T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERKEN EMBRİYONİK DÖNEMDE ALKALOZDAN SAVUNMA MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Şenay DAĞILGAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN

ADANA-2013

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERKEN EMBRİYONİK DÖNEMDE ALKALOZDAN SAVUNMA MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Şenay DAĞILGAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN

Bu tez çalışması Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TF 2010 YL-2).

Tez no……

ADANA 2013

KABUL VE ONAY

Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "**Erken Embriyonik Dönemde Alkalozdan Savunma Mekanizmasını İncelenmesi**" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 04/06/2013

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. S. Sadi KURDAK
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Suna SOLMAZ
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun ……. tarih ve ……. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bir bilim insanı olarak yetişmemde büyük katkıları olan, adaletli, etik ve disipliner yaklaşım gibi sayamayacağım bir çok konuda örnek aldığım danışmanım Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN' a, sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında çalışma olanağı vererek, Yüksek lisans eğitimimde önemli katkıları bulunan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım başta Prof. Dr. S. Sadi KURDAK ve Prof. Dr. Ayşe DOĞAN olmak üzere değerli bilgilerini benden esirgemeyen tüm Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine çalışma arkadaşlarıma ve emeği geçmiş tüm teknik ve idari personele en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca eğitimim boyunca, büyük bir özveri ile beni destekleyen, hayatıma huzur veren aileme de teşekkürü borç bilirim.

Şenay DAĞILGAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLOLAR DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Oogenez	4
2.2. Fertilizasyon	5
2.3. Embriyogenez	6
2.4. Fare Modeli ve Önemi	8
2.5. Solüsyonlar	9
2.6. pHi İyon Ölçüm Yöntemleri	10
2.6.1. Spektrofluorometrik Yöntem ile Hücre içi İyon Ölçümü	10
2.6.1.1. Floroforlar ve Özellikleri	11
2.6.1.1.1. Orantısal olmayan (non-ratiometric) floroforlar	11
2.6.1.1.2. Orantısal (ratiometric) floroforlar	11
2.6.1.2. Hücrelere Florofor Yükleme Yöntemleri	13
2.6.1.2.1. Mikroinjeksiyon yöntemi	13
2.6.1.2.2. AM ester formları ile yükleme yöntemi	13
2.6.1.3. pH' a Hassas Floroforlar	14
2.6.1.3.1. BCECF (2,7 bis Karboksietil 5-6 karboksi florosin)	14

2.6.1.3.2. Karboksi SNARF-1 (karboxy-seminaphthorhodafluor-1) 15
2.6.2. Mikrospektrofluorometrik Hücre içi İyon Ölçüm Yöntemi 16
2.6.2.1. Işık Çoğaltıcı Tüp (Photo Multiplier Tube, PMT) 16
2.6.2.2. Kamera (Imaging, görüntüleme sistemi) 17
2.7. Mikrospektrofluorometre ile pH_i Kaydı 19
2.8. Zigot ve Embriyolarda pH_i Düzenlenmesi 20
2.9. AE Aktivitesi ve Hesabı 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
3.1. Solüsyonlar 23
3.2. Kimyasal Maddeler 24
3.3. Zigot ve Embriyo Eldesi 24
3.3.1. Zigotun Eldesi 24
3.3.2. 2h, 4h ve 8h Aşamalardaki Embriyoların Eldesi 25
3.4. pH_i Kaydı 26
3.5. Cl^- Uzaklaştırma Yöntemi ve AE Aktivite Hesabı 29
3.6. Alkaloz İndüksiyonu ve AE Fonksiyonunun Araştırılması 29
3.7. İstatistik 30
4. BULGULAR 31
4.1. Zigot ve Embriyolardaki pH_{id} Değerleri 31
4.2. AE Aktivitesinin Saptanması 32
4.3. İndüklenmiş Alkalozdan İyileşme 34
5. TARTIŞMA 37
5.1. pH_i değerleri 37
5.2. AE Aktivitesi 37
5.3. İndüklenmiş Alkaloza Verilen İyileşme Yanıtları 39
6. SONUÇLAR 41
KAYNAKLAR 43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no

Şekil 2.1 Mayotik metafaz II aşamasındaki oosit (A), fertilize olmuş, ikinci polar cismini atmış ve pronükleusları belirgin hale gelmiş zigot (B) örnek fotoğrafları 5

Şekil 2.2 Ovüle olan MII aşamasındaki oosit ampullada fertilize olarak başlayan embriyogenez aşamaları. Zigot, oviduktan uterusa doğru ilerlerken gelişimine devam eder ve blastokist aşamasında uterusa implante olur. 6

Şekil 2.3 PN zigot **(A)**, 2h **(B)**, 4h **(C)**, 8h **(D),** morula **(E)**, blastokist **(F)** aşamasındaki embriyolar ile blastokistin zonasından ayrılmasını **(G)** gösteren embriyoların örnek fotoğrafları. 8

Şekil 2.4 Orantısal olmayan florofor Fluo-3'ün 488 nm dalga boyunda uyarılması ile kayıtlanan emisyon spektrumu 12

Şekil 2.5 Ca^{2+}'a hassas Fura-2 floroforunun 510 nm dalga boyunda toplanan floresan kayıtlarının eksitasyon spektrumu. 12

Şekil 2.6 BCECF - AM ester formundaki floroforun AM metodu ile hücreye yüklenmesi 14

Şekil 2.7 BCECF'in 535 nm emisyonu dalga boyunda gerçekleştirilmiş eksitasyon spektrumu 15

Şekil 2.8 SNARF-1'in 534 nm'de uyarılması ile kayıtlanan emisyon spektrumu 16

Şekil 2.9 Kameraya ait piksellerden meydana gelen ışık algılayıcıları ve üzerine düşen ışık ile ortaya çıkan görüntü şematizasyonu. Bu sayede kamera ile uzaysal çözümleme yapılabilmektedir 17

Şekil 2.10 pH_i kayıtlarının alındığı ve emisyon ışığının saptayıcısı olarak ICCD Kamera'nın kullanıldığı mikrospektrofluorometrik kayıt sisteminin şeması 18

Şekil 2.11 Mikrospektrofluorometrik kayıt sisteminin çalışma ilkesi. 18

Şekil 2.12 BCECF ve SNARF-1'in *in situ* kalibrasyonu ile çizilmiş kalibrasyon eğrileri 20

Şekil 2.13 AE' in hücre modelinde çalışma prensibi ve sonuç olarak gelişebilecek hücre içi alkalozu iyileştirmesi (üstte). Dış ortamdan Cl^-' un uzaklaştırılarak AE'ın ters yönde çalışması sonucu hücre içi alkalizasyon oluşturulabilir ve bu oluşma hızından linear regresyon aracılığıyla fonksiyonel olarak AE aktivitesi hesaplanabilir (altta) 21

Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan Balb/c soyu dişi farelerden biri 22

Şekil 3.2 Solüsyonların hazırlanmasında kullanılan cihazlar 24

Şekil 3.3 Süperovülasyon protokolü ile indüklenmiş ve kopülasyon yapmış dişi farede vajinal plak 25

Şekil 3.4 Süperovülasyon protokolü ile ampulladan izole edilen PN aşamadaki zigotun örnek fotoğrafı **(A)**, flash yöntemi uygulanarak ovidukt veya horndan elde edilen 2h **(B)**, 4h **(C)**, 8h **(D)** embriyoların örnek fotoğrafları 25

Şekil 3.5 Fizyoloji Anabilim Dalı Üreme Fizyolojisi Laboratuvarı' nda zigot ve embriyoların izole edilerek kültür işlemlerinin gerçekleştirildiği ortam ve cihazlar 26

Şekil.3.6 Tüm embriyonik aşamalarda eş zamanlı olarak yapılan kayıtların örnek floresan görüntüsü 27

Şekil 3.7 pH' ya hassas olan 500 nm ile **(A)** ve pH' ya hassas olmayan 440 nm ile **(B)** eksite edilen embriyoların 535 nm' deki emisyon yanıtları 27

Şekil 3.8. 400-500 nm' lerde eksite edilen zigot/embriyolardan 535 nm' de elde edilen emisyon yanıtlarının pH_i değişimine bağlı olarak gerçekleşen grafiği 28

Şekil 3.9. Kayıtların gerçekleştirildiği mikrospektrofluorometre sistemi 28

Şekil 3.10 BCECF ile yüklenmiş PN zigot ve embriyolar (n=19) kullanılarak *in situ* Nigerisin/Yüksek K^+ metodu ile alınmış pH_i kalibrasyon eğrisi 29

Şekil 4.1 Cl^- uzaklaştırma yöntemi kullanılarak PN zigot ile 2h, 4h ve 8h embriyolardan alınan kayıtların ortalama değerleri ile çizilmiş pH_i değişimleri. On dakika süresince pHKSOM ortamında dinlenim pH_i kayıtlanmış, sonrasında Cl^- içermeyen pHKSOM ile ortam değiştirilmiştir. Bu şekilde uygulanan Cl^- uzaklaştırma yöntemi ile gelişen alkalinizasyonun linear regresyon eğrisi ile AE aktivitesi saptanmıştır. 33

Şekil 4.2 Cl^- uzaklaştırma yöntemi ile PN zigot ve 2h, 4h ve 8h embriyolardan saptanan AE aktivitesinin karşılaştırmalı görünümü 34

Şekil 4.3 İndüklenmiş hücre içi alkaloza PN zigotların ve 2h, 4h ve 8h embriyoların verdikleri iyileşme yanıtlarının ortalama değerler ile çizilmiş grafiği **(A).** Bu iyileşme yanıtlarının DIDS etkisiyle değişimi **(B)** 35

Şekil 4.4 İndüklenmiş hücre içi alkaloza PN zigot ve 2h, 4h ve 8h embriyoların inhibitörsüz (NH_4Cl-pHKSOM) ve inhibitörlü (NH_4Cl-pHKSOM+DIDS) ortamda gerçekleşen pH_{if} ile pH_{id}'leri arasındaki farklar 36

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa no
Tablo 3.1	Çalışmada kullanılan solüsyonların ayrıntılı içeriği	23
Tablo 4.1	O Cl^-, NH_4Cl, NH_4Cl+DIDS gruplarına ait zigot ve embriyoların pHKSOM ortamında kayıtlanan pH_{id} değerleri (Ort. ± SEM)	31
Tablo 4.2	PN zigot ve 2h, 4h ve 8h embriyoların pHKSOM ortamında kayıtlanan tüm pH_{id} değerlerinin ortalama verileri (Ort. ± SEM)	32
Tablo 4.3	PN zigot ile 2h, 4h ve 8h embriyolarda kayıtlanan AE aktiviteleri (pHU/dk)	33
Tablo 4.4	PN zigotların ile 2h, 4h ve 8h embriyoların dinlenim pH_i (pH_{id}) ve NH_4Cl ile indüklenen alkalozise verdikleri iyileşme yanıtları sonucu oluşan pH_i (pH_{if}) değerleri ve DIDS uygulamasının bu değerlere etkisi	35

KISALTMALAR

ΔpH_i : Hücre içi final pH'ı ile hücre içi dinlenim pH'ı arasındaki fark

AE **:** Anyon (HCO_3^-/Cl^-) değiştirici

BCECF **:** 2,7 bis karboksi etil 5-6 karboksi florosin

BSA **:** Sığır serum albumini

DIDS **:** 4,4' -Diisocyanbatostilbene-2,2' -disulfonik asit

GV **:** Germinal vezikül

IP **:** Intraperitoneal

IU **:** Uluslararası ünite

Karboksi SNARF-1 **:** Karboksi-seminaphthorhodafluor-1

KFHM **:** K^+ içerikli zigot ve embriyo toplama medyumu

KSOM **:** K^+ içerikli basit optimize edilmiş medyum

MI **:** Mayotik metafaz I

MII **:** Mayotik metafaz II

NBCE **:** Na^+, HCO_3^-/Cl^- değiştiricisi

NHE **:** Na^+/H^+ değiştiricisi

pH_i **:** Hücre içi pH

pH_{id} **:** Hücre içi dinlenim pH'ı

pH_{if} **:** Hücre içi final pH'ı

PMSG **:** Gebe kısrak serum gonadotropini

PMT **:** Işık (foton) çoğaltıcı tüp

PN **:** Pronüklear

SEM **:** Standart hata

TIBDAM **:** Tibbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi

2h **:** 2 hücreli

4h **:** 4 hücreli

8h **:** 8 hücreli

ÖZET

Erken Embriyonik Dönemde Alkalozdan Savunma Mekanizmasının İncelenmesi

Hücre içi pH (pH_i) düzenlenmesi, temel homeostatik mekanizmalardan biridir. Bu düzenleme, alkali şoklara karşı HCO_3^-/ Cl^- değiştiricisi (AE), asidik şoklara karşı ise Na^+/H^+ ile Na^+,HCO_3^-/Cl^- değiştiricileri ile gerçekleştirilir. Yeni canlının gelişimini sağlayacak olan oosit ve sonuçta gelişen embriyoların sağlıklı olabilmesi için, bu düzenleyicilerle pH_i değerlerini dar sınırlar içinde tutmaları gerekir. Yapılan çalışmalar, profaz I aşamasındaki oositlerde AE aktif iken mayotik matürasyon sürecinde bu değiştiricinin baskılandığını göstermiştir. Bu çalışmada ise, saptanan bu değişimin daha sonraki embriyonik gelişim aşamalarında, pronüklear zigottan (PN) sekiz hücreli (8h) embriyolara kadar, incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada beş – sekiz haftalk matür Balb/c soyu farelere süperovülasyon protokolü uygulanarak ve kopülasyonları sağlanarak uygun zamanlarda PN zigot, iki hücreli (2h), dört hücreli (4h) ve 8h embriyolar elde edildi. Kültür ve kayıt solüsyonları olarak KSOM esaslı solüsyonlar kullanıldı. Elde edilen zigot ve embriyolar, pH-sensitif florofor 2,7 bis karboksi etil 5-6 karboksi florosin (BCECF) ile yüklendi ve mikrospektrofluorometrik yöntem ile ratiometrik olarak pH_i kayıtları alındı. Cl^- uzaklaştırma metodu ile AE aktivitesi fonksiyonel olarak saptandı. Zigot/embriyoların amonyum puls tekniği ile indüklenen alkalozdan iyileşmeleri ve bu iyileşmelerin AE inhibitörü DIDS ile etkilenmesi incelendi.

Hücreleri alkali şoklardan koruyan AE aktivitesi, PN zigot aşamasında yüksek iken (0,068±0,01 pHU/dk) 2h, 4h ve 8h embriyo aşamasına kadar olan gelişimsel süreçte giderek azaldı (pHU/dk olarak sırasıyla; 0,058±0,01; 0,042±0,01 ve 0,033±0,01). Aktivitedeki bu azalma 8h aşamada, PN zigot ve 2h embriyo değerlerine göre, istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). PN zigot ve tüm embriyo aşamalarında indüklenmiş alkali şoklardan tam olarak iyileşme gerçekleşti. Çalışılan PN zigot, 2h ve 4h embriyolarda AE aktivitesi, ortama eklenen DIDS ile anlamlı olarak baskılandı ancak DIDS, 8h embriyolarda etkisiz idi.

Preimplantasyon aşamalarında bulunan PN zigot, 2h, 4h ve 8h embriyoların gelişim sürecinde AE aktivitesi giderek azalmakta, buna karşın çalışılan tüm aşamalarda alkalozdan iyileşme tam olarak gerçekleşmektedir. Bu iyileşme PN zigot, 2h ve 4h embriyolarda AE aktivitesi sayesinde olmakta iken 8h embriyolarda alkalozdan iyileşmenin doğası saptanamamıştır. Bu bulgular ışığında, gelişmekte ve metabolizmaları değişmekte olan embriyoların (daha fazla asidik yük oluştururlar), alkali oviduktan asidik uterusa ilerlerken, metabolizma ve dış ortamlarına uygun şekilde savunma mekanizmalarını oluşturdukları sonucuna varılabilir.

Anahtar Sözcükler: Anyon değiştirici, fare, hücre içi pH düzenlenmesi, zigot, embriyo

ABSTRACT

Investigation of Activity Changes of Anion Exchanger Against Intracellular Alkalosis During Early Preimplantation Embryonic Stages

Intracellular pH (pH_i) regulation is an important component of mammalian cell homeostasis. pH_i is maintained within a narrow range by three major regulatory-mechanisms: the HCO_3^-/Cl^- exchanger (AE), which alleviates alkalosis, and the Na^+/H^+ (NHE) and Na^+-dependent HCO_3^-/Cl^- (NDCBE) exchangers, both of which alleviate acidosis. pH_i should be kept within narrow range by these regulators for healthy developing embryos, as well. Findings of studies performed showed that although AE activity of oocyte at prophase I stage high, this activity is inhibited during meiotic maturation. In this study, we aimed to investigate AE activity during early preimplantation embryonic developmental process, from PN zygote to 8-c stage.

In this study, PN zygotes, two-cell (2-c), four-cell (4-c), eight-cell (8-c) stage embryos were obtained by classical procedure from 5-8 week old mature female Balb/c strain mouse following superovulation protocol. KSOM based solutions were used as culture and recording solutions. Intracellular pH (pH_i) was recorded by using microspectrofluorometric technique from zygotes/embryos which were loaded with pH-sensitive florophore, BCECF. AE activity was determined by Cl^- removal assay. Function of AE was investigated using recovery response from induced-alkalosis and confirmed by DIDS, specific inhibitor of AE.

While AE activity was high at PN zygotes (0,068±0,01 pHU/min), this activity gradually decreased as embryos develop to 2-c, 4-c and 8-c stages (in pHU/min; 0,058±0,01, 0,042±0,01 and 0,033±0,01, respectively). These activity changes were statistically significant at PN zygote and 2-c embryo when compared to 8-c stage ($p<0,05$). Complete recovery from induced-alkalosis was determined at all-stages of embryos; and, DIDS inhibited these recovery responses at all stages except 8-c embryo.

In the light of these findings, it is possible to conclude that embryos, which are developing and changing their metabolisms, constitute appropriate defense mechanisms in accordance with the environment, as they move along from alkaline oviduct to acidic uterus.

Keywords: Anion exchanger, mouse, intracellular pH regulation, zygote, embryo

1. GİRİŞ

Foliküller içinde birinci mayozun profazında durdurulmuş olan oositin mikroskobik görüntüsünde hücre ortasında bariz olarak germinal vezikül vardır[1]. Ovülasyon hipofiz gonadotropinleri ile tetiklendiğinde oosit kaldığı profazdan kurtulur ve germinal vezikül yıkılır [2-4], böylece oosit birinci mayotik metafaza (MI) geçmiştir. Gelişimi devam eden oosit, birinci mayotik bölünmesini gerçekleştirerek kutup cismini atar ve böylece tekrar durdurulacağı ikinci mayotik metafaz (MII) aşamasına ulaşır [5]. MII aşamasındaki oosit, fertilize olacağı ovidukt içine atılır. Spermin aktive etmesiyle kaldığı MII aşamasından kurtulur, buna bağlı olarak ikinci kutup cismini atar ve sonuç olarak erkek ve dişi pronükleuslar kaynaşarak yeni canlının genetik materyalini oluştururlar. Böylece pronüklear aşamadaki (PN) zigotun gelişimini sürdürmesi ile artarda mitotik bölünmeler gerçekleşir ve sırayla iki (2h), dört (4h) ve sekiz hücreli (8h) embriyolar oluşur. Preimplantasyon aşamasındaki embriyo gelişimi, morula ve blastokist aşamaları ile tamamlanır.

Başlıca hücre içi pH (pH_i) düzenleme mekanizmaları, pH_i'yı düşüren HCO_3^-/Cl^- değiştiricileri (anyon değiştiricileri, AE) ve pH_i'yı arttıran Na^+/H^+ ile $Na^+,HCO_3^-/Cl^-$ değiştiricileridir [6-10]. AE, zayıf baz HCO_3^-'ı Cl^- ile değiştirir, böylece alkalozun düzeltilmesini sağlar. Na^+/H^+ değiştiricileri (NHE), H^+'i Na^+ ile değiştirmek üzere hücre dışına verir, böylece asidozun düzeltilmesini sağlar. Na^+, HCO_3^-/Cl^- (NBCE) değiştiricileri ise Na^+ ve HCO_3^-'ı hücre içine alırken Cl^-'u dışarı atar, böylece hücre içi HCO_3^- artışının sonucu pH_i arttırılır [6-10]. Tüm bu pH_i düzenleyici mekanizmaların anahtar özelliği bu değiştiricilerin pH_i'daki değişimler tarafından aktiflenmesidir; NHE ve NBCE'leri, pH_i'nin değişimiyle aktive edildiği "ayar noktası" veya bir eşik değerin altına düşmedikçe sessizdirler [8, 11, 12]. Tersine, AE'leri pH_i "ayar noktası"nın üstüne çıktığında aktive edilirler [12, 13].

Oositlerin büyüme-gelişime [14-16] ve mayotik matürasyon sürecinde [17-20] hücreiçi pH düzenleyici mekanizmaların gelişimsel değişimi gösterilmiştir. Oositin büyüme-gelişme sürecinde pH_i'si, foliküler yapı içinde granüloza hücrelerinin yardımı ile düzenlenebilmekte iken [15, 16], mayotik yeterliliklerini kazanmaları ile AE ve NHE aktiviteleri sayesinde oositler, foliküler yapıdan bağımsız, kendi başlarına pH_i

düzenlemesini gerçekleştirebilmektedirler [14]. Böylece oosit tam büyüklüğüne ulaşmış ancak birinci mayotik bölünmenin profaz I aşamasında duraksatılmış (Germinal vezikül aşaması) durumda iken AE ve NHE aktivitesi tam etkinliğine ulaşmaktadır [14, 15]. Ancak Phillips KP ve ark. yaptıkları çalışmada, birinci mayozun metafaz sürecinde AE aktivitesinin baskılandığını, fertilizasyon ile yeniden aktive olmaya başladığını ve ancak pronüklear aşamada maksimum aktivasyona ulaştığını rapor etmişlerdir [19]. Balb/c soyu farede de benzer düzenlemenin bulunduğu laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmada gösterildi [17]. Ayrıca, asidoz defans mekanizması olan NHE aktivitesinin de bu süreç içinde baskılandığı, buna karşın oosit NBCE aktivitesinin bu mayotik matürasyon sürecinde kazanıldığı yine laboratuvarımızdan çıkan çalışmalarda rapor edildi [18]. NHE ve AE'ın mayotik matürasyon aşamalarında baskılanmasının önemi, günümüz bilgileri ile henüz açıklanamamıştır.

Oogenez sürecindeki pH_i defans mekanizmalarının aktivitelerindeki gelişimsel değişim, embriyogenez sürecinde de incelenmiştir [20-26]. İnsan embriyoları üzerinde AE aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, zigot aşamasında bu aktivite yüksek bulunmuş [27], insan embriyosunda yapılan bir diğer çalışmada ise zigot, 2h, 4h, 8h, 16h embriyolar ile morula ve blastokist aşamalarının tümünde yüksek AE aktivitesi saptanmıştır [23]. Buna karşılık, hamsterda AE aktivitesinin değerlendirildiği araştırmada PN zigotta yüksek aktivite saptanmış iken 2h aşamasında bu aktivitenin azaldığı rapor edilmiştir [28]. Diğer yandan, fare embriyolarında gerçekleştirilen yine AE aktivitesinin araştırıldığı çalışmada PN zigot, 2h embriyo ve morula ile blastokist aşamalarında giderek azalan aktivite saptanmış iken 4h ve 8h embriyolar değerlendirilmemiştir [29]. Az sayıda insan preimplantasyon aşamalarındaki embriyolar üzerinde yapılan çalışma sonuçları ile hamster ve fare embriyoları üzerinde elde edilen veriler arasında farklılık vardır. Öte yandan insan embriyosunda yapıldığı gibi farede embriyo gelişiminin ardışık aşamalarında yapılan sistematik bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Değişen dış ortamın pH'ʁ(ampulladaki alkali ortam) ve embriyonun metabolik aktivitesi [23, 30], göz önüne alındığında her bir aşamanın farklı bir aktivite göstermesi beklenebilir. Ayrıca *in vitro* fertilizasyon (IVF) çalışmalarında genel olarak 3. gün embriyo transferi yapıldığı ve bu süredeki embriyonun ise 8h aşamasında olması nedeniyle zigot, 2h, 4h ve 8h embriyo aşamalarının özellikle incelenmesi pratik öneme sahiptir. Böylece

zigot/embriyoların vücut dışında manipüle ve kültüre edilmesi için gerekli ortamların oluşturulmasında daha fazla bilgi sağlanabilir.

AE aktivitesi, farklı düzeylerde de olsa, fare preimplantasyon aşamasındaki embriyo gelişimi süresince devam etmektedir [21, 29, 31]. HCO_3^-/Cl^- değişimi dinlenim pH_i'ını kontrol eder ve embriyo gelişimi için gereklidir [29]. İnsan embriyolarının da farede olduğu gibi AE2 ve 4 isoformlarını eksprese etmesi ve böylece pH_i'ı düzenlenmesine katkıda bulunması [32] fare modelinde yapılan çalışmaların değerini daha da arttırmaktadır. Bunun yanı sıra ülkemizde özellikle son yıllarda etik nedenler ile insan oosit/embriyoları üzerinde çalışmalar yapılamamaktadır. Dolayısı ile embriyo gelişim sürecindeki temel bilgilerimizi arttırabilmek üzere fare gibi deneysel modeller üzerinde çalışmalar yapılması elzemdir.

Bu tezin amacı, tüp bebek uygulamalarında *in vitro* ortamda takip edilen zigot ile 2h, 4h ve 8h embriyoların embriyonik gelişim sürecinde, pH_i düzenleyicilerinden olan HCO_3^-/Cl^- değiştirici aktivitesinin ve değişim paterninin fare modelinde incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oogenez

Gonadlardaki dişi germ hücrelerinin gelişerek olgun hale gelmesi sürecine **oogenez** denir. Gamet de denilen dişi germ hücresi olan oosit (yumurta), oogoniumdan gelişir. Fötal yaşamın erken dönemlerinde primer germ hücreleri mitoz ile çoğalarak oogonium denilen dişi ana germ hücresini yapar. Bu, oogoniumların tümü DNA' larını kopyalayarak birinci mayoz bölünmeye başlayacak olan primer oositlere gelişir, ancak bölünmeyi tamamlayamazlar. Bu aşamadaki oositin mikroskobik görüntüsünde hücre ortasında bariz bir germinal vezikül (GV) vardır. Buna göre doğumdaki tüm germ hücreleri 46 kromozom içeren primer oositlerdir ve kromozomlarının her biri iki kardeş kromatidlidir. Hücreler mayotik durgunluk evresindedirler [5, 33, 34].

Bu durum puberteye, overlerdeki yenilenen aktivitelerin başlangıcına kadar sürer. Puberte ile birlikte her ay pek çok primer oosit büyümeye başlar, ancak genellikle bunlardan yalnızca bir tanesi gerçek olgunluğa erişerek ilk mayotik bölünmeyi gerçekleştirir. Böylece mayotik matürasyon aşamalarından geçecek olan oositte önce GV yıkılır; bu aşamadaki oosit Mayotik metafaz I (MI) aşamasındadır ve mikroskop altında GV görünmez, sitoplazmasında homojen bir görüntü vardır. Gelişimini sürdüren oosit birinci mayotik bölünmeye uğrayarak sekonder oosit adını alır. Bu bölünme ile her kardeş hücre, her biri iki kromatidli 23 kromozom alır. Ancak bu bölünmede, iki kardeş hücreden biri olan sekonder oosit sitoplazmanın tümünü korur, bu oosit Mayotik metafaz II aşamasındadır. Birinci polar cisim denilen diğeri çok küçüktür ve sekonder oosite yapışıktır (Şekil 2.1.A). Böylece sekonder oosit, kromozomların yarısını, fakat besinden zengin sitoplazmanın hemen hemen tümünü alır [33, 34].

İkinci mayotik bölünme, ovülasyondan sonra tuba uterinadaki sekonder oosit, fertilize olursa gerçekleşir ve bu bölünme sonucunda her bir kardeş hücre, her biri tek kromatidli 23 kromozom alır. Bu durumda da kardeş hücrelerden biri sitoplazmanın tamamına yakınını korurken, ikinci polar cisim denilen diğeri küçük ve fonksiyonsuzdur. Özetle, oogenezin net sonucu her primer oositten sadece bir olgun oosit meydana gelmesidir. Fertilizasyon sonucu gelişen zigotta ise 20-22. saatte

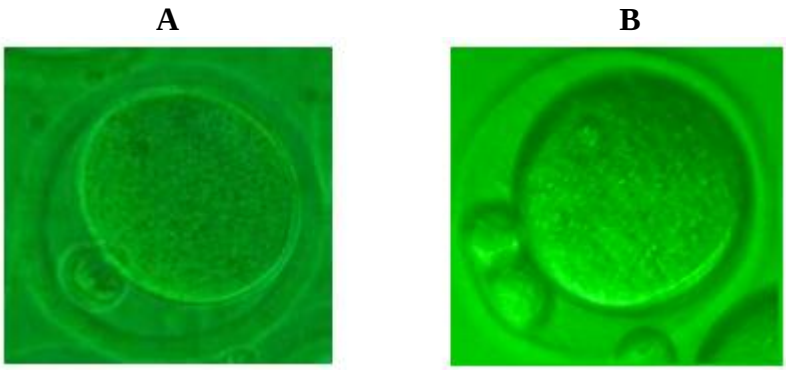
pronükleuslar oluşarak zigotun merkezine doğru hareket ederler; böylece yeni bireyin genetik materyali oluşturulur.

Böylece, dişi ana germ hücresi olan oogoniumdan olgun bir oositin ortaya çıkma süreci olan oogenez tamamlanmış olur. Olgun oosit, 80-100 μm çapında büyük ve hareketsiz bir hücredir. Sitoplazması besin maddelerinden zengindir. Fertilizasyondan sonra uterusa yerleşene kadar embriyoya gerekli olan maddeleri sağlar. Fertilize olmamış oosit, ovülasyondan 24-48 saat sonra canlılığını kaybederek yok olur [17].

2.2. Fertilizasyon

Ejekülasyonla vajinaya boşalan yüz milyonlarca spermden onlarcası, saatler içinde fallop kanallarının ampulla bölgesine ulaşır. Burada bekleyen oosit (Şekil 2.1. A), tekbir sperm tarafından fertilize edilir. Spermin ovuma girebilmesi için öncelikle, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarını tamamlaması; böylece ovumun çevresinde yer alan çok katlı granüloza hücrelerinin oluşturduğu korona radyata tabakasını penetre etmesi, daha sonra oositi çevreleyen zona pellisudaya bağlanması ve bu tabakayı kat etmesi zorunludur. Sperm oosite girdikten sonra, oosit zigotu oluşturmak üzere ikinci mayotik bölünmeyi gerçekleştirir ve sekonder polar cismi atar (Şekil 2.1.B).

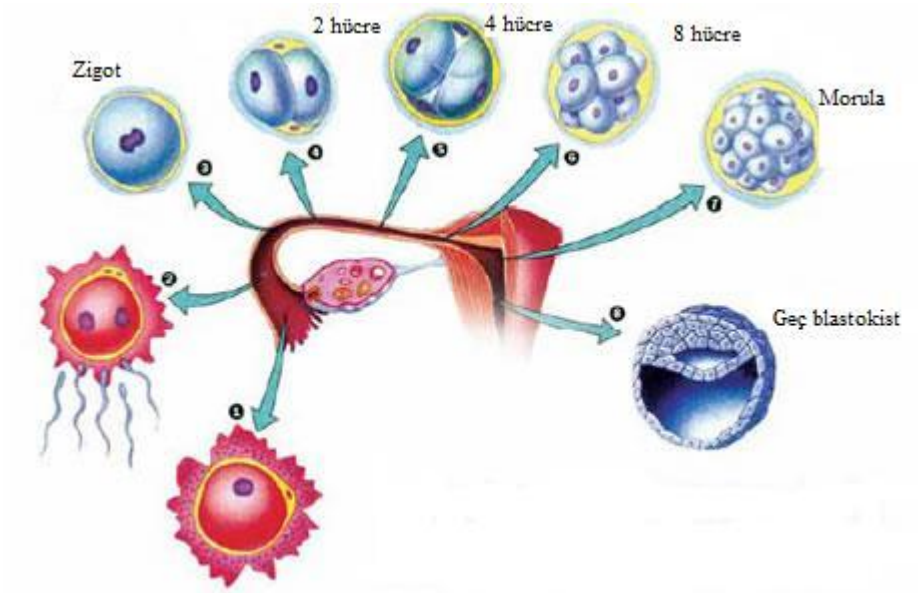
Daha sonra erkek pronükleusun 23 eşleşmemiş kromozomu ile dişi pronükleusun 23 eşleşmemiş kromozomu bir araya gelerek, fertilize oositin (zigot) birbirini bütünleyen 46 kromozomunu oluştururlar [35].



Şekil 2.1. Mayotik metafaz II aşamasındaki oosit **(A)**, fertilize olmuş, ikinci polar cismini atmış ve pronükleusları belirgin hale gelmiş zigot **(B)** örnek fotoğrafları.

2.3. Embriyogenez

Embriyonik gelişim (embriyogenez), spermin oositi fertilize etmesi ile başlar. Fare gibi iç döllenme gösteren canlıların önemli bir özelliği erken embriyonik gelişimin, dış döllenme gösteren (deniz kestanesi, kurbağa gibi) canlılara göre çok daha yavaş gerçekleşmesidir. Dış döllenme gösteren canlılarda fertilizasyondan sonraki 24 saatte, farklı doku tabakalarına organize olan 60.000' den fazla hücre bulunmasına karşın, fare embriyosu halen iki hücre aşamasındadır. Bu süreçte embriyolar ovidukt boyunca uterusa hareket ederken, büyüklüğünde herhangi bir artış olmaksızın, bölünmeler yavaş bir şekilde devam eder (Şekil 2.2). Fertilizasyondan 4-5 gün sonra uterusa ancak ulaşır. Bu yavaş gelişim uterusun embriyoyu kabul etmesi, yani implantasyona hazır hale gelmesi için gerekli zamanı tanır [36].



Şekil 2.2. Ovüle olan MII aşamasındaki oositin ampullada fertilize olarak başlayan embriyogenez aşamaları. Zigot, oviduktan uterusa doğru ilerlerken, büyüklüğünde herhangi bir artış olmaksızın, gelişimine devam eder ve blastokist aşamasında uterusa implante olur.

Embriyogenezis süreci, erkek ve dişiye ait 23' er kromozomun (pronükleuslar) birleşerek zigotun genetik materyalini meydana getirmesiyle başlar (Şekil 2.3-A). Bu aşamada zigotun etrafı glikoprotein yapıdaki zona pellisuda olarak adlandırılan membran ile kaplıdır. Zigot üzerinde derin bir yarık oluşur, bu yarık derinleşerek zigot

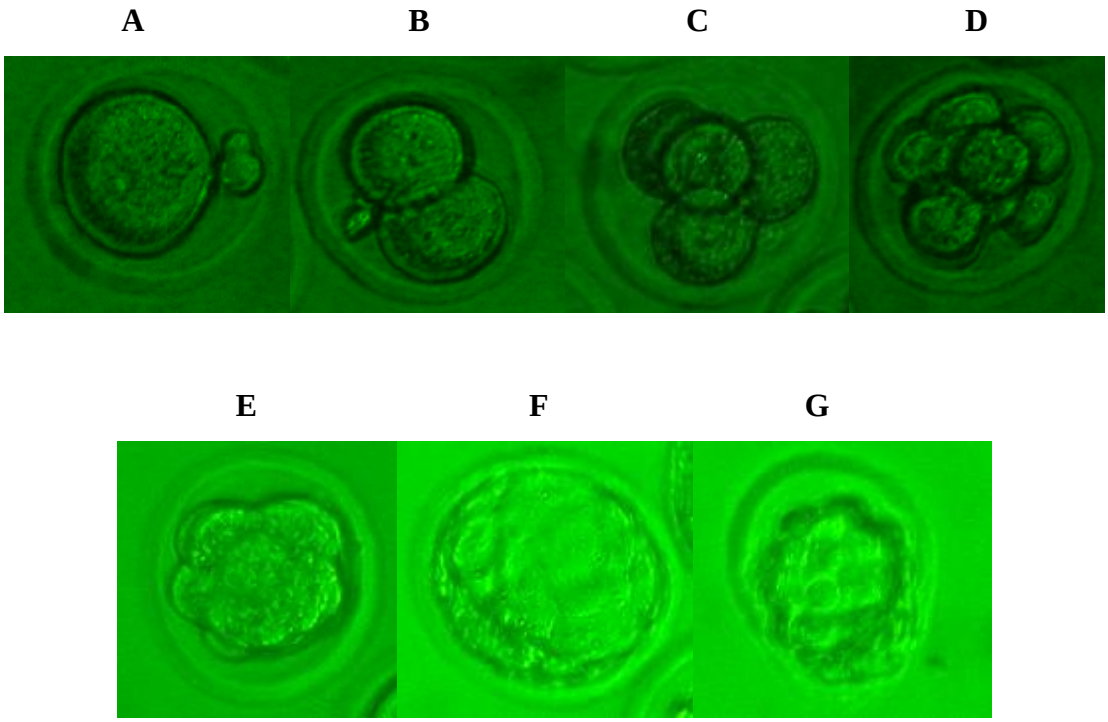
ikiye bölünür. Böylece iki blastomerli embriyo meydana gelir (Şekil 2.3-B). Zigotun blastomerlere bölünmesi, fertilizasyondan 30 saat sonra başlar.

Embriyo tuba boyunca ilerlerken blastomerler aktif DNA sentezi yapar. Bununla birlikte yeni sitoplazma sentez edilemez, yalnızca hücre sayısında artış vardır. Sonuçta blastomerlerin büyüklüğü yavaş yavaş azalır. Sadece ilk üç yarıklanma hemen hemen eş zamanlı gerçekleşirken daha sonraki yarıklanmalar eş zamanlı olmaz. Sayı arttıkça, blastomerler birbirlerine karşı sıkıca bir araya gelerek düzenlenir ve şekil değiştirirler. Buna kompaktlaşma denir.

Fare embriyosu ile yapılan çalışmalar protein sentezinde 1. gün (2 hücreli) ve 2. gün (4-8 hücreli evrelerinde, Şekil 2.3-C ve D) majör değişikliklerin olduğunu göstermiştir. Ayrıca fare embriyo kültüründe yapılan araştırmalarda, fare oositi ve zigotunda pirüvata mutlak gereksinim duyulurken, glukozun sekiz hücreli embriyo ve sonraki aşamalar için gerektiği gösterilmiştir. Kompaktlaşma ile protein sentezi artacağı için, enerji ihtiyacı da artar. Glukoz, nükleik asit, fosfolipid ve non-esansiyel aminoasit biyosentezi için pentoz sağlayan kaynaktır. Embriyonun blastokist aşamasında anaerobik glikoliz için önemli bir kapasitesi vardır ve bu özellik embriyoyu implantasyon zamanında karşılaşacağı anaerobik ortama hazırlar [37].

Kompaktlaşmadaki en önemli olay 2 ayrı hücre grubunun ortaya çıkışıdır. Dış kısımla temas halinde olan blastomerler trofektodermal dizilimi; embriyo içinde kalanlarsa iç hücre kitlesini oluştururlar. İç hücre kitlesi embriyoyu, trofektoderm hücreleri ise uterus duvarı ile ilk teması ve infiltrasyonu sağlayıp, plasenta ve ekstra embriyonik yapılara katılacaklardır.

Fertilizasyondan sonraki 4. gün, embriyo 16-20 hücreden oluşup morula olarak adlandırılır (Şekil 2.3-E). Bu dönemde fertilize olmuş yumurta uterus kavitesine girer. Uterusa ulaşmasının ilk günü, zona pellisuda uterus sekresyonları tarafından eritilir ve morulanın merkez hücreleri ile çevre hücreleri arasındaki boşluk sıvı ile dolar. Beşinci günün sonunda blastokist oluşur (Şekil 2.3-F). Kabukta yer alan düzleşmiş hücreler trofoblast, merkezdeki yuvarlak hücreler ise embriyoblast adını alırlar. Trofoblast plasentayı, embriyoblast embriyoyu oluşturur. Fertilizasyondan 5 gün sonra, zona pellisuda eritilir (hatching) (Şekil 2.3-G), blastokist uterus bezlerinden salgılanan sekresyonlarla beslenerek genişler ve 6. gün endometrium içine implante olmaya başlar [37].



Şekil 2.3. PN zigot **(A)**, 2h **(B)**, 4h **(C)**, 8h **(D),** morula **(E)**, blastokist **(F)** aşamasındaki embriyolar ile blastokistin zonasından ayrılmasını **(G)** gösteren embriyoların örnek fotoğrafları.

2.4. Fare Modeli ve Önemi

Fare üreme araştırmalarında oosit elde etme, implantasyon öncesi embriyo gelişimlerinin incelenmesinde en yaygın kullanılan modeldir. Bu çalışmalar ile oosit veya embriyolara potansiyel olarak toksik materyallerin etkisi, değişik üreme tekniklerinin ve infertilite tedavi programlarının test edilmesi mümkün olabilmektedir.

Fare oositinin gelişimi ve düzenleyici mekanizmaları insan oositi ile büyük benzerlikler göstermektedir [2, 29, 38, 39]. Yavru farelerin ilk 21 günlük gelişimi sürecinde izlenen oositlerin büyüme gelişme dönemi, insandaki primer oositten sekonder oosite kadar olan döneme benzerdir [14, 40, 41]. Ayrıca ovülasyon öncesi ve sonrası dönem oositlerin gelişim özelliklerinin [2, 29, 38, 42], hücre içi pH düzenleyicileri gibi homeostatik mekanizmaların aydınlatılması [15, 19, 26] *in vitro* insan oosit matürasyonu ve embriyo kültür çalışmaları için yol gösterici olmaktadır. Diğer ilerlemeler ile birlikte bu bilgilerin ışığında, son on yıl içinde yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen başarı yüzdesinde önemli artışlar sağlanmıştır.

2.5. Solüsyonlar

In vitro zigot ve embriyo kültürü için kullanılan medyum içerikleri *in vivo* ortamı mümkün olduğunca yansıtma esasına dayanmaktadır. Günümüze kadar çok değişik medyumlar tanımlanmışken hemen tümünün içeriğinde değişik oranlarda NaCl, KCl, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, laktat, pirüvat, glukoz, glutamin, EDTA, sığır serum albumini (BSA) ve antibiyotikler bulunmaktadır. Medyumlardaki belirtilen içeriklerden NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$ elektrolit ve osmotik dengeyi sağlarken, KH_2PO_4, $NaHCO_3$ tampon olarak kullanılmaktadır. Laktat, pirüvat, glukoz enerji substratları, glutamin ise organik osmolit olarak işlev görmektedir. EDTA ağır metal kontaminasyonuna karşı, BSA ise zigot ve embriyoların zemine veya birbirlerine yapışmalarını önlemek için medyumlara eklenmektedir. Bu medyum oluşturma prensipleri çerçevesinde birçok medyum tanımlanmıştır: CZB, M16, MTF, START, BMOC, SOM ve KSOM gibi. Günümüzde yaygın olarak kullanılan medyumlardan biri, NaCl ve KCl konsantrasyonları biraz daha yüksek olarak oluşturulmuş " K^+ simplex optimized medium" (KSOM) dur[43, 44].

KSOM medyumu, esas olarak HCO_3^- tamponu içerdiği için, oosit/embriyo gelişimi için yüksek CO_2 konsantrasyonlu (%5) ortamlar gerekmektedir. Dolayısı ile CO_2' li inkübatörler kültür çalışmaları için uygundur. Bu medyum kullanılarak yapılan embriyo kültür çalışmalarında (%5 CO_2, 37 ºC' de) %70' i blastokist aşamasına gelebilmektedir. Ancak bu medyum, normal atmosfer ortamında yapılacak uzun süreli çalışmalar için uygun değildir. *In vitro* ortamda zigot ve embriyo toplama işleminde, normal atmosfer şartlarında pH'ı stabil kalabilen bir medium gerekmektedir. HEPES tamponu eklenmesi ve buna karşılık HCO_3^-'ın azaltılması ile KSOM medyumunun bir modifikasyonu olan " flash and holding medium" (KFHM) oluşturulmuştur [44]. HEPES canlı sistemlerin kullandığı tampon sistemlerinden olmadığı için, uzun süreli kültürlerde KFHM kullanılması uygun değildir.

Zigot ve embriyo toplama ve kültür çalışmalarında belirtilen solüsyonlar kullanılabilirken, çalışmamızda yaptığımız pH_i kayıtları için de KSOM esaslı solüsyonlar oluşturuldu. H^+/laktat değiştiricisinin pH_i' a etkisini azaltmak için laktat azaltılmış solüsyonlar oluşturulabilmekte [45] ve bu kullanım amacı nedeniyle pHKSOM olarak tanımlanmaktadır [46].

Alkaloz indüksiyonu için pHKSOM solüsyonuna NH_4^+ eklenmektedir. NH_4^+, solüsyonda $NH_3 + H^+$ olarak ayrışmakta, NH_3 hücre zarlarını kolaylıkla geçerek hücre içine girmektedir. Hücre içine giren NH_3 hücre içindeki H^+ iyonlarını bağlayarak alkaloz oluşturmaktadır. Böylece indüklenen alkalozu iyileştirmek için gerekli savunma mekanizmaları incelenebilmektedir [46].

2.6. Hücre içi İyon Ölçüm Yöntemleri

Hücre içi iyon ölçümü için belli başlı 2 yöntem bulunmakta olup bunlar:

1. İyon sensitif mikroelektrodlar ile potansiyometrik,
2. Floresan indikatörleri ile kimyasal ölçüm (Spektrofluorometrik) yöntemleridir.

Uygulanabilirliğinin kolaylığı, duyarlığının yüksek olması, hızlı cevap verebilirliği, çok küçük çapta ve değişik hücrelerde ölçümlerin gerçekleştirilebilirliği, floresan indikatör yöntemini ön plana çıkarmaktadır. Bu yöntem ile kullanılan floresan indikatöre göre hücre içi değişik iyon (H^+, Ca^{2+}, Na^+, K^+, Cl^-, Mg^{2+}, Zn^{2+}) konsantrasyonlarının saptanması mümkün olmaktadır. Bunun yanı sıra mikroelektrodlar ile potansiyometrik ölçüm yönteminde de hücre içi iyonların ölçümü mümkün ise de yavaş ve yerel değişimlere yanıt verebilmesi, ancak büyük boyuttaki hücrelerde kullanılabilirliği ve kalibrasyonunun güçlüğü nedeniyle bu yöntem kısıtlı modellerde kullanılabilmektedir. Bu tez çalışmasında hücre içi iyon ölçümü floresan indikatör yöntemi ile gerçekleştirildiği için yöntem ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

2.6.1. Spektrofluorometrik Yöntem ile Hücre içi İyon Ölçümü

Hedeflenen hücre içi iyon için özgün bir floresan prob ile spektrofluorometrik olarak hücre içi iyon seviyeleri ölçülebilmektedir. Bu yöntem ile en sıklıkla hücre içi Ca^{2+} ve pH ölçülmektedir. İki tip ölçüm yapılabilmektedir:

1. Hücre içi iyon seviyelerinin statik ölçümünde küvet tipi spektrofluorometre bu amaç için yeterli olmaktadır.
2. Hücre içi dinamik iyon değişimleri için bilgisayar kontrollü ve mikroskoba adapte edilebilen spektrofluorometre (mikrospekrofluorometrik yöntem) gerekmektedir.

Amaçlanan ister statik ister dinamik hücre içi iyon seviyelerinin araştırılması olsun, hücrelere iyona hassas floresan özellikte bir prob (florofor) yüklenmesi gerekmektedir.

2.6.1.1. Floroforlar ve Özellikleri

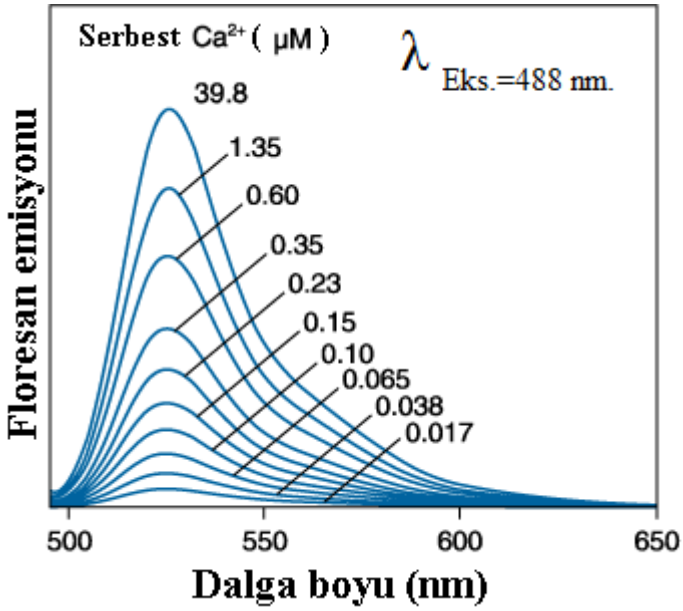
Floroforlar, özgün oldukları iyona bağlandıklarında floresan özelliklerinde değişiklik olan maddelerdir. Bu değişen floresan özelliklerine göre floroforlar da sınıflara ayrılmaktadır:

2.6.1.1.1. Orantısal olmayan (non-ratiometric) floroforlar

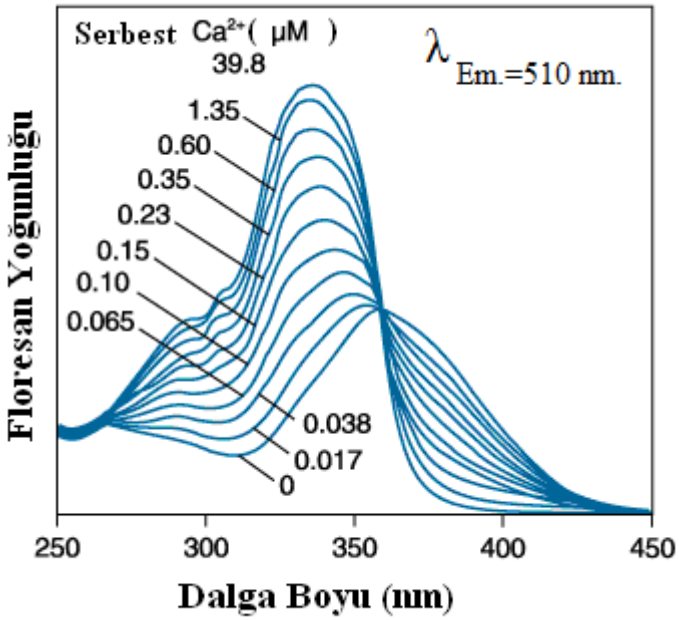
Özgün iyona bağlandıklarında bağlanma düzeyine göre floresan ışığında artma veya azalma olan floroforlardır. Dezavantajları, hücre içi floroforun hücre dışına sızması, optik yol ile hücreler arasına bir engelin girmesi durumlarında ortaya çıkan artifisyel değişimler, yapılan ölçümlerin doğruluğunu olumsuz olarak etkilemesidir. Bu tip floroforlara örnek olarak, Ca^{2+}'a hassas olan Fluo-3 verilebilir (Şekil 2.4).

2.6.1.1.2. Orantısal (ratiometric) floroforlar

Bu tip floroforlar özgün iyona bağlandıklarında eksitasyon veya emisyon spektrumunda kayma gerçekleşir. Serbest ve spesifik iyona bağlı florofor formları emisyon ışımalarının, pik yaptığı dalga boyları birbirine oranlanarak iyon seviyeleri hakkında bilgi elde edilir. Bu yaklaşım ile orantısal olmayan floroforlardaki dezavantajlar ortadan kaldırılmakta, dolayısı ile daha güvenilir kayıtlar yapılması olanaklı olmaktadır. Bu sınıftaki floroforlara örnek olarak, Ca^{2+} hassas Fura-2 (Şekil 2.5), pH'a hassas BCECF (Şekil 2.7) verilebilir.



Şekil 2.4. Orantısal olmayan florofor Fluo-3'ün 488 nm dalga boyunda uyarılması ile kayıtlanan emisyon spektrumu.



Şekil 2.5. Ca^{2+}'a hassas Fura-2 floroforunun 510 nm dalga boyunda toplanan floresan kayıtlarının eksitasyon spektrumu.

2.6.1.2. Hücrelere Florofor Yükleme Yöntemleri

Hücre içi iyon ölçümünün yapılabilmesi için kullanılacak floroforun hücre içine yüklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmekle birlikte sıklıkla kullanılanlar mikroinjeksiyon ile direkt yükleme ve floroforun asetometil ester formu (AM formu) ile basit şekilde inkübe etmedir[46].

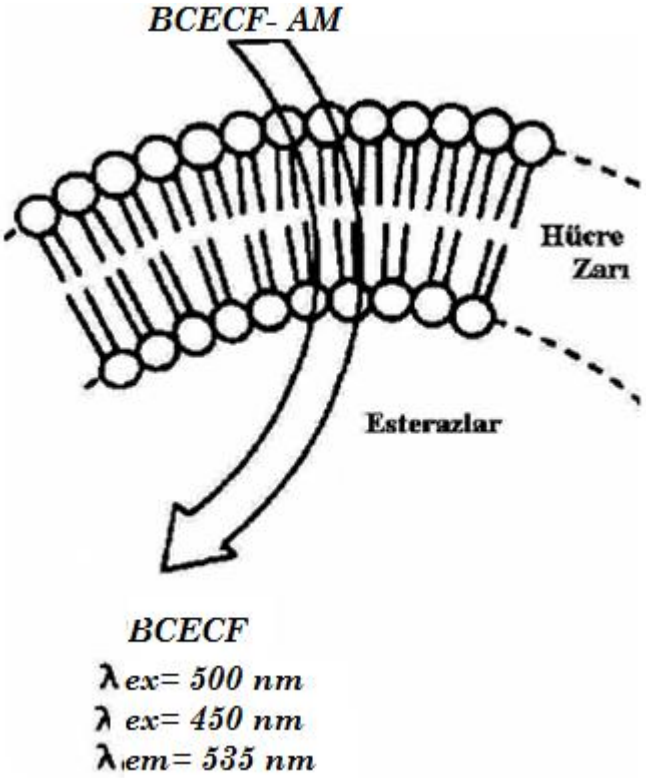
2.6.1.2.1. Mikroinjeksiyon yöntemi

Bu yöntemde her bir hücreye mikropipetler ile girilerek uygun dozda florofor yüklemesi yapılmaktadır. Bu yöntem için mikro/nanoinjektörler, uygun çaplarda hazırlanmış mikropipetler ve tecrübe gerekmektedir. Aynı zamanda her bir hücre için işlemin ayrı ayrı yapılması gerektiğinden uzun zaman alabilmektedir. Diğer bir dezavantajı ise invaziv bir yöntem olduğu için hücreyi zedeleme ihtimalidir. Ancak bazı durumlarda (folikül içindeki oositin yüklenmesi, vitellin zar ile çevrili kurbağa yumurtasının yüklenmesi gibi) tek yükleme yolu olmaktadır.

2.6.1.2.2. AM ester formları ile yükleme yöntemi

Hemen tüm floroforların, moleküllerinin içinde bazı hidrofilik gruplar, karboksilatlar vardır. Dolayısı ile floforların yüksek su çözünürlüğü, hücre zarlarından geçmesi için uygun değildir, çünkü lipid hücre zarı hidrofobiktir. AM ester formları ile bu floroforların hidrofilik grupları maskelenmekte, lipofilik hale dönüştürülerek hücre içine girmeleri sağlanmaktadır. Hücre içine giren floroforların asetometil esterleri, hücre içinde bulunan özgün olmayan esterazlar ile hidroliz edilir. Böylece tekrar hidrofilik hale gelen florofor, hücre içine hapsolur (Şekil 2.6). Bu yöntem ile floroforlar hücreler ile basit şekilde inkübe edilerek hücre içinde birikmeleri sağlanır. Dolayısı ile bu yöntem invaziv olmayan, özel cihaz gerektirmeyen, pratik bir yöntemdir. Çalışmamızda fare zigot ve embriyolarına florofor yüklenmesi bu yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

Sık olarak kullanılan floroforlar hücre içi Ca^{2+} ve pH ölçümü için kullanılmaktadır. Ancak çalışmamız pH_i kaydı üzerine olduğundan sadece pH' a hassas floroforların özellikleri ayrıntılı olarak verilecektir.



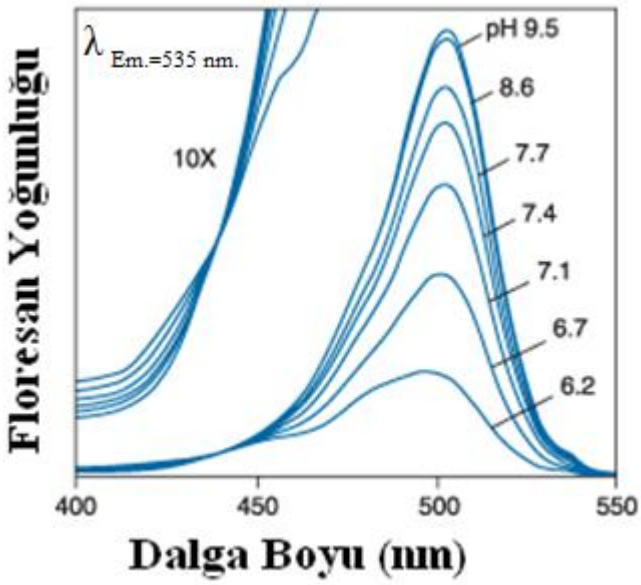
Şekil 2.6. BCECF-AM ester formundaki floroforun AM metodu ile hücreye yüklenmesi.

2.6.1.3. pH' a Hassas Floroforlar

Fizyolojik aralıkta pH değişikliklerine duyarlı çok sayıda floresan indikatörler mevcuttur. Bunlardan başlıcaları şunlardır.

2.6.1.3.1. BCECF (2,7 bis Karboksietil 5-6 karboksi florosin)

pH 7.0 civarındaki değişimlere hassas olarak geliştirilen ilk florofordur. BCECF, 530 nm' de sabit emisyon kaydı yapılırken, 450 nm' de uyarıldığında pH' a hassas olmayan yanıt verir; 500 nm' de uyarıldığında ise artan pH' ya bağlı olarak emisyon ışığında artış olur (Şekil 2.7). Dolayısı ile 450 ve 500 nm' lerde uyarılması ile elde edilen emisyon yanıtlarının oranı (500/450), pH' ya oranlı olarak değişmektedir. Şekil 2.7' de de görüldüğü gibi, BCECF asit sınırlardaki çalışmalar için tercih edilmesi gereken florofordur.

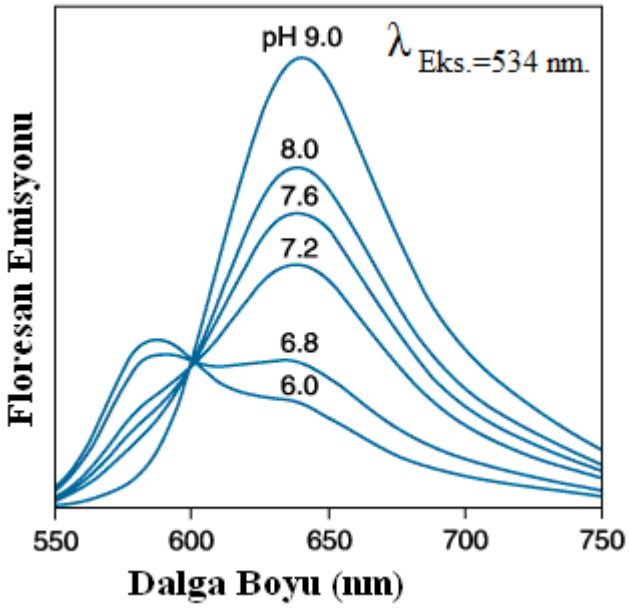


Şekil 2.7. BCECF' in 535 nm emisyonu dalga boyunda gerçekleştirilmiş eksitasyon spektrumu.

2.6.1.3.2. Karboksi SNARF-1 (karboxy-seminaphthorhodafluor-1)

Karboksi SNARF-1, 535 nm' de uyarıldığında, emisyonları 600 ve 640 nm olmak üzere çift dalga boyunda toplanmaktadır. Bu durumda, 600 nm pH' a hassas olmayan, 640 nm ise pH' a hassas dalga boyudur (Şekil 2.8). Dolayısı ile 640/600 oranı, pH artıkça artan bir değişim göstermektedir. SNARF-1 ise alkali sınırlardaki çalışmalar için tercih edilmesi gereken florofordur.

PN zigot ve tüm embriyonik aşamaların eş zamanlı olarak kayıtlanması kamera ile mümkün olmaktadır. BCECF ile pH_i kayıtlarında, emisyon saptayıcı olarak tek bir kameranın yeterli olması ve kayıt sistemimizde de tek kameranın bulunması nedeniyle alkali sınırlarda çalışılmasına rağmen bu teknik kısıtlılık nedeniyle, florofor olarak BCECF kullanılmıştır.



Şekil 2.8. SNARF-1' in 534 nm' de uyarılması ile kayıtlanan emisyon spektrumu.

2.6.2. Mikrospektrofluorometrik Hücre İçi İyon Ölçüm Yöntemi

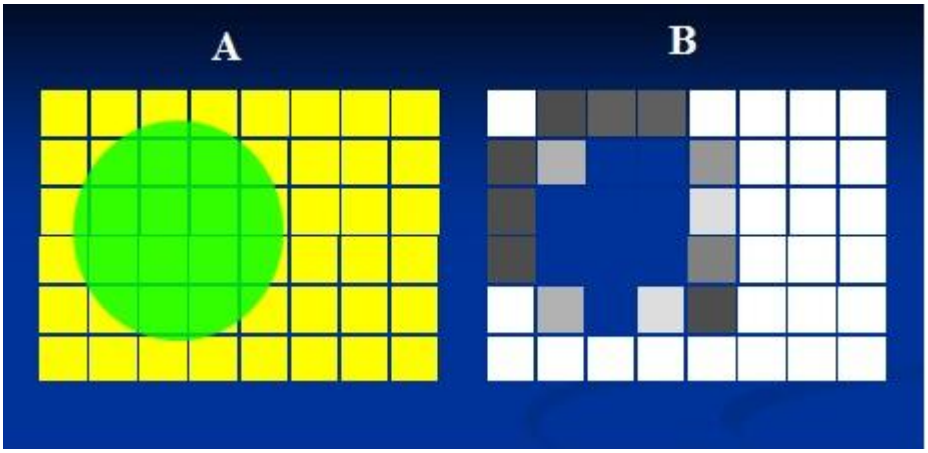
Dinamik hücre içi iyon ölçümleri için mikrospektrofluorometrik yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde Xenon lamba ile sağlanan uyarıcı ışık, bir fiber optik kablo ile uygun filtrelerden geçirilerek mikroskoptaki biyolojik materyale aktarılmaktadır. Uyarılan materyalden gelen emisyon ışımaları ise ışık saptayıcı sistemler ile toplanmaktadır. Bu ışık saptayıcıları şunlardır:

2.6.2.1. Işık Çoğaltıcı Tüp (Photo Multiplier Tube, PMT)

Geniş spektrumlu olan PMT' ler oldukça düşük ışık seviyelerine dahi hassastır. PMT, geniş bir dinamik sınıra sahiptir, böylece ışığın yüksek seviyelerini de ölçebilir. Ayrıca PMT' ler oldukça hızlıdır, dolayısı ile hızlı spektral olaylar güvenli bir biçimde kayıtlanabilir. Ancak uzaysal çözümlemesi olmaması gibi bir dezavantajı da vardır.

2.6.2.2. Kamera (Imaging, görüntüleme sistemi)

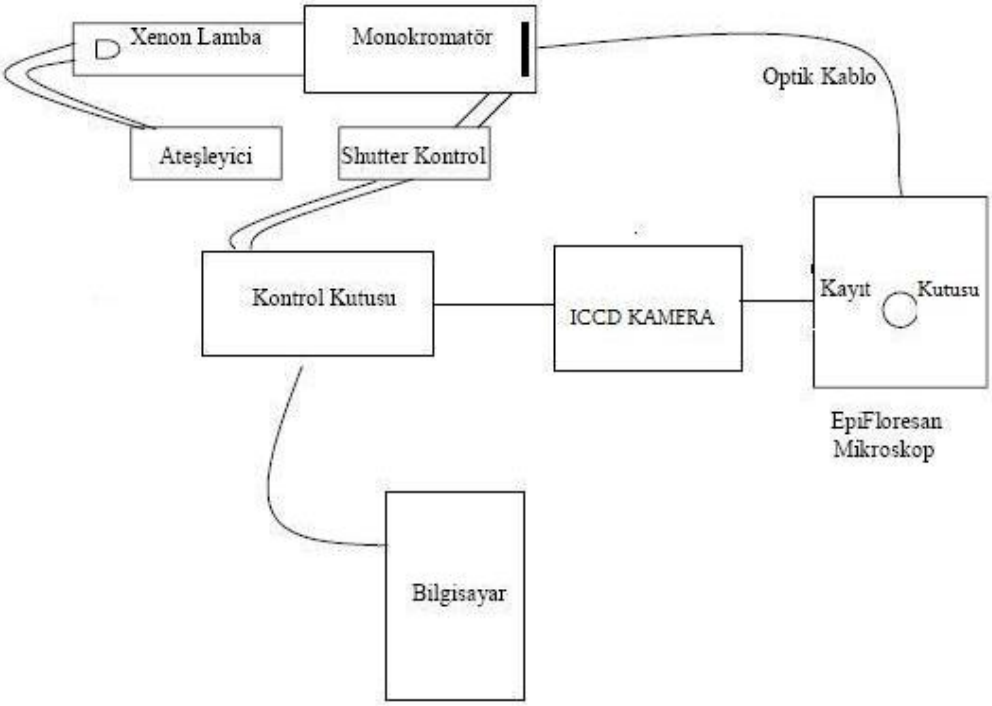
Piksellerden meydana gelen ışık algılayıcılarından oluşmaktadır (Şekil 2.9.A). Daha yüksek ışık şiddeti gerektirmesi, yavaş olması, nispeten dar spektruma hassas olması dezavantajları iken uzaysal çözümlemesi önemli bir avantajıdır (Şekil 2.9.B).



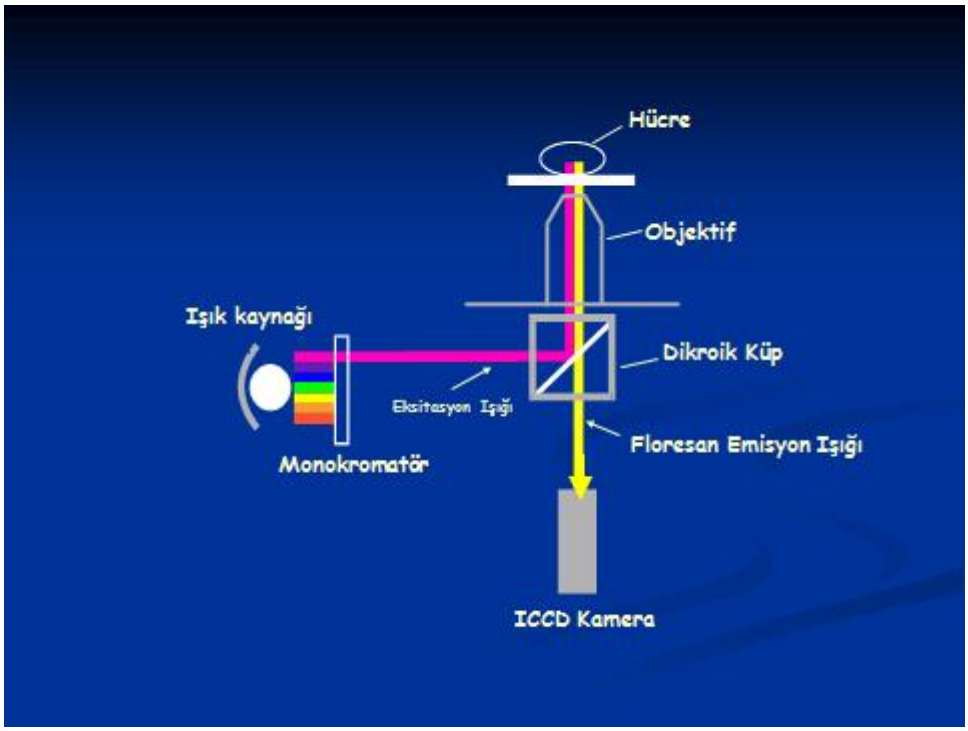
Şekil 2.9. Kameraya ait piksellerden meydana gelen ışık algılayıcıları ve üzerine düşen ışık ile ortaya çıkan görüntü şematizasyonu. Bu sayede kamera ile uzaysal çözümleme yapılabilmektedir.

ICCD Kamera kullanılarak yapılan çalışmamızdaki mikrospektrofluorometrik tekniğin şematik sunumu Şekil 2.10' da verilmiştir. Xenon lamba ile uyarıcı ışık oluşturulmakta, bu ışığın önündeki monokromatör ile ışık istenen dalga boyunda fiber optik kablo ile mikroskobun kayıt odacığındaki biyolojik materyale aktarılmaktadır. Materyalin 450 nm ve 500 nm' lerde uyarılması ile elde edilen emisyon ışığı ise, dikroik bir küp aracılığı ile ICCD kamera' ya yönlendirilmektedir (Şekil 2.10 ve 2.11).

Böylece ICCD kamera' ya yönlendirilen emisyonışığı da bir kontrol kutusu aracılığı ile bilgisayara aktarılmaktadır. Toplanan bu bilgiler özel tasarlanmış bir software ile işlenmektedir.



Şekil 2.10. pH_i kayıtlarının alındığı ve emisyon ışığının saptayıcısı olarak ICCD kameranın kullanıldığı mikrospektrofluorometrik kayıt sisteminin şeması.



Şekil 2.11. Mikrospektrofluorometrik kayıt sisteminin çalışma ilkesi.

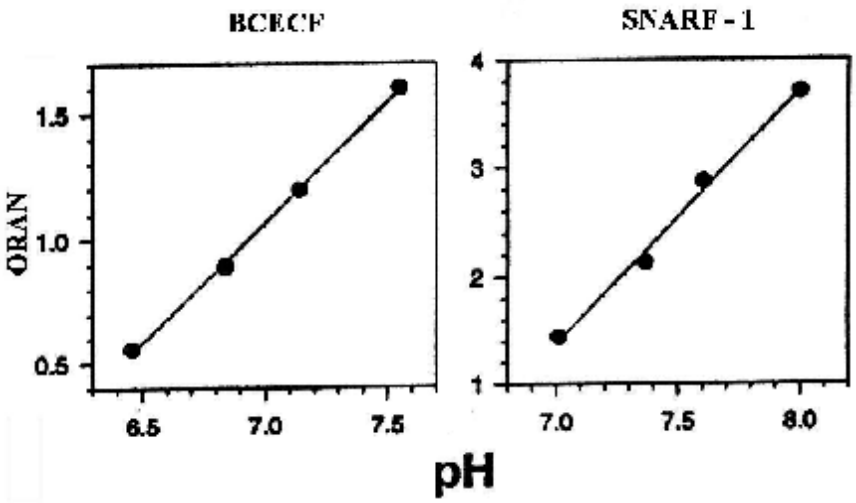
2.7. Mikrospektrofluorometre ile pH_i Kaydı

pH_i ve bunun düzenlenmesi en temel homeostatik hücresel mekanizmalardan biridir. Dolayısı ile bu parametrenin incelenmesi, temel hücresel düzenleyici mekanizmalar için önemli bilgiler verebilmektedir. Özellikle zigot ve embriyo gibi modellerde, pH_i'nin gelişimsel değişimleri önemli bir araştırma alanı olmaktadır.

pH_i kaydı için, öncelikle öngörülen pH aralıklarına uygun pH'a hassas bir florofor seçilmelidir. Uygun şekilde florofor ile yüklenen biyolojik materyal, mikroskopdaki kayıt odacığına yerleştirilir ve eksitasyon ışığı biyolojik materyale uygulanır. Bu BCECF için 450 ve 500 nm'lerde olmak üzere farklı iki dalga boyunda eksitasyon ışıkları ile sağlanır ve bu uyarılar ile elde edilen emisyon yanıtlarının oranı alınarak, oransal bir kayıt yapılır.

Saptanan bu oran pH değerlerine, nigerisin / yüksek K^+ ve valinomisin metoduna göre *in situ* olarak çevrilebilir. Bu metod, K^+/H^+ değiştiricisinin nigerisin etkisi ile plazma membranının iki tarafındaki bu iki iyon gradiyentini eşitlemesi ilkesine dayanmaktadır. Bu değiştirici etkisi ile hücre içi ve dışı K^+ yoğunlukları eşitlendiği zaman pH_i, dış ortam pH'ı ile aynı değere ulaşacaktır. K^+ gradiyentinin ortadan kaldırılması için hücre içindeki gibi dış ortamda da yüksek K^+ yoğunluğu oluşturulur. Embriyolarda belirlenmiş ortalama hücre içi K^+ yoğunluğu yaklaşık 100-125 mM'dür. Dolayısı ile dış ortam solüsyonunda da bu değerler uygun olmaktadır. K^+ gradiyentinin tamamen ortadan kalktığından emin olmak için de seçici K^+ ionoforu valinomisin, nigerisin/yüksek K^+'a ek olarak kullanılmaktadır [46].

Belirtilen nigerisin/yüksek K^+ ve valinomisin metodu ile oranların pH'ya çevrilmesi için öncelikle kalibrasyon solüsyonları oluşturulmaktadır. Bu solüsyonlar 100 mM KCl, 25 mM NaCl ve 21 mM HEPES içermekte ve pH'ları ise NaOH ile 37 ºC'de çalışılacak pH aralıklarına uygun olarak (örneğin pH 6,8-8,0) ayarlanır. Solüsyona osmotik denge için 75 mM sukroz da eklenir. Rutin olarak uygulanan valinomisin dozu 5 µg/ml, nigerisin dozu ise 10 µg/ml'dir. Genellikle ayarlanan 4 pH değerinde *in situ* olarak elde edilen oranlar, kalibrasyon eğrisi oluşturularak pH değerlerine çevrilebilmektedir. SNARF-1 ve BCECF için bu kalibrasyon eğrilerine örnekler Şekil 2.12'de verilmiştir.



Şekil 2.12. BCECF ve SNARF-1' in*in situ* kalibrasyonu ile çizilmiş kalibrasyon eğrileri (Baltz JM ve Phillips KP' den[46]).

2.8. Zigot ve Embriyolarda pH_i Düzenlenmesi

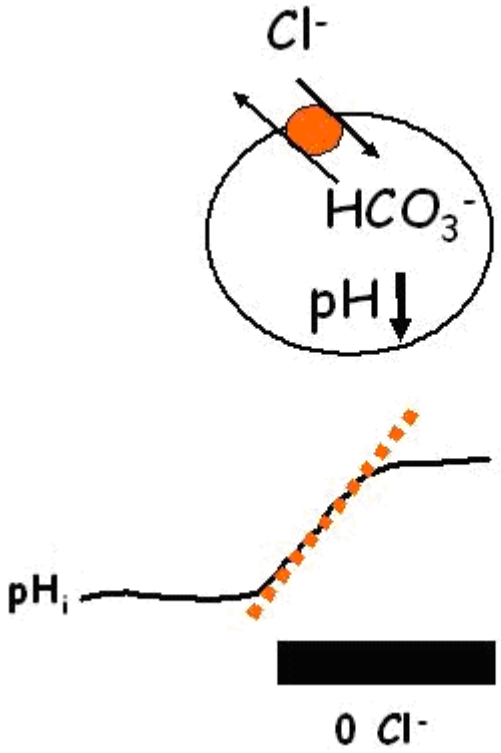
Zigot ve embriyoların değişen çevre koşullarından korunmak için geliştirdiği pH_i düzenlemesi gibi birçok mekanizması vardır. Hücre için hayati öneme sahip olan pH_i düzenlenmesinde, pH' y düşüren HCO_3^-/Cl^- değiştiricileri (anyon değiştiricileri, AE), ve pH_i arttıran Na^+/H^+ ile Na^+, HCO_3^-/Cl^- değiştiricileri (sırasıyla, NHE ve NBCE) rol oynamaktadır. AE, zayıf bir baz HCO_3^-'ı Cl^- ile değiştirir, böylece alkalozun düzeltilmesini sağlar. NHE, H^+' i Na^+ ile değiştirmek üzere hücre dışına verir, böylece asidozun düzeltilmesini sağlar. NBCE ise Na^+ ve HCO_3^-' ı hücre içine alırken Cl^-' u dışarı atar, böylece hücre içi HCO_3^- artışının sonucu pH_i arttırılır. Bu pH_i düzenleme mekanizmaları hücre içi pH değişimlerine hassas olup, pH_i değişimleri ile aktif hale gelirler.

2.9. AE Aktivitesi ve Hesabı

AE, pH_i' m belli bir değerin üzerine çıkması ile aktive olmaktadır. Bu ayar noktası pH_i'ın 7,30-7,40 olduğu değerlerdir. Ayar noktası hücrenin metabolik değişimleri ile değişebilmektedir [29]. AE aktivitesi DIDS gibi kimyasallarla inhibe edilmektedir. Dolayısı ile DIDS, AE varlığı veya fonksiyonunun teyidi için özgün bir inhibitör olarak yaygın kullanılmaktadır.

AE aktivitesi için hücre içinde HCO_3^-, hücre dışında ise Cl^- konsantrasyon farkının olması gereklidir. Hücre dışında yeterince Cl^- olmadığı zaman değiştirici ters

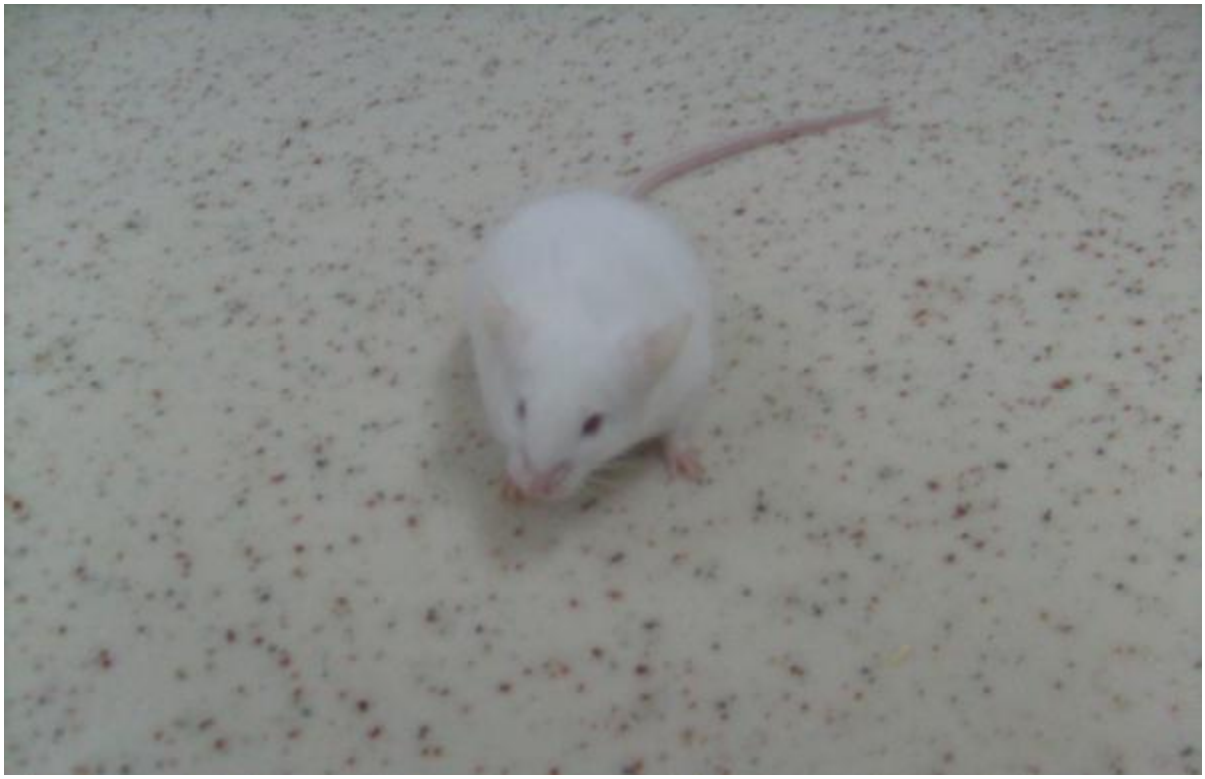
yönde çalışabilmekte, yani HCO_3^-'ı hücre içine alırken, Cl^-'u hücre dışına taşıyabilmektedir. Bunun sonucunda AE aktivitesi ile hücre içinde alkaloz gelişmektedir. Alkalozun oluşum hızı da AE aktivitesi hakkında bilgi vermektedir [46]. Alkalozun oluşum hızının linear regresyon eğrisi ile bu aktivite fonksiyonel olarak hesaplanabilmektedir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. AE' in hücre modelinde çalışma prensibi ve sonuç olarak gelişebilecek hücre içi alkalozu iyileştirmesi (üstte). Dış ortamdan Cl^-'un uzaklaştırılarak AE'ın ters yönde çalışması sonucu hücre içi alkalizasyon oluşturulabilir ve bu oluşma hızından linear regresyon aracılığıyla fonksiyonel olarak AE aktivitesi hesaplanabilir (altta).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, 112 Balb/c soyu dişi fare (6-8 haftalık) kullanıldı (Şekil 3.1). Fareler yetiştirildikleri laboratuvarda 12 saat aydınlık ve karanlık (17:00 - 05:00) döngüde tutuldu. Ortamın sıcaklığı (21±1 ºC) ve nemi (% 40-60) devamlı kontrol altında tutuldu. Tüm deneylerden önce hayvanlar kafeslerinde dörtlü gruplar halinde, istedikleri kadar yiyecek ve içecek alabilecekleri şekilde barındırıldı. Deneyde kullanılan bu farelerden superovülasyon protokolü uygulanarak elde edilen 451 zigot ve embriyodan kayıt alındı. Tüm deneysel uygulamalar, Ç.Ü. Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurul kararlarına uygun olarak yapıldı.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Balb/c soyu dişi farelerden biri.

3.1. Solüsyonlar

Çalışma için gerekli tüm solüsyonların hazırlanmasında yüksek kalitede ultra saf su kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm solüsyonlar KSOM esaslı olarak hazırlandı. Bu solüsyonun içeriği Tablo 3.1' de verilmiştir. Zigot ve embriyo kültürü bu solüsyonda yapılırken oosit eldesi işlemlerinde Hepes-KSOM (KFHM) kullanıldı; bu solüsyonda 21 mM HEPES bulunurken $NaHCO_3^-$ bu miktarda azaltıldı ve solüsyon pH'ı NaOH ile 7.40' a ayarlandı. Florofor yükleme ve pH_i ölçümleri için kullanılan solüsyonlarda H^+ / laktat değiştiricisinin etkisini azaltmak için [42] Na-laktat 9 mM azaltıldı (Na-laktat 1 mM' e düşürülürken NaCl 104 mM' e çıkarıldı) (Tablo 3.1). Ayrıca BSA bu solüsyonlara eklenmedi. Böylece florofor yükleme solüsyonu pHKFHM, dinlenim pH_i' ları kaydedilen solüsyon ise pHKSOM olarak tanımlandı. 0 Cl^- içeren pHKSOM solüsyonunda tüm Cl^- tuzları yerine glukonat tuzları kullanıldı. Alkaloz indüksiyonu için ise pHKSOM solüsyonuna 35 mM NH_4Cl eklendi (NaCl yoğunluğu 35 mM azaltılarak) ve solüsyon NH_4Cl-pHKSOM olarak tanımlandı. Bu şekilde hazırlanan solüsyonların uygunluğu, osmolarite kontrolleriyle yapıldı. Solüsyonların hazırlanmasında kullanılan cihazlar Şekil 3.2' te ve çalışmada kullanılan tüm solüsyonların ayrıntılı içeriği Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan solüsyonların ayrıntılı içeriği.

	KSOM+BSA (mM)	KFHM+BSA (mM)	pHKFHM (mM)	pHKSOM (mM)	O Cl^-pHKSOM (mM)	NH_4ClpHKSOM (mM)
NaCl	95	95	104	104	-	69
KCl	2.5	2.5	2.5	2.5	-	2.5
KH_2PO_4	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Na laktat	10	10	1	1	1	1
Glukoz	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Na pirüvat	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
$NaHCO_3$	25	4	4	25	25	25
Hepes	-	21	21	-	-	-
$CaCl_2$	1.7	1.7	1.7	1.7	-	1.7
Glutamine	1	1	1	1	1	1
EDTA (tetra Na)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
K penisilin G	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Streptomisin SO_4	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
NH_4Cl	-	-	-	-	-	35
Na glukonat	-	-	-	-	104	-
K glukonat	-	-	-	-	2.5	-
Ca $(glukonat)_2$	-	-	-	-	5.6	-
BSA	1 mg/ml	1 mg/ml	-	-	-	-



Şekil 3.2. Solüsyonların hazırlanmasında kullanılan cihazlar.

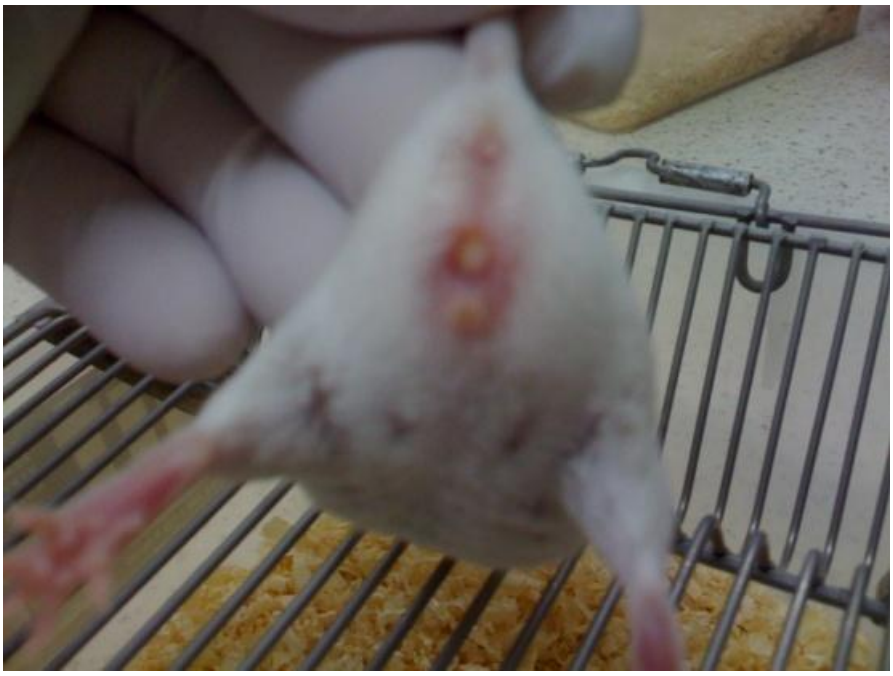
3.2. Kimyasal Maddeler

Solüsyonların hazırlanmasında gerekli tüm kimyasallar maddeler Sigma' dan sağlandı. BCECF (Sigma B8806), Valinomisin (Sigma V-0627) dimetil sulfoksidde, 4,4' - Diisocyanbatostilbene-2,2' -disulfonik asit disodyum tuzu (DIDS, Sigma D-3514) stok solüsyonu 0.1 M $KHCO_3$' da hazırlandı. Nigerisin ise (Sigma N-7143) etanol içinde çözüldü.

3.3. Zigot ve Embriyo Eldesi

3.3.1. Zigotun Eldesi

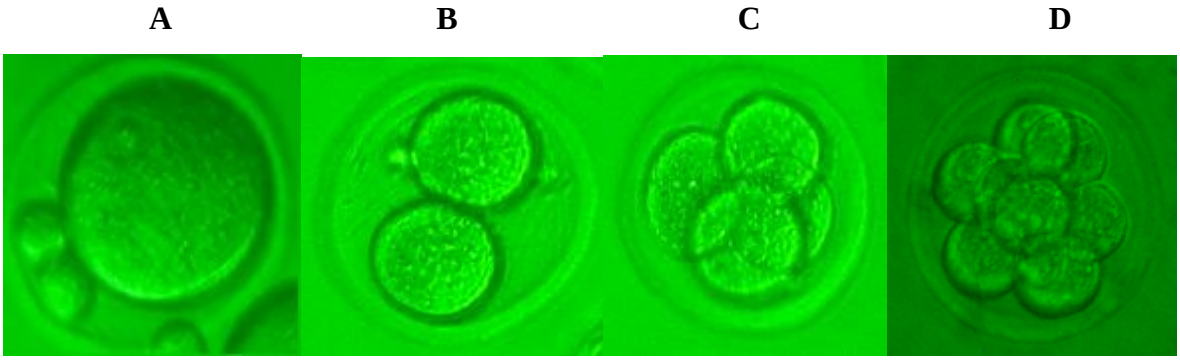
PMSG injeksiyonundan 48 saat sonra hCG indüksiyonu yapılan dişi, erkek fare ile aynı kafese konularak çiftleşmeleri sağlandı. Ertesi sabah vajinal plağı pozitif olan dişinin (Şekil 3.3), hCG injeksiyonundan 22 saat sonra oviduktları çıkarıldı. Çıkarılan oviduktların ampulla bölgesinden elde edilen zigotlardan 75 µg/ml hiyalorinidaz ile kumulus hücreleri uzaklaştırıldı ve 3 defa KFHM+BSA ile yıkandı. Mikroskop altında PN' ları net olarak görünen zigotlar (Şekil 3.4.A) seçilerek deneye alındı.



Şekil 3.3. Süperovülasyon protokolü ile indüklenmiş ve kopülasyon yapmış dişi farede vajinal plak.

3.3.2. 2h, 4h ve 8h Aşamalardaki Embriyoların Eldesi

Süperovülasyon protokolü uygulanan ve vajinal plağı pozitif olan dişi fare üreme sisteminden ovidukt ve hornları çıkarıldı. hCG enjeksiyonunu takiben yaklaşık olarak, 2h için 30-32 (Şekil 3.4.B), 4h için 50-56 (Şekil 3.4.C) ve 8h embriyoları (Şekil 3.4.D) elde etmek için de 62-65 saat sonra flush yöntemi uygulandı.



Şekil 3.4. Süperovülasyon protokolü ile ampulladan izole edilen PN aşamadaki zigotun örnek fotoğrafı **(A)**, flash yöntemi uygulanarak ovidukt veya horndan elde edilen 2h **(B)**, 4h **(C)**, 8h **(D)** embriyoların örnek fotoğrafları.



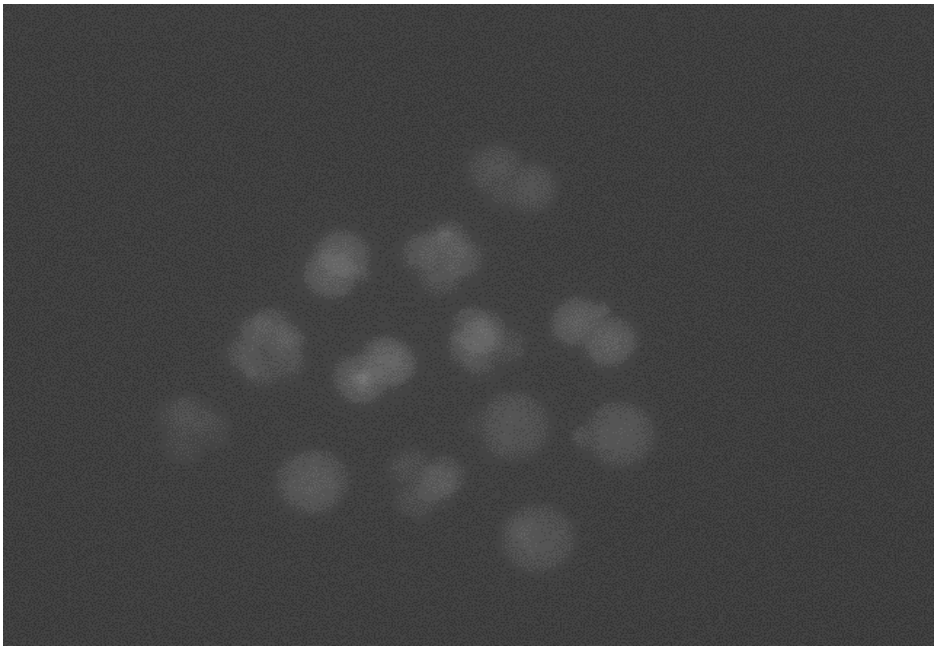
Şekil 3.5. Fizyoloji Anabilim Dalı Üreme Fizyolojisi Laboratuvarı' nda zigot ve embriyolam izole edilerek kültür işlemlerinin gerçekleştirildiği ortam ve cihazlar.

3.4. pH_i Kaydı

Elde edilen PN zigotlar, 2h, 4h ve 8h embriyolar, 1 µM BCECF-AM içeren pHKFHM' de 37 ºC' de 15 dk inkübe edilerek yüklendi. Yükleme solüsyonu pHKFHM olduğu ve BSA içermediği için yüklemeler, zigot ve embriyoların zemine yapışmalarını önlemek için %1 jelatin ile kaplanmış saat camlarında gerçekleştirildi. Dış ortamdaki BCECF' in tamamen uzaklaştırılması için pHKFHM ile 3 kez yıkandı. Yüklenmiş ve yıkanmış zigotlar ve embriyolar zemininde lamel olan kayıt odacığına aktarıldı. Ortamda BSA olmadığı için zigot ve embriyolar lamele yapışarak stabil hale geldi. Kayıt odacığı invert floresan mikroskoba (Nikon TE 2000-U) yerleştirildi. Solüsyonu değiştirmek için perfüzyon ve %5 CO_2 - %95 hava karışımı ile gazlanmasını sağlayacak havalandırma düzeneği yerleştirildi. Bu ortamda, solüsyon 37 ºC' de sabit olacak şekilde sıcaklık kontrol ünitesi (PTC-20) ile kontrol altında tutuldu.

Kayıt odacığına yerleştirilen BCECF ile yüklenmiş zigot ve embriyoların bulunduğu solüsyon pHKSOM ile değiştirildikten sonra stabilizasyon için 10 dk beklendi. Bu süre sonunda 440 nm ve 500 nm boyundaki eksitasyon ışığı ile uyarıldı. 535 nm dalga boylarındaki emisyonu ICCD kamera kullanılarak görüntülendi. Tüm embriyonik aşamaların kaydı eş zamanlı olarak yapıldı, bu şekilde yapılan kayıtlardan birinin örnek görüntüsü Şekil 3.6' da verilmiştir. pH' ya hassas olan 500 nm eksitasyon yanıtı (Şekil 3.7. A) ve pH' ya hassas olmayan 440 nm eksitasyon yanıtı (Şekil 3.7. B)

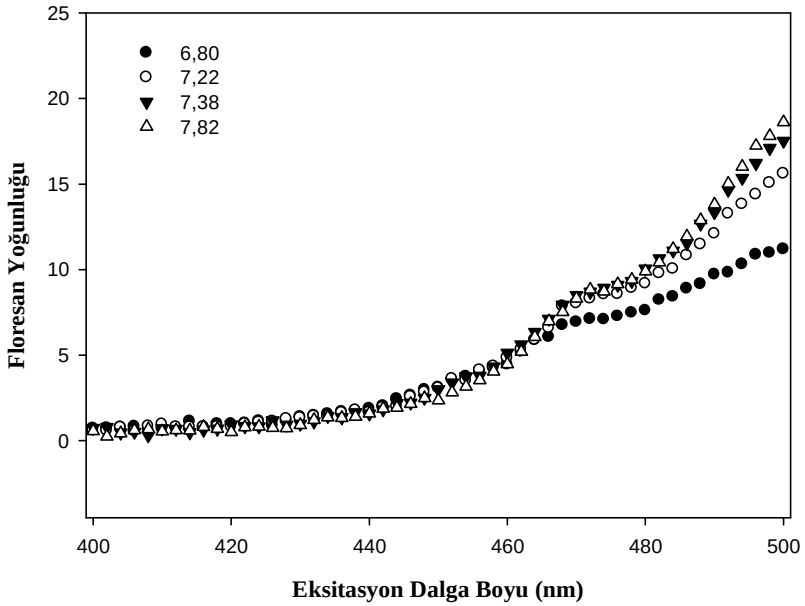
Image Master programı ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Bu şekilde pH_i değişimine bağlı olarak saptanan yanıtlar Şekil 3.8' de görülmektedir. Zemin değerleri çıkarıldıktan sonra 500/440 eksitasyon oranı pH_i değişimlerinin takibi için hesaplandı. Tüm kayıtlar 37 ºC' de %5 CO_2 - % 95 hava karışımı ile gazlandırılarak yapıldı. Kayıtlar 30 sn' de bir alındı. pH_i kayıtlarının gerçekleştirildiği mikrospektrofluorometre sistemi Şekil 3.9.' da görülmektedir.



Şekil.3.6. Tüm embriyonik aşamalarda eş zamanlı olarak yapılan kayıtların örnek floresan görüntüsü



Şekil 3.7. pH' ya hassas olan 500 nm **(A)** ve pH' ya hassas olmayan 440 nm **(B)** ile eksite edilen embriyoların 535 nm' deki emisyon yanıtları

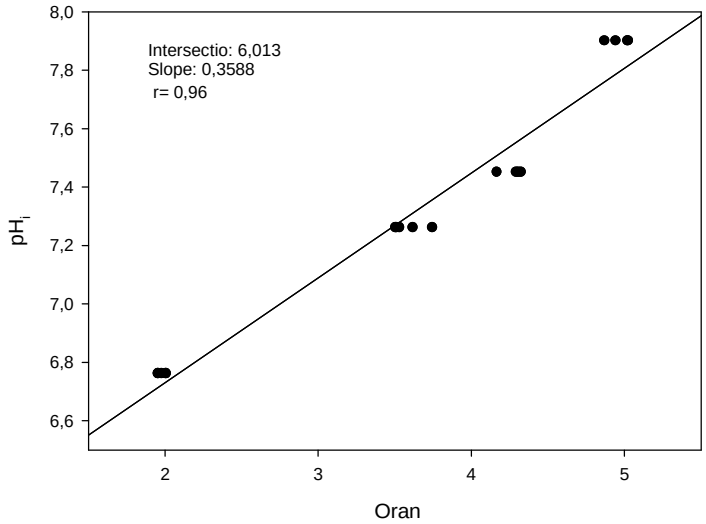


Şekil 3.8. 400-500 nm' lerde eksite edilen zigot/embriyolardan 535 nm' de elde edilen emisyon yanıtlarının pH_i değişimine bağlı olarak gerçekleşen grafiği



Şekil 3.9. Kayıtların gerçekleştirildiği mikrospektrofluorometre sistemi.

BCECF ile yapılan kayıtlar pH değerlerine, K^+ gradiyentini ortadan kaldırmak için Valinomisin eklenmiş Nigerisin/yüksek K^+ metoduna göre çevrildi. Bu çevrimde kullanılan örnek bir kalibrasyon eğrisi Şekil 3.10' de görülmektedir. Dinlenim pH_i değerleri şu şekilde saptandı: Zigot ve embriyoların pHKSOM' a aktarılmasının ardından stabilizasyon için 10 dk beklendi, daha sonra alınan kontrol kayıtlarının 0.-10. dakikalar arasındaki değerlerin ortalaması dinlenim pH_i değeri olarak belirlendi.



Şekil 3.10. BCECF ile yüklenmiş PN zigot ve embriyolar (n=19) kullanılarak *in situ* Nigerisin/Yüksek K^+ metodu ile alınmış pH_i kalibrasyon eğrisi.

3.5. Cl^- Uzaklaştırma Yöntemi ve AE Aktivite Hesabı

Zigot ve embriyolardan pHKSOM ile 10 dk dinlenim pH_i'ı alındıktan sonra solüsyon 0 Cl^- pHKSOM ile değiştirilerek ortamdan Cl^- uzaklaştırıldı. Bu durumda AE ters yönde çalışmaya başlamakta, hücre içindeki Cl^- dışarı çıkarken dış ortamdan HCO_3^- hücre içine alınmakta ve böylece hücrede alkaloz gelişmektedir. Alkalozun başlangıç oluşma hızı linear regresyon analizi ile AE aktivite hesabı için kullanıldı [14, 15, 46] (Şekil 2.12). AE aktivitesi pH_i' nin dakikadaki değişimi (pHU/dk) olarak verildi. 0 Cl^- pHKSOM solüsyonunda zigot ve embriyolardan 20 dk pH_i kaydı alındı.

3.6. Alkaloz İndüksiyonu ve AE Fonksiyonunun Araştırılması

Zigot ve embriyolarda alkaloz indüksiyonu için 35 mM NH_4Cl kullanıldı. Bu konsantrasyonda kullanılan NH_4Cl zigot/embriyolarda 0,5-0,6 pH birimi kadar alkaloz

geliştirebilmektedir [46]. Zigot ve embriyolarda indüklenen bu alkalozdan AE aktivitesi ile iyileşme derecesi, 20 dk sonunda pH_i'ın dönebildiği değer (pH_{if}) olarak ifade edildi. pH_{if} değeri, alkalozdan iyileşen hücrelerin son 5 dk'lık pH_{if} değerlerinin ortalaması alınarak saptandı. İyileşme sonucu dönebildiği pH_{if} değeri ile dinlenim pH_i (pH_{id}) değerleri arasındaki fark AE aktivitesi ve dolayısı ile fonksiyonel olup olmadığı konusunda bilgiler vermektedir [16].

Zigot ve embriyoların indüklenen alkalozdan iyileşmelerinin AE aktivitesi sayesinde olduğunun teyidi 500 μM DIDS ile yapıldı. NH_4Cl-pHKSOM ortamına eklenen DIDS ile gerçekleşen pH_{if}, kontrol kayıtlarının değerleri ile karşılaştırıldı.

3.7. İstatistik

Çalışmada 0 Cl^-, NH_4Cl-pHKSOM, NH_4Cl-pHKSOM+DIDS uygulama gruplarında zigot ve embriyoların verdikleri yanıtlar tek yollu ANOVA ile karşılaştırıldı. Post hoc olarak Tukey testi uygulandı. Aynı aşamadaki zigot ve embriyoların uygulama grupları arasındaki karşılaştırmalar için t-testi, NH_4Cl-pHKSOM ve NH_4Cl-pHKSOM+DIDS gruplarının kendi içindeki pH_{id} ve pH_{if} değerleri arasındaki karşılaştırmalar için ise eşleştirilmiş t-testi kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS 13.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Grafikler ise Sigma Plot 8.0 programı kullanılarak çizildi, linear regresyon yine bu program kullanılarak hesaplandı. Tüm değerler ortalama ± SEM olarak verildi. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Zigot ve Embriyolardaki pH_{id} Değerleri

Tüm uygulama gruplarının (O Cl^-, NH_4Cl, NH_4Cl+DIDS) pHKSOM solüsyonunda alınan pH_{id} değerleri, PN zigot ve embriyolar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi (Tablo 4.1). Aynı şekilde, farklı uygulama gruplarının aynı aşamadaki PN zigot/embriyolara ait pH_{id} arasında da anlamlı farklılık saptanmadı, bu nedenle PN zigot ve embriyoların pHKSOM ortamında saptanan tüm pH_{id} değeri birleştirildi. Bu şekilde PN zigot ve embriyoların pH_{id} değerleri belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. O Cl^-, NH_4Cl, NH_4Cl+DIDS gruplarına ait zigot ve embriyoların pHKSOM ortamında kayıtlanan pH_{id} değerleri (Ort. ± SEM).

	O Cl^-	**NH_4Cl**	**NH_4Cl+DIDS**
PN	7,36±0,01	7,37±0,02	7,31±0,10
	(N=7, n=37)	(N=5, n=28)	(N=11, n=44)
2h	7,22±0,09	7,27±0,09	7,34±0,12
	(N=9, n=48)	(N=7, n=29)	(N=14, n=52)
4h	7,29±0,06	7,40±0,01	7,29±0,13
	(N=13, n=64)	(N=7, n=34)	(N=11, n=29)
8h	7,24±0,09	7,30±0,18	7,34±0,13
	(N=10, n=37)	(N=6, n=20)	(N=12, n=29)

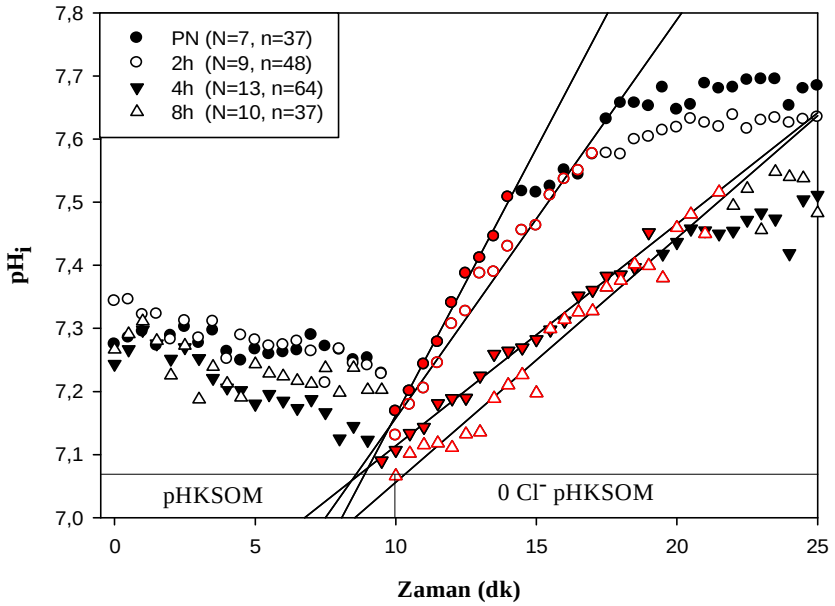
N, kullanılan fare sayısı; n, kayıt alınan zigot/embriyo sayısı.

Tablo 4.2. PN zigot ve 2h, 4h ve 8h embriyoların pHKSOM ortamlarında kayıtlanan tüm pH_{id} değerlerinin ortalama verileri (Ort. ± SEM).

	PN	2h	4h	8h
pH_{id}	7,34±0,08 (N=23, n=109)	7,29±0,06 (N=30, n=129)	7,32±0,06 (N=31, n=127)	7,31±0,08 (N=28, n=86)

4.2. AE Aktivitesinin Saptanması

Zigot ve embriyolardaki AE aktivitesi, ortamdan Cl^- uzaklaştırılarak saptandı. Bu yöntem ile ters yönde çalışan AE, hücre içi alkalinizasyona neden olmaktadır. PN zigotlarda ve 2h, 4h, 8h embriyolarda bu yöntem ile yapılmış kayıtlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1' de sunulmuştur. AE aktivitesinin saptanmasında, gelişen hücre içi alkalozun başlangıç eğiminin linear regresyonu alındı. Bu şekilde hesaplanan AE aktivite değerleri Tablo 4.3' de verilmiştir. Bu değerler ile çizilen karşılaştırmalı AE aktivite grafiğinde, zigot ve embriyolar arasındaki gelişimsel değişim daha net olarak Şekil 4.2' de görülmektedir. Yüksek olan PN zigot AE aktivitesi, 8h embriyo aşamasına kadar olan gelişimsel süreçte giderek azalmakta, aktivitedeki bu azalma 8h aşamada, PN zigot ve 2h embriyo değerlerine göre, istatistiksel olarak anlamlı hale gelmektedir (Tablo 4.3 ve Şekil 4.2).

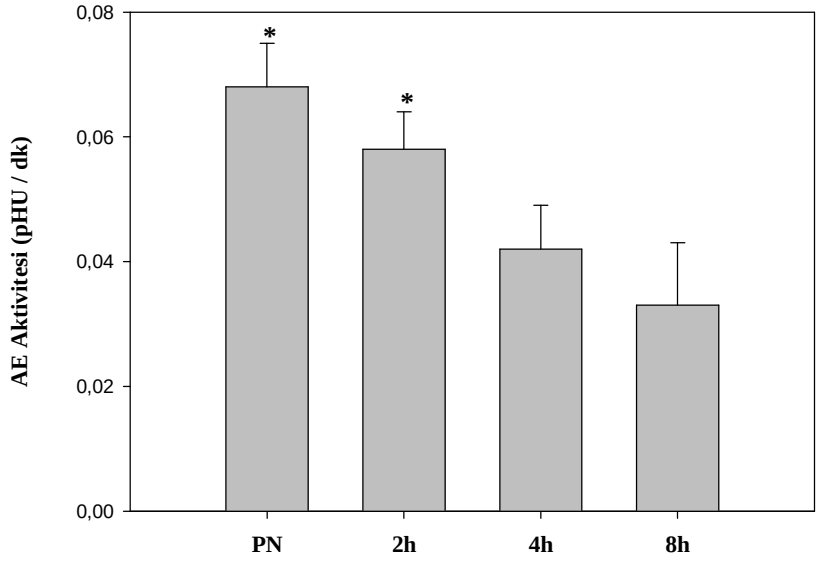


Şekil 4.1. Cl^- uzaklaştırma yöntemi kullanılarak PN zigot ile 2h, 4h ve 8h embriyolardan alınan kayıtların ortalama değerleri ile çizilmiş pH_i değişimleri. On dakika süresince pHKSOM ortamında dinlenim pH_i kayıtlanmış, sonrasında Cl^- içermeyen pHKSOM ile ortam değiştirilmiştir. Bu şekilde uygulanan Cl^- uzaklaştırma yöntemi ile gelişen alkalinizasyonun linear regresyon eğrisi ile AE aktivitesi saptanmıştır.

Tablo 4.3. PN zigot ile 2h, 4h ve 8h embriyolarda kayıtlanan AE aktiviteleri (pHU/dk).

	PN	2h	4h	8h
AE Aktivitesi	0,068±0,01* (N=7, n=37)	0,058±0,01* (N=9, n=48)	0,042±0,01 (N=13, n=64)	0,033±0,01 (N=10, n=37)

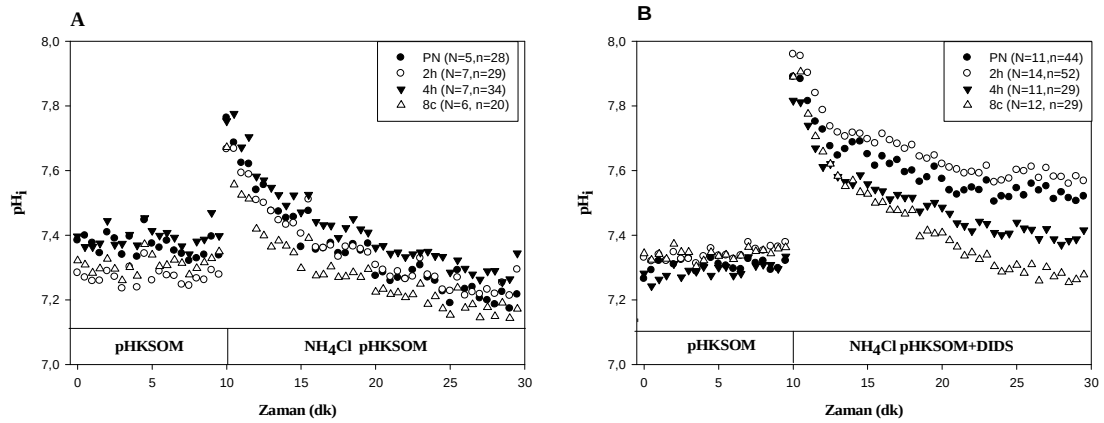
*, 8h embriyo değerine göre anlamlı farklılık ($p<0,05$).



Şekil 4.2. Cl^- uzaklaştırma yöntemi ile PN zigot ve 2h, 4h ve 8h embriyolardan saptanan AE aktivitesinin karşılaştırmalı görünümü (*, 8h aşamasındaki embriyo değerine göre anlamlı farklılık, $p<0,05$).

4.3. İndüklenmiş Alkalozdan İyileşme

PN zigot ve embriyolarda hücre içi alkalozu indüklemek için 35 mM NH_4^+ kullanıldı. NH_4Cl-pHKSOM ortamında indüklenen bu alkaloza verdikleri iyileşme yanıtlarının ortalama değerler ile çizilen grafiği Şekil 4.3.A' da verilmiştir. Dinlenim pH_{id} değerleri ve alkalozdan iyileşme sonucu gelebildikleri yeni hücre içi pH (pH_{if}) değerleri Tablo 4.4.' de sunulmuştur. Görüldüğü gibi, PN zigot ve tüm aşamalardaki embriyolar indüklenmiş alkalozdan tam olarak iyileştiler. Buna karşılık, PN zigot, 2h ve 4h embriyoların indüklenmiş alkalozdan iyileşmelerini, ortama eklenen DIDS baskıladı, ancak 8h embriyolarda etkili olmadı (Şekil 4.3.B). Bu uygulama gruplarında gerçekleşen pH_{id} ve pH_{if} Tablo 4.4' te verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi, DIDS, PN zigot ile 2h embriyolarda, gerçekleşen pH_{id} ile pH_{if} değerleri arasında anlamlı farklılığa neden olurken ($p<0.05$), 4h embriyolarda bu farklılık sınırda kaldı ($p=0.055$). Buna karşılık 8h embriyolarda bu değerler arasında anlamlı bir fark saptanmadı.



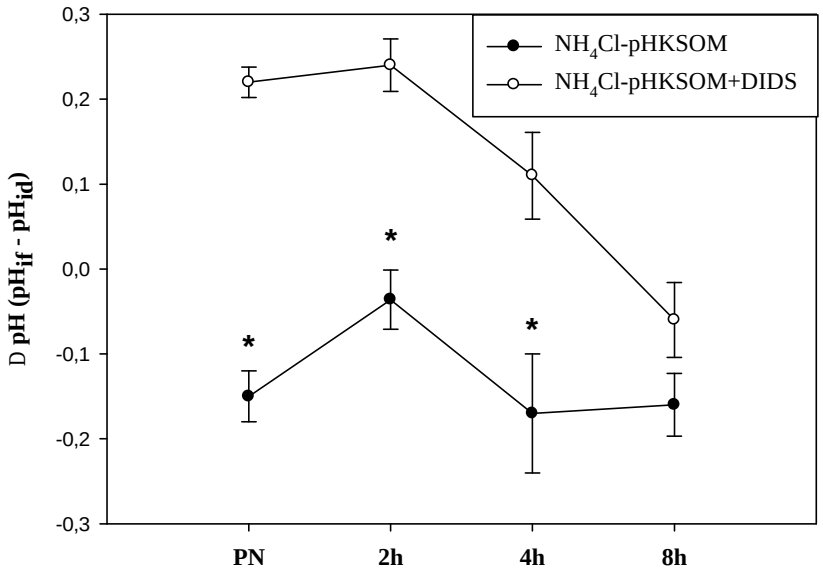
Şekil 4.3. İndüklenmiş hücre içi alkaloza PN zigotların ve 2h, 4h ve 8h embriyoların verdikleri iyileşme yanıtlarının ortalama değerler ile çizilmiş grafiği **(A).** Bu iyileşme yanıtlarının DIDS etkisiyle değişimi **(B)**.

Tablo 4.4. PN zigotlar ile 2h, 4h ve 8h embriyoların dinlenim pH_i (pH_{id}) ve NH_4Cl ile indüklenen alkalozise verdikleri iyileşme yanıtları sonucu oluşan pH_i (pH_{if}) değerleri ve DIDS uygulamasının bu değerlere etkisi

	NH_4Cl		**NH_4Cl + DIDS**	
	pH_{id}	**pH_{if}**	**pH_{id}**	**pH_{if}**
PN	7,32±0,20	7,22±0,18	7,31±0,10	7,53±0,11 [a]
	(N=5, n=28)		(N=11, n=44)	
2h	7.27±0,09	7,24±0,14	7,34±0,12	7,58±0,14 [a]
	(N=7, n=29)		(N=14, n=52)	
4h	7,40±0,10	7,23±0,09	7,29±0,13	7,40±0,17 [b]
	(N=7, n=34)		(N=11, n=29)	
8h	7,30±0,18	7,15±0,16	7,34±0,13	7,28±0,12
	(N=6, n=20)		(N=12, n=29)	

[a], NH_4Cl uygulamasındaki aynı aşama zigot ve 2h embriyo pH_{if} değerine göre anlamlı farklılık ($p<0.05$).
[b,] NH_4Cl uygulamasındaki aynı aşama 4h embriyo pH_{if} değerine göre farklılık ($p=0.055$)

PN zigot ve embriyoların NH_4Cl-pHKSOM ve NH_4Cl-pHKSOM + DIDS gruplarında pH_{if} ile pH_{id} değerleri arasındaki farklar (ΔpH) ile çizilmiş grafik Şekil 4.4' de görülmektedir. Bu grafikte de görüldüğü gibi indüklenen alkalozdan PN zigot, 2h, 4h, ve 8h embriyoların tamamı tam olarak iyileşti. DIDS uygulaması durumunda iyileşme sonucu gerçekleşen pH_{if} değerleri, PN zigot ile 2h ve 4h embriyolarda yüksek kaldı. Böylece ΔpH değerleri inhibitörsüz ortamda elde edilenlere göre anlamlı farklılık gösterdi (Şekil 4.4). Buna karşın 8h embriyolarda bu değerler arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Şekil 4.3. B' de görüldüğü üzere, DIDS' in ortamda olmasına rağmen, pH_{id} değerlerine dönmesi 8h embriyolarda daha hızlı gerçekleşti. DIDS, PN zigottan 8h embriyoya doğru gelişen embriyoların pH_{id} değerlerine dönmelerini giderek daha az etkiledi (Şekil 4.3.B). Nitekim etkideki bu azalma, aynı aşama zigot/embriyonun pH_{id} ile pH_{if} değerleri arasında yapılan karşılaştırmalardaki anlamlılık düzeyleri ile de paralellik göstermektedir (PN, p=0,000; 2h, p=0,001; 4h, p=0,005). Dolayısıyla, PN zigot, 2h ve 4h embriyoların tümünde DIDS uygulanması, bu değerleri anlamlı olarak baskılarken, 8h embriyolarda anlamlı bir baskılanma gerçekleşmedi.



Şekil 4.4. İndüklenmiş hücre içi alkaloza PN zigot ve 2h, 4h ve 8h embriyoların inhibitörsüz (NH_4Cl-pHKSOM) ve inhibitörlü (NH_4Cl-pHKSOM+DIDS) ortamlarda gerçekleşen pH_{if} ile pH_{id} değerleri arasındaki farklar (*, aynı aşamadaki zigot veya embriyoların NH_4Cl + DIDS ortamında elde edilen değerine göre anlamlı farklılık, $p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın esas bulgusu, AE aktivitesinin PN zigot aşamasında yüksek iken 2h, 4h ve 8h embriyo aşamalarına kadar olan gelişimsel süreçte giderek azalmasıdır. Buna karşılık, PN zigot ve tüm embriyo aşamaları, indüklenen alkalozdan tam olarak iyileştiler. Diğer yandan, 8h embriyolar dışında diğer çalışılan tüm zigot/embriyolarda alkalozdan iyileşme DIDS ile inhibe edilebildi.

5.1. pH_i Değerleri

Çalışmamızda gelişim sürecindeki zigot/embriyolardan eş zamanlı kayıtlanan pH_i değerleri, aşamalar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiş olup 7,30 düzeylerinde idi (Tablo 4.1). Laboratuvarımızda daha önce PMT ile yapılan, yine mikrospektrofluorometrik yöntemle kayıtlanan, mayotik matürasyon sürecindeki oositlerin pH_i değerleri arasında farklılık saptanmamış ve buna yakın değerler elde edilmiştir [17]. Benzer değerler, insan embriyosunda [32], GV aşamasındaki fare oositinde [15], hamster oosit ve 2 hücreli embriyosunda [28, 47] da rapor edilmiştir. Philips ve Baltz, insan ve fare GV oosit ile matür MII oosit ve zigotlardan kayıtladıkları pH_i değerleri arasında, bizim çalışmamızda olduğu gibi, anlamlı bir fark olmadığını rapor etmişlerdir [32, 47]. Bu bilgiler ışığında kamera ile zigot ve tüm aşama embriyolarda eş zamanlı olarak kayıtladığımız değerlerin, hücre içi pH değerlerini doğru olarak yansıttığı ve güvenilir olduğu net olarak ifade edilebilir.

5.2. AE Aktivitesi

Sunulan bu çalışmada, PN zigot aşamasında yapılan kayıtlardan elde edilen yüksek AE aktivitesi, 2h, 4h ve 8h embriyo aşamalarına ilerlediği gelişimsel süreçte, giderek azaldığı ve aktivitedeki bu azalmanın özellikle 8h aşamada, PN zigot ve 2h embriyo değerlerine göre, istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2). Büyüyen-gelişen çıplak oositlerde pH_i düzenleyici sistemlerin mayotik yeterlilik ile kazanıldığı [14], bu gelişme süreci boyunca oositlerin pH_i düzenleyici sistemler açısından foliküler yapıya bağımlı oldukları gösterilmiştir [16]. Ancak bu bağımlılık oositin GV aşamaya ulaşması ile ortadan kalmaktadır [14, 16, 48]. GV aşamasına ait bu bulgu daha

önce laboratuvarımızdan çıkan çalışmada da gösterilmiştir [17]. GV aşamasına kadar olan bulgulardan farklı ve şaşırtıcı olarak, mayotik matürasyon aşamalarındaki oositlerin pH açısından dış ortam etkilerine açık olduğu bildirilmiştir [19, 48]. Benzer şekilde, daha önceki çalışmamızda MI ve MII aşamalarındaki oositlerde AE aktivitesinin düşük olarak saptanması ve alkali şoklara karşı dinlenim pH_i değerlerine geri dönememeleri bu şaşırtıcı bulgular ile paralellik göstermektedir [18].

AE aktivitesinin baskılandığı embriyolarda ooplazmik alkalozun, gelişimi olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiş [29] fakat, fertilizasyon için hazır olan MII aşamasındaki oositlerde dinlenim pH_i'ının diğer aşama oosit/embriyolar ile farklılık göstermediği ortaya konmuştur. Ancak deniz kestanesi, kurbağa gibi canlılarda fertilizasyon ile 0,3-0,5 pH birimlik artışların olduğu belirlenmiştir [47-49]. Fertilizasyon ile gelişen bu alkalinizasyonun protein sentezi ve metabolik aktivasyon için kolaylaştırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir [47, 48, 50]. Diğer yandan, sıçan ve fare oositlerinde yapılan çalışmalarda fertilizasyon ile böyle bir alkalinizasyonun olmadığı bulgularına ulaşılmıştır [22, 51]. Bununla birlikte, fertilizasyonu bekleyen olgun MII oositte inhibe edilen AE aktivitesinin fizyolojik önemi tam olarak belirlenememesine rağmen, enerji korunumu, fertilizasyona kadar ovüle oositin zar üzerindeki iyonik farklanmanın devamı veya metabolik aktivasyon ile ilgili olabileceği ifade edilmiştir [31, 48]. Literatürde belirtilen bu bulgular, pH_i düzenlenmesinin oosit ve zigotta gelişimsel değişim gösterdiğini ve türlere göre bu düzenlemelerde farklılıklar olabildiğini ortaya koymaktadır.

Embriyogenez sürecinde yapılan çalışmalar incelendiğinde ise, AE aktivitesinin insan embriyolarında incelendiği bir çalışmada, bu aktivite zigot aşamasında yüksek olarak bulunmuş, yine insan embriyosunda yapılan başka bir çalışmada zigot, 2h, 4h, 8h, 16h embriyolar ile morula ve blastokist aşamalarının tümünde yüksek AE aktivitesi saptanmıştır [23]. Az sayıda insan embriyosu üzerinde yapılan bu iki çalışmaya karşın, hamsterda AE aktivitesinin değerlendirildiği araştırmada ise, PN zigotta yüksek aktivite saptanmış iken, 2h aşamasında bu aktivitenin azaldığı rapor edilmiştir [28]. Model olarak fare kullanılarak yapılan, embriyo AE aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, PN zigot, 2h embriyo ve morula ile blastokist aşamalarında giderek azalan aktivite saptanmış iken, 4h ve 8h embriyolar değerlendirilmemiştir [26]. Çalışmamızda ise, AE aktivitesi PN zigottan 8h embriyo aşamasına kadar ardışık olarak incelenmiştir. Bu aktivitenin PN

zigot aşamasında yüksek olduğu 2h, 4h ve 8h aşamalara ilerlediğinde aktivitenin giderek azaldığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, gelişimsel değişim gösterirken ovidukta ilerleyen embriyonun, değişen dış ortamın pH'sına (ampulladaki alkali ortamdan uterusdaki asidik ortama doğru [30]), maruz kaldığı ve metabolik aktivitesinin [23, 30] bu gelişim sürecinde farklılaştığını ortaya koymuştur. Azalan dış ortam pH'sı ve metabolizması sonucu daha fazla asit yük oluşturması şartları altında, embriyonun alkaloz savunma mekanizmasını oluşturan AE aktivitesinin azalması uyumlu görünmektedir.

5.3. İndüklenmiş Alkaloza Verilen İyileşme Yanıtları

Çalışmamızda PN zigot ve 2h embriyolarda yüksek olduğu saptanan AE aktivitesi 4h ve özellikle 8h embriyolarda anlamlı olarak azalmasına rağmen, zigot ve tüm bu embriyonik aşamaların, dinlenim pH_i değerleri (pH_{id}) ile alkalozdan iyileşme sonunda dönebildikleri yeni pH_i (pH_{if}) değerleri arasında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4.4, Şekil 4.3.A). Dolayısı ile zigot ve çalışılan tüm aşamadaki embriyolar indüklenen alkalozdan tam olarak iyileştiler (Şekil 4.3.A). Halbuki, AE aktivitesinde gelişimsel azalma saptadığımız MI ve MII mayotik matürasyon aşamalarındaki oositler, indüklenen alkalozdan tam olarak iyileşememişlerdi [17]. Yine düşük AE aktivitesi olduğu gösterilen oositlerde tam olarak iyileşme gerçekleşmediği rapor edilmiştir [14, 27].

PN zigot ve embriyoların indüklenen alkalozdan iyileşmelerinin AE aktivitesi sayesinde olduğunun teyidi için, AE inhibitörü olan, DIDS kullanıldı. DIDS, AE varlığı ve fonksiyonunun teyidi için yaygın olarak kullanılan inhibitördür [14, 17, 20, 27-29] ve tüm bu çalışmalarda, AE aktivitesini etkin olarak baskıladığı gösterilmiştir. Çalışmamızda ise DIDS, zigot ve 2h ile 4h embriyolarda alkalozdan iyileşmeyi anlamlı olarak baskılarken 8h embriyolarda anlamlı bir etki gerçekleştirmedi (Şekil 4.3.B, Tablo 4.4). Benzer bulgu, başka bir proje çerçevesinde incelemekte olduğumuz, morula ve blastokist aşamalarındaki embriyolarda da saptandı. Yapılan literatür taramasında, alkalozdan iyileşmeyi sağlayan başka taşıyıcı/mekanizmaya rastlanmadı. Alkalozdan iyileşmeyi sağlayan, bilinen tek mekanizma HCO_3^-/Cl^- değiştiricisi olmasına rağmen, bu aktivitenin düşük olduğu özellikle 8h embriyolarda alkalozdan tam olarak iyileşmenin doğası saptanamamıştır. Ancak blastomer sayısı dolayısı ile embriyonun yüzey alanı arttıkça, alkaloz indüksiyonu için kullanılan NH_4Cl'ün, iyon tuzağından daha kolay

kurtularak, bu embriyolarda hücre dışına sızmanın artabileceği ve alkalozdan iyileşmeyi kolaylaştırabileceği düşünülebilir. Zira alkalozdan iyileşmeye verilen yanıtlar, zigot ve tüm aşamalardaki embriyolarda benzer iken (Şekil 4.3.A), iyileşme üzerine DIDS' in inhibisyon etkisi, 2h aşamadan sonraki 4h ve 8h embriyolarda giderek azalmış olarak saptandı (Şekil 4.3.B). Ancak amonyum puls tekniği dışında bir yolla indüklenen veya başka bir nedenle gelişen alkalozdan iyileşmenin, 4h ve özellikle 8h embriyolarda nasıl gerçekleşeceği daha fazla araştırılması gereken hususlardır.

Yardımcı üreme tekniklerinde embriyo kültürü çok önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Günümüz uygulamaları, standart kültür medyumlarında embriyoların kültüre edilmesidir. Ancak embriyoların aşamalarına göre değişen özellikleri göz ardı edilmektedir. Bu da embriyoların kalitesini etkileyebilmektedir. *In vitro* fertilizasyon (IVF) çalışmalarında embriyo transferinin genel olarak 3. gün yapılması ve bu aşamadaki embriyonun 8h olması nedeniyle zigot, 2h, 4h ve 8h embriyo aşamalarının ardışık olarak incelendiği bu çalışma sonuçları pratik uygulamalara katkı sağlayabilecektir. Bu durumda özellikle AE aktivitesinin azaldığı 4h ve 8h embriyoların kültüre edildiği medyumların pH' ları önem kazanmaktadır. Ayrıca, HCO_3^-/Cl^- değiştiricisinin çalışabilmesi için medyum HCO_3^- yoğunluğunun uygun olması şarttır. Zira HCO_3^-/Cl^- değişimi, dinlenim pH_i'ını kontrol eder ve embriyo gelişimi için gereklidir [29].

6. SONUÇLAR

PN zigottan 8h embriyoya kadar olan erken embriyonik gelişim aşamalarında alkaloz savunma mekanizması giderek zayıflamaktadır. Buna rağmen, ilginç olarak, çalışılan tüm aşamalardaki embriyolar indüklenen alkalozdan tam olarak iyileşebilmektedirler.

Günümüz yardımcı üreme tekniklerinin başarı oranı %30 civarındadır. Embriyoların kültüre edildiği medium içeriklerinin optimum düzeyde oluşturulması ve kültür başarı oranlarının artırılması, IVF çalışmalarındaki başarı oranını da direkt etkileyecek ve bu da gebelik şansına doğrudan yansıyabilecektir.

Hücrelerin en temel homeostatik mekanizmalarından biri, pH_i düzenlenmesidir. pH_i, hücredeki tüm süreçleri doğrudan veya dolaylı olarak etkiler. Dolayısı ile dar sınırlar içinde tutulması hayati öneme sahiptir. Bu durum embriyolar için de geçerlidir ve *in vivo* ortamda embriyo gelişirken bir taraftan metabolik aktivitesi diğer taraftan dış ortam özellikleri değişmektedir. Bu değişimlere karşın, iç ortamını stabilize edecek savunma mekanizmalarının iyi çalışması gerekir. Bu düşünceden hareketle çalışmamızda, embriyogenez sürecinde değişen metabolizma ve ortama karşı, pronüklear aşamadaki zigottan 8h embriyolara kadar olan gelişim sürecindeki hücrelerin alkaloz defans mekanizması fonksiyonel açıdan incelenmiştir. Pratik uygulamalarda optimal seviyeye ulaşabilmek ve başarı oranlarının arttırılması için kültür medyumlarının optimizasyonuna ve böylece daha uzun süreli kültürlerin yapılabilmesine ihtiyaç vardır. Zira daha ileri gelişim aşamasındaki embriyoların uterusa transferinde daha yüksek oranda başarılar elde edildiği gösterilmiştir. Bunun için de dış ortamda yaşatılmaya çalışılan embriyoların, pH_i gibi temel düzenleme mekanizmalarının embriyonik gelişim aşamalarına göre ayrıntılı olarak incelenmesi gerekir. Çalışmamızda kullanılan, fare embriyo mekanizmaları insanınkiler ile benzerlikler gösterdiğinden, elde edilen sonuçlar pratik değer taşımaktadır.

Embriyoların gelişimsel değişimleri hakkındaki bu temel bilgilerimizin artışı ile hangi embriyonik aşamada nasıl bir ortam sağlanmalı, ayrıntıları ile ortaya konabilecektir. Bu sayede ise; embriyonun kültüre edildiği medyumun optimize edilmesi, kültür sürelerini daha uzatmayı sağlayabilecek ve böylece daha yüksek

implantasyon ve dolayısı ile gebelik oranlarına ulaşılabilecektir. Bu da, her geçen gün artan yardımla üreme merkezlerine başvuran çiftlerin daha az uygulama ile çocuk sahibi olma şansını arttırabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Anderson, E. and D.F. Albertini, *Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary.* J Cell Biol, 1976. 71(2): p. 680-6.
2. Eppig, J., ed. *Mammalain oocyte development in vivo and in vitro. In elements of Mammalian Fertilization* Vol. I. 1991, Basic Consepts, P.M. Wassarman,ed.Boca Raton:CRC Press. 57-76.
3. Gilula, N.B., M.L. Epstein, and W.H. Beers, *Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex.* J Cell Biol, 1978. 78(1): p. 58-75.
4. Larsen, W.J., S.E. Wert, and G.D. Brunner, *A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes.* Dev Biol, 1986. 113(2): p. 517-21.
5. Cooper GM, H.R., ed. *The Cell Cycle Third Edition*. Vol. 14. 2004, ASM Pres, Washington, D.C. 615-621.
6. Boyarsky, G., et al., *pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na+-dependent and -independent Cl(-)-HCO3- exchangers.* Am J Physiol, 1988. 255(6 Pt 1): p. C857-69.
7. Boyarsky, G., et al., *pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO3.* Am J Physiol, 1988. 255(6 Pt 1): p. C844-56.
8. Roos, A. and W.F. Boron, *Intracellular pH.* Physiol Rev, 1981. 61(2): p. 296-434.
9. Tonnessen, T.I., K. Sandvig, and S. Olsnes, *Role of Na(+)-H+ and Cl(-)-HCO3- antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality.* Am J Physiol, 1990. 258(6 Pt 1): p. C1117-26.
10. Boron, W.F., ed. *Intracellular pH regulation. In Membrane Transport Processes In Organized Systems*. 1987, T.E.Andreoli, J.F. Hoffman, D.D. Fanestil, and S.G. Schultz, eds. (NY:Plenum). 39-51.
11. Aronson, P.S., J. Nee, and M.A. Suhm, *Modifier role of internal H+ in activating the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles.* Nature, 1982. 299(5879): p. 161-3.
12. Vaughan, J.D., ed. *Regulation of intracellular pH in cardiacmuscle. In Proton Passage Acrosss Cell Membranes.* 1988, G. Bock and J. Marsh,eds. (Chichester: Wiley). 23-46.
13. Olsnes, S., T.I. Tonnessen, and K. Sandvig, *pH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells.* J Cell Biol, 1986. 102(3): p. 967-71.
14. Erdogan, S., et al., *Mechanisms regulating intracellular pH are activated during growth of the mouse oocyte coincident with acquisition of meiotic competence.* Dev Biol, 2005. 286(1): p. 352-60.
15. Fitzharris, G. and J.M. Baltz, *Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth.* Development, 2006. 133(4): p. 591-9.
16. FitzHarris, G., V. Siyanov, and J.M. Baltz, *Granulosa cells regulate oocyte intracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms.* Development, 2007. 134(23): p. 4283-95.
17. Cetinkaya, A. and S. Erdogan, *Changes of HCO3-/Cl- exchanger activity during meiotic maturation in Balb/c strain mouse oocytes and zygotes.* J Reprod Dev, 2008. 54(6): p. 492-5.

18. Erdogan, S., et al., *Changes in the activity of defense mechanisms against induced acidosis during meiotic maturation in mouse oocytes.* Theriogenology, 2011. 75(6): p. 1057-66.
19. Phillips, K.P., et al., *The intracellular pH-regulatory HCO3-/Cl- exchanger in the mouse oocyte is inactivated during first meiotic metaphase and reactivated after egg activation via the MAP kinase pathway.* Mol Biol Cell, 2002. 13(11): p. 3800-10.
20. FitzHarris, G. and J.M. Baltz, *Regulation of intracellular pH during oocyte growth and maturation in mammals.* Reproduction, 2009. 138(4): p. 619-27.
21. Baltz, J.M., J.D. Biggers, and C. Lechene, *Relief from alkaline load in two-cell stage mouse embryos by bicarbonate/chloride exchange.* J Biol Chem, 1991. 266(26): p. 17212-7.
22. Ben-Yosef, D., Y. Oron, and R. Shalgi, *Intracellular pH of rat eggs is not affected by fertilization and the resulting calcium oscillations.* Biol Reprod, 1996. 55(2): p. 461-8.
23. Dale, B., et al., *Intracellular pH regulation in the human oocyte.* Hum Reprod, 1998. 13(4): p. 964-70.
24. Kline, D. and J.A. Zagray, *Absence of an intracellular pH change following fertilisation of the mouse egg.* Zygote, 1995. 3(4): p. 305-11.
25. Zhou, C., et al., *HCO3(-)/Cl(-) exchange inactivation and reactivation during mouse oocyte meiosis correlates with MEK/MAPK-regulated Ae2 plasma membrane localization.* PLoS One, 2009. 4(10): p. e7417.
26. Zhao, Y. and J.M. Baltz, *Bicarbonate/chloride exchange and intracellular pH throughout preimplantation mouse embryo development.* Am J Physiol, 1996. 271(5 Pt 1): p. C1512-20.
27. Phillips, K.P. and J.M. Baltz, *Intracellular pH regulation by HCO3-/Cl- exchange is activated during early mouse zygote development.* Dev Biol, 1999. 208(2): p. 392-405.
28. Lane, M., J.M. Baltz, and B.D. Bavister, *Bicarbonate/chloride exchange regulates intracellular pH of embryos but not oocytes of the hamster.* Biol Reprod, 1999. 61(2): p. 452-7.
29. Zhao, Y., et al., *Expression and function of bicarbonate/chloride exchangers in the preimplantation mouse embryo.* J Biol Chem, 1995. 270(41): p. 24428-34.
30. Hugentobler, S., et al., *In situ oviduct and uterine pH in cattle.* Theriogenology, 2004. 61(7-8): p. 1419-27.
31. Zhao, Y., et al., *Routes of Cl- transport across the trophectoderm of the mouse blastocyst.* Dev Biol, 1997. 189(1): p. 148-60.
32. Phillips KP, L.M., Claman P and Baltz JM., ed. *Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos.* Vol. 15. 2000, Hum. Reprod. 896-904.
33. Widmaier EP, R.H., Strang KT. , ed. *Female Reproductive Physıology.* . 2004, Human Physiology 9 th Ed., New York; Mc Graw - Hill company, . 659-669.
34. SM., G., *The Endocrine System, .* , (eds. Berne R. M, Levy M. N.) Physiology 4th Ed., St. louis; A Times Mirror Company. , 1998: p. 987-990.
35. Uyar A. Üreme Fizyolojisi. (Elektronik Kaynak) (Erişim: http://www.google.com.tr/#hl=tr&q=Doç.+Dr.+F.+Aytül+UYAR+üreme&oq Erişim Tarihi; 27.02.13).
36. http://www.google.com.tr/search?hl=tr&site=imghp&tbm=isch&source., Erişim tarih: 25.02.13.
37. Beksaç M, D.N., Koç A, Yüksel A., *Obstetrik Maternal Fetal Tıp ve Perinatoloji.* MN. Medikal ve Nobel, 2001.
38. Eppig, J.J., et al., *Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport.* Biol Reprod, 2005. 73(2): p. 351-7.

39. Hogan B, C.F.a.L.E., ed. *Manipulating the mouse embryo.* . ed. 27-33. 1986;, Cold spring harbor laboratory.
40. Sorensen, R.A. and P.M. Wassarman, *Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte.* Dev Biol, 1976. 50(2): p. 531-6.
41. Wassarman, P.M., et al., *Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro.* Adv Exp Med Biol, 1979. 112: p. 251-68.
42. Vanderhyden, B., *Molecular basis of ovarian development and function.* Front Biosci, 2002. 7: p. d2006-22.
43. Biggers, J.D., *Reflections on the culture of the preimplantation embryo.* Int J Dev Biol, 1998. 42(7): p. 879-84.
44. JD., L.J.a.B., ed. *Methods of Enzymology* Vol. 225:. 1993, Guide to techniques in mouse development : Wassarman P.M and Delamphilis M.L. Academic press, San Diego. .
45. Gibb, C.A., et al., *Control of cytosolic pH in two-cell mouse embryos: roles of H(+)-lactate cotransport and Na+/H+ exchange.* Am J Physiol, 1997. 273(2 Pt 1): p. C404-19.
46. KP., B.J.a.P., ed. *Intracellular ion measurements in single eggs and embryos using ion-sensitive fluorophores.In a Comparative Methods Approach to the study of Oocytes and Embriyos, J.D.Richter,ed.(New York and Oxford University Press)*. 1999. 39-82.
47. Grandin, N. and M. Charbonneau, *Intracellular pH and the increase in protein synthesis accompanying activation of Xenopus eggs.* Biol Cell, 1989. 67(3): p. 321-30.
48. Grandin, N. and M. Charbonneau, *The increase in intracellular pH associated with Xenopus egg activation is a Ca(2+)-dependent wave.* J Cell Sci, 1992. 101 (Pt 1): p. 55-67.
49. Johnson, J.D. and D. Epel, *Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation.* Nature, 1976. 262(5570): p. 661-4.
50. JM., B., ed. *pH regulatory mechanism in the mammalianoocyte and early embryo. Ch.8. In: Sodium- Hydrogen Exchanger*. From Molecular to its Role in Disease.(Ed. M Karmazyn, M Avkiran and L Fliegel). Kluwe Academic Publihers, Boston. Pp. . 123-136.
51. Phillips, K.P. and J.M. Baltz, *Intracellular pH change does not accompany egg activation in the mouse.* Mol Reprod Dev, 1996. 45(1): p. 52-60.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana' da doğan Şenay Dağılgan, 1999 yılında Adana Borsa Lisesi' nden, 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Ebelik Bölümü' nden mezun olmuştur. 2007-2010 yıllarında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ebelik Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans eğitimini tamamlayarak, aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.