

Farklı büyüklüklerdeki sığır oositlerinin maturasyonu üzerine insülin benzeri büyüme faktörü- 1'in (IGF-1) etkisi*

Duygu Burcu TOPUZOĞLU**

Öz: Bu çalışmanın amacı farklı büyüklüklerdeki oositlerin maturasyonu üzerine insülin benzeri büyüme faktörü-1'in etkisinin araştırılmasıdır. Çalışmada 360 adet A kalite oosit kullanılmıştır. Çalışma materyali; Grup I uygulama (%50 ng/ml IGF-1), Grup II kontrol grubu olmak üzere 2 gruba ayrılmış ve her grup oosit çaplarına göre 3 alt gruba ayrılmıştır. Grup I'de TCM-199 vasatına 50ng/ml IGF-1 eklemiş, kontrol grubuna ek fakör eklenmemiştir. Oosit çapı gözetmeksizin Grup I'de %73,33, kontrol grubunda %63,33 maturasyon oranları elde edilmiş ve gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur (p0,001) oosit çaplarına göre gruplar arasında, grup ve alt gruplar arasında maturasyon yüzde oranlarında bir artış saptanmış ise de fark istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur. Çalışma sonunda maturasyon vasatına eklenen IGF-1'in maturasyon oranını arttırdığı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: IGF-1, maturasyon, oosit, sığır

Investigation of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on maturation of different sized bovine oocytes

Abstract: The aim of this study is to investigate the effects of insulin like growth factor-1 (IGF-1) on different sized bovine oocytes. In this study 360 A quality oocytes were used. Main groups were divided into 2 groups; Group I and Group II (control) and each group was divided into 3 subgroups according to the oocyte size. In Group I 50 ng/ml IGF-1 was added and in control group no growth factor was added. Excluding the oocyte diameter, rates in were observed as in Group I 73,33 % and in Group II, 63,33%. The difference between

en maturation rates were found statistically significant (p 0,001). However, induced maturation rates were observed both in between main groups and subgroups according to the oocyte diameters, statistically no difference was observed. In the end of the study, we concluded that the addition of IGF-1 to the maturation mediums, was induced the maturation rates.

Key Words: IGF-1, maturation, oocyte, bovine

Giriş

Son yıllarda çiftlik hayvanlarında oositlerin in vitro maturasyonu ve fertilizasyonu üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda çok önemli aşamalar sağlanmış ve oositler in vivo veya in vitro ortamda kültüre edildikten sonra elde edilen embriyoların taşıyıcı hayvanlara nakledilmesiyle gebelik oranlarındaki artışların görülmesiyle yöntemlerin başarısı ispatlanmıştır (19,21).

Çiftlik hayvanlarında oositlerin in vitro ortamda gelişimlerinin iyi olabilmesi için iyi kaliteli oositlerin seçiminde follikül büyüklüğü, atrezi aşaması, folliküler sıvıdaki progesteron seviyesi gibi bir çok kriter bulunmaktadır. Bununla beraber yapılan çalışmalar kumulus oosit kompleksinin morfolojisinin, corona radiata hücrelerinin morfolojisinin ve follikül büyüklüğünün de oosit gelişimi ile ilgili olduğunu göstermiştir. Oosit büyümesi sırasında RNA sentezinin bu aşamada yoğun olmasından dolayı, oositin büyüklüğü, oosit büyümesi için bir indikatör olduğu belirtilmiştir (4,11,13). Oosit çapı ve in vitro maturasyon sırasında oositin mayoz bölünmeye gitmesi ve bunu sonlandırması arasındaki ilişki insan, sığır, manda, domuz ve köpek gibi birçok canlı türünde or-

* Aynı adlı doktora tez çalışmasından özetlenmiştir.

** Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji AD.

taya konmuştur. Sığırlarda periferik folliküllerden elde edilen oositler, çapı ne olursa olsun benzer mayotik yetenek gösterirken, kortikal folliküllerden elde edilen oositler büyüklükleriyle ilişkili bir yetenek göstermişlerdir. Buna göre, daha küçük oositler, mayotik maturasyon için anormal bir yol izleme eğilimi ve buna bağlı olarak maturasyon sürecinde bozukluk göstermişlerdir. Sığırlarda, in vitro maturasyon ve in vitro fertilizasyon sırasında follikül büyüklüğünün oosit performansı ve oosit ve follikül büyüklüğü arasındaki ilişki daha önce de ortaya konmuştur. Domuzlarda, hem follikül hem de oosit çapı oositlerdeki nükleer maturasyon derecesi ile ilişkilidir (22).

Yapılan çalışmalarda, memelilerde follikülogenezis üzerine IGF-1'in rolü geniş bir şekilde araştırılmış (15,18) ve yapılan araştırmalar IGF-1'in sığırlarda oosit maturasyonu, erken embriyonik gelişim ve gebelik oranları üzerine etkisi olduğunu göstermektedir (16).

Bu çalışmanın amacı farklı büyüklüklerdeki oositlerin maturasyonu üzerine insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'in etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Ovaryumların toplanması

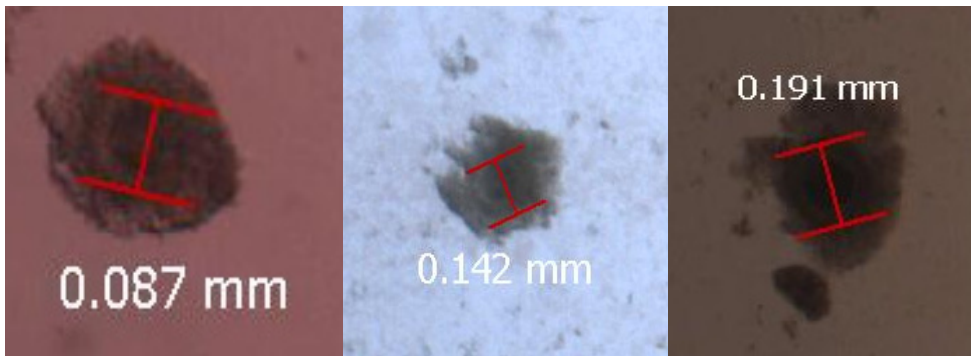
Çalışmada kullanılan oositlerin toplandığı ovaryumlar Ankara ili, Çubuk belediye mezbahasında kesilen inek ve düvelerden elde edildi. Karkaslardan alınan ovaryumlar çevre dokularından uzaklaştırıldı. Taşıma vasatı olarak 35°C'ye ayarlanmış termos ile antibiyotik-antimikotik solüsyon katkılı %0,9'luk NaCl kullanıldı. Ovaryumların karkastan alınıp, oositlerin maturasyon vasatına konulmasına kadar olan sürenin 4 saati geçmeme-

sine özen gösterildi. İn vitro fertilizasyon laboratuvarına getirilen ovaryumlar, kandan ve taşıma vasatından uzaklaştırılmak amacıyla 30°C'deki %0,9'luk NaCl ile yıkanıp, içinde %0,9'luk NaCl bulunan behere alındı.

Oosit aspirasyonu ve oositlerin seçimi

Aspirasyon işlemi 18 G'luk kanüller takılmış 5 ml'lik contasız plastik tek kullanımlık enjektörlerle gerçekleştirildi. Aspirasyon için 2-8 mm çapındaki folliküller tercih edildi. Elde edilen follikül sıvıları 15 ml'lik santrifüj tüplerinde biriktirildi. Oositlerin çökmesi için tüpler 38,5°C ayarlanmış etüvde 10 dakika süre ile bekletildi. Bu süre sonunda üstteki süpernatant atılarak üzerine bir miktar daha önceden hazırlanan oosit arama vasatı (%1 fetal buzağı serumu (FCS) içeren laktatlı ringer solüsyonu) eklenerek oositlerin çökmesi için 10 dakika daha beklendi.

Etüvden çıkarılan tüp, üzerindeki süpernatant tekrar uzaklaştırılarak, tüpün kalan kısmına arama vasatı eklenip karıştırılarak, içerik daha önceden hazırlanmış olan 90 mm'lik petriye aktarıldı. Zuelke ve Brackett'nin (1993) (25) tarif ettiği şekilde seçilen oositler, içinde arama vasatı bulunan 60 mm'lik petriye aktarıldı. Daha sonra içinde maturasyon vasatı (TCM-199+%5 FCS) bulunan 35 mm'lik 3 ayrı petride yıkanan oositler Lucas ve ark. (2002)'nin (13) tarif ettiği şekilde, Leica Application Suite 2.8.1. programı kullanılarak zona kalınlığını da dâhil edilerek, çaplarına göre ayrıldı (<110 m, 110-150 m, >150 m), her 100 µl'sinde 20 oosit olacak şekilde hazırlanan, gruplarına göre büyüme faktörü eklendi (IGF-I 50 ng/ml). Diğer grup ise sadece TCM-199 ile kontrol grubu olarak bırakıldı.



Şekil 1: Oosit çapı ölçümleri
Figure 1: Oocyte diameter measurements

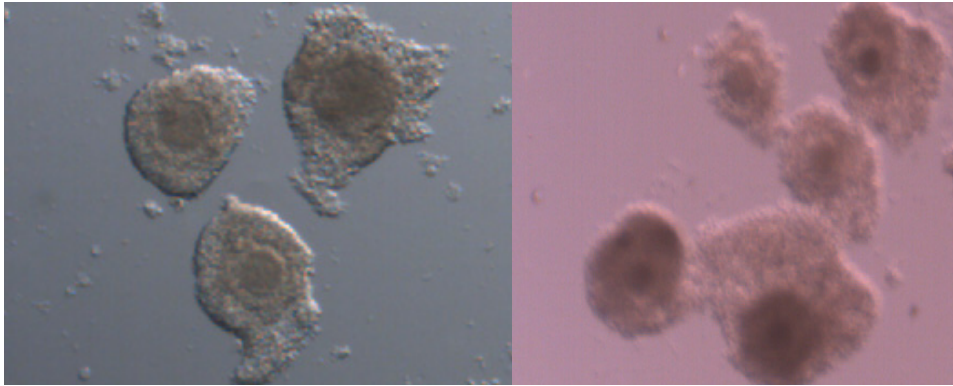
Tablo 1: Gruplar
Table 1: Groups

Grup	n	Oosit çapı (µm)	Uygulama
Grup I (IGF-1)	60	≤110	TCM-199 + IGF-1(50ng/ml)
	60	110-150	
	60	≥150	
Grup II (TCM-199)	60	≤110	TCM-199
	60	110-150	
	60	≥150	

Ekilibrasyon ve Kültür Şartları

Tüm gruplarda kullanılan vasatlar, oositler maturasyona başlamadan 1 gün önce veya en az 12 saat önce %5 CO₂’ li 38,5°C’ de ve maksimum nem ortamında ekilibrasyona bırakıldı.

Maturasyon kriterlerinin değerlendirilmesi



Şekil 2: Maturasyon öncesi ve sonrası oositler
Figure 2: Oocytes before and after maturation

Maturasyon süresinin tamamlanmasının ardından oositlerin kumulus ekspansiyonları kaydedilmiştir. Maturasyon oranının belirlenmesi için kumulus ekspansiyonu görülen oositler pipetasyon işlemi ile kumulus hücrelerinden tamamen ayrılmış ve stereo mikroskop altında 1.kutup hücresinin atılımı açısından incelenmiştir. 1.kutup hücresi atan oositler matur olarak değerlendirilip bu oositlerin tümüne in vitro fertilizasyon uygulanmıştır.

İstatistiksel analiz

Verilerin, gruplar arası oosit çaplarına ve kullanılan büyüme faktörlerine göre maturasyon oranları grup içi ve gruplar arası farklılığın istatistiksel değerlendirilmesinde Statistic Packet of Social Science (SPSS) 14 Paket Programı kullanılarak

ki-kare testi uygulanmıştır. (p<0,05)

Bulgular

Çalışma süresince 2-8 mm büyüklüğündeki folliküllerin aspirasyonu sonucunda elde edilen A kalitedeki 360 adet oosit kullanılmıştır.

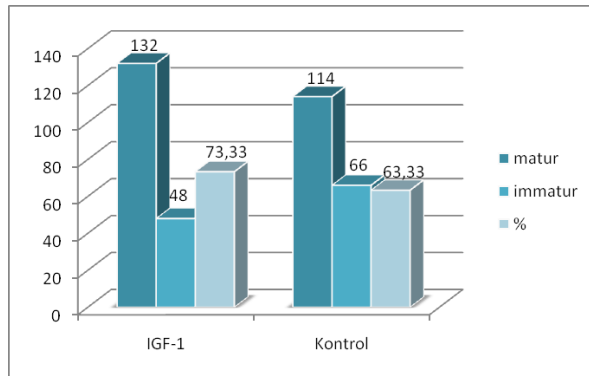
IGF-1 ilave edilmiş ve kontrol grubunun oosit çapı gözetmeksizin maturasyona etkisi

Oosit çapı gözetmeksizin farklı çalışma gruplarındaki oositlerin ortalama maturasyon oranları Tablo 2’de belirtilmiştir. İnkubasyon sonrası gruplar arasında şekillenen maturasyon oranları Grup I’de ve Grup II’de sırasıyla %73,33 ve %63,33 olarak belirlenmiş ve gruplar arası farkın önemli olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 2: IGF-1 ilave edilmiş ve kontrol grubunun oosit çapı gözetmeksizin maturasyona etkisi
Table 2: IGF-1 added and control group maturation rates excluding oocyte diameter

Grup	n	Mature olan oosit sayısı		%
		Matur	İmmatur	
Grup I (IGF-1)	180	132	48	73,33 ^a
Grup II (TCM-199)	180	114	60	63,33 ^b

p<0,001



Şekil 3: IGF-1 ilave edilmiş ve kontrol grubunun oosit çapı gözetmeksizin maturasyona etkisi
Figure 3: IGF-1 added and control group maturation rates excluding oocyte diameter

IGF-1 ve kontrol grubunun farklı oosit çaplarına göre maturasyona etkisi

Grup I'de IGF-1 ilave edilen maturasyon vasatlarında farklı oosit çaplarına göre şekillenen maturasyon oranları Tablo 3'te belirtilmiştir. Buna göre sırasıyla maturasyon oranları çapı 110 µm' den küçük oositlerde %66,66, 110-150 µm olan oositlerde % 75,0 ve 150 µm' den büyük olan oositlerde % 78,33 olarak belirlenmiştir. Oosit çaplarına göre IGF-1'in maturasyon oranları üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,05)

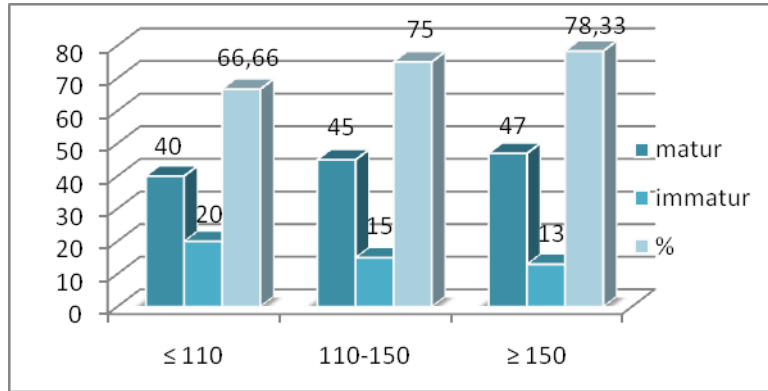
Kontrol grubunda TCM-199 kullanılarak maturasyona bırakılan oositlerin maturasyon oranla-

rı verilmiştir (Tablo 3). Maturasyon oranları çapı 110 µm' den küçük oositlerde % 51,66, 110-150 µm arasında çapa sahip oositlerde % 68,33 ve 150 µm' den büyük çaplı oositlerde % 70,0 olarak belirlenirken, bu oranların gruplar arası istatistiksel farkı çapı 110-150 µm ve 150 µm' den büyük oositlerde 110 µm' den küçük olanlar ile karşılaştırıldığında önemli bulunmuştur (p<0,06).

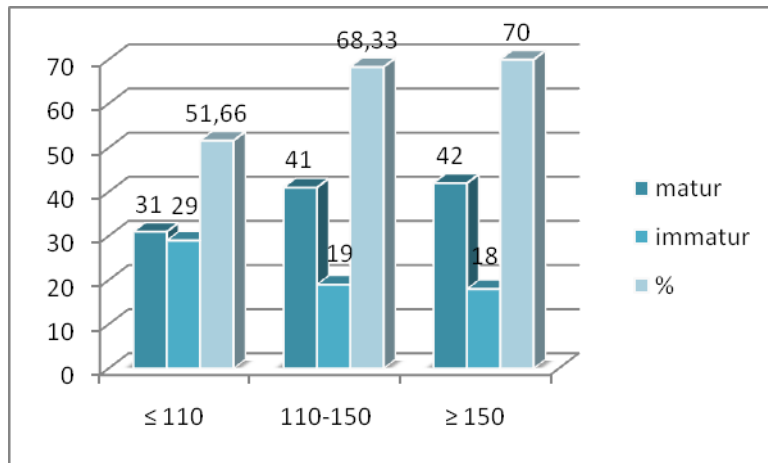
Grup I ile kontrol gruplarının, alt gruplarını kendi aralarında istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında yüzde oranları olarak farklılık gözükse bile istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. (p>0,05).

Tablo 3: Oosit çaplarına göre maturasyon oranları
Table 3: Maturation rates including oocyte diameters

Grup	n	Oosit çapı (µm)	Mature olan oosit		%
			Matur	İmmatur	
Grup I (IGF-1)	60	≤110	40	20	66,66
	60	110-150	45	15	75,0
	60	≥150	47	13	78,33
Grup II (Kontrol)	60	≤110	31	29	51,66
	60	110-150	41	19	68,33
	60	≥150	42	18	70,0



Şekil 4: IGF-1 eklenmiş grupta oosit çaplarına göre maturasyon oranları
Figure 4: Maturation rates in IGF-1 added group according to oocyte diameters



Şekil 5: Kontrol grubunda oosit çaplarına göre maturasyon oranları
Figure 5: Maturation rates in control group according to oocyte diameter

Tartışma ve Sonuç

Sunulan çalışmada toplanan ovaryumların saklanması ve transportu amacı ile 35°C ısıda, izotonik sodyum klorür kullanılmış ve her bir mililitreye bir mikrolitre dozunda penisilin streptomisin kombinasyonu antibiyotik ilave edilmiştir. Kullanılan transport medyumdan kaynaklanan toksikasyon ya da oositlerde morfolojik bozulmalara rastlanmamıştır. Ovaryumların elde edilmesinden laboratuara kadar taşınması arasındaki geçen 4-6 saatlik süre önceden 25-30 °C'ye ayarlanmış izotonik sodyum klorür ve antibiyotik ilavelerinin bu amaçla güvenle kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

Evcil memelilerde oositlerin in vitro maturasyonu amacı ile çeşitli katkı maddeleri ve hormonlar kullanılmaktadır (2,8,10,17). Maturasyon vasatları basit ve komplike olarak ikiye ayrılmaktadır.

Basit vasatlar genellikle sodyum bikarbonat veya HEPES solüsyonu ile tamponlanan ve ultrasaf su içinde çözdülüren kimyasallardır. Bu çalışmada maturasyon amacı ile HEPES tamponlu doku kültürü-199 (TCM-199) vasatına %5 oranında ilave edilen fetal buzağı serumu katkı vasat kullanılmıştır. Sunulan çalışmada kullanılan TCM-199 kültür vasatının maturasyon amacı ile güvenle kullanılabilirliği bir kez daha kanıtlanmıştır.

IGF-I, memelilerde oosit maturasyonunu uyaran ve embriyo gelişimini sağlayan bir faktördür. IGF-I' in embriyo gelişimi sırasında preimplantasyon yeteneğini artırması IGF-I reseptörlerine yüksek eğilimle gerçekleşmektedir. IGF-I' in kültür medyumlarına eklenmesinin, insan, fare ve tavşan embriyolarında hücre proliferasyonunu arttırması ve apoptozisi düşürerek preimplantasyon şansını

arttırması gibi yararları olduğu belirtilmiştir (14). Wang ve ark., (2009) (24) yaptıkları çalışmada, maturasyon vasatına 50 ng/ml IGF-1 eklemişler ve maturasyon oranlarını kontrol grubu ve IGF-1 eklenmiş gruplarda sırasıyla %51,2 ve %56,5 olarak bildirmişlerdir. Stefanello ve ark. (2006) (23), IGF-1 eklenen vasatlarda maturasyon oranlarını, % 80,6 olarak bildirmişlerdir. Demeestere ve ark (2004)(5) IGF-1' in değişik dozlarını kullanarak (10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) oosit maturasyonu üzerine etkilerini araştırmışlar ve 50 ng/ml dozunda IGF-1 kullanılan grupta diğer gruplara göre daha yüksek (%64,6) maturasyon oranları tespit etmişlerdir. Dhali ve ark. (2000) (6) yaptıkları bir çalışmada çapı 3 mm' den büyük sığır ovaryumu follüküllerinden kazandıkları oositleri in vitro olarak kültüre etmişler ve IGF-1 kullanılan grupta 2-4 hücreli embriyo bölünme oranlarını % 66,4, blastosist oranlarını ise % 21,1 olarak bildirmişlerdir. Block ve ark. (2008) (3) ise IGF-1 kullandıkları grupta kontrol grubuna oranla daha düşük erken bölünme oranlarını (%81,9) ancak blastosist gelişiminde ise IGF-1'in daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (%29,4). Sunulan bu çalışmada IGF-1'in kullanıldığı grupta oosit çapı gözetmeksizin diğer araştırmacılarla karşılaştırıldığında %73,33 olarak tespit edilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Değişik türler üzerinde yapılan birçok çalışma oosit çapı ile oositin gelişim yeteneği ve embriyo oluşumu arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermektedir (1, 7, 9, 12, 19, 22, 20).

Hyttel ve arkadaşları (1997) (9), 110 µm çapındaki sığır oositlerinin maturasyon oranlarının, 110 µm ve daha büyük çaptaki oositlere göre (%60) daha düşük olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada da, büyüme faktörü ilave edilen vasatlardaki maturasyon oranlarının oosit çapı büyüdükçe arttığı saptanmış ancak bu oranların kontrol grubunda da aynı oranda artış göstermesine karşılık alt gruplar arası istatistiksel değerlendirmelerde bu artış önemsiz bulunmuştur.

Çalışma sonucunda maturasyon vasatına eklenen IGF-1'in oosit çapı gözetmeksizin ve oosit çapı arttıkça maturasyon yüzde oranlarını da arttırdığı kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

- 1. Anguita B, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT (2007):** Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 67, 526-536
- 2. Bevers MM, Dieleman SJ, Van Den Hurk R, Izadyar F (1997):** Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine, *Theriogenology*. 47, 13-22
- 3. Block J., Wrenzycki C, Niemann H, Herrmann DJ, Hansen P (2008).** Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro, *Mol Reprod Dev*, 75, 895-903
- 4. Crozet N, Motlik J, Szollosi D. (1981)** Nuclear fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during early stages of antrum formation. *Biol Cell*. 41, 35-42
- 5. Demeestere I, Grevy C, Centner F, Devreker F, Englert Y, Delbaere A, (2004).** Effect of insulin-like growth factor-1 during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol. Reprod.*, 70, 1664-1669.
- 6. Dhali A, Manik RS, Das SK, Palta P (2000).** Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes, *Theriogenology*. 53: 1295-1303.
- 7. Gandolfi F, Brevini TA, Cillo F, Antonini S (2005).** Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev Sci Technol*, 24, 413-423.
- 8. Harper KM, Brackett BG (1993).** Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotrophins. *Biol Reprod.*, 48, 409-416.
- 9. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997).** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47, 23-32.
- 10. Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H (1994).** Influence of EGF and TGF-A on in vitro

maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium, *J Reprod Fertil*, 100, 439-446.

11. Lazzari G, Galli C, Moor RM (1994). Functional changes in the somatic and germinal compartments during follicle growth in pigs. *Anim Reprod Sci.* 35, 119-130.

12. Lechniak D, Szczepankiewicz D, Kauss D, Szulc J, Szydlowski M (2005). IVM media, oocyte diameter and donor genotype at RYR1 locus in relation to the incidence of porcine oocytes after maturation in vitro. *Theriogenology*, 64, 202-212.

13. Lucas X, Martinez EA, Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JM (2002). Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58, 871-885.

14. Makarevich AV, Markkula M (2002). Apoptosis and cell proliferation of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor 1 during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.*, 66, 386-392.

15. Monget P, Bordy C (2000). Importance of the IGF system in early folliculogenesis, *Mol. Cell. Endocrinol.* 163, 89-93.

16. Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW (2002). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*. 57, 895-907.

17. Nagai, T (2001). The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 55, 1291-1301.

18. Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B, Heyman Y (2004). Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domest Anim Endocrinol.* 27, 179-195.

19. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1997). Bovine oocyte diameter

in relation to developmental competence. *Theriogenology*, 48, 796-774.

20. Romão GS, Araújo MC, De Melo AS, De Albuquerque Salles Navarro PA, Ferriani RA, Dos Reis RM (2010). Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. *Fertil Steril.* 93, 621-5.

21. Sağırkaya H, Mısırhoğlu M, Kaya A, First L, N, Parrish, J, Memili E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.*, 101, 225-240.

22. Shirazi A, Sadeghi N (2007). The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Ruminant Res.* 69, 103-107

23. Stefanello J R, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, Golçalves, PB (2006). Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-1 or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*, 66, 2068-2076

24. Wang LM, Feng HL, Ma Y.Zh, Cang M, Li HJ, Yan Zh, Zhou P, Wen JX, Bou S, Liu DJ (2009). Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Anim Reprod Sci*, 114, 99 -108.

25. Zuelke KA, Brackett BG (1993). Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod*, 48, 815-820.

Geliş Tarihi: 04.04.2011 Kabul Tarihi: 23.06.2011

Yazışma Adresi:

Duygu Burcu Topuzoğlu
Ahmet Taner Kışlalı Mh.
İLKO Konut Sitesi 2818 Cd. No:29
Çayyolu-Ankara
Tel: 06532 515 31 82
e-posta: burcutopuzoglu@gmail.com