

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

**FARE OOSİT / ZİGOTUNDA HCO_3^- / Cl^- DEĞİŞTİRİCİ
AKTİVİTESİNİN MAYOTİK MATÜRASYON
SÜRECİNDEKİ DEĞİŞİMLERİ**

Ali ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç.Dr. Şeref ERDOĞAN

**Bu tez çalışması Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından
desteklenmiştir (TF 2006 YL-1).**

ADANA - 2006

KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "Fare Oosit / Zigotunda HCO₃⁻ / Cl⁻ Değiştirici Aktivitesinin Mayotik Matürasyon Sürecindeki Değişimleri" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 05/09/2006


Doç.Dr. Şeref ERDOĞAN
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof.Dr. Ayşe DOĞAN
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi


Prof.Dr. Suna SOLMAZ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

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

Enstitü Müdürü
Prof.Dr. Sait POLAT

TEŞEKKÜR

Öncelikle bir bilim insanı olarak gelişebilmem için her zaman benden desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Şeref ERDOğAN' a sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimimde önemli katkıları bulunan Prof. Dr. Ayşe DOğAN' a en içten teőekkürlerimi sunarım. Bana Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında çalışma olanağı veren ve bu konuda her türlü yardımını esirgemeyen Prof. Dr. S. Sadi KURDAK ve Prof. Dr. Tuncay Özgünen'e minnettar olduğumu belirtmek istiyorum. Yüksek lisans eğitim programında değerli bilgilerini benden esirgemeyen tüm Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine en içten teőekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	
.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Oogenez.....	3
2.2. Folikül Gelişimi.....	5
2.3. Fare Modeli ve Önemi.....	7
2.4. Solüsyonlar.....	8
2.5. Hücre içi İyon Ölçüm Yöntemleri.....	9
2.5.1. Spektrofluorometrik Yöntem ile Hücre içi İyon Ölçümü.....	9
2.5.1.1. Floroforlar ve Özellikleri.....	10
2.5.1.2. Hücrelere Florofor Yükleme Yöntemleri.....	12
2.5.1.3. pH'a Hassas Floroforlar.....	13
2.5.2. Mikrospektrofluorometrik Hücre içi İyon Ölçüm Yöntemi.....	15
2.6. Mikrospektrofluorometre ile Hücre içi pH Kaydı.....	16
2.7. Oositlerde pH _i Düzenlenmesi.....	18
2.8. AE Aktivitesi ve Hesabı.....	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1. Solüsyonlar.....	21
3.2. Kimyasal Maddeler.....	22
3.3. Oosit ve Zigot Eldesi.....	23
3.4. Hücre içi pH Kaydı.....	24
3.5. Cl ⁻ Uzaklaştırma Yöntemi ve AE Aktivite Hesabı.....	26

3.6. Alkaloz İndüksiyonu ve AE Fonksiyonunun Araştırılması.....	27
3.7. İstatistik.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Hücre içi pH (pH_i) Kaydı ve Oosit/Zigotlardaki Dinlenme pH_i (pH_{id}) Değerleri.....	28
4.2. AE Aktivitesinin Saptanması.....	28
4.3. İndüklenmiş Alkalozdan İyileşme.....	32
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Mayoz I'ın profaz fazında olan germinal vezikülü net olarak görünen primer oosit	3
Şekil 2.2	Mayoz I'ın profazından çıkmış ve Germinal Vezikülü yıkılmış Metafaz I (A) ve birinci mayotik bölünmeyi tamamlamış Metafaz II (B) oositler	4
Şekil 2.3	Foliküler gelişimindeki değişik aşamaları ve ilgili yapılarını, korpus luteumu gösteren ovaryum yapılarının şematik sunumu (Bern-Levy'den ³⁵)	7
Şekil 2.4	Orantısız olmayan florofofor Fluo-3'ün 488 nm dalga boyunda uyarılması ile kayıtlanan emisyon spektrumu	11
Şekil 2.5	Ca ²⁺ a hassas Fura-2 florofoforunun 510 nm dalga boyunda toplanan floresan kayıtlarının eksitasyon spektrumu	11
Şekil 2.6	SNARF-1-AM formundaki florofoforun AM metodu ile hücreye yüklenmesi	13
Şekil 2.7	BCECF'in 535 nm dalga boyunda emisyonu toplanmış eksitasyon spektrumu	14
Şekil 2.8	SNARF-1'in 534 nm'de uyarılması ile kayıtlanan emisyon spektrumu	14
Şekil 2.9	pH _i kayıtlarının alındığı ve emisyon ışığının saptayıcısı olarak PMT'nin kullanıldığı mikrospektrofluorometrik kayıt sisteminin şeması	16
Şekil 2.10	BCECF ve SNARF-1'in <i>in situ</i> kalibrasyonu ile çizilmiş kalibrasyon eğrileri (Baltz JM ve Phillips KP'den ¹⁵)	17
Şekil 2.11	HCO ₃ ⁻ /Cl ⁻ değiştiricisinin hücre modelinde çalışma prensibi ve sonuç olarak gelişebilecek hücre içi alkalozu iyileştirmesi (üstte). Dış ortamdan Cl ⁻ 'un uzaklaştırılarak AE'in ters yönde çalışması sonucu hücre içi alkalizasyon oluşturulabilir ve bu oluşma hızından linear regresyon	19

	aracılığıyla AE aktivite hesabı yapılabilir (altta)	
Şekil 3.1	Çalışmada kullanılan Balb/c soyu dışı farelerden biri	20
Şekil 3.2	Fizyoloji Anabilim Dalı Fare Laboratuvarı'nda deneyde kullanılan farelerin yetiştirildiği ortam	21
Şekil 3.3	Süperovülasyon protokolü ile ovaryumdan izole edilmiş GV oosit (A), ampulladan izole edilen MI (B) ve MII (C) oositler ile PN aşamadaki zigotun (D) örnek resimleri	24
Şekil 3.4	Süperovülasyon protokolü ile indüklenmiş ve çiftleştirilmiş dışı farede kopülasyon plağı	24
Şekil 3.5	Kayıtların alındığı TIBDAM laboratuvarındaki mikrospektrofluorometre sistemi.	25
Şekil 3.6	SNARF-1 ile yüklenmiş MI ve MII oositler (n=17) kullanılarak in situ olarak nigerisin/yüksek K ⁺ metodu ile alınmış pH _i kalibrasyon eğrisi	26
Şekil 4.1	GV, MI, MII oositlerde ve PN zigotta Cl ⁻ uzaklaştırma yöntemi ile yapılan pH _i kayıt örnekleri (A) ve bu solüsyona DIDS eklenmesi sonucu elde edilen örnek pH _i kayıtları (B)	30
Şekil 4.2	Cl ⁻ uzaklaştırma yöntemi ile GV, MI, MII oositler ve PN zigot aşama kayıtları ortalama değerleri ile çizilmiş hücre içi pH (pHi) değişimleri	31
Şekil 4.3	GV, MI, MII oositlerinde ve PN zigotlarda Cl ⁻ uzaklaştırma yöntemi ile saptanan AE aktivitesi ve bu aktiviteye DIDS uygulamasının etkisi	31
Şekil 4.4	İndüklenmiş hücre içi alkaloz GV, MI, MII oosit ve PN zigotların verdikleri iyileşme örnek kayıtları (A) ve bu yanıtlara DIDS uygulamasının etkileri (B)	33
Şekil 4.5	İndüklenmiş hücre içi alkaloz GV, MI, MII oosit ve PN zigotların verdikleri iyileşme yanıtlarının ortalama değerler ile çizilmiş grafiği (A). Bu ortalama yanıtların DIDS etkisiyle değişimi (B)	34
Şekil 4.6	GV, MI, MII oositler ve PN zigotlarda indüklenen alkaloz sonucu gelişen pH _{if} değerleri ile pH _{id} değerleri arasındaki	34

fark (ΔpH) ve DIDS uygulamasının bu farklılara olan istatistiksel olarak anlamlı etkisi

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 3.1	Çalışmada kullanılan solüsyonların ayrıntılı içeriği	22
Tablo 4.1	O Cl ⁻ , O Cl ⁻ +DIDS, NH ₄ Cl, NH ₄ Cl+DIDS gruplarına ait oosit/zigotların p _H K _S O _M ortamında kayıtlanan p _H _i _d değerleri (Ort. ± SEM)	29
Tablo 4.2	GV, MI, MII oositlerde ve PN zigotta kayıtlanan AE aktiviteleri ve DIDS uygulamasının bu aktivitelere etkisi (Ort. ± SEM)	29
Tablo 4.3	GV, MI, MII oositlerin ve PN zigotların dinlenme (p _H _i _d) ve NH ₄ ⁺ ile indüklenen alkalozis'e verdikleri iyileşme yanıtları sonucu oluşan p _H _i (p _H _i _f) değerleri ve DIDS uygulamasının bu değerlere etkisi (Ort ± SEM)	32

KISALTMALAR

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

AE: Anyon (HCO_3^-/Cl^-) değiştirici

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

BSA: Sığır serum albumini

cAMP: Siklik adenzin mono fosfat

COC: Kumulus-oosit kompleksi

db cAMP: Dibutiriladenozin 3,5-siklik monofosfat

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

GV: Germinal vezikül

IP: İntraperitoneal

IU: Uluslararası ünite

Karboksi SNARF-1: Karboksi-seminaphthorhodafluor-1

KFHM: K^+ içerikli oosit/zigot 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 dinlenme PH'ı

pH_{if}: Hücre içi final pH'ı

PI: Preimplantasyon

PMSG: Gebe kısrak gonadotropini

PMT: Işık (foton) çoğaltıcı tüp

PN: Pronüklear

SEM: Standart hata

TIBDAM: Tıbbi bilimler deneysel araştırma ve uygulama merkezi

ÖZET

Fare Oosit / Zigotunda $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ Değişirici Aktivitesinin Mayotik Matürasyon Sürecindeki Değişimleri

Büyüyen gelişen fare oositlerindeki hücre içi pH (pH_i) düzenleyici sistemler, mayotik yeterlilik ile kazanılmakta ve Germinal Vezikül (GV) aşamasına ulaştığında tam olarak aktif hale gelmektedirler. Ancak mayotik matürasyon aşamalarında bu düzenleyici sistemlerin inhibe edilebildiği yolunda bulgular mevcuttur. Nitekim asit şoklara karşı oositlerin savunma mekanizmasından biri olan Na^+/H^+ değişiricisinin bu süreçte aktivitesinin baskılandığı saptanmıştır. Diğer yandan asidoza karşı diğer bir savunma mekanizması olan $\text{Na}^+,\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ değişiricisinin bu süreçte gittikçe artan aktivitesi olduğu yolunda bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmada ise, alkali şoklara karşı hücreyi koruyan $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ değişirici (AE) aktivitesinin mayotik matürasyon ile ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmada Balb/c soyu dişi fareler indüklenerek uygun zamanlarda GV, Metafaz I (MI), Metafaz II (MII) oositler, veya kopülasyonları sağlanarak pronükleolar (PN) aşamadaki zigotlar elde edildi. Kültür ve kayıt solüsyonları olarak KSOM esaslı solüsyonlar kullanıldı. SNARF-1-AM ile yüklenmiş olan oosit/zigotlardan mikrospektrofluorometrik yöntem ile ratiometrik olarak pH_i kayıtları alındı.

Hücreleri alkali şoklardan koruyan AE aktivitesi, GV oosit aşamasında yüksek iken ($0,056 \pm 0,008$ pHU/dk) MI ve MII aşamalarında bu aktivite anlamlı olarak baskılandı (sırasıyla, $0,024 \pm 0,006$ pHU/dk ve $0,030 \pm 0,004$ pHU/dk; $p < 0,05$). PN zigot aşamasında ise AE aktivitesi daha yüksek değerlere ulaştı ($0,040 \pm 0,004$ pHU/dk). Çalışılan tüm bu oosit ve zigot aşamalarında belirlenen aktivite DIDS ile anlamlı olarak baskılandı. İndüklenmiş alkali şoklara karşı MI ve MII oositler pH_i 'lerini tam olarak iyileştiremez iken (sırasıyla, $7,18 \pm 0,008$ 'e karşın $7,45 \pm 0,041$; $7,22 \pm 0,002$ 'e karşın $7,43 \pm 0,040$), GV oosit ve PN zigot aşamalarında dinlenme değerlerine yakın olarak iyileşme gerçekleşti (sırasıyla, $7,20 \pm 0,017$ 'e karşın $7,27 \pm 0,029$; $7,16 \pm 0,015$ 'e karşın $7,29 \pm 0,035$).

Oosit gelişiminin önemli bir kilometre taşı olan mayotik matürasyon sürecinde $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ değiştirici aktivitesi baskılanmaktadır. Bu baskılanma fertilizasyon sonrası PN aşamaya kadar devam etmektedir. AE aktivitesindeki bu inhibisyonun fizyolojik önemi henüz bilinmese de, fertilizasyon sürecindeki metabolik aktivasyon ile ilgili olabilir.

Anahtar Sözcükler: Anyon değiştirici, fare, hücre içi pH düzenlenmesi, mayotik matürasyon, oosit

ABSTRACT

Changes of $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ Exchanger Activity During Meiotic Maturation on Mouse Oocyte / Zygotes

Intracellular pH regulatory systems of growing mouse oocytes are acquired with meiotic competence, and when oocyte reaches to germinal vesicle (GV) stage they become full activity. But there are some evidence about these systems are inhibited on meiotic maturation process. It has been determined that activity of Na^+/H^+ exchanger which is defence mechanism against acid shock is inhibited in this process. On the other hand, we found evidence about gradually increasing activity of $\text{Na}^+,\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger which is other defence mechanism against acidosis in this process. The aim of this study was investigate relationship between meiotic maturation and activity of $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger (AE) which protects cells against to alkalosis.

GV, Metaphase I (MI), Metaphase II (MII) oocytes and pronuclear (PN) zygotes were obtained from 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 oocytes/zygotes which were loaded with pH-sensitive fluorophore, SNARF-1-AM.

While AE activity was high at GV stage oocytes ($0,056 \pm 0,008$ pHU/min), this activity was significantly inhibited at MI and MII stages (respectively, $0,024 \pm 0,006$ pHU/min and $0,030 \pm 0,004$ pHU/min; $p < 0,05$). AE activity reached higher level at PN zygote stage ($0,040 \pm 0,004$ pHU/min). Determined all these activities were significantly inhibited by DIDS at studied all oocyte and zygote stages. While pH_i of MI and MII stage oocytes was not completely recover from induced alkalosis (respectively, $7,18 \pm 0,008$ vs $7,45 \pm 0,041$; $7,22 \pm 0,002$ vs $7,43 \pm 0,040$), almost completely recover were occur at GV stage oocytes and PN zygotes (respectively, $7,20 \pm 0,017$ vs $7,27 \pm 0,029$; $7,16 \pm 0,015$ vs $7,29 \pm 0,035$).

$\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger has been inhibited during meiotic maturation process which is a important milestones on development of oocyte. This inhibition has been persisted till PN stage zygote following fertilization. The physiologic significance of

inhibition of AE activity is not known yet but it may be related to metabolic activation during fertilization process.

Key Words: Anion exchanger, mouse, intracellular pH regulation, meiotic maturation, oocyte

1. GİRİŞ

Foliküller içinde birinci mayozun profazında durdurulmuş olan oositin sitoplazmasında, germinal vezikül (GV) net olarak görülmektedir. Foliküler yapıda, oosit çevresinde bulunan granüloza hücreleri oosite ve birbirlerine gap kavşaklarla bağlantılıdır^{1,2}; böylece sinsisyal bir kumulus-oosit kompleksi (COC) oluşturulur. Ovülasyon hipofiz hormonlarınca tetiklendiğinde COC gap kavşak bağlantılarının sonlanmasıyla oosit kaldığı profazdan kurtulur ve GV yıkılır (GVBD)^{2,3,4}. Oosit birinci mayotik metafaza (MI) geçer ve birinci kutup cismini atar; böylece tekrar durdurulacağı ikinci mayotik metafaz (MII) aşamasına ulaşmıştır⁵. Bu süreçte, kumulus hücreleri bir hiyalüronik asit içeren matriks sentezler ve kumulus genişler⁶. Genişlemiş COC, kumulus ile çevrilmiş oositin fertilize olacağı ovidukt içine atılır. Spermin aktive etmesiyle kaldığı MII aşamasından kurtulur, buna bağlı olarak ikinci kutup cismini atar ve sonuç olarak pronükleuslar oluşturularak zigot haline gelir.

Başlıca hücre içi pH (pH_i) düzenleme mekanizmaları, pH_i 'yi düşüren HCO_3^-/Cl^- değiştiricileri (anyon değiştiricileri, AE) ve pH_i 'yi arttıran Na^+/H^+ ile $Na^+, HCO_3^-/Cl^-$ değiştiricileridir^{7,8,9,10,11}. AE, zayıf baz HCO_3^- 'i 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^- 'i hücre içine alırken Cl^- 'u dışarı atar, böylece hücre içi HCO_3^- artışının sonucu pH_i arttırılır^{7,8,9,10,11}. 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^{10,12,13}. Tersine, AE'leri pH_i "ayar noktası"nın üstüne çıktığında aktive edilirler^{12,14}.

İmplantasyon öncesi embriyo gelişimi süresince AE ve NHE aktiviteleri yoğun olarak çalışılmıştır^{15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27}. Ancak son yıllara kadar preovülatuar dönem oosit gelişiminde pH_i düzenlenmesi çalışılmamıştır. Büyüyen-gelişen çıplak oositlerin mayotik yeterliliği kazanmasına kadar asidoz/alkaloza karşı savunmasız olduęu²⁸, ancak bu aşamada pH_i düzenlenmesi için granüloza hücrelerine bağımlı

olduğu ²⁹ son yıllarda gösterilmiştir. Daha sonraki oosit gelişim aşamalarındaki pH_i düzenlenmesi ile ilgili çalışmalardan biri CF1 soyu farelerde yapılmıştır. Bu çalışmada GV aşamasında AE aktivitesi yüksek iken GVBD ile aktivitesinde oldukça azalma saptanmış, oosit MI ve MII aşamasında kaldığı sürece bu düşük aktivitenin devam ettiği rapor edilmiştir ³⁰. Halbuki fertilizasyondan sonraki yaklaşık 8. saatte bu aktivite tekrar en üst değere çıkmakta ve tüm preimplantasyon (PI) aşamadaki embriyonik evrelerde bu yüksek aktivite devam etmektedir ^{16,20,30,31}. Yapılan protein sentez ve taşınmasının inhibisyon çalışmaları aktivitedeki bu değişimin mevcut taşıyıcıların aktivasyonundaki değişimler sonucu olduğunu göstermiştir ³⁰. NHE aktivitesinin benzer upregülasyonu hamster oositinin fertilizasyonundan sonra da bulunmuştur ¹⁹. Bunun gibi bir düzenleme Balb/c soyu fare oosit/zigot NHE aktivitesinde de belirlenmiştir ³². Bunun ötesinde, NBCE aktivitesinin de mayotik matürasyon aşamalarına bağlı olarak düzenlendiği bulguları mevcuttur (Erdoğan Ş ve Çetinkaya A, yayınlanmamış bulgu); Balb/c soyu farelerde NBCE aktivitesinin GV ve MI aşamalarında düşük iken MII oosit aşamasında artmakta ve PN zigotta ise asidoza karşı etkin bir savunma sistemi oluşturmaktadır.

AE aktivitesi fare preimplantasyon aşamasındaki embriyo gelişimi süresince devam etmektedir ^{20,21,33}. HCO_3^-/Cl^- değişimi dinlenim pH_i 'ını kontrol eder ve embriyo gelişimi için gereklidir ²¹. İnsan embriyolarının da hem AE hem de NHE'lerini eksprese ettiği ve böylece pH_i 'ı düzenlediğinin rapor edilmesi ¹⁸ fare modelinde yapılan çalışmaların değerini daha da arttırmaktadır.

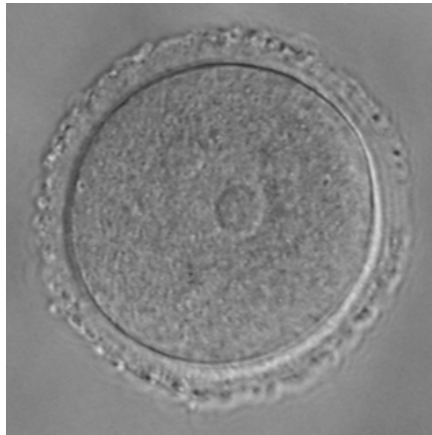
Bu tezin amacı, mikrospektrofluorometrik kayıt sistemi ile oosit/zigotlarda pH_i kaydı yaparak oositlerin gelişiminde önemli bir kilometre taşı olan mayotik matürasyon sürecinde, pH_i düzenleyicilerinden HCO_3^-/Cl^- değiştirici aktivitesinin ve değişim paterninin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oogenez

Gonadlardaki dişi germ hücrelerinin gelişerek olgun hale gelmesi sürecine **Oogenez** denir. Herhangi bir evredeki dişi germ hücrelerine **oosit (yumurta)** denir. Oosit, oogoniumdan gelişir.

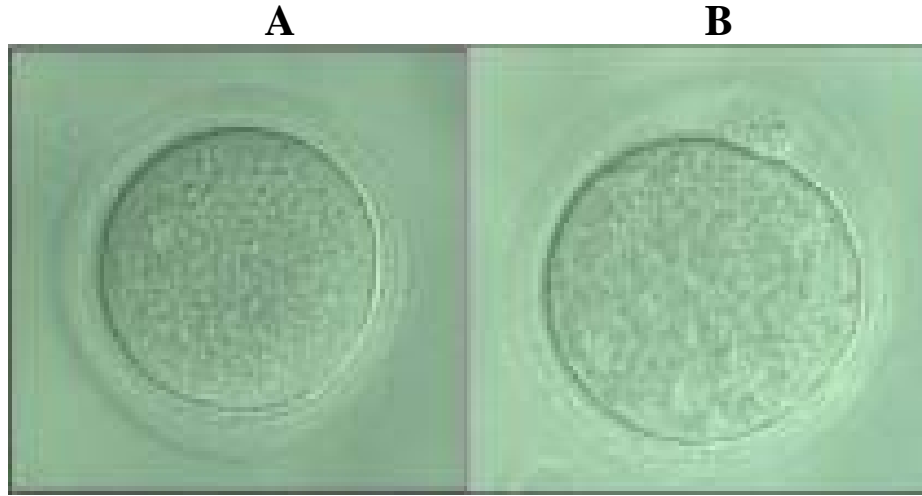
Fötal yaşamın erken dönemlerinde primer germ hücreleri mitoz ile çoğalarak oogonium denilen dişi ana germ hücrelerini yapar. Fötal yaşamın 3. ayı civarında oogoniumlarda bölünme durur ve bundan sonra yeni germ hücreleri oluşmaz. Mitozla çoğalma durduktan sonra hacimsel büyüme başlar. Fetusda, oogoniumların tümü DNA'larını kopyalayarak birinci mayoz bölünmeye başlayacak olan primer oositlere gelişir, ancak bölünmeyi tamamlayamazlar. Primer oositler, mayoz I'in profaz fazının diploten aşamasında durdurulurlar. Böylece insanda 40-50 yıl kadar sürebilecek olan oldukça uzun süren bu aşamada bölünme olmadan hücrenin hacmi artar. Bu aşamadaki oositin mikroskopik görüntüsünde hücre ortasında bariz bir GV vardır (Şekil 2.1). Buna göre doğumdaki tüm germ hücreleri 46 kromozom içeren primer oositlerdir ve kromozomlarının her biri iki kardeş kromatidlidir. Hücreler mayotik durgunluk evresindedirler^{5,34,35}.



Şekil 2.1. Mayoz I'in profaz fazında olan germinal vezikülü net olarak görünen primer oosit.

Bu durum puberteye, overlerdeki yenilenen aktivitelerin başlangıcına kadar sürer. Puberte ile birlikte her ay pek çok primer oosit büyümeğe 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 (Şekil 2.2A). 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 (Şekil 2.2B). Birinci Polar cisim denilen diğeri çok küçüktür ve sekonder oosite yapışmıştır. Böylece sekonder oosit, kromozomların yarısını, fakat besinden zengin sitoplazmanın hemen hemen tümünü alır

34,35



Şekil 2.2. Mayoz I'in profazından çıkmış ve Germinal Vezikülü yıkılmış Metafaz I (A) ve birinci mayotik bölünmeyi tamamlamış Metafaz II (B) oositler.

İkinci mayotik bölünme, ovülasyondan sonra tuba uterinada olur; fakat sadece sekonder oosit fertilize olursa, bu bölünme sonucunda her bir kardeş hücre, her biri tek kromatidli 23 kromozom alır. Bu durumda da kardeş hücrelerden biri sitoplazmanın tamamına yakını korurken, ikinci polar cisim denilen diğeri küçük ve fonksiyonsuzdur. Özetle, oogenezin net sonucu her primer oositte 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 uterusu yerleşene kadar zigota gerekli olan maddeleri sağlar. Fertilize olmamış oosit, ovülasyondan 24-48 saat sonra canlılığını kaybederek yok olur.

2.2. Folikül Gelişimi

Overdeki yaşamları boyunca, oositler folikül olarak bilinen yapılarda bulunurlar. Foliküller, başlangıçta granüloza hücreleri denilen tek bir hücre tabakasıyla çevrili bir primer oositten oluşan primordial foliküller olarak bulunurlar. Primordial folikül evresinden daha ileriye gelişim, oositin boyutunda bir artış, granüloza hücrelerinin birçok tabakaya proliferasyonu ve oositin iç tarafındaki granüloza hücrelerinden zona pellusida denilen kalın bir materyal tabakasıyla ayrılmasıyla karakterizedir (Şekil 2.3). Granüloza hücreleri östrojen, ovülasyondan hemen önce az miktarda progesteron ve peptid hormon inhibin salgılar^{34,35}.

Zona pellusidanın varlığına rağmen, granüloza hücrelerinin iç tabakası, zona pellusidayı geçen ve oositle yarıklı bağlantılar (gap junction) oluşturan sitoplazmik uzantılar yoluyla, oositle çok yakından ilişkili kalır. Bu yarıklı bağlantılar sayesinde, besinler ve kimyasal haberciler oosite geçer^{34,35}. Örneğin, granüloza hücreleri, oositte mayotik durmayı sağlamakta etkili olan cAMP gibi bir yada daha çok faktör sağlar; gelişmekte olan oositin hücre içi pH'ını düzenler²⁹. Granüloza hücreleri birbirleriyle de yarıklı bağlantıları vardır, böylece tüm yapı bir sinsisyum olarak çalışır.

Folikül granüloza hücrelerinin mitozuyla geliştikçe, granüloza hücrelerini çevreleyen bağ dokusu hücreleri farklılaşır ve granüloza hücrelerinden östrojen salınmasında önemli bir rol oynayan teka tabakalarını oluşturarak sekonder folikül halini alır. Bundan kısa süre sonra, folikül içindeki primer oosit tam boyutuna ulaşır (80-100 µm) ve granüloza hücrelerinin ortasında, salgıladıkları sıvının sonucu olarak sıvı ile dolu bir aralık olan antrum oluşmaya başlar (Erken antral folikül).

Bazı primordiyal foliküllerin sekonder evreye ilerleyişi devamlı ortaya çıkar, böylece herhangi bir anda mevcut foliküllerin çoğu halen primordiyaldır, fakat nispeten daima sabit sayıda preantral foliküller bulunur. Her menstrüel siklusun başlangıcında, bu preantral foliküllerin 10-25'i antral foliküllere gelişmeye başlar. Siklusta ilk hafta bir seçim işlemi ortaya çıkar: sadece bir folikül, baskın folikül, gelişmeye devam eder ve genişlemeye başlamış olan diğerleri atreziye (dejenerasyon) uğrar. Bu foliküllerdeki oositler de ölür.

Atrezi antral foliküllerle sınırlı değildir, gelişimin tüm evrelerinde foliküller atreziye uğrayabilir. Atrezi in utero başlar, böylece doğumda 2-4 milyon olan folikül ve oosit sayısı, fetusta daha önce bulunanların sadece küçük bir kısmıdır. Atrezi daha sonra tüm prepübertyal yaşam boyunca devam eder, böylece aktif üreme yaşamı başladığında sadece 200.000-400.000 folikül vardır.

Baskın folikül antrumunun genişlemesi sonucu olarak, oositi çevreleyen granüloza hücre tabakaları, antrum içine uzanan bir tümsek oluştururlar ve buna kumulus ooforus denir. Oositin hemen çevresindeki kumulus hücrelerine korona radiata denir. Ovülasyon yaklaştıkça, oosit sekonder oosit haline gelmek için birinci mayotik bölünmesini tamamlar. Olgun folikül (Graaf folikülü) o kadar genişler ki (çapı yaklaşık 1.5 cm) over yüzeyinden dışarı doğru şişlik yapar.

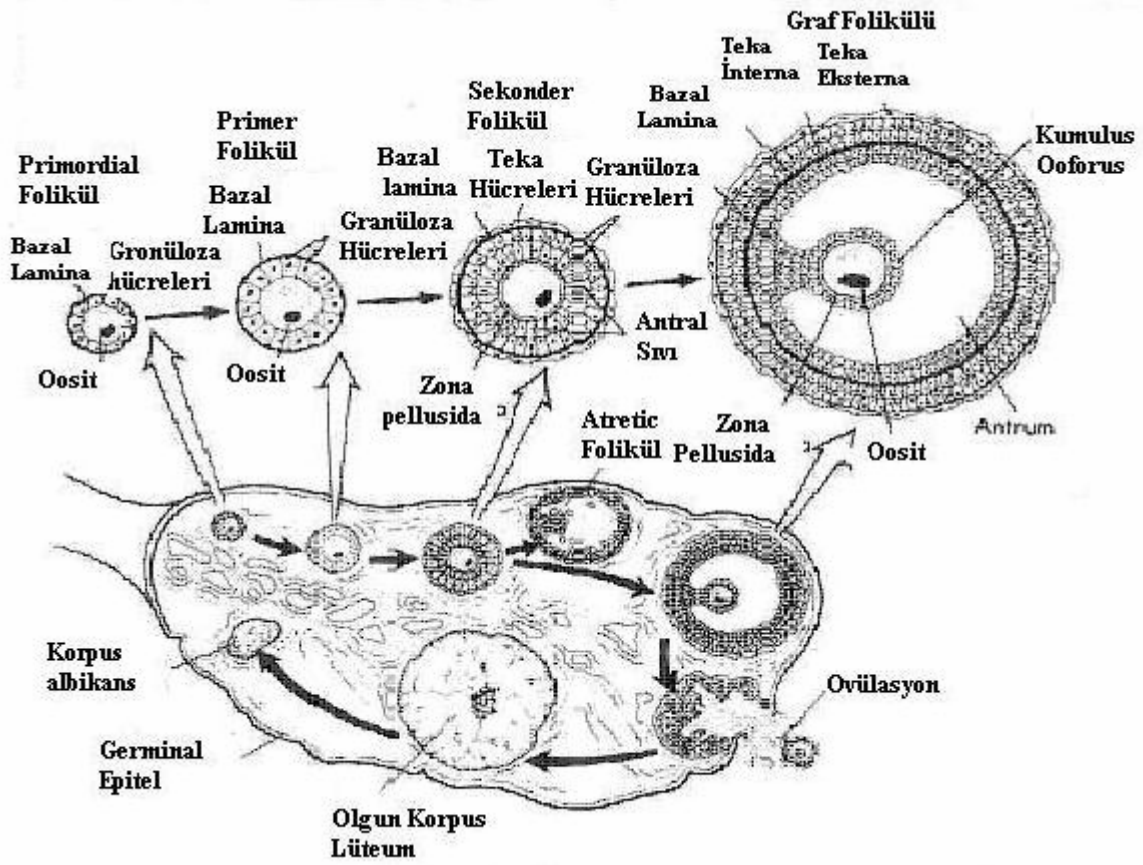
Folikül ve overin birleştikleri yerde ince duvar yırtıldığında ovülasyon gerçekleşir. Sıkıca yapışmış zona pellusida ve granüloza hücreleriyle çevrilmiş olan sekonder oosit, over yüzeyine taşınır. Bu olayların tümü menstrüel siklusun yaklaşık 14 gününü alır.

Olgun folikül antrum sıvısını ve yumurtasını boşalttıktan sonra, overdeki kalıntısı antrum çevresinde kollabe olur ve hızlı bir değişime uğrar. Granüloza hücreleri büyük ölçüde genişler, yeni oluşan kapillerler içeriye ilerler. Gland benzeri, östrojen, progesteron ve inhibin salgılayan tüm bu yapıya korpus luteum denir (Şekil 2.3). Korpus luteum yaklaşık 10 gün içinde maksimum gelişime ulaşır ve sonra tuba uterinaya atılmış olan oosit döllenmezse hızla dejenere olur. Menstrüasyona ve yeni bir menstrüel siklusun başlamasına, korpus luteum fonksiyonunun kaybı yol açar^{34,35}.

Böylece, over fonksiyonu yönünden menstrüel siklus, süresi yaklaşık eşit olan ve ovülasyonla ayrılan iki evreye bölünebilir:

- 1) Tek bir olgun folikül ve sekonder oositin geliştiği foliküler evre;

2) Ovulasyondan sonra başlayan ve korpus luteumun kaybına kadar süren lüteal evre³⁴.



Şekil 2.3. Foliküler gelişimdeki değişik aşamaları ve ilgili yapılarını, korpus luteumu gösteren ovaryum yapılarının şematik sunumu (Bern-Levy'den³⁵).

2.3. 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^{3,21,36,37}. Yavru farelerin ilk 21 günlük gelişimi sürecinde izlenen oositlerin büyüme gelişme dönemi insandaki primer oositten sekonder oosite kadar olan döneme benzerdir^{28,38,39}. Ayrıca ovülasyon öncesi ve sonrası dönem

oositlerin gelişim özelliklerinin ^{3,21,36,40}, hücre içi pH düzenleyicileri gibi mekanizmaların aydınlatılması ^{16,29,30} *in vitro* insan oosit matürasyon 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.

2.4. Solüsyonlar

In vitro oosit/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, KH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂, NaHCO₃, laktat, pirüvat, glukoz, glutamin, EDTA, sığır serum albumini (BSA) ve antibiyotikler bulunmaktadır. Medyumlardaki belirtilen içeriklerden NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄ elektrolit ve osmotik dengeyi sağlarken, KH₂PO₄, NaHCO₃ tampon olarak kullanılmaktadır. Laktat, pirüvat, glukoz enerji substratları, glutamin ise organik osmolit olarak işlev görmektedir. EDTA ağır metal kontaminasyonuna karşı, BSA ise oosit/embriyoların zemine veya birbirlerine yapışmalarını önlemek için medyumlara eklenmektedir. Bu medyum oluşturma prensipleri çerçevesinde bir çok 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 ^{41,42}.

KSOM medyumunu, esas olarak HCO₃⁻ tamponu içerdiği için, oosit/embriyo gelişimi için yüksek CO₂ konsantrasyonlu (%5) ortamlar gerekmektedir. Dolayısı ile CO₂'li inkübatörler kültür çalışmaları için uygundur. Bu medyum kullanılarak yapılan embriyo kültür çalışmalarında (%5 CO₂, 37 °C'de) %70'i trofoblast aşamasına gelebilmektedir. Ancak bu medyum, normal atmosfer ortamında yapılacak uzun süreli çalışmalar için uygun değildir. *In vitro* ortamda oosit/embriyo toplama işleminde, normal atmosfer şartlarında pH'ı stabil kalabilen bir medium gerekmektedir. HEPES tamponu eklenmesi ve buna karşılık HCO₃⁻'in azaltılması ile KSOM medyumunun bir modifikasyonu olan “flash and holding medium” (KFHM) oluşturulmuştur ⁴¹. HEPES canlı sistemlerin kullandığı tampon sistemlerinden olmadığı için, uzun süreli kültürlerde KFHM kullanılması uygun değildir.

Oosit/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 laktatı azaltılmış solüsyonlar oluşturulabilmekte ²⁷ ve bu kullanım amacı nedeniyle pHKSOM olarak tanımlanmaktadır ¹⁵.

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 sistemleri incelenebilmektedir ¹⁵.

2.5. Hücre içi İyon Ölçüm Yöntemleri

Hücre içi iyon ölçümü için belli başlı 2 yöntem bulunmakta olup bunlar: **1.** İyon sensitif mikroeletrodlar ile potansiyometrik, **2.** Floresan indikatörleri ile kimyasal ölçüm (Spektrofluorometrik) yöntemleridir. Uygulanabilirliğinin kolaylığı, duyarlılığının 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 mikroeletrodlar ile potansiyometrik ölçüm yönteminde de hücre içi iyonların ölçümü mümkün ise de yavaş ve yerel değişimlere yanıt verebilmesi, ancak büyük boyuttaki hücrelerde kullanılabilirliği, kalibrasyonunun güçlüğü nedeniyle bu yöntem kısıtlı modellerde kullanılabilir.

2.5.1. Spektrofluorometrik Yöntem ile Hücre içi İyon Ölçümü

Hedeflenen hücre içi iyon için özün 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 yapılabilir: **1.** Hücre içi iyon seviyelerinin statik ölçümü; kuvet tipi spektrofluorometre bu amaç için yeterli olmaktadır. **2.** Hücre içi dinamik iyon değişimleri, bilgisayar kontrollü ve mikroskoba

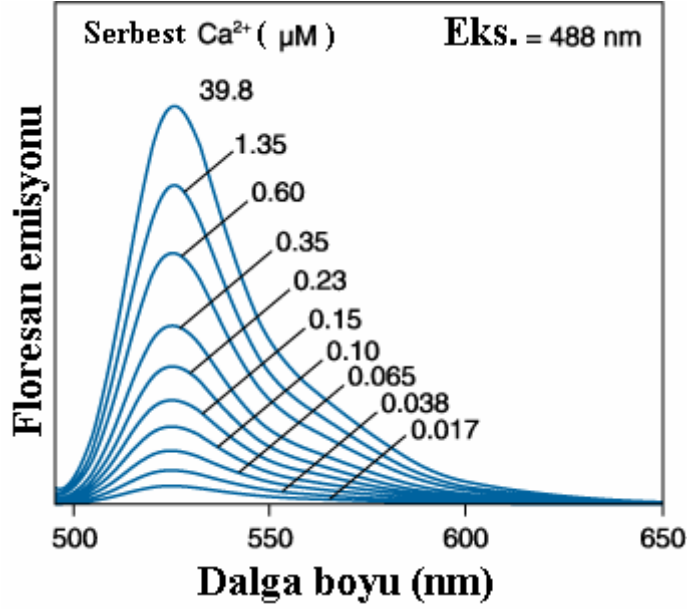
adapte edilebilen spektrofluorometre (mikrospektrofluorometrik yöntem) gerekmektedir. Amaçlanan ister statik ister dinamik hücre içi iyon seviyelerinin araştırılması olsun, hücrelere iyon hassas floresan özellikte bir prob (florofor) yüklenmesi gerekmektedir.

2.5.1.1. Floroforlar ve Özellikleri

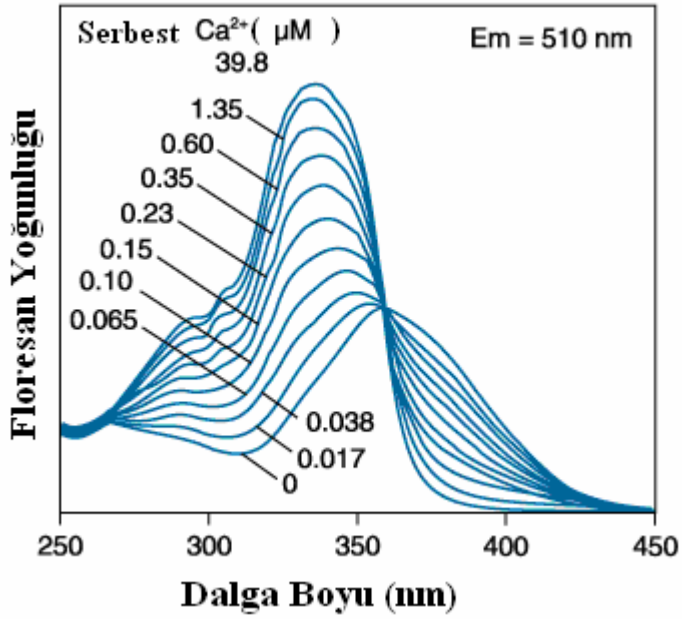
Floroforlar, özgün oldukları iyonla bağlandıklarında floresan özelliklerinde değişiklik olan maddelerdir. Bu değişen floresan özelliklerine göre floroforlar da sınıflara ayrılmaktadır:

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

2. Orantısız (ratiometric) floroforlar: Bu tip floroforlar özgün iyonla bağlandıklarında eksitasyon veya emisyon spektrumunda kayma gerçekleşir. Serbest ve spesifik iyonla bağlı florofor formları emisyon ışımalarının, pik yaptığı dalga boyları birbirine oranlanarak iyon seviyeleri hakkında bilgi elde edilir. Bu yaklaşım ile orantısız olmayan floroforlardaki dezavantajlar ortadan kaldırılmakta, dolayısıyla daha güvenilir kayıtlar yapılması olanaklı olmaktadır. Bu sınıftaki floroforlara örnek olarak, Ca^{2+} hassas Fura-2 (Şekil 2.5), pH'a hassas SNARF-1 verilebilir.



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



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

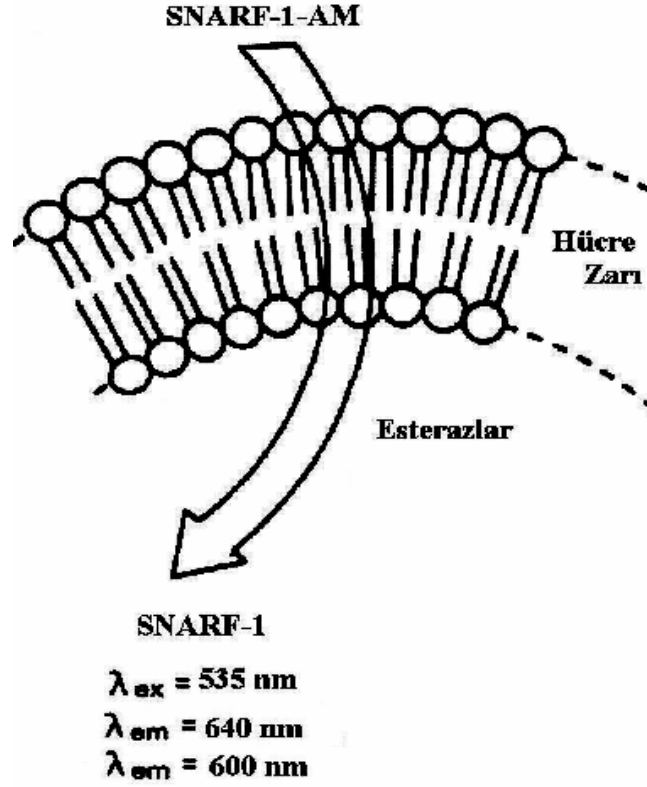
2.5.1.2. Hücrelere Florofor Yükleme Yöntemleri

Hücre içi iyon ölçümünün yapılabilmesi için kullanılacak floroforun hücre içine yüklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla çeşit yöntemler geliştirilmekle birlikte sıklıkla kullanılanlar mikroinjeksiyon ile direkt yükleme ve floroforun asetometil ester formu (AM formu) ile basit şekilde inkübe etmedir ¹⁵.

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 gerektiği için 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.

AM metodu: Hemen tüm floroforların, moleküllerinin içinde bazı hidrofilik gruplar, karboksilatlar vardır. Dolayısı ile floroforların yüksek su çözünürlüğü, hücre zarlarından geçmesi için uygun değildir, çünkü lipid hücre zarı hidrofobiktir. AM metodu 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 hapsolür (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 oosit/zigotlarına 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.



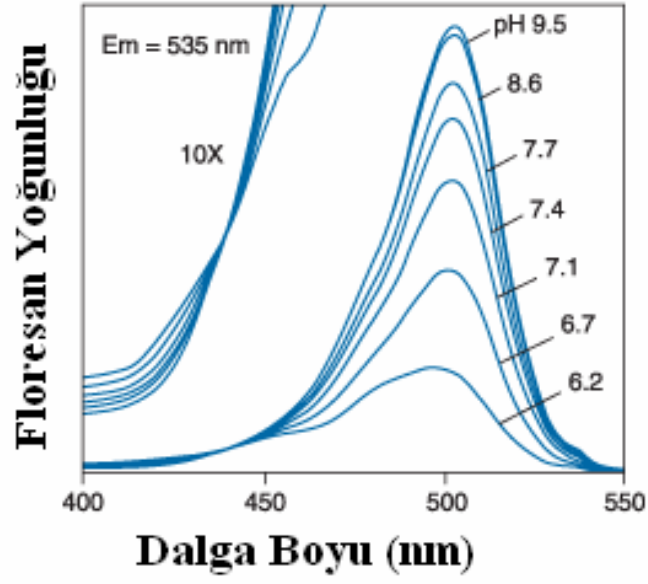
Şekil 2. 6. SNARF-1-AM formundaki floroforun AM metodu ile hücreye yüklenmesi.

2.5.1.3. pH'a Hassas Floroforlar

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

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

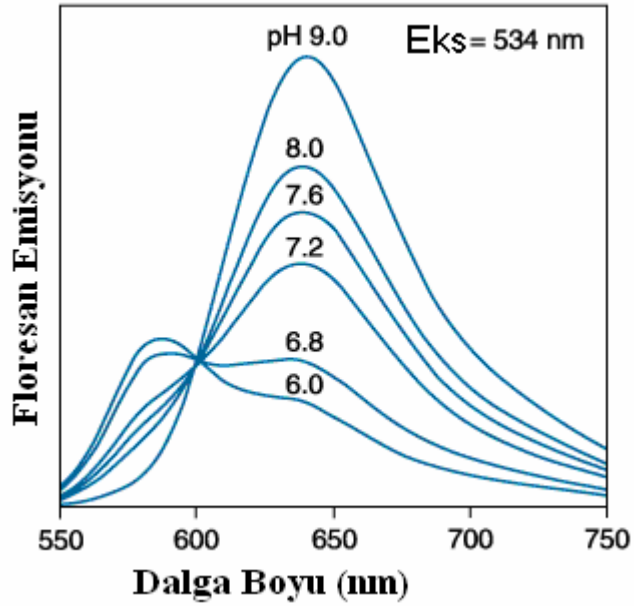
pH 7.0 civarındaki pH değişimlerine hassas olarak geliştirilen ilk florofordur. BCECF, 530 nm'de sabit emisyon kaydı yapılırken, 450 nm'de uyarıldığında pH'a hassas olmayan yanıt verir; 500 nm'de uyarıldığında ise artan pH'ya bağlı olarak emisyon ışığında artış olur (Şekil 2.7). Dolayısı ile 450/500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



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

b) 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.



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

2.5.2. Mikrospektrofluorometrik Hücre içi İyon Ölçüm Yöntemi

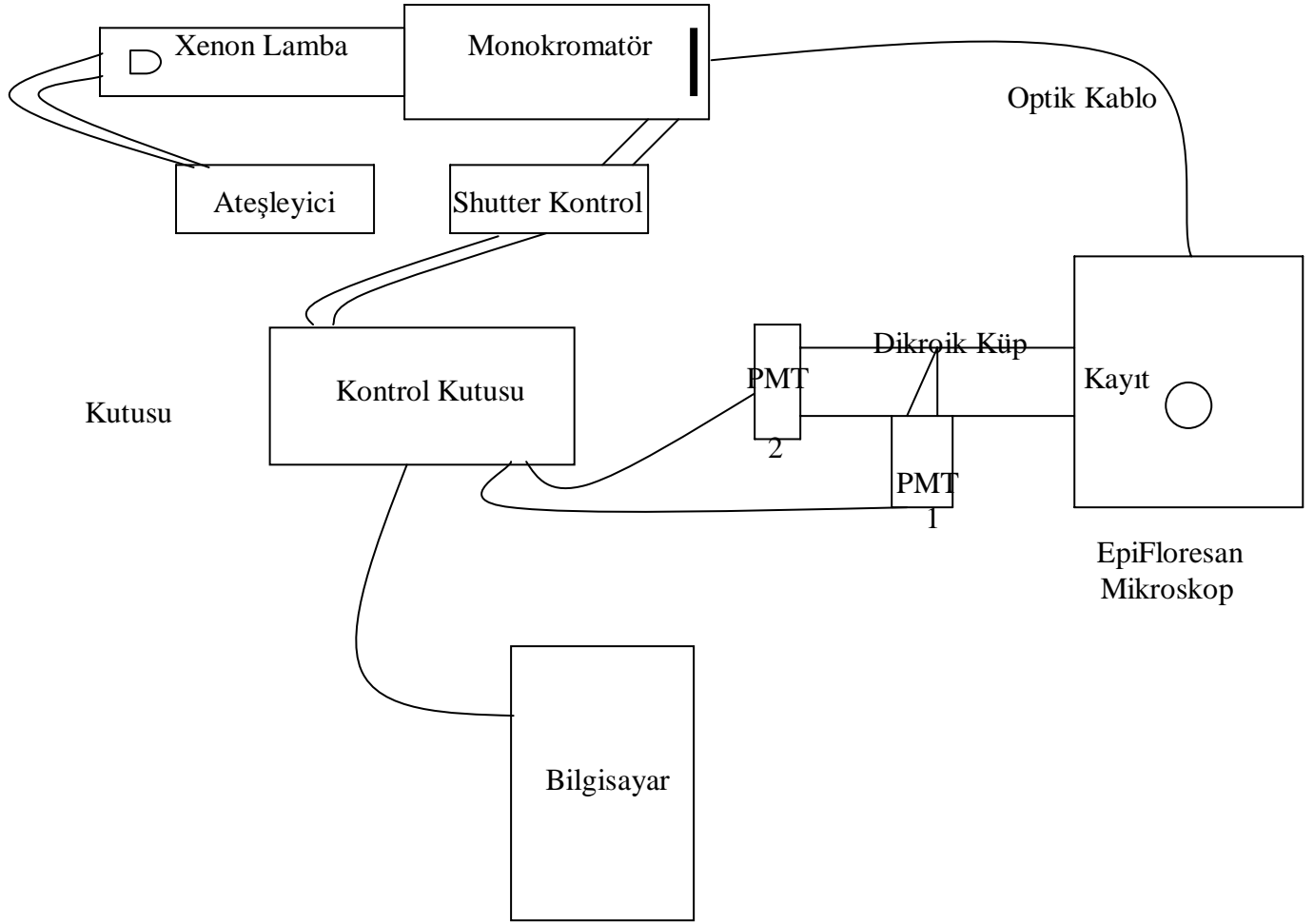
Dinamik hücre içi iyon ölçümleri için mikrospektrofluorometrik yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde Xenon lamba ile sağlanan uyarıcı ışık, bir fiber optik kablo ile uygun filtrelerden geçirilerek mikroskoptaki biyolojik materyale aktarılmaktadır. Uyarılan materyalden toplanan emisyon ışınları ise ışık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

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 çözümülemesi olmaması gibi bir dezavantajı da vardır.

Kamera (Imaging, görüntüleme sistemi), piksellerden meydana gelen ışık algılayıcılarından oluşmaktadır. Daha yüksek ışık şiddeti gerektirmesi, yavaş olması, nispeten dar spektruma hassas olması dezavantajları iken uzaysal çözümülemesi önemli bir avantajıdır.

Çalışmamızda kullanılan PMT'li mikrospektrofluorometrik tekniğin şematik sunumu Şekil 2.9'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. Materyalden gelen emisyon ışığı dikroik bir küp aracılığı ile örneğin 600 nm'deki ışığı PMT 1'e, 640 nm'deki ışığı ise PMT 2'ye yönlendirilmektedir.

Böylece PMT'ler sayesinde 640 ve 600 nm'lerde toplanan emisyon ışıkları bir kontrol kutusu aracılığı ile bilgisayara aktarılmaktadır. Toplanan bu bilgiler özel tasarlanmış bir software ile işlenmektedir.



Şekil 2.9. pH_i kayıtlarının alındığı ve emisyon ışığının saptayıcısı olarak PMT'nin kullanıldığı mikrospektrofluorometrik kayıt sisteminin şeması.

2.6. Mikrospektrofluorometre ile Hücre içi pH Kaydı

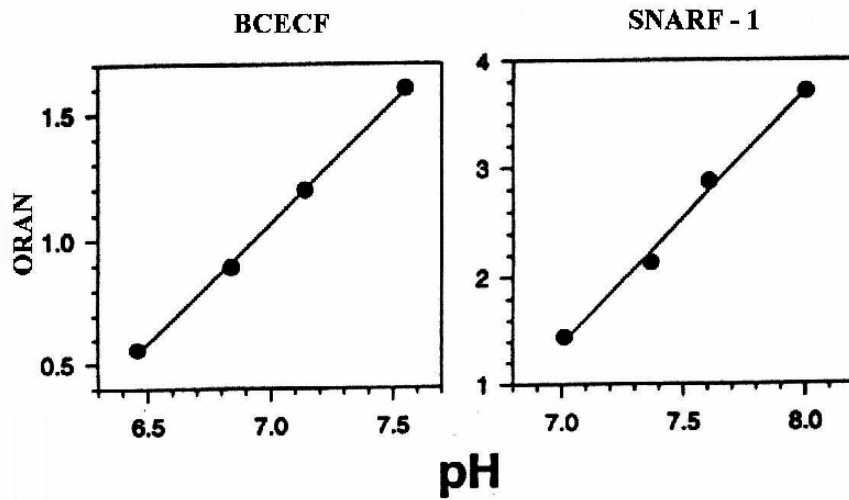
pH_i ve bunun düzenlenmesi en temel homeostatik hücresel mekanizmalardan biridir. Dolayısı ile bu parametrenin incelenmesi, temel hücresel düzenleyici mekanizmalar için önemli bilgiler verebilmektedir. Özellikle oosit/embriyo gibi modellerde gelişimsel değişimleri önemli bir araştırma alanı olmaktadır.

pH_i kaydı için, öncelikle öngörülen pH aralıklarına uygun pH'a hassas bir florofoz seçilmelidir. Alkali sınırlarda çalışılacaksa belirtildiği gibi SNARF-1 daha uygun bir seçenektir. Biyolojik materyale uygun şekilde yüklenen florofoz, mikroskopdaki kayıt odacığına yerleştirilir ve eksitasyon ışığı biyolojik materyale uygulanır. Bu SNARF-1 için 535 nm'dir ve emisyon ışıkları 640 ve 600 nm'lerde ayrı

ayrı saptanır. Ve 640/600 nm oranı hesaplanarak 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

15

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 °C'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 μ g/ml, nigerisin dozu ise 10 μ g/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 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. BCECF ve SNARF-1'in *in situ* kalibrasyonu ile çizilmiş kalibrasyon eğrileri (Baltz JM ve Phillips KP'den ¹⁵).

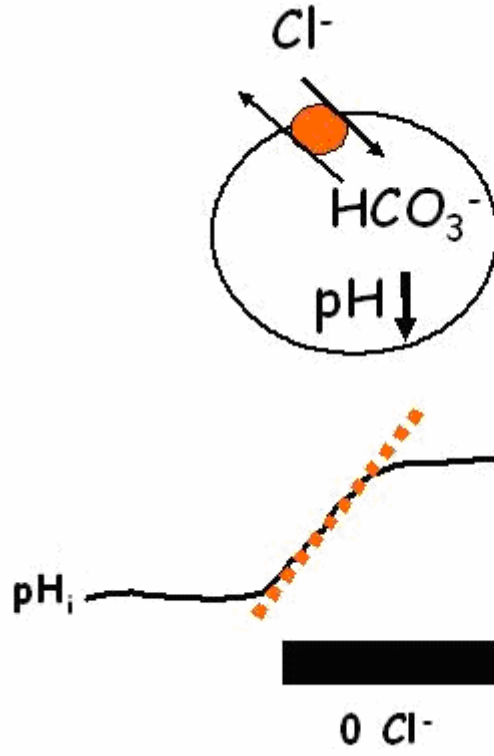
2.7. Oositlerde pH_i Düzenlenmesi

Oositin değişen çevre koşullarından korunmak için geliştirdiği pH_i düzenlemesi gibi birçok mekanizması vardır. Hücre için hayati öneme sahip olan pH_i düzenlenmesinde, pH'yı düşüren HCO₃⁻/Cl⁻ değiştiricileri (anyon değiştiricileri, AE), ve pH_i arttıran Na⁺/H⁺ ile Na⁺, HCO₃⁻/Cl⁻ değiştiricileri (sırasıyla, NHE ve NBCE) rol oynamaktadır. AE, zayıf bir baz HCO₃⁻'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 HCO₃⁻ ı hücre içine alırken Cl⁻ u dışarı atar, böylece hücre içi HCO₃⁻ artışının sonucu pH_i arttırılır. Bu pH_i düzenleme mekanizmaları hücre içi pH değişimlerine hassas olup, pH_i değişimleri ile aktif hale gelirler.

2.8. AE Aktivitesi ve Hesabı

AE, pH_i'nın belli bir değerin üzerine çıkması ile aktive olmaktadır. Bu ayar noktası pH_i'ın 7,10-7,30 olduğu değerlerdir. Ayar noktası hücrenin metabolik değişimleri ile değişebilmektedir ²¹. AE aktivitesi DIDS gibi ilaçlarla inhibe edilmektedir. Dolayısı ile DIDS, AE varlığı veya fonksiyonunun teyidi için özgün bir inhibitör olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

AE aktivitesi için hücre içinde HCO₃⁻, hücre dışında ise Cl⁻ konsantrasyon farkının olması gereklidir. Hücre dışında yeterince Cl⁻ olmadığı zaman değiştirici ters yönde çalışabilmekte, yani HCO₃⁻'ı hücre içine alırken, Cl⁻'u hücre dışına taşımaktadır. Böylece AE aktivitesi ile hücre içinde alkaloz gelişmektedir. Alkalozun oluşum hızı da AE aktivitesi hakkında bilgi vermektedir ¹⁵. Alkalozun oluşum hızının linear regresyon eğrisi ile bu aktivite hesaplanabilmektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. AE'in hücre modelinde çalışma prensibi ve sonuç olarak gelişebilecek hücre içi alkalozu iyileştirmesi (üstte). Dış ortamdan Cl^- 'un uzaklaştırılarak AE'in ters yönde çalışması sonucu hücre içi alkalizasyon oluşturulabilir ve bu oluşma hızından linear regresyon aracılığıyla AE aktivite hesabı yapılabilir (altta).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yetiştirilmiş 104 adet Balb/c (6-8 haftalık) soyu dişi fare kullanıldı (Şekil 3.1) ve bu farelerden superovülasyon protokolü ile elde edilen 881 oositten kayıt alındı. Fareler yetiştirildikleri laboratuvarında 12 saat aydınlık ve karanlık (18:00-06:00) döngüde tutuldu. Ortamın sıcaklığı (21 ± 1 °C) ve nemi (% 40-60) devamlı kontrol altında tutuldu. Farelerin yetiştirildiği Fizyoloji Anabilim Dalı hayvan laboratuvarı Resim 3.2'de gösterilmiştir. Tüm işlemler, 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.



Şekil 3.2. Fizyoloji Anabilim Dalı Fare Laboratuvarı'nda deneyde kullanılan farelerin yetiştirildiği ortam.

3.1. Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan tüm solüsyonlar KSOM esaslı olarak hazırlandı. Bu solüsyonun içeriği Tablo 3.1'de verilmiştir. Oosit/zigot 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 ²⁷ Na laktat 9 mM azaltıldı (Na laktat 1 mM'düşürülürken NaCl 104 mM'e çıkarıldı) (Tablo 3.1). Ayrıca BSA bu solüsyonlara eklenmedi. Böylece florofor yükleme solüsyonu pHKFHM, dinlenim-kontrol 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. 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 _p HKSOM (mM)	NH ₄ Cl _p HKSOM (mM)
NaCl	95	95	104	104	-	69
KCl	2.5	2.5	2.5	2.5	-	2.5
KH ₂ PO ₄	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
MgSO ₄ .7H ₂ O	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
EDT A (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 ₄ Cl	-	-	-	-	-	35
Na glukonat	-	-	-	-	104	-
K glukonat	-	-	-	-	2.5	-
Ca (glukonat) ₂	-	-	-	-	5.6	-
BSA	1 mg/ml	1 mg/ml	-	-	-	-

3.2. Kimyasal Maddeler

Solüsyonların hazırlanmasında gerekli tüm kimyasallar maddeler Sigma'dan sağlandı. Karboksiseminaphthorhodafluor-1-asetoksimetil ester (SNARF-1-AM, Moleküler Probes C-1271), Valinomisın (Sigma V-0627) dimetil sulfoksidde, 4,4'-Diisocyanbatostilbene-2,2'-disulfonik asit disodyum tuzu (DIDS, Sigma D-3514) stok solüsyonu 0.1 M KHCO₃'da, dibutiriladenozin 3,5-siklik monofosfat (db cAMP, Sigma D-0627) stok solüsyonu suda hazırlandı. Nigerisin ise (Sigma N-7143) etanol içinde çözüldü.

3.3. Oosit ve Zigot Eldesi

a. GV Aşamasındaki Oosit Eldesi

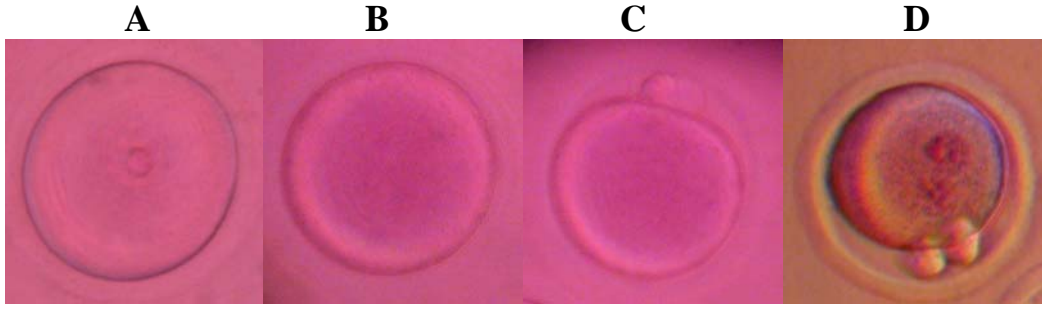
Deney saatinden 48 saat önce dişi farelere 5 IU intraperitoneal (IP) olarak gebe kısarak serum gonadotropin (PMSG, Sigma G-4877) injeksiyonu yapıldı. Servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülen deney hayvanı diseke edilerek ovaryumları çıkarıldı. KFHM + BSA ortamında bistüri kullanılarak ovaryumlar kıyıldı. Mikroskop altında kriterlere uygun GV aşamasındaki oositler (Şekil 2.1) toplandı. GV oositlerin çevresindeki gevşek granüloza hücreleri dar çaplı pastör pipetler kullanılarak mekanik olarak uzaklaştırıldı. Bu şekilde elde edilmiş örnek GV oosit Şekil 3.3A'de verilmiştir. GV çalışmalarının tüm aşamalarında mayotik arrestin devamını sağlamak için ortama 100 µM db cAMP eklendi.

b. MI ve MII Aşamalarındaki Oosit Eldesi

Dişi farelere, PMSG injeksiyonundan 48 saat sonra IP olarak 5 IU insan koryonik gonadotropin (hCG, Sigma CG-5) verildi. hCG injeksiyonunda 18-20 saat sonra MI ve MII aşamasındaki oositler ampullardan toplandı. Oositlerin çevresindeki kumulus hücreleri 75 µg/ml hiyalorinidaz (Sigma H-3506) ile uzaklaştırıldı. Ardından oositler KFHM+BSA ile 3 defa yıkandı. Uygun MI ve MII oositler seçilerek (Şekil 3.3B ve C) deneye alındı.

c. PN Zigotun Eldesi

PMSG injeksiyonundan 48 saat sonra hCG indüksiyonu yapılan dişi, erkek fare ile aynı kafese konularak çiftleşmeleri sağlandı. Ertesi sabah kopülasyon plağı pozitif olan dişinin (Şekil 3.4), hCG injeksiyonundan 22 saat sonra ampulları çıkarıldı. 75 µg/ml hiyalorinidaz ile kumulus hücreleri uzaklaştırılan zigotlar yine 3 defa KFHM+BSA ile yıkandı. Mikroskop altında PN'ları net olarak görünen zigotlar (Şekil 3.3D) seçilerek deneye alındı.



Şekil 3.3. Süperovülasyon protokolü ile ovaryumdan izole edilmiş GV oosit (A), ampulladan izole edilen MI (B) ve MII (C) oositler ile PN aşamadaki zigotun (D) örnek resimleri.



Şekil 3.4. Süperovülasyon protokolü ile indüklenmiş ve çiftleştirilmiş dişi farede kopülasyon plağı.

3.4. pH_i Kaydı

Elde edilen GV, MI, MII oositler ve PN zigotlar, 5 μ M SNARF-1-AM içeren pHKFHM'de 37 °C'de 30 dk inkübe edilerek yüklendi. Uygun yüklenen oosit/zigotların sitoplazmaları mikroskop altında pembesi renk almaktadır. Yükleme solüsyonu pHKFHM olduğu ve BSA içermediği için yüklemeler, oosit/zigotların zemine

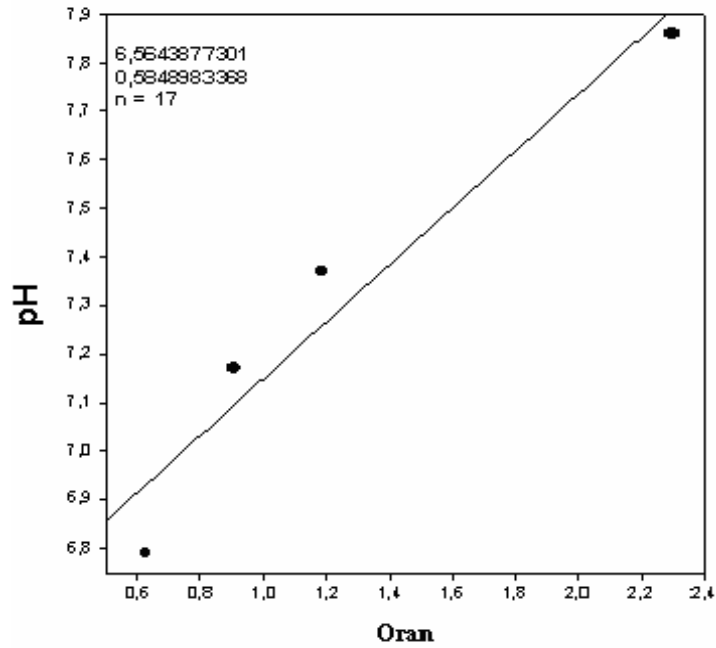
yapışmalarını önlemek için %1 jelatin ile kaplanmış saat camlarında gerçekleştirildi. Dış ortamdaki SNARF-1'in ortamdan tamamen uzaklaştırılması için pHKFHM ile 3 kez yıkandı. Yüklü ve yıkılmış oosit/zigotlar zemini lamel ile kaplanmış kayıt odacığına aktarıldı. Ortamda BSA olmadığı için oosit/zigotlar lamele yapışarak stabil hale geldi. Kayıt odacığı invert floresan mikroskoba (Nikon TE 2000-U) yerleştirildi. Kayıt odacığına, solüsyonu değiştirmek için perfüzyon, %5 CO₂ - %95 hava karışımı ile gazlanmasını sağlayacak havalandırma düzeneği yerleştirildi. Kayıt odacığı, solüsyon 37 °C'de sabit olacak şekilde sıcaklık kontrol ünitesi (PTC-20) ile kontrol edildi.

Kayıt odacığına yerleştirilen SNARF-1-AM ile yüklü oosit/zigotların bulunduğu solüsyon pHKSOM ile değiştirildikten sonra stabilizasyon için 10 dk beklendi ve 535 nm dalga boyundaki eksitasyon ışığı ile uyarıldı. 640 nm ve 600 nm dalga boylarındaki emisyonları PMT'ler kullanılarak saptandı. pH'ya hassas olan 640 nm emisyon yanıtı ve pH'ya hassas olmayan 600 nm emisyon yanıtı Felix programı ile kayıtları. Zemin değerleri çıkarıldıktan sonra 640/600 oranı pH_i değişimlerinin takibi için hesaplandı. Tüm kayıtlar 37 °C'de %5 CO₂ - % 95 hava karışımı ile gazlandırılarak yapıldı. Kayıtlar 25 sn'de bir (0.04 Hz) alındı. Çalışmada pH_i kayıtları, Ç.Ü Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM) laboratuvarındaki mikrospektrofluorometre sistemi ile gerçekleştirildi (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Kayıtların alındığı TIBDAM laboratuvarındaki mikrospektrofluorometre sistemi.

SNARF-1-AM ile orantısal olarak yapılan kayıt pH değerlerine, K^+ gradiyentini ortadan kaldırmak için Valinomisin eklenmiş Nigerisin/yüksek K^+ metoduna göre çevrildi. Bu çevrimde kullanılan örnek bir kalibrasyon eğrisi Şekil 3.6'de görülmektedir. Dinlenim pH_i değerleri şu şekilde saptandı: Oosit/zigotların pHSOM'a aktarılmasının ardından stabilizasyon için 10 dk beklendi, daha sonra alınan kontrol kayıtlarının 5.-10. dakikalar arasındaki değerlerin ortalaması dinlenim pH_i değeri olarak belirlendi.



Şekil 3.6. SNARF-1 ile yüklenmiş MI ve MII oositler (n=17) kullanılarak *in situ* olarak Nigerisin/Yüksek K^+ metodu ile alınmış pH_i kalibrasyon eğrisi.

3.5. Cl^- Uzaklaştırma Yöntemi ve AE Aktivite Hesabı

Oosit/zigotlar'dan pHSOM ile 10 dk istirahat pH_i 'ı alındıktan sonra solüsyon $0 Cl^-$ pHSOM 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^{15,28,29} (Şekil 2.11). AE

aktivitesi pH_i 'nin dakikadaki değişimi (pHU/dk) olarak verildi. $0 Cl^-$ pPKSOM solüsyonunda oosit/zigotlardan 20 dk pH_i kaydı alındı.

Cl^- uzaklaştırma yöntemi ile oluşan hücre içi alkalozun AE aktivitesi sonucu geliştiğini teyit etmek için AE inhibitörü olan DIDS (500 μM) kullanıldı. DIDS eklenmiş $0 Cl^-$ pPKSOM ortamında anlamlı bir hücre içi alkaloz gelişmedi.

3.6. Alkaloz İndüksiyonu ve AE Fonksiyonunun Araştırılması

Oosit/zigolarda alkaloz indüksiyonu için 35 mM NH_4^+ kullanıldı. Bu konsantrasyonda kullanılan NH_4^+ oosit/embriyolarda 0,5-0,6 pH birimi kadar alkaloz geliştirebilmektedir¹⁵. Oosit/zigotlarda indüklenen bu alkalozdan AE aktivitesi ile iyileşme derecesi, 20 dk sonunda pH_i 'ın dönebildiği değer (pH_{if}) olarak ifade edildi. pH_{if} değeri, iyileşme eğrisinden nonlinear regresyon (birinci dereceden eksponensiyel) testi ile hesaplandı. İyileşme sonucu dönebildiği pH_{if} değeri ile dinlenme pH_i (pH_{id}) değerleri arasındaki fark AE aktivitesi ve dolayısı ile fonksiyonel olup olmadığı konusunda bilgiler vermektedir²⁸.

Oosit/zigotların indüklenen alkalozdan iyileşmelerinin AE aktivitesi sayesinde olduğunun teyidi yine 500 μM DIDS ile yapıldı. NH_4Cl pPKSOM ortamına eklenen DIDS ile gerçekteşen pH_{if} , kontrol kayıtlarının değerleri ile karşılaştırıldı.

3.7. İstatistik

Çalışmada $0 Cl^-$, $0 Cl^-+DIDS$, NH_4Cl pPKSOM, NH_4Cl pPKSOM+DIDS uygulama gruplarında oosit/zigotların verdikleri yanıtlar tek yollu ANOVA ile karşılaştırıldı. Post hoc olarak Tukey testi uygulandı. Aynı aşamadaki oosit/zigotların uygulama grupları arasındaki karşılaştırmalar için t-testi, NH_4Cl pPKSOM ve NH_4Cl pPKSOM+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 ve nonlinear regresyon analizleri ise bu program kullanılarak hesaplandı. Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verildi. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. pH_i Kaydı ve Oosit/Zigotlardaki pH_{id} Değerleri

0 Cl⁻ uygulama grubunun GV aşamasındaki oosit pH_{id} değeri hariç, tüm uygulama gruplarının (0 Cl⁻, 0 Cl⁻+DIDS, NH₄Cl, NH₄Cl+DIDS) pHSOM solüsyonunda alınan pH_{id} değerleri oosit/zigotlar arasında anlamlı bir fark göstermedi (Tablo 4.1). Aynı şekilde, farklı uygulama gruplarının aynı aşamadaki oositler ve zigotlar arasında da anlamlı farklılık saptanmadı.

4.2. AE Aktivitesinin Saptanması

Oosit/zigotlardaki AE aktivitesi, ortamdaki Cl⁻ uzaklaştırılarak saptandı. Bu yöntem ile ters yönde çalışan AE aktivitesi, hücre içi alkalinizasyona neden olmaktadır. GV, MI, MII oositler ve PN zigotlarda bu yöntem ile yapılmış örnek kayıtlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1A'da sunulmuştur. AE aktivitesinin saptanmasında gelişen hücre içi alkalozun başlangıç eğiminin linear regresyonu alındı. Ortalama değerler ile çizilen ve AE aktivite hesabında kullanılan grafik Şekil 4.2'de, bu şekilde hesaplanan değerler ise Tablo 4.2'de verilmiştir. GV aşamasındaki oosit AE aktivitesi, MI ve MII aşamalarındaki oositlerin AE aktivitesinden anlamlı olarak yüksek saptandı (p<0,05). Buna karşılık GV oosit ile PN zigot AE aktiviteleri anlamlı farklılık göstermedi (p>0,05).

DIDS inhibisyonu altında kaydedilen AE aktivite örnek kayıtları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1B'de verilmiştir. Tüm oosit aşamalarında ve zigotta kayıtlanan AE aktivitesi, inhibitörü olan DIDS ile, anlamlı olarak baskılandı (p<0,05, Tablo 4.2, Şekil 4.3). DIDS inhibisyonu altında saptanan AE aktivitesi, çalışılan tüm aşamalar arasında anlamlı farklılık göstermedi. AE aktivitesinin ve DIDS inhibisyonu sonucu değişimin gösterildiği toplu karşılaştırmalar ise Şekil 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. O Cl⁻, O Cl⁻+DIDS, NH₄Cl, NH₄Cl+DIDS gruplarına ait oosit/zigotların pHKSOM ortamında kayıtlanan pH_{id} değerleri (Ort. ± SEM).

	O Cl ⁻	O Cl ⁻ +DIDS	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl+DIDS
GV	7,24±0,013* (N=8, n=52)	7,18±0,017 (N=7, n=51)	7,20±0,017 (N=6, n=106)	7,19±0,006 (N=6, n=89)
MI	7,21±0,020 (N=8, n=61)	7,19±0,019 (N=7, n=61)	7,18±0,008 (N=7, n=51)	7,18±0,012 (N=5, n=33)
MII	7,19±0,012 (N=7, n=44)	7,19±0,019 (N=7, n=61)	7,22±0,024 (N=6, n=38)	7,19±0,013 (N=5, n=53)
PN	7,17±0,016 (N=7, n=35)	7,19±0,010 (N=6, n=47)	7,16±0,015 (N=6, n=47)	7,20±0,015 (N=5, n=53)

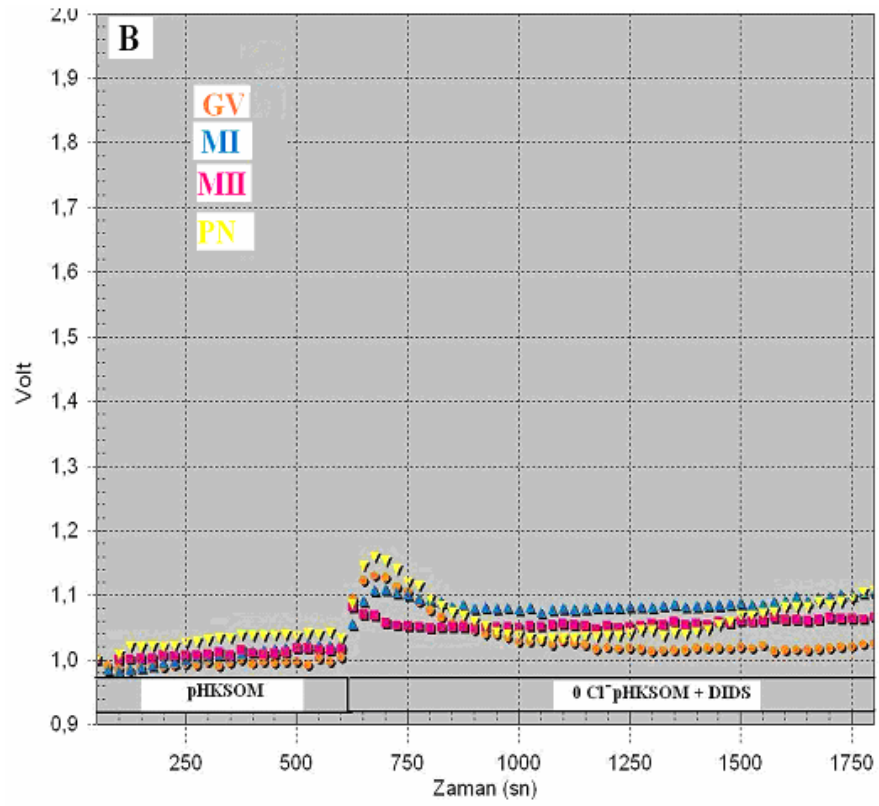
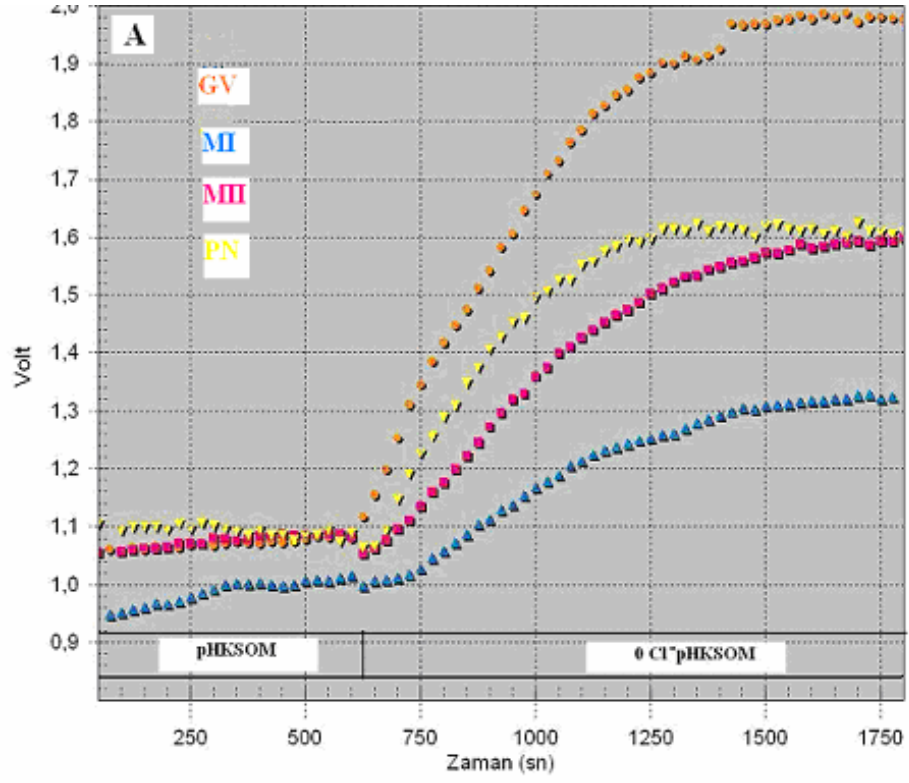
*, aynı uygulama grubu PN zigot değerine göre anlamlı farklılık (p<0,05).
N, kullanılan fare sayısı; n, kayıt alınan oosit/zigot sayısı.

Tablo 4.2. GV, MI, MII oositlerde ve PN zigotta kayıtlanan AE aktiviteleri ve DIDS uygulamasının bu aktivitelere etkisi (Ort. ± SEM).

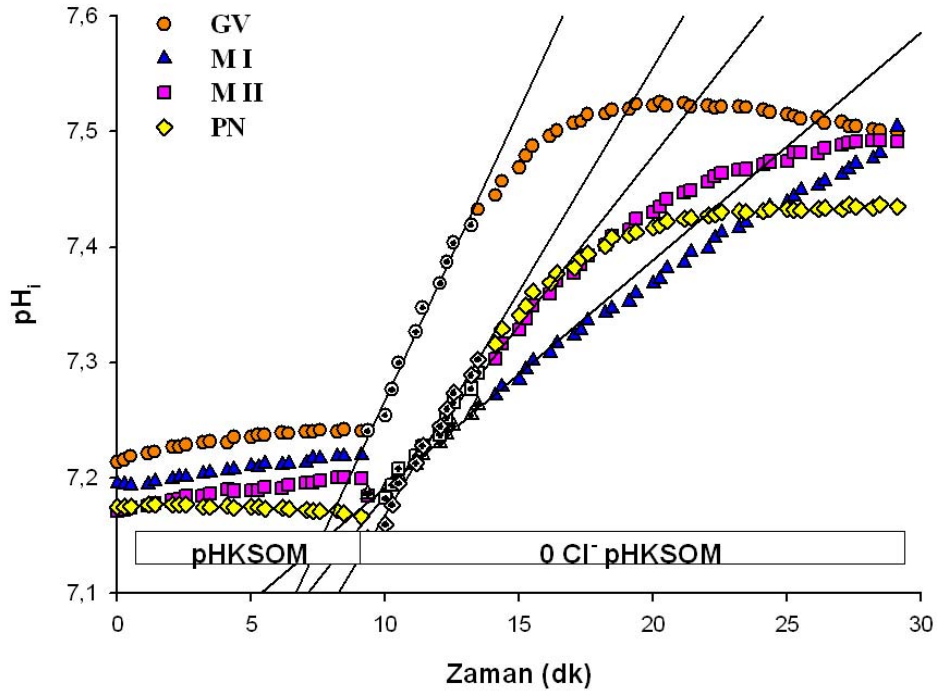
	0 Cl ⁻ ortamında AE Aktivitesi (pHU/dk)	0 Cl ⁻ + DIDS ortamında AE Aktivitesi (pHU/dk)
GV	0,056±0,008 (N=8, n=52)	0,001±0,000*** (N=7, n=51)
MI	0,024±0,006* (N=8, n=61)	0,002±0,001** (N=7, n=61)
MII	0,030±0,004* (N=7, n=44)	0,003±0,001** (N=6, n=57)
PN	0,040±0,004 (N=7, n=35)	0,002±0,001** (N=6, n=47)

*, 0 Cl⁻ GV oosit değerine göre anlamlı farklılık (p<0,05),

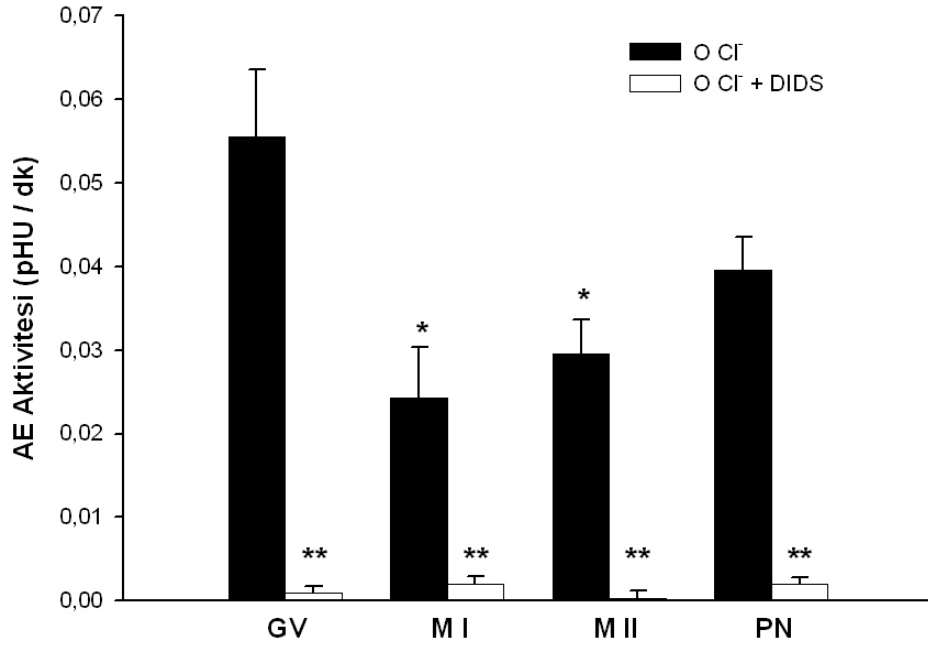
**, Aynı aşama oosit/zigot 0 Cl⁻ değerlerine göre anlamlı farklılık (p<0,05).



Şekil 4.1. GV, MI, MII oositlerde ve PN zigotta Cl⁻ uzaklaştırma yöntemi ile yapılan pH_i kayıt örnekleri (A) ve bu solüsyona DIDS eklenmesi sonucu elde edilen pH_i örnek kayıtları (B).



Şekil 4.2. Cl⁻ uzaklaştırma yöntemi ile GV, MI, MII oositler ve PN zigot aşama kayıtları ortalama değerleri ile çizilmiş pHi değişimleri.



Şekil 4.3. GV, MI, MII oositlerinde ve PN zigotlarda Cl⁻ uzaklaştırma yöntemi ile saptanan AE aktivitesi ve bu aktiviteye DIDS uygulamasının etkisi (*, GV oosite göre; **, aynı aşama 0 Cl⁻ değerine göre anlamlı farklılık, p<0,05)

4.3. İndüklenmiş Alkalozdan İyileşme

Oosit ve zigotlarda hücre içi alkalozu indüklemek için 35 mM NH₄⁺ kullanıldı. NH₄Cl pHKSOM ortamında indüklenen bu alkalozu verdikleri iyileşme yanıtının örnek kayıtları Şekil 4.4A'da, ortalama değerler ile çizilen grafiği ise Şekil 4.5A'da verilmiştir. Dinlenme pH_{id} değerleri ve alkalozdan iyileşme sonucu gelebildikleri yeni hücre içi pH (pH_{if}) değerleri Tablo 4.3'de sunulmuştur. GV oosit ve PN zigot iyileşme yanıtları diğer oositlerden anlamlı olarak daha iyi iken yine de pH_{if} değerleri pH_{id} değerlerine göre anlamlı olarak yüksek kaldı. DIDS inhibisyonu altında alkalozdan iyileşme yanıtları MII dışındaki oosit aşamalarında ve zigotta anlamlı olarak farklı idi; pH_{if} değerleri yüksek seviyelerde kaldı. DIDS etkisi altında iyileşme yanıtlarının örnek kayıtları Şekil 4.4B'de, ortalama değerler ile çizilmiş grafiği ise Şekil 4.5B'de verilmiştir.

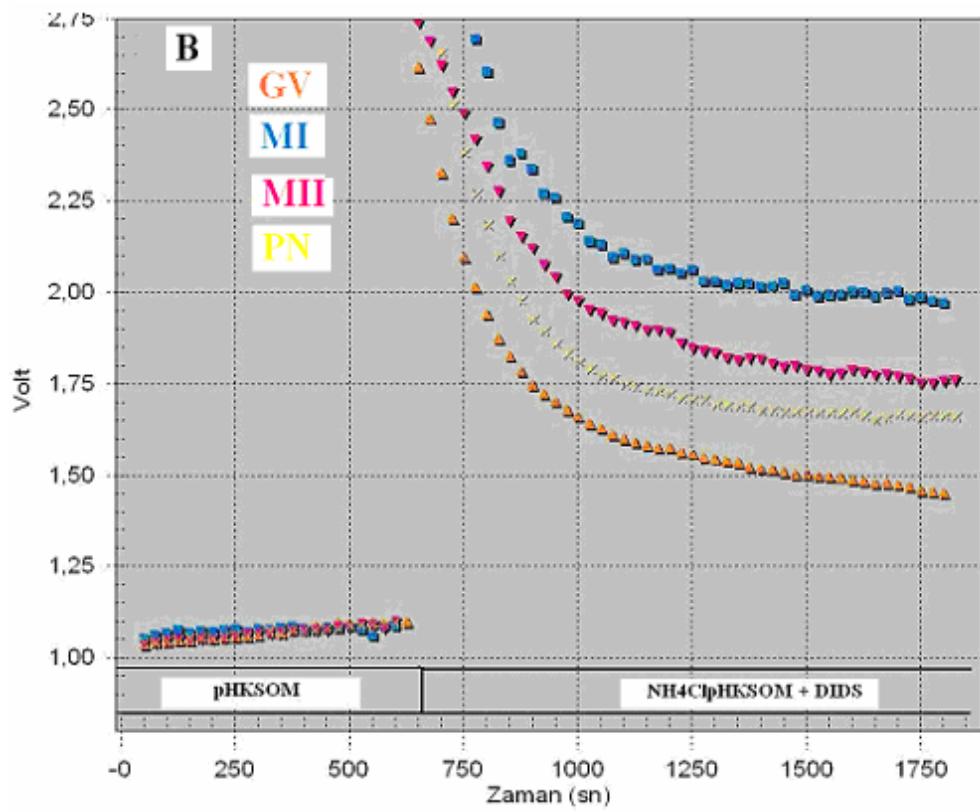
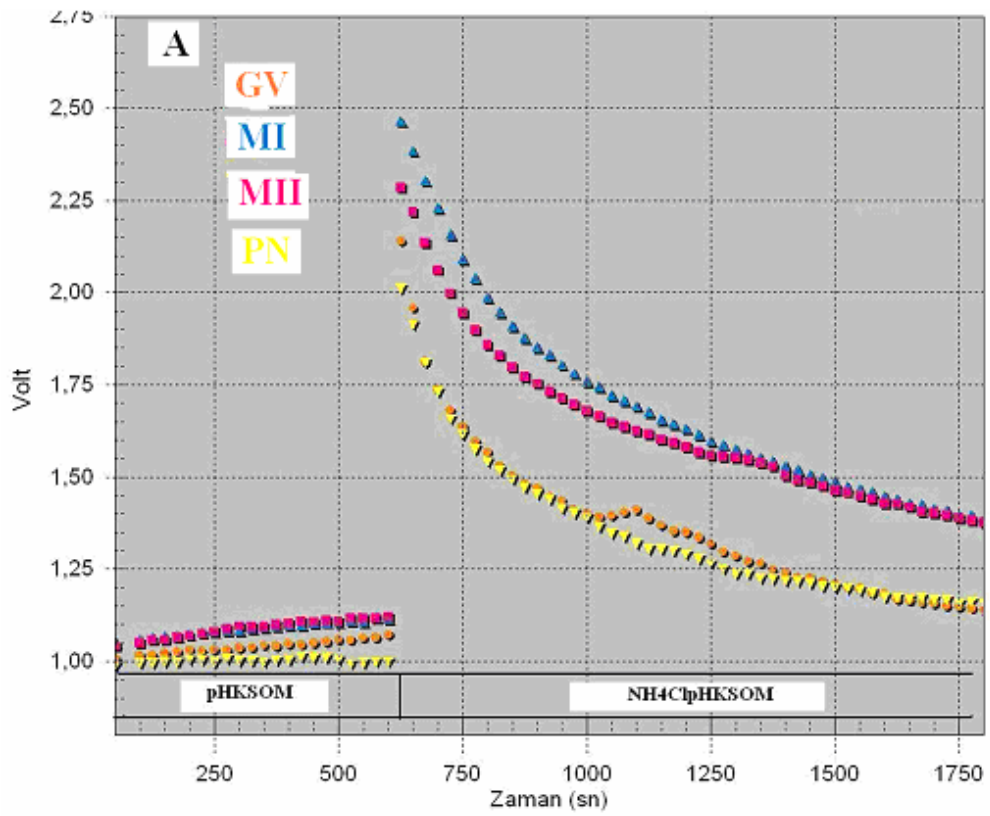
Oosit/zigotların NH₄Cl ve NHCl pHKSOM + DIDS gruplarında pH_{if} değerleri ile pH_{id} arasındaki farklar ile çizilmiş grafiği Şekil 4.6'da görülmektedir. Bu grafikte, indüklenen alkalozdan GV oositin ve PN zigotun pH_{id} değerlerine yakın değerlere dönebildiği, MI ve MII oositlerde ise bunun sınırlı kaldığı görülmektedir. Tüm aşamalarda DIDS bu değerleri anlamlı olarak baskılamıştır.

Tablo 4.3. GV, MI, MII oositlerin ve PN zigotların dinlenme (pH_{id}) ve NH₄⁺ ile indüklenen alkalozis'e verdikleri iyileşme yanıtları sonucu oluşan pH_i (pH_{if}) değerleri ve DIDS uygulamasının bu değerlere etkisi (Ort ± SEM).

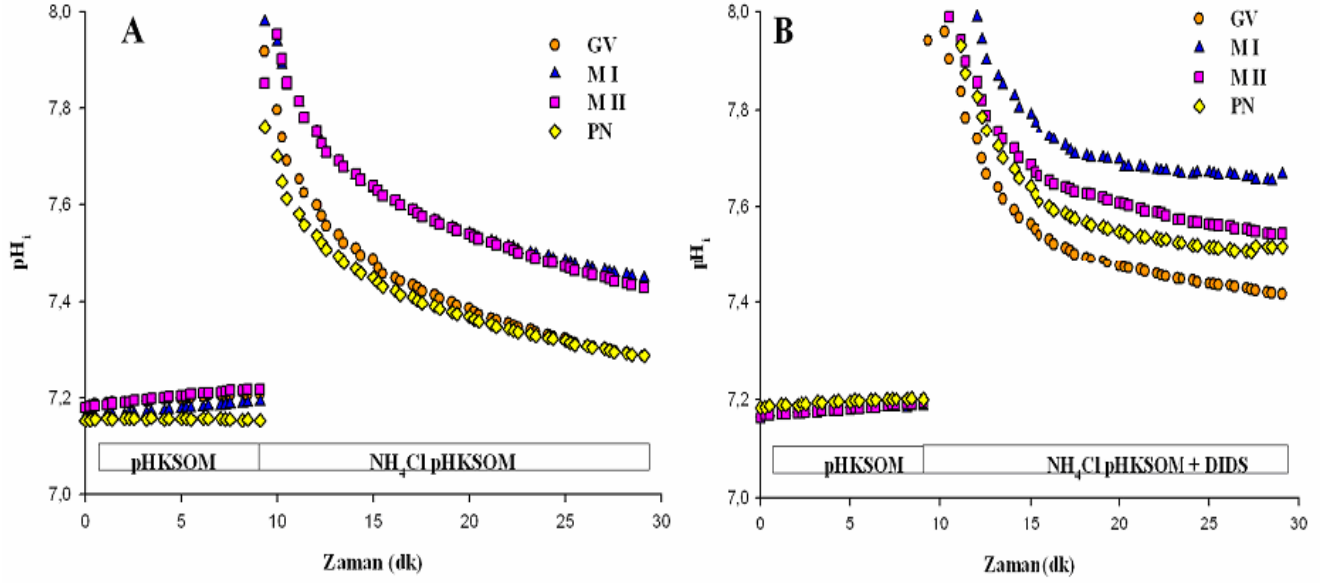
	NH ₄ Cl		NH ₄ Cl + DIDS	
	pH _{id}	pH _{if}	pH _{id}	pH _{if}
GV	7,20±0,017 (N=6, n=106)	7,27±0,029 [*]	7,19±0,006 (N=6, n=89)	7,43±0,044 ^{**}
MI	7,18±0,008 (N=7, n=51)	7,45±0,041 [*]	7,18±0,012 (N=5, n=33)	7,66±0,053 ^{**}
MI	7,22±0,002 (N=6, n=38)	7,43±0,040 [*]	7,19±0,013 (N=5, n=53)	7,54±0,056
PN	7,16±0,015 (N=7, n=50)	7,29±0,035 [*]	7,20±0,015 (N=5, n=53)	7,52±0,032 ^{**}

^{*}, NH₄Cl uygulamasındaki aynı aşamada oosit/zigot pH_{id} değerine göre anlamlı farklılık (p<0.05),

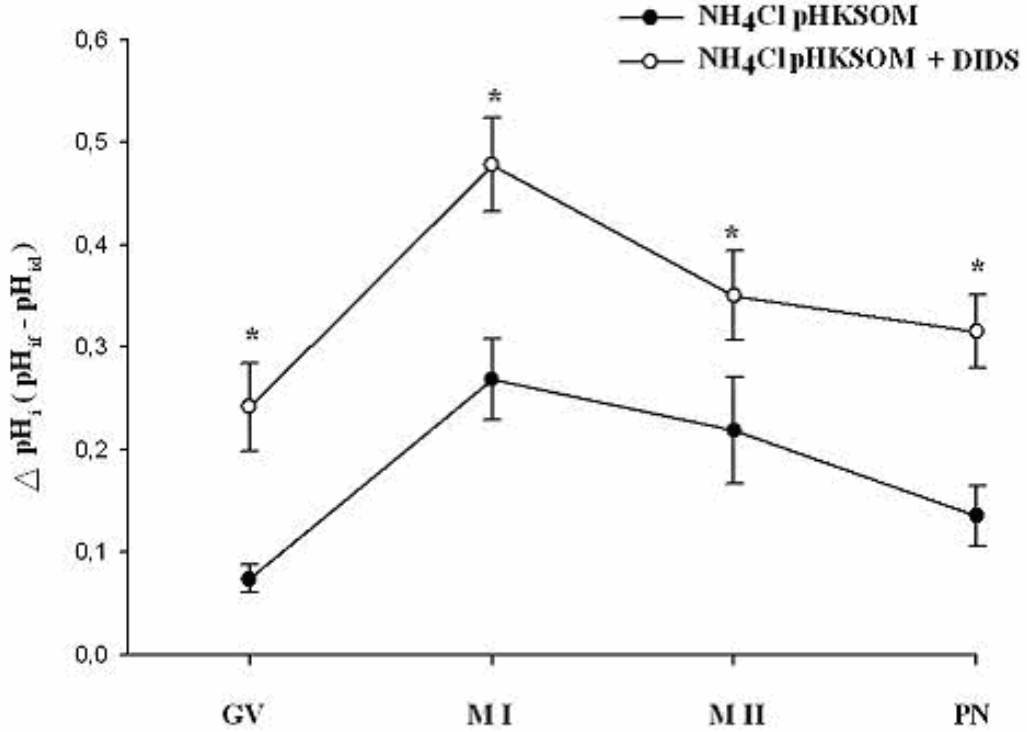
^{**}, NH₄Cl uygulamasındaki aynı aşama oosit/zigot pH_{if} değerine göre anlamlı farklılık (p<0.05).



Şekil 4.4. İndüklenmiş hücre içi alkalozu GV, MI, MII oosit ve PN zigotların verdikleri iyileşme örnek kayıtları (A) ve bu yanıtlara DIDS uygulamasının etkileri (B).



Şekil 4.5. İndüklenmiş hücre içi alkalozu GV, MI, MII oosit ve PN zigotların verdikleri iyileşme yanıtlarının ortalama değerler ile çizilmiş grafiği (A). Bu ortalama yanıtların DIDS etkisiyle değişimi (B).



Şekil 4.6. GV, MI, MII oositler ve PN zigotlarda indüklenen alkaloz sonucu gelişen pH_{ir} değerleri ile pH_{id} değerleri arasındaki fark (ΔpH) ve DIDS uygulamasının etkisi (*, aynı aşama NH_4Cl değerine göre anlamlı farklılık, $p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın en önemli bulgusu, Germinal Vezikül aşamasındaki oositte yüksek $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ değiştirici aktivitesi saptanırken bu aktivite Mayotik Metafaz I ve Metafaz II oosit aşamalarında anlamlı olarak baskılanmış, pronükleolar aşamaya gelmiş zigotta ise, GV oositteki kadar olmasa da, tekrar yükselmiş olduğudur. AE aktivitesindeki bu değişimlere paralel olarak indüklenen alkalozdan iyileşme, GV oositlerde ve PN zigotta hemen hemen tam olmasına karşın, MI ve MII aşamalarındaki oositlerde iyileşme tam olarak gerçekleşmedi. Böylece mayotik matürasyon aşamalarından geçen oositlerde AE aktivitesinde bir baskılanma gerçekleşmekte ve baskılanma fertilizasyon ile, mayotik matürasyonun tamamlanması sonucu, PN aşamasında ortadan kalkma eğilimi göstermektedir.

pH_i değerleri kayıt alınan oosit ve zigotlarda anlamlı bir farklılık göstermemiş olup 7,20 civarında idi. Benzer pH_i değerleri insan embriyosunda¹⁸, matür GV aşamasındaki fare oositinde²⁹, hamster oosit ve 2 hücreli embriyosunda^{19,43} da kayıtlanmıştır. Philips ve Baltz^{18,44} insan ve fare GV oosit, ovüle fertilize olmamış MII oosit ve fertilize zigotlardan kayıtladıkları pH_i değerleri arasında, bizim çalışmamızda olduğu gibi, anlamlı bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında çalışmada yapılan pH kayıtlarının, oosit/zigot pH_i değerlerini doğru olarak yansıttığı net olarak söylenebilir.

GV aşamasındaki oositler ovaryumlardan elde edildi. Bu oositlerin çevrelerindeki granüloza hücreleriyle yarıkli bağlantı ilişkileri olmayınca birinci mayozun profaz evresindeki duraksatılmasının sonlandığı ve germinal vezikülün yıkılarak MI aşamasına ilerlediği bilinmektedir. Mayotik duraksatılmanın devamı için çevre granüloza hücrelerinden sağlanan cAMP seviyesinin yüksek olması gerektiği bildirilmiştir^{40,45,46}. Bu nedenle GV aşamasındaki oosit eldesi ve kaydı için kullanılan tüm ortamlara cAMP'nin membrandan geçen dibutiril formu (db cAMP)^{30,31} eklenmiştir. Aynı şekilde MI aşamasındaki oositlerin de MII aşamalarına geçmesinin önlenmesi için solüsyona db cAMP eklenmiştir. MII oosit fertilize olmadan mayotik matürasyonunu tamamlamayacağından ve PN zigot mayotik matürasyonunu tamamlamış olduğundan bu aşamaların elde ve kayıt solüsyonlarına ise db cAMP

eklenmemiştir. Ortamda bulunan db cAMP'nin AE aktivitesine etkisi olmadığının gösterilmesi ⁴⁷ GV, MI, MII oositlerin ve PN zigot AE aktivitelerinin karşılaştırılması mümkün olabilmektedir.

Büyüyen-gelişen çıplak oositlerde pH_i düzenleyici sistemlerin mayotik yeterlilik ile kazanıldığı ²⁸, bu gelişme süreci boyunca oositlerin bu düzenleyici sistemler açısından foliküler yapıya bağımlı oldukları gösterilmiştir ²⁹. Ancak bu bağımlılık matür GV aşamaya ulaşması ile ortadan kalmaktadır ^{28,29,31}. Sunulan çalışmada da GV aşamadaki oositlerde yüksek AE aktivitesi saptanmıştır. Nitekim GV aşamasındaki bu yüksek aktivitenin AE ile birlikte NHE aktivitesi için de geçerli olduğu rapor edilmiştir ^{30,31,32}. Ancak, mayotik matürasyon aşamalarında oositlerin pH açısından dış ortam etkilerine açık olduğunun bildirilmesi ^{30,31} şaşırtıcı olmuştur. Benzer şekilde, sunulan çalışmada MI ve MII aşamalarındaki oositlerde AE aktivitesinin düşük olarak saptanması ve alkali şoklara karşı dinlenim pH değerlerine geri dönememeleri bu şaşırtıcı bulguları desteklemektedir.

AE aktivitesinin baskılanan embriyolarda ooplazmik alkalozun gelişimi olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiştir ²¹. Aynı şekilde asidoza karşı savunmasız olan embriyoların da zarar gördüğü rapor edilmiştir ²². Bu sonuçlar ortada iken, özellikle fertilizasyon için hazır olan MII aşamasındaki oositlerde AE aktivite baskılanmasının fizyolojik önemi henüz ortaya konamamıştır. Ancak deniz kestanesi, kurbağa gibi canlılarda fertilizasyon ile 0,3-0,5 pH birimlik artışların olduğu belirlenmiştir ^{48,49,50,51}. Fertilizasyon ile gelişen bu alkalinizasyon protein sentezinin ve metabolik aktivasyonun artışı için kolaylaştırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir ^{31,51,52}. Ancak sıçan ve fare oositlerinde yapılan çalışmalarda fertilizasyon ile böyle bir alkalinizasyonun memelilerde olmadığı bulgularına ulaşılmıştır ^{44,53}. Bununla birlikte fertilizasyonu bekleyen olgun MII oositte inhibe edilen AE aktivitesinin fizyolojik önemi, enerji korunumu, fertilizasyona kadar ovüle oositin zar üzerindeki iyonik farklanmanın devamı veya metabolik aktivasyon ile ilgili olabileceği ifade edilmiştir ³¹.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

GV oositlerde $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ değiştiricisi oldukça aktif iken germinal vezikülün yıkılması ile birinci mayozun metafaz I aşamasında ve birinci mayoz bölünmesini tamamlayan fertilizasyon için hazır hale gelen olgun MII oositlerde bu aktivite düşmektedir. Bu mayotik matürasyon süreci içinde oositler alkali şoklara karşı savunmasız haldedirler. Pronüklear aşamasına geldiğinde zigotta tekrar yükselen AE aktivitesi sayesinde alkalozaya karşı dirençli hale gelebilmektedir.

In vitro oosit/embriyo kültürlerinin başarı yüzdesinin yüksek olabilmesi için oositlerin/embriyoların homeostatik düzenleme mekanizmalarının ayrıntılı bilinmesi gerekmektedir. Dolayısıyla örneğin, *in vitro* fertilizasyon için toplanan olgun MII aşama oositlerin kültür şartları, pH savunma sistemi baskılanmış olduğundan, çok daha büyük önem kazanmaktadır. Bu anlamda elde edilen tüm bilgiler oosit/embriyoların elde edilme zamanlarının saptanması, solüsyon içeriklerinin ve dolayısıyla kültür şartlarının optimize edilmesi için ışık tutmaktadır. Fare oositlerinin, en azından pH_i düzenleme gibi homeostatik düzenleme mekanizmaları insan oositleri ile büyük benzerlikler göstermesi, elde edilen bilgilerin pratik değerini daha da arttırmaktadır. Son yıllarda yardımcı üreme tekniklerindeki başarı yüzdesinin artış nedenlerinden biri de, bu yapılan çalışmalar sonucu oositlerin/embriyoların *in vitro* şartlarda daha yüksek kalitede yaşatılması, daha uzun kültür şartlarının sağlanabilmesidir.

KAYNAKLAR

1. **Anderson E. and Albertini DF.** Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* **1976**; 71, 680-686.
2. **Gilula NB, Epstein ML, and Beers WH.** Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell Biol.* **1978**; 78, 58-75.
3. **Eppig JJ.** Mammalian oocyte development in vivo and in vitro. In Elements of Mammalian Fertilization Volume I: Basic Concepts, P.M.Wassarman, ed. (Boca Raton: CRC Press), **1991**; pp. 57-76.
4. **Larsen WJ, Wert SE, and Brunner GD.** A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev. Biol.* **1986**; 113, 517-521.
5. **Cooper GM, Hausman RE.** The Cell Cycle Third Edition. *The Cell*. Chapter 14:. ASM Press, Washington, D.C. **2004**; p.615-621.
6. **Salustri A, Yanagishita M, Camaioni A, Tirone E, and Hascall V.** Proteoglycan and hyaluronic acid synthesis by granulosa cells: regulation by an oocyte factor and gonadotropins. In Ovarian Cell Interactions: Genes to Physiology, A.Hsueh and D.Schomberg, eds. (New York: Springer-Verlag), **1993**; pp. 38-48
7. **Boron WF.** Intracellular pH regulation. In Membrane Transport Processes In Organized Systems, T.E.Andreoli, J.F.Hoffman, D.D.Fanestil, and S.G.Schultz, eds. (NY: Plenum), **1987**; pp. 39-51.
8. **Boyarsky G, Ganz MB, Sterzel RB, and Boron WF.** pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO_3^- . *Am. J. Physiol.* **1988**; 255, C844-C856.
9. **Boyarsky G, Ganz MB, Sterzel RB, and Boron WF.** pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na^+ -dependent and -independent Cl^- - HCO_3^- exchangers . *Am. J. Physiol.***1988**; 255, C857-C869.
10. **Roos A. and Boron WF.** Intracellular pH. *Physiol Rev.* **1981**; 61, 296-434.
11. **Tonnessen TI, Sandvig K, and Olsnes S.** Role of Na^+ - H^+ and Cl^- . *Am. J. Physiol.* **1990**; 258, C1117-C1126.

12. **Vaughan-Jones D.** Regulation of intracellular pH in cardiac muscle. In Proton Passage Across Cell Membranes, G.Bock and J.Marsh, eds. (Chichester: Wiley), **1988**; pp. 23-46.
13. **Aronson PS, Nee J, and Suhm MA.** Modifier role of internal H^+ in activating the Na^+H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature*. **1982**; 299, 161-163.
14. **Olsnes S, Tonnessen TI, and Sandvig K.** pH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells. *J. Cell Biol.* **1986**; 102, 967-971.
15. **Baltz JM. and Phillips KP.** Intracellular ion measurements in single eggs and embryos using ion-sensitive fluorophores. In A Comparative Methods Approach to the Study of Oocytes and Embryos, J.D.Richter, ed. (New York and Oxford: Oxford University Press), **1999**; pp. 39-82.
16. **Zhao Y, Baltz JM.** Bicarbonate/chloride exchange and intracellular pH throughout preimplantation mouse embryo development. *Am. J. Physiol.* **1996**;271 (Cell Physiol. 40): C1512-C1520.
17. **Steeves CL, Lane M, Bavister BD, Phillips KP and Baltz JM.** Differences in intracellular pH regulation by Na^+H^+ antiporter among two-cell mouse embryos derived from females of different strains. *Biol. Reprod.* **2001**; 65: 14-22.
18. **Phillips KP, Leveille MC, Claman P, and Baltz JM.** Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* **2000**; 15, 896-904.
19. **Lane M, Baltz JM, and Bavister BD.** Na^+H^+ antiporter activity in hamster embryos is activated during fertilization. *Dev. Biol.* **1999**; 208, 244-252.
20. **Baltz JM, Biggers JD, and Lechene C.** Relief from alkaline load in two-cell stage mouse embryos by bicarbonate/chloride exchange. *J. Biol. Chem.* **1991**; 266, 17212-17217.
21. **Zhao Y, Chauvet PJ, Alper SL, and Baltz JM.** Expression and function of bicarbonate/chloride exchangers in the preimplantation mouse embryo. *J. Biol. Chem.* **1995**; 270, 24428-24434
22. **Lane M, Baltz JM, and Bavister BD.** Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen (Na^+H^+) antiporter. **1998**; *Biol. Reprod.* 59, 1483-1490.
23. **Baltz JM, Biggers JD, and Lechene C.** Apparent absence of Na^+H^+ antiport activity in the two-cell mouse embryo. *Dev. Biol.* **1990**. 138, 421-429.

24. **Baltz JM, Biggers JD, and Lechene C.** Two-cell stage mouse embryos appear to lack mechanisms for alleviating intracellular acid loads. *J. Biol. Chem.* **1991**; 266, 6052-6057.
25. **Edwards LJ, Williams DA, and Gardner DK.** Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum. Reprod.* **1998**; 13, 3441-3448.
26. **Edwards LJ, Williams DA, and Gardner DK.** Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids. *Mol. Reprod. Dev.* **1998**; 50, 434-442.
27. **Gibb CA, Poronnik P, Day ML, and Cook DI.** Control of cytosolic pH in two-cell mouse embryos: roles of H⁺- lactate cotransport and Na⁺/H⁺ exchange. *Am. J. Physiol.* **1997**; 273, C404-C419.
28. **Erdogan S, FitzHarris G, Tartia AP, Baltz JM.** Mechanisms regulating intracellular pH are activated during growth of the mouse oocyte coincident with acquisition of meiotic competence. *Dev. Biol.* **2005**; 286(1):352-60.
29. **FitzHarris G and Baltz JM.** Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth. *Development*, **2006**; 133(4):591-9
30. **Phillips KP, Petrunewich MAF, Collins JL, and Baltz JM.** 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, 3800-3810.
31. **Baltz JM.** pH regulatory mechanism in the mammalian oocyte 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 Publishers*, Boston. Pp. 123-136.
32. **Erdogan S, Cetinkaya A, Dogan A.** Changes of Na⁺/H⁺ exchanger activity from germinal vesicle stage oocyte to pronuclear stage zygote on mouse model. *Chinese J. Pathophysiol.* **2006**;22(13) Suppl., 310-311,
33. **Zhao Y, Doroshenko PA, Alper SL, and Baltz JM.** Routes of Cl⁻ transport cross the trophectoderm of the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* **1997**; 189, 148-160.
34. **Widmaier EP, Raff H, Strang KT,** Female Reproductive Physiology. Human Physiology 9th edition, New York; *Mc Graw - Hill company*, **2004**; 659-669

35. **Genuth SM.** The Endocrine System, (eds. Berne R.M, Levy M.N.) Physiology 4th edition, St. louis; *A Times Mirror Company.* **1998**; 987-990
36. **Eppig JJ, Pendola FL, Winglesworth K and Pendola JK.** Mouse oocytes in regulate metabolic cooperativity between granulose cells and oocytes: amino acid transport. *Biol Reprod.* . **2005**; 73, 351-357.
37. **Hogan B, Constantini F and Lacy E.** Manipulating the mouse embryo. *Cold spring harbor laboratory.***1986**; 27-33
38. **Sorensen RA, Wassaarman PM.** Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* **1976**; 50, 531,-536.
39. **Wassarman PM, Shultz RM, Letourneau GE, LaMarca MJ, Josefowicz WJ, Bleil JD.** Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1979**; 112, 251-268
40. **Wanderhyden B.** Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience* **2002**; 7: 2006-2022.
41. **Lawitts JA and Biggers JD.** Methods of Enzymology vol. 225: Guide to techniques in mouse development : Wassarman P.M and Delamphilis M.L. *Academic press*, San Diego. **1993**;
42. **Biggers JD.** Reflection on the culture of the preimplantation embryo. *Int J Dev Biol.* **1998**;42(7):879-84.
43. **Lane M, Baltz JM and Bavistar BD.** Bicarbonate / chloride Exchange regulates intracellular pH of embryos but not oocytes of the hamster. *Biol. Reprod.* 1999;61, 452-457
44. **Phillips KP and Baltz JM.** Intracellular pH change does not accompany egg activation in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* **1996**; 45, 52-60
45. **Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiriri A.** Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturatio. *Mol. Cell Endoc.* **2002**; 187, 153-159.
46. **Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Carturindt R, Sinitz J.**Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonik development. *Biol. Reprod.* **2006**; 74(1):177-84.

47. **Phillips KP, Baltz JM.** Intracellular pH regulation by $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchange is activated during early mouse zygote development. *Dev Biol* **1999**; 208: 392-405
48. **Epel D.** The role of Na^+/H^+ exchange and intracellular pH changes in fertilization. In: Grinstein S, editors, Na^+/H^+ Exchange. Boca Raton: *CRC Press*. **1988**; P 209-223.
49. **Johnson JD, Epel D, Paul M.** Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature*. **1976**; 262: 661-664.
50. **Shen SS and Steinhardt RA.** Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg. *Nature*. **1978**; 272: 253-254.
51. **Grandin N and Carbonneau M.** Intracellular pH and the increase in protein synthesis accompanying activation of xenopus eggs. *Biol. Cell*. **1989**; 67, 321-330.
52. **Grandin N and Carbonneau M.** The increase in intracellular pH associated with xenopus egg activation is a Ca^{2+} - dependent wave. *J. Cell Scien.* **1992**; 101, 55-67.
53. **Ben-Yosef D, Oron Y and Shalgi R.** Intracellular pH of rat eggs is not affected by fertilization on the resulting calcium oscillations. *Biol. Reprod.* **1996**; 55, 461-468.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında K. Maraş'ta doğan Ali Çetinkaya, 1997 yılında Adana Dadaloğlu Lisesi'nden, 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olmuştur. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fiziyojji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.