

Farklı Mayoz Evrelerindeki Oositlerin İn-Vitro Maturasyon Sürelerinin Değerlendirilmesi

DETERMINATION OF THE IN-VITRO MATURATION PERIODS OF THE OOCYTES IN DIFFERENT PHASES

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

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

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

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

**** Prof.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD, ANKARA.

Özet

GATA IVF merkezine başvuran 28 hastadan toplam 216 adet profaz I(PI) ve metafaz I(MI) oositlerin oosit-korona-kumulus (OKK) kompleksi toplandı. Bunların Oosit Maturasyon İndeksine (OMI) göre, in-vitro maturasyon (IVM)'larını en ideal olarak kaç saatte tamamladıkları araştırıldı.

PI oositler (n=114) için uygun inkübasyon zaman aralığı 22-36 saat, bu zaman aralığında olgunluğa ulaşma(MII) oranı %66.5, telofaz II(TII)'ye ulaşma oranı %33 olarak bulundu. MI oositler (n=102) için uygun inkübasyon zaman aralığı 10-22 saat olarak bulundu. Bu zaman aralığında, olgunluğa ulaşma (MII) oranı %69, TII'ye ulaşma oranı %42.3 olarak belirlendi.

PI oositler için uygun inkübasyon zaman aralığının 22-36 saat, MI oositler için 10-22 saat olması halinde IVM oranını yükselteceği değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Oosit, Mayoz, In-vitro maturasyon

T Klin Tıp Bilimleri 2000, 20:295-301

Summary

Oocyte-corona-cumulus complex (OCC) of totally 216 prophase I (PI) and metaphase I (MI) oocytes were obtained from 28 patients who applied to GATA IVF center. It has been researched that PI and MI oocytes could complete their in-vitro maturation's (IVM) within how many hours ideally, based on Oocyte maturation index (OMI).

It was found that the appropriate incubation time phase is 22-36 hours for PI oocytes (n=114), in the same period the rate of maturation (MII) is 65.5%, the rate of having telophase II (TII) is 33%. It was also found that the reasonable incubation time phase is 10-22 hours for MI oocytes (n=102). In the same period, it was determined that the rate of maturation (MII) is 69% and having TII is 42.3%.

It was suggested that IVM rates would be higher if reasonable incubation time phase for PI oocytes 22-36 hours and 10-22 hours for MI oocytes.

Key Words: Oocyte, Meiosis, In-vitro maturation

T Klin J Med Sci 2000, 20:295-301

Yardımcı üreme tekniklerin(YÜT)'de inseminasyon ya da mikroenjeksiyon öncesi uygun preinkübasyon süresini saptamak için, her bir oosit olgunluğunun doğru değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bunun için oosit olgunluğunu sınıflayan sistemler (Oosit Matürasyon İndeksi) geliştirilmiştir (1).

Olgun follikülün yırtılmasıyla metafaz II (MII) evresinde atılan sekonder oosit olgun (matür) oosit

Geliş Tarihi: 15.02.2000

Yazışma adresi: Dr. Mehmet CINCIK
GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,
06018 Etlik, ANKARA

olarak tanımlanır. Etrafında zona pellusida (ZP), ışınal düzenli korona radiata ve kumulus ooforus tabakasıyla sarılmış olarak oosit-korona-kumulus kompleksini (OKK) yapar. Yardımcı üreme tekniklerin (YÜT)'de follikül ile beraber bu kompleks aspire edilir.

Ovulasyondan yaklaşık 4 gün önce (doğal siklusta LH pikinden; indüklenen sikluslarda hCG enjeksiyonundan önce) estradiol seviyesi yükselir, korona ve kumulus hücreleri daha yoğun hale gelirler. Merkezde yerleşik çekirdek bir germinal kese (Germinal Vezikül-GV) şeklinde görünür. Çekirdek, belirgin bir çekirdekçiğe sahiptir. LH piki ya da indüklenenlerde hCG'den sonra GV periferde hareket eder (2-5).

Tablo 1. Oosit matürasyon indeksi (OMİ)

| Oosit statüsü | Evre | Mayotik statü | Nükleer Statü | Morfolojik Özellikler |
|----------------------------|------|---------------|---|---|
| Immatür (Olgunlaşmamış) | I | Profaz I | GV görülür. 1.kutup hücresi henüz atılmamıştır. | Yoğun korona hücreleri Sadece birkaç tabakadan ibaret kumulus hücreleri |
| Intermediate (Ara) | II | Metafaz I | GV yırtılmış olduğundan seçilemez. 1.kutup hücresi henüz gözlenemez. | Korona radiata hücrelerinin yoğunluğu azalmıştır. Kumulus dağımıktır. |
| Matür (Olgun) | III | Metafaz II | Perivitellin aralıkta 1.kutup hücresi gözlenir. | Ooplazma berrak, düzenlidir. ZP kolay seçilir. Granüloza hücreleri kumulus ve korona radiatanın genişlemesine yol açacak şekilde dağılmıştır. |

GV: Germinal Vezikül.

GV'nün yıkılması (Germinal Vesicle Break Down-GVBD) 22-25 saatte olur. Bazı kaynaklara göre clomiphene HMG-HCG sikluslarında bu 15. saatte olaylanır (6). Metafaz I(MI)'den 4 saat sonra kromozomlar birinci mayoz ipliğinin metafaz plağı boyunca dizilirler ve sonra kutuplara hareket ederler (Anafaz I). 34 saat geçince çoğu oosit MII'ye ulaşır. 1. Kutup hücresi atılır ve kromozom sayısı yarıya indirilir. Ardından ikinci mayoz ipliği oluşur. Kumulus ve korona hücrelerinin genişlemesi (ekspansiyonu) da çekirdek maturasyonunu izler (2,4,5,7). MI'den MII'e geçerken kumuluslar da proteoglikan salgılar ve ZP'daki porları doldururlar. Böylece spermiuma karşı direnç (rezistans) düşer. Bu nedenle de MII'deki oosite spermiumun penetrasyonu ve ooplazmaya girmesi (inkorporasyonu) şansı artar (3).

YÜT'de immatür oositlerin in-vitro maturasyonları (IVM) sağlanabilirse başarı artacaktır. Bu nedenle farklı mayoz evrelerindeki oositlerin in-vitro matürasyon sürelerinin iyi bilinmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada PI ve MI oositlerin en ideal inkübasyon zaman aralığına ulaşmaya çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

GATA IVF merkezine farklı zamanlarda başvuran 28 hastadan, hCG uygulamasından 34-36 saat sonra ultrasonografi (Kretz-Müni) eşliğinde tek ya da çift lumenli aspirasyon iğnesi (Cook 1735 G) ile follikül aspirasyonu yapılarak toplanan

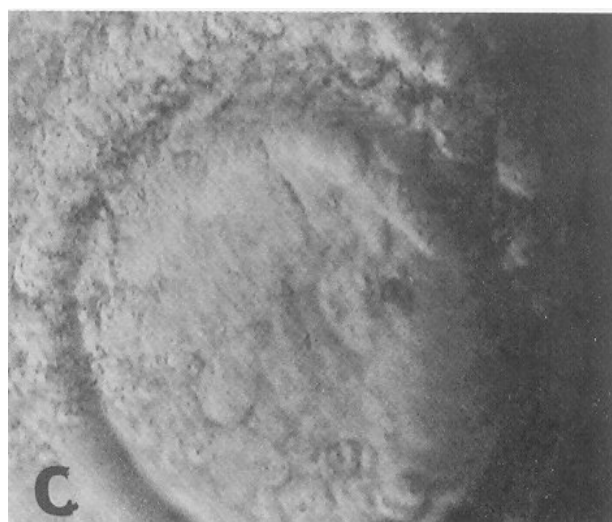
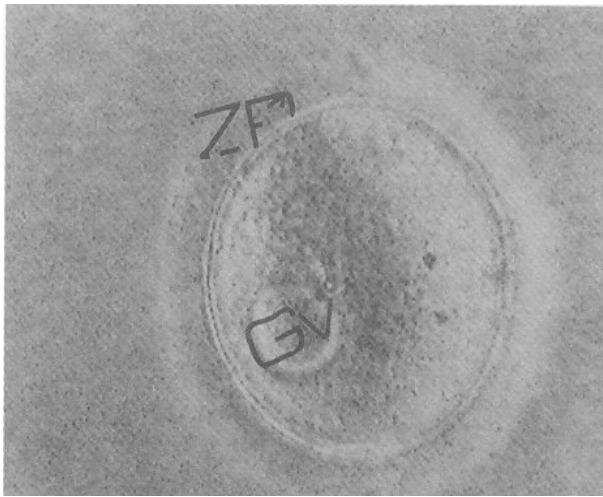
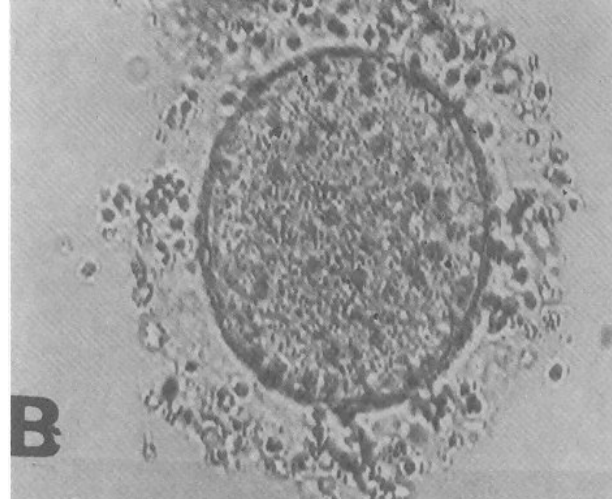
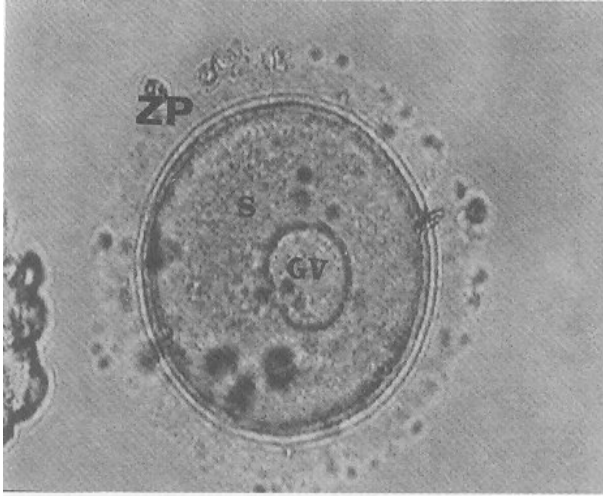
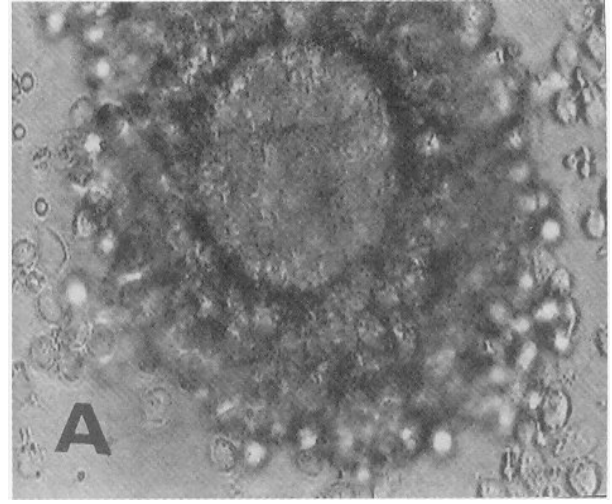
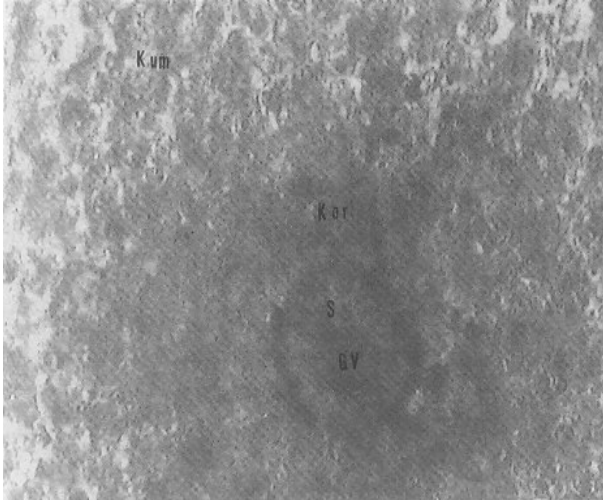
toplam 216 immatür insan oositi, embriyoloji laboratuvarına aspirasyon sıvısının içinde getirildi, laminar flowda (K-System-Holtten, Danimarka), stereomikroskop (Leica Wild MZ8 - Almanya) altında incelendi. PI ve MI oositlerin, IVM'larını ortalama kaç saatte tamamladıklarını anlamak için, farklı sikluslarda toplanan oosit-korona-kumulus kompleksi, Oosit Matürasyon İndeksine (OMI) göre sınıflandırıldı (Tablo 1).

Ayrıştırılan oositler inkübatöre (Salvis-Biocenter 2001) kaldırıldı. İnkübatör, sabit olarak, ısıyı 37°C, nemi %90 ve karbondioksit konsantrasyonunu %5 düzeyinde ayarlayacak 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.

MII oositler 4-6 saat inkübasyondan sonra, eşlerinin swim-up yöntemi uygulanmış spermiumları ile insemine edildi ya da erkek faktörü varsa mikroenjeksiyona tabi tutuldu. Olgun olmayan oositlerin IVM periyodu sonundaki durumları tesbit edildi. Sony Color Video Printer-Thermal Kamera kullanılarak polaroid fotoğrafları çekildi.

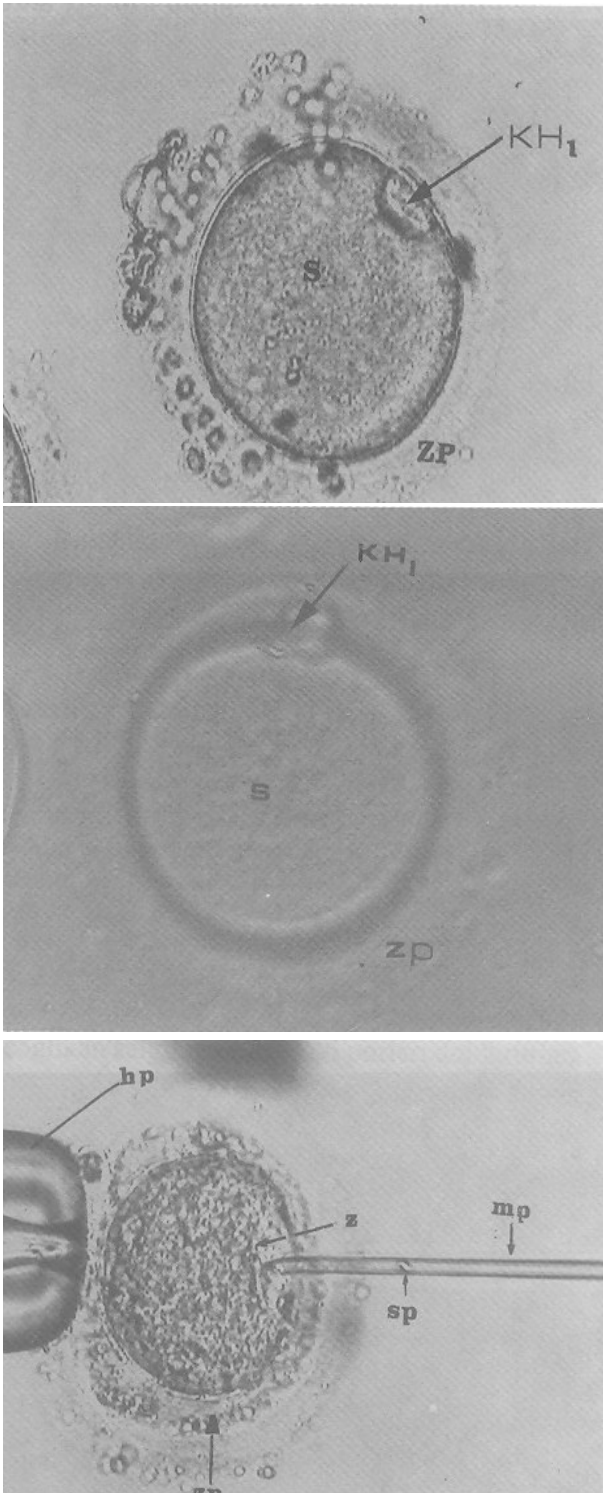
Bulgular

IVM'larını ortalama kaç saatte tamamladıklarını anlamak için, farklı sikluslarda toplanan oosit-korona-kumulus kompleksi Oosit Maturasyon İndeksine (OMI) göre sınıflandırılarak görüldü (Şekil 1,2).



Şekil 1. (a) PI oosit mikrografıdır. Oosit korona kumulus kompleksinde germinal vezikül (GV) belirgin olarak seçilmektedir. S: sitoplazma, Kor: Korona hücreleri, Kum: Kumulus hücreleri (b) Korona-Kumulus hücreleri temizlendikten sonraki PI oosit. GV: Germinal vezikül, ZP:Zona Pellucida, S: sitoplazma. (c) PI oositin faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsünün mikrografıdır. Z:Zar, GV: Germinal vezikül.

Şekil 2. MI oositin mikrografıdır. (a) Korona-Kumulus kompleksi ile birlikte MI oosit (b) Korona-Kumulus hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra MI oosit. Germinal vezikül yıkılmıştır. (c) Aynı oositin faz kontrast görüntüsüdür.

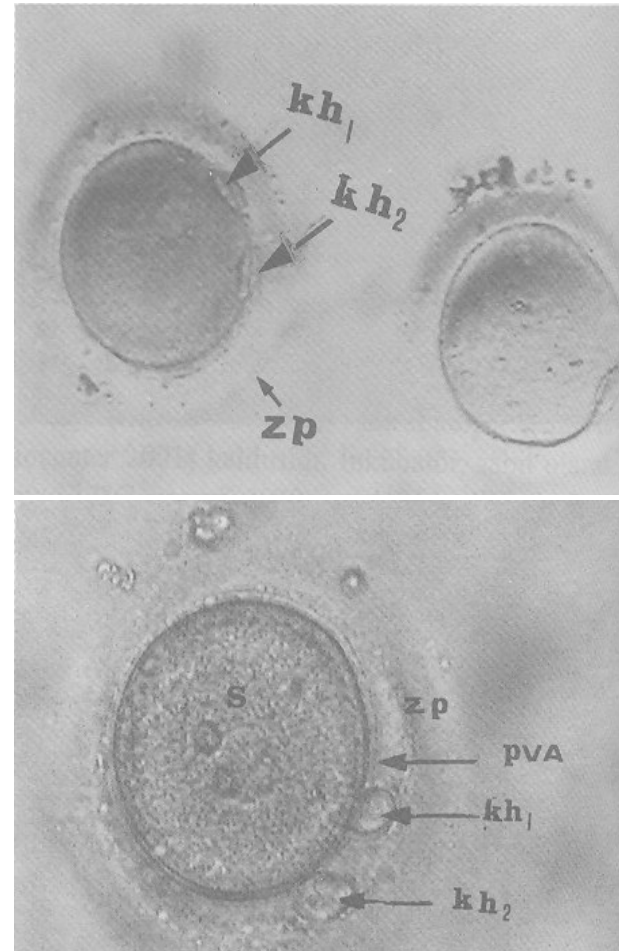


Şekil 3. (a) Olgun (MII) oositin mikrografıdır. Germinal vezikül yıkılmıştır. 1. kutup hücresi (KH1) net olarak seçilmektedir. S: Sitoplazma, ZP: Zona Pellusida (b) MII oositin faz kontrast mikrografıdır. KH1: 1. kutup hücresi, S: Sitoplazma, ZP: Zona pellusida (c) İntrasitoplazmik spermium enjeksiyonu (ICSI) mikrografıdır. Sp: Spermium, Mp: Mikroenjeksiyon pipeti, Hp: Holding pipet, Zona pellusida (ZP) geçilmiş, zar (Z) henüz geçilmemiştir.

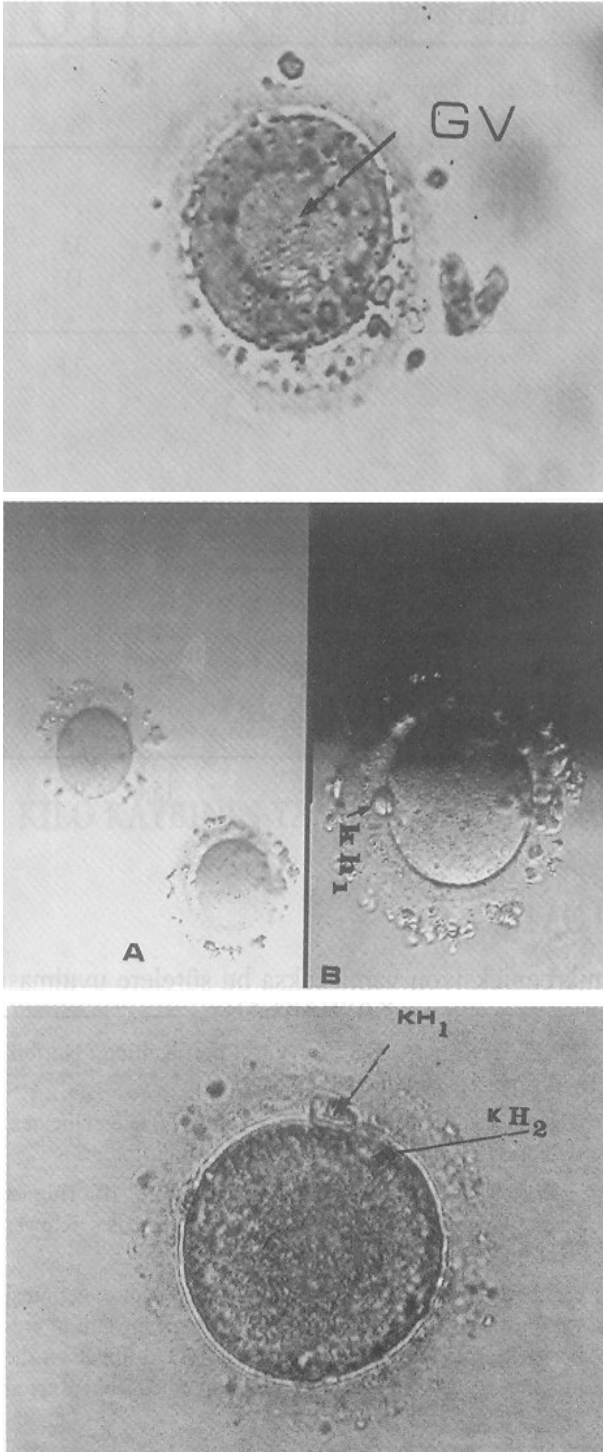
MII oositler 4-6 saat inkübasyondan sonra, eşlerinin swim-up yöntemi uygulanmış spermiumları ile insemine edildiler ya da erkek faktörü varsa mikroenjeksiyona tabi tutuldular (Şekil 3).

Olgun olmayan oositler Tablo 2'de belirtilen zaman aralıklarında, %90 Nem, %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edildiler. 4 saat aralıklarla mayotik statülerinde bir değişiklik olup olmadığına bakıldı. Gözlem sırasında 1. kutup hücresini attığı görülenler, aynı petri dishlere alınarak 4 saat sonra eşlerinin spermiumlarıyla insemine edildiler. Bunlardan da ne kadarının telofaz II (TII) evresine ulaştığına bakıldı (Şekil 4).

Farklı siklularda toplanıp aynı ortam koşulları ve medium içinde gözlenen oosit örneklerinin birleştirilmesi ile aşağıdaki Tablo 2 ve 3 oluştu.



Şekil 4. (a) TII evresindeki oositin mikrografıdır (solda). Birinci ve ikinci kutup hücreleri (kh1 ve kh2) perivellin aralıkta net olarak seçilmektedir. kh2 nin görülmesi oositin döllenmiş ve 2. Mayoz bölünmenin sürdüğünün bir işaretidir. (b) TII oositin faz kontrast mikrografıdır. kh1: 1.kutup hücresi, kh2: 2. Kutup hücresi, PVA: perivellin aralık, ZP: Zona pellusida, S: Sitoplazma.



Şekil 5. (a) PI oositi gösteren bir mikrograftır. Aspire edildiği anda fotograflanmış olup germinal vezikül (GV) seçilmektedir. (b) (a)'daki oositin olgunlaşma sürecini gösteren mikrograftır. A: 12 saat sonra germinal vezikül kaybolmuştur (alttaki oosit). B: 22 saat sonra 1. kutup hücresi (KH1) atılmıştır. (c) (a)'daki oositin 26. Saatteki TII durumunu gösteren mikrograftır. 2. kutup hücresi de atılmıştır. KH1: 1. kutup hücresi, KH2: 2. kutup hücresi.

Profaz I oositler için en uygun inkübasyon zaman aralığı 22-36 saat olarak bulundu (Tablo 2). Bu zaman aralığında olgunluğa ulaşma (MII) oranı %66.5, TII'e ulaşma oranı %33 olarak bulundu (Şekil 5).

MI oositler için en uygun inkübasyon zaman aralığı 10-22 saat olarak bulundu. Bu zaman aralığında, olgunluğa ulaşma (MII) oranı %69, TII'ye ulaşma oranı %42.3 olarak saptandı (Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

YÜT'de toplanan PI ve MI oositlerin döl lenebilme yeteneği bulunmamaktadır (2,8,9,10). Matürasyon ilerledikçe fertilizasyon yeteneği artmaktadır (11). MII evresindeki oositler fertilizasyon yeteneği en yüksek olanlardır. Mayotik statünün MII'de olması ve spermiumun ZP ile oosit zarı engelini geçerek sitoplazma içine girmesi de döl lenme için her zaman yeterli değildir (2,9,12,13). Dolayısıyla oosit immatüritesi IVF'de başarısızlık oranının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (11,14). Bununla birlikte, matürasyonlarını in vitro olarak tamamlayan PI ve MI oositlerin döl lenebildiği bildirilmiştir (10,15). İmmatür oositlerin IVM'larının sağlanması YÜT'nin başarısını arttıracak ve immatür, matür ve postmatür oositlerin oranlarının bilinmesi her hastanın indüksiyona vermiş olduğu cevabın değerlendirilmesini sağlayacaktır.

İnseminasyon öncesi uygun preinkübasyon süresini tesbit için her bir oositin olgunluğunun doğru değerlendirilmesi çok önem taşımaktadır. Genellikle 16 mm'den küçük çaplı folliküllerden toplanan GV'ün görüldüğü immatür (PI) ve intermediate (MI) oositlerin ise olgunlaşma süreleri, kültür ortamı içinde, in-vitro olarak devam ettiğinden inseminasyon zamanları iyi bilinmemektedir. Bunların IVM'undan sonra döl lenebildiklerine ve gebelik oluştuğuna dair raporlar bildirilmiş olmasına rağmen, inkübasyon süreleri ve inseminasyon zamanı konusunda bir uzlaşma sağlanabilmiş değildir (9,16).

Daha önce yapılan çalışmalarda, olgun olmayan oositlerin IVM sürelerini Sathananthan ve arkadaşları 12-20 saat, L. Veeck ve arkadaşları 22-34 saat, Edwards ve arkadaşları 40-48 saat olarak bildirmişlerdir (17,18). L. Veeck ve arkadaş-

Tablo 2. Profaz I (GV görülen) oositlerin IVM süreleri ve ulaştıkları evreler

| Kültür Süresi (Saat) | GV. görülen Oosit sayısı | MI | % | IVM süresi sonunda ulaştıkları evre | | | |
|----------------------|--------------------------|----|------|-------------------------------------|------|------|-----|
| | | | | M II | % | T II | % |
| 1-10 | 25 | 14 | 56 | - | - | - | - |
| 10-22 | 32 | 23 | 72 | 18 | 56.2 | - | - |
| 22-36 | 18 | 15 | 83 | 12 | 66.5 | 6 | 33 |
| 36-48 | 27 | 19 | 70 | 15 | 55.5 | 3 | 11 |
| 48-72 | 12 | 8 | 66 | 5 | 41.6 | - | - |
| TOPLAM | 114 | 79 | 69.2 | 50 | 43.8 | 9 | 7.8 |

Tablo 3. MI oositlerin IVM süreleri

| Kültür süresi (Saat) | MI Oosit sayısı | IVM süresi sonunda ulaştıkları evre | | | |
|----------------------|-----------------|-------------------------------------|------|------|------|
| | | MII | % | T II | % |
| 1-10 | 16 | 10 | 62.5 | - | - |
| 10-22 | 26 | 18 | 69 | 11 | 42.3 |
| 22-36 | 22 | 13 | 59 | 5 | 22.7 |
| 36-48 | 25 | 9 | 36 | - | - |
| 48-72 | 13 | 4 | 30.7 | - | - |
| TOPLAM | 102 | 54 | 52.9 | 16 | 15.6 |

ları 22-34 saatlik inkübasyonla oositleri matür hale getirmeyi başarmışlardır. İmmatür 74 oositten 44'ünün IVM'nun tamamladığını ve bunlardan 8 gebelik elde edildiğini bildirmişlerdir. L.Veeck ve arkadaşları bu çalışmada, PI'den MII'e ulaşan oosit oranını %83 olarak bulmuş ve bunların %82'sinin döllendiğini bildirmişlerdir. In vitro matürasyonunu tamamlayarak gelişen embriyonlar ile gebelik oranını PI oositlerde %12, MII oositlerde %25 olarak bulmuşlardır (11,14,18).

Çalışmamızda daha önceki araştırmalardan farklı olarak, PI ve MI oositler için IVM sürelerini ayrı ayrı araştırmanın daha doğru olacağı değerlendirilmiştir. Bu zaman aralığında oositler, her 4 saatte bir stereomikroskopla gözlenmişlerdir. MII oositlerin de 4-5 saatlik inkübasyondan yararlandıkları görülmüştür.

YÜT'de inseminasyon ya da mikroenjeksiyon zamanının mayotik statünün irdelenmesinden sonra tesbiti daha doğru olacaktır. Bulgularımıza göre, IVM için uygun inkübasyon zaman aralıkları PI oositler için 22-36 saat, MI oositler için 10-22 saat olarak belirlenmiştir. IVF için, inseminasyon ya da

mikroenjeksiyon yapılacaksa bu sürelerle uyulması başarıyı arttıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Jones HW, Jones GS. In Vitro Fertilization, Norfolk Williams and Wilkins Baltimore, 1993.
2. Gruzinskas JG, Yovich JL. Gametes-The Oocytes. Cambridge Univ. Press Cambridge 1995.
3. Blerkom JV, Motta PM. Ultrastructure of Human Gametogenesis and Early Embryogenesis. Kluwer Academic Publishers, 1989.
4. Van der Elst J, et al. In vitro maturation of mouse germinal vesicle-stages oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. Hum Reprod 1992, Nov; 7 (10) 1440-6.
5. Goodrowe KL. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. Biol Reprod 1991; 45 (3): 466-70.
6. Racowsky L, et al. Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured in-vitro analysis by light microscopy. Fertil Steril. 1992; 58 (4): 750-5.
7. Downs SM, et al. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte. Dev Biol 1995, 172(1): 72-85.
8. Terada Y. Localization of microfilaments during oocyte maturation of golden hamster Ang: 1995; 41(4) 486-92.

9. Veeck L.L. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Philadelphia: Williams -Wilkins, 1992.
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. Plachot M., Mandebaum J. Oocyte maturation fertilization and embryonic growth in vitro. British Medical Bulletin 1990; 40(3): 675-94.
12. Rowe P.J. Hargreave TB. Hand book of IVF Cambridge, Cambridge University Press, 1993.
13. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. Philadelphia: WB Saunders C, 1993.
14. Galli C, et al. Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro Bull Assoc Anat 1991; 75:67-71.
15. Dersch Mark A. Bement William M. Cortical membrane trafficking during the meiotic resumption of xenopus laevis oocytes. Cell Tissue Res 1991, 263:375-83.
16. Sathanathan A. Henry. Maturation of the human oocyte in vitro: nuclear events during meiosis (an ultrastructural study)--Gamete Research 1985; 12:237-51.
17. Dekel N, et al. Experimental extension of the time interval between oocyte maturation and ovulation effect on fertilization and first cleavage. Fertil Steril 1995; 64 (5): 1023-8.
18. Armstrong, DT. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. New York Academy of Sciences 1995.