

## SİĞİRLARDA İN VİVO OOSİT MATURASYONU (DERLEME)

### (In vivo Oocyte Maturation in Cattle) (A Review)

Numan AKYOL\*

\* Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü

#### ÖZET

Bu derlemede, in vivo oosit maturasyonunun gerçekleřme řekli ve bu sūrece etki eden faktōrler konu edilmiřtir.

**Anahtar Kelimeler :** Sığır, Oosit, Maturasyon

#### SUMMARY

In this review, how to realize of in vivo bovine oocytes maturation and factors affecting of this procedure were discussed.

**Key Words :** Bovine, Oocyte, Maturation

#### GİRİŐ

Bilim dūnyasının neredeyse 50 yıldır ūzerinde durduğu laboratuvar koşullarında embriyo elde etmeye yōnelik çalışmalarda ūnemli mesafe alınmış olmasına rağmen konuyla ilgili aydınlatılması gereken birçok soru işareti mevcuttur. İn vitro embriyo elde edilmesi konusunda ilerleme sağlamak bir bakıma oosit maturasyonunun vūcut içerisinde gerçekleşme şeklinin bilinmesiyle ilgili olduğu açıktır. Bu çalışmada, in vivo oosit maturasyonu gerçekleşme tarzı irdelenerek, konuyla ilgilenen araştırcılara faydalı bilgiler verilmiştir.

#### İn Vivo Oosit Maturasyonu

##### Nūkleer Maturasyon

Nūkleer maturasyon, oosit nūkleusunun germinal vezikūl ařamasından metafaz-2 (M-II) ařamasına gelmesi durumudur. Nūkleer maturasyon, germinal vezikūl yıkımlanması (Germinal Vesicle Break Down-GVBD), kromozom kondenzasyonu, birinci metafazın ię iplikçiklerinin oluřumu, homolog kromozomların polar cisimcik vasıtasıyla atılması ve M-II

durumuna geçilmesi olgularını kapsar (9). Ūncelikle nūkleer membranda bozulmalar bařlar, porlar kaybolur kısa sūre içerisinde membran parçalanarak yok olur. İneklerde nūkleer maturasyon sūresi 24 saat olarak bildirilmiřtir ve ineklerde preovulatōr LH yūkseliřinden 4-8 saat sonra gerçekleřir. Nūkleer maturasyonun en ūnemli kısmını protein sentezi oluřturur (2).

Primer oosit iki mayoz bōlünme geçirerek olgunlařır. Birinci bōlünmeyle birlikte iki kardeř hūcre meydana gelir ki, bunlardan biri sitoplazma yōnünden zengin olup gerçek oositir. Dięeri ise sitoplazma yōnünden fakir ancak yine de mitokondri, ribozom ve kortikal granūllere sahip olan Polar Cisimciktir. Nūkleer maturasyonun bařlaması için LH tetikleyici bir role sahiptir. Maturasyonun devamı için de bařta ūstrojen olmak ūzere steroidlere ihtiyaç vardır (2).

Mayoz bōlünme yeterlilięi olmayan oositler, germinal vezikūl (Germinal vesicle-GV) safhasında kalırlar ve birinci profaz

safhasını geçemezler. Mayoz yeterliliğine sahip oositlerde, olgunlaşma kapasitesi mevcut olup treonin ve tirozin rezidülerinin özel defosforilasyonuna imkan veren sistemleri aksaksız çalışmaktadır. Mayoz yeterliliği, folikül büyüklüğü ile yakından ilişkilidir. Türlerine göre değişmekle birlikte inekte antral folikül, germinal vezikül yıkımı ardından zaman içerisinde 2-3 mm çapa ulaşabilir. Bu yeterlilik aynı zamanda oosit büyüklüğü ile de ilgilidir. Nükleer maturasyonunu tamamlayan ve M-II aşamasında olan oositin çapı yaklaşık 110 µm olur. Bu durum in vitro oosit maturasyonunda önemli bir yer tutar. 95 µm den küçük çapa sahip inek oositleri mayoza devam edemezler. Bundan dolayı in vitro embriyo elde edilmesi amacıyla toplanan oositlerin 100µm den büyük olmalarına özen göstermek gerekir (6).

Birinci polar cisimciğini atan oositte M-II'ye geçiş için hazırlıklar başlar. Kromozomlar tekrar hücrenin ortasında dizilirler, ikinci mayozun iğ iplikçikleri oluşur ve kromozomları kutuplara çekerler ancak hiçbir zaman spermatozoon oolemma penetrasyonu gerçekleşmedikçe ikinci mayoz bölünme tamamlanamaz. Kortikal granüller normal fertilizasyonda ve polisperminin önlenmesinde büyük rol sahibidirler. Başlangıçta oosit içerisinde rastgele yayılmış bir halde yer alan golgi aygıtları ve kortikal granüller, birinci metafazın ilerlemesi ile periferde yer alırlar ve plazma membranına tutunurlar. Spermatozoonun oolemma penetrasyonu ile ikinci mayoz kaldığı yerden tekrar başlayarak ikinci polar cisimciğin de oluşumuyla haploid (n) sayıda kromozoma sahip olgun bir oosit şekillenmiş olur (2) (Şekil 1).

### **Sitoplazmik Maturasyon**

Sitoplazmik maturasyon, oositin GV safhasından M-II safhasına, olgun bir oosit oluncaya kadar geçirmiş olduğu ultrastrüktürel değişimleri ifade eder. Bu değişimler, oositin

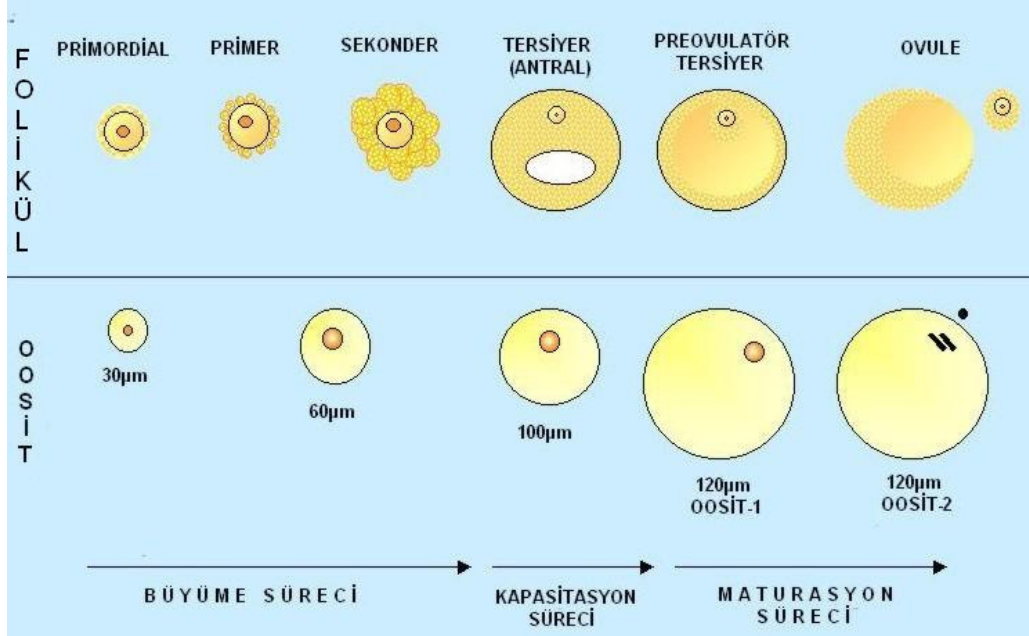
normal fertilizasyonu, bölünmeye başlaması ve blastosist safhasına kadar ulaşmasında indirekt olarak etkilidir.

Polar cismin oluşmasıyla birlikte perivitellin boşluğun genişlemesi ve formasyonu, mitokondrilerin sayılarının artması ve yapısal değişimleri, golgi aygıtlarından kortikal granül salınmasıyla birlikte ooplazmanın granüllü bir hal alması sitoplazmik maturasyonun başlamasıyla birlikte görülmeye başlayan olgulardır. Başlangıçta merkezi olarak yer alan mitokondriler oositin gelişimi ile birlikte periferal bir konum alırlar. Mitokondriler, sitoplazmik maturasyonda anahtar rol üstlenirler. Hücre içi metabolik modifikasyon, farklılaşma ve proliferasyonlarda hep mitokondriler vardır (8). Golgi aygıtları, kortikal granüllerin ve zona pellusidanın yapımından sorumludur. Oosit içerisinde golgi aygıtlarının sayısının artması ile folikül çapı da büyür. Kortikal granüllerin yerlerinin değişimi sitoplazmik maturasyonun en önemli işaretidir. Sitoplazmik maturasyonun morfolojik olarak kayda değer bir diğer parametresi de kumulus hücre ekspansiyonudur (4).

### **İn vivo Oosit Maturasyonuna Etki Eden Faktörler**

#### ***Maturasyonu Destekleyici Faktör (MPF)***

Oosit maturasyonunu tetikleyici bir faktör olup, germinal vezikül yıkımlanması (GVBD), kromozom kondenzasyonu ve iğ iplikçiklerinin oluşumu gibi bir seri olayın kusursuz olarak başlamasına yardım eder. MPF (Maturation Promotion Factor), protein kompleks tabiatında bir madde olup iki alt komponentten oluşmuştur. Bunlar; p34<sup>cdc2</sup> ve cyclinB'dir. Birinci komponent katalizör diğeri ise regülatör rol oynar. GV safhasında MPF miktarı az, GVBD aşamasında yüksektir. Birinci metafaz da en yüksek düzeye ulaşır ve arkasından anafaz-telofaz aşamasında, bu faktörün aktivasyonunda hızlı bir kayıp görülür. Oositin



Şekil 1. Folikül ve oositin birlikte maturasyonu (9)

M-II safhasına girmesiyle seviyesinde tekrar artış meydana gelir. Bu artış ve azalışlar oositin gelişim dönemlerinin bir sonucu değil daha çok sebebidir. İn vitro koşullarda inek oositinde adı geçen yükselişler kültür başlangıcından itibaren 9-12 ve 18. saatlerde meydana gelir. Mayozun kaldığı yerden tekrar başlaması ve maturasyon süreci fosforilasyon ve defosforilasyon olayları tarafından hücrenin aktivitesinin ürünü olan kinaz ve fosfatazların kontrolünde gelişir (13).

#### **Mayoz Kilitlenmesi (Meiotic Arrest)**

İnek oositinde maturasyon, birkaç kez sürecin durdurulması ve tekrar başlatılması şeklinde gerçekleşir. Hücre içi ve dışı faktörlerle maturasyon sürecinin durdurulduğu bu dönemlere dinlenme safhası, işleme de mayotik kilitlenme adı verilmektedir. Birinci mayotik kilitlenme doğum öncesi (prenatal) hayatta oositin, mayozun ilk aşamasına ilerlediği anda oluşur ve bu dönem birinci mayozun diploten safhasıdır. Oosit, atrezi olmadığı sürece preovulatör LH piki oluncaya dek bu şekilde aylar hatta yıllar boyu kalır.

İkinci mayotik kilitlenme, oositin ikinci mayoz bölünmenin metafaz aşamasına ulaşmasıyla görülür. Fertilizasyonla veya partenogenetik bölünmeyle birlikte oosit mayozu tamamlar (5).

#### **Foliküler Apoptozis**

Apoptozis, ovaryumda oositler adına patolojik bir durumun oluşmasına sebep olan ve normal olmayan foliküler gelişim sürecinin çok önemli bir parçasıdır (9). Atrezinin hücrenin mekanizmasının ardında asıl neden olarak yer alır. Adı geçen mekanizma daha çok mRNA ve protein sentezi ile ilgilidir. Biyokimyasal olarak foliküler atrezi apoptotik hücre ölümlerine atfedilir. Bu da belirli bir düzen içerisinde hücrelerin sahip olduğu DNA materyalinin kaybı ve nükleer genomik havuzun dağılması ile sonuçlanır (7, 11).

#### **İnhibitörler**

Maturasyon inhibitörleri, foliküler hücreler tarafından sentezlenen ve mayoz bölünmenin durdurulmasını sağlayan biyolojik ürünlerdir. Mayes'in (9) bildirimleri doğrultusunda,  $\alpha$ -amanitin, 5,6-dichloro-1-B-

D-ribofuranosyl benzimidazole gibi bazıları RNA transkripsiyonuna engel olurlar ve transkripsiyon inhibitörleri adını alırlar. Cycloheximide, Puromycin gibi bazı inhibitörler de protein sentezine engel olarak etki gösterirler. Fosfataz inhibitörleri ise MPF komponentlerinin fosforilasyonunu kontrol altında tutarak etki gösterirler. Bunlara örnek olarak, Okadaik asit, Vanadate, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), Butyrolactone ve Roscovitine gösterilebilir. Ayrıca adenosin ve hipoksantin gibi pürinler de inhibitör etki de olup mayozun durdurulmasına yardımcı olurlar.

### ***Sitokinler ve Büyüme (Growth) Faktörlerinin etkisi***

Sitokinler hücrel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldır. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Şöyle ki; belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücrel sıvılara salgalanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücrel reseptörlerine bağlanırlar. Diğer sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin ve parakrin etkilerdir. Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

1) *Büyüme faktörleri* (Epidermal - EGF, Platelet orijinli – PDGF, insülin benzeri - IGF-1 büyüme faktörleri v.b.)

2) *Lenfokinler*

3) *Koloni stimüle eden faktörler*

4) *Transforme ediciler*

5) *Tümör nekroz faktörleri*

6) *Interferonlar*

Sitokinlerin en önemli etkilerinden biri hücre bölünmesi ve farklılaşması üzerindedir. Hücreler belli faktörler tarafından gönderilen spesifik sinyaller sonucu bölünür. Bu faktörler büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. Büyüme faktörleri hücre bölünmesi üzerinde pozitif etki

gösterirken, bazı sitokinlerin hücre bölünmesini engelleyici etkileri bilinmektedir. Belli bir hücrenin yüzeyinde mevcut olan reseptörler, bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirlerler (3).

İn vitro koşullarda yapılan çalışmalarda granuloza hücrelerince IGF-1 salındığı bunun da granuloza hücre mitozu ve steroidogenik aktivasyonunda etkili olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda, büyüme faktörlerinin in vitro maturasyon vasatına katılmasıyla oosit maturasyonunun desteklendiği bildirilmiştir (2).

### **Foliküler Sıvı ve Oosit Maturasyonu**

Foliküler sıvı, folikül hücrelerinin salgıları ve plazma eksudatından oluşur. İnorganik madde içeriği açısından kan plazmasına yakındır. Foliküler sıvıda sekiz adet steroid madde belirlenmiştir. Östrus siklusunun foliküler evresinde bu sıvı bol miktarda östrojen (östradiol-17 $\beta$ ) içerir (1).

İnekte, foliküler sıvıdaki östradiol konsantrasyonu gelişim ilerledikçe artmakta, ancak progesteron seviyesi pek değişmemektedir. Östrojen maturasyon süreci içerisinde granuloza hücrelerinin FSH ve LH'a olan duyarlıklarını artırır. Sonuçta granuloza hücrelerinde bazı farklılaşmalar başlar. İnekte foliküler evre boyunca, özellikle son üç-beş gün içinde folikül hücreleri önemli fonksiyonel değişim yaşar. Seksüel siklusun erken evresinden foliküler evrenin ortalarına dek granuloza hücreleri progesterona göre çok miktarda östradiol üretirler. Geç foliküler evrede ise LH/FSH yükselişinin ardından östrojen üretim düzeyi hayli düşerken, progesteron üretimi hızlanır. Granuloza hücreleri, özellikle ovulasyona yakın dönemlerde oksitosin hormonu da salgırlar. Ortamda teka hücreleri, adrenal steroidler, katekolaminler ve askorbik asit varlığında oksitosin üretiminin arttığı, aktivin varlığında ise düştüğü bildirilmektedir (12).

## KAYNAKLAR

1. **Edwards RG (1974)**. Follicular fluid. J. Reprod. Fert. 37: 189-219.
2. **Gordon I (1994)**. Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International Co., Wallingford UK.
3. **Güneş H (1999)**. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerine etkileri. Tr. J. of Biology 23 : 283–292
4. **Hosoe M, Shioya Y (1997)**. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. Zygote, 5: 371-376.
5. **Hyttel P, Fair T, Callesen H, Gereve T (1997)**. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology, 47(1): 23-32.
6. **Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, Vos Plam, Hendriksen PJM, Dieleman SJ, Schellander K, Besenfeller U, Gereve T (2001)**. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes an preimplantation embryos. J. Reprod. Fert. 122: 21-30.
7. **Jewgenow K, Heerdegen B, Müller K (1999)**. In vitro development of individually matured bovine oocytes in relation follicular wall atresia. Theriogenology, 51: 745-756.
8. **Krisher RL, Bavister BD (1998)**. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. Theriogenology, 49: 103-114.
9. **Mayes M (2002)**. The meiotic arrest of bovine oocytes. Département des sciences animales Faculte des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Universitélaval Québec PhD thesis. De l'Université Laval, Quebec-Canada.
10. **Palumbo A, Yeh J (1995)**. Apoptosis as a basic mechenism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. (Abstr.) J. Soc. Gynecol Investig. 2(3): 565.
11. **Svanberg B (1999)**. Apoptosis the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia. Erişim: [[http://www.physiology.gu.se/endo/Dissertation/avhandling\\_Bodil\\_Svanberg.pdf](http://www.physiology.gu.se/endo/Dissertation/avhandling_Bodil_Svanberg.pdf)] Erişim Tarihi: 14.10.2003.
12. **Voss AK, Fortune JE (1991)**. Oxytocin secretion by bovine granulosa cells: Effects of stage of follicular development, gonadotropins, and co-culture with theca interna. Endocrinology, 128 (4): 1991-1999.
13. **Whitaker M (1996)**. Control of meiotic arrest. J. Reprod. Fert. 1: 127-135.