

FAREDE ANTIOKSİDANLAR IVF SONUÇLARINI VE EMBRYO GELİŞİMİNİ OLUMLU ETKİLİYOR

GİRİŞ: Memelilerde implantasyon öncesi embryolar buldukları ortamdan oldukça fazla etkileniyorlar. İnsanda, ART sırasında, zararlı Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS) gametlerin toplanması, kültürü ve manipülasyonunda her evrede oldukça fazla miktarda ortaya çıkmakta. In vivo olarak gametler tarafından oluşturulan düşük dozda ROS gamet fonksiyonu ve gelişimi açısından gerekli olsa da in vitro oluşan ROS, özellikler atmosferik kültür şartlarında düşük embryo kalitesi ve viabilitesi ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin insan embryolarında yüksek oranda tespit edilen H₂O₂ hücre apoptosisi ile ilişkilidir.

Düşük oranda O₂ içeren embryo kültürlerinde, (tipik olarak %5), O₂ düzeyi tuba uterina ve uterin kavite ortamına daha yakın olduğundan embryo gelişimi ve viabilite oranları daha yüksektir. Bu kültürler kullanılarak oluşturulan embryolarda canlı doğum oranı da daha fazladır. Bunun aksine atmosferik şartlarda embryo bölünmesi gecikmekte ve embryo gen ekspresyonunda azalma gözlenmektedir. Bu embryolarda ROS daha yüksek oranlarda bulunmaktadır.

Kadın reproduktif sisteminde düşük konsantrasyonda O₂ bulunmasının yanı sıra çeşitli antioksidan maddeler de salınmaktadır. Aynı şekilde erkek reproduktif sisteminde ve seminal sıvıda da antioksidanlar bulunmaktadır. Spermlerin ART için hazırlanması sırasında yüksek oranda ROS oluşmakta ve bu spermler immatür olduklarından ayrıca antioksidan içeren seminal sıvıdan da yoksun olduklarından oksijen radikallerinden daha fazla zarar görmektedirler.

Antioksidanlardan L-Karnitin, epididimis sıvısında bulunur ve sperm motilitesini artırır, spermin fertilizasyon için olgunlaşmasına yardımcı olur ve sperm hücrelerini apoptosise karşı korur. Oositlerde MII'deki oosit sayısını artırır. Embryo kültüründe de daha düşük DNA hasarı ile ilişkilidir.

Alfa Lipoik Asit, sperm motilitesini artırır; oksidatif strese dolayısıyla DNA hasarına karşı, ve apoptotik genlerin aktivasyonunu engelleyerek hücre ölümüne karşı da koruyucudur.

N-Asetil Sistein, hücre için en önemli antioksidanlardan biri olan glutatyonun sentezinde hız kısıtlayıcı basamakta görev alır. Glutatyon, fertilizasyon için spermin kapasitasyonu için gereklidir. Aynı zamanda sistein zona pellucida'da yapısal değişikliğe yol açarak fertilizasyon kapasitesine katkıda bulunur.

Embryo kültür ortamında bulunan, L-Karnitin, Alfa Lipoik Asit ve N-Asetil Sistein'in fare embryolarının gelişiminde ve viabilitesinde olumlu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Bu etki hem atmosferik hem de fizyolojik konsantrasyonlarda O₂ altında görülmekle birlikte atmosferik koşullarda daha fazla görülmüştür.

Materyal Ve Method:

Pronükleer oositin toplanması için 3-4 haftalık F1 virgo dişi fareye ekzojen gonadotropin 48 saat sonrasında da hCG verilerek, 12 haftalık F1 erkek fare ile çiftleşmesi sağlanmıştır. Vajene konulan tıkaç ile çiftleşmenin gerçekleştiği doğrulanmıştır. hCG sonrası 22. saatte pronükleer oositler toplanarak hyaluronidaz içeren GMOPS mediumunda iki kez yıkanmış, 48 saat albümin içeren G1 mediumunda bekletildikten sonra G2 mediumuna alınmıştır.

IVF için oositler 3-4 haftalık F1 dişi hibrid fareden hCG injeksiyonundan 15 saat sonra toplanarak kültür için albümin içeren parafin yağı, %6 CO₂ altındaki 37°C'deki oosit IVF mediumunda inkübe edilmiştir. Spermiler ise 8-12 haftalık F1 erkek fareden alınarak kapasitasyonun gerçekleşmesi için 1 saat sperm IVF mediumunda tutulmuş ve konsantrasyonu tespit edilmiştir. Her oosit kümesine 1-2 milyon motil sperm eklenerek fertilizasyonun gelişmesi için 4 saat beklenmiş sonrasında embryolar IVF mediumu ve G1 mediumu ile yıkanarak kültürler random olarak yerleştirilmiştir.

Antioksidan içeren ve içermeyen ortamda gerçekleşen IVF ile oluşan embryoları oluşturan gametlerin kültüre edildikleri mediumlara göre ayrılmasıyla 4 grup elde edildi. Ayrıca antioksidan içeren ve içermeyen kültürlerden elde edilen oosit ve spermiler ile, antioksidansız ortamda IVF yapılmasıyla da 4 grup elden edildi.

Analiz:

Embryolar ayrı ayrı kültüre edildikten sonra 4 saat G1 mediumunda ve sonra 48 saatte G2 mediumunda inkübe edildiler. İnkübasyon boyunca 15 dakika aralıklarla görüntü alındı. Döllenmeden blastokist oluşumuna, blastokistten trofoblast ve embriyoblast ayırımına kadar tüm morfokinetik olaylar kaydedildi. Blastokistlerin sayımı spesifik boyama yöntemiyle yapıldı. Trofoblastlar propidium iyot ile boyandı embriyoblast boyanmadan kaldı ve tüm hücre çekirdekleri bisbenzimid ile boyanarak flüoresan mikroskop ile incelendi.

İntrasellüler H₂O₂ seviyelerini ölçmek için ise yine flüoresan mikroskop kullanıldı. Pronükleer oositlerdeki H₂O₂ peroksiflor 1 ile reaksiyona girerek mikroskopide görünür hale geldi.

İstatistik: hücre sayıları ve zaman ile ilgili analizler one-way ANOVA ve ardından Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile analiz edildi. Kontrol grupları için ise student's t-test uygulandı.

Sonuçlar:

Antioksidanların herhangi bir evrede IVF mediumunda bulunması, fertilizasyon hızına ve blastokist oluşma yüzdesine etkide bulunmamıştır. Antioksidanların yalnızca embryo kültür ortamına eklenmesi, trofoblast, embriyoblast ve dolayısıyla blastokist hücre sayısında belirgin artış sağlamıştır ($p < 0.01$). Aynı şekilde antioksidanların sadece IVF mediumunda bulunması da embriyoblast, trofoblast ve sonucunda blastokist hücre sayısının fazla olmasıyla sonuçlanmıştır. Antioksidanların hem embryo kültür ortamında hem de IVF mediumunda bulunması ise hücrelerin sayısında artışa ek olarak gelişim sürecinin hızının artması ile sonuçlanmıştır. Ve bu etki iki hücre bölünmesi evresinden blastokist evresine kadar gözlenmiştir ($p < 0.01$).

Gamet kültürlerinde antioksidanların bulunması, fertilizasyon hızı ve blastokist oluşma yüzdesinde bir fark oluşturmamıştır. Yalnızca sperm IVF ortamında antioksidanların bulunduğu embryolar hem oosit hem de sperm ortamında antioksidan embryolarla karşılaştırıldığında, blastokist total hücre sayısında bir fark saptanmamıştır. Yalnızca oosit IVF mediumunda antioksidan bulunan embryoların ise trofoblast, embriyoblast ve dolayısıyla blastokist hücre sayısının fazla olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde hem oosit hem sperm IVF mediumunda antioksidanlar bulunan embryoların da hücre sayısının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yalnızca oosit IVF ortamında antioksidanlar bulunan embryolar ve hem oosit hem sperm IVF ortamında antioksidanlar bulunan embryoların gelişim sürecinin daha hızlı olduğu gözlenmiştir. Yalnızca sperm IVF ortamında antioksidanlar bulunan

embryolar hiçbir ortamda antioksidan bulunmayan ambryolarla karşılaştırıldığında ise hız farkı saptanmamıştır.

Antioksidanların bulunduğu ortamda 4 saat inkübe edilen pronükleer oositlerde bulunan H₂O₂ düzeyleri, kontrol grubu le karşılaştırıldığında belirgin olarak daha düşük izlendi (p<0.001). Ayrıca Toplanma sırasında 20 dakika süre ile antioksidanlar ile birleştirilen pronükleer oositlerin blastokist hücre sayısında önemli fark izlendi.

Tartışma:

Günümüzde kullanılmakta olan G1 ve G2 IVF mediumlarında lipoik asit haricindeki antioksidanlar rutin olarak bulunmamaktadır. Bu çalışmada gamet toplanması ve fertilizasyon sırasında kullanılan mediumlarda, antioksidanların bulunmasının, erken hücre bölünmesi evresinden blastokist oluşum evresine kadar her aşamada embryo gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Özellikler atmosferik koşullarda (%20 O₂ altında) çalışılan merkezlerde bu yarar belirgin olarak gözlenmektedir.

Yalnızca sperm IVF ortamında antioksidanların bulunmasının blastokist hücre sayısına ve gelişme hızına katkıda bulunmadığı gözlenirse de; sperm motilitesinin arttığı, membran bütünlüğünün korunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte kullanılan IVF protokolü gereği sperm hücreleri oositlere göre daha kısa süre antioksidanlara maruz kalmıştır. Ayrıca kullanılan sperm hücreleri genç fertil erkek fareden alınmıştır ve infertil erkeği temsil etmemektedir. Çalışma antioksidanların sperm üzerindeki faydalı etkilerini ortaya koyamamakla birlikte oositlerle birlikte sinerjistik etkisinin ortaya çıktığını göstermiştir.

Ayrıca çalışmada antioksidanlarla 4 saat inkübe edilen pronükleer oositlerin H₂O₂ düzeylerinin antioksidan kullanılmadan inkübe edilen oositlerden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu da inkübasyon sırasında azalmış oksidatif stresi yansıtmaktadır. Koyunlarda yapılan çalışmalarda, in vitro oldunlaştırma ortamına L-karnitin eklenmesinin glutatyon düzeylerinde artışa ve oksijen radikalleri seviyelerinde düşüşe yol açtığı görülmüştür. Embryodaki yüksek glutatyon seviyeleri embryo kalitesinde artış ile birliktelik göstermektedir. Bu üç antioksidanın da intrasellüler H₂O₂ seviyesini düşürdüğü tamamen ortadan kaldırmadığı bilinmelidir, hücrelerin haberleşmesinde, gamet fonksiyonlarının ve gelişiminin sürdürülmesinde düşük dozda oksijen radikallerinin varlığı önemlidir.

Sonu olarak antioksidanların IVF sırasında ve embryo kültürü sırasında ortamda bulunması, hücre sayısında artışa, embryo gelişimine ve gelişim hızına katkıda bulunmakta; aynı zamanda H₂O₂ seviyelerinde azalmaya sebep olmaktadır. Bu bulgular antioksidanların insanda IVF sürecine katkıda bulunabileceğine ve embryo viabilitesini arttırabileceğine işaret etmektedir.