

## Calciumpatroonanalyse tijdens eicelrijping en na toepassing van geassisteerde eicelactivatie

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

<sup>1</sup> Universitair Ziekenhuis Gent, Afdeling Reproductieve Geneeskunde, Gent, België

### Introductie

Studies op diermodellen beschrijven dat de bekwaamheid van de eicel om intracellulaire Ca<sup>2+</sup>-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<sup>2+</sup>-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 (7,5µM) 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>.

### Resultaten

Na blootstelling aan ionomycine vertoonden alle eicellen één sterke stijging van de intracellulaire calciumconcentratie, die gemiddeld na 5,9 min. (±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.

	<b>GV vs. MI</b>	<b>GV vs. GV-MII 24h</b>	<b>GV vs. MI-MII 3h</b>	<b>GV vs. Failed fertilized</b>	<b>MI vs. GV-MII 24h</b>	<b>MI vs. MI-MII 3h</b>	<b>MI vs. Failed fertilized</b>
<b>Absolute amplitude</b>	P=0,013	P=0,082	P=0,026	P=0,051	P=0,096	P=0,406	P=1
<b>Area under the curve</b>	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<sup>2+</sup>, als de blootstelling van de eicel aan ionomycine telkens één intracellulaire Ca<sup>2+</sup>-stijging. Deze pieken resulteerden echter niet in spontane Ca<sup>2+</sup>-oscillaties binnen een termijn van 8h.

### Conclusie

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