

Calciumpatroonanalyse tijdens eicelrijping en na toepassing van geassisteerde eicelactivatie

De Roo C.¹, Nikiforaki D.¹, Vanden Meerschaut F.¹, Lu Y.¹, Lierman S.¹, Qian C.¹, Heindryckx B.¹, De Sutter P.¹

¹ Universitair Ziekenhuis Gent, Afdeling Reproductieve Geneeskunde, Gent, België

Introductie

Studies op diermodellen beschrijven dat de bekwaamheid van de eicel om intracellulaire Ca^{2+} -oscillaties te genereren, wordt verworven tijdens de eicelrijping. Gegevens hierover bij de mens zijn echter schaars. Het doel van deze studie is het vergelijken van de door ionomycine geïnduceerde Ca^{2+} -piek in verschillende rijpingsstadia van humane eicellen. In tweede instantie werd het precieze effect van onze techniek van geassisteerde eicelactivatie (assisted oocyte activation, AOA) op het intracellulair calcium nagegaan.

Materialen en methodes

Er werden 48 humane eicellen gecollecteerd van 35 verschillende koppels en opgedeeld in 5 groepen: (1) verse germinale vesikel (GV) eicellen (N=10), (2) verse metafase I (MI) eicellen (N=10), (3) GV-eicellen gematureerd tot het metafase II (MII)-stadium na 24h (N=10), (4) MI-eicellen gematureerd tot het MII-stadium na 3h (N=10) en (5) onbevuchte eicellen 24h na IVF-behandeling (N=8). Deze 5 groepen eicellen werden geladen in de fluorescente calciumindicator Fura-2AM (7,5 μM) en vervolgens blootgesteld aan 10mM ionomycine gedurende 20 min. Simultaan werden de intracellulaire calciumveranderingen gemeten. In het tweede luik van de studie werd, volgens het AOA-protocol, 0.1 mol/l CaCl_2 geïnjecteerd intracellulair, gevolgd door tweemaal 10 min blootstelling aan 10mM ionomycine. Opnieuw werd de intracellulaire calciumrespons gemeten. Tussen deze stappen werden de eicellen gedurende 30 minuten geïncubeerd op 37°C en bij 6% CO_2 .

Resultaten

Na blootstelling aan ionomycine vertoonden alle eicellen één sterke stijging van de intracellulaire calciumconcentratie, die gemiddeld na 5,9 min. ($\pm 1,93$) herstelde tot de basiscalciumconcentratie. GV-eicellen vertoonden een significant kleinere amplitude in vergelijking met de andere groepen. De calciumpieken van verse MI-eicellen waren daarentegen niet significant verschillend van de calciumpieken van in vitro uitgerijpte eicellen.

	GV vs. MI	GV vs. GV-MII 24h	GV vs. MI-MII 3h	GV vs. Failed fertilized	MI vs. GV-MII 24h	MI vs. MI-MII 3h	MI vs. Failed fertilized
Absolute amplitude	P=0,013	P=0,082	P=0,026	P=0,051	P=0,096	P=0,406	P=1
Area under the curve	P=0,041	P=0,082	P=0,041	P=0,021	P=0,364	P=0,705	P=0,534

Bij geassisteerde eicelactivatie induceerde zowel de injectie van Ca^{2+} , als de blootstelling van de eicel aan ionomycine telkens één intracellulaire Ca^{2+} -stijging. Deze pieken resulteerden echter niet in spontane Ca^{2+} -oscillaties binnen een termijn van 8h.

Conclusie

De potentie van een humane eicel om intracellulaire Ca^{2+} -oscillaties te genereren neemt toe tijdens het uitrijpingsproces. Op basis van deze gegevens is het calcium-vrijstellingsmechanisme waarop ionomycine effect heeft, reeds uitgerijpt op het MI-stadium. Daarnaast werd geïllustreerd dat de 3 AOA-geïnduceerde Ca^{2+} -pieken niet gevolgd worden door spontane Ca^{2+} -oscillaties volgens de hypothese van Ca^{2+} -induced Ca^{2+} releasing mechanisme.