

Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ko-Kültür Kullanımı

*Emb.Yeşim KUMTEPE**,
*Dr.Hakan KIRAN***
*Emb.Zeynep G. TOKAT**
*Emb.Ayşe Ç. KENDİRCİ**
*Prof.Dr.M.Turan ÇETİN***

Embriyo transferi (ET) sonrası implantasyon yetersizliği, in vitro fertilizasyon (IVF) uygulanan kadınlar için hala büyük bir problemdir. İmplantasyon başarısını etkileyen faktörler arasında, embriyo kalitesi, endometrial reseptivite ve transfer tekniği sayılabilir. Genç yaştaki bayanlara yapılan ET sonrası yüksek gebelik oranları, bu faktörlerden embriyoya düşen payın daha az olduğunu düşündürmektedir. Yapay uterus olarak da bilinen endometrial ko-kültür ortamları, embriyoların transfer dönemi öncesi doğala yakın bir ortamda gelişimlerine izin veren sistemlerdir. Ko- kültür sistemlerinin embriyo gelişimine pozitif etkisi in vivo şartları başarı ile taklit etmesidir. Bu derlemede, yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) ko-kültür kullanımının temel prensipleri ele alındı ve literatürden örnekler verildi.

Ko-Kültür Sistemlerinin Yapısı ve Kullanım Alanları

Endometrium ile embriyo arasındaki etkileşimin en yüksek düzeyde olduğu dönemin embriyoların 4, 5 ya da 6.günü olması nedeniyle, bu dönemde ET yapılması daha avantajlı gibi görünmektedir. Bu uzun süreyi sağlamak için, in vivo şartları mümkün olduğunca taklit edebilen kültür sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu amaçlara yönelik IVF kültür mediumlarına ek olarak ko-kültür sistemleri de tercih edilebilmektedir^{1,2}.

YÜT uygulamalarında en çok çalışılan hücre grubu insan fallopian tüp hücreleri, maymun böbrek epitel hücreleri,bovine oviductal epitel hücreleri, rahim içi hücre grubu (endometrial hücreler) ve oositlerin granuloza

* Prof.Dr.M.Turan Çetin Kadın Sağlığı ve Tüp Bebek Merkezi, ADANA

hücreleridir. Bu hücre gruplarının monolayer üremesi ile elde edilen ko-kültür sistemini oluşturan besleyici ve yardımcı hücreler mediumun içindeki toksik ve inhibitör etkisi gösteren maddeleri basal mediumdan uzaklaştırarak embriyo gelişimini stimüle ederken, bir çok embriyotrofik faktörleri ortama sağlarlar ve tüm bunlar embriyo kalitesini artırır. Fakat bu hücrelerin embriyo gelişimi üzerinde aynı zamanda birden fazla etkiye sahip olmasından dolayı, bu faktörlerin tanımlanması güçleşmiştir. Eğer doğru bir tanımlama yapıp formülize edilebilmiş olsalardı, piyasada kullanılan IVF mediumlarının bu faktörleri uygun miktarda içerip içermediği bilinir ve hücrelerin varlığına ihtiyaç duyulmazdı. Bu konudaki çalışmalar henüz olumlu bir sonuç vermemiştir. Yapılan birçok ko-kültür çalışmalarında transfer edilen embriyoların gelişmiş bir inner cell mass (iç hücre kitlesi) yapısına sahip oldukları, yanı sıra, gebelik sonuçları ve gebeliğin devam ettirilme oranlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. İmplantasyon başarısızlığı olan oosit donasyon hastalarında, ko-kültür uygulamaları ile daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları elde edilmiştir³. Ko-kültür uygulamalarının gerekliliği üzerine öne sürülen mekanizmalar şunlardır:

1. Metabolik kilitleme: Rutin kültürlerin yoğun olduğu hücre tabakası formu, moleküler ağırlığı düşük bazı metabolitler sağlar. Bunlar genetik aktivasyonu sağlayarak embriyo metabolizmasına süreklilik getirir. Bu da embriyonun normal olmayan metabolik gelişimini, yavaş gelişimini ya da gelişim duraksamasını engeller.
2. Gelişim faktörü: Besleyici hücrelerin embriyonik hücre gelişimini sağlayıcı bazı önemli maddelerin kaynağı olduğu saptanmıştır (pirüvat, glukoz, laktat ve amino asitler).
3. Toksik bazı metabolitlerin uzaklaştırılması: Besleyici hücreler glisin üretimi ile hücre gelişimine engel olabilecek bazı ağır metal iyonlarını amonyum ve üreyi kullanmak suretiyle ortamdan uzaklaştırırlar.
4. Serbest radikal oluşumunun engellenmesi: besleyici hücreler bazı azaltıcı faktörlerle hücre genetik materyalinin mutasyona uğramasını sağlayan serbest radikalleri uzaklaştırır veya oluşumunu engeller^{4,6}.

Buna rağmen birçok IVF laboratuvarında ko-kültür uygulamalarının tercih edilmeme nedenleri;

- a. Ko-kültür hazırlanması ve takibi laboratuvar çalışmalarına ek olarak yoğun bir iş yükü getirir.
- b. Birçok IVF laboratuvar çalışanınin oosit, sperm ve embriyo dışındaki hücre kültürü konusunda bilgi ve tecrübesi yoktur. Ko-kültür çalışma teknikleri öğrenilmesi gereken ek bir çalışma tekniğidir.
- c. Ko-kültür çalışmaları ve optimal gebelik oranları konusunda uluslar arası belirlenmiş bir fikir birliği yoktur. Elde edilen tüm sonuçlar belirli merkezlerin kendi sonuç ve kararlarını yansıtmaktadır.
- d. Hücrelerin elde edildiği dokuların enfeksiyon taşıma riski ve bunun embriyoyu etkileme ihtimali bir çok YÜT laboratuvarını bu tekniği uygulamaktan alıkoymaktadır. Bu konuda özellikle transmisyonun tipi hala aydınlanamamıştır^{4,7}.

Ko-kültür uygulama endikasyonları şunlardır;

35 yaş ve üstü hastalar

Önceki YÜT denemeleri sonucu gebelik elde edilemeyen durumlar

Yüksek FSH düzeyine sahip kadınlar

Ovulasyon indüksiyon programlarına kötü yanıt veren hastalar

Önceki denemelerinde düşük kalitede embriyo gelişimi (yüksek oranda fragmentasyon, yavaş embriyo gelişimi, düzensiz klivaj) gözlenen hastalar⁸.

Ko-kültür sistemlerinin hücresel özellikleri

Monolayer hücre özellikleri; hücre kültürünün 7.gününe dek silia hücreleri ile diğer sekresyon hücreleri bir arada gözlenir. Bir kaç pasaj sonrası silia hücreleri fonksiyonlarını yitirirler ve hücre popülasyonu yoğunlukla sekresyon hücrelerini kapsar. Bunlar çok sayıda mikrovilli içeren hücrelerdir. Bu hücreleri üreme sonrası işlem sırasında kullanılmak üzere dondurmak mümkündür. Başarılı bir monolayer hücre gelişimi şu faktörlere bağlıdır;

Hücrelerin dish yüzeyine tutunabilmeleri ve optimal yayılım performansı gösterebilmeleri için serum içeren mediuma ihtiyacı vardır. Ko-kültür çalışmalarında serum olarak hastanın kendi kanından elde edilen inaktive edilmiş ve filtrasyondan geçirilmiş maternal serum tercih edilir. Buna alternatif olarak günümüzde en çok Synthetic Serum Substitute (SSS, Irvine Scientific, Santa Ana) tercih edilmektedir. Son yıllarda gözlenen hayvansal protein kaynaklı kontaminasyonlar yüzünden artık bir çok çalışmada tercih edilmemekle birlikte sağladığı organik zenginlik nedeniyle Fetal Calf Serum (Biological Industries, Israel) kullanılmaktadır.

Medium olarak elde edilen tüm hücre türlerini besleyip geliştirebilecek zengin bir medium seçilmelidir.

Ko-kültür hücrelerinin en homojen ve aktif mitotik gelişimi gösterebilmeleri için uygun miktar (300.000 canlı hücre/well) dağılımında hücre ekimi önemlidir.

Hücre türleri eşit oranda gelişmezler, özellikle fibroblastik hücrelerin gelişimi biraz daha yavaş olabilir. Üreme sürecinde hücreler tanımlanmalı, gelişimleri ayrı ayrı takip edilip değerlendirilmelidir^{1,9}.

Ko-kültür hazırlanması için genellikle uygun hücre yüzeyleri veya dokularından oluşturulan kültürler kullanılır. Tubal epitel hücreleri arasında bilinen saf bir kültür yoktur. Sağlıklı fallopian tüpler menopozal dönem öncesi histeroskopi ile elde edilir. Steril, saf epitel hücre dokuları hazırlanır. İlk pasaj her zaman en başarılı kültür düzlemini oluşturur. Kültüre alınan hücreler sıvı nitrojende aşamalı olarak dondurulur ve planlanan siklus öncesi çözülür. Çözülme sonrası ikinci hücre kültürü oluşturulur^{10,11}.

Ko-kültür sistemlerinde mediumların önemi

Ko-kültür sistemi üç bağımsız öğeden oluşmaktadır; embriyo, besleyici hücreler ve medium. Her bir öğe diğer ikisinin üzerinde kendi belirgin etkisini gösterir. Bu iletişimlerden en hayati olanı basal mediumun besleyici hücrelerin büyümesini devam ettirmesi ve embriyonun ihtiyaçlarına cevap verebilmesidir. Birçok ko-kültürde basal medium olarak tercih edilen basit iyonik mediumların embriyo için yeterliliği ispatlanmış ve diğer hücrelerin gelişimi gözardı

edilmiştir. Diğer taraftan bazı çalışmalarda hücreler için kompleks kültür ortamı dizayn edilmiş ama bu mediumlar embriyo gelişime uyum göstermemiştir. Ko-kültürün getirdiği pozitif farklılıklar, ancak embriyoların rutin olarak kullanılan kültür mediumları ile inkübe edildiğinde kötü embriyo gelişimi ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı durumlarında kendini gösterebilir. Bu sonuçlar ko-kültür ortamındaki hücrelerin embriyo toksik maddeleri kültür ortamından uzaklaştırdığına dair teorileri desteklemektedir. Embriyo gelişimini düzeltmeye yönelik kültür mediumları bile embriyoların implantasyonu üzerinde pek çok farklı etki gösterirler.Örneğin mediumun içeriğinin değiştirilmesi ile embriyoların glikolitik aktivitesi de (amino asit, vitamin, insülin, epidermal growth factor ve transferrinin farklı kombinasyonları) değişebilir. Örneğin amino asit yıkımı sonucu meydana çıkan amonyumun embriyo gelişimi üzerine toksik olduğu gözlenmiştir.Bu etkiyi azaltmak için mediumun 48 saatte bir değişimi uygun görülmüştür.Daha sonra yapılan çalışmalar epidermal growth factor ve leukemia inhibitory factor varlığında blastosist oluşum oranının arttığını, ayrıca bu ortamlarda gelişen embriyoların inner cell mass bakımından daha çok hücreye sahip olduklarını göstermiştir.Ayrıca amino asit ve glutaminlerin embriyo gelişimini stimule ederken aslında inner cell mass hücrelerinde artışa ve gelişime sebep oldukları görülmüştür.¹²⁻¹⁴ Benzer olarak kültür ortamına çeşitli makromoleküllerin eklenmesinin, embriyoda toplam blastomer ve inner cell mass sayısında belirgin bir artışa yol açtığı gözlenmiştir¹⁵.

Vero hücreler hazır kitler halinde satılan canlılığını yitirme riski düşük, saflaştırılmış hücre kültürleridir. Defalarca pasaj yapmaya uygun,birçok hücre kültürüne göre daha proliferik bir gelişim gösteren yapıya sahiptirler.Bu yüzden ekim yapılan hücre sayısı miktarı da diğer ko-kültür sistemlerine göre daha düşüktür.Vero hücre kültürü için DMEM-%10 maternal serum (Dulbecco's Modified Eagle's Medium + %10 Fetal Bovine Serum) kullanılır. Monolayer hücreler T6VA (T6 supplemented with Vitamins and Amino acids) ile yıkanır^{16,11}.

Blastosist transferi ve ko-kültür kullanımı

Blastosist transferinin fizyolojik olarak daha yüksek implantasyon ile sonuçlanması, blastosiste ulaşan embriyoların genomlarının daha aktif ve sağlıklı olmaları ve devam eden gebeliklerin daha fazla olması nedeni ile genellikle blastosist çalışmalarında ko-kültür tercih edilen bir uygulama olmuştur. Bongso ve ark. insan tubal hücreleri ile yaptıkları çalışmalarında 5.gün sabahında % 69 oranında kavite vermiş embriyolar, 6.günün sabahında ise expended ve hatching blastosistler geliştirmişlerdir⁵. Wiemer ve ark. oviductal epitel ile gelişen embriyoların büyüme hızlarının daha yüksek olduğunu ve embriyoların daha düşük fragmentasyona sahip olduklarını göstermiştir¹⁷. Bu çalışmalar ko-kültür sistemlerinin 35 yaş üstü kadınlarda ve daha önceden tekrarlayan implantasyon başarısızlığı gözlenen hastalarda daha başarılı olduğunu göstermiştir. Menezo ve ark. vero hücreleri ile yaptığı çalışmalarda % 23 oranında bir gebelik artışı göstermiştir¹⁸. Çeşitli infertilite nedenlerine sahip hastalarda yapılan bir çalışmada Olivennes ve ark. ko-kültür ile yetiştirilen morula ve blastosistlerde transfer sonrası yine yüksek implantasyon oranları göstermiştir¹⁹. Jayot ve ekibi hastadan elde edilen endometrial hücreleri daha siklusta ko-kültür hazırlayarak embriyo gelişiminde kullanmıştır. Dördüncü günde %21 morula görülürken tanımlanmış mediumlarla inkübe edilen embriyoların sadece % 8' i morula düzeyi gelişim gösterebilmişlerdir. Cohen ve ark. ko-kültür ile geliştirilen embriyolarda zona pellucidanın incelmış olduğunu gözlemlemiştir. Buna bağlı olarak assisted hatching ile kombine edilen ko-kültür çalışmalarında daha önceki IVF denemelerinde başarısızlıkla sonuçlanan hastalarda artan gebelik oranları elde edilmiştir²⁰. Li ve ark. ko-kültür ile kontrol grubu blastosistlerinin kromozom kompozisyonlarını karşılaştırmışlar ve herhangi bir fark görmemişlerdir²¹. Oviductal epitel hücreler ve granuloza hücreleri ile ko-kültüre edilen embriyoların, kontrol grubuna oranla blastosist evresine geçme oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur²². Bir diğer çalışmada, endometrial epitel hücreleri ile insan embriyolarının ko-kültürü blastosist oranını % 50.8' den % 58.2' ye çıkarmış, implantasyon ve gebelik oranları artmıştır²³.

SONUÇ

Değişik merkezlerden alınan birçok ko-kültür çalışmaları bu sistemlerin sequential mediumlara üstünlüğünü göstermiştir. YÜT uygulamalarında ko-kültür kullanımı, endikasyonu olan durumlarda implantasyon oranlarını ve dolayısı ile gebelik oranlarını arttırabilir. Ko-kültür kullanımına ilişkin geniş vaka serili çalışmaların başarılı sonuçlarının bildirilmesi, bu sistemlerin daha fazla tercih edilmesine yol açacaktır. Ayrıca, IVF laboratuvar personelinin ko-kültür teknikleri konusunda eğitilmesi, ileride bu tür uygulamaların rutine girmesini kolaylaştıracaktır.

Kaynaklar

1. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, et al. Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization-embryo transfer. J Assist Reprod Genet. 1999;16(3):121-7.
2. Barmat LI, Worriow KC, Payton BV. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. Fertil Steril 1997;67:775-779.
3. Rubio C, Simon C, Mercader A, et al. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. Hum Reprod. 2000;15 Suppl 6:31-8.
4. Jacobs AL, Carson DD. Uterine epithelial secretion of interleukine-1 alfa induces prostaglandine E2 AND PGF 2 alfa secretion by uterine stromalcells in vitro. Endocrinology 1993;132:300-308.
5. Bongso A, Ng S.C, Fong CY, et al. Improved pregnancy rate after transfer of human fallopian tubal cell coculture. Fertil Steril 1992;58:569-574.
6. Bongso A, Soon-Cye, N Sathananthan H, et al. Improved quality of human embryos when co cultured with human ampullary cells. Hum Reprod 1989;6:706-713.
7. Jayot S, Parnex I, Verdaguer S, et al. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantations. Fertil Steril 1995;63:109-114.
8. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocysts formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. J. Assist Reprod Genet 2996;13:9-14.

9. Liu HC, Tseng L. Estradiol metabolism in isolated human endometrial epithelial gland and stromal cells. *Endocrinology* 1992;104:1674-1681.
10. Tucker JM, Kort HI, Toledo AA, et al. Effect of coculture on subsequent survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J Assist Reprod Gen* 1995;12:689-692.
11. Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Bio Reprod.* 1990;42:301-306.
12. Pollard JW. Regulation of growth factor synthesis and growth factor related gene expression in the rat and mouse uterus before and after implantation. *J Reprod Fertil* 1990;88:721-733.
13. Feng HL, Wen XH, Amet T, et al. Effect of different coculture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 1996;11:1525-1528.
14. De Los Santos MJ, Mercader A, Frances A, et al. Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 systems during embryonic development. *Bio Reprod.* 1996;54:563-574.
15. Choi YH, Lee BC, Lim JM, et al. Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome. *Theriogenology.* 2002;58(6):1187-97.
16. Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, et al. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium in coculture on vero cells: A randomized study. *Fertil Steril* 1994;61:521-525.
17. Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N, et al. Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod.* 1996;11(11):2429-33.
18. Menezo YJ, Bellec V, Zaroukian A, et al. Embryo selection by IVF, co-culture and transfer at the blastocyst stage in case of translocation. *Hum Reprod.* 1997;12(12):2802-3.
19. Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, et al. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* 1994;9(12):2367-73.
20. Cohen J, Alikani M, Liu HC, et al. Rescue of human embryos by micromanipulation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1994;8(1):95-116.
21. Li GP, White KL, Aston KI, et al. Conditioned medium increases the polyploid cell composition of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts. *Reproduction.* 2004;127(2):221-8.

22. Wu YH, An ZX, Zhang Y, et al. The application of co-culture system on the in vitro development of bovine somatic nuclear transferred embryos] Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2006;22(2):306-10.
23. Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, et al. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. Fertil Steril. 2003;80(5):1162-8.

Yazışma Adresi:

Dr.Hakan KIRAN
Prof. Dr. M. Turan Çetin Kadın Sağlığı
ve Tüp Bebek Merkezi
100.Yıl Mah. 132 Sok. No:1
Seyhan-ADANA

Tel: 0 322 2563177
Fax: 0 322 2563186
e-posta: hakankiran01@yahoo.com