

İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü-1 'in Japon Bildircin Embriyolarında Kemik Gelişimi Üzerine Etkileri

Buket BAKIR *  Hakan KOCAMIŞ *

* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-36100, Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-3912

Özet

İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1), Japon bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) embriyolarının omur bölgesindeki (*medulla spinalis thoracis*), kemik gelişimi üzerine etkileri histolojik olarak incelendi. Rekombinant insan IGF-1'i (rhIGF-1), yumurtanın küt ucundan, dental drill bit ile, chorio-allantoic zara zarar vermeden enjekte edildi. Kontrol ve rhIGF-1 enjekte edilen gruplar, histolojik analizler için embriyonal gelişimin 7. gününden 16. gününe kadar toplandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Torakal kemikte, kemikleşme merkezi, rhIGF-1 uygulanan embriyolarda ilk kez 11. günde, kontrol grubunda ise 12. günde tespit edildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hücre sayısının rhIGF-1 enjekte edilmiş grupta önemli derecede artmış olduğu görüldü ($P<0.05$). Araştırmamız sonucunda; rhIGF-1 uygulamasının Japon bildircinlerinin kemik gelişimini olumlu yönde etkilediği ve kemik gelişimini hızlandırdığı sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: rhIGF-1, Bildircin, Kemik gelişimi

The Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 on Bone Growth During Japanese Quail Embryonic Development

Summary

The effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on vertebrae bone (*medulla spinalis thoracis*) development of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) were histologically investigated during embryonic development. Recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) was injected through the blunt end of eggs via a single hole with a dental drill bit, without penetrating the chorioallantoic membrane. Control and rhIGF-1 injected groups were collected daily from days 7 to 16 of embryonic development for histological analysis and were examined with light microscopy. Ossification centers of thoracal bones were first observed on E12 for control and E11 day for rhIGF-1 injected groups, respectively. The number of cells were significantly increased in rhIGF-1 injected groups compared to that of control ($P<0.05$). In conclusion, the administration of rhIGF-1 accelerated the bone formation during quail embryonic development.

Keywords: rhIGF-1, Quail, Bone development

GİRİŞ

Kemik doku, somitlerin sklerotomundan köken alan osteoprogenitör hücrelerden gelişir¹. Destek dokular arasında gerçek anlamda destekleme görevi yapan kemik dokusu, hücreler (osteoprogenitör hücreler, osteoblast, osteosit, osteoklast), aramadde (matriks) ve hidroksiapatit adı verilen inorganik maddelerden oluşur. Kemik dokusunun iki türü vardır. Bunlardan birincisi, intrauterin hayatta ilk şekillenen primer kemik dokusudur. Buna olgunlaşmamış kemik dokusu da denir. Bunun yerini daha sonra sekonder kemik dokusu (olgunlaşmış kemik dokusu) alır.

Olgun kemikler, süngerimsi kemik (spongiyoz) ve kompakt kemik olmak üzere iki gruba ayrılırlar².

Büyüme ve gelişim üzerinde önemli etkileri olan insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), 70 aminoasit içeren, yaklaşık 7500 dalton ağırlığında olan bir büyüme faktörüdür³. IGF sistemi; IGF-1, IGF-2, IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) ve IGF reseptörlerinden (IGFR) oluşur^{4,5}. Yetişkin omurgalılarda, IGF-1'in temel kaynağı karaciğerdir. Buna karşın, embriyogenezis boyunca diğer dokular tarafından



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426800



buhal@hotmail.com

da üretilen IGF-1, embriyogenezin sonlarına doğru karaciğer tarafından üretilmeye başlar⁶. IGF-1, birçok dokunun özellikle de iskeletin büyüme ve farklılaşmasında önemli bir etkidir⁷. Kemik şekillenmesinden sorumlu hücrelerin hepsi (osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar) IGF-1'i üretebilirler⁸. Osteoblast hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda, IGF'lerin, gelişimin bütün safhalarında osteoblast fonksiyonunu (proliferasyon, farklılaşma, matriks üretimi, mineralleşme) arttırdığı görülmüştür^{8,9}.

Bu çalışma; IGF-1'in, Japon bıldırcınlarında (*Coturnix coturnix japonica*) embriyonal kemik gelişimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan döllenmiş Japon bıldırcını yumurtası Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinden sağlandı. Hayvanlara hayvan bakımı ve koruma düzenlemelerine göre muamele edildi (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Extermination and Other Scientific Purpose 1996).

Enjeksiyon Prosedürü

İnkübasyonun 3. günündeki bıldırcın yumurtalarının %70'lik etanol ile dezenfekte edilen küt uçlarına, chorio-allantoic zara zarar vermeyecek şekilde dışçı matkabı (dental drill bit) ile küçük bir delik açıldı. Açılan delikten, ucuna 22 ölçekli enjektör iğnesi takılı otomatik pipetle, her bir yumurtanın içine bir kez olmak üzere 10 ml asetik asit ve %0.1'lik BSA (Bovine Serum Albumin) ile hazırlanan rekombinant human IGF-1 (rhIGF-1) 100 ng/embriyo miktarında yumurtalara enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra açılan delik küçük bir yapıştırıcı (sticker) ile kapatılarak kontrol grubu yumurtalar ile birlikte nem oranı %86-87, sıcaklığı 37°C'ye ayarlanan inkübatöre yerleştirildi⁴. Uygulamada kullanılan rekombinant human IGF-1 (rhIGF-1) Dr. A. F. Parlow (UCLA, CA, USA) tarafından sağlandı.

Embriyoların Toplanması ve Doku Preparatlarının Hazırlanması

Yumurtaların kuluçka makinasına ilk konulduğu saat "0" zaman dilimi kabul edilip, 7. günden itibaren 16. güne kadar düzenli olarak her 24 saatte, hem enjeksiyon yapılan grup hemde kontrol grubunda bulunan yumurtalardan günde 5-6 adet toplandı. Embriyoların üst gövdelerinin toraks (*medulla spinalis thoracis*) bölümü alınarak bovin ve %10'luk formol-alkolde tespit edildi. Tespit olan doku örnekleri; dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirildikten sonra parafinle bloklanarak, her bloktan 6 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitlere rutin incelemeler için Crossmanın üçlü boyaması yapıldı¹⁰. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BX51) incelenirken, gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları çekildi. Histo-metrik ölçümler mikroskoba uyarlanan oküler mikrometre

yardımları yapıldı. Hücre sayımları birim alanda (0.01 mm², bir birim alan kabul edildi) ve notokordun her iki yanında paralel olacak şekilde yapıldı. İstatistikî değerlendirme için Minitab programı ile t-testi uygulandı¹¹.

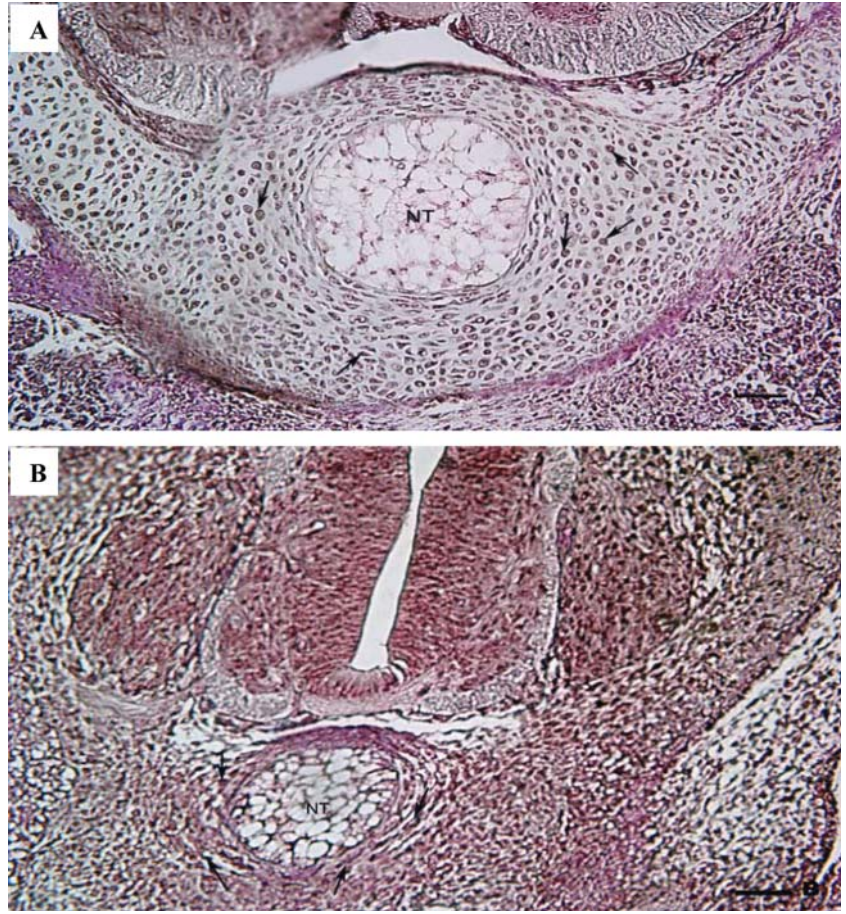
BULGULAR

İnkübasyonun 7 ve 8. gününe ait kontrol grubu embriyolarında, sırt omur kemiğini oluşturacak taslağın sınırları belirginleşmemiş ve aynı zamanda kırıldak hücreleri tam diferensiyasyon olmadıklarından diğer organları oluşturacak hücrelerden ayırıldı. Bu nedenle hücre sayım işlemi gerçekleştirilemedi. Bununla birlikte aynı dönemlere ait rhIGF-1 enjekte edilmiş embriyolarda, hücrelerin kontrol grubuna oranla daha fazla belirginleştiği sırt omur kemiğini oluşturacak olan taslağın çevre dokulardan ayırıldı. Gözlemlendi (*Şekil 1*).

İnkübasyonun 9. gününde kontrol grubuna ait embriyoların kırıldak hücrelerinin daha belirgin hale geldiği, sırt omur kemiğini oluşturacak olan alanın sınırlarının ayırıldı. İnkübasyonun bu gününden itibaren kontrol grubu ve rhIGF-1 uygulanan grupta birim alanda kırıldak hücrelerinin sayısı gerçekleştirilebildi (*Tablo 1*). rhIGF-1 uygulanan grupta, kırıldak hücrelerinin büyüklüklerinin inkübasyonun ilerlemesine bağlı olarak arttığı ve bu hücrelerin çekirdeklerinin daha belirgin olduğu görüldü. İnkübasyonun 10. gününde kontrol grubuna ait embriyoların kırıldak hücre hatlarının daha da belirginleştiği dikkati çekti. Aynı dönemde rhIGF-1 uygulanan grupta ise, özellikle notokordun çevresinde yer alan hücrelerde hipertrofinin meydana geldiği görüldü.

İnkübasyonun 11. gününde, kontrol grubundaki embriyoların kırıldak hücrelerinin bir önceki döneme göre hem daha belirgin hem de daha büyük olduğu gözlemlenirken, rhIGF-1 uygulanan grupta kemikleşme merkezleri dikkati çekti. rhIGF-1 uygulanan grupta kemikleşme merkezlerinin ve hipertrofi alanlarının oluşması nedeniyle birim alana düşen kırıldak hücre sayısının azalmış olduğu tespit edildi (*Tablo 1, Şekil 2*). Kontrol grubunda ilk kemikleşme merkezi ise inkübasyonun 12. gününde görüldü. Bu dönemde rhIGF-1 uygulanan grupta, kemikleşme merkezlerinin genişlediği ve özellikle notokordun çevresinde belirgin bir kemikleşme zonu dikkati çekti. Bu dönemde gerek rhIGF-1 uygulanan grupta ve gerekse kontrol gruplarında kemikleşmenin başlamasıyla birlikte kondrosit hücre sayısında belirgin düşüşler tespit edildi (*Tablo 1*).

İnkübasyonun 13. gününe ait kontrol grubu embriyolarında, odaklar halinde küçük boyutlarda kemikleşme merkezleri tespit edildi. rhIGF-1 uygulanan grupta, kemikleşme alanlarının genişlemeye devam ettiği görüldü. İnkübasyonun 14. gününe ait kontrol grubu embriyolarında, kemik odaklarının arttığı dikkati çekti. rhIGF-1 uygulanan grupta ise, inkübasyonun 13. gününde başlayan kemikleşme bölgesindeki genişlemenin arttığı görüldü. İnkü-



Şekil 1. İnkübasyonun 7. günü kıkırdak doku. A: rhIGF-1 enjekte edilen grup. B: kontrol grubu. Oklar: kıkırdak hücreleri. NT: Notokord, Bar: 10 µm

Fig 1. Cartilage tissue on 7th day of incubation. A: rhIGF-1 injected group. B: control group. Arrows: cartilage cells. NT: Notocord. Bar scale: 10 µm

Tablo 1. İnkübasyonun 9-16 günleri arasında rhIGF-1 enjekte edilmiş ve kontrol grubu bildirgin embriolarında omur bölgesinde (medulla spinalis thoracis) birim alanda kondrosit hücre sayılarının değerlendirilmesi ve t-testi ($P<0.05$)

Table 1. Evaluation of the number of cartilage cells in unit area of vertebrae part (medulla spinalis thoracis) and t-test in the rhIGF-1 treatment and control groups quail embryos between the 9th and 16th day of incubation ($P<0.05$)

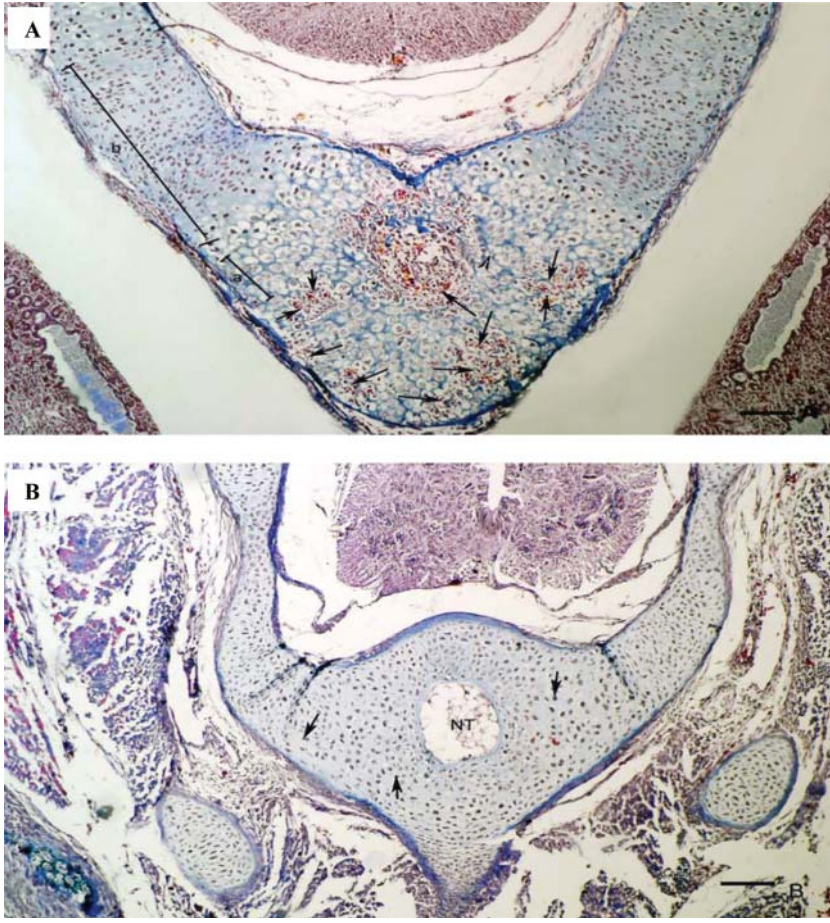
İnkübasyon Günü	n	rhIGF-1 Uygulanan Grup	Kontrol Grubu	t-Değeri
9	10	165.20±2.9	104.40±2.9	5.55
10	10	274.60± 2.7	239.00±4.3	6.96
11	10	250.60± 5.5	278.00±4.0	-4.00
12	10	246.40±1.9	263.60±3.2	-4.58
13	10	237.20±6.2	265.20±3.7	-3.89
14	10	179.00±8.0	236.00±6.5	-5.52
15	10	174.60±2.9	236.2±16	-3.71
16	10	149.00±8.9	1±2.787.60	-4.17

n: sayım yapılan birim alan sayısı (n: the number of counts per unit area)

basyonun 15. gününde, kontrol grubuna ait embriolar-
da, kemikleşme merkezlerindeki artış dikkati çekmek-
teydi. rhIGF-1 uygulanan grupta, kemikleşmekte olan ke-
mikleşme zonunda trabeküllerin şekillendiği görüldü.

İnkübasyonun son günü olan 16. günde ise rhIGF-1
uygulanan grupta kemikleşme zonunun tüm alana ya-

yıldığı görüldü. Kontrol grubunda, büyüklükleri farklı çok
sayıda kemik odakları dikkati çekti. Kontrol grubunda ink-
küasyonun 12. gününde görülen kemikleşme merkez-
lerinin, inkübasyonun 16. gününe kadar sürekli geliştiđi
gözlense de, rhIGF-1 uygulanan embriolardaki gelişimin,
incelenen her dönemde daha ileri seviyede olduğu dik-
kati çekti.



Şekil 2. İnkübasyonun 11. günü. A: rhIGF-1 enjekte edilmiş grup. Oklar: Kemikleşme merkezleri. B: Kontrol grubu. Oklar: Kıkırdak hücreleri. NT: Notokord. Bar: 20 µm

Fig 2. incubation day of 11. A: rhIGF-1 injected group. Arrows: ossification centers. B: control group. Arrows: cartilage cells. NT: Notochord. Scale Bar: 20 µm

TARTIŞMA ve SONUÇ

IGF-1'in ve büyüme hormonunun (GH), büyüme üzerindeki rolünün açıklanmasından günümüze değin söz konusu faktörlerin kemik büyümesi üzerindeki rolü daha fazla araştırılmaya başlanmıştır. Kürtül ve ark.¹², kanatlıların kanat ve bacak kemik gelişimini incelemek amacıyla Hubbert ırkı broylerlerde kuluçka döneminin 7. ve 21. günleri arasında yapmış oldukları çalışmada, ilk kemikleşme merkezinin inkübasyonun 9. gününde gözlemlenmiştir¹². Nakane ve Tsudzuki'nin¹³, Japon bildircinlerinde, 3. ve 17. günler arasında iskelet oluşumuyla ilgili yapmış oldukları çalışmada, omur kemiklerinde, ilk kemikleşmenin 11. günde torakal omurların merkezinde olduğunu görmüşlerdir¹³. İnkübasyonun 7. ve 16. günleri arasında Japon bildircinlerinin sırt omurlarında yapmış olduğumuz çalışma sonucunda, kontrol grubunda ilk kemikleşme merkezi 12. günde görüldü. Diğer taraftan, rhIGF-1 uygulanan grupta ise ilk kemikleşme merkezinin 11. günde saptanmış olması ve ilerleyen günlerde gelişimin kontrol grubuna göre daha ilerde olduğunun gözlenmesi IGF-1'in kemik gelişimi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Phornphutkul ve ark.¹⁴, iskelet gelişimini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, IGF-1'in yetersiz olduğu farelerin türdeşlerinden daha küçük doğduğunu ve bu hay-

vanların büyüme plağının, iki haftalık normal tipleri ile karşılaştırıldığında büyüme bölgelerinin daha sınırlı olduğunu görmüştür. Çoğalma zonu olarak da adlandırılan büyüme plağında, hem bu bölgedeki kondrosit sayılarının hem de hipertropik zondaki kondrosit sayılarının normal gruba göre daha az olduğu görülmüştür. Aynı hayvanlara IGF-1 enjekte edildiği zaman, kemik uzamasının arttığı, proliferatif ve hipertrofik zonun her ikisinde yeniden yapılandığı gözlenmiştir¹⁴. Japon bildircinlerinde yaptığımız çalışma, bu bilgileri destekler nitelikte olup, IGF-1 uygulanan gruptaki kondrosit hücre sayılarının kontrol grubuna oranla daha fazla olduğu tespit edildi ($P < 0.05$).

Pourlis ve ark.¹⁵, Japon bildircinlerinde inkübasyonun 6. ve 16. günleri arasında bacak ve kanatlarda kemik gelişimini incelemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, inkübasyonun 8. gününden itibaren kemiği oluşturacak olan alanlarda kıkırdak hücre sayısının arttığını, yumurtadan çıkıştan kısa bir süre öncesine kadar ise kıkırdak hücre sayısının önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir¹⁵. Yaptığımız çalışma sonucunda, birim alanda sayılan kıkırdak hücre sayısı inkübasyonun 9. gününden itibaren artmıştır. Ayrıca birim alandaki kıkırdak hücre sayısının IGF-1 enjekte edilen gruplarda inkübasyonun 11. gününden kontrol gruplarında ise 12. gününden itibaren azalmaya başladığı görüldü.

İnsan IGF-1'inin tavuk biyolojik aktiviteleri üzerine et-

kilerine dair çok az çalışma bulunmaktadır. Örneğin, insan IGF-1'inin, tavuk embriyo kondrositlerinde; RNA, proteoglikan ve DNA sentezini uyardığı gözlenmiştir¹⁶. Diğer omurgalılarla karşılaştırıldığında memeli IGF'leri ve IGF bağlayıcı proteinleri hakkında çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Kanatlılarda IGF'lerin yapı ve fonksiyonlarıyla, kanatlı IGFBP'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve fonksiyonu ile ilgili daha detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır¹⁷.

Japon bildircinlerinde, omurların toraks bölgesinde kemik gelişimiyle ilgili yaptığımız çalışmada, her iki grupta da inkübasyonun 7. gününde şekillenmiş olan fakat tam olarak ayırdedilemeyen kıkırdak hücrelerinin ilerleyen günlerde ayırdedilmeye başladığı ve inkübasyonun 16. gününe dek sürdürülen gözlemler sonucunda, iki grup arasında farkın 9, 11 ve 15. günler arasında önemli olduğu saptandı. Ayrıca, kontrol grubu ile rhIGF-1 uygulanan gruplar, birim alandaki hücre sayısı bakımından yaşa bağlı olarak kıyaslandığında, farkın istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edildi ($P < 0.05$). Japon bildircinlerinde, kemik gelişimi üzerine IGF-1'in etkilerini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada, IGF-1'in kemik gelişimi üzerine etkilerinin olumlu olduğu ve kemik gelişimini hızlandırdığı sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Olsen BR, Reginato AM, Wang W:** Bone development. *Annu Rev Cell Bio*, 16, 191-220, 2000.
- Özer A:** Kemik dokusu. In, Aştı RN (Ed): Genel Histoloji. 6. Baskı, s. 189-191, Yorum Matbaacılık, Ankara, 2008.
- Allan GJ, Flint DJ, Patel K:** Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *J Rep Fertil*, 122, 31-39, 2001.
- Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA:** Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrinol Rev*, 17, 481-517, 1996.
- Fu Z, Kubo T, Noguchi T, Kato H:** Developmental changes in the mRNA levels of IGF and its related genes in the reproductive organs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Growth Horm & IGF Res*, 11, 24-33, 2001.
- PabloDe FT, Robcis HI, Caldes T, Aemany J, Scavo L, Serrano J:** Insulin-like growth factors in chicken embryogenesis. *Endocrinol*, 11, 558-577, 1990.
- Rosen CJ:** Insulin-like growth factor 1 and calcium balance: Evolving concepts of an evolutionary process. *Endocrinol*, 144 (11): 4679-4671, 2003.
- Rosen CJ:** Insulin-Like Growth Factor system and bone. *Endocrinol*, 277-278, 2001.
- Jonsson KB, Wiberg K, Ljunghall O:** Insulin-like growth factor-1 does not stimulate bone resorption in cul. *Internal Med*, 59, 366-370, 1996.
- Crossman O:** A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*, 69, 31-38, 1937.
- Minitab:** Minitab Reference Manual. Release 10 for Windows Minitab Inc, USA, 1994.
- Kürtül İ, Atalgın ŞH, Aslan K, Bozkurt EÜ:** Ossification and growth of the bones of the wings and legs in prehatching period of the Hubbert strain broiler. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (6): 869-874, 2009.
- Nakane Y, Tsudzuki M:** Development of skeleton in Japanese quail embryos. *Anim Sci*, 41, 523-534, 1999.
- Phornphutkul C, Wu KY, Yang X, Chen Q, Gruppuso Philip A:** Insulin-like growth factor-1 signalling is modified during chondrocyte differentiation. *Pedi Endocrinol*, 10, 1677, 2004.
- Pourlis AF, Magras IN, Pedritis D:** Ossification and growth rates of limb long bones during the prehatching period in the Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Anat Hist Emb*, 27, 61-63, 1998.
- Burger EH, Klein-Nulend J:** Mechanotransduction in bone-role of the lacuna canalicular network. *FASEB J*, 13, 101-113, 1999.
- McQueeney K, Dealy CN:** Roles of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 binding protein-2 (IGFBP2) and -5 (IGFBP5) in developing chick limbs. *Growth Horm & IGF Res*, 11, 346-363, 2001.