

α -AMANTİN'İN İN VİTRO OOSİT MATURASYONUNA ETKİSİ

Ali Eroğlu¹

Einfluss von α -Amanitin auf die extrakorporale Eizellreifung

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wurde die Notwendigkeit der Transkription für die Reifung der Schweineizelle und die Rolle der Cumuluszellen dabei durch Verwendung von α -Amanitin (ein Inhibitor der RNA polymerase II) untersucht. Die Auflösung der Germinalvesikel wurde bei 80,0 % der intakten Eizellen in der Versuchsgruppe I und bei 90,7 % der partiell denudierten Eizellen in der Versuchsgruppe II durch die Zufügung von α -Amanitin ins Kultivierungsmedium (10 μ g /ml) inhibiert, während 86,4 % der partiell denudierten Eizellen in der Kontrollgruppe, die ohne α -Amanitin -Zusatz kultiviert wurden, die Meiose wieder aufnahmen und 63,6 % die erste meiotische Reifeteilung vollendeten.

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass α -Amanitin in Anwesenheit von w enigen Cumuluszellen (20-100) die Reifung der Schweineizelle auch inhibieren kann. Ferner weisen die Transkriptionsaktivität während der Reifung des Cumulus-Oozyten-Komplexes des Schweines notwendig ist.

Özet: Bu çalışmada, spesifik bir RNA polimerase II inhibitörü olan α -amanitin kullanılarak domuzlarda oosit maturasyonu için transkripsiyonun gerekli olmadığı ve kumulus hücrelerinin buradaki rolü araştırıldı. Kültür vasatında α -amanitin'in varlığı (10 μ g /ml), kumulus hücreleri ile çevrili (intakt) oositlerin % 80.0'inde, kumulus hücrelerinin büyük bölümü uzaklaştırılmış oositlerin % 90.7'sinde germinal vezikülün çözülmesini ve çekirdeksel olgunlaşmayı önledi. Buna karşılık α -amanitin olmadan kültüre edilen, yine kumulus hücrelerinin büyük bölümü uzaklaştırılmış oositlerin %63.6'sı çekirdeksel olgunlaşmayı tamamladı. Bu bulgular, α -amanitin'in oositler üzerinde az sayıda kumulus hücrelerinin bulunması halinde de domuz oositlerinin olgunlaşmasını inhibe ettiğini ve olgunlaşma sırasında kumulus -oosit kompleksinde transkripsiyonun gerekli olduğunu göstermektedir.

1: Öğr.Gör.Dr.,U.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı,Bursa-TÜRKİYE

Giriş

Bir kaç istisna dışında, her siklusda, memeli türüne göre değişen sayıdaki oositte, mayotik bölünme ovulasyondan kısa bir süre önce tekrar başlayarak veziküler safhadan metafaz II safhasına kadar ilerler. Bu sırada meydana gelen, olgunlaşma (maturasyon) olarak adlandırılan kromozomal ve çeşitli yapısal, biyokimyasal değişimler sonucu bir taraftan kromozom sayısı yarıya düşerken (çekirdeksel olgunlaşma) diğer taraftan oositler döllenme ve embriyonik gelişme yeteneği (stoplasmik olgunlaşma) kazanırlar (20,22).

Memeli oositlerinin folliküllerden dışarı alınıp uygun bir vasatta kültüre edilmesi halinde de veziküler safhadan metafaz II safhasına kadar ilerlediği gözlenmiştir(2). Ancak bu şekilde in vitro olgunlaşan oositlerde stoplasmik olgunlaşma tam olarak şekillenmemektedir (10,19). Sonuç olarak, oositler döllenme bozuklukları göstermekte ve erken embriyonik gelişmelerini tamamlayamamaktadır. in vitro maturasyon sırasındaki moleküler olaylarını tam olarak açıklığa kavuşturulması ve buna göre kültür tekniklerinin gelişmesiyle oositlerin sitoplasmik olarak da olgunlaşmaları sağlanabilir. Bu da değerli dışı materyalin binlerce sayıdaki oositlerinden yararlanma olanağını doğuracaktır.

Bu çalışmada, spesifik bir RNA polimerase inhibitörü olan a-amanitin kullanılarak maturasyon sırasındaki transkripsiyonun olgunlaşmaya etkisi ve kumulus hücrelerinin buradaki rolü araştırıldı.

Materyal ve Metod

Oositlerin Kazanılması: Çalışmada kullanılan oositler, mezbahada toplanan ovaryumlardan elde edildi. Prepubertal, dönemindeki domuzların kesilip karın boşluğunun açılmasından hemen sonra, ovaryumlar, içinde vücut ısısında %0.9'luk NaCl çözeltisi bulunan termosaya aktarıldı. Yaklaşık 1 saat içinde ovaryumlar, toplanarak laboratuvara nakledildi. Oositler, 3-5mm çapındaki atretik görünüşte olmayan tersiyer folliküllerden kazanıldı. Bunun için folliküller bir Ensizyon ile açıldıktan sonra, içerikleri steril %0.9'luk NaCl ile petri kutusuna yıkandı. Hemen sonra oositler, stereo mikroskop altında toplanarak bir kısım içinde 10µg/ml konsantrasyonda a-amanitin (Boehringer-Mannheim, FRG) ve 3g/l konsantrasyonda bovine serum albumine (BSA, pure, Serva, FRG) bulunan, diğer kısım ise sadece BSG (3g/l) eklenen Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Serva, FRG) vasatına aktarıldı.

Bu oositlerin morfolojik değerlendirilmesi, stereo mikroskop yardımıyla 63-100x büyütmede yapıldı. Stoplasmik degenerasyon göstermeyen ve intakt (kompakt ve çok katlı kumulus ooforus ile çevrelenmiş) oositler, kültür için seçildi. Daha sonra bu oositler, kültüre edilecekleri vasatla 2 kez yıkandılar. Kültür için seçilen oositlerin veziküler safhada olup olmadıklarının kontrolü, bunlardan bir bölümünün kültür öncesi tespit edilip boyanmasıyla yapıldı.

Araştırma Grupları ve Oositlerin Kültürü : α -amanitin'in oosit maturasyonuna etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılmak üzere 2 araştırma grubunda incelendi. Araştırma grubu I'de α -amanitin'in intact oositlerin in vitro olgunlaşmasına etkisi araştırıldı. Araştırma grubu II'de ise α -amanitin'in kumulus hücrelerinin büyük kısmı uzaklaştırılmış olan oositlerin in vitro olgunlaşmasına etkisi incelendi. Kültür için seçilen intact oositlerin kumulus hücreleri, oositlerin üzerinde 20-100 hücre kalıncaya kadar pasteur pipeti aracılığıyla mekanik olarak uzaklaştırıldı.

Her iki araştırma grubunda da α -amanitin içeren PBS'deki oositler kullanıldı.

Kontrol grubunda, α -amanitin içermeyen PBS'deki oositler arasında kültür için seçilen intact oositler, yine kumulus hücrelerinden büyük ölçüde arındırıldıktan (20-100 kumulus hücresi kalıncaya kadar) sonra α -amanitin olmadan kültüre edildiler.

Kültürün başlamasına kadar laboratuvarında yapılan işlemler yaklaşık 1 saat sürdü.

Kültür vasatı olarak 3g/1BSA (pure, Serva, FRG), 50 μ g/1 Gentamycin (Serva, FRG), 2mg /1Amphotericin B (Serva, FRG) eklenmiş TC 199 (with Earle's salts, Serva, FRG) kullanıldı. Araştırma gruplarında, vasata ayrıca 10 μ g/ml konsantrasyonda olacak şekilde α -amanitin katıldı. On günde bir hazırlanan kültür vasatı, membran filtreler (1.2 μ m, 0.45 μ m, 0.2 μ m, Millipore) aracılığıyla sterilize edilip kullanıma kadar 4°C'de saklandı.

Oositlerin kültürü, 30x10mm steril petri kutuları (tissue culture petri dishes, Flow laboratory, UK) içinde, 39°C'lik nemli ortamda ve %5 CO₂ %5 O₂, %90 N₂'den oluşan gaz karışımı altında yapıldı. Kültürden önce içlerinde 2ml kültür vasatı bulunan petri kutuları inkübatöre pH'ları 7.2-7.4'e ve ısıları 39°C'ye ayarlandı. Oositler, hareketsiz sistemde 44-46 saat kültüre edildiler.

Olgunlaşmanın İncelenmesi ve İstatistiksel Değerlendirme :

Kültür sonunda, oositler çevrelerindeki kumulus hücrelerinden tamamen arındırılarak alkol/asetik asit (3:1) karışımı içinde tesbit edildiler. Daha sonra %1'lik aceto-orcein ile boyanarak faz kontrast mikroskopta ve 400-600x büyütmede oositlerin mayotik safhaları incelendi. Mayotik safhaların sınıflandırılması HUNTER ve POLGE (8)'un kriterlerine göre yapıldı.

İstatistiksel değerlendirme için oositlerin mayotik safhaları;

1-Veziküler safha (olgunlaşmamış oositler)

2-Prometefaz I-Metefaz II (olgunlaşan ve olgun oositler) şeklinde gruplandırıldı.

Daha sonra X²-testi ile "Mikrosat" (Ecosoft, 1984) adlı bilgisayar programı kullanılarak gruplar birbirleriyle karşılaştırıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Oositlerin, araştırma grupları ve kontrol grubundaki in vitro olgunlaşmalarıyla ilgili bulgular tablo 1'de özetlendi.

Kültür vasatında α -amanitin'in varlığı , hem intakt oositlerin hem de kumulus hücrelerinden büyük ölçüde arındırılmış olan oositlerin olgunlaşmasını belirgin şekilde önledi (sırasıyla %90.7 ve %63.6'sı 1.mayotik bölünmeyi tamamlayarak sekonder oosit haline geçtiler).

Her iki araştırma gurubu ile kontrol grubu arasındaki olgunlaşma farkları istatistiki olarak da anlamlı bulundu.İki araştırma grubu arasındaki olgunlaşma farkları ise istatistiki olarak önemsizdi.

Tablo 1: TC 199 vasatında, α -amanitin'in varlığında veya yokluğunda kültüre edilen oositlerin olgunlaşma oranları

	Araştırma Grubu Ia	Araştırma Grubu I Ib	Kontrol Grubu c
Veziküler Safha	32(% 80.0)	49 (% 90.7)	6 (% 13.6)
Prometafaz I	4 (% 10 .0)	1 (% 1.9)	1 (% 2.3)
Metafaz I	-	-	8 (% 18.2)
Anafaz I	-	-	1 (% 2.3)
Telofaz	-	-	-
Metafaz II	4 (% 10.0)	4 (% 7.4)	28 (% 63.6)
TOPLAM	40	54	44

a İntakt oositler α -amanitin ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) ile kültüre edildiler

b Kumulus hücreleri büyük ölçüde uzaklaştırılmış oositler α -amanitin ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) ile kültüre edildiler

c Kumulus hücreleri büyük ölçüde uzaklaştırılmış oositler α -amanitin olmadan kültüre edildiler

Tartışma ve Sonuç

Maturasyon sırasında oositlerin protein sentez aktivitelerinde önemli değişiklikler olmakta ve bazı proteinlerin sentezi dururken bir çok yeni protein sentezlenmektedir (6,12,14,16,17). Oositlerin protein sentezlerindeki bu

değişikliklerin, posttranslasyonel modifikasyon sonucu meydana gelmesi, daha önce sentezlenmiş mRNA'nın kullanımı sonucu yada olgunlaşmadan hemen önce ve olgunlaşma sırasında yeni bir transkripsiyon ile mRNA sentezlenmesi ve daha sonra bunun translasyonu sonucu şekillenmesi olasıdır. Bu çalışmada maturasyon sırasında transkripsiyon şekillenip şekillenmediği ve kumulus hücrelerinin buradaki rolü araştırıldı.

Protein sentezindeki bir çok değişikliğe karşın fare oositlerinde olgunlaşma sırasında ve döllenmeden 2 hücreli safhaya kadar transkripsiyon olmadığı bildirilmiştir (5,7).Döllenme sonrası protein sentezindeki bazı değişiklikler posttranslasyonel modifikasyona bağlanmıştır (21). Ancak fare oositlerinin olgunlaşması sırasındaki ve sonrasındaki asıl protein sentezi değişikliklerinin,daha önceden sentezlenmiş mRNA gruplarının selektif kullanımı ile şekillendiği sanılmaktadır (4,18).

Bu çalışmadaki, α -amanitin ile kültüre edilen oositlerin olgunlaşmadığını, buna karşın kontrol grubundaki oositlerin olgunlaştığını gösteren bulgular, domuzlarda oosit maturasyonu sırasında yeni bir transkripsiyonun gerekliliğine işaret etmektedir.MATTIOLI ve arkadaşları (11) da domuz oositleri ve α -amanitin ile yaptıkları araştırmalarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir.Yine koyun (15) ve sığır (9) oositleriyle yapılan çalışmalarda oosit maturasyonu için transkripsiyonun gerekli olduğu sonuc çıkarılmıştır. Sözü edilen bu çalışmalarda ,kumulus hücreleri ile çevrili (intakt) ve kumulus hücreleri uzaklaştırılmış (denude)domuz,koyun, sığır oositleri α -amanitin ile kültüre edilmiş, denude oositlerin olgunlaşmasına karşın intakt oositlerin olgunlaşmadığı gözlenmiştir.Bu çalışmada ayrıca, α -amanitin'in kumulus hücrelerinin büyük bölümü uzaklaştırılmış oositlerde de olgunlaşmayı inhibe ettiği gösterilmiştir. Tüm bu bulgular, α -amanitin'in oosit maturasyonu inhibe edici etkisinin, az sayıda da olsa kumulus hücrelerinin varlığına bağlı olduğunu göstermektedir. Bu da, α -amanitin 'in kumulus hücrelerindeki transkripsiyonu inhibe ederek oositler üzerine dolaylı etkidiği düşüncesini akla getirmektedir. Ancak kumulus hücrelerinden arındırılmış oositlerin α -amanitin 'in varlığında olgunlaşmaları, kumulus hücrelerinde sentezlenen RNA'nın oosit olgunlaşması için gerekli olduğu savını zayıflatmaktadır.

α -Amanitin'in etki mekanizmasını açıklamak için ileri sürülen başka bir düşünce ise, bu maddenin oositlerde transkripsiyonu inhibe ettiği; fakat oosit içine girebilmek için kumulus hücrelerinin varlığına gereksinim duyduğudur (15). Çeşitli araştırmalar, gerek kumulus hücreleri arasında, gerekse kumulus hücreleri ile oosit arasında "gap junctions" denilen iyon ve küçük molekül maddelerin alış-verişini sağlayan hücreler arasında bağlantı olduğunu ortaya koymuştur (1,3,13). Hücreler arası bu bağlantıların, α -amanitin'in molekül büyüklüğündeki bir maddenin geçişine uygun olması bu düşünceyi güçlendirmektedir.

Sonuç olarak araştırma bulguları, α -amanitin'in,az sayıdaki kumulus hücrelerinin varlığında da domuz oositlerinin maturasyonunun inhibe edildiğini ve olgunlaşma için kumulus-oosit kompleksinde yeni bir transkripsiyonun gerekli olduğunu göstermektedir.Ancak bu yeni transkripsiyonun kumulus hücrelerinde

mi, yoksa oosit içinde mi meydana geldiğini ortaya çıkartabilmek için daha ayrıntılı araştırmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Anderson, E. & Albertini, D.F. (1976): *Gap junction between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary*. J. Cell Biol. 71, 680-686
2. Biggers, J.D. (1973): *Oogenesis and ovum maturation*. In: *The regulation of mammalian reproduction*, Eds. S.J. Segal, R. Crozier, P.A. Corfaman, and P.G. Condliffe, pp. 273-283. Thomas, Springfield, Illinois
3. Brower, P.T. & Schultz, R.M. (1982): *Intercellular communication between granulosa cell and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth*. Dev. Biol. 90, 144-153
4. Cascio, S.M. & Wassarman, P.M. (1982): *Program of early development in the mammal: Post-transcriptional control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes and early embryos*. Dev. Biol. 89, 397-408
5. Clegg, K.B. & Piko, L. (1983): *Poly (A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A) + RNA in early mouse embryos*. Dev. Biol. 95, 331-341
6. Eroğlu, A. and Meinecke, B. (1990): *Polypeptide Synthesis of in vivo and in vitro matured porcine oocytes*. Reprod. Dom. Anim. 25, 261-268
7. Flach, G., Johnson, M.H., Braude, P.R., Taylor, R.A.S. & Bolton, V.N. (1982): *The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo*. EMBO J. 1, 681-686
8. Hunter, R.H.F., Polge, C. (1966): *Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin*. J. Reprod. Fert. 12, 525-531
9. Kastrop, P.M.M., Hulshon, S.C.J., Bevers, M.M., Destree, O.H.J. and Kruij, T.A.M., (1991): *The effects of α -amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro*. Molec. Reprod. Dev. 28, 249-254
10. Leibfried, M.L., Bovister, B.D. (1983): *Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters*. J. Exp. Zool. 226, 481-485
11. Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M.L. and Barboni, B. (1991): *Changes in maturation-promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation*. Molec. Reprod. Dev. 30, 119-125
12. Mcgaughey, R.W. & Van Blerkom, J. (1977): *Patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes during maturation in vitro*. Dev. Biol. 56, 241-254
13. Moor, R.M. & Cran, D.G. (1980): *Intercellular coupling in mammalian oocytes*. Dev. Mamm. 4, 3-37
14. Moor, R.M. & Crosby, L.M. (1986): *Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes*. J. Embryol. exp. Morph. 94, 207-220
15. Osborn, J.C. & Moor, R.M. (1983): *Time-dependent effects of α -amanitin on nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes*. J. Embryol. exp. Morph. 73, 317-338

16. Pontbriand, D., Goff, A.K., Xu, K.P. & King, W.A. (1989): *Effect of steroids on protein synthesis in mature and immature bovine oocytes.* *Theriogenology* 31,240 (Abstr.)
17. Schultz, R.M. & Wassarman, P.M. (1977): *Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74,538-541
18. Schultz, R.M., Letourneau, G.E. & Wassarman, P.M. (1978): *Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: Protein synthesis in nucleate and anucleate oocyte fragments.* *J. Cell Sci.* 30,251-264
19. Thibault, C. (1977): *Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?* *J. Reprod. Fertil.* 51,1-15
20. Tsafiriri, A. (1978): *Oocyte maturation in mammals.* In: *The Vertebrate Ovary*, Ed. R.E. Jones, pp.409-442, Plenum Press, New York-London
21. Van Blerkom, J. (1981): *Structural relationship and posttranslational modification of stage specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78,7629-7633
22. Wassarman, P.M., Schultz, R.M., Letourneau, G.E., LaMarca, M.J., Josefowicz, W.J., Bleil, J.D. (1979): *Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro.* In: *Ovarian Follicular and Corpus Luteum Function*, Eds. C.P. Channing, J. Marsh, and W.A. Sadler, pp.251-268, Plenum Press, New York