

OOSİT DENUDASYON İŞLEMİNDEN SONRA HEMEN VEYA İNKÜBASYONU TAKİBEN MİKROENJEKSİYON UYGULAMASININ FERTİLİZASYON, EMBRİYO KALİTESİ VE GEBELİK ORANI ÜZERİNE ETKİSİ

Zeynep COŞKUN*, Bihter DİNGİLOĞLU*, Burcu TAMER* , Ahmet Zeki IŞIK**, Kubilay VİCDAN**, Cem AKARSU**

*Kayseri Özel Sevgi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi

**Özel Ankara Tüp Bebek Merkezi

ÖZET

Amaç: Yardımcı üreme tekniklerinde infertilite tedavisinde kullanılan en önemli tekniklerden birisi intrasitoplazmik sperm enjeksiyonudur. ICSI'den önce uygulanan denudasyon işlemi oositlerin etrafındaki korona-kumulus kompleksi mekanik ve enzimatik yolla uzaklaştırılır. Bu çalışmada, 40 IU/ml hyaluronidaz enzimi kullanılarak denudasyon işlemi yapılmış oositlerin ICSI'den önce inkübasyonsuz veya inkübe edilerek kullanılmalarının fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik oranı üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal - Metod: Hastalar haftanın günlerine göre randomize edildiler. 114 hastada (Grup I) hyaluronidaz işleminden sonra oositler 30-60 dak. süreyle 37 C'de %5.5 CO₂, %5 O₂'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında mikroenjeksiyon işlemine alınmıştır. 136 hastada ise (Grup II) hyaluronidaz işleminden hemen sonra ICSI işlemi uygulanmıştır.

Bulgular: Hyaluronidaz uygulanmasından sonra oositleri inkübe edilen ve edilmeyen gruplarda fertilizasyon oranları ve transfer edilen Grade I embriyo sayıları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. İmplantasyon oranı inkübasyon uygulanmayan grupta (Grup II) yüksek görülmeyle birlikte iki grup arasında anlamlı bir fark yoktur.

Sonuç: Hyaluronidaz kullanılarak yapılan denudasyon işleminin hemen sonrasında mikroenjeksiyon işlemine başlanabilir.

Anahtar kelimeler: hyaluronidaz, ICSI, İnkübasyon süresi

SUMMARY

The Effects of the Incubation of Hyaluronidase Applied Oocytes Before ICSI on Fertilization, Embryo Development and Pregnancy Rates

Objective: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is one of the most important techniques used for the treatment of male infertility. Before ICSI oocytes have to be denuded from cumulus and corona cells using a combination of enzymatic and mechanical methods. In this study 40 IU/ml hyaluronidase has been used to denude the oocytes. The aim of this study is to investigate the effects of the incubation of hyaluronidase applied oocytes before ICSI on fertilization, embryo development and pregnancy rates.

Materials and methods: Patients were randomly selected according to the days of the week. In 114 patient (Group I) oocytes were incubated in 37 C , %5 CO₂ and %5 O₂ for 30-60 minutes before ICSI. In 136 patient (Group II) ICSI is performed immediately after denudation.

Results: There was no statistical difference on fertilization rates and number of grade I embryo that were transferred between two groups. Although implantation rates were higher in group II that no incubation had been performed, there was no statistical difference between two groups.

Discussion: ICSI can be performed immediately after denudation with hyaluronidase.

Key words: hyaluronidase, ICSI, incubation time

GİRİŞ

Yardımcı üreme tekniklerinde infertilite tedavisinde kullanılan en önemli tekniklerden birisi intrasitoplazmik sperm enjeksiyonudur (ICSI-mikroenjeksiyon). ICSI'nin başarısı (fertilizasyon,embriyo kalitesi ve gebelik) birçok faktöre bağlıdır. Mikroenjeksiyonda kullanılan aletler (inverted mikroskop, manipulator, enjeksiyon pipetleri vb.),uygulayıcının deneyimi (Gortdts et al.1995), oositin kalitesi (Liu et al. 1995), kullanılan spermin vitalitesi (Nagy et al.1995b) ve kadın yaşı (Devroey et al.1996; Oehninger et al.1995; Abdelmassih et al.1996) gibi birçok faktör etkilidir. Overlerdeki folliküllerden toplanan oositler korona radiata ve kumulus hücreleriyle sarılmış durumdadır. Oosit ve kumulus hücrelerinin arasındaki ekstrasellüler matriks hyaluronik asit flamanlarından ve glikoprotein granüllerinden oluşur (Dandekar et.al. 1992). Ekstrasellüler matriksteki bu hyaluronik asit, kumulus hücrelerini bir arada tutan bir glikozaminoglikandır. Hyaluronidaz enzimi birçok memeli sperm plazma membranında ve akrozomunda yüksek konsantrasyonda bulunur. Bu enzim hyaluronik asiti hidrolize eder. ICSI'den önce uygulanan denudasyon işleminde oositlerin etrafındaki korona-kumulus kompleksi mekanik (pipetleme) ve enzimatik (hyaluronidaz enzimi) yolla uzaklaştırılır (Mahedevan ve Trounson, 1985).

Bu çalışmada, 40 IU/ml hyaluronidaz enzimi kullanılarak denudasyon işlemi yapılmış oositlerin ICSI'den önce inkübasyonsuz yani işlemde hemen sonra veya inkübe edilerek kullanılmalılarının fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kontrollü ovarian hiperstimülasyonu, yaşı 40 ve altındaki hastaların over rezervi ve FSH düzeyleri değerlendirilerek long protokol, mikrodoz flare up veya antagonist protokolleri uygulanarak gerçekleştirildi. Mikrodoz flare up protokolünde 21 günlük OKS kullanımını takiben 2 günlük ilaçsız dönemden sonra GnRH agonist, leuprolide asetat 2x40 µg s.c.(Lucrin,Abbot,Türkiye) ve agonist kullanımının 3. gününde rFSH (Gonal-F, Serono, Puregon, Organon, Türkiye) 225-450 IU başlandı. Antagonist protokolünde siklusun 2. günü rFSH başlanarak, en büyük follikül 14 mm'e ulaştığında 0.25mg/gün GnRH antagonist (Ganirelix) hCG gününe kadar uygulandı. Long

protokolde siklusun 21. günü GnRH agonist (Leuprolide 0.05mg) başlandı. Takip eden menstürasyonun 3. günü rFSH başlanarak agonist dozu 0.025 mg olarak devam edildi. Ovarian stimülasyon cevabı seri follikülometri ve E2 ölçümleriyle değerlendirildi. En az 3 follikül çapı >17mm olduğunda 10.000 IU HCG ile ovulasyon tetiklemesi gerçekleştirildi ve oositler vajinal ultrason yardımıyla HCG uygulanmasından 35 saat sonra toplandı.

Oositlere toplandıktan 2-2,5 saat sonra uygulanan denudasyon işlemi iki aşamada yapılmıştır. 80 IU/ml hyaluronidase (Hyaluronidase 80 IU/ml in HEPES-HTF,ART-40007-A-5,SAGE In Vitro Fertilization, Inc. A Cooper Surgical Company) enzimi, HEPES (hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid) tamponlu mediumla 40 IU/ ml'ye dil edilmiştir. Birinci aşamada (i) Korona-kumulus-oosit kompleksi 40 IU/ml hyaluronidaz içeren medium içerisinde 10 saniye süreyle tutulur. İkinci aşamada (ii) 250 µm çapındaki ağız kontrollü pipet yardımıyla enzim içermeyen medium içinde pipetlenir. HEPES'li mediumu içerisinde pipetlenerek yıkanan oositlerin enzimden uzaklaştırılması sağlanır.

Hastalar haftanın günlerine göre randomize edildiler. Haftanın 1 ,3 ve 5ci günlerindeki hastalar grup I ; haftanın 2,4 ve 6cı günlerindeki hastalar grup II'ye dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların tamamında ejakülat spermleri kullanılmıştır.

114 hastada (Grup I) hyaluronidaz işleminden sonra oositler 30-60 dak. süreyle 37 C'de % 5.5 CO2, %5 O2'de Heracell-240 inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında mikroenjeksiyon işlemine alınmıştır.

136 hastada ise (Grup II) hyaluronidaz işleminden hemen sonra ICSI işlemi uygulanmıştır.

İstatistiksel analizler için student's t-test ve Ki-Kare analizleri kullanılmış p değeri anlamlılık sınırı p< 0.05 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Hastaların ortalama yaşları, oosit denudasyon işleminden sonra hemen mikroenjeksiyon uygulanan grupta (Grup II , n =114) ve inkübasyon uygulanan grupta (Grup I, n = 136) sırasıyla 32.4± 5.4 , 31.4± 5.9'dur. Her iki grupta toplanan ortalama oosit sayısı, grup I'de 17.3±8.9 ve grup II' de 15.2±8.4 'dür. Denudasyon işleminden sonra belirlenen MII oosit sayısı grup I' de 13.0± 7.8 , grup II' de 11.4± 6.7'dir.

ICSI' den 16-20 saat sonra yapılan fertilizasyon kontrolünde grup I'de 8.0 ± 5.5 , grup II' de 6.8 ± 4.85 normal fertilizasyon (2PN) izlenmiştir. Transfer edilen embriyo sayısı grup I' de 3.1 ± 0.95 , grup II' de 3.0 ± 0.9 dur. Hastalara transfer edilen grade I embriyo sayısı grup I' de $2,23 \pm 1$, grup II' de $2,3 \pm 1,1$ ' dir. Transfer sonrası elde edilen gebelik oranı grup I' de % 45,3 ve grup II'de % 52,5' dir. İmplantasyon oranı grup I' de % 21.26, grup II' de 22.62 ' dir. Bulgular aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo: ns, not significant, fark anlamsız ($P > 0,05$)

	Hyaluronidaz uygulamasında sonra inkübasyon		
	Var (Grup I) (n=114)	Yok (Grup II) (n=136)	
Yaş Ortalama	$31,4 \pm 5,9$	$32,46 \pm 5,4$	ns
MII	$17,34 \pm 8,96$	$15,29 \pm 8,4$	ns
2PN	$13,01 \pm 7,8$	$11,43 \pm 6,7$	ns
ET sayısı	$8,0 \pm 5,5$	$6,87 \pm 4,85$	ns
Transfer edilen grade I embriyo	$3,1 \pm 0,95$	$3,03 \pm 0,9$	ns
Gebelik oranı (%)	$2,23 \pm 1,14$	$2,34 \pm 1,1$ ns	
İmplantasyon oranı (%)	45,3	52,5	ns
	21,26	22,62	ns

TARTIŞMA

Mikroenjeksiyon işleminden önce oositlerin etrafındaki korona-kumulus kompleksini mekanik ve enzimatik (hyaluronidaz) yollarla uzaklaştırmak gerekir.

Hyaluronidaz enziminin fare oositlerini aktive ettiği gösterilmiştir (Kaufman, 1983). Bununla beraber enzimin insan oositleri üzerine olan etkisi ile ilgili çok az bilgi vardır (Laufer et al.1984, Mahaduen ve Trounson 1985, Pickering et al. 1988, Abramczuk et al. 1990, Fishel et al.1992). Fare oositleri hyaluronidaz (100IU/ml) veya etanol (%17) tarafından (Kaufman et al 1983) kolaylıkla aktive olurken insan oositlerinin daha az etkilendiği görülmektedir.

Oositler üzerine olan etkileri tartışılmakla birlikte yüksek hyaluronidaz konsantrasyonları oositlerin partenogenetik aktivasyonunu uyarmaktadır (Van de Velde et al.,1997).

Bugün rekombinant enzim preparatları geliştirilmesine rağmen, kullanılan hyaluronidaz enzimlerinin birçoğu inek ve koyun testislerinden elde edilir. İnek hyaluronidaz enzimi insan hyaluronidaz enzimi ile %65 oranında benzerlik gösterir.

Saflaştırılmış enzim preparasyonları kullanılmakla birlikte rastlantısal enfeksiyon geçişlerini göz önünde tutmak gerekir. Gerçekten bu tür ürünlerin saflaştırılmasında ve sterilizasyonunda kullanılan metodların

etkinliğine rağmen bilinmeyen patojenlerin geçişini tamamen önlediğini söylemek imkansızdır (Truyen et al.1995).

Denudasyon uygulamasından sonra oositler tamponlu mediumlarda yıkanmasına rağmen hyaluronidazın muhtemel etkileri tam olarak bilinmemektedir. Mikroenjeksiyona başlamadan önce oositlerin kültür sıvısı içinde inkübe edilmesinin fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik oranı üzerine etkisinin olup olmadığı tartışılmıştır.

Çalışmamızın verileri sonucunda hyaluronidaz uygulamasından sonra oositleri inkübe edilen ve edilmeyen gruplarda fertilizasyon oranları ve transfer edilen Grade I embriyo sayıları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. İmplantasyon oranı inkübasyon uygulanmayan grupta (Grup II) yüksek görülmele birlikte iki grup arasında anlamlı bir fark yoktur. Bu verilerin sonucuna göre hyaluronidaz kullanılarak yapılan denudasyon işleminin hemen sonrasında mikroenjeksiyon işlemine başlanabilir. Ancak yine de kullanılan hyaluronidaz konsantrasyonuna ve oositlerin maruz kalma süresine dikkat edilmeli ve uygulayıcının yeteri tecrübeye ulaşmış olması sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Gordts, S., Vercruyssen, M. and Roziere, P. Recent developments in assisted fertilization. Hum. Reprod., (1995) 10 (Suppl. 1), 107-114.
2. Liu, J., Nagy, Z., Joris, H. et al. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. Hum. Reprod., 1995;10:2630-2636.
3. Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H. et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum. Reprod., 1995;10:1123-1129.
4. Devroey, P., Godoy, H., Smits, J. et al. Female age predicts embryonic implantation after ICSI: a case-controlled study. Hum. Reprod., 1996;11:1324-1327.
5. Oehninger, S., Veeck, L., Lanzendorf, S. et al. Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. Fertil. Steril., 1995;64:977-981.
6. Abdelmassih, R., Sollia, S., Moretto, M. et al. Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 1996;65:573-577.
7. Dandekar, P., Aggeler, J. and Talbot, P. Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. Hum. Reprod., 1992;7:391-398.
8. Mahadevan, M.M. and Trounson, A.O. Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization.

- Fertil. Steril., 1985;43:263-267.
9. Kaufman, M. Early Mammalian Development: Parthenogenic Studies. (1983) Cambridge University Press, Cambridge, UK. Laufer, N., Tarlatzis, B.C., DeCherney, A.H. et al. Asynchrony between cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. Fertil. Steril., 1984;42:366-372.
 10. Pickering, S.J., Johnson, M.H., Braude, P.R. et al. Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. Hum. Reprod., 1988;3:978-989.
 11. Abramczuk, J.W. and Lopata, A. Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained in vitro. Hum. Reprod., 1990; 5:578-581
 12. Fishel, S., Timson, J., Lisi, F. et al. Evaluation of 225 patients undergoing subzonal insemination for the procurement of fertilization in vitro. Fertil. Steril., 1992;57:840-849.
 13. Van de Velde, H., Nagy, Z.P., Joris, H. et al. Effects of different hyaluronidase concentrations and mechanical procedures for cumulus cell removal on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 1997;12:2246-2250.
 14. Truyen, U., Parrish, C.R., Harder, T.C. and Kaaden, O.R. There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases. Vet. Microbiol., 1995;43:103-122.