sigma ABD) katıldı. Diğer besiyerleri hazır ticari şekilleriyle kullanıldı. Serum kullanılması gerektiğinde, hastadan ya da doğum yapanların fetal kordonlarından alınan kan örnekleri santrifüje edilip serumları ayrıştırıldı, daha sonra 56 °C'daki su banyosunda 30 dakika inaktive edilerek kullanıldı.

Ayrıştırılan oositler inkübatöre (Salvis-Biocenter 2001) kaldırıldı. İnkübatör, 37°C'de, %75-98 nem ve %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonunu ayarlayacak şekilde düzenlendi (Tablo 1). Farklı

mediumlara katılan çeşitli serumlarla elde edilen örneklerin birleştirilmesi ile hazırlanan farklı kültür ve inkübasyon modellerinde MII'ye ulaşan matür oositlerin istatistiksel sayı ve oranları belirlendi.

### Bulgular

Farklı parametrelerin kombinasyonu ile oosit kültüründe, IVM başarısını araştırmak amacıyla, olgunlaşmamış (PI ve MI) oositler farklı koşullarda ve farklı zamanlarda kültüre edildi. Örneklerin birleştirilmesi ile elde edilen bulgular Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1'den de görüldüğü gibi, Ham's F-10, Medi= Cult, IVF-50 Scandinavian, Menezo B2 ve FAS ile IVM başarısı nisbeten daha yüksek bulundu. Beklendiği gibi medium kalitesinin hücre kültürünün başarısını önemli derecede etkilediği gözlemlendi.

Kullanılan besi yerlerine FCS'nun eklenmesiyle başarının arttığı görüldü. MS ya da sentetik HSA eklenmesiyle de başarının göreceli olarak arttığı, buna karşın, BSA ile yapılan çalışmalarda başarı oranının daha düşük kaldığı saptandı. Bazı mediumlarda ise başarı çok düşük bulundu.

### Tartışma ve Sonuç

IVM için kültür sistemlerinin başarısı farklı parametrelerin doğru kombinasyonuna bağlıdır (1,2,4,7). YÜT'de toplanan PI ve MI oositlerin döl lenebilme yeteneği bulunmamaktadır (7-10). Dolayısıyla oosit immatüritesi IVF'de başarısızlık oranının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (3,4,10,11). Çalışmamızda, farklı kültür ve inkübasyon modelleri denenerek immatür oositlerin IVM'ları araştırılmıştır. Bu amaçla, farklı ortam koşulları, mediumlar ve bunlara farklı serumlar eklenerek (HAS, BSA,MS,FCS) ya da ko-kültürasyon sağlanarak çalışılmıştır.

En iyi çalışan model, 37 °C ısı, %98 nem ve %5 CO<sub>2</sub> fizyolojik şartları ile, Fetal Kordon Serum (FCS) içeren, pH'sı 7.4, osmolaritesi 284 mOsmol olan kültür şartları olmuştur. Maternal Serum (MS) ve HTF kullanılmasıyla da buna yakın sonuçlar alınmıştır. %10-15'lik FCS'u, HSA (Human serum albumin)'e; kıyasla daha başarılı, HSA de Bovine Serum Albumin (BSA)a göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

**Tablo 1.** Farklı kültür ve inkübasyon modellerinde IVM'nun gözlenmesi ve elde edilen bulgular (n=970)

Ortam Koşulları	Medium	Serum	Ko-kültür Hücreleri	IVM'a bırakılan oosit sayısı (n=970)	M II'ye ulaşan oosit		
					Sayısı (n=322)	Oran %	
%5 CO <sub>2</sub> , 37°C, %98 Nem	Ham'S F-10	HSA	-	104	42	40	
		BSA	-	86	8	9	
		MS %15'lik	-	42	10	23	
		MS %10'luk	-	70	22	31	
		FCS	-	76	38	50	
		FCS	Folikül Epitel Hücreleri	78	24	30	
		Medi=Cult	FCS	-	54	26	48
		Fert=Cult	HSA	-	36	2	5
		Earle's Solution	BSA	-	30	6	20
		IVF-50 Scandinavian		Granüloza hücreleri	76	34	45
%5 CO <sub>2</sub> , 37°C, %75 Nem	Menezo B <sub>2</sub>	HSA	Granüloza hücreleri	22	10	45	
		BSA	Granüloza hücreleri	20	4	20	
		HSA	-	28	4	14	
		%15 MS	-	92	34	37	
		%10 MS	-	24	6	25	
%5 CO <sub>2</sub> , %5 O <sub>2</sub> %90 N <sub>2</sub> , 37°C, %75 Nem	Sentetik HTF	HSA	Epitel hücreleri	38	12	32	
		%10 FCS	-	50	24	48	
		%15 FCS	-	24	8	33	
		-	Granüloza hücreleri	20	8	40	

HSA: Human Serum Albumin

BSA: Bovine Serum Albumin

MS : Maternal Serum

FCS: Fetal Cord Serum (Fötal Kordon Serumu)

HTF: Human Tubal Fluid

FAS: Follikül Aspirasyon Sıvısı

Aynı amaçla FAS (follikül aspirasyon sıvısı) (8) kullanıldığında sonuçlar göreceli olarak iyi bulunmuştur. Ko-kültür hücreleri olarak granüloza hücrelerinin ortama eklenmesi follikül ve epitel hücrelerine göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Ortamda serum veya FAS'ın bulunmasının, kumulusların matürasyondaki rollerini tetiklediği kanısını taşıyoruz. Özellikle, FCS kullanılması ile kültüre edilen oositlerden meydana gelen embriyonların kalitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. FCS yerine diğerlerinden biri kullanılacaksa, tercih sırası HSA, MS ve BSA şeklinde olmalıdır.

IVM için kültür sistemlerinin başarısının farklı parametrelerin doğru kombinasyonuna bağlı olduğu görülmüştür. Farklı birçok parametrenin değişik kombinasyonlarıyla yapılan çalışmadan el-

de edilen verilerimizin, ileride yapılacak araştırmalara ışık tutarak YÜT'nin başarısına katkıda bulunacağını ümit ediyoruz.

#### KAYNAKLAR

1. Veeck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Philadelphia: Williams - Wilkins, 1992.
2. Sathananthan a.Henry. Maturation of the human oocyte in vitro: nuclear events during meiosis (an ultrastructural study). Gamete Research 1985; 12:237-51.
3. Plachot M, Mandebaum J. Oocyte maturation fertilization and embryonic growth in vitro. British Medical Bulletin 1990; 40:3:675-94.
4. Galli C, et al. Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro Bull Assoc Anat Mar 1991; 75,67-71.
5. Spearu Norah. In vitro growth of oocytes. Hum Reprod 1994; 9: 6: 969-76.

6. Veeck Lucinda L, Acosta Anibal A, Jones Hovard W, maturation and fertilization of morphologicly immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. The American Fertility Society, 1983.
7. Fukuii 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.
8. Kadam Al, et al. A follicular fluid factor, inhibiting xenopus oocytes maturation. Endocr. Res 1991; 17 (3-4): 343-55.
9. Lopata A. The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation Ann NY Acad Sc: USA 1988; 541:324-36.
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 Oct; 260(1): 116-24.
11. Gruzinskas JG, Yovich JL. Gametes-The Oocytes. Cambridge Univ Press Cambridge 1995.