

40360

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

KURBAĞA YUMURTA MODELİNDE FERTİLİZASYONDAN BİRİNCİ
YARIKLANMAYA KADAR OLAN EVREDEKİ MEMBRAN POTANSİYEL
DEĞİŞİMLERİ VE BU DEĞİŞİMLERİN İYONİK TEMELİ

Tez Yöneticisi
Doç.Dr.Gülay LOĞOĞLU

Dr.Şeref ERDOĞAN
Uzmanlık Tezi

ADANA-1995

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2-A- Amfibiler	2
2-B- Kurbağa Yumurtası	2
2-C- Kurbağa Yumurtasının Olgunlaşması ve Ovulasyon	3
2-D- Kurbağa Yumurtasının Fertilizasyonu ve Birinci Yarıklanma	6
2-E- Yumurtada Gelişen Polispermiye Karşı Blok	9
2-F- Biyoelektrik Potansiyellerin Fertilizasyondaki Önemi .	10
2-F.1- Dinlenim Zar Potansiyeli (RMP)	10
2-F.2- Nernst Denge Potansiyeli	10
2-F.3- Fertilizasyon Potansiyeli (FP)	13
2-F.4- Aktivasyon Potansiyeli	14
2-F.5- Fertilizasyon Potansiyelinin Polispermiyi Önleme Mekanizması	14
2-F.6- Türlerle Göre Fertilizasyon Potansiyeli	16
2-F.7- Türlerde FP'ne Neden Olan Elektrolitler	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3-A- Gereç ve Yöntem	18
3-A.1- Yumurta Eldesi	18
3-A.2- Sperm Eldesi	19
3-A.3- İnseminasyon İşlemi ve Fertilizasyonun Değerlendirilmesi	19
3-A.4- Solüsyonların Hazırlanması	19
3-A.5- Elektrofizyolojik Kayıtlar	21
3-B- Deney Grupları ve Değerlendirilen Parametreler	21
3-B.1- Kontrol ve Deney Grupları	21
3-B.2- Değerlendirilen Parametreler	22
3-C- İstatistik	23
4. BULGULAR	24
4-A- Dinlenim Zar Potansiyeli (RMP) ve Fertilizasyon Potansiyeline İlişkin Değerler	24
4-B- Yarıklanma Döngüsüne İlişkin Değerler	34

5. TARTIŞMA	50
5-A- Dinlenme Zar Potansiyeli ve Fertilizasyon Potansiyeli.	50
5-A.1- Fertilize olmamış yumurtadaki dinlenme zar potansiyeli (RMP)	50
5-A.2- Fertilizasyon Zamanı (F_t)	52
5-A.3- Pik Fertilizasyon Potansiyeli (FP_p)	52
5-A.4- Fertilize Yumurtada Zar Potansiyeli (MP_f)	54
5-A.5- Fertilizasyon Potansiyeli Süresi (FP_d)	54
5-B- Yarıklanma Döngüsü	56
5-B.1- Birinci Yarıklanma Zamanı (C_t)	56
5-B.2- Pik Yarıklanma Potansiyeli (CP_p)	57
5-B.3- Yarıklanma Döngüsü (C_c) ve Yarıkılanan Yumurtanın Zar Potansiyeli (MP_{pc})	57
6. SONUÇ	60
7. ÖZET	61
8. SUMMARY	63
9. ÖZGEÇMİŞ	65
10. KAYNAKLAR	66

TABLO VE ŞEKİLLER

1. TABLOLAR

Tablo 1	20
Tablo 2	24
Tablo 3	25
Tablo 4	26
Tablo 5	27
Tablo 6	28
Tablo 7	29
Tablo 8	30
Tablo 9	31
Tablo 10	32
Tablo 11	33
Tablo 12	33
Tablo 13	34
Tablo 14	35
Tablo 15	36
Tablo 16	37
Tablo 17	38
Tablo 18	39
Tablo 19	40
Tablo 20	41
Tablo 21	42
Tablo 22	43
Tablo 23	43
Tablo 24	44

2. ŞEKİLLER

Şekil 1	5
Şekil 2	7
Şekil 3	8

Şekil 4	15
Şekil 5	45
Şekil 6	46
Şekil 7	47
Şekil 8	48
Şekil 9	49



Teşekkür ...

Uzmanlık eğitimim süresince tüm başvurularımda bana en doğru yolu gösteren sayın hocam Prof.Dr.Tuncay Özgünen'e; çalışmalarım süresince hiç bir zaman bilimsel desteğini benden esirgemeyen, tez danışmanım sayın Doç.Dr.Gülay Loğoğlu'na; beraber çalıştığımız ilk günden itibaren bana her türlü desteği veren sayın Prof.Dr.Ayşe Doğan'a; katkıları nedeniyle arkadaşım sayın Uzm.Dr.S.Sadi Kurdak'a; bana hücre içi kayıt tekniğini öğreten sayın Prof.Dr.Rüştü Onur'a teşekkür ederim.

KISALTMALAR

c-ADPR: Siklik ADP-riboz

C_o: Yarıkılanma döngüsü

C_t: Yarıkılanma zamanı

CP_p: Yarıkılanma pik potansiyeli

EGTA: Etilen glikol-bis (β -Aminoetil eter) N,N,N',N'-tetraasetik asit

E_x: X iyonu için denge potansiyeli

F_t: Fertilizasyon zamanı

FP: Fertilizasyon potansiyeli

FP_a: Fertilizasyon potansiyel süresi

FP_p: Pik fertilizasyon potansiyeli

MP_f: Fertilize yumurtanın zar potansiyeli

MP_o: Birinci yarıkılanma sonrası zar potansiyeli

RMP: Dinlenim zar potansiyeli

SITS: 4-asetamido-4'-isotiosiyanoetilben-2,2'-disülfonik asit

TEA: Tetraetilamonyum

ZP: Zona pellusida

1. GİRİŞ

Tüm canlıların ortaya koydukları davranışların temel amacı, varlığını korumak ve türünün devamını sağlamak için üremektir. Dişinin yumurtayı hazırlaması, erkeğin sperm üreterek yumurtanın mümkün olduğu kadar yakınına bırakması, yumurtanın başarılı olarak fertilize edilmesi için yeterli olmamaktadır. İnternal fertilizasyonun söz konusu olduğu canlılarda (memelilerde) yumurtanın yakınına az sayıda sperm ulaşabilirken, eksternal fertilizasyon durumunda yumurtanın üzerine çok fazla sayıda sperm bırakılarak, yumurta bir anda çok sayıda sperm ile karşılaşmaktadır. Türlerin bir çoğunda embriyonun hayatiyeti, yumurtanın yalnızca tek bir sperm tarafından fertilizasyonuna bağlıdır. Bunun için de yumurtada polispermiye karşı oluşturulan çeşitli blok mekanizmaları söz konusudur. Bunlardan ilk aşamada gelişeni, **fertilizasyon potansiyeli** ile sağlanan geçici elektriksel bloktur.

Bir çok canlıda çalışılmış olan fertilizasyon potansiyelinin fonksiyonu genelde aynı olmakla beraber, iyonik temeli türlere göre farklılık göstermektedir. Amfibilerde, özellikle de kurbaçalarda fertilizasyon potansiyeline ait özellikler çalışılmış, ancak fertilizasyondan birinci yarıklanmaya kadar olan evredeki membran potansiyel değişimlerinin iyonik temeli incelenmemiştir. Ülkemizde ise bu tür bir çalışmaya hiç rastlanamamıştır.

Bu çalışmada, Çukurova Bölgesinde yaygın olarak bulunan **Rana cameranoi** türü kurbağa yumurtasındaki fertilizasyon potansiyeli ile birinci yarıklanmaya kadar olan evrede gelişen membran potansiyel değişimlerine ait iyonik temellerin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2-A-AMFİBİLER

Türkiye'de bulunan amfibiler Urodela ve Anura takımlarına ait olup, iki takımı birbirinden ayıran başlıca özellikler şu şekilde sıralanabilir; **Urodelada** ön ve arka ayaklar hemen hemen aynı uzunlukta ve kuyruk mevcut iken, **Anurada** arka bacaklar öndekilere göre daha uzun ve bu nedenle de sıçramaya elverişlidir ve kuyruk bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan **Rana cameranoi** türünün sistematığı şöyledir (1);

Klassis Amfibia
Takım Anura
Familiya Ranidae
Cins Rana
Tür cameranoi

2-B-KURBAĞA YUMURTASI

Kurbağalarda ovaryumlar, yaz mevsiminin sonlarından üreme mevsimi olan ilkbahara kadar vücut boşluğunu doldururlar. Ovaryumlarda bulunabilecek yumurta sayısı yaklaşık olarak *Rana pipiens* için 2.000, *Rana catesbiana* için ise 20.000 kadardır. Her bir yumurtanın çapı 1.75 mm kadar olup olgun yumurtaların animal kutup yüzeyi melanin pigmenti içerdiğinden siyah görünümündedir. Yumurtanın vegetal ve animal hemisferlerini belirleyen beyaz yolk ve siyah pigment nedeniyle, ovaryum benekli bir görünüme sahiptir (26).

Kurbağa yumurtası, vegetal kutupta toplanmış olan büyük granüllü, geniş bir yolk kesesidir. Animal hemisferde yoğunlaşmış olan ve germinal vezikül yada olgunlaşmamış nukleusa yakın bulunan sitoplazmanın ince bir dış tabakası vardır. Bütün yumurtayı çevreleyen cansız yüzey tabaka pigment içerir. Bu tabaka yumurtanın

şeklini kaybetmemesi için ve yarıklanma ile gastrulasyonun morfojenetik süreci açısından gereklidir. Gelişme sırasında ortaya çıkan eşitsiz pigment, yolk ve sitoplazma dağılımları yumurtadaki polaritenin ilk göstergeleridir. Polaritenin tam geliştiği yumurtada sitoplazma, yüzeysel melanin pigmenti ve nükleus animal kutupta; açık renkli yolk ise vegetal kutupta çok daha yoğun olarak bulunur. **Telolechital** olarak tanımlanan bu görünümdeki yumurtada bir kutupta büyük miktarda toplanmış olan yolk ile karşı kutupta sitoplazma yoğunlaşması ve nükleus lokalizasyonu söz konusudur. Amfibi yumurtası hayvanlar alemi içinde en büyük yumurta olup, kurbağa yumurta nükleusu çıplak gözle görülebilecek kadar büyüktür (26).

Her olgun yumurta cansız, transparan bir **vitellin membranı** tarafından sıkıca çevrilmiştir. Olgunlaşma sürecinde beliren bu membran erken oogonyum evresinde bulunmamaktadır. Yumurta fertilize olduktan sonra, vitellin membranı ile yumurta arasına sıvı dolarak, **perivitellin aralığı** gelişir (26).

2-C-KURBAĞA YUMURTASININ OLGUNLAŞMASI VE OVULASYON

Ovulasyon, ön hipofiz bezinden seks uyarıcı hormonun salgılanması ile gerçekleşir. Üreme mevsimi olan ilkbahar süresince veya hemen önce ön hipofiz asidofilik hücrelerinin sayısı, göreceli olarak artar; bu kurbağadaki cinsel davranışların nedenidir. Erkek kurbağaların amplexus (üreme için cinsel davranış) yapmak için girişimi, cinsel olarak uyarılmamış dişi tarafından reddedilir. Ancak başka bir kurbağadan hipofiz bezi alınarak, bu dişiye enjekte edilirse erkek kurbağanın amplexus isteğini kabul eder hale getirilebilir. Hibernasyondaki (kış uykusu) kurbağaların hipofizleri seks uyarıcı hormon içerebilir; hormon düzeyleri, üreme mevsimi yaklaştıkça artar. Cinsel olgunluğa erişmiş dişi kurbağalardan alınan 6 hipofiz bezinin enjeksiyonu, normal üreme periyodundan 8 ay önce gibi erken bir zamanda (Ağustos'un son haftası) R.pipiens'te ovulasyona neden olabilir. Bir veya iki hipofiz bezinin Nisan ayı başlarındaki enjeksiyonu ile de aynı

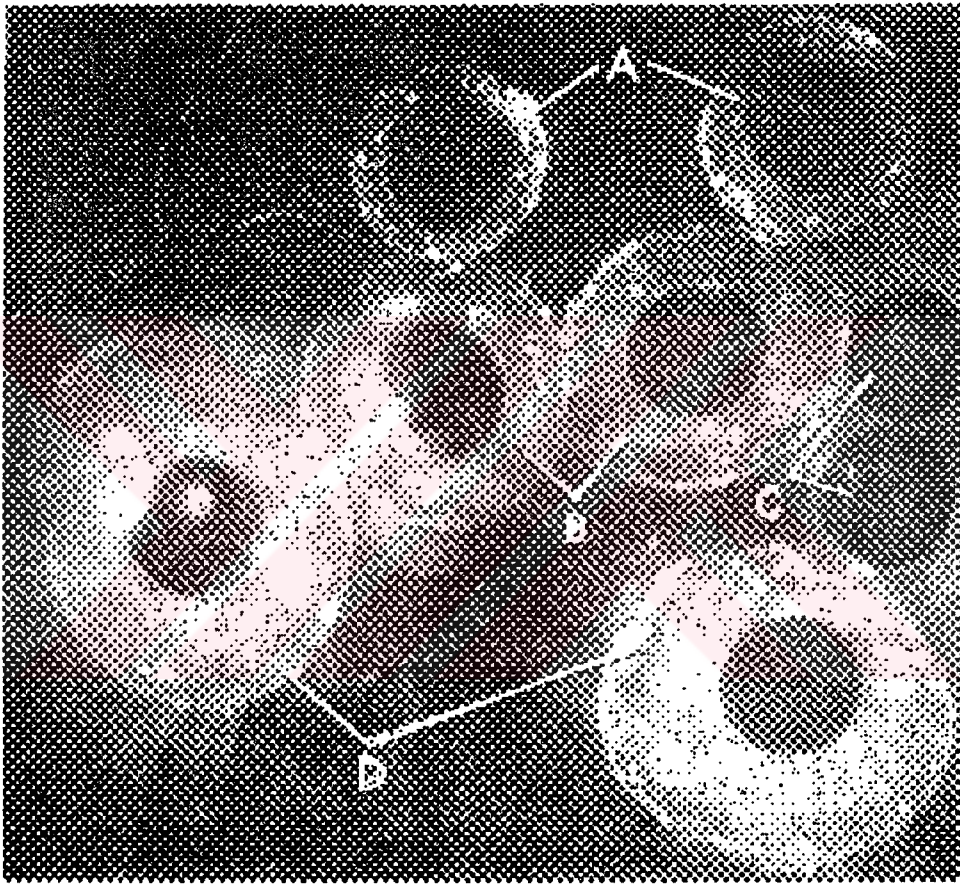
sonuca ulaşılabilir. Hibernasyonu takiben ilkbahar başlarında kurbaşaların bataklığa ulaşmaları ve devreye giren ısı, ışık, yiyecek gibi çevresel faktörler, endokrin sistem aracılığıyla, kurbaşaların üreme için hazır hale gelmesine etki edebilir. Ayrıca, ovaryumların çeşitli uyaranlara olan duyarlılığı üreme mevsimi yaklaşırken artmaktadır (26).

Artan hormon düzeyleri, ovulasyona neden olur; bu sırada dişinin vücut boşluğunun hemen tamamı, silyalar ile örtülmüştür. Yumurtanın ostiyumlardan birine doğru taşınmasını sağlayan ve kurbaşaya ait sekonder seks özelliklerinden olan silyalar, ovaryum kaynaklı hormonlara yanıt olarak yapılırlar. Ovulasyon sırasında batın içine atılan yumurtalar, ovaryumdan ayrıldıklarında transparan vitellin membranı dışında çıplaktırlar. Bu yapıdaki vücut kavite yumurtalarının fertilize olarak gelişebilmesi imkansızdır. Bu yumurtalar, batın içindeki silyaların aktif itme hareketleri ile yaklaşık 2 saat içinde ostiuma ulaşırlar. Oviduktun batın boşluğuna açılan ağzı olan ostiumdan ovidukta geçen yumurtalar, albuminöz bir jel tabakası ile çevrilmeye başlar; yumurtaların döllenebilmesi için bu jel tabaka şarttır. Ovidukt boyunca silyer akımlar ile taşındıkları süreç içinde yumurtalar tamamen jel ile çevrili hale gelirler. Başlangıçta ilk ince tabaka yumurtayı sıkıca çevirir; bunu takiben gelişen 2 ayrı jel tabakasından en dıştaki, oldukça kalın ve daha az visközdür. Ovidukt içinde gelişen bu üç katlı jel tabakası vitellin membranın hemen dışında, transparan bir kılıf olarak gözlenir. Su ile temas eder etmez şişmeye başlayan jel tabaka, yumurtanın çapından daha fazla bir kalınlılığa erişir (Şekil 1).

Jelin fonksiyonu yaralanmaya, daha büyük mikroorganizmalarca sindirilmeye, mantar ve diğer infeksiyonlara karşı yumurtayı korumaktır. Jelin diğer önemli bir fonksiyonu yumurta metabolizmasının sıcaklık değişikliklerinden etkilenmesini önlemektir. Tamamen karanlık bir çevrede bile, yumurtanın sıcaklığı ortamdakinden daha yüksektir. Böylece jel, yumurtadaki ısı kaybını engelleyerek döllenmeyi kolaylaştırmaktadır (26).

Normal bir sıcaklıkta yumurtanın uteruslara erişmesi 2 ile 4

saatte gerçekleşir. Her uterusun kloakaya ayrı bir açılımı vardır ve ovüle olan yumurtalar, amplexusa kadar bu keşelerin (uterus) içinde kalırlar. Amplexus süresince suyun içine atılan yumurtalar, erkek tarafından fertilize edilirler. Genellikle yumurtalar bir günden fazla uterus içinde kalmazlar (26).



Şekil 1: Olgunlaşma süresince yumurtayı çeviren jel tabakası (su çekerek şişmiş); (A) oviduktun başlangıç kısmından, (B) oviduktun orta kısmından, (C) abdominal boşluktan, jel tabakası oluşmamış (olgunlaşmamış), (D) uterustan alınmış yumurtalar (Rugh'dan).

Yumurtanın olgunlaşması, spermle aktive edilinceye kadar

tamamlanmaz; uterusu ulaşan her yumurta ikinci olgunlaşma bölünmesinin metafazında olup, ikinci polar cismin eliminasyonunu tamamlamak için aktivasyon uyarısını bekler (26).

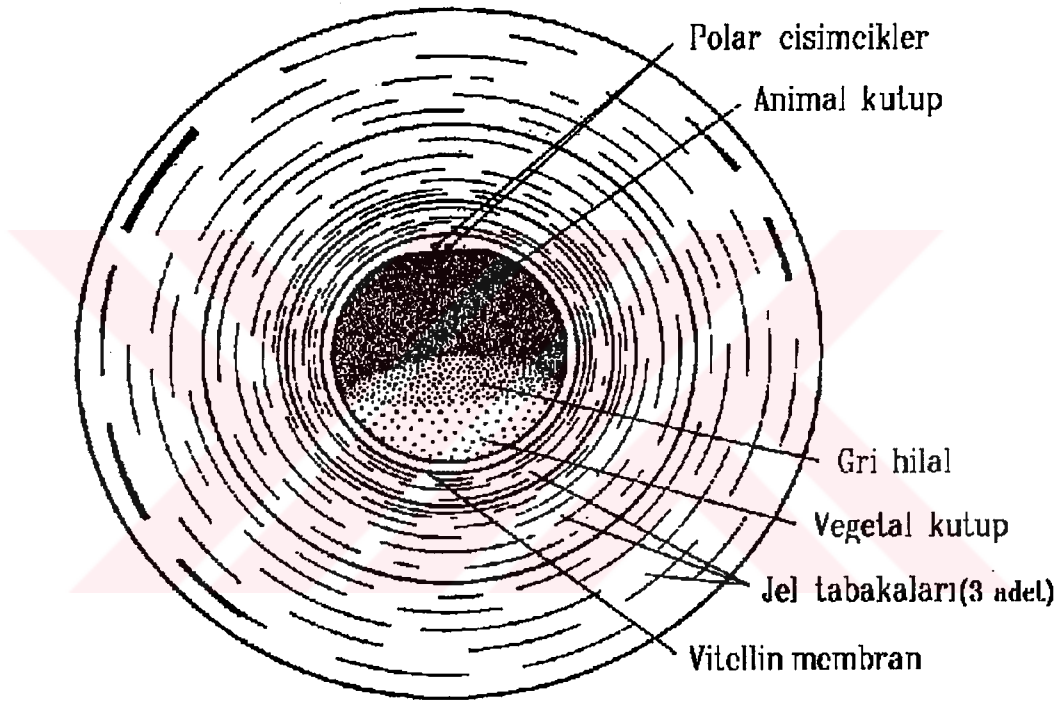
2-D-KURBAĞA YUMURTASININ FERTİLİZASYONU VE BİRİNCİ YARIKLANMA

Fertilizasyon genel olarak, iki aşamalı bir süreçtir. İlk aşama yumurtanın aktivasyonudur ve bu sperm veya çeşitli partenogenetik ajanlar tarafından başarılabilir. İkinci aşama olan amfimiksis sürecinde, nükleer materyellerin karışımı söz konusudur (26).

Dişi kurbağa yumurtayı suyun içine bırakırken, amplektik durumdaki erkek, spermatozoayı yumurtanın üzerine bırakır (eksternal fertilizasyon). Bundan hemen sonra jel tabakası şişerek çok sayıda spermin girişi kısmen engellenir. Kuşlarda olduğu gibi bazı telolesital yumurtalarda, polispermi doğal olarak gelişebilir. Urodel yumurtalarında da yaygın olan polispermi, Anuranlarda söz konusu değildir (örneğin kurbağa). Bunlarda, her koşulda sadece tek bir spermatozoonun nükleusu, yumurta nükleusu ile kaynaşır (monospermi). Spermatozoon yumurtaya daima **animal hemisferden** girer (26).

İnseminasyon sırasında yumurta nükleusu ikinci olgunlaşma bölünmesinin metafazındadır. Yumurtanın spermatozoon tarafından aktivasyonu olgunlaşma sürecini yeniden başlatır; böylece mayoz tamamlanarak, **ikinci polar cisimcik** perivitellin aralığa atılır (Şekil 2). Aktivasyonun en iyi göstergesi, vitellin membranının dışa doğru yükselmesidir. Daha sonra vitellin membranının transformasyonu ile **fertilizasyon membranı** oluşur. Fertilizasyon membranına dönüşen vitellin membranı ile yumurta yüzeyi arasındaki suyla dolu olan aralık, **Perivitellin mesafedir**; bu mesafe, yumurtanın serbestçe dönebilmesini sağlar. Olgun yumurtadaki belirgin yolk-sitoplazmik gradiyent nedeniyle; siyah pigmentli animal hemisfer üste, daha ağır olan ve yolk içeren vegetal hemisfer ise alta gelene dek, yerçekiminin etkisiyle yumurta fertilizasyon membranının içinde yavaşca döner (**rotasyon**). Yumurta

laboratuvar koşullarında kurbağa spermi ile artifisyel olarak insemine edildiğinde, inseminasyonu takiben bir saat içinde rotasyon tamamlanır; bu durumda, yumurta kitlesinin üstten görünümü uniform olarak siyahtır (26).



Şekil 2: Fertilize yumurtanın şematik görünümü. Polar cisimcik, vitellin membran ve şişmiş jel tabakaları görülmektedir (Rugh'dan).

Kurbağa yumurtasında ilk yarıklanmalar holoblastiktir (total); eşit olmayan yarıklanmalar, ikinci yarıklanmadan sonra gerçekleşir.

Yumurta fertilize olduktan yaklaşık 2.5 saat sonra (25 °C'de; 18 °C'de 3.5 saat), pigmentli merkezin yakınında çok kısa bir içe çökme görülür ve animal hemisfer korteksi hafifçe deprese olur. Bu girintinin her iki yöne doğru uzamasıyla, pigmentli yüzeyel kılıfta derinleşen **birinci yarıklanma izi** belirir (Şekil 3). Başlangıçta çok yüzeyel olan yarıklanma, animal hemisferin merkezinden vegetal hemisfere doğru yumurtayı çevreler. Yarıklanmanın derinliği, ilk görüldüğü yer olan animal hemisferde en fazladır. Fertilizasyonu takiben 3 saat içinde birinci yarıklanma tamamlanarak, tüm yumurta vertikal bir izle çevrilir (26).



Şekil 3: Birinci yarıklanma (Rugh'dan).

2-E-YUMURTADA GELİŞEN POLİSPERMIYE KARŞI BLOK

Embriyonun hayatiyeti için, yumurtanın sadece tek bir spermatozoon tarafından fertilize edilmesi şarttır; bu durum iki veya üç aşamada gerçekleşen polispermiye karşı blok ile sağlanır. Bunlardan birincisi, internal fertilizasyonun söz konusu olduğu canlılarda (memeliler), fertilizasyon sırasında yalnızca birkaç spermin yumurtanın çok yakınında bulunabilmesidir; bu olgu, yumurta:sperm oranının sıklıkla 1:1 olmasıyla sonuçlanır; yani iki veya daha fazla spermin bir yumurtayı fertilize etmesi, sayısal nedenlerle engellenmektedir. İn vitro fertilizasyonda sıklıkla gözlenen polispermi, bu oranın ne denli önemli olduğunun göstergesidir (22).

Bloktan sorumlu olan ikinci mekanizma, fertilizasyonu takiben oosit membranının depolarize olmasıdır (**fertilizasyon potansiyeli**). Memelilerde genellikle hipotetik olan bu blok, ilk önce omurgasızlarda gösterilmiştir. Örneğin, deniz kestanesinde sperm-oosit füzyonu, oosit membranını yaklaşık bir dakika içinde depolarize eder; bu depolarizasyon, bir diğer spermin yumurta ile füzyonunu engeller. Bazı cinslerde, depolarizasyon bir saatten fazla devam edebilir. Depolarizasyonun memeli yumurtasında da gerçekleşebileceğini destekleyen bulgular olmakla beraber, bu olay halen tartışmalıdır (22).

Bloktan sorumlu olan son mekanizma ise, füzyon sırasında oositten kortikal granüllerin salınmasıdır. Bu olay Ca^{+2} ile uyarılan tipik bir ekzositozdur. Bu süreçte, Zona Pellusida (ZP) üzerinde bulunan protein yapıdaki sperm bağlanma alanlarının, kortikal granül içerikleri tarafından modifiye edilmesi sözkonusudur. Fare yumurtasında yapılan çalışmalarda, ZP 3'e ek olarak ZP 2 proteininin de bu yolla değişime uğradığı; böylece akrozom reaksiyonu geçirmiş fazla sayıda spermin bağlanmasının da engellendiği gösterilmiştir. 5-10 dakika gibi uzun bir sürede gerçekleşen bu yavaş blok, sperm yoğunluğunun çok düşük olduğu koşullarda önem kazanmaktadır.

2-F-BİYOELEKTRİK POTANSİYELLERİN FERTİLİZASYONDAKİ ÖNEMİ

Yumurtaya ait dinlenme zar potansiyelinin ve polispermiye karşı blok mekanizmalarından biri olan fertilizasyon potansiyelinin omurgasızlar ve amfibilerdeki önemi, yapılan birçok çalışmada kesinlik kazanmıştır (3,8,9,10,11,12,13,14,15,19,29,30).

2-F.1-Dinlenme Zar Potansiyeli (RMP)

Hayvan hücrelerinin çoğunda hücre zarı üzerinde elektriksel bir potansiyel farkı (voltaj farkı) bulunmakta olup, bu hücrelerin sitoplazmaları ekstrasellüler sıvıya göre elektriksel olarak daha negatiftir. Dinlenme halindeki bir hücrede, zar üzerindeki bu elektriksel potansiyel farkına **Dinlenme Zar Potansiyeli** adı verilir. Dinlenme zar potansiyeli sinir ve kas hücrelerinin eksitabilitesi ile diğer bazı hücre yanıtlarının eldesinde merkezi bir rol oynar (2).

Değişik türlerdeki hücrelere ait RMP'lerden bazıları şöyledir:
 X.laevis yumurtasında yaklaşık -19 mV (29),
 R.pipiens yumurtasında yaklaşık -30 mV (11,12),
 R.esculenta ve R.temporaria yumurtalarında yaklaşık -24 mV (24),
 Deniz yıldızı yumurtasında yaklaşık -70 mV (14),
 Cerebratulus lacteus yumurtasında yaklaşık -66 mV (15),
 Fucoid alglerinin bütün türlerine ait yumurtalarda yaklaşık -60 mV (3),
 Medeka (Oryzias latipes) yumurtasında yaklaşık -47 mV (21),
 Kurbağa kas hücresinde -90 mV (2),
 Memeli spinal motor nöronlarında yaklaşık -70 mV (7).

2-F.2-Nernst Denge Potansiyeli

Hücre zarı üzerinde iyonların dağılımlarını etkileyen güçler **konsantrasyon gradiyenti** ile **elektriksel gradiyent**dir. Örneğin kurbağa kas hücresinde klorür iyonları hücre içine göre ekstrasellüler sıvıda daha yüksek konsantrasyonda bulunur ve Cl^- konsantrasyon gradiyenti boyunca hücre içine difüze olma eğilimi gösterirken, hücrenin içi dışına göre daha negatif olduğundan

elektriksel gradiyent boyunca hücre dışına itilir. Sonuçta, her iki gradiyent boyunca hücre içi ve dışına olan Cl^- akışlarının eşitlendiği bir dengeye ulaşılır. Bu elektrokimyasal denge sırasındaki zar potansiyeline, **Denge Potansiyeli** adı verilir. Denge potansiyelinin niceliği **Nernst eşitliği** ile belirlenir (7):

$$E_{Cl^-} = \frac{RT}{FZ_{Cl}} \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}$$

E_{Cl^-} ; Cl^- için denge potansiyeli,

R ; Gaz sabitesi,

T ; Mutlak sıcaklık,

F ; Faraday (yükün molü başına coulomb sayısı),

Z_{Cl} ; Cl^- değerliği,

$[Cl^-]_o$; Hücre dışındaki Cl^- konsantrasyonu,

$[Cl^-]_i$; Hücre içindeki Cl^- konsantrasyonu.

Nernst eşitliği iyonların akma eğilimi gösterdikleri yönün belirlenmesinde kullanılabilir.

1. Belli bir iyon için bir zar üzerinden ölçülen potansiyel farkı, o iyon için Nernst eşitliğiyle hesaplanan potansiyel farkına eşitse bu iyon zar üzerinde elektrokimyasal denge halindedir ve zar üzerinde bu iyonun net bir akışı görülmez.

2. Belli bir iyon için ölçülen elektriksel potansiyel, Nernst eşitliği sayesinde hesaplanan değerle aynı işaret taşıyor fakat daha büyük bir değere sahipse elektriksel kuvvet yoğunluk kuvvetinden daha büyüktür ve bu iyon elektriksel kuvvet tarafından saptanan yöne net olarak akar.

3. Belli bir iyon için ölçülen elektriksel potansiyel farkı, Nernst eşitliğinden hesaplanan değerle aynı işaretli fakat daha küçük bir değerde ise yoğunluk kuvveti elektriksel kuvvetten daha büyüktür ve bu iyon yoğunluk farkı tarafından belirlenen yönde net

bir akışa uğrayacaktır.

4. Belli bir iyon için zar üzerinden ölçülen elektriksel potansiyel farkı Nernst eşitliğinden hesaplanan değerle zıt işaretliyse elektriksel ve yoğunluk kuvvetleri aynı yöndedir ve şimdi bu iyon denge halinde bulunamayacak ve hem elektriksel, hem de yoğunluk kuvvetleri tarafından belirlenecek yönde net akışa uğrayacaktır.

Örneğin kurbağa kas hücresinde (2);

	Hücre dışı sıvısı (mM)	Sitoplazma (mM)	Denge potansiyeli (mV)	RMP (-90 mv)
[Na ⁺]	120	9.2	+67	
[K ⁺]	2.5	140	-105	
[Cl ⁻]	120	3-4	(-89) - (-196)	

Bu tabloda da görüldüğü üzere zar üzerinde Cl⁻ dağılımını incelemek için elektriksel ve kimyasal gradientlerin temsil ettiği güçlerin dışında bir başka güç aramaya gerek yoktur. Zira kurbağa kas hücresinde RMP, klor için denge potansiyeline yaklaşık eşit olduğundan bu hücre zarından klor serbest olarak geçebilmekte ve denge durumunu sağlayabilmekte, yani net klor akışı olmamaktadır. Ancak olgun R.pipiens yumurtası üzerinde iyon selektif mikroelektrodlarla yapılan bir çalışma, yumurtalardaki iyonik dengenin yukarıdaki tablodan farklı olduğunu ortaya koymuştur (12). Bu çalışmaya ait bulgular aşağıdaki gibidir:

	Hücre dışı sıvısı (mM)	Hücre içi sıvısı (mM)	Denge potansiyeli (mV)	RMP (-30 mV)
[K ⁺]	0.19	140	-150	
[Cl ⁻]	21.5	44	+18	

Burada Cl^- 'a ait konsantrasyon gradiyentinin yönü daha az yoğunlukta olduğu hücre dışına doğru iken, elektriksel gradiyent de aynı yöndedir. Dolayısıyla klor elektrokimyasal gradiyentleri boyunca hücre dışına çıkmaya zorlanacaktır. Ancak bu hücrenin RMP değeri -30 mV olduğundan, klorun dinlenme durumunda hücre dışına çıkışı söz konusu değildir. Aynı olay kurbağa kas hücresinde Na^+ için geçerlidir. Böylece R. pipiens olgun yumurtasında hücre içinde daha yoğun bulunan Cl^- pasif olarak hareket edememekte olup, hareketleri aktif bir sistem (kapı/kanal) tarafından düzenlenmelidir.

Herhangi bir andaki zar potansiyeli Na^+ , K^+ ve Cl^- dağılımları ile zarın bu iyonların herbirine olan geçirgenliğine bağımlı olacaktır. Bu ilişki, **Goldman sabit-alan eşitliği** ile tanımlanmaktadır (7):

$$V = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}$$

V; Membran potansiyeli,

R; Gaz sabitesi,

T; Mutlak sıcaklık,

F; Faraday,

P_K , P_{Na} , P_{Cl} ; Sırasıyla, membranın K^+ , Na^+ , Cl^- geçirgenliği,

Köşeli parantezler konsantrasyonları, o ve i harfleri ise sırasıyla hücre dışını ve içini göstermektedir.

2-F.3-Fertilizasyon Potansiyeli (FP)

Olgun yumurta bir sperm tarafından fertilize edildiğinde dinlenme membran potansiyeli, türlerin birçoğunda pozitif yönde olmak üzere, ani bir kayma gösterir. Membran potansiyelindeki bu ani değişime, **Fertilizasyon Potansiyeli** denir. Potansiyeldeki bu değişim, ikinci bir spermin yumurtaya girmesini önlemeye yönelik, *hızlı gelişen fakat geçici bir elektriksel blok* olarak fonksiyon

gören bir mekanizmadır. Yavaş gelişen, kalıcı mekaniksel blok oluşturulana (kortikal reaksiyon) kadar bu mekanizma ile ikinci bir spermin yumurtaya girişi önlenir. Deniz kestanesinde, 90 dk kadar yumurtayı polispermiye karşı koruyan mekanizmanın FP olduğu, mekanik bloğun ise ancak 90 dakikadan sonra gelişerek işlev gördüğü gösterilmiştir (15). Yumurta membran potansiyelinde fertilizasyonla ortaya çıkan ani değişime benzer değişiklikler, artifisyel olarak aktive olan yumurtalarda da görülebilmektedir. Bundan dolayı yumurta zar potansiyelinde meydana gelen ani değişimin fertilizasyon mu yoksa aktivasyon sonucu mu olduğunu anlayabilmek için yumurtanın gelişimi takip edilmelidir. Eğer yumurtada *ani potansiyel değişimine* ek olarak *kortikal reaksiyon, rotasyon ve normal olarak birinci yarıklanma* da görülürse, potansiyeldeki bu değişim **Fertilizasyon Potansiyelidir** (12).

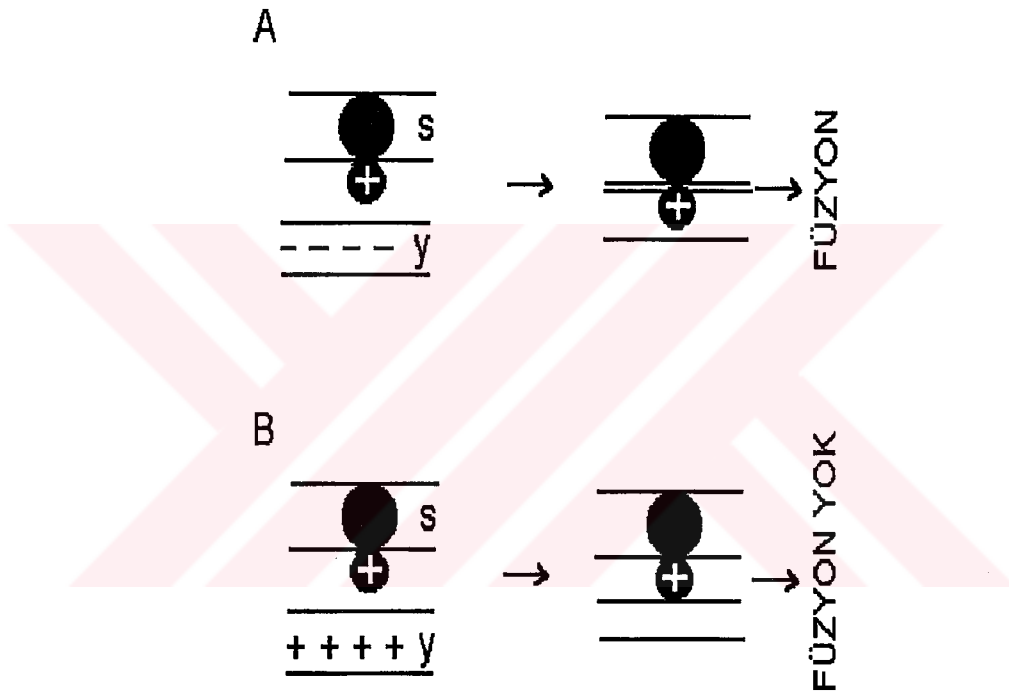
2-F.4-Aktivasyon Potansiyeli

Olgun bir yumurtanın ya iğneyle iritasyonu gibi mekanik bir travma ile, yada Ca^{+2} ionoforu (Örn; A 23187) veya IP_3 gibi kimyasal yollarla artifisyel olarak aktive edilmesiyle gelişen membran potansiyeli değişimidir. Potansiyeldeki bu değişiklik, fertilizasyon potansiyeline benzer. İyonik kondüktans değişikliklerinin büyüklüğü aynı olmakla beraber, aktivasyon potansiyeli daha kısa bir sürede meydana gelir (12). Artifisyel olarak aktive edilmiş bir yumurtada kortikal reaksiyon ve rotasyon görülürken, yarıklanma parsiyeldir ve bir sonraki gün yumurta sitolize uğrar.

2-F.5-Fertilizasyon Potansiyelinin Polispermiyi Önleme Mekanizması

FP'nin yumurtaya ikinci bir sperm girişini önleme mekanizmasını açıklayan model şu şekildedir (13); sperm-yumurta birleşmesindeki voltaja bağımlılık, sperm membranında bulunan yüklü bir füzyon molekülünden dolayıdır. Füzyon molekülünün bir parçası sperm plazma membranı içine gömülü iken, ikinci parçası membrandan çıkıntı yapmış bir şekilde organizedir. Bu ikinci komponentin yerleşimi, yumurta membranını invaze edecek pozisyondadır (Şekil

4). Eğer bu komponent (+) yüklü ise, spermin yumurtaya girebilmesi yumurta membran potansiyeline bağımlı olacaktır. Zira bu komponent yumurta membranı içindeki elektrik alan ile karşılaşacaktır. Böyle bir durumda, yumurta membran potansiyeli (-) değerinde ise füzyon gerçekleşecek (Şekil 4-A); (+) değerinde ise sperm yumurtaya giremeyecektir (Şekil 4-B). Bu konu da yapılan çapraz fertilizasyon (10,14) ve voltaj klamp çalışmaları (9,19), spermdeki yüklü molekülün füzyonda anahtar rol oynadığını göstermiştir.



Şekil 4: Yumurta membran potansiyelinin, sperm-yumurta birleşmesini (füzyon) düzenleme mekanizması. Paralel çizgiler sperm (s) ve yumurta (y) plazma membranlarını; solid şekiller ise füzyonda önemli olan membran moleküllerini temsil etmektedir. Yumurta membran potansiyeli negatif ise (A), sperm komponentinin pozitif yüklü kısmı yumurta içine tam olarak girebilecek ve füzyon gerçekleşecek; pozitif ise (B), sperm komponentinin pozitif yüklü kısmı yumurta içine tam olarak giremeyecek ve füzyon önleneyecektir (Jaffe'den).

Spermin yumurtaya girmesinden sonra yumurta membran potansiyelinde meydana gelen ani depolarizasyonun, spermde bulunan ve yumurtaya füzüyon sonucunda serbestleyerek ooplazmada eriyebilen bir faktörden kaynaklandığı düşünölmektedir (6). Bu eriyebilen sperm fraksiyonu, fertilizasyon kanallarının aktivasyonunu ve yumurta yüzey kontraksiyonunu başlatabilmektedir. Son zamanlarda bu faktörün siklik ADP-riboz (c-ADPR) olabileceği fikri ortaya atılmış (20), bu görüş deniz kestanesi yumurtasında yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir (18). Mekanizma kısaca şu şekildedir: sperm tarafından yumurtaya ya direkt c-ADPR molekülü, yada bu molekülün oluşumu için gerekli olan enzim sağlanmakta, c-ADPR ise endoplazmik retikulum üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak Ca^{+2} serbestlenmesine neden olmaktadır. Artan sitoplazmik kalsiyum, fertilizasyon potansiyelinin başlamasını sağlayacak kapıların aktivasyonuna neden olabilmektedir (16). Aktivasyon potansiyeli ile fertilizasyonda ortaya çıkan membran potansiyel değişiminin benzer olması da, bu görüşü desteklemektedir (12). Sonuç olarak fertilizasyon potansiyeli, sperm ile yumurta arasında oluşan etkileşim ile açılan kanallardan (fertilizasyon kanalları), iyonik kondüktansın artışı sonucu meydana gelmektedir. Yani fertilizasyon kanalları voltajdan bağımsız, ancak spermdeki liganda bağımlı olarak fonksiyon görmektedir.

2-F.6-Türlere Göre Fertilizasyon Potansiyeli

FP türlere göre değişen özellikler göstermekle beraber, fonksiyonu hepsinde aynıdır. *Ekinodermlerden* deniz kestanesi ve deniz yıldızında (8,13; Jaffe&Cross'a göre, Jaffe ve Miyazaki'den), *Echiuranlardan* Urechis'te (13; Jaffe&Cross'a göre Somero'dan), *Amfibilerden* Rana pipiens ve Xenopus laevis'te (11,12,29) membran potansiyeli fertilizasyonu takiben pozitif değerlere; *Artropodlarda* ise negatif değerlere kaymaktadır (15; Klein ve ark. göre Goudeau'dan). *Salamenderlerle* (polispermi görülür) *teleostlardan* Oryzias latipes'te ise fertilizasyonda elektriksel blok gelişmemektedir (21,26). Elektriksel kaydı yapılan *bitkilerden* deniz Fucoid Alglerinde geçici FP gözlenmiş ve dereceli bir

hiperpolarizasyon kaydedilmiştir (3).

2-F.7-Türlerde FP'ne Neden Olan Elektrolitler

FP çalışması yapılan diğer türlere ait örnekler şöyle sıralanabilir:

Deniz yıldızında yapılan çalışmalarda FP'nin 10 dk kadar devam ettiği ve bu potansiyelden sorumlu temel elektrolitlerin Na^+ ve Ca^{+2} olduğu bildirilmiştir (8,13).

Urechisde yapılan çalışmalarda FP'nin 10 dk kadar sürdüğü ve esas olarak Na^+ , daha az olmak üzere Ca^{+2} kondüktanslarının arttığı belirtilmiştir (13).

Fucoid Alglerde FP'nin temelde Na^+ kondüktansındaki artışa bağlı olduğu bildirilmiştir (3).

Amfibilerde FP'nin temel olarak Cl^- ve K^+ kondüktanslarındaki artış sonucunda geliştiği bildirilmiştir (11,12).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3-A-GEREÇ ve YÖNTEM

Tür ayrımı Başoğlu'na (1) göre yapılarak Çukurova Bölgesinden toplanan erişkin *Rana cameranoi* türü kurbağalar, kullanılacakları zamana kadar +4 °C'de tutuldu. Az miktarda stok solüsyon içeren plastik kaplarda, +4 °C'de, kurbağalar uzun süre yiyeceksiz kalabilmekte olup; Na⁺, K⁺, Ca⁺² ve uygun antibiotikler içeren bu solüsyonlar (29) her hafta düzenli olarak değiştirildi.

3-A.1-Yumurta Eldesi

Çalışmalar Kasım ile Haziran ayları arasında yapıldı. Aynı cins kurbağalardan çıkarılan hipofiz bezleri (25) homojenat haline getirilerek cinsel olgunluğa erişmiş dişi kurbağalara intraperitoneal (IP) yoldan 18 No.lu iğne ile enjekte edildi. Enjekte edilen dişi hipofiz bezi sayısı Kasım-Ocak'ta 6, Ocak-Şubat'ta 4, Mart'ta 3 ve Nisan'da 2 adet olmak üzere aylara göre ayarlandı (27).

Progesteron (Sigma P0130) bitkisel yağda hafifçe ısıtılarak eritildi ve elde edilen stok solüsyon (10 mg/ml) oda sıcaklığında saklandı. Progesteron dişi kurbağanın uyluk kası içine enjekte edildi. Hipofiz bezi ve progesteron enjeksiyonları ardışık uygulandı. Enjekte edilen progesteron dozları da Kasım-Aralık'ta 4 mg, Ocak'ta 2 mg, Şubat-Mart'ta 1 mg ve Nisan-Mayıs'ta 0.5 mg olmak üzere aylara göre ayarlandı (11). Enjeksiyon işlemi tamamlanan hayvanlar 18°C'de 36 saat veya 25 °C'de 24-36 saat kadar tutulduktan sonra, sağma yolu ile olgun yumurtalar elde edildi. İki-üç gün boyunca olgun yumurta elde edilebilmesi için dişi kurbağalar daha sonra +4 °C'de tutuldu.

Olgunluk kriterlerini taşıyan vitellin membran ve jel tabakaları ile çevrili yaklaşık 1.75 mm çapındaki pigmentli animal kutup ve grimsi-beyaz vegetal kutup içeren yumurtalar, çalışma

kapsamına dahil edildi (26).

3-A.2-Sperm Eldesi

IP yoldan 300 IU human koriyonik gonadotropin (hCG, Sigma CG-2) enjeksiyonu yapılan erkek kurbağalar, oda sıcaklığında 2-5 saat bekletildi. Bu süre sonunda çıkarılan testisler etkisi araştırılacak olan solüsyonlarda küçük parçalara ayrılarak, sperm süspansiyonları elde edildi. Spermilerin aktivite kazanmaları için süspansiyon 5-10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Spermiler şekil ve hareketlilik açısından, mikroskop altında X100 büyütmesinde incelendi.

3-A.3-İnseminasyon İşlemi ve Fertilizasyonun Değerlendirilmesi

Ortalama 5-10 olgun yumurta kuru plastik petri kaba kondu ve jel tabakasının plastiğe doğal yapışması sayesinde stabilite sağlandı. Fertilizasyon için, olgun yumurtaların üzerine etkisi araştırılacak solüsyondaki sperm süspansiyonundan (yaklaşık 5×10^6 /ml) birkaç damla damlatılarak, 1 ile 2 dakika kadar beklendi. Bu sürenin sonunda kayıt solüsyonu kaba eklenerek, mikroelektrod ile yumurtaya girildi. Fertilizasyon, inseminasyondan sonra yaklaşık 5 dakikada gerçekleşti. Bu şekilde insemine edilen yumurtaların % 90'dan fazlasında normal fertilizasyonun geliştiği gözlemlendi. Membran potansiyelinde depolarizasyon (yaklaşık 5 dk içinde), rotasyon (yaklaşık 30 dk'da) ve normal birinci yarıklanma (yaklaşık 2.5 saatte) normal fertilizasyon kriterleri olarak değerlendirildi (12). Elde edilen kayıtların geçerliliği, embriyolar nöral fold aşamasına kadar takip edilerek kontrol edildi. Membran potansiyel değişimine ek olarak rotasyon gösteren, fakat normal olarak birinci yarıklanma gelişmeyen veya nöral fold aşamasına gelmeyen yumurtalara ait kayıtlar geçersiz sayıldı. Tüm deneyler 21-25 °C arasında gerçekleştirildi.

3-A.4-Solüsyonların Hazırlanması

İyonların fertilizasyona ilişkin biyoelektrik potansiyeller üzerindeki etkisini incelemek için, iyon içeriklerinin modifiye

edildiği solüsyonlarla, kanal blokleri içeren solüsyonlar kullanıldı; bu solüsyonlara ve kontrol kayıtlarında kullanılan standart % 10'luk Ringer solüsyonuna (12) ait içerikler, Tablo 1'de verilmiştir. Tüm solüsyonlarda fertilizasyon ve gelişme normal olarak meydana gelmiştir.

Tablo 1- Solüsyonların içerikleri (mM; P_h 7.8).

	<u>NaCl₂</u>	<u>KCl</u>	<u>CaCl₂</u>	<u>MgSO₄</u>	<u>NaOH</u>	<u>Hepes</u>	<u>Ch.Cl.</u>	<u>KOH</u>	<u>SITS</u>	<u>TEA</u>	<u>MgCl₂</u>	<u>EGTA</u>
<u>Standart Sol.</u>	<u>11.1</u>	<u>0.19</u>	<u>0.11</u>	<u>0.08</u>	<u>0.4</u>	<u>0.25</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>
<u>0.5 [Na⁺]</u>	<u>5.55</u>	<u>0.19</u>	<u>0.11</u>	<u>0.08</u>	<u>---</u>	<u>0.25</u>	<u>5.55</u>	<u>0.4</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>
<u>0.1 [Na⁺]</u>	<u>1.11</u>	<u>0.19</u>	<u>0.11</u>	<u>0.08</u>	<u>---</u>	<u>0.25</u>	<u>9.99</u>	<u>0.4</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>
<u>0 [Na⁺]</u>	<u>0</u>	<u>0.19</u>	<u>0.11</u>	<u>0.08</u>	<u>---</u>	<u>0.25</u>	<u>11.1</u>	<u>0.4</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>
<u>K Blokerli</u>	<u>11.1</u>	<u>0.19</u>	<u>0.11</u>	<u>0.08</u>	<u>0.4</u>	<u>0.25</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>10</u>	<u>---</u>	<u>---</u>
<u>Cl⁻ Blokerli</u>	<u>11.1</u>	<u>0.19</u>	<u>0.11</u>	<u>0.08</u>	<u>0.4</u>	<u>0.25</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>1</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>
<u>0.5 [Ca²⁺]</u>	<u>11.1</u>	<u>0.19</u>	<u>0.055</u>	<u>0.08</u>	<u>0.4</u>	<u>0.25</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>0.055</u>	<u>---</u>
<u>0 [Ca²⁺]</u>	<u>11.1</u>	<u>0.19</u>	<u>0</u>	<u>0.08</u>	<u>0.4</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>---</u>	<u>0.11</u>	<u>5</u>

Tabloda 0.5 [Na⁺], 0.1 [Na⁺], 0 [Na⁺] olarak belirtilen Na⁺ değerleri; sırasıyla Na⁺ içeriğinin standart solüsyondakinin 0.5 ile 0.1 katına azaltıldığı solüsyonlarla hiç Na⁺ içermeyen solüsyonları tanımlamaktadır. Aynı şekilde 0.5 [Ca²⁺] ve 0 [Ca²⁺] olarak belirtilen Ca²⁺ değerleri; sırasıyla Ca²⁺ içeriğinin standart solüsyondakinin 0.5 katı kadar azaltıldığı solüsyonlarla, hiç Ca²⁺ içermeyen solüsyonları tanımlamaktadır. 0 [Ca²⁺] modifiye solüsyonuna ayrıca 5 mM Etilen Glikol-bis (β -Aminoetil eter) N,N,N',N'-Tetraasetik asit (EGTA, Sigma E-4378) eklendi. Modifiye solüsyonlardaki azaltılan miktarlara uygun olarak ve tabloda belirtildiği gibi Na⁺ kolin klorür (Ch.Cl.) ile; Ca²⁺ ise Mg²⁺ ile tamamlandı. K⁺ kanal blokleri olarak 10 mM Tetraetilamonyum (TEA)

(Sigma T-2265), Cl^- kanal blokeri olarak ise 1 mM 4-asetamido-4'-isotiosiyano-2,2'-disülfonik asit (SITS) (Sigma A-0554) kullanıldı. Tüm kimyasal maddeler Sigma'dan sağlandı.

3-A.5-Elektrofizyolojik Kayıtlar

Dış çapı 1.2 ila 1.5 mm olan filamentli cam pipetler (Intracel Ltd.- İngiltere) dikey mikroelektrod puller (Harward Microelecrode Pullers, 50-2013) ile çekilerek, uç çapı 0.1-0.5 μm olan mikroelektrodlar hazırlandı. Mikroelektrodlar 3 M KCl ile dolduruldu. Bu şekilde elde edilen mikroelektrodların uç dirençleri (R_e) 10-35 M Ω , uç potansiyelleri ise 2-5 mV olarak saptandı. Bu mikroelektrodlar ile membran potansiyel kayıtları banyo solüsyonuna göre agar referans elektrodu sayesinde yapıldı. Stereomikroskop (Olympus VMZ) altında ve hidrolikli mikromanipülatör (Narishige, MO-203) aracılığı ile mikroelektrod yumurtanın animal kutbuna temas ettirilerek, amplifiyerin (Nihon Kohden MEZ 7200) negatif kapasitansının geçici olarak arttırılmasıyla sağlanan osilasyon akımı sayesinde yumurtaya girildi. Bu şekilde mikroelektrod ile girilen yumurtaya ait membran potansiyelleri birinci yarıklanmanın sonuna kadar sürekli kaydedildi. Kayıt süresince aralıklı olarak R_e kontrol edildi. Membran potansiyeli amplifiyer aracılığı ile, storaj osiloskopta (Nihon Kohden VC 10) izlendi.

3-B-DENEY GRUPLARI ve DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER

3-B.1-Kontrol ve Deney Grupları

Standart solüsyon olarak kullanılan %10 Ringer solüsyonunda alınan kayıtlar, kontrol grubunu oluşturdu.

Deney Grupları

$\text{Na}^+_{0.5}$ grubu: Standart solüsyondakinin 0.5 katı kadar azaltılmış Na^+ içeren modifiye solüsyonlarda alınan kayıtlar.

$\text{Na}^+_{0.1}$ grubu: Standart solüsyondakinin 0.1 katına azaltılmış Na^+ içeren modifiye solüsyonlarda alınan kayıtlar.

Na^+_0 grubu: Sodyum içermeyen modifiye %10 Ringer solüsyonunda alınan kayıtlar.

TEA grubu: Standart solüsyona K^+ kanal blokeri olan TEA eklenmiş solüsyonlarda alınan kayıtlar.

SITS grubu: Standart solüsyona Cl^- kanal blokeri olan SITS eklenmiş solüsyonlarda alınan kayıtlar.

$Ca^{+2}_{0.5}$ grubu: Standart solüsyondakinin 0.5 katı kadar azaltılmış Ca^{+2} içeren modifiye solüsyonlarda alınan kayıtlar.

Ca^{+2}_0 grubu: Kalsiyum içermeyen modifiye %10 Ringer solüsyonunda alınan kayıtlar.

3-B.2-Değerlendirilen Parametreler

Fertilize olmamış yumurtanın dinlenme zar potansiyeli (RMP ; mV): Olgun yumurtadan, fertilizasyondan önce kayıtlanan dinlenme zar potansiyeli değeri.

Pik fertilizasyon potansiyeli (FP_p ; mV): Fertilizasyon potansiyelinin en üst değeri.

Fertilize yumurtanın membran potansiyeli (MP_f ; mV): Fertilize olmuş yumurtada zar potansiyelinin tekrar stabil duruma döndüğü değer.

Fertilizasyon zamanı (F_t ; dk): Yumurtanın insemine edildiği andan, zar potansiyelinde meydana gelen anlamlı ilk değişim anına kadar geçen süre.

Fertilizasyon potansiyel süresi (FP_d ; dk): Fertilizasyon potansiyelinin başladığı andan, fertilize yumurtanın stabil zar potansiyeline döndüğü zamana dek geçen süre.

Birinci yarıklanma zamanı (C_t ; dk): FP 'nin başladığı andan, yarıklanmanın elektriksel belirtisi olan hiperpolarizasyonun ilk başladığı ana kadar geçen süre.

Birinci yarıklanma pik potansiyeli (CP_p ; mV): Yarıklanmaya bağlı olarak gelişen hiperpolarizasyonun en üst değeri.

Yarıklanma döngüsü (C_o ; dk): Yarıklanmanın göstergesi olan hiperpolarizasyonun başladığı andan, potansiyelin tekrar stabil durumuna dönmesine kadar geçen süre. Bu döngüde hiperpolarizasyonun pik değerine kadar geçen süre faz 1; pik hiperpolarizasyondan sonra stabil membran potansiyelinin oluşumuna kadar geçen süre ise faz 2 olarak adlandırılmıştır.

Birinci yarıklanma sonrası zar potansiyeli (MP_{p_0} ; mV): Yarıklanma sonrasında, zar potansiyelinin stabil olarak kaldığı değer.

3-C-İSTATİSTİK

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde tek yollu Anova testi, Student-Newman-Keuls testi ve bağımlı örneklerde t-testi ile korelasyon-regresyon analizi kullanıldı (CSS Statistica/3F, Primer ve Excel 5.0 for Windows). Tüm değerler ortalama \pm Standart hata ($Ort \pm SE$) olarak ifade edildi. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alındı.



4. BULGULAR

4-A-DİNLENİM ZAR POTANSİYELİ (RMP) VE FERTİLİZASYON POTANSİYELİNE İLİŞKİN DEĞERLER

Gruplara göre dinlenme zar potansiyeli ve fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler Tablo 2-12'de verilmiştir.

4-A.1- Kontrol Grubu

Tablo 2: Kontrol grubundaki RMP ile fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler.

	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _a (dk)
1	-28	7	-25	3.41	21.05
2	-36	5	-32	7.16	22.07
3	-23	6	-18	4.51	8.25
4	-27	0	-27	3.35	20.02
5	-30	5	-18	4.09	13.18
6	-37	7	-27	4.25	16.26
7	-26	7	-24	5.15	9.43
8	-26	6	-24	3.49	16.32
9	-26	3	-22	11.30	22.20
10	-23	11	-20	7.11	14.21
11	-17	9	-18	7.52	11.40
12	-26	6	-24	10.43	18.21
13	-30	7	-21	5.49	15.46
14	-37	8	-26	5.30	16.00
15	-20	5	-20	4.43	6.14
16	-23	11	-19	7.29	16.50
17	-23	11	-20	8.50	13.44
18	-28	-1	-26	9.05	12.11
19	-19	1	-22	7.53	17.34
20	-22	11	-18	6.15	9.55
Ort±SE	-26.35±1.26	6.25±0.79	-22.55±0.86	6.30±0.53	15.08±1.03
Min	-37	-1	-32	3.35	6.14
Max	-17	11	-18	11.30	22.20

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

4-A.2- Deney Grupları

Tablo 3- Na⁺_{0.5} grubundaki RMP ve fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler.

	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _d (dk)
1	-27	0	-32	5.30	12.31
2	-33	-3	-34	9.11	16.50
3	-24	9	-22	6.57	13.55
4	-26	4	-22	5.00	14.00
5	-21	0	-20	4.10	12.53
6	-46	-4	-50	4.57	15.09
7	-30	8	-24	4.01	14.01
8	-41	4	-22	6.36	13.04
9	-21	14	-17	6.37	27.53
10	-31	-1	-24	4.15	9.53
11	-24	0	-36	5.17	20.33
12	-28	-8	-28	6.51	12.11
13	-25	12	-21	5.48	13.42
14	-39	3	-26	4.56	12.20
15	-35	0	-30	4.10	12.47
16	-28	3	-23	5.01	13.01
17	-30	1	-23	6.56	13.11
18	-31	-2	-24	6.24	11.33
19	-23	5	-19	5.05	11.22
20	-27	-1	-30	4.23	11.53
Ort±SE	-29.5±1.49	2.2±1.21	-26.35±1.68	5.36±0.28	14.08±0.87
Min	-46	-8	-50	4.01	9.53
Max	-21	14	-17	9.11	27.53

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 4: Na⁺_{0.1} grubundaki RMP ve fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler.

	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _a (dk)
1	-23	0	-11	5.39	16.21
2	-29	2	-22	2.44	12.08
3	-25	0	-27	4.19	12.48
4	-27	2	-22	3.56	11.47
5	-25	-1	-24	6.08	12.47
6	-30	2	-29	3.19	14.34
7	-27	-3	-23	8.41	3.58
8	-29	7	-30	8.18	21.44
9	-35	6	-21	8.13	10.07
10	-31	0	-27	5.15	13.25
11	-27	2	-20	6.34	14.00
12	-34	-2	-20	4.26	10.07
13	-30	-1	-29	7.44	14.17
14	-28	-2	-20	7.11	13.25
15	-29	4	-24	4.33	10.30
16	-38	0	-24	5.05	10.18
17	-34	-1	-31	9.27	12.24
18	-35	5	-22	7.23	11.03
19	-27	5	-21	5.32	19.57
20	-33	2	-24	4.16	10.21
21	-30	8	-27	3.20	13.57
Ort±SE	-29.81±0.84	1.67±0.68	-23.71±0.99	5.49±0.43	12.51±0.79
Min	-38	-3	-31	2.44	3.58
Max	-23	8	-11	9.27	21.44

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 5: Na⁺ grubundaki RMP ve fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler.

	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _d (dk)
1	-34	-3	-28	3.40	9.13
2	-43	4	-23	3.52	11.28
3	-43	3	-39	7.58	11.04
4	-45	4	-35	11.59	13.51
5	-51	4	-34	7.14	13.01
6	-48	4	-35	7.08	10.36
7	-30	8	-25	3.04	13.15
8	-53	-7	-35	5.01	15.49
9	-34	-1	-20	4.59	9.40
10	-47	0	-24	5.49	14.17
11	-53	-1	-21	5.29	12.57
12	-29	3	-24	3.55	18.22
13	-39	3	-26	3.42	13.19
14	-51	-2	-28	4.11	13.03
15	-40	-2	-27	3.16	19.09
16	-43	-1	-21	4.46	12.25
Ort \pm SE	-42.69 \pm 1.96	1.00 \pm 0.93	-27.81 \pm 1.5	5.25 \pm 0.57	13.13 \pm 0.69
Min	-53	-7	-39	3.04	9.13
Max	-29	8	-20	11.59	19.09

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 6: TEA grubundaki RMP ve fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler.

	RMP (mV)	FP_p (mV)	MP_f (mV)	F_t (dk)	FP_a (dk)
1	-30	5	-17	7.18	18.04
2	-20	15	-12	5.30	18.20
3	-22	13	-11	5.04	23.38
4	-17	11	-19	6.24	15.57
5	-23	12	-14	5.10	23.50
6	-25	13	-22	4.48	26.40
7	-23	17	-12	6.18	21.48
8	-20	4	-11	5.51	11.06
9	-28	15	-18	5.21	24.06
10	-19	15	-20	3.20	25.13
11	-24	16	-19	4.28	19.29
12	-17	20	-12	3.15	18.52
13	-20	14	-16	5.39	21.36
14	-16	8	-16	3.14	10.55
15	-17	15	-11	4.51	5.25
16	-16	17		3.45	
17	-17	20	-17	2.40	12.17
18	-21	9	-11	3.58	6.32
19	-20	8	-14	5.28	11.23
20	-19	9	-22	7.14	14.58
21	-16	12	-13	3.18	11.34
Ort±SE	-20.48±0.86	12.76±0.96	-15.35±0.84	4.54±0.3	17.05±1.42
Min	-30	4	-22	2.40	5.25
Max	-16	20	-11	7.18	26.40

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 7: SITS grubundaki RMP ve fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler.

	RMP (mV)	FP_p (mV)	MP_f (mV)	F_t (dk)	FP_d (dk)
1	-20	-7	-16	4.47	3.23
2	-27	-2	-26	3.24	10.17
3	-19	-3	-16	3.21	16.41
4	-24	-6	-22	6.24	17.47
5	-18	-4	-20	7.52	8.18
6	-34	-3	-21	3.35	2.57
7	-33	-10	-22	5.59	5.07
8	-24	10	-18	4.17	21.49
9	-18	-6	-18	6.50	4.09
10	-19	-8	-17	7.08	3.45
11	-30	-4	-20	8.49	6.18
12	-27	-8	-19	2.40	5.54
13	-18	-1	-11	8.01	2.53
14	-19	-7	-17	1.30	9.13
15	-33	-1	-31	12.30	4.41
16	-24	-3	-19	2.10	4.06
17	-32	-11	-29	4.15	5.33
18	-20	5	-15	4.00	9.25
19	-40	-5	-31	3.20	8.06
20	-38	-7	-31	2.40	5.26
21	-23	-4	-20	4.55	7.16
Ort±SE	-25.71±1.53	-4.05±1.04	-20.90±1.23	5.10±0.58	7.46±1.12
Min	-40	-11	-31	1.30	2.53
Max	-18	10	-11	12.30	21.49

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 8: Ca²⁺_{0.5} grubundaki RMP ve fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler.

	RMP (mV)	FP _p (mV)	RMP _f (mV)	F _t (dk)	FP _d (dk)
1	-29	14	-24	4.38	17.00
2	-24	11	-11	3.33	12.23
3	-29	10	-25	6.53	24.04
4	-28	6	-26	3.28	16.28
5	-23	-8	-23	5.38	9.15
6	-19	10	-21	1.53	19.20
7	-22	12	-30	2.12	19.42
8	-24	12	-27	3.22	23.09
9	-25	17	-24	3.34	24.42
10	-22	9	-21	4.45	12.29
11	-25	7	-25	4.23	15.46
12	-24	7	-19	6.52	22.26
13	-30	10	-21	2.37	17.13
14	-29	5	-18	4.50	17.19
15	-32	21	-21	3.37	18.11
16	-53	12	-43	5.08	34.18
17	-30	9	-17	5.10	22.57
18	-30	7	-18	5.27	14.31
19	-53	14	-21	5.35	24.26
20	-22	12	-22	10.50	21.00
21	-27	5		4.25	
Ort±SE	-28.57±1.92	9.62±1.23	-22.85±1.40	4.40±0.40	19.20±1.25
Min	-53	-8	-43	1.53	9.15
Max	-18	21	-11	10.05	34.18

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 9: Ca⁺²₀ grubundaki RMP ve fertilizasyon potansiyeline ait değerler.

	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _a (dk)
1	-43	8	-20	11.39	19.29
2	-30	1	-17	6.09	14.01
3	-28	3	-18	10.33	9.48
4	-30	10	-21	4.56	14.07
5	-27	9	-25	2.52	23.02
6	-24	7	-27	5.04	26.36
7	-27	0	-26	8.32	27.06
8	-22	0	-19	12.43	10.21
9	-19	2	-13	9.39	10.31
10	-36	0	-19	6.09	14.36
11	-36	12	-27	4.01	14.38
12	-31	13	-18	3.30	17.52
13	-28	11	-25	3.02	26.28
14	-21	13	-29	5.25	27.03
15	-23	15	-22	2.01	19.34
16	-25	6	-15	1.30	12.46
17	-24	13	-18	5.33	19.43
18	-29	13	-17	2.44	17.24
19	-26	12	-25	6.23	14.18
Ort±SE	-27.84±1.33	7.79±1.21	-21.10±1.05	5.55±0.75	17.52±1.35
Min	-43	0	-29	1.30	9.48
Max	-19	15	-13	12.43	27.06

RMP ile MP_f değerleri arasındaki farklılık anlamlıdır (p<0.05).

4-A.3- RMP ile Fertilizasyon Potansiyeline İlişkin Toplu Değerler

Tablo 10: Kontrol ve Na⁺ gruplarındaki RMP ile fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler (Ort±SE).

Gruplar	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _a (dk)
Kontrol (N [*] =8;n ^{**} =20)	-26.35±1.26	6.25±0.79	-22.55±0.86	6.30±0.53	15.08±1.03
Na⁺_{0.5} (N=5;n=20)	-29.5±1.49	2.2±1.21 ^a	-26.35±1.68	5.36±0.28	14.08±0.87
Na⁺_{0.1} (N=3;n=21)	-29.81±0.84	1.67±0.68 ^a	-23.71±0.99	5.49±0.43	12.51±0.79
Na⁺₀ (N=2;n=16)	-42.69±1.96 ^{a b}	1.0±0.93 ^a	-27.81±1.5 ^a	5.25±0.57	13.13±0.69

(*) : Kullanılan kurbağa sayısı

(**) : Kayıt alınan yumurta sayısı

(a) : Kontrole göre anlamlı olan değerler; p<0.05

(b) : Diğer Na⁺ gruplarına göre anlamlı olan değer; p<0.05.

Tablo 11: TEA ve SITS gruplarındaki RMP ile fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler (Ort±SE).

Gruplar	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _d (dk)
Kontrol (N=8;n=20)	-26.35±1.26	6.25±0.79	-22.55±0.86	6.30±0.53	15.08±1.03
TEA (N=4;n=21)	-20.48±0.86*	12.76±0.96*	-15.35±0.84*	4.54±0.3	17.05±1.42
SITS (N=3;n=21)	-25.71±1.53	-4.05±1.04*	-20.9±1.23	5.10±0.58	7.46±1.12*

(*): Kontrole göre anlamlı olan değerler; p<0.05 .

Tablo 12: Ca⁺² gruplarındaki RMP ile fertilizasyon potansiyeline ilişkin değerler (Ort±SE).

Gruplar	RMP (mV)	FP _p (mV)	MP _f (mV)	F _t (dk)	FP _d (dk)
Kontrol (N=8;n=20)	-26.35±1.26	6.25±0.79	-22.55±0.86	6.30±0.53	15.08±1.03
Ca⁺²_{0.5} (N=2;n=21)	-28.57±1.92	9.62±1.23	-22.85±1.4	4.40±0.4	19.20±1.25*
Ca⁺²₀ (N=3;n=19)	-27.84±1.33	7.79±1.21	-21.10±1.05	5.55±0.75	17.52±1.35

(*): Kontrole göre anlamlı olan değerler; p<0.05.

4-B- YARIKLANMA DÖNGÜSÜNE İLİŞKİN DEĞERLER

Gruplara göre yarıklanma döngüsüne ilişkin değerler, Tablo 13-23'de verilmiştir.

4-B.1- Kontrol Grubu

Tablo 13: Kontrol grubundaki yarıklanma döngüsüne ait değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_c (dk)	MP_{pc} (mV)
1	125.30	-51	22.05	-40
2	130.52	-71	18.17	-42
3	120.54	-50	30.36	-39
4	95.49	-44	20.22	-27
5	113.18	-55	31.54	-36
6	100.56	-38	39.59	-32
7	132.06	-45	26.54	-33
8	90.26	-38	*	-35
9	127.08	-36	19.55	-30
10	129.29	-39	21.04	-32
11	107.00	-34	*	-28
12	130.20	-39	23.55	-29
13	136.10	-45	*	-21
14	110.10	-42	29.50	-28
15	111.55	-54	30.00	-31
16	112.07	-38	32.45	-30
17	80.15	-48	36.05	-35
Ort±SE	114.58±3.94	45.12±2.23	26.42±1.73	-32.24±1.28
Min	80.15	-71	18.17	-42
Max	136.10	-34	43.59	-21

*: Yarıklanma döngüsünün sona erdiği an tam olarak saptanamadığı için bu veriler değerlendirme dışı bırakılmıştır.

4-B.2- Deney Grupları

Tablo 14: $\text{Na}^{+}_{0.5}$ yarıklanma döngüsüne ilişkin değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_c (dk)	MP_{pc} (mV)
1	124.13	-37	8.28	-30
2	137.37	-34	28.10	-31
3	122.24	-52	15.36	-51
4	128.03	-64	37.00	-55
5	117.55	-75	38.04	-56
6	137.01	-69	19.18	-68
7	132.19	-86	22.39	-83
8	146.48	-48	10.58	-45
9	150.09	-44	7.25	-44
10	146.31	-38	7.37	-37
11	153.24	-60	21.23	-35
12	156.24	-27	7.28	-26
13	117.42	-49	42.13	-24
14	138.08	-49	12.49	-42
Ort \pm SE	133.28 \pm 3.49	-52.29 \pm 4.48	19.56 \pm 3.24	-44.79 \pm 4.46
Min	117.42	-86	7.25	-83
Max	156.24	-27	42.13	-24

Tablo 15: $\text{Na}^{+}_{0.1}$ grubundaki yarıklanma döngüsüne ait değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_c (dk)	MP_{pc} (mV)
1	143.05	-40	11.48	-40
2	151.18	-35	26.14	-31
3	136.59	-33	11.19	-32
4	126.43	-41	17.48	-39
5	107.17	-52	33.10	-39
6	129.24	-45	26.39	-31
7	146.25	-34	16.54	-29
8	129.17	-33	11.14	-31
9	136.51	-29	19.04	-20
10	140.35	-46	18.37	-43
11	134.46	-52	22.13	-52
12	152.06	-71	23.20	-44
13	152.36	-30	11.42	-29
14	136.47	-35	10.05	-32
15	127.58	-47	26.38	-39
16	139.02	-68	24.37	-61
17	148.11	-31	7.07	-30
18	122.54	-41	16.01	-32
19	118.07	-56	38.00	-39
Ort \pm SE	132.52 \pm 2.80	-43.11 \pm 2.81	19.36 \pm 1.88	-36.47 \pm 2.13
Min	107.17	-71	7.07	-61
Max	152.36	-29	38.00	-20

Tablo 16: Na⁺ grubundaki yarıklanma döngüsüne ait değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_e (dk)	MP_{pc} (mV)
1	116.17	-57	23.32	-39
2	115.38	-60	20.35	-58
3	97.37	-54	16.22	-46
4	113.21	-66	11.06	-51
5	104.13	-47	20.03	-32
6	122.42	-54	17.15	-50
7	134.36	-57	24.50	-41
8	143.44	-49	24.08	-34
9	141.03	-36	18.52	-25
10	137.38	-71	15.50	-63
11	135.45	-40	11.05	-32
12	124.47	-65	24.23	-48
Ort±SE	123.37±4.3	-54.67±3.01	19.00±1.30	-43.25±3.30
Min	97.37	-71	11.05	-63
Max	143.44	-36	24.50	-25

Tablo 17: TEA grubundaki yarıklanma döngüsüne ait değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_o (dk)	MP_{pc} (mV)
1	160.03	-28	22.25	-21
2	146.24	-28	24.13	-21
3	166.36	-22	12.53	-19
4	146.09	-20	12.39	-14
5	150.29	-20	14.25	-18
6	124.30	-34	20.08	-24
7	119.32	-29	19.31	-20
8	116.22	-40	22.16	-21
9	131.33	-42	27.56	-13
10	133.16	-34	15.40	-17
11	120.12	-28	20.31	-14
12	123.20	-40	18.41	-27
13	119.19	-27	13.43	-17
14	120.29	-21	15.33	-12
15	120.50	-24	7.21	-21
16	131.36	-21	13.41	-16
Ort \pm SE	130.40 \pm 3.98	-28.63 \pm 1.86	17.36 \pm 1.29	-18.44 \pm 1.03
Min	116.22	-42	7.21	-27
Max	166.36	-20	27.56	-12

CP_p ile C_o arasında güçlü ve anlamlı bir ilişki saptanmıştır (n=16, r= -0.678 p<0.01).

Tablo 18: SITS grubundaki yarıklanma döngüsüne ait değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_c (dk)	MP_{p0} (mV)
1	133.28	-47	21.57	-24
2	118.46	-41	13.21	-36
3	120.01	-67	25.18	-36
4	123.30	-77	*	-32
5	128.45	-47	26.40	-31
6	136.25	-43	27.35	-29
7	149.55	-78	26.09	-54
8	128.07	-46	24.22	-32
9	*	-67	21.36	-46
10	132.50	-56	20.52	-50
11	138.37	-60	13.48	-54
12	119.21	-64	36.28	-49
13	133.22	-44	26.51	-30
14	128.43	-93	20.59	-71
15	152.19	-48	19.27	-28
16	131.54	-68	25.23	-45
17	133.20	-41	12.19	-31
18	118.17	-60	26.26	-37
19	110.59	-35	22.18	-26
20	104.30	-44	17.29	-36
21	107.13	-45	12.48	-40
22	113.38	-40	13.57	-22
Ort \pm SE	126.51 \pm 2.75	-55.05 \pm 3.23	21.43 \pm 1.33	-38.14 \pm 2.55
Min	104.30	-93	12.19	-71
Max	152.19	-35	36.28	-22

(*): Zamanın tam olarak saptanamadığı bu veriler değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Tablo 19: $Ca^{+2}_{0.5}$ grubundaki yarıklanma döngüsüne ait değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_s (dk)	MP_{pc} (mV)
1	123.29	-30	19.23	-23
2	139.03	-46	31.24	-30
3	117.48	-65	16.58	-31
4	114.22	-79	26.21	-38
5	140.19	-30	12.35	-25
6	137.12	-62	27.40	-39
7	135.38	-32	6.44	-29
8	138.10	-36	15.51	-30
9	145.13	-30	10.50	-38
10	141.47	-34	22.24	-19
11	129.38	-77	31.30	-35
12	128.45	-76	17.26	-44
13	127.05	-49	21.16	-25
14	123.52	-31	15.31	-26
15	133.40	-48	21.20	-28
16	137.52	-33	12.50	-30
17	135.03	-83	26.44	-30
18	147.13	-52	27.01	-23
19	121.24	-78	37.47	-29
Ort \pm SE	132.30 \pm 2.13	-51.11 \pm 4.56	21.08 \pm 1.85	-29.53 \pm 1.39
Min	114.22	-83	6.44	-44
Max	147.13	-30	37.47	-19

Tablo 20: Ca^{+2} grubundaki yarıklanma döngüsüne ait değerler.

	C_t (dk)	CP_p (mV)	C_s (dk)	MP_{pc} (mV)
1	114.37	-38	16.49	-25
2	97.26	-27	18.34	-19
3	111.20	-79	37.04	-41
4	132.00	-33	23.24	-24
5	130.48	-43	21.06	-23
6	119.44	-34	17.36	-27
7	123.05	-48	21.45	-24
8	117.11	-29	13.10	-21
9	118.28	-42	16.43	-20
10	124.16	-37	20.49	-31
11	123.38	-26	13.51	-22
12	130.14	-36	9.13	-24
13	122.33	-30	9.14	-27
14	118.01	-27	7.30	-26
Ort \pm SE	120.14 \pm 2.39	-37.79 \pm 3.63	17.38 \pm 1.95	-25.29 \pm 1.47
Min	97.26	-79	7.30	-41
Max	132.00	-26	37.04	-19

MP_f ile MP_{pc} değerleri arasındaki farklılıklar tüm gruplarda kendi içinde anlamlılık gösterdi ($p < 0.05$).

4-B.3- Yarıklanma Döngüsüne İlişkin Parametrelere Ait Toplu Değerler

Tablo 21: Kontrol ve Na⁺ gruplarındaki yarıklanma döngüsüne ait değerler (Ort±SE) .

Gruplar	C _t (dk)	CP _p (mV)	C _c (dk)	MP _{pc} (mV)
Kontrol (N=8)	114.58±3.94 (n=17)	-45.12±2.23 (n=17)	26.42±1.73 (n=14)	-32.24±1.28 (n=17)
Na ⁺ _{0.5} (N=5;n=14)	133.28±3.49*	-52.29±4.48	19.56±3.24	-44.79±4.46*
Na ⁺ _{0.1} (N=3;n=19)	132.52±2.8*	-43.11±2.81	19.36±1.88	-36.47±2.13
Na ⁺ ₀ (N=2;n=12)	123.37±4.3	-54.67±3.01	19.00±1.30	-43.25±3.3*

(*): Kontrole göre anlamlı olan değerler; p<0.05

Tablo 22: TEA ve SITS gruplarındaki yarıklanma döngüsüne ait değerler (Ort±SE).

Gruplar	C _t (dk)	CP _p (mV)	C _o (dk)	MP _{pc} (mV)
Kontrol (N=8)	114.58±3.94 (n=17)	-45.12±2.23 (n=17)	26.42±1.73 (n=14)	-32.24±1.28 (n=17)
TEA (N=4;n=16)	130.40±3.98*	-28.63±1.86*	17.36±1.29*	-18.44±1.03*
SITS (N=2)	126.51±2.75* (n=21)	-55.05±3.23 (n=22)	21.43±1.33 (n=21)	-38.14±2.55 (n=22)

(*): Kontrol grubuna göre anlamlı olan değerler; p<0.05.

Tablo 23: Ca⁺² gruplarındaki yarıklanma döngüsüne ait değerler (Ort±SE).

Gruplar	C _t (dk)	CP _p (mV)	C _o (dk)	MP _{pc} (mV)
Kontrol (N=8)	114.58±3.94 (n=17)	-45.12±2.23 (n=17)	26.42±1.73 (n=14)	-32.24±1.28 (n=17)
Ca⁺²_{0.5} (N=2;n=19)	132.30±2.13*	-51.11±4.56	21.08±1.85	-29.53±1.39
Ca⁺²₀ (N=3;n=14)	120.14±2.39	-37.79±3.63	17.38±1.95*	-25.29±1.47

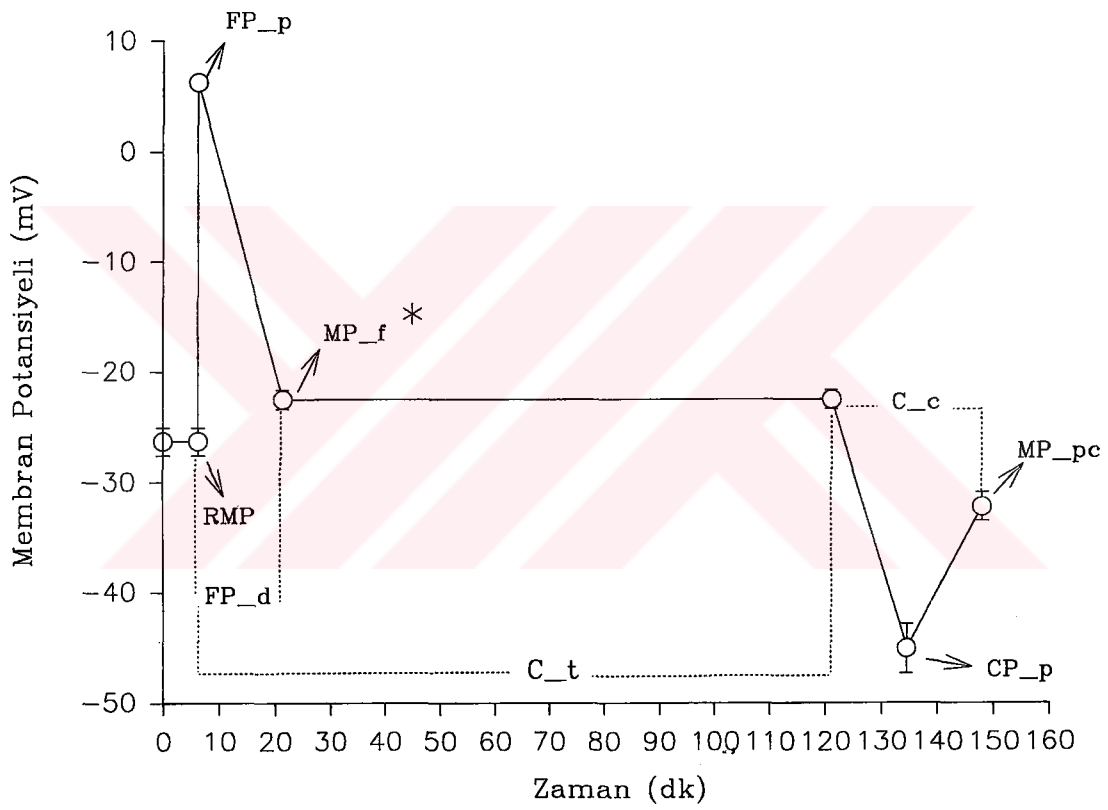
(*): Kontrol grubuna göre anlamlı olan değerler; p<0.05

Yarıklanma döngüsüne ait hiperpolarizasyonun pik değerine kadar geçen süre (faz 1) ve pik hiperpolarizasyondan sonra membran potansiyelinin stabil bir değere dönmesine kadar geçen süre (faz 2) ile toplam yarıklanma döngü sürelerine ait ortalama değerler tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24- Tüm gruplarda yarıklanma döngüsüne ait faz 1 ve faz 2 ile yarıklanma döngüsü toplam sürelerine ait değerler (ort±SE).

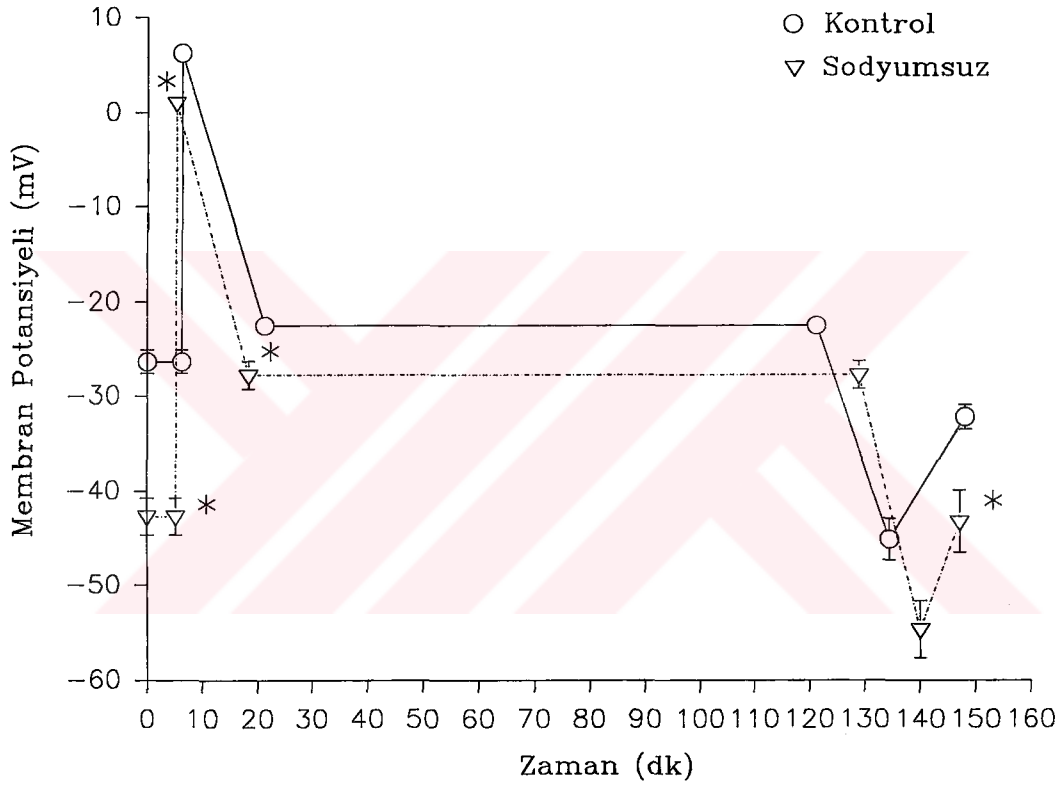
	Faz 1 (dk)	Faz 2 (dk)	C ₀ (dk)
Kontrol (n=14)	13.24±2.13	13.18±0.92	26.42±1.73
Na⁺_{0.5} (n=14)	11.32±1.47	8.23±2.23	19.56±3.24
Na⁺_{0.1} (n=19)	12.18±1.1	7.19±1.48	19.36±1.88
Na⁺₀ (n=12)	11.06±0.96	7.54±1.23	19.00±1.30
TEA (n=16)	7.50±0.76*	9.46±0.80	17.36±1.29*
SITS (n=21)	9.12±0.97	12.31±0.98	21.43±1.33
Ca⁺²_{0.5} (n=19)	8.25±0.92*	12.43±1.49	21.08±1.85
Ca⁺²₀ (n=14)	8.29±0.78*	9.08±1.65	17.38±1.95*

(*): Kontrole göre anlamlı olan değerler; p<0.05.



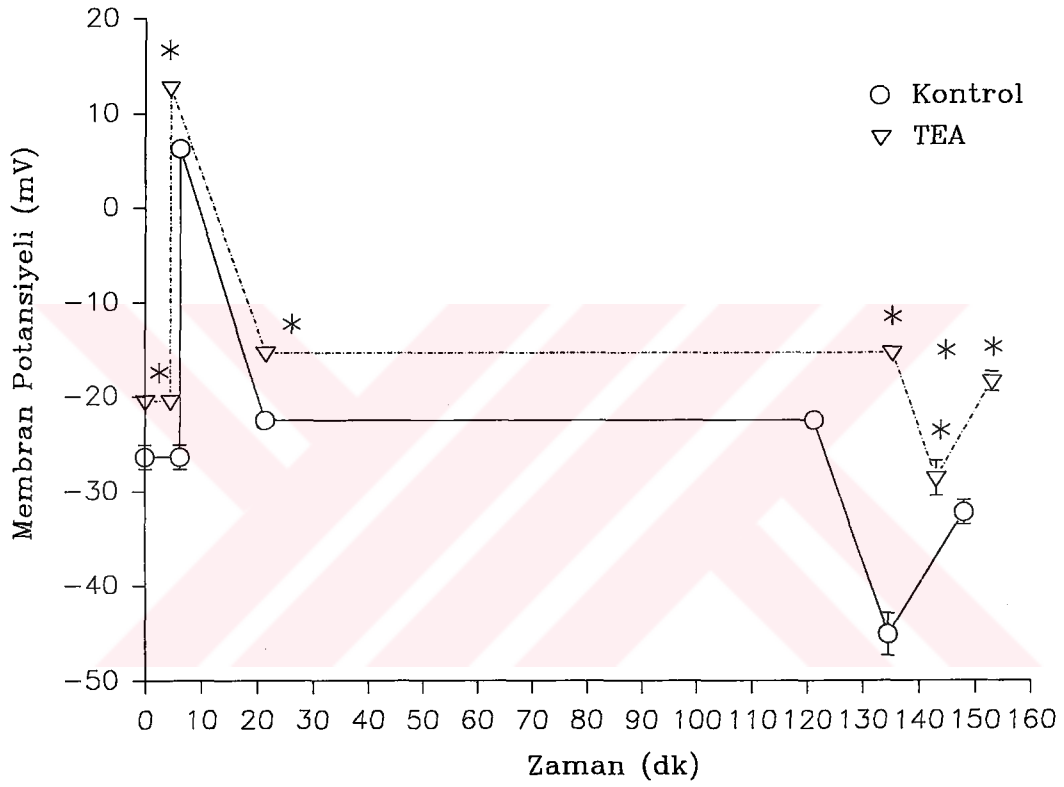
Şekil 5: Kontrol grubuna ait dinlenme zar potansiyeli ile fertilizasyon ve yarıklanma süreçlerine ilişkin parametreler ($\text{ort} \pm \text{SE}$).

(*): MP_f birinci yarıklanmaya kadar anlamlı olmayan, önemsiz osilasyonlar göstermiştir.



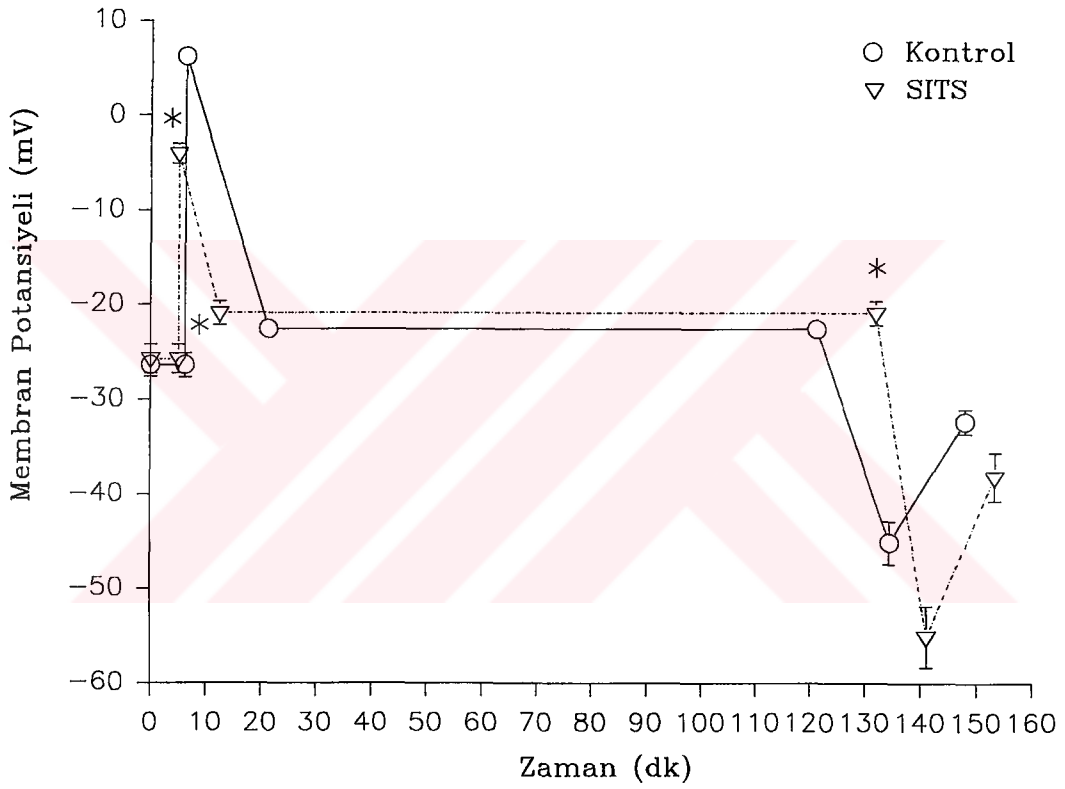
Şekil 6: Kontrol ve Na⁺ gruplarına ait dinlenme zar potansiyeli ile fertilizasyon ve yarıklanma süreçlerine ilişkin parametreler (ort±SE). (Şeklin çiziminde kullanılan parametreler Şekil 5'de verildiği gibidir).

(*): Na⁺ grubunda kontrole göre anlamlı olan değerler (p<0.05).



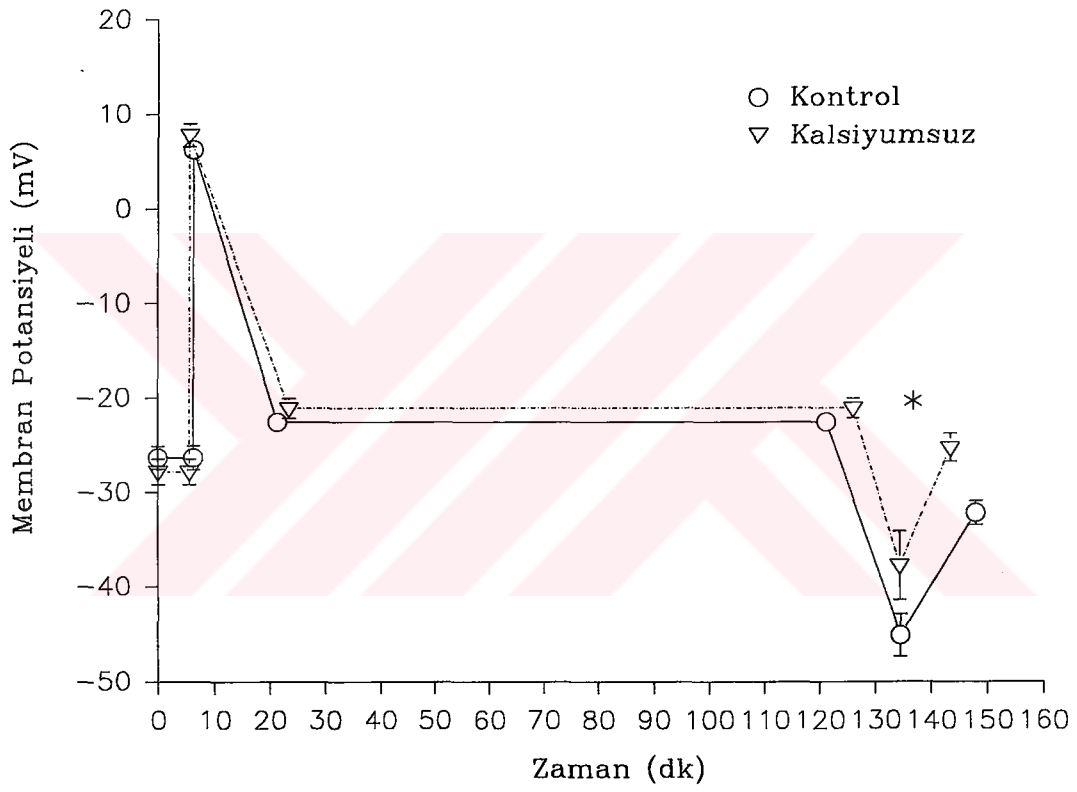
Şekil 7: Kontrol ve TEA gruplarına ait dinlenme zar potansiyeli ile fertilizasyon ve yarıklanma süreçlerine ilişkin parametreler (ort \pm SE). (Şeklin çiziminde kullanılan parametreler Şekil 5'de verildiği gibidir).

(*): TEA grubunda kontrole göre anlamlı olan değerler ($p < 0.05$).



Şekil 8: Kontrol ve SITS gruplarına ait dinlenme zar potansiyeli ile fertilizasyon ve yarıklanma süreçlerine ilişkin parametreler (ort±SE). (Şeklin çiziminde kullanılan parametreler Şekil 5'de verildiği gibidir).

(*): SITS grubunda kontrole göre anlamlı olan değerler ($p < 0.05$).



Şekil 9: Kontrol ve Ca^{+2} gruplarına ait dinlenme zar potansiyeli ile fertilizasyon ve yarıklanma süreçlerine ilişkin parametreler (ort \pm SE). (Şeklin çiziminde kullanılan parametreler Şekil 5'de verildiği gibidir).

(*): Ca^{+2} grubunda kontrole göre anlamlı olan değerler ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada fertilizasyondan birinci yarıklanmaya kadar geçen süre içinde yumurtanın membran potansiyelindeki değişiklikler ile önemli iyonların bu değişiklikler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, fertilizasyonun *Rana cameranoi* kurbağa yumurtasında çok ani ve saniyeler içinde gerçekleşen depolarizasyona neden olduğu ve bu depolarizasyonun, yaklaşık 15 dakika sürerek ikinci bir spermin yumurtaya girişini önlediğini göstermiştir. Fertilize yumurtanın dinlenim zar potansiyeli birinci yarıklanmaya dek önemli bir değişiklik göstermezken, birinci yarıklanma sırasında başlayan ve yavaş hızda gelişen bir hiperpolarizasyon dönemine girmiş, daha sonra tekrar dinlenim zar potansiyeline yaklaşan bir değere erişmiştir. Yarıklanma dönemine ait olan bu biyoelektriksel potansiyel, yaklaşık 25 dakika sürmüştür (Şekil 5).

5-A-DİNLENİM ZAR POTANSİYELİ VE FERTİLİZASYON POTANSİYELİ

5-A.1-Fertilize olmamış yumurtadaki dinlenim zar potansiyeli (RMP)

Standart solüsyon olarak kullanılan % 10 Ringer çözeltisinde elde edilen RMP değeri ($\text{ort} \pm \text{SE}$) -26.35 ± 1.26 mV olarak bulundu. *Rana pipiens*, *Rana esculenta*, *Rana temporaria* türü kurbağa yumurtalarıyla % 10'luk ringer solüsyonlarında yapılan kayıtlarda buna yakın sonuçlar çeşitli kaynaklarda bildirilmiştir (11,12,24; Peres ve arkadaşlarına göre Cross, Jaffe ve Schlichter'den). Ancak farklı içerikteki solüsyonlarla yapılan çalışmalarda, *R.pipiens* kurbağa yumurtası için RMP, yaklaşık -55 mV, *Xenopus laevis* cinsi kurbağa yumurtası içinse yaklaşık -19 mV olarak kayıtlanmıştır (29).

Standart solüsyona göre 0.5 ve 0.1 katına azaltılan Na^+ içeren çözeltelerde (sırasıyla; $\text{Na}^+_{0.5}$ ve $\text{Na}^+_{0.1}$ grupları) ortalama RMP

değerleri kontrol grubuna göre hiperpolarizasyon yönünde bir değişiklik göstermiş, ancak gruplar arasındaki farklılıklar anlamsız olarak bulunmuştur (kontrol, $\text{Na}^{+}_{0.5}$, $\text{Na}^{+}_{0.1}$, sırasıyla; -26.35 ± 1.26 mV; -29.5 ± 1.49 mV; -29.81 ± 0.84 mV; $p > 0.05$, tablo 10). Ancak hiç sodyum içermeyen Na^{+}_0 grubuna ait ortalama değerinde (-42.69 ± 1.96 mV) hiperpolarizasyon anlamlı olarak bulundu ($p < 0.05$). Dış ortam sodyum yoğunluğunun 1.2 ila 121 mM arasında değişen değerlerinde RMP'nin anlamlı bir farklılık göstermediği *X.laevis* yumurtası için bildirilmiştir (23). Bizim çalışmamızda $\text{Na}^{+}_{0.1}$ grubunda kullanılan solüsyonun sodyum yoğunluğu da yaklaşık 1.2 mM olup, bu kaynaklardaki bulguları desteklemektedir. Sodyum içermeyen solüsyonda saptanan anlamlı hiperpolarizasyon, bu iyonun yoğunluk gradyentiyle hücre dışına sızmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir; Nitekim sodyum yoğunluğunun azaltıldığı solüsyonlarda elde edilen ortalama RMP değerlerinin kontrol grubuna ait olan değere göre anlamsız olarak ($p > 0.05$) daha negatif bulunması da, bu düşüncemizi desteklemektedir.

Kalsiyumun 0.5 kat azaltıldığı yada hiç kalsiyum içermeyen solüsyonlarla Cl^{-} kanal blokleri olan SITS eklenmiş solüsyonlarda ortalama RMP, kontrol değerine göre anlamlı bir fark göstermedi (bu solüsyonlardaki RMP değeri, sırasıyla ve $\text{ort} \pm \text{SE}$ olarak; -28.57 ± 1.92 mV, -27.84 ± 1.33 mV, -25.71 ± 1.53 mV; $p > 0.05$; tablo 11-12). *Xenopus* yumurtalarıyla yapılan benzer bir çalışmada bizim sonuçlarımızı destekleyen bulgular elde edilmiş olup, klorun RMP üzerinde anlamlı bir etkisi saptanmamıştır (23); ancak bu çalışmada kullanılan yumurta türü farklı olduğu gibi, klorun etkisi dış ortamdaki Cl^{-} yoğunluğu değiştirilerek belirlenmiş olup yöntem de farklıdır.

K^{+} kanal blokleri olan TEA eklenmiş solüsyonlarda, kontrol grubuna göre depolarizasyon saptandı (Kontrol, -26.35 ± 1.26 mV; TEA grubu, -20.48 ± 0.86 mV; $p < 0.05$; tablo 11). *Rana pipiens* yumurtasında iyonselektif mikroelektrodlar kullanılarak ölçülen yumurta içi K^{+} düzeyi yaklaşık 121 mM. olarak bulunmuştur (12). Dış ortamda bulunan KCl yoğunluğu ise düşük düzeylerde olup (% 10 Ringer'de KCl, 0.19 mM), potasyum dinlenim halindeki yumurtadan konsantrasyon ve elektriksel gradyentleri (yaklaşık $E_{\text{K}^{+}} = -150$)

boyunca sızma eğilimindedir. K^+ kanal blokeri uygulanması ile yumurta dışına çıkabilecek potasyum iyonunun azalması zarın depolarizasyonundan sorumlu olabilir (7).

Sonuç olarak özetlenirse, *Rana cameranoiye* ait fertilize olmamış yumurtada dinlenme zar potansiyelini temel olarak etkileyen faktör, K^+ 'a ait yoğunluk farkıdır.

5-A.2-Fertilizasyon Zamanı (F_t)

Yumurtanın insemine edildiği andan, zar potansiyelinde meydana gelen ilk belirgin değişiklik anına kadar geçen süre olarak tanımlanan F_t 'nin kontrol grubuna ait olan değeri ($ort \pm SE$) 6.30 ± 0.53 dk olarak bulunmuştur. Diğer gruplara ait olan değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir (tablo 10-12). Benzer sperm yoğunlukları kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir (5,11,12,29,30).

5-A.3-Pik Fertilizasyon Potansiyeli (FP_p)

Spermin yumurtayı aktive etmesi ile artan kondüktans sonucu membran ani olarak depolarize olmaktadır. Bu depolarizasyonun en üst değeri ise, kondüktansı artan iyonlar hakkında bilgi vermektedir. Çalışmamızda, kontrol grubuna ait FP_p değeri ($ort \pm SE$) 6.25 ± 0.79 mV olarak bulundu. *Rana pipiens* yumurtasında % 10'luk Ringer solüsyonunda ölçülen FP_p değeri, ortalama 13 mV (12); *Rana pipiens* ve *Xenopus* yumurtalarında farklı solüsyonlar kullanılarak ölçülen değerler ise, sırasıyla ortalama -5.1 mV ve 3 mV olmak üzere, doğal olarak çok farklı bulunmuştur (29). FP_p değeri K^+ kanal blokeri uygulandığında anlamlı olarak yükselmişken ($ort \pm SE$, 12.76 ± 0.96 mV; $p < 0.05$), Cl^- kanal blokeri uygulandığında anlamlı olarak daha negatif bir değere inmiştir ($ort \pm SE$, -4.05 ± 1.04 mV; $p < 0.05$, tablo 11). Jaffe & Schlichter'in yaptığı bir çalışmada Cl^- kanal blokerlerinin (SITS ve DIDS) *R. pipiens* yumurtasının fertilizasyon veya aktivasyonunda etkili olmadığı bildirilmesine karşın; *Xenopus* yumurtasında yapılan bir çalışmada ise, bizim bulgularımızla uyumlu olmak üzere, fertilizasyonda artan Cl^- kondüktansının DIDS (Cl^-

kanal blokeri) ile azaldığı gösterilmiştir (17; Klein ve arkadaşlarına göre Webb'den). *R. pipiens* yumurtasında iyonselektif mikroelektrodlar ile yapılan ölçümlerde, yumurta içindeki K^+ konsantrasyonu 121 mM, Cl^- konsantrasyonu 44 mM olarak; bu iyonlara ait denge potansiyelleri ise Cl^- için +18 mV, K^+ için ise yaklaşık -150 mV olarak saptanmıştır (11). Çalışmamızda K^+ kanal blokeri uygulanarak kayıtlanan FP_p değeri (ort \pm SE, 12.76 \pm 0.96 mV) kloro ait denge potansiyeline ($E_{Cl^-} = +18$ mV) çok yakın bulunmuştur. Buna karşın Cl^- kanal blokeri uygulanarak kayıtlanan FP_p değeri (ort \pm SE, -4.05 \pm 1.04 mV) potasyuma ait denge potansiyeline ($E_{K^+} = -150$ mV) yaklaşımla beraber TEA grubunda saptanan ölçüde bir yakınlık sözkonusu değildir. Bu sonuçlara göre, fertilizasyon potansiyelinden K^+ ve Cl^- iyonlarının birlikte sorumlu oldukları ancak klor iyonuna ait etkinin potasyum iyonuna göre daha fazla olduğu söylenebilir.

Solüsyondaki Na^+ yoğunluğunun azaltılması, FP_p değerini de anlamlı olarak azaltmaktadır (gruplara ait ort \pm SE değerleri; kontrol, 6.25 \pm 0.79 mV; $Na^+_{0.5}$, 2.2 \pm 1.21 mV; $Na^+_{0.1}$, 1.67 \pm 0.68 mV; Na^+_0 , 1.0 \pm 0.93 mV; $p < 0.05$, tablo 10). Havuz suyu gibi düşük Na^+ konsantrasyonu içeren ortamlardaki (yaklaşık % 10 Ringer) *Rana* ve *Xenopus* yumurtalarında, membran potansiyeli pozitif değerlere çıktığı zaman voltaja duyarlı sodyum kanallarının açılmasıyla sodyumun hücre dışına çıktığı ve sonuçta potansiyel değişiminin daha az pozitif bir değere eriştiği bildirilmiştir. (23; Peres ve arkadaşlarına göre Schlichter ve Baud'dan). Bu bilgiler ışığında, sodyumun fertilizasyon potansiyelinin oluşumuna direkt katkıda bulunmadığı, ancak K^+ ve Cl^- kondüktanslarındaki artışın neden olduğu depolarizasyon sırasında açılan voltaja duyarlı Na^+ kanalları yoluyla bu iyonun hücre dışına çıkarak, pik fertilizasyon potansiyelinin daha pozitif bir değere erişmesini engellediği sonucuna varılabilir.

Çalışmamızda solüsyondaki kalsiyum yoğunluğunun azaltılması durumunda veya kalsiyumun hiç bulunmadığı ortamlardaki FP_p değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir (tablo 11). Bu bulgular ışığında, dış ortamdaki kalsiyum iyonunun fertilizasyon potansiyelini önemli ölçüde

etkilemediği sonucuna varılmıştır.

5-A.4-Fertilize Yumurtada Zar Potansiyeli (MP_f)

Fertilize yumurtaya ait zar potansiyeli döllenmeden önceki dinlenme düzeyine erişmemiş ve daha pozitif bir değerde seyretmiştir. RMP ile MP_f arasında saptanan bu farklılık tüm gruplarda anlamlı olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer sonuçlar, *Rana pipiens* ile *Xenopus laevis* yumurtalarında yapılan çalışmalarda da bulunmuş, ancak *Xenopus* yumurtası ile yapılan bir diğer çalışmada RMP ile MP_f arasında önemli bir fark kayıtlanmamıştır (29). MP_f 'nin RMP'ne göre daha pozitif değerde olmasının, mikroelektrodlarla kayıt sırasında gelişebilecek sızıntı akımlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (24).

Fertilize yumurtadaki zar potansiyeline ilişkin saptanan anlamlı değerler ise, kontrol ve TEA ile Na^+ gruplarında, sırasıyla ($ort \pm SE$), -22.55 ± 0.86 mV, -15.35 ± 0.84 mV, -27.81 ± 1.50 idi (p değerleri < 0.05 , tablo 10-11). Fertilize yumurtadaki zar potansiyelinin potasyum blokleri uygulandığında daha pozitif bir değerde saptanması, fertilizasyon potansiyelinin repolarizasyon fazından, yani zarın tekrar polarize olmasından sorumlu olan iyonlardan birinin potasyum olduğunu düşündürmektedir. MP_f 'nin sodyum içermeyen ortamda kontrol grubuna göre daha negatif bir değerde saptanması ise, bu koşulda hücre içindeki sodyumun dışarıya sızdığını düşündürmektedir. Sodyumsuz ortam doğal koşullarda söz konusu olamayacağından ve $Na^{+0.5}$ ile $Na^{+0.1}$ gruplarında göreceli ve anlamlı bir hiperpolarizasyonun saptanmadığından, Na^+ iyonunun fertilizasyon potansiyeline ait repolarizasyon fazından sorumlu olmadığını söyleyebiliriz.

Klor blokleri ve azaltılmış yoğunluklarda Ca^{+2} içeren solüsyonlarda saptanan ortalama MP_f değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir (tablo 11-12).

5-A.5-Fertilizasyon Potansiyeli Süresi (FP_d)

Fertilizasyon potansiyelinin başladığı andan stabil bir MP_f değerine ulaşılan dek geçen süre olan FP_d , kontrol grubunda

(ort \pm SE) 15.08 \pm 1.03 dk olarak bulundu. Bu bulgumuz, çeşitli kaynaklarca desteklenmektedir (12,29,30). Cl⁻ kanal blokleri uygulandığında FP_a kontrole göre anlamlı olarak kısalmış iken (ort \pm SE, 7.46 \pm 1.12 dk, p<0.05, tablo 11), K⁺ kanal blokleri uygulanan TEA grubunda kontrole göre anlamlı bir fark saptanamamıştır (ort \pm SE, 17.05 \pm 1.42 dk, p>0.05, tablo 11). Fertilizasyon sırasındaki depolarizasyondan sorumlu temel iyon olan Cl⁻ kondüktansının kısıtlandığı durumlarda, ortalama pik fertilizasyon potansiyelinin kontrol grubuna göre çok daha negatif bir değerde saptanması (FP_p kontrol ve Cl⁻ kanal blokleri uygulanan gruplarda sırasıyla ort \pm SE, 6.25 \pm 0.79 mV ve -4.05 \pm 1.04 mV; p<0.05; tablo 11), bu koşullarda membranın daha kısa bir sürede polarize konuma dönmesi ile açıklanabilir. K⁺ kanal blokleri uygulandığında ortalama FP_p'nin daha pozitif bir düzeyde olması ise, benzer bir yaklaşımla, zarın tekrar polarize konuma dönmesini yani fertilizasyon potansiyel süresini anlamlı olmamakla birlikte, kontrol grubuna göre daha uzatmaktadır.

Kalsiyum bulunmayan solüsyonda (Ca⁺²₀ grubu) ortalama FP_a kontrole göre anlamlı farklılık göstermezken (p>0.05, tablo 12), Ca⁺²_{0.5} grubundaki ortalama FP_a kontrole göre anlamlı bir uzamaya neden oldu (ort \pm SE, kontrol, 15.08 \pm 1.03 dk; Ca⁺²_{0.5}, 19.20 \pm 1.25 dk, p<0.05; tablo 11). Polispermiyi önlemek üzere ikinci bir basamak olan kalıcı mekanik blok için gerekli kalsiyumun, yumurtanın kendi iç depolarından sağlandığı gösterilmiş olup (4,28; Talevi'ye göre Dale'dan); bu bulguyu desteklemek üzere sonuçlarımızda da hücre dışındaki kalsiyum iyonunun elektriksel ve mekanik blok üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, Ca⁺²_{0.5} grubunda saptanan FP_a'deki uzamanın deney sırasında gelişen diğer iyonlara ait etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı sodyum yoğunlukları içeren Na⁺ gruplarındaki ortalama fertilizasyon potansiyel sürelerinin kendi aralarında ve kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiş olması (p>0.05, tablo 12), sodyumun FP oluşumuna direkt katkıda bulunmadığı yolundaki bulgularımızı da desteklemektedir.

5-B-YARIKLANMA DÖNGÜSÜ

5-B.1-Birinci Yarıklanma Zamanı (C_t)

Fertilizasyon potansiyelinin başladığı andan yarıklanmanın elektriksel belirtisi olan hiperpolarizasyonun başladığı ilk ana kadar geçen süre olan C_t 'nin, başlıca ortam sıcaklığından etkilendiği bilinmektedir. Bu çalışmada, kontrol grubunda ($ort \pm SE$) 114.58 ± 3.94 dk olarak saptanan C_t ile oda sıcaklığı (22-25 °C'ler arasında) arasında orta derecede ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($n=17$, $r=-0.461$, $p<0.062$); bu bulgumuz, sıcaklık artışının yarıklanma süresini kısalttığı yolundaki klasik bilgileri doğrulamaktadır (26).

TEA grubuna ait kayıt sırasındaki ortalama ortam sıcaklığı değeri ile kontrol grubuna ait değer arasındaki farklılık anlamlı bulundu ($ort \pm SE$, sırasıyla, 23.3 ± 0.18 °C ve 23.97 ± 0.23 °C). TEA grubunda saptanan ortalama C_t değerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak uzaması ($ort \pm SE$; kontrol, 114.58 ± 3.94 dk; TEA, 130.40 ± 3.98 , $p<0.05$), bu gruptaki ortam sıcaklığının anlamlı olarak daha düşük olması ile açıklanabilir.

Yarıklanma süresi Ca^{2+}_o ve Na^+_o gruplarında anlamsız, diğer gruplarda ise anlamlı olmak üzere tüm gruplarda kontrole göre daha uzun bulundu (tablo 21-23). TEA grubu haricindeki gruplara ait ortam sıcaklığının kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemesi, sıcaklığın bu gruplardaki yarıklanma süresi uzamasından sorumlu olmadığını düşündürmektedir. Bu çalışmada yarıklanma süresinin incelenecek değişkenler arasına alınmasındaki temel nedenimiz, iyonik kondüktansın bu parametre üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını belirleyebilmektir. Ancak ortamda yapılan iyonik değişikliklere rağmen yarıklanmaya dek geçen süre içinde kaydedilen zar potansiyelinin belirgin bir değişiklik göstermemesi; bu gruplarda saptanan yarıklanma süresindeki uzamayı iyonik kondüktanslar ile açıklamamızı olası kılmamaktadır. Bu düşüncemizi, Kline ve arkadaşlarının bir çalışmasına ait bulgular da doğrulamaktadır (17).

5-B.2-Pik Yarıklanma Potansiyeli (CP_p)

Birinci yarıklanma sırasında membranda dereceli bir hiperpolarizasyon gelişti. Bu potansiyelin en üst değeri olan CP_p , kontrol grubunda (ort \pm SE) -45.12 \pm 2.23 mV olarak bulundu. Ortalama CP_p değeri, K^+ kanal blokleri uygulanan TEA grubunda kontrole göre anlamlı olarak daha az negatif bir düzeye erişirken (ort \pm SE, -28.63 \pm 1.86 mV; $p < 0.05$), diğer gruplarda anlamlı bir farklılık göstermedi (tablo 21-23). Yarıklanma sırasında yumurtaya yeni membran katıldığı, katılan bu yeni membranın değişik elektriksel özellikler gösterdiği ve birinci yarıklanma sırasında gözlenen zar hiperpolarizasyonunun, bu yeni membrana ait yüksek K^+ geçirgenliğinden kaynaklanabileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (17; Klein ve arkadaşlarına göre de Laat ve Woodward'dan). Yarıklanma sırasında artan K^+ kondüktansı, membran potansiyelini potasyum için denge potansiyeline (yaklaşık -150 mV) yaklaştırmaya çalışarak hiperpolarizasyona yol açmaktadır; K^+ kanal blokleri uygulanması ile bu kondüktansın azaltılması durumunda ise, bizim çalışmamızda saptandığı gibi, TEA grubuna ait ortalama CP_p değerinin kontrole göre anlamlı olarak daha az negatif bir düzeyde kaldığı söylenebilir (tablo 22). Bu bulgumuzu, de Laat ve arkadaşlarına ait bir çalışma da desteklemektedir (17; Klein ve arkadaşlarına göre de Laat ve Bluemink'den). TEA grubu dışındaki tüm gruplara ait olan ortalama CP_p değerlerinin kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemesi de (tablo, 21-23); yarıklanma sırasında gözlenen hiperpolarizasyonu, yarıklanan yumurtaya katılan yeni zardaki artmış potasyum geçirgenliğiyle açıklayan görüşü daha da güçlendirmektedir.

5-B.3-Yarıklanma Döngüsü (C_c) ve Yarıklanan Yumurtanın Membran Potansiyeli (MP_{pc})

Yarıklanma sırasında gelişen hiperpolarizasyonun başlamasından, yarıklanma sonrasındaki membran potansiyelinin tekrar stabil hale dönmesine kadar geçen süre olan C_c , kontrol grubunda (ort \pm SE) 26.42 \pm 1.73 dk olarak saptandı; TEA ve Ca^{+2} , gruplarına ait değerler ise kontrole göre anlamlı olarak daha kısa

bulundu (sırasıyla, $ort \pm SE$, 17.36 ± 1.29 dk ve 17.38 ± 1.95 dk; $p < 0.05$, tablo 22-23). Çalışmamızda, K^+ kondüktansı kısıtlanmış olan TEA grubuna ait ortalama pik yarıklanma potansiyeli (CP_p) değerinin daha pozitif bulunmuş olması; yarıklanma döngüsünü kısaltarak yarıklanma sonrası zar potansiyelinin daha kısa zamanda stabil bir değere erişmesine yol açmış olabilir. Bu sonucu, TEA grubunda saptadığımız CP_p ile C_c arasındaki güçlü ve anlamlı ilişki de doğrulamaktadır ($n=16$, $r= -0.678$, $p < 0.01$). TEA ve Ca^{+2} gruplarının yarıklanmanın hangi fazını etkileyerek ortalama yarıklanma döngü süresindeki (C_c) anlamlı kısalmaya neden olduğu araştırıldığında, anlamlı etkinin pik yarıklanma potansiyeline kadar geçen süre (faz 1) üzerinde olduğu saptandı; bu gruplarda, yarıklanma potansiyeline ait ikinci fazın süresi ise kontrole göre daha kısa bulunmakla beraber, farklılık anlamlı değildi (tablo 24).

Çalışmamızda Na^+ grubuna ait (hücreye kalsiyum girişi engellenmediği halde) ortalama MP_{pc} 'nin kontrole göre daha negatif; Ca^{+2} grubuna ait aynı değer ise (hücreye kalsiyum girişi engellendiği halde) daha az negatif bulunması (MP_{pc} , kontrol, Na^+ ve Ca^{+2} gruplarında, sırasıyla, $ort \pm SE$; -32.24 ± 1.28 mV; -43.25 ± 3.3 mV; -25.29 ± 1.47 mV; tablo 21,23); yarıklanmanın pik hiperpolarizasyonu takip eden fazında (faz 2) Na^+ 'un Ca^{+2} 'a göre daha etkin olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgumuzu, Na^+ grubunda saptanan faz 2'deki kısalmanın, Ca^{+2} grubundakine göre daha belirgin olması da desteklemektedir (faz 2 süreleri; kontrol, Na^+ ve Ca^{+2} gruplarında, sırasıyla, $ort \pm SE$; 13.18 ± 0.92 dk, 7.54 ± 1.23 dk, 9.08 ± 1.65 dk; $p > 0.05$; tablo 24). Klein ve arkadaşlarının bir çalışmasında, yarıklanma döngüsünün pik hiperpolarizasyonu takip eden fazına (faz 2), sodyum ve kalsiyumun yanısıra klor iyonunun da etkili olabileceği gösterilmişse de (17), bizim çalışmamızda klorun (SITS uygulanan gruplarda) faz 2 dahil, yarıklanma döngüsüne ait hiçbir parametreyi anlamlı olarak etkilemediği saptanmıştır (tablo 22,24).

Tüm gruplarda, depolarizan bir potansiyel olan fertilizasyon potansiyelini takip eden stabil membran potansiyeline (MP_f) ait ortalama değer fertilize olmamış yumurtanın dinlenim zar

potansiyeline (RMP) göre daha pozitif bulunmuş ($p < 0.05$); buna karşın, hiperpolarizan bir potansiyel olan yarıklanma potansiyelini takip eden stabil membran potansiyeline (MP_{pc}) ait olan aynı değer MP_f 'ne göre daha negatif ($p < 0.05$) olarak saptanmıştır. R.pipiens ve X.laevis türü kurbaçalarda yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (29).

İyonların MP_{pc} üzerine olan etkisi araştırıldığında, K^+ çıkışının kısıtlandığı TEA grubuna ait ortalama değer kontrol grubuna göre daha az negatif (membran depolarize); buna karşın $Na^{+0.5}$ ve Na^+ gruplarına ait olan aynı değerler ise daha negatif (membran hiperpolarize) olarak bulundu; bu farklılıklar, istatistiksel olarak anlamlı idi (kontrol, TEA, $Na^{+0.5}$ ve Na^+ gruplarına ait MP_{pc} değerleri, sırasıyla, $ort \pm SE$, -32.24 ± 1.28 mV, -18.44 ± 1.03 mV, -44.79 ± 4.46 mV, -43.25 ± 3.3 mV; $p < 0.05$; tablo 21-22). Yarıklanma sürecinde yumurtaya katılan yeni membrana ait K^+ permeabilitesinin yüksek olduğu literatürde bildirilmiştir (17; Klein ve arkadaşlarına göre de Laat ve Woodward'dan). Bu yeni zara ait elektriksel özellik olan artmış K^+ geçirgenliği, MP_{pc} 'nin MP_f 'ne göre daha negatif bir düzeyde kalmasına neden olabilir. Bu sonucu, bizim çalışmamızda TEA grubuna ait ortalama MP_{pc} değerinin kontrole göre anlamlı olarak daha pozitif bulunması da desteklemektedir.

Çalışmamızda kullanılan standart ve modifiye edilmiş tüm solüsyonlar ile bloker eklenmiş solüsyonlardaki fertilize yumurtalar, nöral fold aşamasına kadar izlendiklerinde, morfolojik olarak normal geliştikleri gözlenmiştir.

6. SONUÇ

Rana cameranoi türü kurbağalarda, fertilizasyon potansiyeli polispermiye karşı hızlı fakat geçici bir blok oluşturmaktadır.

Döllenmemiş yumurtaya ait membran potansiyelini temelde K^+ etkilemekte iken, spermin yumurtayı aktive etmesi ile gelişen fertilizasyon potansiyelinde (FP) Cl^- etkisi ön plana çıkmaktadır; yani K^+ , FP'ni klora göre daha az etkilemektedir.

Na^+ FP'nin oluşumuna direkt katkıda bulunmamakta, dış ortam Na^+ yoğunluğu azaltıldığında pik fertilizasyon potansiyel (FP_p) değerini düşürmektedir.

Dış ortamdaki Ca^{+2} 'un FP üzerinde anlamlı bir etkisi olmayıp, kalsiyumsuz solüsyonlarda döllenmiş yumurta, normal gelişmesini sürdürmektedir. Hücre dışındaki Ca^{+2} , polispermiyi önleyen elektriksel ve mekanik bloklara herhangi bir katkıda bulunmamaktadır.

Fertilize olmuş yumurtanın zar potansiyeli (MP_f), birinci yarıklanmaya kadar anlamlı bir değişiklik göstermemektedir.

Birinci yarıklanma sırasında gelişen hiperpolarizasyondan (faz 1) temelde K^+ ; pik hiperpolarizasyonu takip eden ve membran potansiyelinin tekrar stabil bir değere dönmesini de kapsayan ikinci fazdan ise Na^+ ve Ca^{+2} sorumludur.

Fertilizasyon potansiyelinden sorumlu temel iyon olan klor, yarıklanma döngüsüne ait hiçbir parametreyi anlamlı olarak etkilememektedir.

Yarıklanma sonrasındaki membran potansiyeli (MP_{pc}), fertilize yumurtanın membran potansiyeline (MP_f) göre daima daha negatif düzeyde kalmaktadır.

7. ÖZET

Bir yumurtanın başarılı olarak fertilize olabilmesi, türlerin çoğunda, yalnızca bir sperm tarafından döllenmesine bağlıdır. Bu şartın sağlanabilmesi için yumurtada polispermiye karşı blok mekanizmaları geliştirilmiş olup, bunlardan ilki **Fertilizasyon potansiyeli** ile sağlanan geçici elektriksel bloktur. Bu çalışmada **Rana cameranoi** türü kurbağa yumurtasındaki fertilizasyon potansiyeli ile birinci yarıklanmaya kadar olan evrede gelişen membran potansiyel değişimlerine ait iyonik temellerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Hücre içi kayıt tekniği kullanılarak fertilizasyondan birinci yarıklanmaya kadar olan evredeki membran potansiyel değişimleri sürekli olarak gözlenmiştir. Standart solüsyon olarak % 10 Ringer kullanılırken, membran potansiyel değişimlerine Na^+ ve Ca^{+2} 'nin etkilerinin incelenebilmesi için bu iyonlara ait dış ortam yoğunlukları değiştirilmiş, K^+ ve Cl^- 'na ait etkiler için ise bu iyonların kanal blokerleri kullanılmıştır (sırasıyla, TEA ve SITS). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar şöyledir:

Döllenmemiş yumurtaya ait membran potansiyelini temelde K^+ etkilemekte iken, spermin yumurtayı aktive etmesi ile gelişen fertilizasyon potansiyelinde (FP) Cl^- etkisi ön plana çıkmaktadır; K^+ , FP'ne kloro göre daha az katkıda bulunmaktadır. Na^+ FP'nin oluşumuna direkt katkıda bulunmamakta, ancak dış ortam Na^+ yoğunluğu azaltıldığında pik fertilizasyon potansiyel (FP_p) değerini düşürmektedir. Dış ortamdaki Ca^{+2} 'un FP üzerinde anlamlı bir etkisi olmayıp, kalsiyumsuz solüsyonlarda döllenmiş yumurta, normal gelişmesini sürdürebilmektedir. Hücre dışındaki Ca^{+2} , polispermiyi önleyen elektriksel ve mekanik bloklara herhangi bir katkıda bulunmamaktadır.

Fertilize olmuş yumurtanın zar potansiyeli (MP_f), birinci yarıklanmaya kadar anlamlı bir değişiklik göstermemektedir. Birinci yarıklanma sırasında gelişen hiperpolarizasyondan (faz 1) temelde K^+ ; pik hiperpolarizasyonu takip eden ve membran potansiyelinin

tekrar stabil bir değere dönmesini de kapsayan ikinci fazdan ise Na^+ ve Ca^{+2} sorumludur.

Fertilizasyon potansiyelinden sorumlu temel iyon olan klor, yarıklanma döngüsüne ait hiçbir parametreyi anlamlı olarak etkilememektedir.



8. SUMMARY

In most of the species, successful fertilization of the egg is dependent on being fertilized by only one sperm. In order to settle this condition, some blocking mechanisms have been developed against polyspermy. The first of these mechanisms is the transient electrical block, which is ensured by **Fertilization potential**. In this study, we aimed to investigate the ionic basis of fertilization potential, and also the changes in membrane potentials till the first cleavage period including the effects of some ions, in the *Rana cameranoi* frog egg.

Membrane potential changes were continuously recorded from fertilization, till the first cleavage period by using intracellular recording technique. Ten percent Ringer solution was used during control recordings. In order to investigate the effects of Na^+ and Ca^{+2} on the membrane potential changes, extracellular concentrations of these ions were modified; effects of K^+ and Cl^- were observed by applying channel blockers of these ions (TEA and SITS, respectively).

The results of our study were as follows:

Membrane potential of the unfertilized egg is affected mainly by K^+ , but Cl^- is more important than K^+ in generating fertilization potential (FP), which was developed by activation of the sperm. Na^+ does not contribute directly to the genesis of FP, but decrement in the extracellular Na^+ concentration leads to decrement in the amplitude of fertilization potential. Extracellular Ca^{+2} concentration does not significantly affect the fertilization potential, and fertilized eggs can complete their development normally in Ca^{+2} free solutions. What is more, extracellular Ca^{+2} does not contribute to the electrical and mechanical blocks, which are developed to prevent polyspermy.

Membrane potential of the fertilized egg (MP_f) does not change significantly till the first cleavage period. K^+ is responsible from the hyperpolarization which develops at the time of first

cleavage (phase 1); Ca^{+2} and Na^{+} are responsible from the period following the hyperpolarization which also includes the return of membrane potential to a stable value (phase 2).

Cl^{-} , which is the basic ion in generating fertilization potential, does not significantly affect any one of the parameters involved in the cleavage cycle.



9. ÖZGEÇMİŞ

1965 Ankara doğumluyum. 1982 yılında Bursa Erkek Lisesi'nden, 1988 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 1988-1991 yılları arasında Diyarbakır ve İzmit SSK Hastaneleri'nde pratisyen hekim olarak çalıştım. Eylül 1991 tarihinde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandım. Halen bu görevimi sürdürüyorum.

İngilizce biliyorum. Evliyim.



10. KAYNAKLAR

- 1- Başoğlu M, Őzeti N: Tũrkiye Amfibileri. Ege Őniversitesi Fen Fakũltesi Kitaplar Serisi no:50, Ege Őniversitesi Matbaası, 1973.
- 2- Berne RM, Levy MN: Principles Of Physiology. Wolfe Publishing Limited, International Student Edition, printed in USA, 1990.
- 3- Brawley SH: The fast block against polyspermy in Fucooid algae is an electrical block. Developmental Biology 144: 94-106, 1991.
- 4- Busa WB, Ferguson EJ, Joseph SK, Williamson JR, Nuccitelli R: Activation of frog (*Xenopus laevis*) eggs by inositol triphosphate. I.Characterization of Ca²⁺ release from intracellular stores. The Journal of Cell Biology 101: 677-682, 1985.
- 5- Charbonneau M, Moreau M, Picheral B, Guerrier P, Vilain JP: Voltage noise changes during monospermic and polyspermic fertilization of mature eggs of the anuran, *Rana temmporaria* (1983). Develop.,Growth and Differ. 25 (5): 485-494, 1983.
- 6- Dale B, Felice LJ, Ehrenstein G: Injection of a soluble sperm fraction into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction. Experimentia 41: 1068-1070, 1985.
- 7- Ganong WF: Reviewed of Medical Physiology, 16t Edition, A Lange medical book, printed in USA, 1993.
- 8- Hagiwara S, Jaffe LA: Electrical properties of egg cell membranes. Ann.Rev. Biophys. Bioeng. 8: 385-416, 1979.
- 9- Iwao Y, Jaffe LA: Evidence that the voltage-dependent component

in the fertilization process is contributed by the sperm. *Developmental Biology* 134: 446-451, 1989.

10- Iwao Y: The membrane potential changes of amphibian eggs during species- and cross-fertilization. *Developmental Biology* 111: 26-34, 1985.

11- Jaffe LA, Kado RT, Muncy L: Propagating potassium and chloride conductances during activation and fertilization of the egg of the frog, *Rana Pipipens*. *Journal of Physiology* 368: 227-242, 1985.

12- Jaffe LA, Schlichter LC: Fertilization-induced ionic conductances in eggs of the frog, *Rana Pipiens*. *Journal of Physiology* 358: 299-319, 1985.

13- Jaffe LA: Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 191-200, 1986.

14- Kane RE: Membrane conductance patterns during fertilization are sperm dependent in two sea urchin species. *Developmental Biology* 141: 330-343, 1990.

15- Kline D, Jaffe LA, Tucker RP: Fertilization potential and polyspermy prevention in the egg of the Nemertean, *Cerebratulus lacteus*. *The Journal of Experimental Zoology* 236: 45-52, 1985.

16- Kline D, Jaffe LA, Kado RT: A calcium-activated sodium conductance contributes to the fertilization potential in the egg of the Nemertean Worm *Cerebratulus lacteus*. *Developmental Biology* 117: 184-193, 1986.

17- Kline D, Robinson KR, Nuccitelli R: Ion current and membrane domains in the cleaving *Xenopus* egg. *The Journal of Cell Biology* 97: 1753-1761, 1983.

- 18- Lee HC: A signaling pathway involving cyclic ADP-ribose, cGMP, and nitric oxide. *News in Physiological Sciences* 9: 134-137, 1994.
- 19- Lynn JW, Chambers EL: Voltage clamp studies of fertilization in Sea Urchin eggs. *Developmental Biology* 102: 98-109, 1984.
- 20- Nuccitelli R: How do sperm activate eggs? *Current Topics in Developmental Biology* 25: 1-16, 1991.
- 21- Nuccitelli R: The fertilization potential is not necessary for the block to polyspermy or the activation of development in the Medaka egg. *Developmental Biology* 76: 499-504, 1980.
- 22- Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM, Steiner R: *Textbook of Physiology Vol 2, 21st Edition*, Saunders Company, 1989.
- 23- Peres A, Mancinelli E: Sodium conductance and the activation potential in *Xenopus laevis* eggs. *Pflügers Arch* 405: 29-36, 1985.
- 24- Peres A, Bernardini G, Negrini C: Membrane potential measurements of unfertilized and fertilized *Xenopus laevis* eggs are affected by damage caused by the electrode. *Experimental Cell Research* 162: 159-168, 1986.
- 25- Perkins KW, Franks RL, Whitten RH: *Reptiles and Amphibians: Care and Culture*, Coralina Biological Supply Company, Printed in United States of America, 1981.
- 26- Rugh R: *The frog: Its reproduction and development*. McGraw-Hill Book Company, printed in United States of America, 1951.
- 27- Rugh R: *Experimental embryology techniques and procedures*. Third Edition, Burgess Publishing Company, 1962.
- 28- Talevi R and Dale B: *Electrical characteristics of Ascidian egg*

fragments. *Exp. Cell Res.* 162: 539-543, 1986.

29- Webb DJ, Nucatelli R: A comparative study of the membrane from before fertilization through cleavage in two frogs, *Rana Pipiens* and *Xenopus Laevis*. *Comp Biochem, Physiol.* 82A: No.1, 35-42, 1985.

30- Webb DJ, Nucatelli R: Fertilization potential and electrical properties of the *Xenopus laevis* egg. *Development Biology* 107: 395-406, 1985.

