

# Kumulus Hücrelerinin Oosit İn-Vitro Maturasyonu Üzerine Etkileri

## EFFECTS OF CUMULUS OOPHORUS CELLS ON IN VITRO OOCYTE MATURATION

Mehmet CINCIK\*, Şaban SEZEN\*\*, H. Mesut ÖZSOY\*\*\*, Tansu KÜÇÜK\*\*\*\*, Cem KORKMAZ\*\*\*\*\*

\* Yrd.Doç.Dr., GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,  
\*\* Uzm.Dr., GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,  
\*\*\* Yrd.Doç.Dr., GATA Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,  
\*\*\*\* Doç.Dr., GATA Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,  
\*\*\*\*\*Dr., GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD ANKARA

### Özet

Kumulus hücrelerinin in-vitro olarak oosit maturasyonunu ne ölçüde etkilediğini araştırmak amacıyla GATA IVF merkezine farklı zamanlarda başvuran 40 hastadan follikül aspirasyonu yapılarak toplanan 80 immatür (PI), 100 intermediate (MI) olmak üzere toplam 180 insan oositi incelendi. Oositler rastgele iki gruba ayrıldı.

İlk grubun kumulus ooforusları temizlendi (kumulussuz), 2. grup ise kumulusları temizlenmeksizin (kumuluslu) çalışıldı. İn vitro maturasyon süreçleri 4'er saat arayla 36. saate kadar gözlemlendi. Farklı sürelerde maturasyonunu tamamlayarak MII'ye ulaşan kumuluslu ve kumulussuz oositler belirlendi. IVM'a ulaşan kumulussuz oosit oranı %24.4 (22/90) olduğu halde, kumuluslu olanlarda bu oran %60 (54/90) bulundu ( $t=5.159$ ,  $p<0.01$ ). En yüksek IVM oranına 12-16. saatler arasında (%17.7) ve kumuluslu olarak inkübe edilen oositlerde rastlandı.

Bu bulgular ışığında, kumulus hücrelerinin varlığının IVM'da çok önemli bir rol oynadığı söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Oosit, Kumulus hücreleri, İn-vitro maturasyon

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:161-165

### Summary

The objective of this study was to investigate the effects of cumulus oophorus cells on in vitro oocyte maturation. A total of 180 oocytes (80 immature - prophase I and 100 intermediate - metaphase I) were collected from 40 patients. These oocytes were randomly distributed into 2 groups.

The first group oocytes were denuded and separated from cumulus oophorus cells (cumulus free). No denudation was done in the second group. During the incubation period the stage of the in vitro maturation of the cumulus free and intact oocytes were observed every 4 hours up to 36 hours. The undenuded (cumulus intact) oocytes in the first group, were found to reach metaphase II stage 60% (54/90) whereas, denuded oocytes reached 24% (22/90). The peak for reaching metaphase II stage were observed in the undenuded group of oocytes at 12-16 hours.

It is obvious that the presence cumulus oophorus cells play a very important role for in-vitro maturation.

**Key Words:** Oocyte, Cumulus oophorus, İn-vitro oocyte maturation

T Klin J Med Sci 2001, 21:161-165

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'nin başarısı yeterli sayıda olgun oositin ve sağlıklı embriyonun elde edilmesine bağlı bulunmaktadır. Toplanan ovulasyon öncesi oositlerin mayotik statülerinin metafaz II (MII)'de olması, normal fertilizasyon ve embriyonik gelişme şansını belirleyen en can alıcı nokta olmaktadır. Olgunluğunu tamamlamamış profaz I (PI) ve metafaz I (MI) oositlerin dölenebilme yeteneklerinin bulunmaması fertilizasyon oranının düşük kalmasına neden olmaktadır. Bunların in-vitro maturasyon (IVM)'ları sağlanabilirse YÜT'lerin başarısı artacaktır.

**Geliş Tarihi:** 21.02.2000

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

T Klin J Med Sci 2001, 21

Sitoplazma olgunlaşması ve oosit aktivasyonu çekirdek maturasyonu ile paralel yürür. Kumulus hücrelerinin etkisi ile oositte protein sentezi uyarılır, özellikle steroid salınımı artar. Spermiumla karşılaşınca MII'deki oositin sitoplazma olgunlaşması daha da indüklenir. Bu olaylar dizisi oosit aktivasyonu olarak tanımlanır (1).

Granüloza hücrelerinde preovulatuvar dönemde FSH ve LH reseptör sayısı artarak follikül gelişimi uyarılır. Bu etki ilk önce granüloza hücrelerinde yapılan E<sub>2</sub> ile kuvvetlenir (2). İnsülin-like Growth Faktörler (IGF I,II) de FSH etkisi ile kuvvetlenmektedirler. IGF'ler granüloza hücre fonksiyonunda mitojen olarak etkilidir ve gonadotropinlerin etkilerini de artırırlar. IGF'lerin biyolojik aktivitelerinde bağlayıcı proteinlerin (IGF BP 1-6) de rolü önem taşımaktadır. IGF I'in sistemik dolaşımından, IGF II'nin ise lokal olarak granüloza hücrelerinden kaynaklandığı gös-

terilmiştir (3,4). Artan IGF I'in etkisi ile; FSH etkisiyle birlikte progesteron ve östrojen sentezi artar, LH reseptörleri artar. Yeterli LH reseptörü oluşunca, LH direkt olarak granüloza hücrelerine etki ederek luteinizasyona ve progesteron yapımına yol açar. İnhibinin LH aktivitesini kuvvetlendirmesi sonucu androjen ve östrojen sentezi artış gösterir (5).

Teka hücrelerinde LH etkisi ile yapılan androjenler (testosteron ve androstenedion) granüloza hücrelerine taşınır ve FSH'nin aromataz enzimlere etkisi ile burada östrojenlere (estradiol ve östron) dönüşür (Two-cell teori) (6,7).

Granüloza hücrelerinin (kumulus ooforus ve korona radiata) oositin in-vitro matürasyonuna da pozitif etkileri vardır. Bu hücreler salgıladıkları gonadotropinlerle reseptörler aracılığıyla oositin ilk etkileşimini sağlamaktadırlar (8-13). Kumulus hücrelerinin in-vitro olarak oosit matürasyonunu ne ölçüde etkilediğini görmek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

### Gereç ve Yöntem

GATA IVF merkezine farklı zamanlarda başvuran 40 hastadan follikül aspirasyonu yapılarak toplanan 80 immatür (PI), 100 intermediate (MI) olmak üzere toplam 180 insan oositi incelendi. Bu oositlerin yarısının kumulusları, 0.5-1 dakika süre ile hiyaluronidaz enzimi ile muamele edilerek (Hyase 10, Scandinavian, İsveç) temizlendi, yarısı ise kumulusları temizlenmeksizin (kumuluslu) bırakıldı.

Toplanan oositler oosit matürasyon indeksindeki parametreler kullanılarak oosit çevresindeki kumulus-korona hücre kompleksi (OKK) nin histolojik yapısı, GV'ün parçalanıp parçalanmadığı ve birinci kutup hücrelerinin atılıp atılmadığına bakılarak olgunluk derecelerine göre ayrıldı

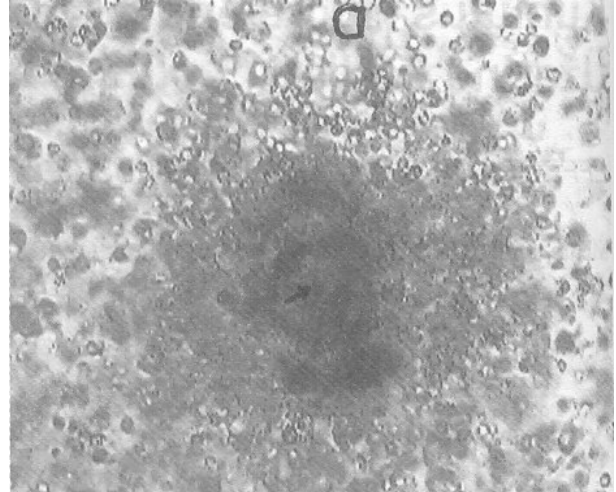
40 Adet PI ve 50 adet MI oosit kumuluslu olarak (cumulus intact=cumulus enclosed), aynı sayıda oositler de kumulusuz olarak (cumulus free=CF) inkübe edildi. Çalışma süresince hepsi için aynı oosit kültür inkübasyon modeli (37°C sıcaklık, %98 nem ve %5 karbondioksit konsantrasyonu) ve aynı kültür sıvısı (Scandinavian IVF-20 İsveç) kullanıldı. pHmetre (PHU-92) ve Osmometre (Knauer) ile kontrol edilerek pH 7.4 ve osmolarite 280-284 mOsmol tutuldu.

4'er saat arayla 36. saatte kadar, germinal vezikülün parçalanması ve daha sonra 1. kutup hücrelerinin atılması açısından (IVM süreçleri) gözlemlendi. Farklı sürelerde MII'ye ulaşan kumuluslu ve kumulusuz oositler belirlendi (Şekil 1,2).

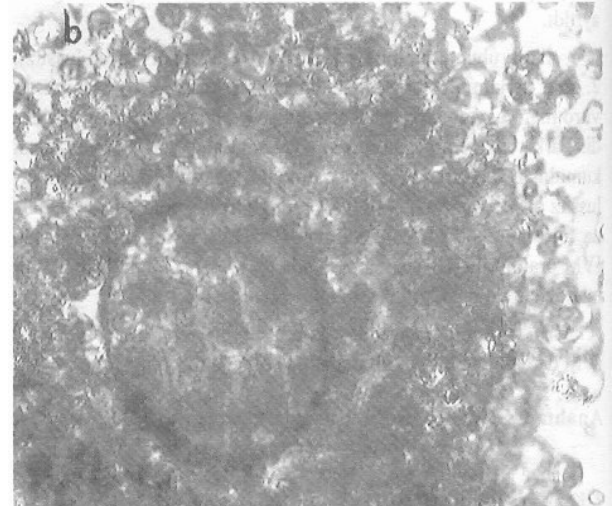
### Bulgular

Kumuluslu ve kumulusuz olarak, 40'ar adet PI ve 50'şer adet MI olarak inkübe edilen oositlerin IVM süreçleri Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

IVM'a ulaşan kumulusuz oosit oranı %24.4 (22/90) olduğu halde, kumuluslu olanlarda bu oran %60 (54/90) bu-



Şekil 1a. Kumuluslu olarak inkübasyona bırakılan ve PI oositi içeren oosit-korona-kumulus kompleksi (OCC). Germinal vezikül (GV) seçilmektedir (ok).

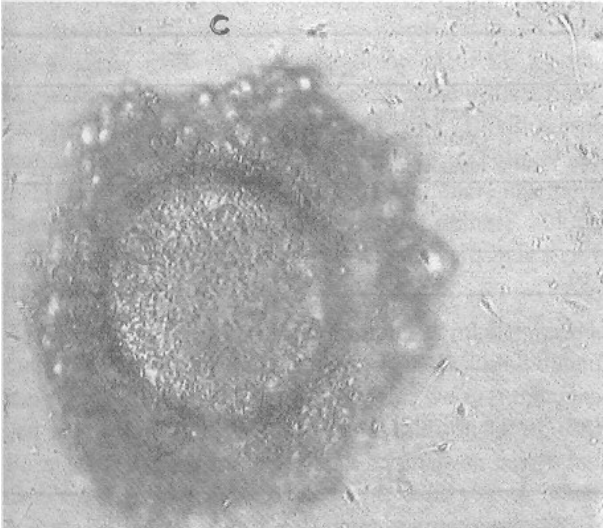


Şekil 1(b). Aynı oositin OCC'nin 10 saat sonraki MI mikrofotografı. (GV yıkılmıştır).

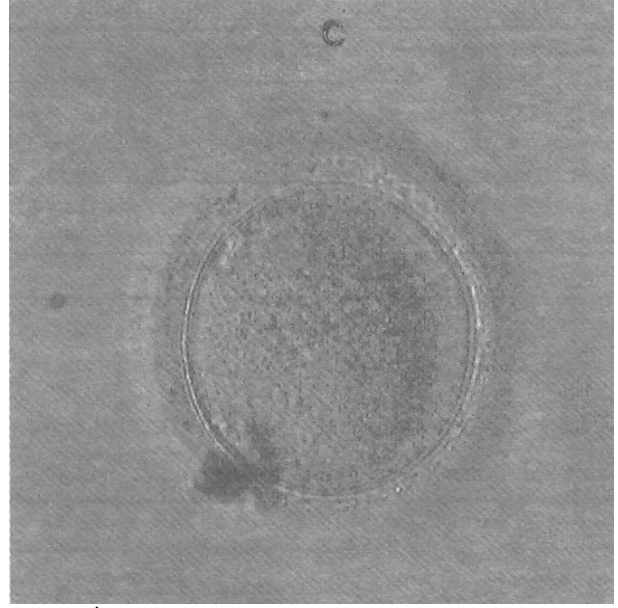
lundu. Kumulusuz PI oositlerin %20'si IVM'ünü tamamlarken, kumuluslu PI oositlerin %60'ının IVM'ünü tamamladığı görüldü. MI oositlerde ise IVM oranları kumuluslu grupta %60 iken kumulusuz grupta ancak %28 idi. Görüldüğü gibi, kumulusları temizlenmeksizin kültüre edilenlerde olgunluğa ulaşma (M II) oranı çok daha yüksek bulundu ( $t=5.159$ ,  $p<0.01$ ).

Tablo 2'de bunların kültür sürelerine göre IVM oranları görülmektedir. Buna göre kumuluslularda %17.7, kumulusuzlarda %8.8 en yüksek IVM oranına 16. saatte ulaşıldı.

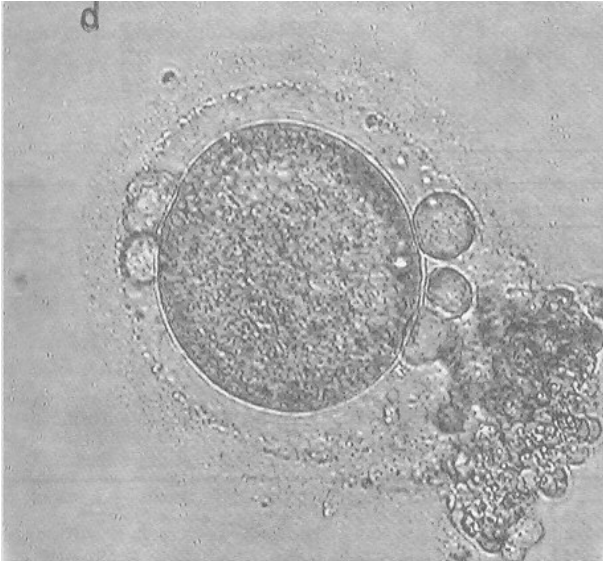
Kültür süresine göre kümülatif IVM oranları ise Tablo 3'deki gibiydi.



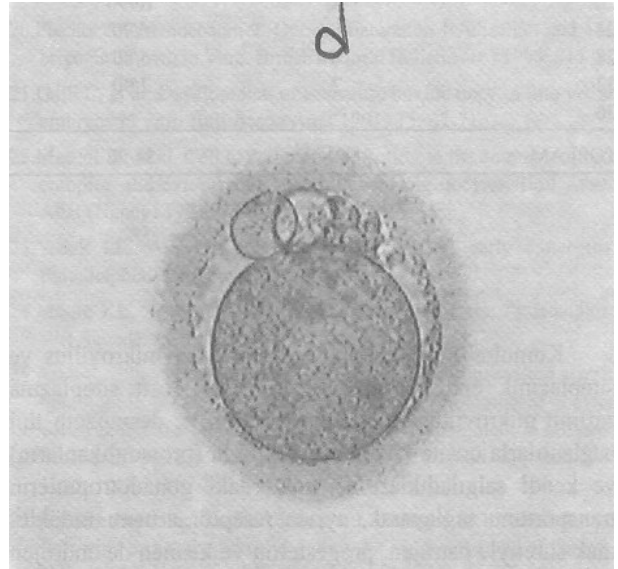
**Şekil 1c.** b'deki oositin 16. saatte MII'ye ulaştıktan sonra, inseminasyonu takiben görüntüsü. Kumulus hücrelerine penetre olmuş spermiumlar seçilmektedir.



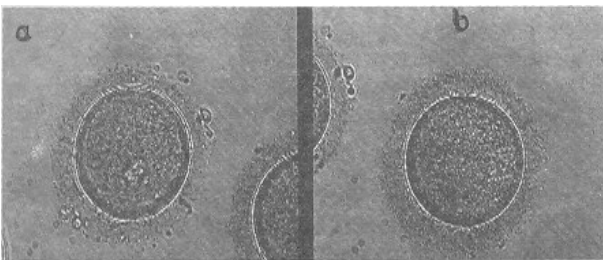
**Şekil 2c.** İnseminasyonu takiben, inkübasyonun 30. saatinde TII evresi. 1. ve 2. kutup hücreleri perivitellin aralıkta (PVA) seçilmektedir.



**Şekil 1d.** Aynı oositin 26. saatte (inseminasyondan 10 saat sonra) çekilmiş TII mikrofografıdır. Kumulus hücrelerinin yarısı uzaklaştırılmış olup, 1. ve 2. kutup hücreleri seçilebilmektedir.



**Şekil 2d.**



**Şekil 2a.** Kumulus hücreleri denude edilmiş PI oosit. Ortada GV şeffaf olarak seçilmektedir. **b.** Aynı oositin 12 saat sonraki MI evresini gösteren mikrofotografı (Matür oosit). 1. kutup hücresi seçilmektedir.

Grafikte en yüksek IVM oranına kumuluslu hücrelerde rastlandığı ve bunun 12-16. saatler arasında hızlı bir artışla (%17.7) karakterize olduğu daha net görülmektedir.

### Tartışma ve Sonuç

Kumulus ooforus hücreleri, sitoplazmik uzantılarıyla zona pellusidayı geçerek oosit plazmalemmasına ulaşırlar ve böylelikle oosit maturasyonunda gerekli substansların bir kısmını sağlarlar. Bu hücreler hem endokrin hem de parakrin özellik taşımadıklarıdır (14).

**Tablo 1.** Kültür süresi dikkate alınmaksızın kumulus hücrelerinin IVM'a etkileri

Oositin Evresi	Kumululu			Kumulussuz		
	Oosit sayısı (Oosit-korona-kumulus kompleksi)	MII'e ulaşanların oranı	%	Oosit sayısı (Kumuluları temizlenmiş)	M II'e ulaşanların oranı	%
PI	40	24/40	60	40	8/40	20
MI	50	30/50	60	50	14/50	28
TOPLAM	90	54/90	60	90	22/90	24.4

T=5.159 ; p<0.01

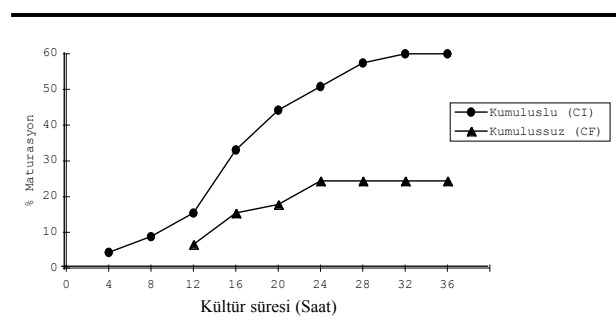
**Tablo 2.** Kültür süresine göre kumuluların IVM'a etkileri

Kültür Süresi (saat)	IVM'a ulaşanlar					
	Kumululu			Kumulussuz		
	MII'e ulaşanlar	MII'e ulaşanların toplama oranı	%	MII'e ulaşanlar	MII'e ulaşanların toplama oranı	%
4	4	4/90	4.4			
8	4	4/90	4.4			
12	6	6/90	6.6	6	6/90	6.6
16	16	16/90	17.7	8	8/90	8.8
20	10	10/90	11.1	2	2/90	2.2
24	6	6/90	6.6	6	6/90	6.6
28	6	6/90	6.6			
32	2	2/90	2.2			
36	-	-				
TOPLAM	54	54/90	60	22	22/90	24.4

Kumulus hücrelerinin yüzey artırıcı mikrovillus ve sitoplazmik çıkıntılarının ZP üzerinde oosit sitoplazma zarının mikrovillusları ile gap-junction ve desmozom tipi bağlantılarla oosite küçük moleküllerin (proteoglikanların) ve kendi salgıladıkları az miktardaki gonadotropinlerin transportunu sağlayarak, ayrıca reseptör artışını indüklemek suretiyle östrojen, progesteron ve kısmen de androjen salgısında artışa yol açarak bunun yanısıra IGF II salgılayarak oosit olgunlaşmasına katkıda buldukları bilinmektedir (11-16).

IVM için kültür sistemlerinin başarısının farklı parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir. Oositlerin IVM'nu kumulus-korona-oosit kompleksinin bütün elemanlarının katıldığı, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin bir sonucudur.

YÜT'de toplanan PI ve MI oositlerin dölenebilme yeteneği bulunmamaktadır (15,18,19). Dolayısıyla oosit immatüritesi IVF'de başarısızlık oranının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (20,21). Bununla birlikte, matürasyonlarını in-vitro olarak tamamlayan PI ve MI oositlerin dölenebildiği bildirilmiştir (19,22).

**Tablo 3.** Kumulus ooforus hücrelerinin kültür süresine göre kümülatif IVM oranları

Matürasyon ilerledikçe fertilizasyon yeteneği artmaktadır (20). MII evresindeki oositler fertilizasyon yeteneği en yüksek olanlardır (15,23,24). Mayotik statünün MII'de olması ve spermiumun ZP ile oosit zarı engelini geçerek sitoplazma içine girmesi de döllenme için her zaman yeterli değildir (25-27).

Halen IVM başarısını arttırmak için farklı serumlar (HSA, BSA, FCS vb.) ve hormonlar (FSH, LH, E<sub>2</sub> vb.) ekleyerek inkübasyon modelleri denenmekle birlikte doyurucu bir başarı elde edilememiştir. Ortama follüküler aspirasyon sıvısı eklenmesi ya da ko-kültürasyon (Follükül epitel hücreleri, granüloza hücreleri vb.) için hücre eklenmesi ile başarı artırılmaya çalışılmaktadır. Özellikle nükleer maturasyona katkıda bulunabilecek bu tür çalışmaların artırılmasının yararlı olacağı inancındayız.

Armstrong ve arkadaşları kumululu inkübasyondan sonra IVM'u sağlanan oositlerin oranının düşük olduğunu, bunlardan fertilize olanlarda yarıklanma ve preimplantasyon oranlarının daha da düştüğünü bildirmişlerdir (28). Bizim çalışmamızda ise kumululu inkübasyon periyodundan sonra IVM oranları anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (t=5.159, p<0.01). Çalışmamızda ayrıca IVM süreleri ile olan ilişki de gözden geçirilmiştir. 12-16 saatin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Kumuluların özellikle çekirdek maturasyonu ve ileri ki gelişme kapasitesi için gerekli olduğu görüldü. Kumuluları temizlenen oositlerde IVM'nun düşük olması, gerekli substansların oosite taşınmasının yeterince sağlanmadığını düşündürmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Zuelke, KA et al. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1993; 48 (4): 815-20.
- Beck WW. The menstrual cycle. In: Beck WW, ed. *Obstetrics & Gynecology*. New York: John Wiley Sons, 1989:27.
- Daya S. Follicle stimulating hormone versus HMG for IVF: Results of meta-analysis. *Horn Res* 1995, 43:224.
- Rojas FJ, Geisthovel R. Local insulin-like growth factors in the ovary. In: Asch R, Studd J, eds. *Progress Reproductive Medicine*. New York: Parthenon Publ, 1995:35.
- Şahmay S. Follüküler Maturasyon. *Organon Yayınları*, 1996:18-22.
- Tesarik J, et al. Human nonovulatory oocyte-cumulus complexes: Ultrastructure, macromolecular synthesis and developmental potential. *Gamete Research* 1984, 9:153-65.
- Şahmay S. İnfertilitede ovulatuvar faktör. *Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite*. İstanbul: Meta Basım, 1995: 9-13.
- Armstrong DT, Zhang. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *New York Academy of Sciences* 1995.
- Lorenz PL, et al. Influence of growth factors on the time-dependent meiotic progression of the bovine oocytes during their in-vitro maturation. *Rev Esp Fisiol* 1995; 51(2): 77-83.
- Anderiesz C, et al. The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocytes in-vitro. *Hum Reprod* 1995; 10(9); 2377-81.
- Motta PM, et al. 45 of human cumulus ooforus: A transmission elektron microscopic study on oviductal oocytes and fertilized eggs. *Hum Reprod* 1995; 10 (9): 2361-7.
- Mattioli M, et al. Cell to cell communication in the cumulus-oocyte complex and cytoplasmic maturation in pig oocytes. *Bull Assoc Anat. (Nancy) Mar*: 1991; 75 (228): 85-8.
- Hampf A, et al. Analysis of the mechanisms of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes *Development Apr*; 1995; 121 (4): 925-33.
- Demir R. İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi. *Palme Yayıncılık*, 1995:79.
- Gruzinskas JG, Yovich JL. *Gametes-The Oocytes*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1995.
- Phillips David M, Dekel Nava. Maturation of the rat cumulus oocyte complex: structure and function. *Molecular Reprod and Development* 1991; 28, 297-306.
- Dekel N. Induction of maturation of rat oocytes by interruption of communication in the cumulus-oocyte complex. *Bull Assoc Anat* 1991, 75 (228): 52-4.
- Lopata A. The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation *Ann NY Acad Sc: USA*, 1988; 541:324-36.
- 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.
- Plachot M, Mandebaum J. Oocyte maturation fertilization and embryonic Growth In Vitro. *British Medical Bulletin* 40:3 1990: 675-94.
- Galli C, et al. Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro *Bull Assoc Anat* 1991; 75: 67-71.
- Mattioli M. et al. Cell to cell communication in the cumulus-oocyte complex and cytoplasmic maturation in pig oocytes. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 1991; 75 (228): 85-8.
- Veeck LL. *Atlas of the human oocyte and early conceptus*. Philadelphia: Williams-Wilkins, 1992.
- Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human*. Philadelphia: WB Saunders Co 1993.
- 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 Vol. I, Human Reproduction* 1995; 10(7): 1897-906.
- Grandin Nathalie, Rolland Jean-Paul. 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 Elsevier*, Paris, 1991; 72: 259-267.
- Simerly Calvin R, Hecht Norman B. Tracing the incorporation of the sperm tail in the mouse zygote and early embryo using an anti-testicular a-tubulin antibody. *Developmental Biology* 1993; 158: 536-48.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of cumulus cells and serum on in vitro maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod*. 1989, 40:720-8.