



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Preimplantasyonel Embriyonik Gelişimde *In Vivo* ve *In Vitro*
Asidoz Defans Mekanizmalarının Karşılaştırılması**

Dr. Özlem IŞIĞIBOL GEZGİN
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN

ADANA-2024



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Preimplantasyonel Embriyonik Gelişimde *In Vivo* ve *In Vitro*
Asidoz Defans Mekanizmalarının Karşılaştırılması**

Dr. Özlem IŞIĞIBOL GEZGİN
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir (TTU-2021-14214).

ADANA-2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca çalışma disiplini ve bilimsel yaklaşımını her zaman örnek aldığım, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, özellikle tez döneminde gösterdiği sabır ve yol göstericiliği için, değerli hocam Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN'a,

Fizyoloji nosyonu edinmemde büyük katkıları olan başta Prof. Dr. Sanlı Sadi KURDAK olmak üzere Prof. Dr. Kübra AKILLIOĞLU, Prof. Dr. Kerem Tuncay ÖZGÜNEN, Doç. Dr. Besim ÖZAYKAN, Doç. Dr. Ayper BOĞA PEKMEZEKMEK, Doç. Dr. Çiğdem ÖZDEMİR'e,

Tez çalışmam boyunca laboratuvarlarını kullanımımıza sunan ve bilgi birikimleriyle destek olan Prof. Dr. Şeyda ERDOĞAN ve Patoloji A.D. ekibine, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Oğuzhan AKBULUT, Dr. Merve AKBULUT ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bugünlere gelebilmemi sağlayan, tüm zorlu süreçlerimde yanımda olan sevgili ailem ve her zaman destekçim olan sevgili eşim Ertuğrul GEZGİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Özlem IŞIĞIBOL GEZGİN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİL LİSTESİ	VII
TABLO LİSTESİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Oogenez	3
2.2. Fertilizasyon ve Preimplantasyonel Embriyonik Gelişim	5
2.4. Embriyo Toplama ve Kültür Solüsyonları	8
2.5. Hücre içi pH Regülasyonu	9
2.5.1 NHE İsoformları	9
2.5.2 pH _i Regülasyonunda HCO ₃ ⁻ Taşıyıcı Proteinlerin Rolü.....	10
3.5.3. NH ₄ ⁺ <i>Puls</i> Metodu ile Asidoz İndüksiyonu	12

2.5.4. Değiştirici Aktivitelerinin Hesaplanması	12
2.6. Hücre İçi İyon Ölçüm Yöntemleri	14
2.6.1. Hücre İçi pH Ölçümü	15
2.6.1.1. Mikroelektrot Yöntemi ile pH _i Ölçümü	15
2.6.1.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi	16
2.6.2. Mikrospektrofluorometrik Yöntem ile pH _i Ölçümü	16
2.6.2.1. BCECF (2,7 bis Karboksietil 5-6 karboksi florosin)	17
2.6.2.2. Karboksi SNARF-1 (carboxy-seminaphthorhodafluor-1)	18
2.7. İmmünfloresan Görüntüleme	20
2.8. Yardımcı Üreme Teknikleri	23
3. GEREÇ-YÖNTEM	25
3.1. Solüsyonlar	25
3.2. Kimyasallar	27
3.3. Zigot ve Embriyo Eldesi	27
3.3.1. <i>In vivo</i> Embriyo Eldesi	27
3.3.2. PN Zigot ve <i>In Vitro</i> Embriyo Eldesi	28
3.4. pH _i Değerlendirmesi	30
3.4.1. NHE Aktivitesinin Hesaplanması	32

3.4.2. NHE İsoformlarının Değerlendirilmesi	32
3.4.3. NHE + NDBCE Aktivitesinin Hesaplanması	32
3.5 İmmünfloresan Boyama	33
3.6 İstatistik	34
4. BULGULAR	35
4.1. NHE Aktivitesinin Değerlendirilmesi	35
4.2. NHE İsoformlarının Değerlendirilmesi	40
4.3. pHKSOM Ortamında Alınan Asidozdan İyileşme Yanıtlarının Değerlendirilmesi ...	46
4.4. İmmünfloresan ile İyon Değiştiricilerin Görüntülenmesi.....	52
5.TARTIŞMA.....	56
5.1. <i>In vivo</i> ve <i>In vitro</i> Embriyonik Gelişim Aşamalarında NHE Aktivitesi	56
5.2. NHE İsoformlarının Etkinliğinin Değerlendirilmesi	57
5.3 HCO ₃ ⁻ İçeren Ortamda <i>In vivo</i> ve <i>In vitro</i> Embriyoların Asidozdan İyileşme Yanıtları	59
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR.....	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

- Şekil 1. Mayotik duraklamada etkili sinyal yolları (A) ve ovulasyonda görülen LH piki ile bu sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler (B). 4
- Şekil 2. Preimplantasyonel embriyonik gelişim aşamaları 7
- Şekil 3. Hücre içi pH regülasyonunda rol alan iyon değiştiriciler ve aktiviteleri sonrası hücre içi pH'da meydana gelen değişiklikler. Na^+/H^+ değiştirici (A), Anyon değiştirici (B), Na^+ bağımlı $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ değiştirici (C), $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ birlikte taşıyıcıları (D, E). Resimler BioRender.com üzerinden çizilmiştir.....11
- Şekil 4. NH_4^+ puls metodu (A) ve asidozdan iyileşme yanıtı sırasında çizilen regresyon eğrisi ile değiştirici aktivitesinin saptanması (B). 13
- Şekil 5. Orantısız olmayan florofor Fluo-3'ün emisyon spektrumu. 15
- Şekil 6. BCECF'in farklı pH değerlerinde kaydedilen eksitasyon spektrumu. 18
- Şekil 7. SNARF-1'in 534 nm eksitasyonu ile gerçekleşen emisyon spektrumu. 19
- Şekil 8. BCECF ve karboksi-SNARF'ın 4 ayrı pH değeri ile çizilen kalibrasyon eğrileri..... 20
- Şekil 9. Direkt ve indirekt immünfloresan boyama yöntemleri (A), indirekt yöntem ile boyanan ... 22
- Şekil 10. Yardımcı üreme teknikleri. 24
- Şekil 11. Laboratuvarımızda *in vivo* elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyo örnekleri. 28
- Şekil 12. Kopulasyon plağı pozitif fare..... 29
- Şekil 13. Laboratuvarımızda PN zigot kültürü ile *in vitro* elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyo örnekleri..... 29
- Şekil 14. Çalışmada kullanılan mikrospektrofluorometrik kayıt sistemi (A). Farklı aşamalardaki embriyoların stereomikroskop altındaki görüntüleri (B) ve bu embriyoların mikrospektrofluorometrik kayıt sistemiyle 500 nm dalga boyunda uyarılan ve 535 nm'de alınan floresan emisyonları (C). 31
- Şekil 15. İmmünfloresan görüntüleme için kullanılan konfokal mikroskop ve görüntülerin analizinde kullanılan bilgisayar programına ait görüntüler..... 33

Şekil 16. <i>In vivo</i> (A) ve <i>in vitro</i> (B) 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyoların amonyum puls metodu ile asidozdan iyileşme yanıtlarının ortalamaları kullanılarak (kırmızı ile işaretli) hesaplanan NHE aktiviteleri. Başlangıç pH _i kaydının yapıldığı 0 Bik. pHKFHM solüsyonu, 10. dakikada NH ₄ Cl içeren 0 Bik. pHKFHM ile 20.dakikada ise Na ⁺ içermeyen 0 Bik. pHKFHM ile değiştirilerek asidoz indüksiyonu yapıldı. Kaydın 30. dakikasından itibaren Na ⁺ içeren 0 Bik. pHKFHM verilerek NHE aktivite kaydı 20 dk boyunca gerçekleştirildi.....	36
Şekil 17. <i>In vivo</i> (•) ve <i>in vitro</i> (°) 2-h (A), 4-h (B), morula (C), trofoblast (D) aşama embriyoların asidozdan iyileşme yanıtları.....	37
Şekil 18. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamadaki embriyoların NHE aktivitelerinin karşılaştırılması. Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p>0,05).	39
Şekil 19. <i>In vivo</i> 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen Kariporid ve S3226 dozlarının eklenmesi ile saptanan asidozdan iyileşme yanıtları.	40
Şekil 20. <i>In vitro</i> 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen Kariporid ve S3226 dozlarının eklenmesi ile saptanan asidozdan iyileşme yanıtları.	41
Şekil 21. <i>In vivo</i> 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen konsantrasyonlarda Kariporid ve S3226 eklenmesi ile saptanan NHE aktiviteleri. *, 0 Bik. pHKFHM 2-h embriyo değerine göre farklılık (p=0,053).	43
Şekil 22. <i>In vitro</i> 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen konsantrasyonlarda Kariporid ve S3226 eklenmesi ile saptanan NHE aktiviteleri.....	45
Şekil 23. <i>In vivo</i> (A) ve <i>in vitro</i> (B) 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamadaki embriyolarda amonyum puls metodu ile asidozdan iyileşme yanıtlarının ortalamaları kullanılarak (kırmızı ile işaretli) hesaplanan değiştirici aktiviteleri. Başlangıç kaydının yapıldığı pHKSOM solüsyonu, 10. dakikada NH ₄ Cl içeren pHKSOM ile 20.dakikada ise Na ⁺ içermeyen pHKSOM ile değiştirilerek asidoz indüksiyonu yapıldı. Kaydın 30. dakikasından itibaren Na ⁺ içeren pHKSOM verilerek değiştirici aktivite kaydı 20 dk. boyunca gerçekleştirildi.	47
Şekil 24. pHKSOM solüsyonunda <i>in vivo</i> (•) ve <i>in vitro</i> (°) 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların asidozdan iyileşme yanıtları.	48
Şekil 25. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamadaki embriyoların değiştirici aktivitelerinin karşılaştırılması. *, <i>in vivo</i> 2-h embriyo değerine göre anlamlı farklılık (p<0,05).	50
Şekil 26. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> elde edilen embriyoların pHKSOM ve 0 Bik. pHKFHM ortamında saptanan değiştirici aktiviteleri.	51
Şekil 27. <i>In vivo</i> (A) ve <i>in vitro</i> (B) embriyoların pHKSOM ve 0 Bik. pHKFHM solüsyonlarında asidozdan iyileşme kayıtlarında dinlenim floresansı ile final floresansı arasındaki farklar, ΔF.	52
Şekil 28. <i>In vivo</i> gelişen ve <i>in vitro</i> kültürde elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların konfokal mikroskop ile kaydedilen NHE1 immünfloresan görüntüleri.....	53

Şekil 29. *In vivo* gelişen ve *in vitro* kültürde elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların konfokal mikroskop ile kaydedilen NHE3 immünfloresan görüntüleri..... 54

Şekil 30. *In vivo* gelişen ve *in vitro* kültürde elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların konfokal mikroskop ile kaydedilen NDBCE immünfloresan görüntüleri. Tüm boyama işlemleri için yapılan pozitif kontrol F-aktin boyanması (E) ve primer kullanılmadan yapılan negatif kontrol (F) görüntüleri. 55



TABLO LİSTESİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. Kullanılan solüsyonların ayrıntılı içerikleri.....	26
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	27
Tablo 3. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> embriyoların 0 Bik. pHKFHM solüsyonunda kaydedilen NHE değiştirici aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).....	38
Tablo 4. <i>In vivo</i> embriyoların 0 Bik. pHKFHM solüsyonunda ve spesifik inhibitör eklendiği durumlarda alınan NHE aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).....	42
Tablo 5. <i>In vitro</i> embriyoların 0 Bik. pHKFHM solüsyonunda ve bu solüsyona spesifik inhibitör eklendiği durumlarda alınan NHE aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).....	44
Tablo 6. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyoların pHKSOM ortamında elde edilen değiştirici aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).	49
Tablo 7. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> elde edilen embriyoların pHKSOM ve 0 Bik. pHKFHM ortamlarında elde edilen değiştirici aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

pH_i: Hücre içi pH

NHE: Na⁺/H⁺ exchanger

NDBCE: Na⁺ dependent HCO₃⁻/Cl⁻ exchanger

NBC: Na⁺, HCO₃⁻ cotransporter

AE: Anion exchanger

BCECF: 2,7 Bis Karboksi Etil 5-6 Karboksi Florosin

Karboksi-SNARF: karboxy-seminaphthorhodafluor-1

BSA: Bovine serum albumin

GV: Germinal vezikül

PN: Pronükleer

IU: International unit

KFHM: K⁺ simplex flushing-holding medium

KSOM: K⁺ simplex optimized medium

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin

hCG: human chorionic gonadotropin

PMT: Photomultiplier tube

MII: Mayotik metafaz II

2-h: 2 hücreli embriyo

4-h: 4 hücreli embriyo

8-h: 8 hücreli embriyo

ART: Assisted Reproductive Technology

IVF: In vitro fertilizasyon

IUI: Intrauterine Insemination

PZD: Partial Zona Dissection

SUZI: Subzonal inseminasyon

ICSI: Intrasiitoplazmik sperm enjeksiyonu

Slc: Solute carrier family

ZP: Zona pellusida

CNP: C-natriüretik peptid

NPR2: Natriüretik peptid reseptörü 2

AREG: Amphyregulin

EREg: Epiregulin

PDE3A: Fosfodiesteraz 3A

EGF: Epidermal growth factor

PGE₂: Prostoglandin E₂

LH: Lüteinizan hormon

NMR: Nükleer manyetik rezonans



ÖZET

Preimplantasyonel Embriyonik Gelişimde *In Vivo* ve *In Vitro* Asidoz Defans Mekanizmalarının Karşılaştırılması

Amaç: Hücre içi pH (pH_i) düzenlenmesi tüm hücrelerde olduğu gibi preimplantasyon aşamasındaki embriyolar için de hayati önem taşır. Preimplantasyon aşamasındaki embriyolar pH_i düzenlenmesi için temel olarak üç farklı iyon değiştirici mekanizma kullanırlar. Bu mekanizmalardan HCO_3^-/Cl^- değiştirici hücreyi alkaloz, Na^+/H^+ ve Na^+ , HCO_3^-/Cl^- değiştiricileri ise asidoza karşı korurlar. Bu çalışmada, *in vivo* elde edilen ve *in vitro* kültürde geliştirilen farklı aşamalarındaki embriyoların (2 hücreli, 4 hücreli, morula ve trofoblast) Na^+/H^+ değiştirici aktivitesinin tek başına ve Na^+ , HCO_3^-/Cl^- değiştiricisi ile birlikte sağlanan asidoz defans mekanizmalarının karşılaştırılması amaçlandı.

Gereç yöntem: Çalışmada 5-8 haftalık Balb/c soyu dişi fareler kullanıldı. *In vivo* ve *in vitro* elde edilen embriyoların bir grubu pH-sensitif florofor 2,7 Bis Karboksi Etil 5-6 Karboksi Florosin (BCECF) ile yüklenerek mikrospektrofluorometrik yöntem ile asidozdan iyileşme yanıtları kaydedildi. Na^+/H^+ değiştirici isoformlarının (NHE1 ve 3) asidozdan iyileşmeye olan katkısını değerlendirebilmek için spesifik inhibitörler (Kariporid, S3226) kullanıldı. Diğer bir grup embriyoya ise Na^+/H^+ ve Na^+ , HCO_3^-/Cl^- değiştirici proteinlerinin spesifik antikoru ile indirekt immunfloresan boyama yöntemi uygulandı.

Bulgular: Asidozdan iyileşmede ana düzenleyici mekanizma olan Na^+/H^+ değiştirici aktivitesi, *in vivo* ve *in vitro* aynı aşama embriyolar arasında anlamlı farklılık göstermezken her iki grupta da en yüksek değiştirici aktivitesi 2-h embriyonik aşamada gözlemlendi. Na^+/H^+ değiştirici 1 ve 3 isoformlarının asidozdan iyileşmede etkili olduğu saptandı. Na^+ , HCO_3^-/Cl^- değiştiricisinin asidozdan iyileşmede tamamlayıcı rol oynadığı ve *in vitro* kültür ortamında gelişen embriyolarda da benzer fonksiyon gösterdiği saptandı.

Sonuç: Asidozdan iyileşmede fonksiyonel değiştirici aktivitelerinin 2 hücreli embriyonik aşamada yüksek olması ve embriyonik gelişim sürecinde anlamlı azalmalar görülmemesi, artan metabolik aktivite ve uterusun asidik ortamına uygun olarak etkin bir asidoz defans mekanizmasının bulunduğunu göstermektedir. *In vivo* elde edilen ve *in vitro* gelişimi sağlanan tüm preimplantasyonel embriyonik aşamaların asidoz defans mekanizmalarının etkinliği arasında anlamlı farklılık saptanmamış olması, kültüre edilen ileri aşama embriyoların da IVF uygulamalarındaki embriyo seçiminde düşünülebileceğini desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: Hücre içi pH düzenlenmesi, Na^+/H^+ değiştiricisi, Na^+ , HCO_3^-/Cl^- değiştiricisi, preimplantasyonel embriyonik gelişim, immünfloresan boyama

ABSTRACT

Comparison of *In Vivo* and *In Vitro* Acidosis Defense Mechanisms in Preimplantation Embryonic Development

Aim: Intracellular pH (pH_i) regulation is crucial for all cell types including preimplantation embryos. There are three mechanisms that are used for pH_i regulation in preimplantation embryos. $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger alleviates alkalosis while Na^+/H^+ and Na^+ , $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchangers alleviate acidosis. In this study, we aimed to compare acidosis defence mechanisms provided by Na^+/H^+ exchanger activity alone and together with Na^+ , $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger activity in *in vivo* and *in vitro* embryos.

Materials and Methods: Embryos were collected from 5-8 week old Balb/c strain female mice. *In vivo* and *in vitro* embryos loaded with 2,7 bis carboxyethyl 5-6 carboxy fluorescein (BCECF) and recovery rates from induced acidosis were recorded by microspectrofluorometric method. Specific inhibitors (Cariporide, S3226) were used to determine the contribution of Na^+/H^+ exchanger isoforms (NHE1 and 3) to recovery from acidosis. In a group of embryos Na^+/H^+ and Na^+ , $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger proteins visualised through indirect immunofluorescence protocol.

Results: Na^+/H^+ exchanger activity was not significantly different between *in vivo* and *in vitro* same stage embryos. NHE1 and 3 isoforms contributed to recovery from acidosis. We found that the major mechanism for defence against acidosis is the Na^+/H^+ exchanger and the Na^+ , $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger plays a complementary role, and embryos developed *in vitro* also showed similar results.

Conclusion: The exchanger activities were high at the 2-cell stage of the embryos and there was no significant decrease during the developmental stages of the embryos. These results suggest that there are effective acidosis defence mechanisms in accordance with the increased metabolic activity during embryonic development and the acidic environment of the uterus. The absence of significant changes in acidosis defence mechanisms between *in vivo* and *in vitro* embryos at all developmental stages may indicate that cultured advanced stage embryos can also be used for IVF treatment.

Key Words: Intracellular pH regulation, Na^+/H^+ exchanger, Na^+ , $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger, preimplantation embryo development, immunofluorescence staining

1. GİRİŞ

Vitellus kesesinden köken alan primordial germ hücreleri gebeliğin 5. haftasından itibaren gonadların korteksine göç eder. Overe göç eden primordial germ hücreleri mitoz bölünmelerle oogoniumu oluştururlar. Oogonia gebeliğin 8. haftasından itibaren birinci mayozun profazına girerek primer oositi oluşturur ve profaz I'in diploten aşamasında durdurulurlar. Bu aşamadaki oosite germinal vezikül aşamadaki oosit (GV oosit) de denir⁽¹⁾. Pubertede artan gonadotropinlerin etkisiyle profaz I tamamlanır ve oositler metafaz I evresine ulaşır. Bu sürecin ilerlemesiyle oositler birinci mayozu tamamlar ve birinci kutup cismini atarak fertilizasyona kadar ikinci mayozun metafazında (MII oosit) kalırlar.⁽²⁾ Bu sürece mayotik matürasyon süreci denir. MII oositler sperm ile fertilize olduğunda ikinci mayoz tamamlanır ve pronüklear (PN) zigot oluşur^(3, 4). PN zigotun art arda mitotik bölünmeler gerçekleştirmesiyle sırasıyla iki hücreli (2-h), 4 hücreli (4-h), sekiz hücreli (8-h), morula ve trofoblast aşama embriyolar oluşur. Zigot oluşumuyla başlayıp trofoblast oluşumuyla tamamlanan döneme preimplantasyonel embriyonik dönem adı verilir.

Tüm hücrelerde olduğu gibi oosit ve embriyolarda da hücrelerin canlılığını sürdürebilmesi ve normal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için hücre içi pH (pH_i) dar bir aralıkta tutulmalıdır. pH_i regülasyonu temel olarak hücre membranında bulunan iyon değiştiricilerle sağlanır^(5, 6). Bu değiştiriciler; hücreyi alkalozla karşı koruyan HCO_3^-/Cl^- değiştirici (Anyon exchanger, AE), asidoza karşı koruyan Na^+/H^+ (Na^+/H^+ exchanger, NHE) ve Na^+ , HCO_3^-/Cl^- (Na^+ -dependent HCO_3^-/Cl^- exchanger, NDBCE) değiştiricileridir. Hücre içi pH belirli bir eşik değerin üzerine çıktığında AE aktive olur ve Cl^- hücre içine alınırken HCO_3^- dışına gönderilir. Hücre içi pH ~ 6.8 'in altına indiğinde NHE aktive olur ve Na^+ hücre içi H^+ ile değiştirilerek asit yük azaltılır. NDBCE değiştiricileri ise $pH_i \sim 7.0$ 'ın altına indiğinde aktifleşir, Na^+ ve HCO_3^- hücre içine alınırken Cl^- dışarı atılır⁽⁶⁾.

Hücre içi pH regülatör proteinlerin mayotik yeterlik süresince kazanıldığı^(7, 8), alkaloz defans mekanizmasının GV oositlerde yüksek aktivite gösterdiği, mayotik maturasyon sürecinde MI ve MII aşama oositlerde baskılandığı, fertilizasyon sonrası PN zigot aşamasında tekrar yüksek değerlere ulaşırken ilerleyen embriyonik gelişim

aşamalarında baskılandığı gösterilmiştir^(9, 10). Asidoz defansında ise temel düzenleyici mekanizmanın NHE aktivitesi olduğu, NDBCE aktivitesinin tek başına hücreyi asidozdan kurtarmada yeterli olmadığı raporlanmıştır⁽¹¹⁻¹³⁾. NHE aktivitesinin mayotik matürasyon sürecinde AE ile benzer şekilde GV oositte yüksek iken MII oositlerde baskılandığı, PN aşamada ise tekrar yüksek aktiviteye ulaştığı gösterilmiştir^(6, 11, 13, 14). Embriyogenez sürecinde *in vivo* elde edilen embriyolarda NHE aktivitesinin PN zigot ve 2-h embriyonik aşamada daha yüksek olmakla birlikte, AE aktivite değişiminden farklı olarak, tüm embriyonik aşamalarda yüksek seyrettiği raporlanmıştır⁽¹²⁾.

Slc9a genleriyle kodlanan NHE proteinlerinin bilinen ilk 5 isoformu hücre membranına yerleşmiş halde bulunur^(15, 16). Preimplantasyonel embriyonik dönemde NHE isoformlarının asidozdan iyileşmedeki etkileri incelendiğinde, fare soylarında farklılıklar göstermekle birlikte, NHE1 ve 3 isoformlarının baskın isoformlar olduğu gösterilmiştir^(12, 13, 17).

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada, asidoz defans mekanizmalarının *in vivo* preimplantasyonel dönem embriyolarındaki etkinliği değerlendirilmişti. Ancak literatürde asidoz defans mekanizmalarının, *in vivo* elde edilen ve *in vitro* kültürde geliştirilen embriyolarda karşılaştırmalı olarak ortaya koyan bir çalışmaya rastlanamamıştır. Yardımcı üreme tekniklerinin başarısında önemli bir etken olan *in vitro* kültür şartları, uzun yıllardır yapılan çalışmalarla optimize edilmeye çalışılsa da *in vivo* ortamı birebir yansıtamaması nedeniyle, düzenleyici mekanizmaların kültür ortamında fonksiyonlarını yerine getirme kapasiteleri embriyo gelişimi için önemlidir. Bu çalışmanın amacı, *in vivo* ve *in vitro* ortamda gelişen embriyolarda pH_i düzenleyici mekanizmaların karşılaştırılması ile fonksiyonlarını normal olarak ortaya koyup koyamadığının, embriyonik gelişim aşamalarına göre asidik pH stresine karşı hücreyi koruyabilme durumunun ve dolayısı ile embriyoların kalitesine etki edebilecek bir parametrenin ortaya konmasıdır. Böylece IVF gibi yardımcı üreme tekniklerinde transfer edilecek embriyoların hangi aşamalara kadar *in vitro* ortamda normal gelişebilmesinin mümkün olabileceğine ışık tutulmaya ve implantasyon başarı oranının artırılmasına katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

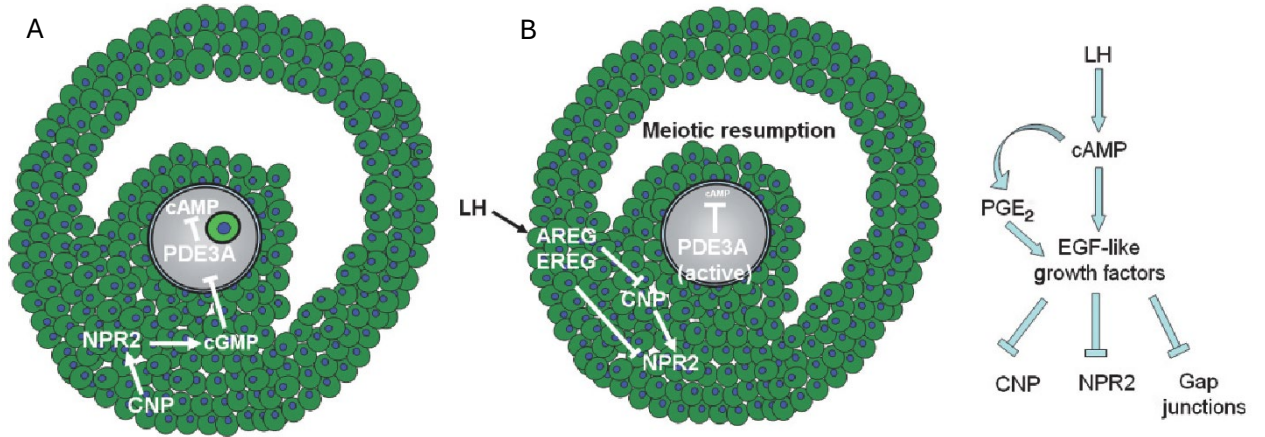
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oogenez

Prenatal dönemin 5-6. haftasında dişi fetüsün germ hücrelerinde fonksiyonel hareketlenme başlar. Vitellus kesesinden köken alan primordial germ hücreleri gonadların korteksine göç eder. Overe göç eden primordial germ hücreleri gebeliğin 20-24. haftasına kadar mitoz bölünmelerle oogoniumu oluştururlar. İntrauterin 24. haftanın sonunda oogonia sayısı 7 milyona ulaşır. Oogonia gebeliğin 8. haftasından itibaren birinci mayozun profazına girerek primer oosit halini alır. Bu aşamada primer oositler DNA'larını kopyalayarak 46 (4N, 22 çift otozomal, 1 çift X kromozomu) kromozoma ulaşırlar. Ancak bölünme tamamlanamaz ve primer oositler profaz I'in diploten aşamasında durdurulurlar. Germinal vezikül de denen primer oosit çekirdeği bu aşamada hücrenin merkezinde net bir şekilde görülür. Bu nedenle bu aşamadaki oosite germinal vezikül aşamadaki oosit (GV oosit) de denir. Tüm oogoninin primer oositlere dönüştüğü mayoz bölünme süreci doğumdan sonraki 6. aya kadar devam eder. Birinci mayoz bölünme ovülasyon zamanına kadar tamamlanamaz. Oogenezin başlangıcından itibaren oogoninin ve folikül oluşumundan sonra foliküllerin birçoğu apoptoza uğrar ve oosit sayısı giderek azalır. Doğumda yaklaşık 2 milyon olan oosit sayısı pubertede 400.000'e düşer^(18, 19).

Diploten evredeki primer oositler tek sıra yassı pregranüloza hücreleriyle çevrelenerek primordial folikülleri oluştururlar. Pubertede gonadotropinlerin etkisiyle pregranüloza hücreleri küboidal granüloza hücrelerine dönüşür ve mitoz bölünmeyle çoğalırlar. Bu süreçte primordial foliküller sırasıyla primer, sekonder, tersiyer ve graaf folikül halini alır. Granüloza hücreleri birbirlerine ve oositlere gap kavşaklarla bağlıdırlar. Gap kavşaklar sayesinde granüloza hücreleriyle oositler arasında karşılıklı olarak besin maddeleri, büyüme faktörleri gibi maddelerin alışverişi sağlanır⁽²⁰⁾. Granüloza hücreleri zona pellüsida (ZP) yapısını oluşturan mukopolisakkaritleri salgılar. Granüloza hücreleri aynı zamanda cAMP, C-natriüretik peptid (CNP), hipoksantin, guanozin, adenozin, cGMP ve oosit matürasyon inhibitörü gibi mayotik arrestin sürdürülmesinde rol oynayan molekülerin gap kavşaklar aracılığıyla oosite iletilmesini sağlar⁽²¹⁾. Granüloza hücrelerinden salınan CNP, natriüretik peptid reseptörü 2 (NPR2)'ye

bağlanarak kumulus hücrelerinin cGMP üretimini uyarır. Artan cGMP gap kavşaklar aracılığıyla oosite ulaşır ve oosite bulunan fosfodiesteraz 3A (PDE3A)'yı baskılar, böylece cAMP'nin parçalanması engellenir ve mayotik duraklama devam eder (Şekil 1A). Ovülasyonda LH pikiyle birlikte folikül içerisinde amfıregülin (AREG), epiregülin (EREG) olarak adlandırılan epidermal büyüme faktörü benzeri (EGF-like) büyüme faktörlerinin artışı görülür⁽²²⁾. Bununla birlikte PGE₂ kumulus hücrelerinde AREG üretimini artırır. Bu büyüme faktörlerinin iki temel işlevi bulunur. C-natriüretik peptidi ve NPR2'yi azaltarak cGMP üretimini baskılamak ve gap kavşakların geçirgenliğini azaltarak mevcut cGMP'lerin oosite iletimini engellemek. Sonuç olarak azalan cGMP'ye bağlı fosfodiesteraz 3A inhibisyonu ortadan kalkar ve cAMP parçalanarak oosit mayotik duraklamadan kurtulur⁽²³⁾ (Şekil 1B). Birinci kutup cismini atarak birinci mayotik bölünmeyi tamamlayan oosit artık sekonder oosit adını alır. Sekonder oosit fertilizasyona kadar ikinci mayozun metafazında durdurulur.



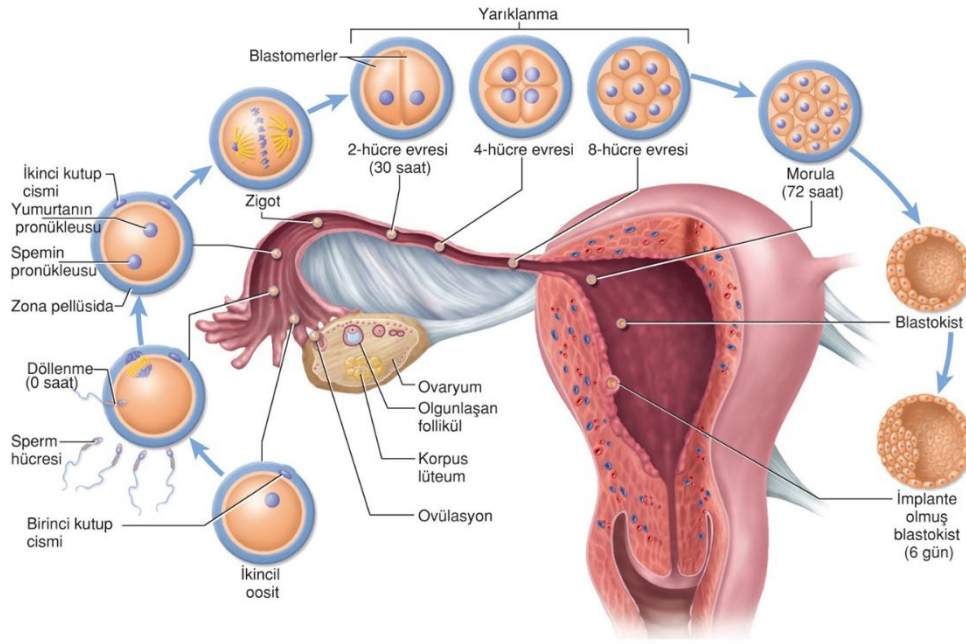
Şekil 1. Mayotik duraklamada etkili sinyal yolları (A) ve ovulasyonda görülen LH piki ile bu sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler (B)⁽²²⁾.

2.2. Fertilizasyon ve Preimplantasyonel Embriyonik Gelişim

LH, progesteron ve prostoglandinlerin etkisiyle sekonder oositi içeren graaf follikül duvarı inceler ve proteolitik enzimlerin aktivitesiyle yırtılır⁽²⁴⁾. Çevresindeki kumulus hücreleriyle birlikte periton boşluğuna atılan sekonder oosit fimbriyalar yardımıyla tuba uterinaya alınır. Tuba epitelinin siliyer hareketi ve tubal kasların kasılmasıyla sekonder oosit ampullaya taşınır.

Ejakülasyon sonrası vajinaya 250-500 milyon sperm bırakılır ancak bunların sadece % 25-50'si ampullaya ulaşır. Sperm hücreleri kısa sürede seminal havuzdan ayrılmaya başlar ve servikal kanala doğru hareket ederler. Sperm hücreleri, artmış sekretuar aktiviteye sahip olan tubaya ulaşır. Tuba, spermilerin epitelyuma yapışmasına neden olan mukus salgılar. Dişi üreme sisteminin peristaltik kasılmaları ve fallop tüplerinin iç yüzeyindeki silia hareketi, spermin hareketine yardımcı olur⁽²⁵⁾. Sperm, dişi üreme kanalında yaklaşık 7 saat süren kapasitasyon dönemi sonunda oositi dölleyebilme yeteneğini kazanır⁽²⁶⁾. Oositin çevresindeki kumulus hücrelerinin matriksi hyaluronik asit yardımıyla parçalanır ve sperm granüloza hücrelerine tutunur. Kumulus hücrelerinin arasından geçen sperm zona pellusidaya ulaşır. Burada ilk olarak ZP3 proteinine bağlanan spermde akrozomal reaksiyon başlar ve hidrolitik enzimler içeren veziküllerin ekzositozu gerçekleşir. Salınan hidrolitik enzimler zonanın lokal olarak parçalanmasını sağlar. Sperm daha sonra ZP2 proteinine bağlanır ve kuyruğunun kırbaç benzeri hareketiyle zona içerisinde oosite doğru ilerler, oosite ulaştığında sperm ve oosit membranları birleşir⁽¹⁹⁾. Fosfolipaz C aktivasyonu ile artan IP₃ oosit endoplazmik retikulumundan Ca⁺² salınımını artırır. Ooplazmik Ca⁺² artışı oositin periferik kortikal granüllerinin ekzositozuna yol açarak kortikal reaksiyonu başlatır. Kortikal reaksiyon zona pellusida proteinlerinin yapısının değişip başka spermilerin oosite ulaşmasını engelleyerek polispermiyi önler. Başlangıçtaki yüksek Ca⁺² artışını takiben saatler süren küçük Ca⁺² salınımları ikinci mayozun tamamlanmasını tetikler ve haploid kromozom içeren ikinci polar cisim atılır. Oosit ve sperm kromozomları dekontense olarak dişi ve erkek pronükleusu oluştururlar. Sonuç olarak iki pronükleusa sahip zigot oluşur. Spermin nükleusu ile birlikte oosit içine giren sentrozom mikrotübüller oluşturarak dişi ve erkek pronükleusu bir araya getirir. Bu süreçte her iki kromozom da replike olur. Pronükleuslar bir araya geldiklerinde çekirdek

zarları çözülür ve kromozomlar metafaz plağını oluşturur ve ilk mitotik bölünme gerçekleşir. İlk iki bölünme yaklaşık 2 gün sürer, üçüncü bölünmeden sonra blastomerler birbirlerine karşı düzleşir ve aralarında bağlantılar oluşmaya başlar, blastomerler arasındaki sınırlar artık ayırt edilemez hale gelir ve embriyo kompakt morula aşamasına ulaşır. Bu aşamada embriyonun RNA, protein ve fosfolipid sentezinde önemli bir artış olur ve farklılaşma süreci başlar. Trofoektoderm hücreleri ilk farklılaşan hücrelerdir ve bu hücrelerde artan Na^+/K^+ ATPaz aktivasyonu sonucu embriyo içerisinde artan Na^+ 'un osmotik etkisiyle suyun pasif geçişi gerçekleşir⁽²⁷⁾. Böylece bir iç hücre kitlesi, blastosel adı verilen içi sıvı dolu bir kavite ve dış kısımda trofoektoderm tabakaya sahip trofoblast oluşur. Embriyo, ilk 3 gün boyunca tuba uterinada bulunur, daha sonra uterus girer. Embriyonun endometriuma implantasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için embriyonik gelişimin normal sürecinde devam etmesi ve endometrial olgunlaşmanın bu süreçle eş zamanlı gerçekleşmesi büyük önem taşır. İmplantasyon süreci üç evreye ayrılır. İlk evre yaklaşma evresi olarak adlandırılır. Bu evrede fertilizasyon sonrası 5-6. günlerde zona pellusidadan ayrılan (*hatching*) trofoblast uterus duvarına yaklaşır. Endometrium duvarında bulunan ve pinopod adı verilen parmaklı çıkıntılar bu yaklaşmayı kolaylaştırır. 6-7. günlerde iç hücre kitlesine komşu olan trofoektoderm hücrelerinin mikrovillusları aracılığıyla adezyon (yapışma) evresi başlar. Bu evrede integrinler, heparan sülfat proteoglikanlar, kaderinler gibi adezyon molekülleri görev alır. Bunlardan en önemlileri integrin proteinleridir⁽²⁸⁾. İntegrin proteinleri hücre dışı matriks proteinlerine (laminin, fibronectin, kollajen, vitronectin) bağlanarak trofoblastın endometriuma tutunmasına aracılık eder. Tutunma sonrası trofoblast hücreleri sitotrofoblast hücrelerine farklılaşır. Sitotrofoblast hücreleri dış kısımda birbirleriyle kaynaşarak uterus duvarına çıkıntılar uzatan çok çekirdekli sinsityotrofoblast tabakasını oluşturur. Sinsityotrofoblastlardan salınan metalloproteazlar ve serin proteazlar ile hücre dışı matriks parçalanır ve embriyonun endometriuma invazyonunu gerçekleştirir⁽²⁹⁾.



Şekil 2. Preimplantasyonel embriyonik gelişim aşamaları

2.3. Zigotik Genom Aktivasyonu

Oositlerde depolanmış olan maternal mRNA ve proteinler erken embriyonik gelişimi destekler. Embriyonik dönemdeki ilk iki yarıklanma maternal mRNA tarafından yönetilir. Zigotik genom aktivasyonu sürecinde maternal transkriptler parçalanır yeni transkriptler oluşur ve gen ekspresyonları yeniden programlanır⁽³⁰⁾. Gen aktivasyonunun gerçekleştiği embriyonik aşamada, hücre döngüsünde meydana gelebilecek gecikmeler mRNA sentezinin belirli bir eşik değerin altında kalmasına ve embriyonik gelişimin durmasına neden olur. Maternal zigotik geçiş olarak adlandırılan bu süreç insanda 4-8 hücre arası gerçekleşirken farede 2 hücreli embriyonik aşamada gerçekleşir⁽²⁷⁾. Erken embriyonik dönemdeki genom aktivasyonu embriyonik aşamalara göre farklı genlerin aktivasyonunun artması ya da azalması süreçlerini içerir. Örneğin 2 ve 4 hücreli embriyonik aşamalarda temel hücresel mekanizmaların düzenlenmesiyle ilgili genlerin aktivasyonu artmışken daha ileri aşamalarda (8-h, morula, trofoblast) hücre farklılaşması ve morfolojik değişiklikleri düzenleyen genlerin aktivasyonu artar⁽³¹⁾.

2.4. Embriyo Toplama ve Kùltür Solüsyonları

Doku kùltür solüsyonlarının ilk örneği Ringer tarafından oluşturulan serum benzeri dengeli tuz çözeltilisidir. Daha sonra kullanılan embriyo kùltürlerinin çoğu serum veya plazma gibi biyolojik sıvılarda veya bu biyolojik sıvılarla desteklenen sentetik kùltür ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Ancak bu biyolojik sıvıların bilinmeyen bileşenleri tekrarlanabilirlik açısından sorunlara neden olmuş ve *in vitro* gelişen embriyo için gerekli bileşenlerin tanımlanması tam olarak sağlanamamıştır. Bu nedenle dengeli tuz çözeltililerine dayalı Tyrode'nin solüsyonu ve Krebs-Ringer-bikarbonat (KRB) solüsyonları gibi sentetik ortamlar geliştirilmeye başlanmıştır⁽³²⁾. Solüsyon içerikleri embriyoların normal gelişimlerini devam ettirebilmek için modifiye edilmiş ve M16, CZB, MEM, SOM, KSOM solüsyonları geliştirilmiştir. Bu çalışmada K⁺ düzeyi artırılmış KSOM (K⁺ simplex optimized medium) solüsyonu kullanılmıştır. Solüsyon içerisinde bulunan NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂ elektrolit ve osmotik etki sağlarken; laktat, pirüvat, glukoz enerji substratları olarak kullanılır. KH₂PO₄ ve NaHCO₃ solüsyonu tamponlamada kullanılır. Ağır metal kontaminasyonlarını önlemek için ortama EDTA eklenir. Embriyoların birbirlerine ve petri zeminine yapışmalarını engellemek için ise BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılır. KSOM solüsyonu içerisindeki bikarbonat sayesinde % 5-6 CO₂ içeren inkübatör şartlarında solüsyon pH'sını tamponlama yeteneğine sahiptir ancak, embriyoların toplanması sırasında atmosfer havasında sabit pH'ya sahip bir ortam gereklidir. Bikarbonat tamponu içeren solüsyonlar kısa süreli ortam havasına maruziyette bile sabit pH seviyelerini sürdüremezler. Bu nedenle embriyoların toplanması sırasında KSOM içeriğindeki NaHCO₃ miktarının azaltılıp ortama HEPES tamponu eklenmesiyle elde edilen KFHM (flushing-holding medium) solüsyonu kullanılır⁽³³⁾. pH ölçümü sırasında monokarboksilat taşıyıcıların hücre içi pH'ya olan etkisini minimize etmek için laktatı azaltılmış pHKFHM/pHKSOM solüsyonları kullanılır.

2.5. Hücre içi pH Regülasyonu

Hücre içi pH regülasyonu, hacim düzenlemesi, hücre metabolizma, membran potansiyeli, kas kasılması, vezikül transportu ve hücre iskeletindeki etkileşimler gibi birçok süreçte kritik rol oynar. pH_i değişiklikleri, Ca^{2+} ve cAMP gibi ikinci habercilerin konsantrasyonunu da etkileyerek hücre içi sinyal iletimini etkiler⁽³⁴⁻³⁷⁾. Hücre içi pH'daki yükselmelerin ve düşüşlerin fare embriyolarında metabolik aktivite üzerinde etkili olduğu⁽³⁸⁾, yüksek pH_i 'nin mitokondriyal disfonksiyona ve anöploidiye neden olduğu gösterilmiştir^(39, 40). Oosit ve embriyolarda da olduğu gibi bütün hücrelerde pH_i regülasyonu için temel olarak üç mekanizma kullanılır. Bunlar hücre membranında yerleşik bulunan slc4 gen ailesinin üyeleri olan HCO_3^-/Cl^- değiştirici (Anyon exchanger, AE), Na^+ , HCO_3^-/Cl^- (Na^+ -dependent HCO_3^-/Cl^- exchanger, NDBCE) ve slc9 gen ailesinin üyesi olan Na^+/H^+ (Na^+/H^+ exchanger, NHE) değiştiricileridir. NHE ve NDBCE hücreyi asidoza karşı korurken, AE hücreyi alkalozaya karşı korur.

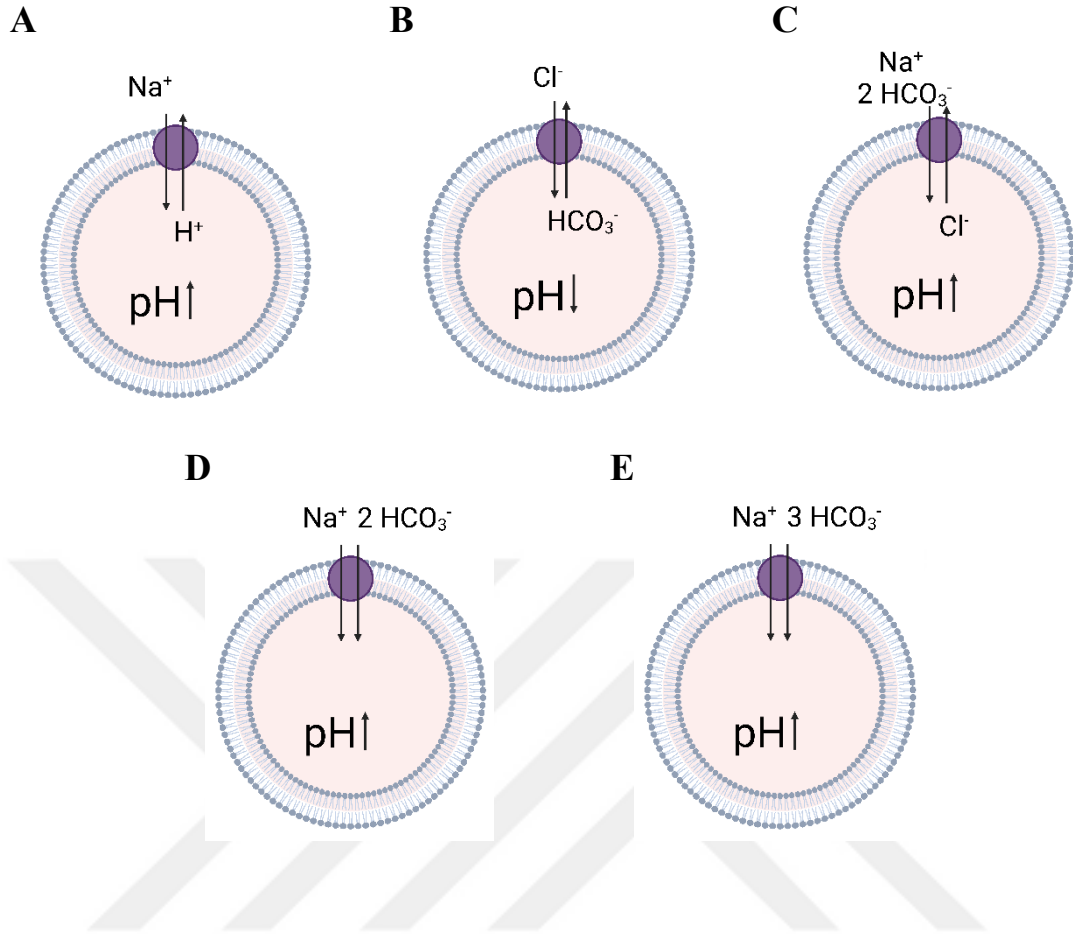
2.5.1. NHE İsoformları

Na^+/H^+ değiştirici proteinleri slc9 gen ailesi tarafından kodlanır, ökaryotik ve prokaryotik tek değerli katyon proton antiporter (CPA) süper ailesinin bir alt grubunu oluştururlar. Slc9A ailesinin bilinen 9 üyesi bulunur, bunlardan ilk beşi hücre membranında diğerleri çeşitli organellerde yer alır. NHE proteinleri elektronötraldirler. Hücre içi pH ~6.8'in altına düştüğünde aktive olurlar⁽⁶⁾ ve Na^+ 'a bağlı sürücü kuvvet ile hücre içi bir H^+ 'i hücre dışı bir Na^+ ile değiştirirler, böylece hücrenin asit yükünü azaltırlar (Şekil 3A). NHE1 isoformu böbreğin makula densa, α ve β interkale hücreleri dışında çoğu memeli hücresinde bulunur. Epitel hücrelerin çoğunun basolateral membranında yerleşim gösterir. Bir istisna olarak plasental sinsityotrofoblast hücrelerinde apikal membranda basolateral membrana göre ~10 kat daha fazla bulunur⁽⁴¹⁾. NHE1 knockout farelerde embriyogenezin normal gerçekleştiği ancak doğum sonrası ölüm oranlarının yüksek olduğu gösterilmiştir⁽¹⁶⁾. NHE2 isoformu ince bağırsak, kolon ve safra kesesinin fırçamsı kenarında, midede ve endotel hücrelerinde basolateral membranda yer alır. NHE3 ince bağırsak, kolon, safra kesesi, renal proksimal tübül ve henle kulbunun kalın ve ince kollarında bulunur. NHE3, ince bağırsak ve böbreklerde nötral NaCl

absorpsiyonunun çoğundan sorumludur. NHE4 en çok midede, az bir oranda da böbrek medullası ve hipokampusta bulunur. NHE5 sperm ve beyinde (dentat gyrus, serebral korteks, hipokampus, amigdala, kaudat çekirdek, hipotalamus, subthalamus ve thalamus) bulunur⁽⁴²⁾. Oositlerde ve preimplantasyon dönemi embriyolarda da NHE1 ve 3 isoformlarını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur^(6, 12, 20, 43-45). NHE1 isoformu tüm preimplantasyonel embriyonik aşamalarda bulunurken farklı çalışmalarda NHE3 isoformunun trofoblast aşamada fonksiyonel olmadığı raporlanmıştır^(12, 17). NHE4 ve 5 isoformları erken embriyonik dönemde baskın isoformlar olmasa da moleküler çalışmalarda farklı embriyonik aşamalarda bulundukları gösterilmiştir^(12, 13).

2.5.2. pH_i Regülasyonunda HCO₃⁻ Taşıyıcı Proteinlerin Rolü

Slc4 gen ailesi tarafından kodlanan 10 adet bikarbonat taşıyıcı protein bulunur. Bu proteinler fonksiyonlarına göre 3 farklı grupta toplanır. İlk grup HCO₃⁻/Cl⁻ değiştiriciler (Anion exchanger, AE) olarak isimlendirilir, ikinci grup Na⁺-HCO₃⁻ birlikte taşıyıcıları (Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter, NBC), üçüncü grup ise Na⁺ bağımlı HCO₃⁻/Cl⁻ değiştirici (Na⁺ driven HCO₃⁻/Cl⁻ exchanger, NDBCE). Anyon değiştiriciler elektronötraldir, Cl⁻ ve HCO₃⁻ iyonlarının konsantrasyon gradiyentleri net taşınım yönünü belirler. Çoğu hücrede hücre dışı Cl⁻ hücre içi bir HCO₃⁻ ile yer değiştirir (Şekil 3B). Eritrositlerde ise değişiminin yönü, hücrelerin sistemik veya pulmoner kapiller yatakta olmasına bağlıdır. DIDS gibi disülfonik stilbenler AE aktivitesini inhibe eder. Na⁺-HCO₃⁻ birlikte taşıyıcısı, bir Na⁺ ve iki veya üç HCO₃⁻ 'ı hücre içine taşır (Şekil 3D ve E). Sonuç olarak, hücre içi pH yükselir ve membran potansiyeli daha negatif bir değer alır. Bunun bir istisnası böbreğin proksimal tübülünde görülür. Burada bazolateral membranda bulunan NBCe1 birlikte taşıyıcısı bir Na⁺ ile üç HCO₃⁻ 'ı hücre dışına göndererek hücre dışına negatif yük geçişine neden olur. NDBCE, hücre içi pH yaklaşık 7.0'ın altına düştüğünde aktive olur⁽⁶⁾. Bir Na⁺ ile iki HCO₃⁻ 'ı hücre içine alınırken bir Cl⁻ da hücre dışına gönderilir (Şekil 3C). Böylece membran potansiyeli değişmeden hücre içi pH yükseltilmeye çalışılır⁽⁴⁶⁾.



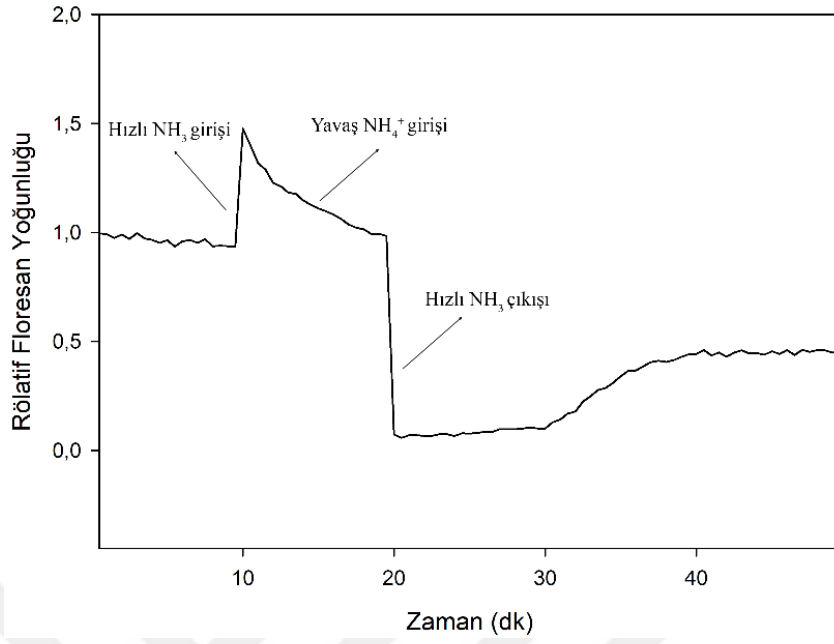
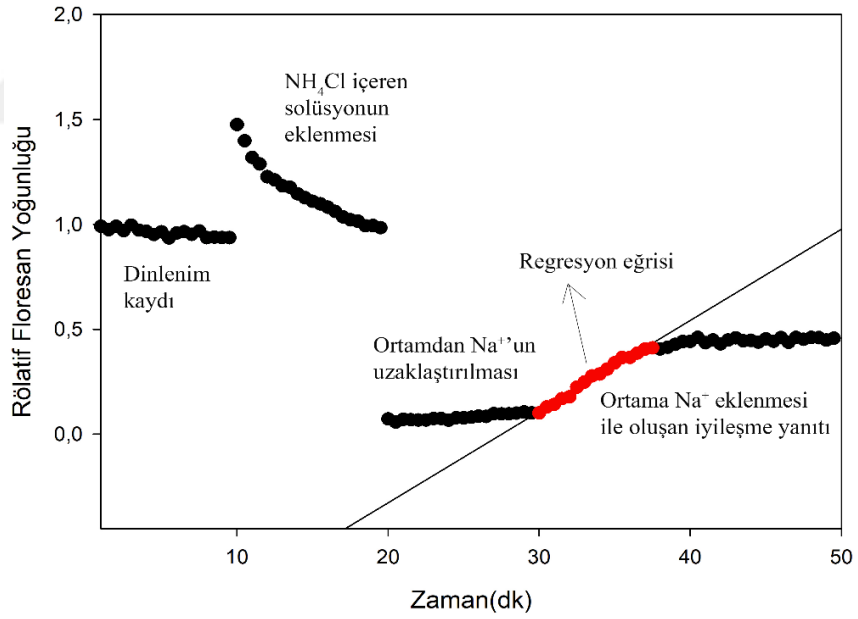
Şekil 3. Hücre içi pH regülasyonunda rol alan iyon değiştiriciler ve aktiviteleri sonrası hücre içi pH'da meydana gelen değişiklikler. Na^+/H^+ değiştirici (A), Anyon değiştirici (B), Na^+ bağımlı $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ değiştirici (C), Na^+ - HCO_3^- birlikte taşıyıcıları (D, E). Resimler BioRender.com üzerinden çizilmiştir.

3.5.3. NH_4^+ Puls Metodu ile Asidoz İndüksiyonu

NH_4^+ puls metoduna göre; hücrelerin bulunduğu ortama NH_4Cl eklenmesinden kısa süre sonra solüsyon içerisinde $\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}^+$ tersinir reaksiyonu denge haline gelir. NH_3 hücre zarından kolaylıkla geçebilir. NH_3 'ın hücre içine girmesi ile buradaki H^+ iyonlarını bağlaması pH_i 'nin hızlı bir şekilde yükselmesine neden olur. Takip eden dönemde NH_4^+ iyonları NH_3 'ten daha yavaş bir şekilde hücre içine girer ve hücre içinde NH_3 ve H^+ iyonlarına ayrılır. Ortamdan NH_4Cl uzaklaştırıldığında NH_3 hücre dışına hızla çıkar. Hücre içinde kalan H^+ iyonları, pH_i 'nin hızla düşmesine yani asidoza neden olur (Şekil 4A).

2.5.4. Değiştirici Aktivitelerinin Hesaplanması

Değiştirici aktivitelerinin hesaplamasında yukarıda ayrıntıları belirtilen NH_4^+ puls metodu uygulanarak asidoz indüksiyonu yapılır. Normal şartlar altında hücre içi pH 'nin belirli eşik değerlerin altına inmesiyle NHE ve NDBCE aktive olur ve Na^+ gradiyentinin sağladığı sürücü kuvvet ile H^+ hücreden uzaklaştırılırken (NHE), HCO_3^- hücre içine alınır (NDBCE). Böylece asit yükün azaltılması sağlanır. NH_4Cl ile asidoz indüksiyonu sağlandıktan sonra ortama Na^+ içermeyen solüsyon verilmesi değiştirici aktivitelerini ortadan kaldırılmış olur ve asidozun devamlılığı sağlanır. Ortama tekrar Na^+ içeren solüsyon verildiğinde iyon değiştiricilerin tekrar aktive olması sağlanır ve iyileşme yanıtı kaydedilir. İyileşme yanıtının başlangıç hızlı fazı sırasında çizilen eğrinin, lineer regresyon analizi ile değiştirici aktivitesi hesaplanır (Şekil 4B). Asidoz indüksiyonundan sonra ortama Na^+ içermeyen solüsyon eklenmesi, pH_i 'ya bağlı grafiğin sabit seyretmesine ve final solüsyonu eklendiğinde değiştirici aktivitelerine bağlı artan iyileşme yanıtının daha net izlenebilmesine olanak tanır.

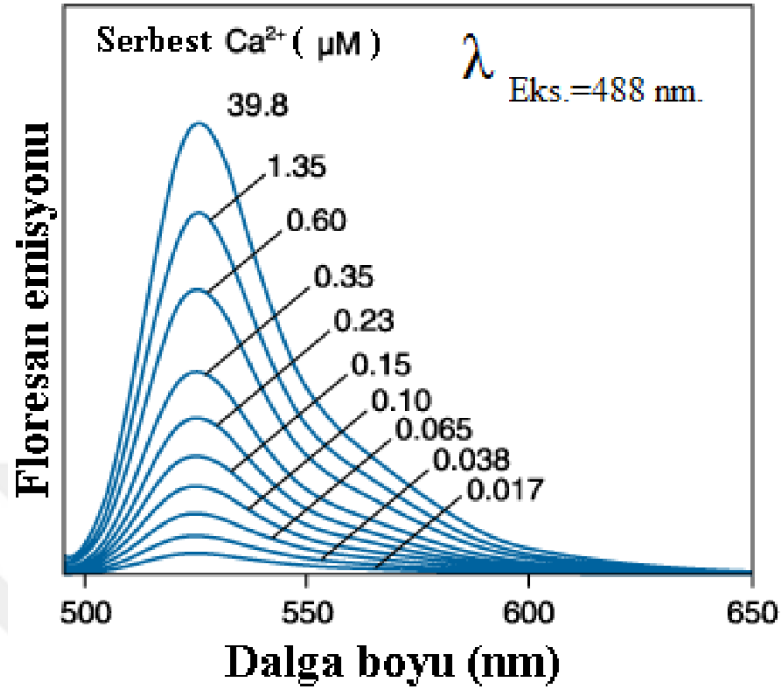
A**B**

Şekil 4. NH₄⁺ *puls* metodu (A) ve asidozdan iyileşme yanıtı sırasında çizilen regresyon eğrisi ile değıştirici aktivitesinin saptanması (B).

2.6. Hücre İçi İyon Ölçüm Yöntemleri

Hücre içi iyon ölçümünde mikroelektrot yöntemi, floresan spektroskopisi, nonapartikül problemler ile iyon ölçümü, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde en sık kullanılanı floresan spektroskopisidir. Bu yöntemde kullanılan floroforlar orantısallık olup olmamaları yönünden ikiye ayrılır. Orantısallık (ratiometrik) floroforlar bir iyonla etkileşime girdiğinde eksitasyon ya da emisyon spektrumunda kayma meydana gelir. İki tip orantısallık florofor bulunur. İlki eksitasyon spektrumunda kayma meydana gelen ve tek bir emisyon dalga boyuna sahip floroforlar. Buna örnek olarak BCECF verilebilir. İkincisiyse emisyon cevabında kayma meydana gelen ve tek bir dalga boyunda eksite edilen floroforlardır. Karboksi SNARF bu gruba örnek verilebilir. Orantısallık floroforlar ile yapılan kayıtlarda pH_i 'ya duyarlı emisyon yanıtının pH_i 'ya duyarlı olmayan (isosbestik nokta) emisyon yanıtına oranı alınır.

Orantısallık olmayan floroforlarda ise özgül iyonla bağlanma düzeyine göre floresan yoğunluğunda artma ya da azalma gözlenir. Ca^{+2} sensitif bir florofor olan Fluo-3 (Şekil 5) orantısallık olmayan floroforlara örnektir. Orantısallık yöntemin avantajı, iki farklı dalga boyunda kaydedilen floresan yanıtlarının oranı yalnızca iyon konsantrasyonuna bağlı değişirken, florofor maddenin hücre dışına sızması, floroforun değişik miktarlarda yüklenmesi, hücre kalınlığının değişkenliği gibi olumsuz durumlardan etkilenmemesidir⁽⁴⁷⁾.



Şekil 5. Orantısız olmayan florofor Fluo-3'ün emisyon spektrumu⁽⁴⁸⁾.

2.6.1. Hücre İçi pH Ölçümü

Hücre içi pH ölçümünde en sık kullanılan yöntemler içerisinde mikroelettrot yöntemi, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve floresan indikatörlerin kullanıldığı floresan spektroskopi yöntemi bulunmaktadır.

2.6.1.1. Mikroelettrot Yöntemi ile pH_i Ölçümü

Hücresel pH'nın mikroelettrotlarla ölçümü sırasında, bir referans elektrot ve bir ölçüm elektrodu yerleştirilir. Hücreye zarar vermemesi için elektrot çapı genellikle 1 μm veya daha azdır. Elektrot, düşük pH'lı bir çözelti ile doldurulur ve bu, elektrot duvarı

boyunca bir H^+ gradyanı oluşturur ve dışarıdaki H^+ konsantrasyonu ile H^+ geçirgenliğine orantılı bir potansiyel oluşturur⁽⁴⁹⁾. Ancak sadece büyük boyuttaki hücrelerde kullanılabilmesi, yerel değişimlere yanıt verebilmesi⁽⁵⁰⁾ ve kalibrasyonunun zor olması bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır.

2.6.1.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

NMR Spektroskopisi, kuvvetli bir manyetik alan içerisindeki belirli çekirdeklerin radyo frekansındaki elektromanyetik ışınları absorblamasına dayanan bir analiz yöntemidir⁽⁵¹⁾. pH'ya bağlı protonasyon/deprotonasyon, çekirdeklerin elektronik ortamını değiştirir ve NMR pikinin konumunu kaydırır. NMR spektroskopisi, iskele sonrası izole kalpteki pH_i ölçümü gibi tüm dokuda pH_i analizi yapıldığı durumlarda en güçlü yöntemdir ve iki veya üç boyutlu görüntüleme yapılmasına olanak tanır. Ancak, hücre içi pH'nın ölçümü için NMR kullanmak karmaşık ekipman, metodoloji ve veri analizi gerektirir. Ayrıca duyarlılığının düşük olması, yüksek hücre konsantrasyonları ve uzun veri toplama süreleri gerektirmesi bu yöntemin dezavantajlarıdır⁽⁴⁹⁾.

2.6.2. Mikrospektrofluorometrik Yöntem ile pH_i Ölçümü

Bu yöntemde pH değişimlerine duyarlı florofofor maddeler kullanılır. Florofofor maddeye uygun dalga boyundaki eksitasyon ışığı gönderilir ve daha yüksek dalga boyundaki emisyon yanıtı kaydedilir. Hücrelere florofofor yüklenmesi farklı yöntemlerle sağlanabilir. Bu yöntemler arasında florofofor içeren lipozomların kullanımı, mikroenjeksiyon yöntemi ve florofoforların hidrofobik gruplarla konjuge edilmesi bulunur. İnvaziv işlem olmaması ve aynı anda birden fazla hücrenin işaretlenebilmesi avantajları nedeniyle hidrofobik gruplarla konjugasyon yöntemi tercih edilmektedir. Hidrofobik gruplar florofofor maddelere ester bağlarıyla bağlanırlar, hücre membranını geçtikten sonra sitoplazmada bulunan esterazlar ile bu ester bağları yıkılır ve florofofor madde tekrar hidrofilik hale gelerek hücre içine hapsolür. Hidrofobik gruplar içerisinde en sık asetometil grupları kullanılır.

Mikrospektrofluorometrik yöntemde sabit bir eksitasyon kaynağı bulunurken emisyon yanıtları farklı deteksiyon yöntemleriyle kaydedilebilir. Bu yöntemlerden ilki

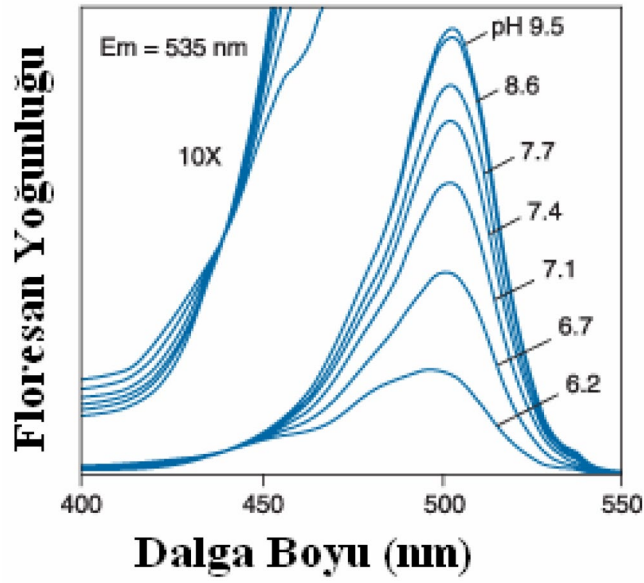
PMT (Photomultiplier tube) sistemidir. Emisyon yanıtları iğne deliği büyüklüğündeki bir açıklıktan geçecek şekilde sınırlandırılıp tek bir hücreden ya da hücre bölümünden gelen floresan yanıtının kaydedilebilmesini sağlar. Hücrelerin uyarılmasıyla meydana gelen iyon salınımları gibi hızlı gelişen olayları kaydedebilir. PMT sistemleri çok düşük ışık düzeylerini kaydedebilir bu nedenle hücrelere az miktarlarda florofor yüklenmesi yeterli olmaktadır, ancak birden fazla hücreden gelen yanıtların aynı anda kaydedilememesi ve uzamsal bilgi verememesi bu sistemin dezavantajlarıdır.

Diğer bir deteksiyon sistemi birden fazla hücreden gelen floresan yanıtın kaydedilmesine olanak sağlayan kamera sistemleridir. PMT'ye göre daha yüksek floresan yoğunluğu ve ışık şiddetine ihtiyaç duyar. Uzamsal bilgi verebilmesi PMT'ye göre avantaj sağlar.

Konfokal mikroskoplar floresan görüntüleme için kullanılan bir diğer yöntemdir. Lazer ışık kaynakları kullanılır. 3 boyutlu görüntü verebilmesi avantaj sağlarken, eksitasyon dalga boyu aralığının sistemde bulunan lazerler ile sınırlı olması bu yöntemin dezavantajıdır⁽⁴⁷⁾.

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

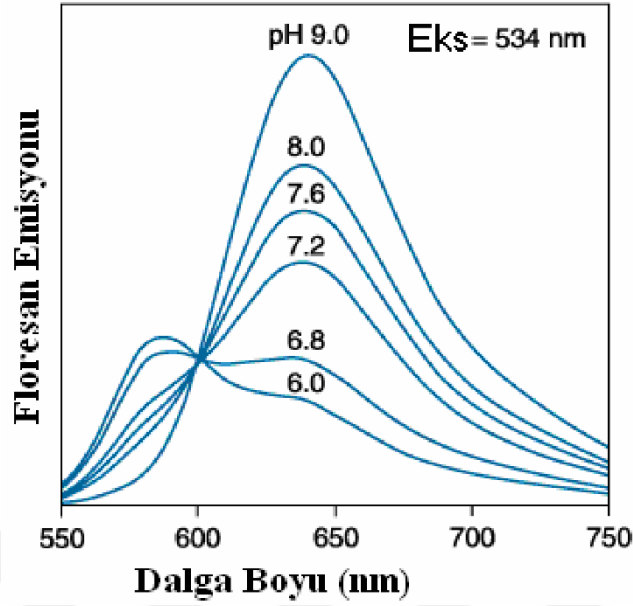
Hücrelerde pH'nın 7'ye yakın olduğu değerlerde ölçüm için en sık kullanılan floresan probalar florosin türevi moleküllerdir. Florosinin hücrelerden dışarı sızma oranı yüksektir bu nedenle pH_i ölçümlerinde hücrelerden dışarı sızma oranı daha düşük olan BCECF gibi türevleri tercih edilir. BCECF'nin pKa değeri 6.97'dir, bu nedenle fizyolojik pH_i değişikliklerini ölçmek için ideal bir florofordur⁽⁵²⁾. pH'daki değişimlere bağlı olarak BCECF'in emisyon spektrumu değişkenlik göstermez, yaklaşık 530 nm'de sabit emisyon kaydı alınır. 440 nm'de eksite edildiğinde pH'ya hassas olmayan yanıt verirken 490 nm'de eksite edildiğinde yüksek pH'da emisyon cevabı artar (Şekil 6). Buna bağlı olarak 490 nm ve 440 nm eksitasyon yanıtlarının oranı (490/440) pH'ya bağlı değişiklik gösterir.



Şekil 6. BCECF'in farklı pH değerlerinde kaydedilen eksitasyon spektrumu⁽⁵³⁾.

2.6.2.2. Karboksi SNARF-1 (carboxy-seminaphthorhodafluor-1)

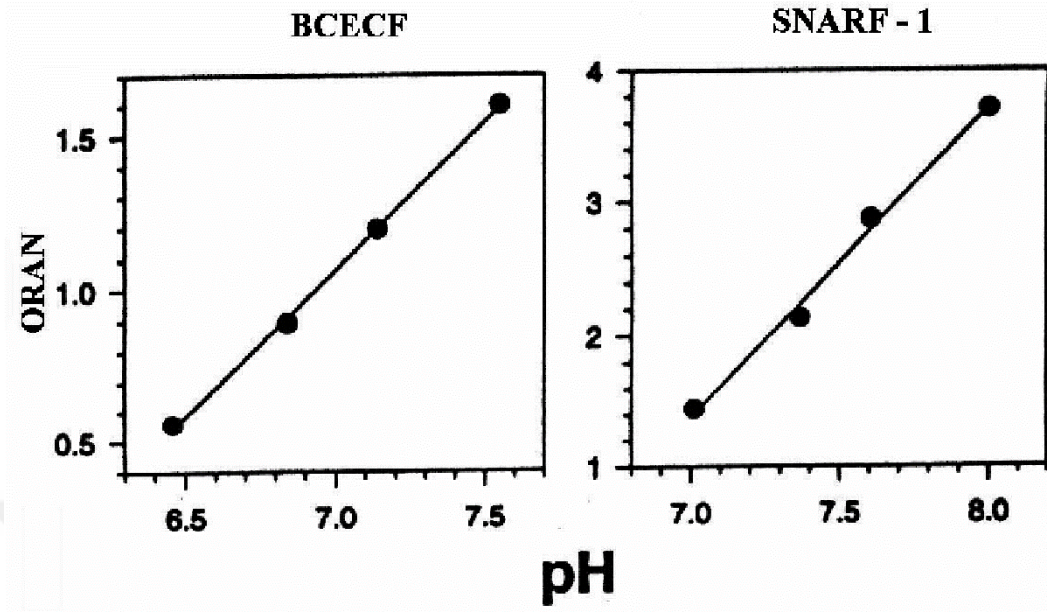
pH'ya duyarlı iki farklı emisyon tepe noktası bulunur. 540 nm eksitasyon dalga boyu ile uyarıldığında 588 nm'de gözlemlenen emisyon yoğunluğu, pH 6.0'da maksimumdur ve artan pH ile azalır. Buna karşılık, 638 nm'de gözlemlenen emisyon yoğunluğu, pH 8.5'te maksimumdur ve azalan pH ile azalır (Şekil 7). Karboksi SNARF-1'in pKa değeri yaklaşık 7.5'tir. Bu nedenle asit pH'daki kullanımı sınırlıdır ve alkali pH çalışmalarında tercih edilir.



Şekil 7. SNARF-1'in 534 nm eksitasyonu ile gerçekleşen emisyon spektrumu.

Mikrospektrofluorometrik yöntemde emisyon yanıtının pH olarak ifade edilebilmesi için kullanılan floroforun pKa değerini de içine alacak şekilde farklı pH değerlerine sahip üç veya dört solüsyon hazırlanır. Hazırlanan kalibrasyon solüsyonlarına K^+/H^+ değiştiricisi olan nigerisin eklenerek hücre içi ve hücre dışı pH değerlerinin eşitlenmesi sağlanır. Hücre içi yüksek K^+ konsantrasyonuna benzer şekilde solüsyonların K^+ içeriği de yüksek tutularak hücre içi ve dışı arasındaki K^+ gradienti ortadan kaldırılır. Ortama K^+ iyonoforu olan Valinomisin de eklenerek gradientin tamamen ortadan kalkması sağlanır.

Farklı pH değerlerine sahip kalibrasyon solüsyonlarıyla elde edilen emisyon oranları kullanılarak bunlara karşılık gelen pH değerlerini gösteren lineer regrasyon eğrisi çizilir. Bu eğriye aynı zamanda kalibrasyon eğrisi de denir. BCECF ve karboksi SNARF'a ait kalibrasyon eğrileri Şekil 8 'de verilmiştir. BCECF'in kalibrasyon eğrisinin asit pH'yı içeren aralıkta, karboksi SNARF'ın ise alkali pH'yı içeren aralıkta en iyi lineer yanıtı gösterir.

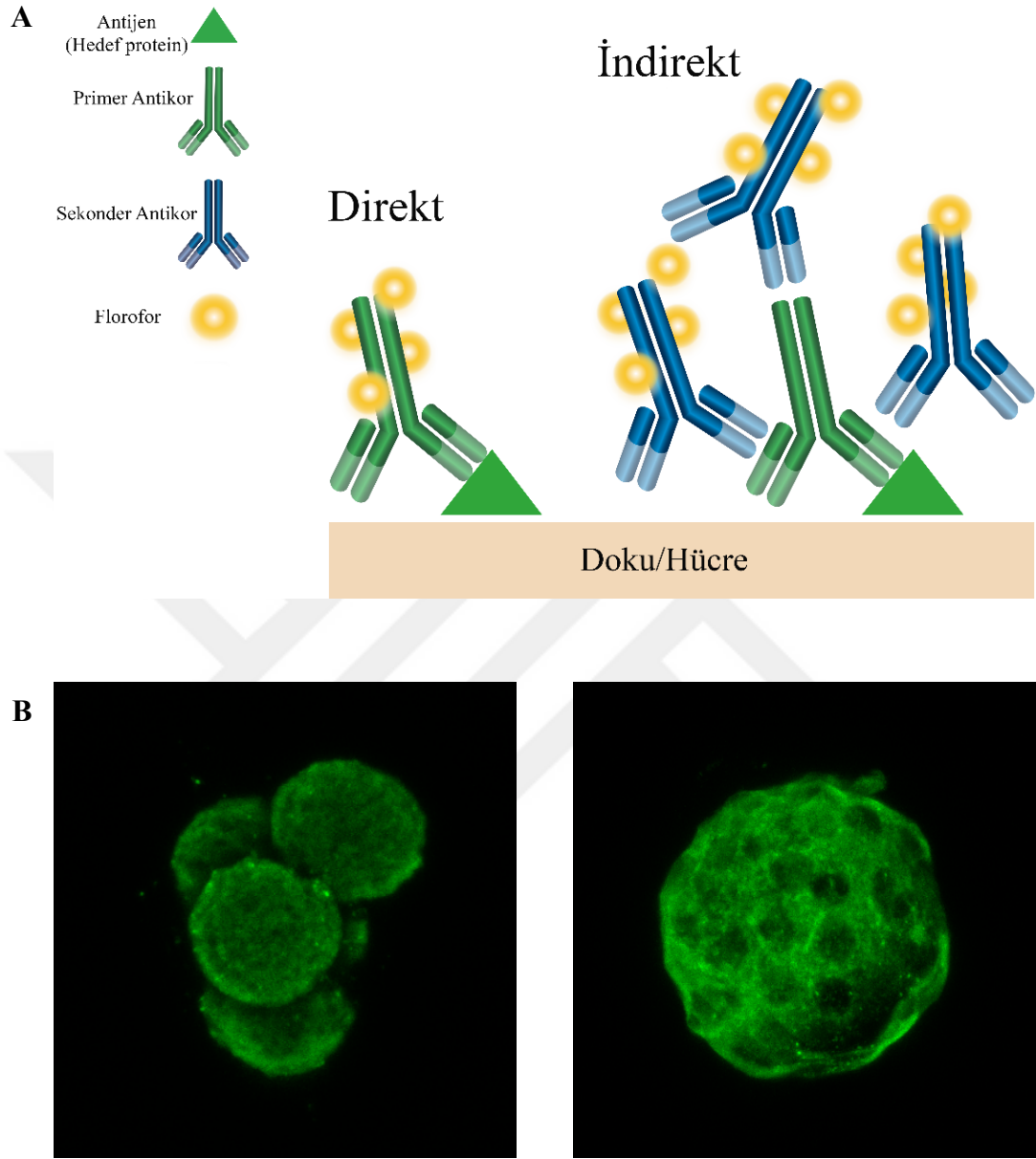


Şekil 8. BCECF ve karboksi-SNARF'ın 4 ayrı pH değeri ile çizilen kalibrasyon eğrileri.

2.7. İmmüno Floresan Görüntüleme

İmmüno floresan boyama, farklı doku türlerinde çeşitli antijenlerin tespit edilmesini ve lokalizasyonunun gösterilmesini sağlayan önemli bir immünokimyasal tekniktir. Direkt ve indirekt olmak üzere iki tipi bulunur. Direkt boyama yönteminde florofor işaretli primer antikorlar kullanılırken indirekt boyamada primer antikora özgül işaretli sekonder antikör kullanılır (Şekil 9A). İF boyamada ilk basamak fiksasyon işlemidir, bu işlem ile hücrelerin otolize uğraması önlenirken mevcut morfolojilerini ve antijenitelerini koruması sağlanır. Formaldehit ve gluteraldehit gibi çapraz bağ oluşturan (*cross-linking*) ajanlar hücre komponentleri arasında metilen bağları oluşturarak, metanol gibi organik çözücüler ise hücrelerden lipidleri uzaklaştırarak ve dehidratasyona neden olarak fiksasyon sağlarlar. Eğer hedef protein hücre içerisinde yer alıyorsa fiksasyon sonrası permeabilizasyon yapılır. Triton X-100, TWEEN permeabilizasyon işleminde en sık

kullanılan kimyasallardır. Etkilerini hücre membranından farklı molekülleri uzaklaştırarak ve membranda değişken boyutlarda porlar oluşturarak gösterirler. Bir sonraki aşamada özgül olmayan proteinlerin antikora bağlanmasını önlemek için bloklama işlemi yapılır. Bloklama işleminde yaygın kullanılan maddeler BSA, süt tozu ve jelatindir. Bloklama solüsyonunda sekonder antikor ile aynı türe ait proteinlerin kullanılması özgül olmayan bağlanmayı azaltır. Bloklama işleminden sonraki basamak primer antikor uygulamasıdır. Eğer indirekt boyama yapılıyor ise primer boyamayı takiben florofor işareti sekonder antikor ile boyama işlemi gerçekleştirilir⁽⁵⁴⁾. Direkt boyama yöntemi daha hızlı olsa da duyarlılığının daha yüksek olması, sinyal amplifikasyonu sağlaması ve birden fazla proteinin aynı anda işaretlenebilmesi nedeniyle indirekt boyama yöntemi daha fazla tercih edilir. Boyama işleminden sonra florofor maddenin ışığa özelliğini daha uzun süre korumasını sağlayan solüsyonlar (*mounting medium*) ile kullanılan hücrelerin/dokuların türüne göre lam-lamel preparatları, kuyulu petriler veya kayıt *chamber* 'ları ile örnekler görüntülemeye hazır hale getirilir. Görüntülemeye floresan ya da konfokal mikroskoplar kullanılarak florofora uygun eksitasyon ışığı gönderilir ve daha uzun dalga boyundaki emisyon yanıtları kaydedilir⁽⁵⁵⁾. Çalışmamızda indirekt yöntem ile boyanan embriyoların konfokal mikroskop ile kaydedilen görüntüleri Şekil 9B'da verilmiştir. İF boyamada en kritik hususlardan biri, elde edilen sinyalin hedef antijene bağlanan antikordan geldiğini kanıtlamak için negatif ve pozitif kontrollerin gösterilmesidir. Pozitif kontrol, işaretlenen proteini içerdiği bilinen hücreler ile yapılır. Negatif kontrol ise primer antikor eklenmeden tüm boyama adımlarının gerçekleştirildiği testtir.



Şekil 9. Direkt ve indirekt immünfloresan boyama yöntemleri (A), indirekt yöntem ile boyanan 4-h (B) ve erken trofoblast (C) embriyo görüntüleri.

2.8. Yardımcı Üreme Teknikleri

In vitro kültür ortamında geliştirilen 8-hücreli embriyonun uterusu implantasyonu sonucu ilk IVF bebeği 1978 yılında sağlıklı bir şekilde dünyaya geldi. Devam eden yıllarda yardımcı üreme teknolojisi (Assisted Reproductive Technology, ART) hızla gelişmeye devam etti. Son yıllarda gerçekçi bir kadın üreme sistemi ortamının simüle edilmesi, tüm ART türleri için ortak bir hedef haline gelmiş ve böylece yapay mikro çevrenin perinatal ve yavru sağlığı üzerindeki etkisi azaltılmıştır.

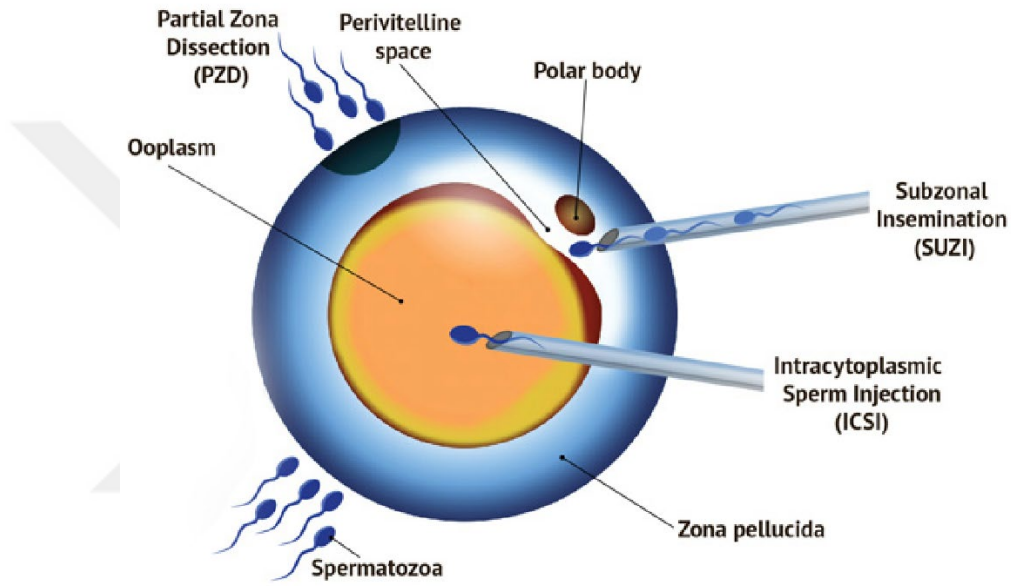
Dünya çapında çiftlerin yaklaşık % 10'u infertildir. İnfertilite oranının yaklaşık % 25'i açıklanamayan nedenlere bağlıdır⁽⁵⁶⁾. IUI (Intrauterine Insemination) açıklanamayan infertilite tedavisinde ilk uygulanan, en basit ve en az invaziv özelliğe sahip fertilizasyon yöntemi olarak kabul edilir. Doğal döngülerde yapılabildiği gibi gonadotropinlerle, klomifen sitratla ya da aromataz inhibitörleriyle (letrozol)⁽⁵⁷⁾ ovülasyon indüksiyonu da sağlanabilir. Gonadotropin enjeksiyonundan yaklaşık 36 saat sonra yıkanmış semen uterusu enjekte edilir⁽⁵⁸⁾.

In vitro inseminasyonda (klasik IVF) oositler 16 saat boyunca spermle inkübe edilir. İnsanlarda, *in vitro* inseminasyondan sonra spermin kumulus oosit kompleksi içerisine girişi 15 dakika içerisinde gerçekleşir.⁽⁵⁹⁾

İlk mikromanipülasyon teknikleri kısmi zona diseksiyonu (Partial Zona Dissection, PZD) ve subzonal inseminasyon (SUZI), erkek faktörlü infertilitesi olan çiftlerde IVF başarısını artırmak için 1980'lerde geliştirilmiştir. PZD, ZP'da bir veya daha fazla delik oluşturarak spermin yumurtaya girmesini kolaylaştırır. Geleneksel inseminasyon ile karşılaştırıldığında PZD'da döllenme oranları % 68 oranında artış göstermiştir. Ancak perivitellin boşluğa giren sperm sayısının kontrol edilememesi nedeniyle polispermi riski yüksektir. SUZI, bir veya daha fazla spermin doğrudan perivitellin boşluğa yerleştirildiği, polispermi riskinin daha düşük olduğu bir yöntemidir. Ancak bu yöntemde gebelik oranları düşük seyretmektedir.

ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) yönteminde olgun bir yumurtanın ooplazmasına tek bir sperm hücresinin doğrudan enjeksiyonu gerçekleştirilir. Doğal döllenme veya klasik IVF sırasında sperm hücrelerinin oosit içerisine giremediği durumlarda (erkek/kadın faktörleri) tercih edilir.

IVF uygulamalarının ilk yıllarında yarıklanma aşamalarındaki embriyoların transferi yaygındı. Ancak son dönemlerde *in vitro* kültür şartlarındaki iyileştirmelerle beraber trofoblast aşama embriyoların implantasyon potansiyelinin daha fazla olduğu ve çoğul gebelik riskini azalttığı savunulmaktadır⁽⁶⁰⁾. Yukarıda ayrıntıları verilen yöntemlerin şematize edilmiş hali Şekil 10’ da verilmiştir.



Şekil 10. Yardımcı üreme teknikleri⁽⁵⁹⁾.

3. GEREÇ-YÖNTEM

Çalışmada, Çukurova Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan 5-8 haftalık Balb/c soyu dişi fareler kullanıldı. Fareler laboratuvarında 12 saat aydınlık ve karanlık (06:00-18:00) döngüde, su ve yem kısıtlaması yapılmadan barındırıldı. Ortamın sıcaklığı 21 ± 1 °C ve nemi % 40-60 olacak şekilde devamlı kontrol altında tutuldu. Yapılan tüm çalışmalar için Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (17.09.2021-8/3).

3.1. Solüsyonlar

Embriyoların eldesi, kültür aşaması ve pH_i ölçümü sırasında KSOM bazlı solüsyonlar kullanıldı. Solüsyonlar hazırlanırken yüksek kalite ultra saf su kullanıldı. Embriyo kültürü için KSOM solüsyonu kullanılırken embriyoların toplanması ve transferi sırasında KFH (HEPES-KSOM) solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyon KSOM solüsyonuna 21 mM HEPES eklenerek ve aynı oranda NaHCO₃ azaltılarak hazırlandı. Solüsyonun pH'ı NaOH ile 7.40'a ayarlandı.

pH_i değerlendirilmesi sırasında kullanılan solüsyonlarda H⁺/Laktat değiştiricisinin etkisini azaltmak için Na-laktat 9 mM azaltıldı ve NaCl 9 mM artırıldı; bu şekilde hazırlanan solüsyon pHKFH olarak tanımlandı. Embriyolara BCECF yüklenmesi sırasında pHKFH solüsyonu kullanıldı. Tek başına NHE aktivitesinin saptanmasında HCO₃⁻ içermeyen solüsyon kullanıldı ve 0 Bik. pHKFH olarak ifade edildi. NHE+NDBCE aktivitesi ölçümünde ise HCO₃⁻ içeren solüsyon kullanıldı ve pHKSOM solüsyonlar olarak tanımlandı. Asidoz indüksiyonu için her iki solüsyona 35 mM NH₄Cl eklenerek (NaCl yoğunluğu aynı oranda azaltıldı) NH₄Cl-0 Bik. pHKFH ve NH₄Cl-pHKSOM solüsyonları hazırlandı. Sodyum içermeyen solüsyonlarda NaHCO₃ yerine KolinHCO₃, Na-laktat yerine laktik asitin K⁺ tuzu, Na-pirüvat yerine K-pirüvat kullanıldı ve 0 Na-0 Bik. pHKFH/0 Na-pHKSOM solüsyonları oluşturuldu. pH_i kaydı sırasında kullanılan solüsyonlara BSA eklenmedi. Tüm solüsyonların ayrıntılı içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan solüsyonların ayrıntılı içerikleri.

	KSOM+BSA (mM)	KFHM+BSA (mM)	pHKFHM (mM)	0Bik. pHKFHM (mM)	NH₄Cl 0 Bik. pHKFHM (mM)	0 Na⁺ 0 Bik. pHKFHM (mM)	pHKSOM (mM)	NH₄Cl pHKSOM (mM)	0 Na⁺ pHKSOM (mM)
NaCl	95	95	104	108	73	-	104	69	-
KCl	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
KH₂PO₄	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
MgSO₄.7H₂O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Na-Laktat	10	10	1	1	1	-	1	1	-
Glukoz	0.2	0.2	0.2	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	0.2	-
NaHCO₃	25	4	4	-	-	-	25	25	-
Hepes	-	21	21	21	21	21	-	-	-
CaCl₂.2H₂O	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Glutamin	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EDTA (tetra Na)	0.01	0.01	0.01	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	0.16	0.16	0.16
Streptomisin SO₄	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
NH₄Cl					35			35	-
Kolin Cl						108			104
Laktik Asit						1			1
K⁺-Pirüvat						0.2			0.2
Kolin HCO₃									25

3.2. Kimyasallar

Solüsyonlarda kullanılan kimyasalların hepsi “Sigma-Aldrich Chemicals”dan (St. Louis MO, USA) sağlandı. pH_i değerlendirilmesi sırasında kullanılan diğer kimyasallar Tablo 2’de gösterilmiştir.

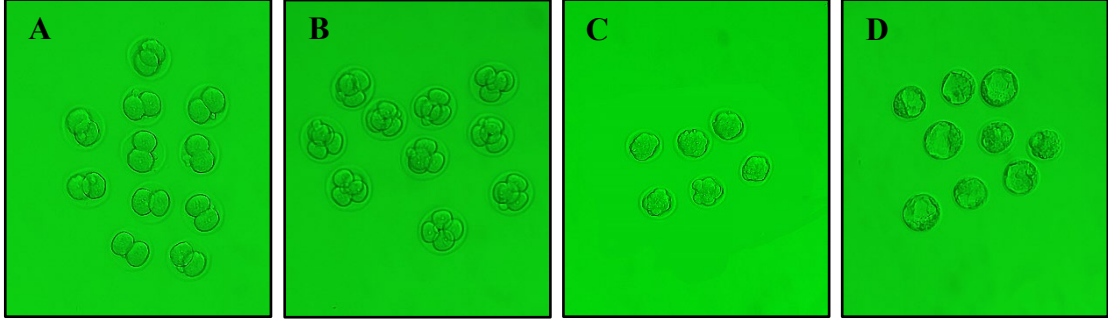
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

BCECF-AM	Cayman-15922
Kariporid	Cayman-16935
PMSG	Biovendor-RP178272
hCG	Sigma-C1063
Hyaluronidaz	Sigma H-3506
Nigerisin	Sigma-N7143
S3226	Sigma-1996
Valinomisin	Cayman-10009152

3.3. Zigot ve Embriyo Eldesi

3.3.1. *In vivo* Embriyo Eldesi

Kopülasyon yapan dişi farelere hCG enjeksiyonunu takip eden 2-h için 30-32, 4-h için 50-56, morula için 70–75, trofoblast aşamasındaki embriyoları elde etmek için ise 96–110 saat sonra servikal dislokasyon yapılarak üreme sisteminden ovidukt/hornları çıkarıldı ve flush yöntemi uygulanarak *in vivo* gelişen embriyolar elde edildi (Şekil 11).



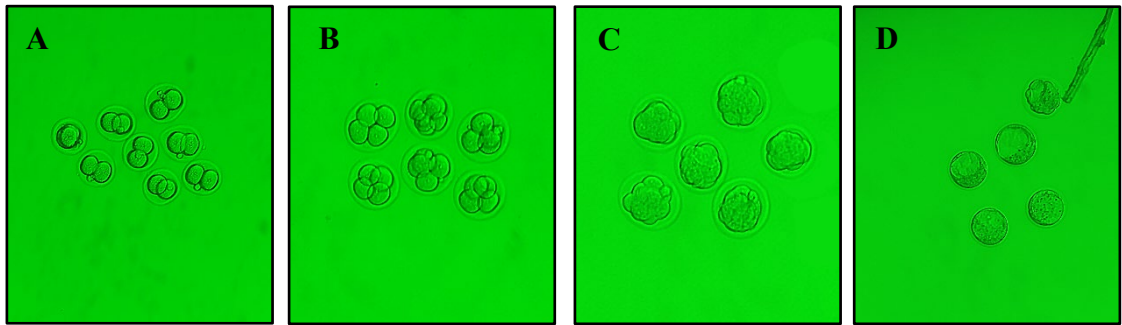
Şekil 11. Laboratuvarımızda *in vivo* elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyo örnekleri.

3.3.2. PN Zigot ve *In Vitro* Embriyo Eldesi

Dişi farelere intraperitoneal yolla 5 IU PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) enjeksiyonunu takiben 48. saatte 5 IU hCG (human chorionic gonadotropin) enjeksiyonu yapıldı. hCG enjeksiyonu sonrası dişi fareler erkek farelerle aynı kafese konularak çiftleşmeleri sağlandı. Ertesi sabah kopülasyon plağı pozitif olan dişi farelere (Şekil 12), hCG enjeksiyonundan yaklaşık 22 saat sonra servikal dislokasyon yapıldı ve oviduktları çıkarıldı. Oviduktların ampulla bölgesinden toplanan PN zigotlar 80µg/ml hyaluronidaz içeren damlaya aktarılıp kumulus hücreleri uzaklaştırıldı. Ardından 3 defa KFHM+BSA solüsyonu ile yıkandı. Mikroskopta pronükleusları net olan ve sağlıklı görünen zigotlar KSOM+BSA solüsyonunda kültüre edilerek *in vitro* 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyoların eldesinde kullanıldı (Şekil 13).



Şekil 12. Kopulasyon plağı pozitif fare.

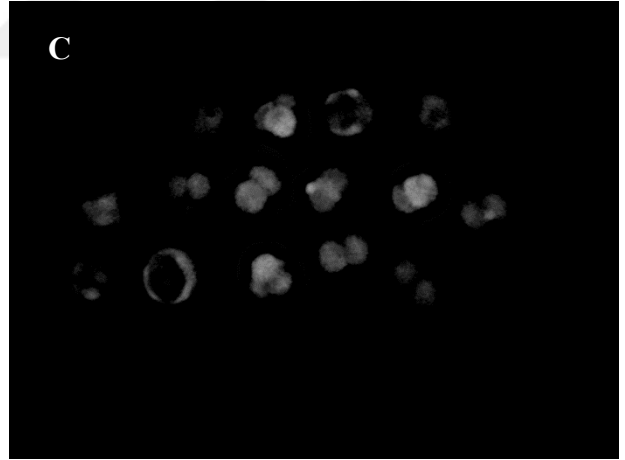
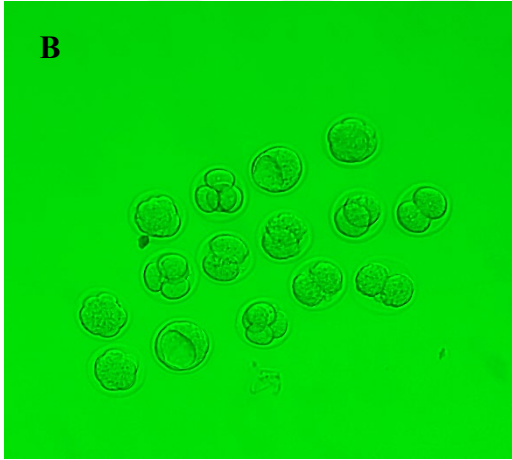


Şekil 13. Laboratuvarımızda PN zigot kültürü ile *in vitro* elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyo örnekleri.

3.4. pH_i Değerlendirilmesi

Yükleme solüsyonu olan pHKFHM, BSA içermediği için saat camları % 1 jelatin ile kaplanarak embriyoların zemine yapışması engellendi. İki saat camına pHKFHM üçüncüye 3 µM BCECF-AM içeren pHKFHM konuldu. Embriyolar iki kez pHKFHM ile yıkayıp BCECF-AM içeren saat camına aktarıldı ve 37°C de 30 dk inkübe edildi. Yüklemeye sonrası embriyolar 3 kez pHKFHM ile yıkanarak ortamdaki BCECF-AM uzaklaştırıldı. *In vivo* gelişen ve *in vitro* kültürle elde edilen embriyolar için yukarıda anlatılan işlemler ayrı saat camlarında gerçekleştirildi. Yüklemeye ve yıkama işlemlerinden sonra *in vivo* ve *in vitro* embriyolar birbirine karışmayacak şekilde zemininde lamel bulunan kayıt odacığına alındı. Solüsyondan BSA çıkarılarak embriyoların lamelere yapışması sağlandı. Solüsyon değiştirmek için perfüzyon sistemi ve pHKSOM bazlı solüsyonlarda % 5 CO₂-% 95 hava karışımı ile gazlanmayı sağlayacak şekilde havalandırma düzeneği oluşturuldu. Sıcaklık kontrol ünitesiyle (PTC-20) solüsyonun sıcaklığı 37 °C olacak şekilde stabil tutuldu.

BCECF ile yüklenmiş embriyolar pHKSOM/0 Bik. pHKFHM solüsyonlarında 10 dk bekletilerek stabiliteleri sağlandıktan sonra 500 nm dalga boyundaki eksitasyon ışığıyla uyarıldı. 535 nm dalga boyundaki emisyon değişimleri invert floresan mikroskoba (Nikon TE 2000-U) bağlantılı ICCD kamerayla (Şekil 14A) yapıldı. Embriyoların mikroskop (Şekil 14B) ve kamera (Şekil 14C) görüntüleri *in vivo* ve *in vitro* embriyoların karışması engellenmesi amacıyla haritalandırıldı ve eş zamanlı olarak 30 sn'de bir kayıt alındı. Emisyon yanıtlarının pH_i olarak ifade edilebilmesi için daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi nigerisin/yüksek K⁺ ve valinomisin metodu uygulanır. Ancak laboratuvarımızda bulunan mikrospektrofluorometrik kayıt sistemindeki teknik arızadan kaynaklı olarak pH insensitif dalga boyunun emisyon yanıtında tutarsızlıklar saptandı. Bu nedenle pH sensitif eksitasyon yanıtının zamana bağlı rölatif floresan yoğunluğu verileri ile pH_i değerlendirmesi yapıldı.



Şekil 14. Çalışmada kullanılan mikrospektrofluorometik kayıt sistemi (A). Farklı aşamalardaki embriyoların stereomikroskop altındaki görüntüleri (B) ve bu embriyoların mikrospektrofluorometik kayıt sistemiyle 500 nm dalga boyunda uyarılan ve 535 nm’de alınan floresan emisyonları (C).

3.4.1. NHE Aktivitesinin Hesaplanması

pH_i değerlendirmek ve NHE aktivitesini hesaplamak için yapılan kayıtlarda, öncelikle Na⁺ içeren ancak bikarbonat içermeyen 0 Bik. pHKFHM solüsyonuyla 10 dk dinlenme kaydı alındı. Daha sonra ortama sırasıyla NH₄Cl 0 Bik. pHKFHM ve 0 Na⁺ 0 Bik. pHKFHM solüsyonu verilerek, ayrıntıları açıklandığı üzere, asidoz indüksiyonu yapıldı. Son olarak ortama Na⁺ içeren 0 Bik. pHKFHM solüsyonu verilerek 20 dk boyunca asidozdan iyileşme yanıtları kaydedildi. İyileşme yanıtının başlangıç hızlı fazı sırasında çizilen eğrinin, lineer regresyon analizi ile NHE aktivitesi saptandı.

3.4.2. NHE İsoformlarının Değerlendirilmesi

NHE isoformlarının asidozdan iyileşmeye olan katkılarını değerlendirebilmek için mikrospektrofluorometrik kayıta kullanılan final solüsyonuna isoform spesifik inhibitörler eklendi. Böylece iyileşme yanıtındaki değişimler ile asidozdan iyileşmeye isoformun/ların katkısı belirlendi. Çalışmada kullanılan spesifik inhibitörlerin dozları ve inhibe ettikleri isoformlar aşağıda belirtilmiştir ^(12, 61, 62).

- a) 1 µM Kariporid; NHE1 inhibisyonu
- b) 1 µM S3226; NHE3 inhibisyonu
- c) 10 µM S3226; NHE1 ve 3 inhibisyonu

3.4.3. NHE + NDBCE Aktivitesinin Hesaplanması

Bikarbonat içeren pHKSOM ortamında asidoz defansında NHE ve NDBCE değiştiricilerinin her ikisi de aktiftir. pHKSOM solüsyonunda alınan 10 dakikalık dinlenme kaydı sonrasında ortama sırasıyla NH₄Cl pHKSOM ve 0 Na⁺ pHKSOM solüsyonlarıyla asidoz indüksiyonu yapıldı ve kayıtlar 10 dk süresince izlendi. Final solüsyonu olarak Na⁺ ve HCO₃⁻ içeren pHKSOM solüsyonu verilerek 20 dk asidozdan iyileşme kaydı alındı. Başlangıçta gerçekleşen hızlı iyileşme yanıtının lineer regresyon analizi ile NHE+NDBCE aktiviteleri saptandı.

3.5. İmmünfloresan Boyama

Elde edilen *in vivo* ve *in vitro* embriyolar ilk olarak % 2'lik paraformaldehit solüsyonunda oda sıcaklığında 20 dk fikse edildikten sonra PBS (phosphate buffered saline) solüsyonunda 3 defa 5'er dk yıkandı. % 0.01 Triton X-100 ve % 5 NDS (normal donkey serum) içeren PBS solüsyonunda oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek *blocking* işlemi uygulandı. Primer antikorların dilüsyonunda % 0.005 Triton X-100 + % 1 NDS içeren PBS solüsyonu (antibody dilution buffer, ADB) kullanıldı. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu NHE-1 primer antikor 1:200, NHE-3 primer antikor 1:50, NDBCE primer antikor 1:200 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Primer antikorda +4 °C'de bir gece inkübe edilen hücreler ADB ile 37 °C'de 3 defa yıkandı. Florofor işaretli sekonder antikorda (Alexa fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG) +4 °C'de bir gece inkübe edildikten sonra 1:20 oranında dilüe edilen Flash Phalloidin Red 594 ile 37°C'de 30 dk F-actin boyaması yapıldı. Boyama işlemi sonrası hücreler polilizin kaplı lam üzerine kondu ve üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Mersin Üniversitesi MEİTAM bünyesinde bulunan konfokal mikroskop (Zeiss LSM 700) kullanılarak görüntülendi, görüntülerin işlenmesi ve analizi Zeiss ZEN (2011) programı ile yapıldı (Şekil 15).



Şekil 15. İmmünfloresan görüntülemeye kullanılan konfokal mikroskop ve görüntülerin analizinde kullanılan bilgisayar programına ait görüntüler.

3.6. İstatistik

In vivo ve *in vitro* farklı embriyonik aşamaların NHE, NHE+NDBCE aktivitelerinin karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi kullanıldı, post-hoc olarak Tukey testi uygulandı. *In vivo* ve *in vitro* aynı embriyonik aşamaların değiştirici aktivitelerinin ikili karşılaştırmasında T-testi, analizler için SPSS 22.0 programı kullanıldı. Bulgular Ortalama $\pm$ SEM olarak verildi ve anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alındı. Bulguların sunumu için hazırlanan grafikler ve regresyon analizleri ise SigmaPlot 12.0 programı kullanılarak yapıldı.

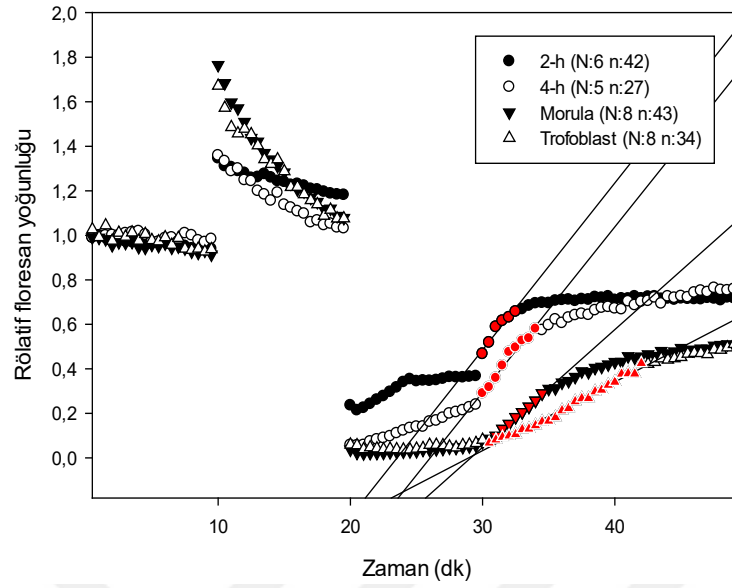


4. BULGULAR

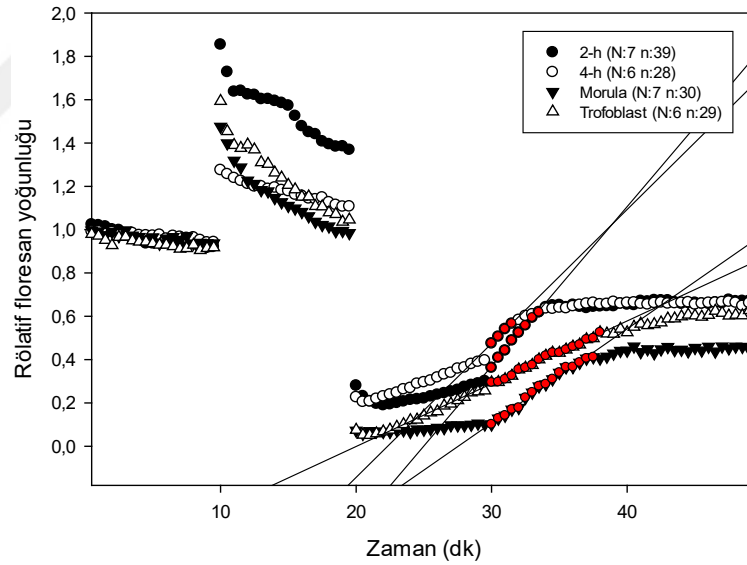
4.1. NHE Aktivitesinin Değerlendirilmesi

In vivo gelişen ve *in vitro* kültürde elde edilen embriyolara NH_4^+ puls yöntemiyle asidoz indüksiyonu yapıldı. 0 Bik. pHKFHM ortamında asidozdan iyileşme yanıtlarının lineer regresyon analiziyle değiştirici aktiviteleri hesaplandı. 0 Bik. pHKFHM ortamında bikarbonata bağlı asidoz defans mekanizması aktif olmadığından alınan iyileşme yanıtları NHE aktivitesini göstermektedir. NHE aktivitesinin saptanması için farklı embriyonik aşamalarda (2-h, 4-h, morula ve trofoblast) toplam 146 *in vivo*, 126 *in vitro* embriyo kullanıldı. Bu embriyolardan elde edilen verilerin ortalamalarıyla oluşturulan asidozdan iyileşme yanıtlarının grafikleri Şekil 16'da sunulmuştur. *In vivo* ve *in vitro* aynı embriyonik aşama embriyoların asidozdan iyileşme yanıtları karşılaştırıldığında tüm aşamalarda *in vivo* ve *in vitro* embriyoların iyileşme yanıtlarının benzer patern gösterdiği saptandı (Şekil 17).

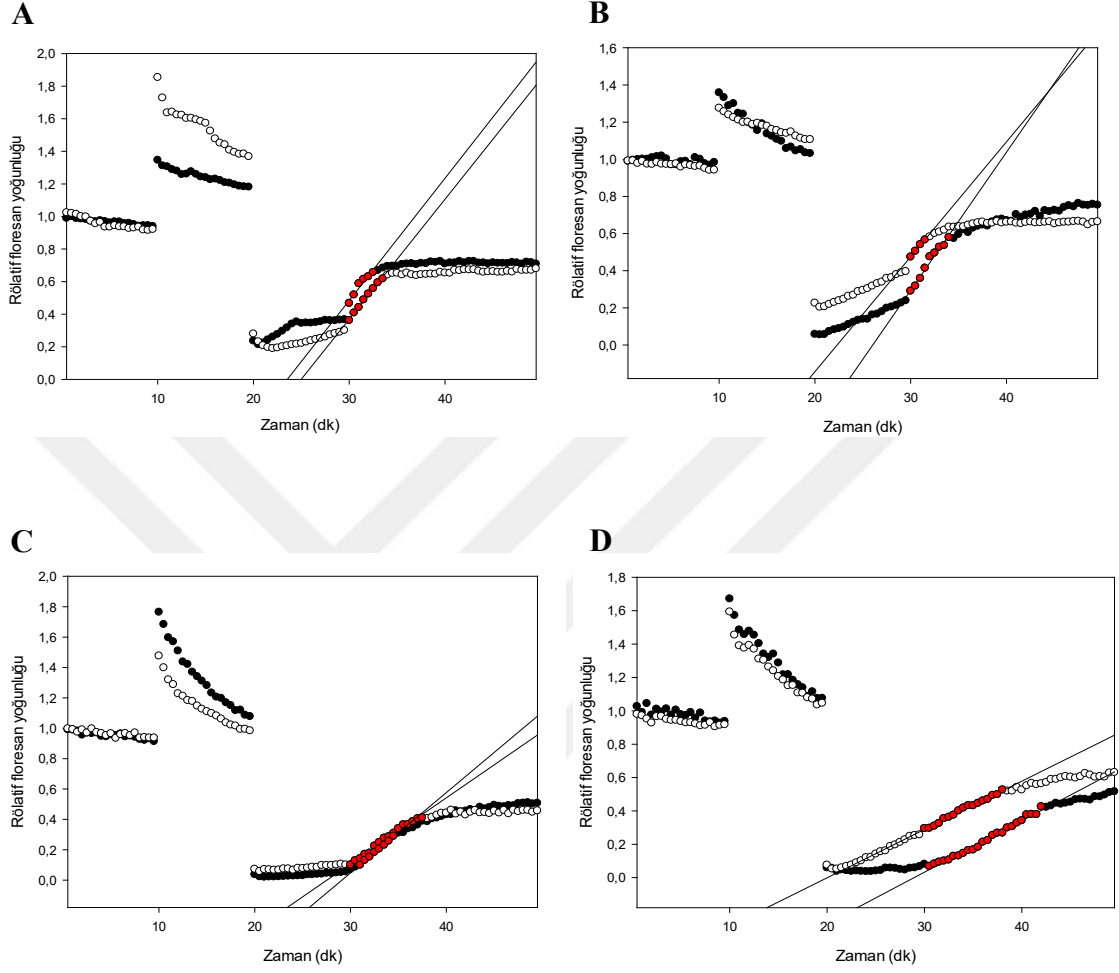
A



B



Şekil 16. *In vivo* (A) ve *in vitro* (B) 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyoların amonyum puls metodu ile asidozdan iyileşme yanıtlarının ortalamaları kullanılarak (kırmızı ile işaretli) hesaplanan NHE aktiviteleri. Başlangıç pH; kaydının yapıldığı 0 Bik. pHKFHM solüsyonu, 10. dakikada NH_4Cl içeren 0 Bik. pHKFHM ile 20.dakikada ise Na^+ içermeyen 0 Bik. pHKFHM ile değiştirilerek asidoz indüksiyonu yapıldı. Kaydın 30. dakikasından itibaren Na^+ içeren 0 Bik. pHKFHM verilerek NHE aktivite kaydı 20 dk boyunca gerçekleştirildi.



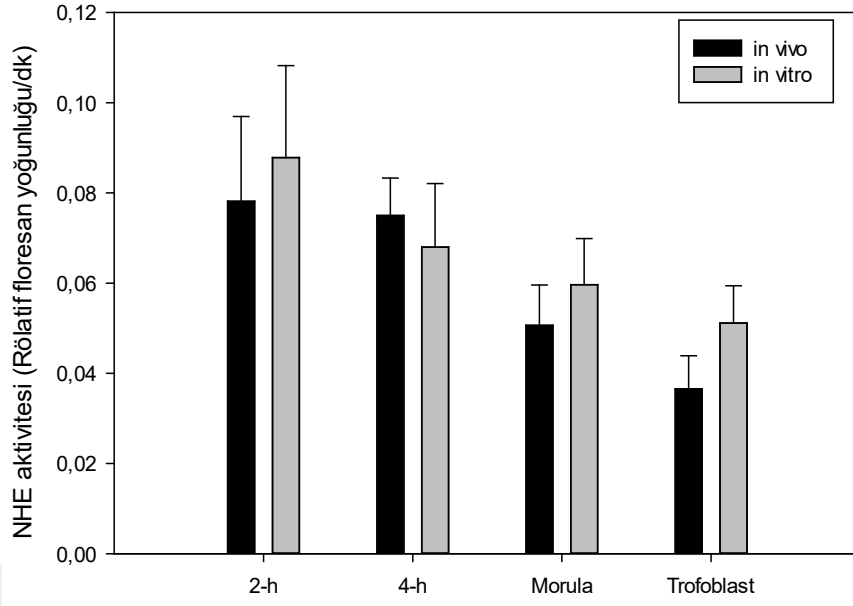
Şekil 17. *In vivo* (•) ve *in vitro* (°) 2-h (A), 4-h (B), morula (C), trofoblast (D) aşama embriyoların asidozdan iyileşme yanıtları

Yapılan istatistiksel analizlerde *in vivo* ve *in vitro* aynı embriyonik aşamalar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. NHE aktivitesi her iki grupta da 2-h embriyonik aşamada yüksek bulundu; *in vivo* 2-h embriyonun NHE aktivitesi trofoblast aşamaya göre anlamlı yüksek bulunurken diğer aşamalar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. *In vitro* 2-h embriyo ile diğer tüm aşama embriyolar arasında anlamlı farklılık bulundu. Tüm grupların NHE aktivitelerinin ortalama $\pm$ SEM değerleri Tablo 3’ de verilmiştir. Tablo 3’teki değerler ile çizilen *in vivo* ve *in vitro* embriyoların NHE aktivite değişimi Şekil 18’te sunulmuştur.

Tablo 3. *In vivo* ve *in vitro* embriyoların 0 Bik. pHKFHM solüsyonunda kaydedilen NHE değiştirici aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).

	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
2-h	0,091 $\pm$ 0,017 N:6 n:42	0,122 $\pm$ 0,018 N:7 n:39
4-h	0,075 $\pm$ 0,008 N:5 n:27	0,068 $\pm$ 0,014 ^a N:6 n:28
Morula	0,051 $\pm$ 0,010 N:8 n:43	0,058 $\pm$ 0,009 ^a N:7 n:30
Trofoblast	0,039 $\pm$ 0,007* N:8 n:34	0,050 $\pm$ 0,003 ^a N:6 n:29

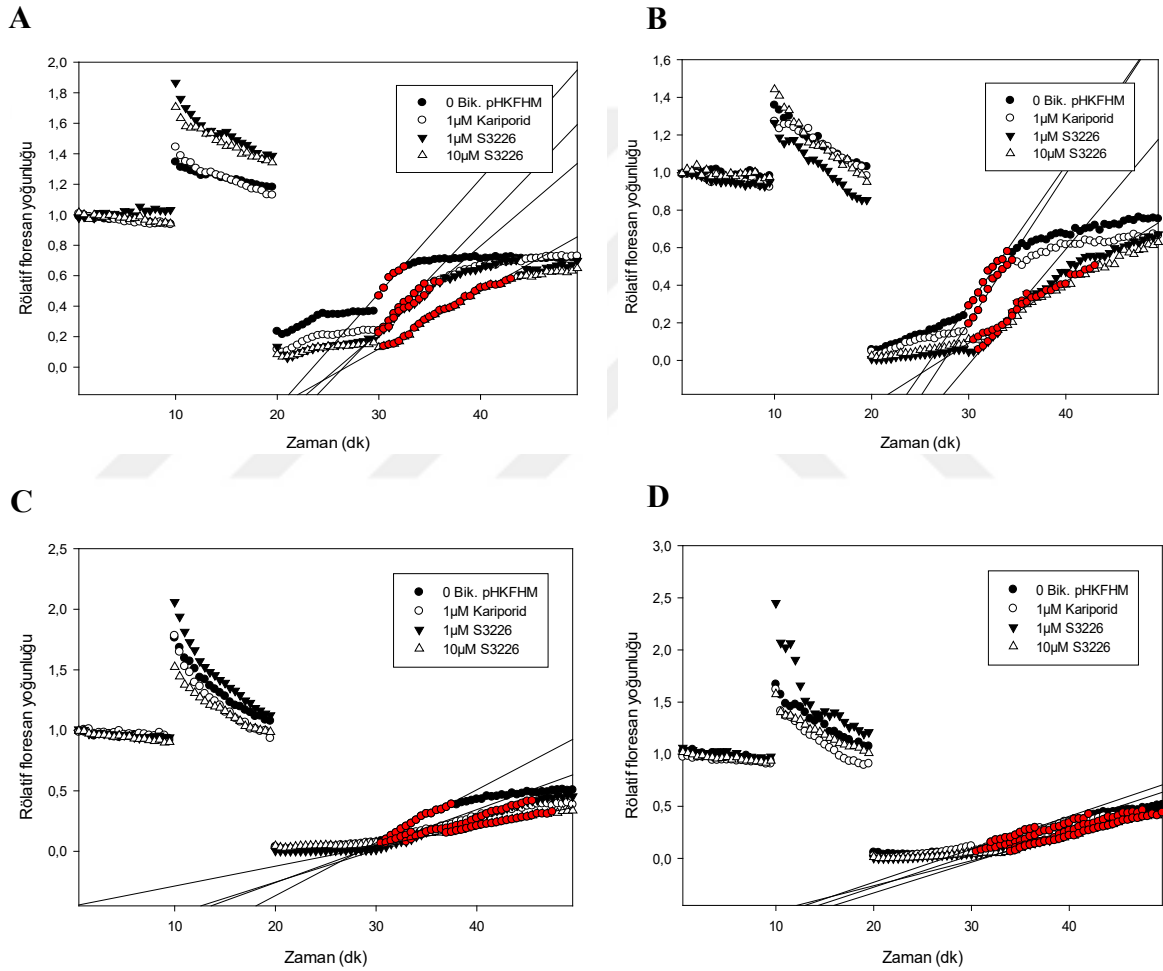
*, *in vivo* 2-h embriyo değerine göre anlamlı farklılık (p<0,05).
a, *in vitro* 2-h embriyo değerine göre anlamlı farklılık (p<0,05).
N: Kullanılan fare sayısı, n: kullanılan embriyo sayısı



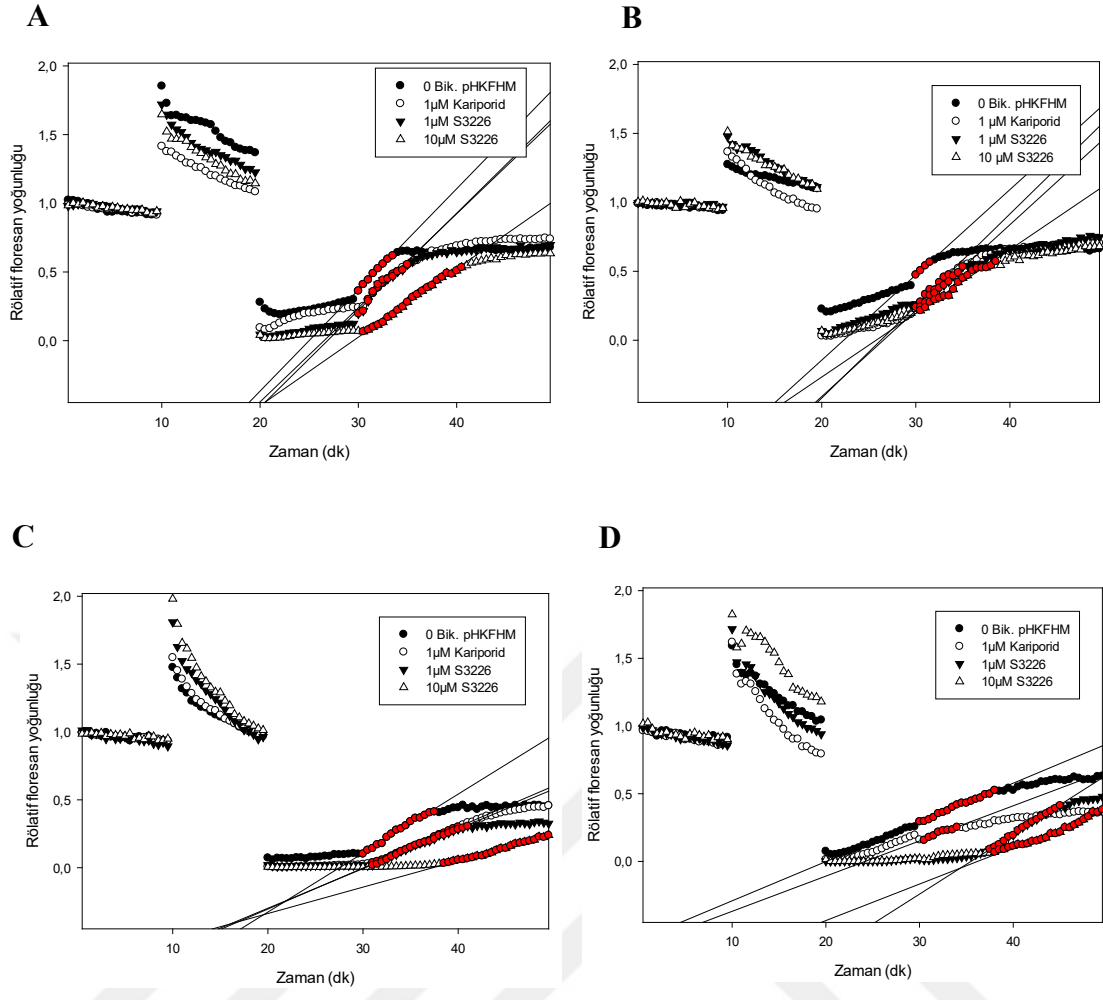
Şekil 18. *In vivo* ve *in vitro* 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamadaki embriyoların NHE aktivitelerinin karşılaştırılması. Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

4.2. NHE İsoformlarının Değerlendirilmesi

Farklı embriyonik aşamalarda NHE isoformlarının asidozdan iyileşmeye olan katkılarını değerlendirebilmek için 0 Bik. pHKFHM ortamında alınan kayıtlarda spesifik inhibitörler kullanıldı; NHE1 inhibisyonu için 1 μ M Kariporid, NHE3 inhibisyonu için 1 μ M S3226 ve NHE1 ve 3 isoformlarının inhibisyonu için ise 10 μ M S3226 kullanıldı^(12, 61). 0 Bik. pHKFHM ve inhibitör eklenmiş solüsyonlarda alınan iyileşme yanıtları Şekil 19 ve 20’de sunulmuştur.



Şekil 19. *In vivo* 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen Kariporid ve S3226 dozlarının eklenmesi ile saptanan asidozdan iyileşme yanıtları.



Şekil 20. *In vitro* 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen Kariporid ve S3226 dozlarının eklenmesi ile saptanan asidozdan iyileşme yanıtları.

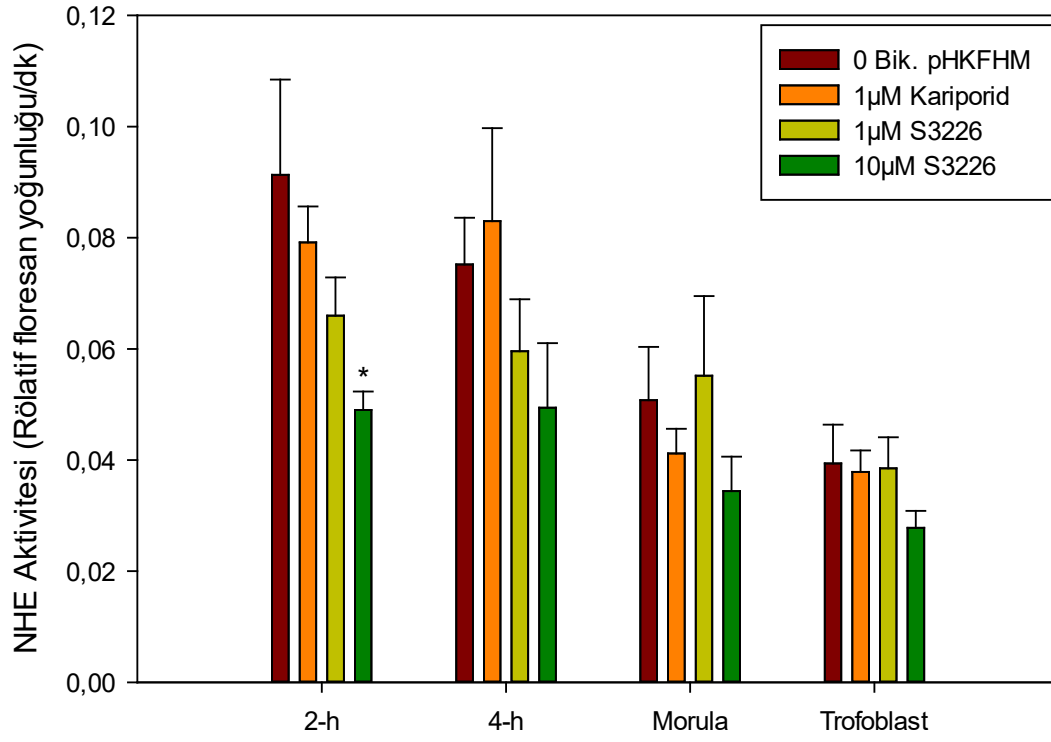
In vivo elde edilen 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyolarda NHE1 ve 3 isoformlarının tek başına inhibe edilmesi iyileşme yanıtında anlamlı bir baskılanmaya neden olmadı. NHE1 ve 3 isoformlarının birlikte inhibe edilmesi 2-h aşamada iyileşme yanıtını baskıladı ($p=0,053$), diğer aşamalarda iyileşme hızını azaltsa da anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 4, Şekil 21).

Tablo 4. *In vivo* embriyoların 0 Bik. pHKFHM solüsyonunda ve spesifik inhibitör eklendiği durumlarda alınan NHE aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).

	0 Bik. pHKFHM	1 μM Kariporid	1 μM S3226	10 μM S3226
2-h	0,091 $\pm$ 0,017 N:6 n:42	0,079 $\pm$ 0,007 N:6 n:32	0,066 $\pm$ 0,007 N:5 n:32	0,049 $\pm$ 0,003*
4-h	0,075 $\pm$ 0,008 N:5 n:27	0,083 $\pm$ 0,017 N:6 n:19	0,060 $\pm$ 0,009 N:5 n:15	0,049 $\pm$ 0,012 N:5 n:13
Morula	0,051 $\pm$ 0,010 N:8 n:43	0,041 $\pm$ 0,004 N:6 n:25	0,043 $\pm$ 0,010 N:5 n:14	0,034 $\pm$ 0,006 N:5 n:13
Trofoblast	0,039 $\pm$ 0,007 N:8 n:34	0,038 $\pm$ 0,004 N:7 n:34	0,039 $\pm$ 0,006 N:6 n:23	0,028 $\pm$ 0,003 N:5 n:21

N: Kullanılan fare sayısı, **n:** kullanılan embriyo sayısı.

***;** Aynı aşama 0 Bik. pHKFHM değerine göre farklılık ($p=0,053$).



Şekil 21. *In vivo* 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen konsantrasyonlarda Kariporid ve S3226 eklenmesi ile saptanan NHE aktiviteleri. *; 0 Bik. pHKFHM 2-h embriyo değerine göre farklılık ($p=0,053$).

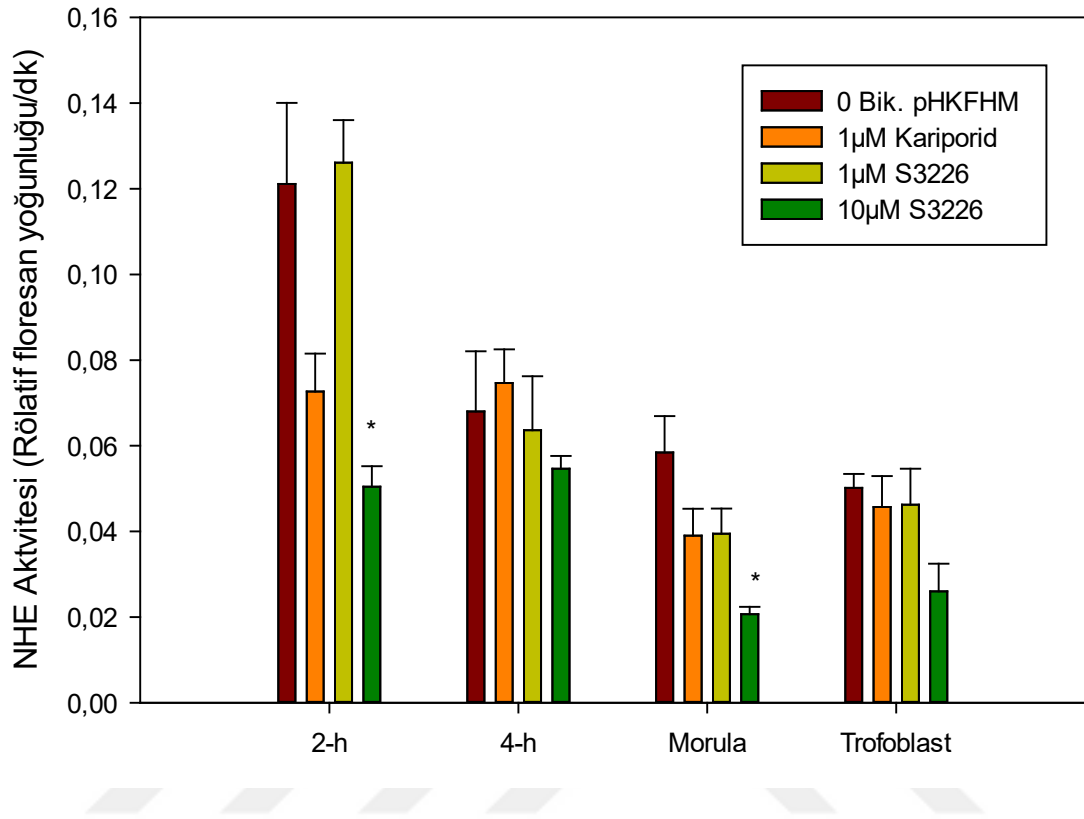
In vitro embriyolarda da *in vivo* embriyolara benzer şekilde NHE1 ve NHE3 isoformlarının tek başlarına inhibe edilmesi 0 Bik. pHKFHM ortamında kayıtlanan iyileşme yanıtına göre anlamlı baskılanmaya neden olmadı. NHE1 ve 3 isoformlarının birlikte inhibe edilmesi, 2-h embriyo ve morula aşamalarında iyileşme yanıtını anlamlı şekilde baskıladı (Tablo 5, Şekil 22).

Tablo 5. *In vitro* embriyoların 0 Bik. pHKFHM solüsyonunda ve bu solüsyona spesifik inhibitör eklendiği durumlarda alınan NHE aktiviteleri (Ort ± SEM).

	0 Bik. pHKFHM	1 µM Kariporid	1 µM S3226	10 µM S3226
2-h	0,122 ± 0,018 N:7 n:39	0,073 ± 0,009 N:6 n:32	0,126 ± 0,010 N:8 n:38	0,050 ± 0,005* N:5 n:23
4-h	0,068 ± 0,014 N:6 n:28	0,075 ± 0,008 N:6 n:25	0,064 ± 0,013 N:5 n:17	0,055 ± 0,003 N:5 n:23
Morula	0,058 ± 0,009 N:7 n:30	0,039 ± 0,006 N:6 n:38	0,039 ± 0,006 N:7 n:23	0,021 ± 0,002* N:6 n:14
Trofoblast	0,050 ± 0,003 N:6 n:29	0,046 ± 0,007 N:6 n:34	0,046 ± 0,008 N:5 n:16	0,026 ± 0,007 N:4 n:11

*; Aynı aşama 0 Bik. pHKFHM değerine göre farklılık (p<0,05).

N: Kullanılan fare sayısı, n: kullanılan embriyo sayısı.

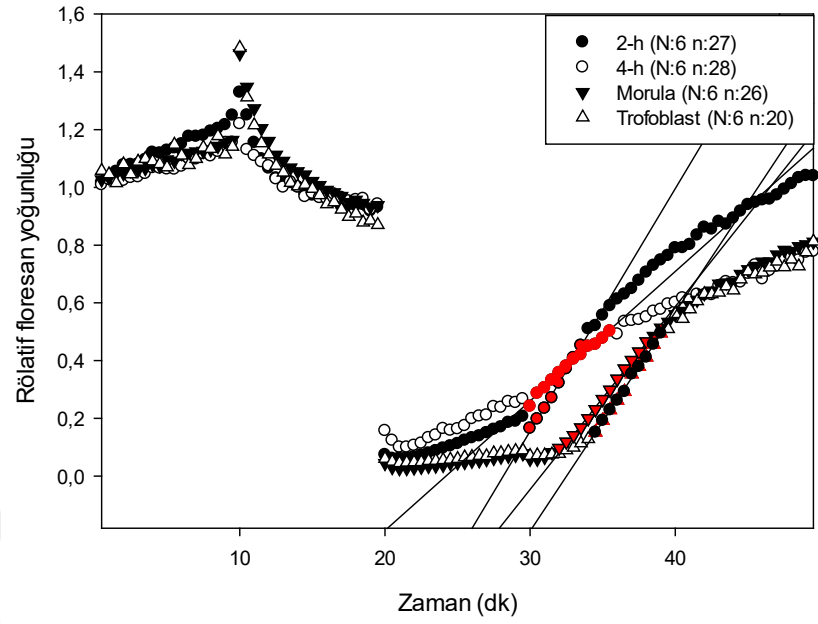
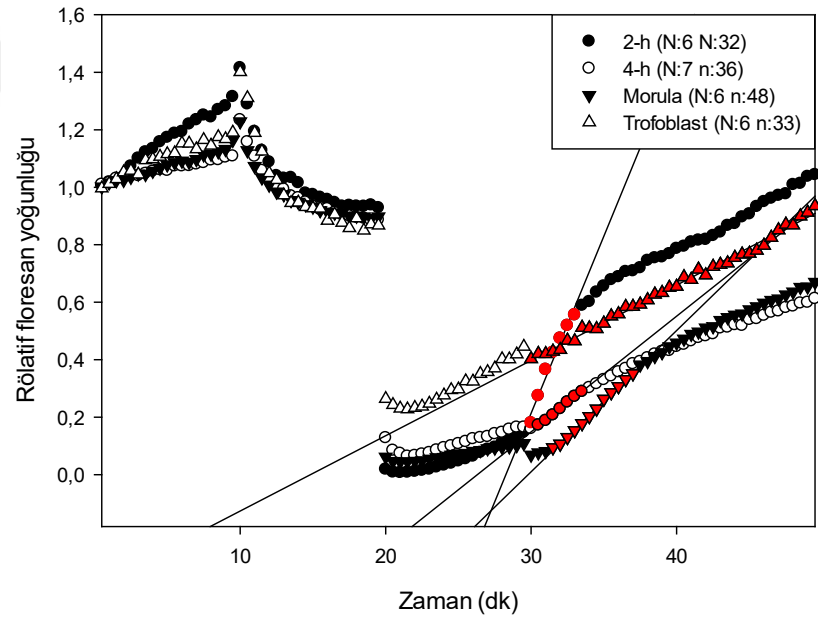


Şekil 22. *In vitro* 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamalarındaki embriyoların final 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna, belirtilen konsantrasyonlarda Kariporid ve S3226 eklenmesi ile saptanan NHE aktiviteleri.

*; aynı aşama 0 Bik. pHKFHM değerine göre anlamlı farklılık ($p<0,05$).

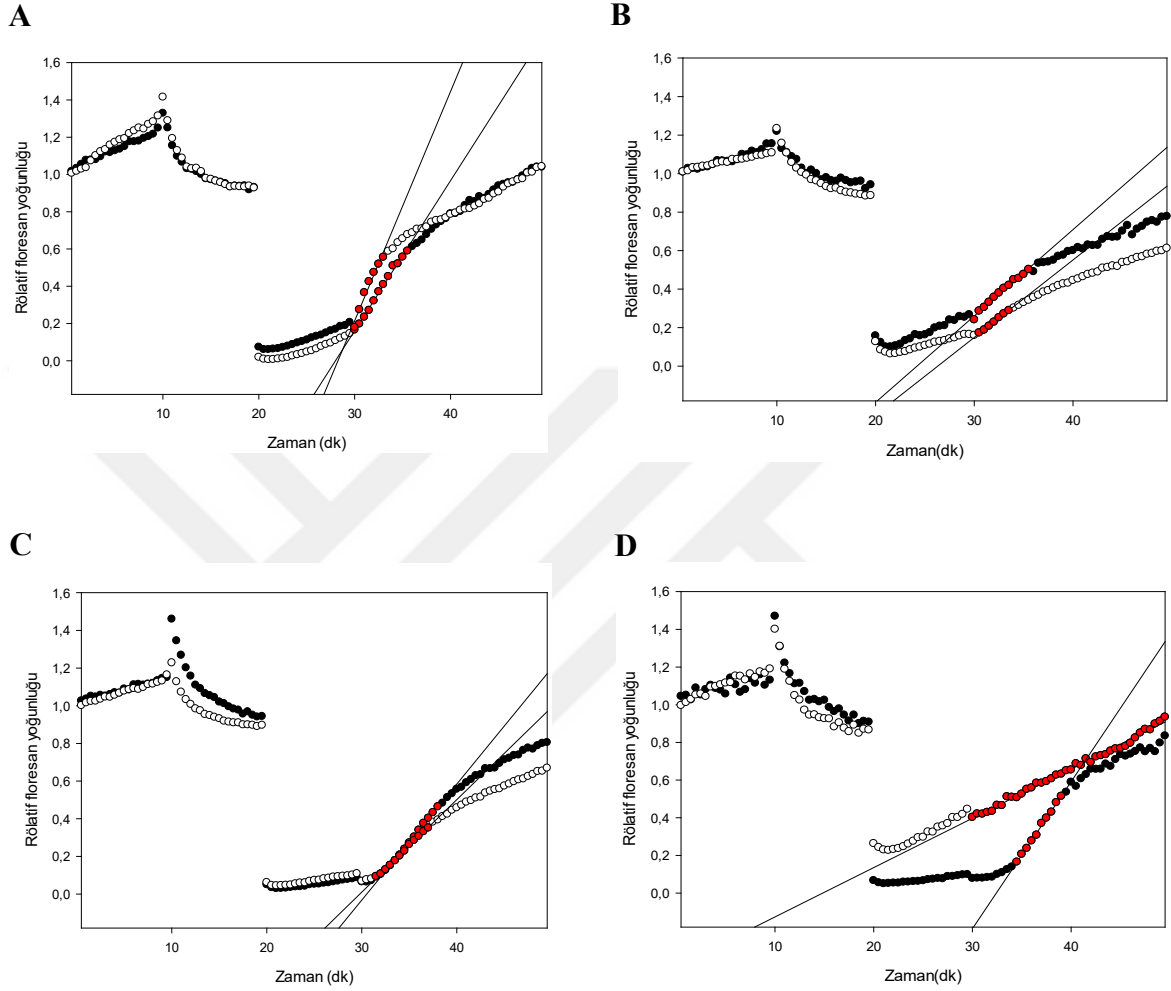
4.3. pHKSOM Ortamında Alınan Asidozdan İyileşme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

0 Bik. pHKFHM solüsyonunda bikarbonat değiştiricileri inaktif olduğu için alınan iyileşme yanıtları NHE aktivitesini yansıtır. Bikarbonat içeren pHKSOM solüsyonunda alınan iyileşme yanıtları ise asidoz defansında etkili olabilecek değiştirici aktivitelerinin (NHE ve NDBCE) toplamını gösterir. Bu ortamda etkili olabilecek değiştirici aktivitelerinin saptanması için 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyolara NH_4Cl -pHKSOM solüsyonuyla asidoz indüksiyonu yapıldı. Farklı embriyonik aşamalarda toplam 101 *in vivo* ve 149 *in vitro* embriyonun iyileşme yanıtları kaydedildi. Embriyoların asidozdan iyileşme yanıtının lineer regresyon analizi ile değiştirici aktiviteleri hesaplandı. *In vivo* (A) ve *in vitro* (B) tüm embriyonik aşamaların iyileşme yanıtlarının ortalamaları ile oluşturulan karşılaştırmalı grafikler Şekil 23’ de sunulmuştur.

A**B**

Şekil 23. *In vivo* (A) ve *in vitro* (B) 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamadaki embriyolarda amonyum puls metodu ile asidozdan iyileşme yanıtlarının ortalamaları kullanılarak (kırmızı ile işaretli) hesaplanan değiştirici aktiviteleri. Başlangıç kaydının yapıldığı pHKSOM solüsyonu, 10. dakikada NH_4Cl içeren pHKSOM ile 20.dakikada ise Na^+ içermeyen pHKSOM ile değiştirilerek asidoz indüksiyonu yapıldı. Kaydın 30. dakikasından itibaren Na^+ içeren pHKSOM verilerek değiştirici aktivite kaydı 20 dk. boyunca gerçekleştirildi.

Aynı embriyonik aşamalarda *in vivo* ve *in vitro* embriyoların iyileşme yanıtları ve regresyon eğrileri trofoblast dışındaki tüm embriyonik aşamalarda benzer patern gösterdi (Şekil 24).



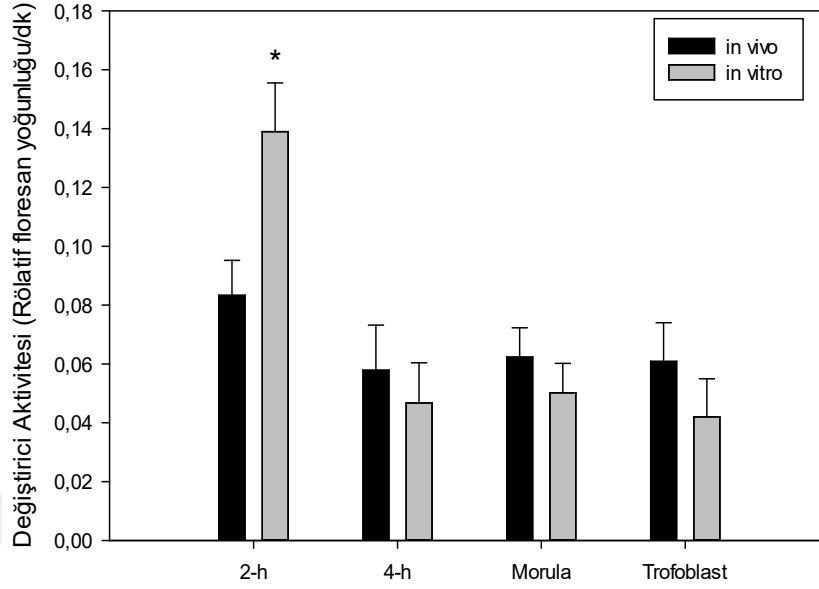
Şekil 24. pHKSOM solüsyonunda *in vivo* (●) ve *in vitro* (○) 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların asidozdan iyileşme yanıtları.

Yapılan istatistiksel analizlerde *in vivo* elde edilen embriyoların değiştirici aktiviteleri karşılaştırıldığında farklı embriyonik aşamalar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. *In vitro* 2-h embriyonik aşamada değiştirici aktivitesi, 4-h embriyo, morula ve trofoblast aşamalara göre anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0,05$). Aynı aşamadaki *in vivo* ve *in vitro* embriyoların değiştirici aktiviteleri karşılaştırıldığında 4-h embriyo, morula ve trofoblast aşamalarda anlamlı farklılık görölmezken, *in vitro* 2-h embriyonun değiştirici aktivitesi *in vivo* 2-h embriyonun değerine göre anlamlı yükseklik gösterdi (Tablo 6). Tablo 6'daki değerler ile çizilen *in vivo* ve *in vitro* embriyoların asidozdan iyileşme hızları şekil 25'te sunulmuştur.

Tablo 6. *In vivo* ve *in vitro* 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyoların pHKSOM ortamında elde edilen değiştirici aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).

	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
2-h	0,083 $\pm$ 0,012* N:6 n:27	0,139 $\pm$ 0,017 N:6 n:32
4-h	0,058 $\pm$ 0,015 N:6 n:28	0,046 $\pm$ 0,014* N:7 n:36
Morula	0,062 $\pm$ 0,010 N:6 n:26	0,050 $\pm$ 0,010* N:6 n:48
Trofoblast	0,061 $\pm$ 0,013 N:6 n:20	0,042 $\pm$ 0,013* N:6 n:33

*, *in vitro* 2-h embriyo değerine göre anlamlı farklılık ($p<0,05$).
N: Kullanılan fare sayısı, n: kullanılan embriyo sayısı



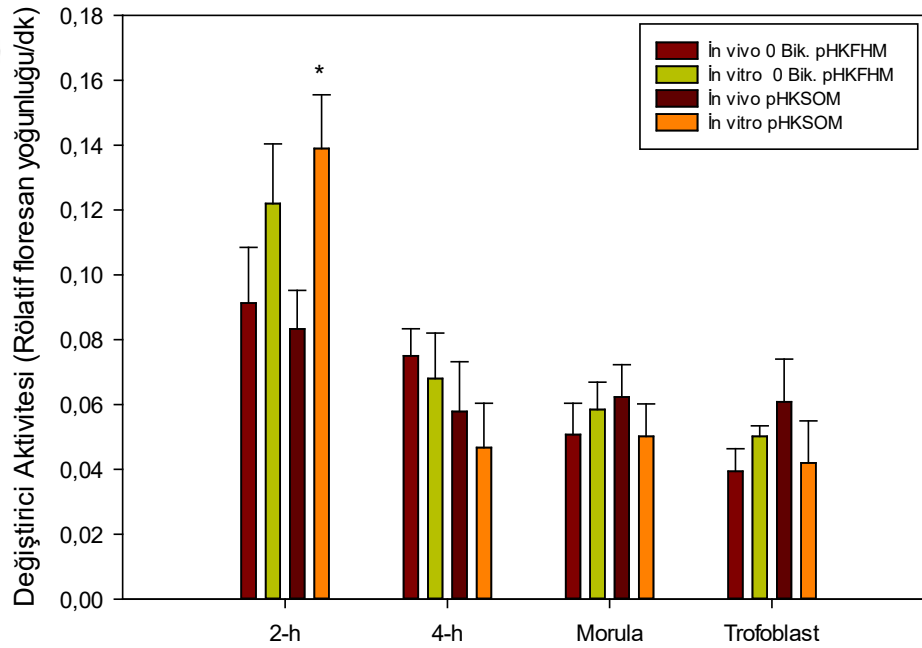
Şekil 25. *In vivo* ve *in vitro* 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamadaki embriyoların değiştirici aktivitelerinin karşılaştırılması. *; *in vivo* 2-h embriyo değerine göre anlamlı farklılık ($p<0,05$).

Embriyoları asidoza karşı koruyan değiştiricilerin aktivitelerini değerlendirebilmek için bikorbonat içeren (pHKSOM) ve içermeyen (0 Bik. pHKFHM) ortamlar kullanıldı. *In vivo* ve *in vitro* aynı aşama embriyoların pHKSOM ortamında saptanan total değiştirici aktiviteleri ile 0 Bik. pHKFHM ortamında saptanan NHE aktiviteleri arasında, 2-h embriyo dışındaki aşamalarda, anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 7, Şekil 26). 0 Bik pHKFHM ve pHKSOM ortamlarında hesaplanan dinlenim floresan yoğunluğu ile final floresan yoğunluğu arasındaki farklar (ΔF) ile çizilen grafik Şekil 27’de gösterilmiştir. *In vivo* 4-h hariç tüm aşamalarda ve *in vitro* 2-h ile morula aşamalarında 0 Bik. pHKFHM solüsyonunda hesaplanan ΔF değeri pHKSOM solüsyonuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$).

Tablo 7. *In vivo* ve *in vitro* elde edilen embriyoların pHKSOM ve 0 Bik. pHKFHM ortamlarında elde edilen değiştirici aktiviteleri (Ort $\pm$ SEM).

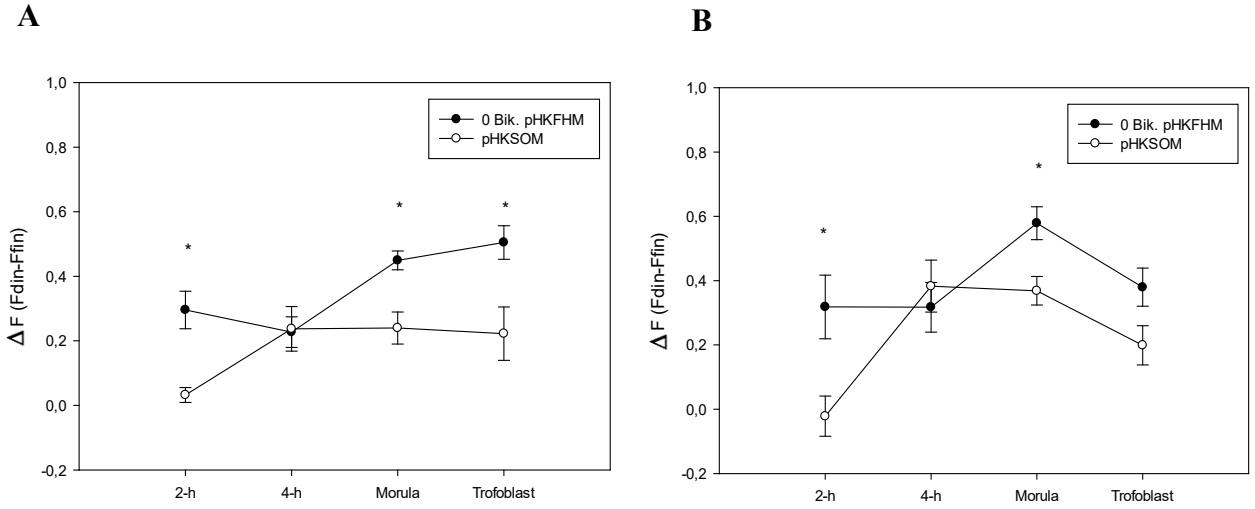
	pHKSOM		0 Bik. pHKFHM	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
2-h	0,083 $\pm$ 0,012 N:6 n:27	0,139 $\pm$ 0,017* N:6 n:32	0,091 $\pm$ 0,017 N:6 n:42	0,121 $\pm$ 0,019 N:7 n:39
4-h	0,058 $\pm$ 0,015 N:6 n:28	0,046 $\pm$ 0,014 N:7 n:36	0,075 $\pm$ 0,008 N:5 n:27	0,068 $\pm$ 0,014 N:6 n:28
Morula	0,062 $\pm$ 0,010 N:6 n:26	0,050 $\pm$ 0,010 N:6 n:48	0,051 $\pm$ 0,010 N:8 n:43	0,058 $\pm$ 0,009 N:7 n:30
Trofoblast	0,061 $\pm$ 0,013 N:6 n:20	0,042 $\pm$ 0,013 N:6 n:33	0,039 $\pm$,007 N:8 n:34	0,050 $\pm$ 0,003 N:6 n:29

N: Kullanılan fare sayısı, n: kullanılan embriyo sayısı
*; pHKSOM solüsyonunda kaydedilen *in vivo* 2-h değerine göre anlamlı farklılık (p<0,05).



Şekil 26. *In vivo* ve *in vitro* elde edilen embriyoların pHKSOM ve 0 Bik. pHKFHM ortamında saptanan değiştirici aktiviteleri.

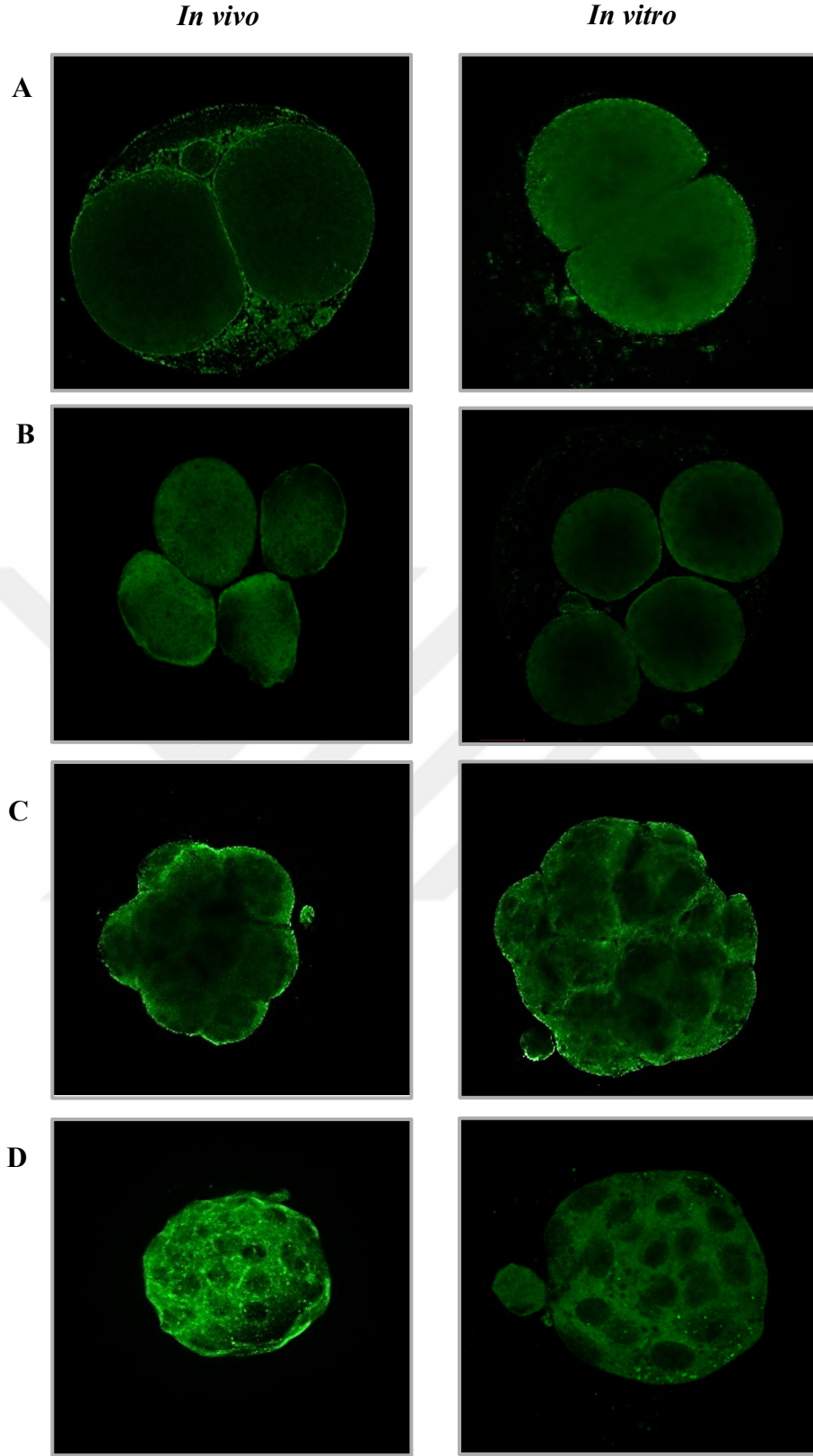
*; *in vivo* pHKSOM 2-h değerine göre anlamlı farklılık.



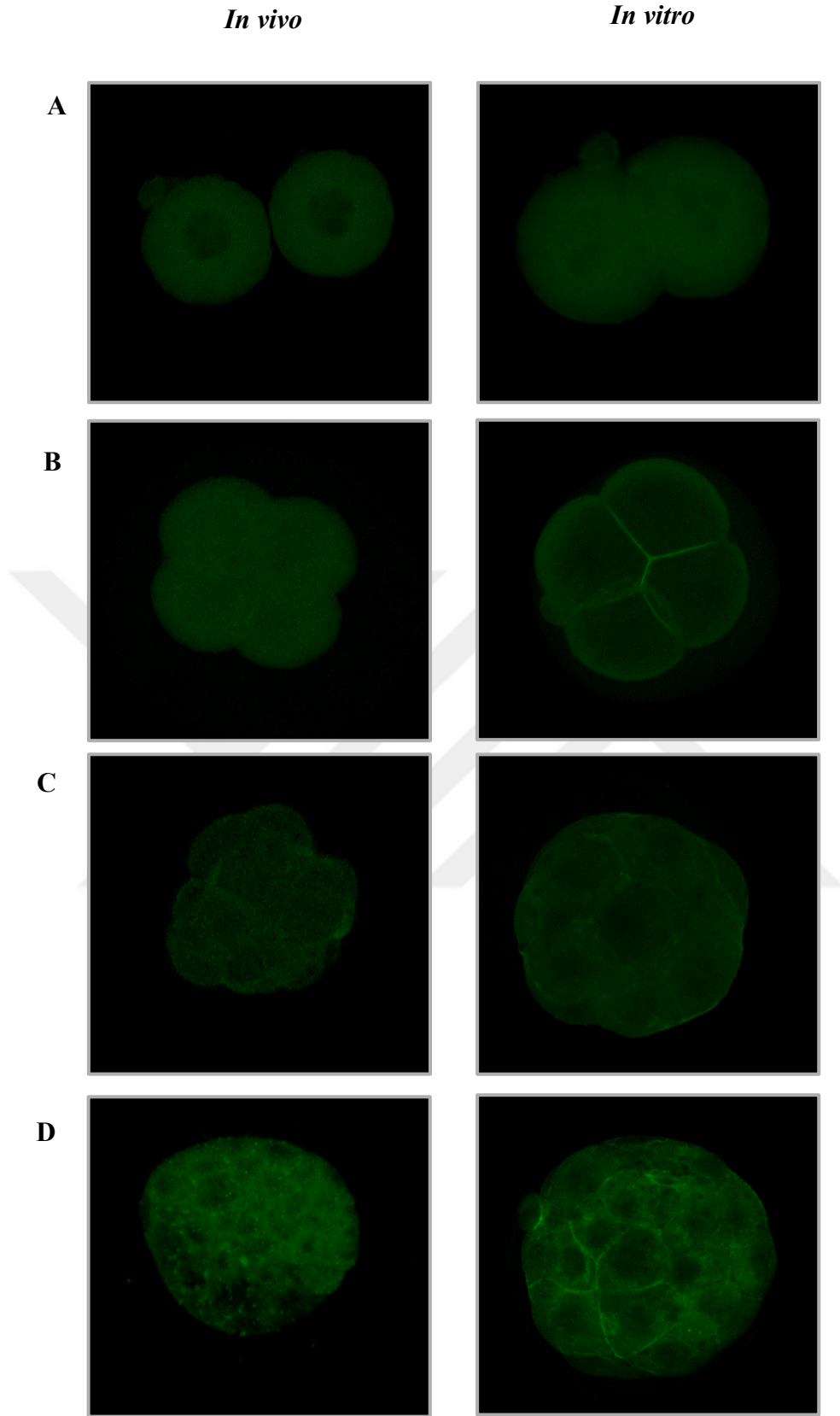
Şekil 27. *In vivo* (A) ve *in vitro* (B) embriyoların pHKSOM ve 0 Bik. pHKFHM solüsyonlarında asidozdan iyileşme kayıtlarında dinlenim floresansı ile final floresansı arasındaki farklar, ΔF .
 *; Aynı aşama pHKSOM değerine göre anlamlı farklılık ($p < 0,05$).

4.4. İmmünfloresan ile İyon Değiştiricilerin Görüntülenmesi

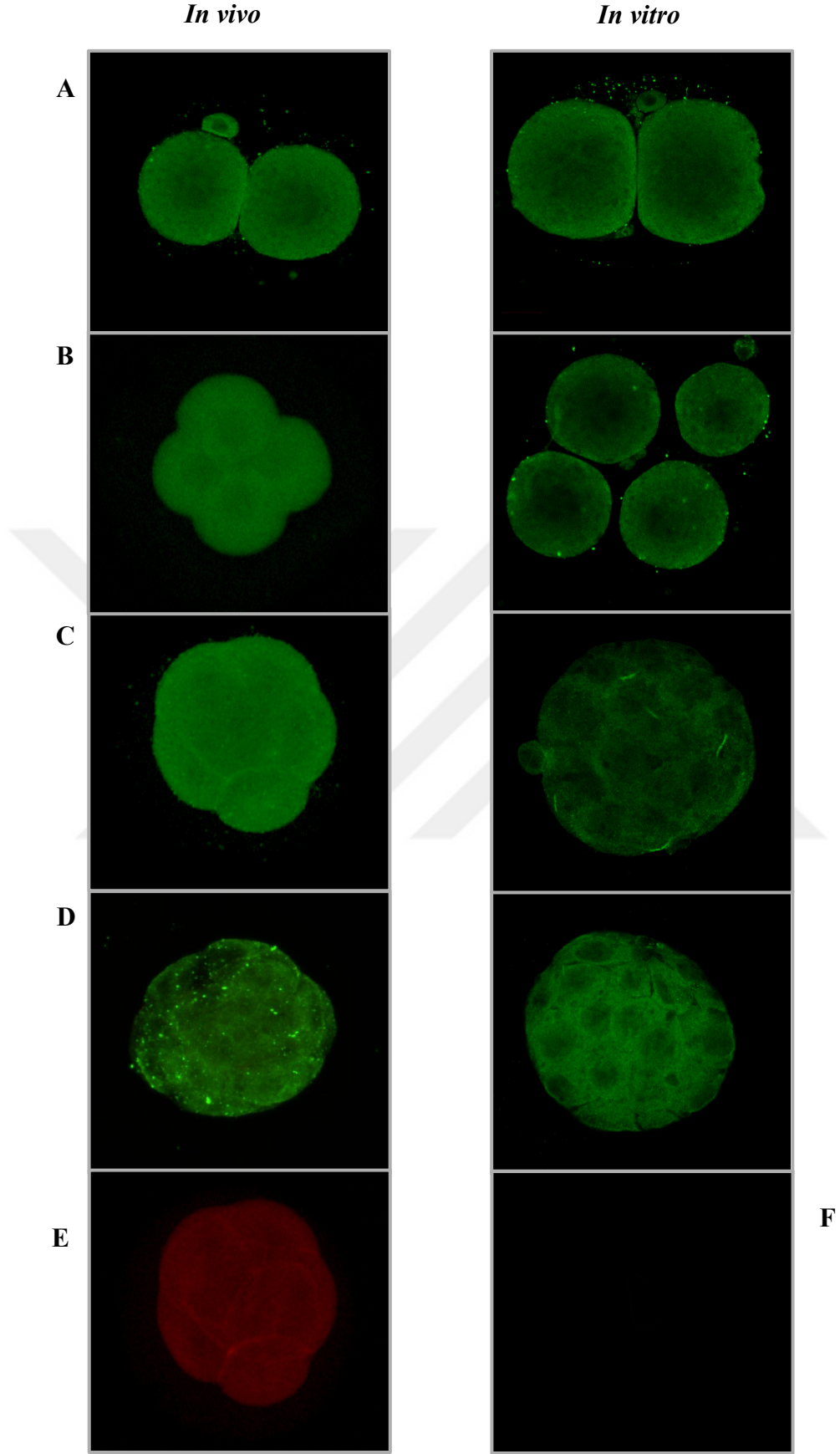
Tüm embriyonik aşamalarda fiksasyon ve bloklama işlemi sonrası *in vivo* ve *in vitro* farklı embriyonik aşamalarda ayrı ayrı olmak üzere NHE1, NHE3 ve NDBCE primer antikorları ve florofor işaretli sekonder antikor ile indirekt immünfloresan boyama işlemi yapıldı. Tüm antikor gruplarında *in vivo* ve *in vitro* aynı embriyonik aşamaların emisyon yanıtı benzerlik gösterdi (Şekil 28-30), ancak yapılan kalitatif incelemede NHE1 antikorlarıyla elde edilen görüntülerin floresan yoğunluğu NHE3 floresan yanıtına göre daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 28 vs 29).



Şekil 28. *In vivo* gelişen ve *in vitro* kültürde elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların konfokal mikroskop ile kaydedilen NHE1 immünfloresan görüntüleri.



Şekil 29. *In vivo* gelişen ve *in vitro* kültürde elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların konfokal mikroskop ile kaydedilen NHE3 immünfloresan görüntüleri.



Şekil 30. *In vivo* gelişen ve *in vitro* kültürde elde edilen 2-h (A), 4-h (B), morula (C) ve trofoblast (D) aşama embriyoların konfokal mikroskop ile kaydedilen NDBCE immünfloresan görüntüleri. Tüm boyama işlemleri için yapılan pozitif kontrol F-aktin boyanması (E) ve primer kullanılmadan yapılan negatif kontrol (F) görüntüleri.

5. TARTIŞMA

5.1. *In vivo* ve *In vitro* Embriyonik Gelişim Aşamalarında NHE Aktivitesi

Asidozdan iyileşmede ana düzenleyici mekanizma olan NHE aktivitesi, *in vivo* ve *in vitro* aynı aşama embriyolar arasında anlamlı farklılık göstermedi (Tablo 3, Şekil 17). *In vivo* elde edilen 2-h aşama embriyoların iyileşme yanıtı yalnızca trofoblast aşamaya göre yüksek bulunurken *in vitro* 2-h aşama embriyoların NHE aktivitesi diğer tüm aşamalara göre anlamlı yükseklik gösterdi (Tablo 3). *In vivo* gelişen embriyolar üzerinde yapılan önceki çalışmamızda NHE aktivitesi, benzer şekilde, PN zigot ve 2-h aşamada yüksek olmakla birlikte 4-h, morula ve trofoblast aşama embriyo değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştı⁽¹²⁾. Aynı fare soyuyla yapılan bir başka çalışmada mayotik matürasyon sürecinde NHE aktivitesinin germinal vezikül (GV) aşama oosit düzeyinde yüksek iken MII aşamada baskılandığı fertilizasyon sonrası PN zigot aşamada tekrar yükseldiği gösterilmiştir⁽¹¹⁾. Mayotik matürasyon sürecinde CF-1 soyu fareler ile yapılan çalışmalarda da NHE aktivitesinde benzer şekilde değişimler olduğu gösterilmiştir^(13, 14). Çalışmamızla uyumlu olarak farklı fare soylarında 2-h aşamada asidozdan iyileşmede NHE aktivitesinin yüksek olduğu rapor edilmiştir^(63, 64). Fare çalışmaları dışında sığır, hamster ve insan embriyolarında da PN zigot ve 2-h embriyonik aşamada saptanan NHE aktivitesinin matür oositlere göre anlamlı yüksek olduğu ortaya konmuştur^(6, 65, 66).

Mayotik matürasyon sürecindeki GV aşama oositler transkripsiyonel ve translasyonel olarak aktiftir. İkinci mayozun profazında duraklayan oositlerde RNA transkripsiyonu durur ve protein sentezi azalır⁽³¹⁾. Fertilizasyonla birlikte maternal zigotik geçiş (maternal to zygotic transition) olarak adlandırılan süreç başlar. Bu süreçte oosite özgü transkriptler parçalanır, zigotik transkriptler oluşur. Zigotik transkriptlerin aktivasyonu büyük oranda 2-h aşamada gerçekleşir^(31, 67, 68). 2-h embriyonik aşamada transkripsiyonu artan genlerin, temel hücrel mekanizmalarla ilişkili olduğu gösterilmiştir⁽³¹⁾. Bu bilgiler ışığında, yukarıda belirtilen NHE aktivite değişiminin mayotik matürasyon sürecindeki transkripsiyon paterni ile uyumlu olduğu ve fertilizasyon sonrası artan ve 2-h aşamada en yüksek düzeye ulaşan NHE aktivitesinin zigotik genom aktivasyonuna bağlı transkripsiyon artışı ile ilişkili olabileceği sonucuna varılabilir. Bu çalışmayla da ortaya konan NHE aktivitesinin *in vivo* ve *in vitro* 2-h

embriyolarda yüksek olması ve aralarında farklılık görülmemesi *in vitro* kültür ortamının embriyoların genomik aktivasyonu üzerinde olumsuz etki oluşturmadığına işaret etmektedir. Öte yandan alkaloz defans mekanizması olan AE aktivitesinin 2-h aşamada yüksek iken embriyonik gelişim aşamalarında giderek azaldığı⁽⁹⁾, *in vivo* ve *in vitro* karşılaştırmalarda da benzer sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir⁽⁶⁹⁾. Bu çalışmada elde edilen asidoz defans mekanizmasının ana bileşeni olan NHE aktivitesinin 2-h embriyolarda daha fazla olmak üzere *in vivo* tüm embriyonik aşamalarda yüksek olarak saptanması ve *in vitro* gelişen embriyolarda da anlamlı farklılık görülmemesi özellikle trofoblast aşamada artan metabolik aktiviteye bağlı oluşan asit yüke^(70, 71) karşı defans mekanizmasının *in vitro* koşullarda da çalıştığını göstermektedir.

5.2. NHE İsoformlarının Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Slc9a gen ailesinin üyeleri olan NHE proteinleri 1 Na⁺ iyonunun hücre içine alınmasına karşılık 1 H⁺ iyonunu hücre dışına gönderen elektronötral değişiricilerdir. NHE1-5 isoformları plazma membranında bulunur. Hücre içi pH belirli bir eşik değerin altına düştüğünde aktive olurlar ve pH_i'nin dar bir aralıkta tutulmasını sağlarlar^(15, 16). Spesifik inhibitörler kullanılarak NHE isoform aktiviteleri baskılanabilmektedir^(12, 61, 62). Bu çalışmada da NHE isoformlarının asidozdan iyileşmeye katkılarını değerlendirmek amacıyla kayıtların finalinde kullanılan Na⁺ içeren 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna spesifik inhibitörler eklendi. NHE1 inhibisyonu için 1 µM karpodid, NHE3 inhibisyonu için 1 µM S3226, NHE1 ve 3 inhibisyonu için ise 10 µM S3226 kullanıldı⁽⁶¹⁾. *In vivo* ve *in vitro* tüm aşamalarda NHE1 ve 3 isoformlarının tek başlarına inhibe edilmesi iyileşme yanıtında anlamlı baskılanmaya neden olmadı. NHE1 ve 3 isoformlarının birlikte inhibe edilmesiyle *in vivo* 2-h aşama embriyolarda baskılanma anlamlılık sınırında farklılık gösterdi (p=0,053) (Şekil 21). *In vitro* 2-h ve morula aşamalarındaki embriyoların iyileşme yanıtı ise anlamlı derecede baskılandı (p<0,05) (Şekil 22). Fonksiyonel değerlendirmeye ek olarak immünfloresan yöntem ile *in vivo* ve *in vitro* tüm embriyonik aşamalarda NHE1 ve 3 isoformlarının varlığı gösterildi (Şekil 28-29). Laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada trofoblast aşamada asidozdan iyileşme yanıtı 1 µM karpodid ve 10 µM S3226 ile anlamlı baskılanma gösterirken PN zigot ve 2-h aşamalarda yalnızca

10 μ M S3226 ile anlamlı baskılanma görüldü, 4-h ve morula aşama embriyolarda ise kariporid ve S3226 ile anlamlı baskılanma görülmedi⁽¹²⁾. Laboratuvarımızda yapılan bu fonksiyonel ve moleküler araştırma sonucunda, trofoblast dışındaki embriyonik aşamalarda NHE1 ve 3'ün baskın isoform olduğu, trofoblast aşamasında ise NHE3'ün saptanmadığı NHE1 ve 5 isoformlarının bulunduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, fertilize olmamış CF-1 soyu farelerden elde edilen oositlerde NHE1 ve 3 isoformlarının ekspresyonu gösterilirken fertilizasyon sonrası yalnızca NHE1 ekspresyonunu bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte aynı çalışmada trofoblast aşama embriyolarda immünohistokimyasal yöntem ile NHE1 isoformunun bazolateral membranda ve NHE3 izoformunun ise apikal membranda lokalize olduğu gösterilmiştir⁽⁷²⁾. Bir diğer çalışmada Quackenbush Swiss soyu farelerin oosit, PN ve 2-h aşamalarında, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, NHE1 ve 3 isoformlarının gösterildiği ancak trofoblast aşama embriyolarda NHE3 aktivitesinin olmadığı belirtilmiştir⁽¹⁷⁾. Siyanov ve Baltz tarafından rapor edilen ve CF1 fare oosit ve preimplantasyonel embriyolarında da slc9a1, slc9a3 ve slc9a4 transkripsiyonları gösterilirken Western-blot ile bu genler tarafından kodlanan proteinlerin ekspresyonu gösterilememiştir. Bu durumun muhtemel düşük protein ifadesinden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Düşük protein ifadesine rağmen 2-h, 4-h, morula ve trofoblast aşamalarda asidozdan tam iyileşmenin gerçekleştiği, 10 μ M konsantrasyonlarındaki kariporid ve S3226 ile bu iyileşmenin baskılandığı gösterilmiştir⁽¹³⁾. Bu bilgiler ışığında, soylara göre farklılıklar görülebilmeye rağmen, hücre içi pH regülasyonunda baskın isoformların NHE1 ve 3 olduğu söylenebilir. Çalışmamızda da bu isoformların etkinliği değerlendirilmiş ve NHE 1 ve 3 isoformlarını baskılayan inhibitör dozlarında *in vivo* ve *in vitro* 2-h embriyonik aşamalarda anlamlı olmak üzere tüm aşamalarda iyileşme yanıtlarında azalmalar saptanmıştır. NHE1 ve 3 isoformlarının inhibe edildiği durumlarda iyileşme yanıtının tamamen baskılanmaması, yukarıda belirtilen çalışmalarda transkripsiyonu gösterilen diğer isoformların (NHE4, NHE5) farklı embriyonik aşamalarda iyileşme yanıtına katkıda bulunmuş olabileceği şeklinde değerlendirilebilir.

5.3. HCO₃⁻ İçeren Ortamda *In vivo* ve *In vitro* Embriyoların Asidozdan İyileşme Yanıtları

Bikarbonat içeren ortamlarda asidozdan iyileşme sırasında NHE ile birlikte NDBCE aktivitesi de gözlemlenir. pHKSOM solüsyonu kullanarak yapılan ölçümlerde iyileşme yanıtı NHE+NDBCE aktivitelerinin toplamı olarak değerlendirildi. Toplam değiştirici aktivitesi *in vivo* farklı embriyonik aşamalar arasında anlamlı farklılık göstermezken, *in vitro* 2-h embriyonik aşamada 4-h, morula, trofoblast değerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 6). *In vitro* 2-h toplam değiştirici aktivitesi aynı zamanda *in vivo* 2-h değerine göre de anlamlı yükseklik gösterdi (Şekil 27). *In vivo* 2-h, morula, trofoblast aşamalar ile *in vitro* 2-h ve morula aşama embriyolarda asidozdan iyileşme yanıtlarından elde edilen ΔF (dinlenme floresans yoğunluğu-final floresans yoğunluğu) değerleri pHKSOM solüsyonunda 0 Bik. pHKFHM solüsyonuna göre anlamlı olarak düşük (dinlenme değerlerine yakın) bulundu (Şekil 27). Kaydedilen floresans yoğunluğunun pH_i 'nın indirekt göstergesi olduğundan NDBCE aktivitesinin ilk dönemdeki hızlı iyileşme yanıtına anlamlı katkısının olmadığı ancak embriyoların dinlenme pH değerine dönebilmesi için gerekli olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Nitekim insan embriyolarında HCO₃⁻ ve CO₂ içermeyen ortamlarda asidozdan iyileşmede yalnızca Na⁺/H⁺ değiştirici aktivitesiyle pH_i 'nin ~6.8 düzeyine getirilebildiği ancak HCO₃⁻ ve CO₂ varlığında NDBCE aktivitesinin eklenmesiyle pH_i 'nin 7'ye kadar çıkabildiği rapor edilmiştir⁽⁶⁾. Üstelik tüm preimplantasyonel gelişim aşamalarında NDBCE proteinini kodlayan slc4a8 ekspresyonunun ortaya konmasının⁽¹²⁾ yanında, bu çalışmada İF boyama ile slc4a8 proteinin gösterilmesi bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Öte yandan yapılan bir çalışmada PN zigot ve 2-h aşamada NDBCE aktivitesinin DIDS ile inhibe edilmesi iyileşme yanıtında anlamlı baskılanmaya neden olduğu gösterilmiştir⁽¹²⁾. Mayotik matürasyon sürecinde GV ve MII oosit ile PN zigot aşamalarında pHKSOM solüsyonunda alınan iyileşme yanıtlarının 0 Bik. pHKFHM ortamından daha yüksek olduğu ve bu iyileşmenin DIDS ile baskılandığı, 2-h aşamada ise NDBCE aktivitesinin asidozdan iyileşmeye katkısının daha az olduğu ve DIDS'in iyileşme yanıtını baskıladığı ancak anlamlı farklılık olmadığı gösterilmiştir^(11, 13). Bu bilgiler ışığında asidozdan iyileşmeyi sağlayan temel mekanizmanın NHE olduğu, NDBCE aktivitesinin ise tamamlayıcı rol oynadığı şeklinde yorumlanmıştır⁽¹¹⁾. Çalışmamızda da *in vivo* elde

edilen embriyolarda aynı yönde sonuçlar elde edilmiş, *in vitro* gelişen embriyolarda da asidozdan iyileşmeye katkıda bulunan bu tamamlayıcı mekanizma korunmuştur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asidozdan iyileşmede görevli NHE+NDBCE değiştirici aktivitelerinin 2-h embriyonik aşamada yüksek olması, alkaloz defans mekanizmasından farklı olarak ilerleyen aşamalara bağlı anlamlı azalmalar görülmemesi, artan metabolizma sonucu oluşan asit yüke ve uterusun asidik ortam şartlarına uygun olarak etkin bir asidoz defans mekanizmasının bulunduğunu göstermektedir.

IVF, ICSI gibi yardımcı üreme teknikleri sırasında embriyolar *in vitro* kültür ortamına maruz kalırlar. Embriyolar için stres faktörü olarak kabul edilen bu gibi durumlarda embriyo canlılığının sürdürülmesi, hücre içi pH regülasyonu gibi homeostasin sağlanmasında önemli rol oynayan mekanizmaların işleyişine bağlıdır. Çalışmamızda *in vivo* ve *in vitro* elde edilen embriyoların asidoz defans mekanizmaları arasında farklılık saptanmamış olması *in vitro* kültür şartlarının pH_i regülasyonu üzerinde olumsuz etki göstermediğini ortaya koymuştur. Günümüzde yapılan IVF uygulamalarında transfer için genellikle 8-h aşama embriyolar kullanılmaktadır. Halbuki ilerleyen embriyonik aşamaların uterusu tutunması daha kolay olabilmekte^(28, 29) dolayısıyla daha ileri embriyonik aşamaların (morula, trofoblast) transferi IVF başarısını arttırmak için daha yaygın tercih edilen bir strateji olarak ön plana çıkabilir. Bu çalışmada temel homeostatik mekanizmalardan hücre içi pH regülasyonunun, *in vivo* elde edilen ve *in vitro* gelişen embriyoların ileri aşamalarında dahi anlamlı farklılık göstermemesi bunun mümkün olabileceğine işaret etmektedir.

Son 30 yıl içerisinde yapılan IVF uygulamalarında gebelik ve canlı doğum oranlarının önemli ölçüde arttığı raporlanmıştır. İngilterede tüm yaş grupları dahil edildiğinde 1991 yılında % 10 olan gebelik oranının 2021 yılında % 29'a yükseldiği bildirilmiştir⁽⁷³⁾. Farklı ülkelerden alınan verilere göre tüm yaş grupları dahil edildiğinde IVF tedavisi sonrası gebelik oranları % 30'lara, canlı doğum oranları % 20'lere ulaşmaktadır. Erken yaş gruplarında (35 yaş altı) ise bu oranlar gebelik için % 40-50'lere, canlı doğum oranları için ise % 30-40'lara çıkmaktadır.⁽⁷³⁻⁷⁶⁾ Gebelik ve canlı doğum oranlarındaki bu artış IVF sürecine etki edebilecek tüm faktörleri değerlendiren kapsamlı çalışmalar neticesinde sağlanabilmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi, embriyo kültür

ortamına ve embriyogenesis sürecine etki edebilecek homeostatik mekanizmaların değerlendirilmesi bu uygulamaların başarısını daha da arttırabilme potansiyeline sahiptir.



KAYNAKLAR

1. **SF, G.** Developmental Biology. 6th edition ed**2000**
2. **FitzHarris, G, Baltz JM.** Regulation of intracellular pH during oocyte growth and maturation in mammals. *Reproduction* **2009**; 138(4):619-627.
3. **Barrett, KE, Boitano S, et al.** Ganong's Review of Medical Physiology. 25 ed McGraw-Hill Education, **2016**
4. **Hall, JE, Hall ME,** . 14 ed, Elsevier, **2020**: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.
5. **Dale, B, Menezo Y, et al.** Intracellular pH regulation in the human oocyte**1998**
6. **Phillips, KP.** Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. *Human Reproduction* **2000**; 15(4):896-904.
7. **Erdogan, S, FitzHarris G, et al.** Mechanisms regulating intracellular pH are activated during growth of the mouse oocyte coincident with acquisition of meiotic competence. *Developmental Biology* **2005**; 286(1):352-360.
8. **Fitzharris, G, 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):591-599.
9. **Dagilgan, S, Dundar-Yenilmez E, et al.** Evaluation of intracellular pH regulation and alkalosis defense mechanisms in preimplantation embryos. *Theriogenology* **2015**; 83(6):1075-1084.
10. **Cetinkaya, A, Erdogan S.** Changes of HCO₃⁻/Cl⁻ exchanger activity during meiotic maturation in Balb/c strain mouse oocytes and zygotes. *Journal of Reproduction and Development* **2008**; 54(6):492-495.
11. **Erdogan, S, Cetinkaya A, et al.** Changes in the activity of defense mechanisms against induced acidosis during meiotic maturation in mouse oocytes. *Theriogenology* **2011**; 75(6):1057-1066.
12. **Dagilgan, S, Dundar-Yenilmez E, et al.** Acidosis defense mechanisms in the preimplantation stages of embryos in BALB/c strain mice ☆. *Theriogenology* **2024**; 217:136-142.
13. **Siyanov, V, Baltz JM.** NHE1 is the sodium-hydrogen exchanger active in acute intracellular pH regulation in preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction* **2013**; 88(6):157.

14. **Zhou, C, Fitzharris G, et al.** Na⁺/H⁺ exchange is inactivated during mouse oocyte meiosis, facilitating glycine accumulation that maintains embryo cell volume. *Journal of Cellular Physiology* **2013**; 228(10):2042-2053.
15. **Hendus-Altenburger, R, Kragelund BB, Pedersen SF.** Current Topics in Membranes **2014**: Structural dynamics and regulation of the mammalian SLC9A family of Na⁺/H⁺ exchangers.
16. **Donowitz, M, Ming Tse C, Fuster D.** SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. *Molecular Aspects of Medicine* **2013**; 34(2-3):236-251.
17. **Harding, EA, Gibb CA, et al.** Developmental Changes in the Management of Acid Loads During Preimplantation Mouse Development. *Biology of Reproduction* **2002**; 67(5):1419-1429.
18. **Costanzo, LS, .** Physiology. 6 ed Elsevier, **2018**
19. **'Koeppen, B, 'Stanton B, .** Berne & Levy Physiology. 7 ed Elsevier, **2017**
20. **FitzHarris, G, Siyanov V, Baltz JM.** Granulosa cells regulate oocyte intracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms. *Development* **2007**; 134(23):4283-4295.
21. **Buccione, R, Schroeder AC, Eppig JJ.** Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction* **1990**; 43(4):543-547.
22. **Russell, DL, Robker RL.** The Ovary (Third Edition), Academic Press, **2019**: Chapter 14 - Ovulation: The Coordination of Intrafollicular Networks to Ensure Oocyte Release.
23. **Conti, M.** Biology and Pathology of the Oocyte: Its Role in Fertility and Reproductive Medicine, Cambridge, Cambridge University Press, **2003**: Hormones and growth factors in the regulation of oocyte maturation.
24. **Jones, EE.** Medical Physiology, Elsevier, **2012**: The Female Reproductive System.
25. **Girsh, E.** A Textbook of Clinical Embryology **2021**: Conception.
26. **İnsan Fizyolojisi, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2021**: Gebelik ve Emzirme.
27. **In-Vitro Fertilization.** 4 ed, Cambridge, Cambridge University Press, **2020**: First Stages of Development.
28. **Elder, K, Dale B.** In-Vitro Fertilization **2019**: Implantation and Early Stages of Fetal Development.

29. **Boron, WF, Boulpaep EL**, .Medical physiology : a cellular and molecular approach. 2 ed, Elsevier, **2012**: Fertilization, Pregnancy, and Lactation.
30. **Zeng, F, Baldwin DA, Schultz RM**. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Developmental Biology* **2004**; 272(2):483-496.
31. **Hamatani, T, Carter MG, et al**. Dynamics of Global Gene Expression Changes during Mouse Preimplantation Development. *Developmental Cell* **2004**; 6(1):117-131.
32. **Yao, T, Asayama Y, .** Human preimplantation embryo culture media: Past, present, and future. **2016**; 33:17-34.
33. **Lawitts, JA, Biggers JD**.Methods in Enzymology, Academic Press, **1993**: [9] Culture of preimplantation embryos.
34. **Busa, WB, Nuccitelli R**. Metabolic regulation via intracellular pH. *American Journal of Physiology* **1984**; 246(4 Pt 2):R409-438.
35. **Edmonds, BT, Murray J, Condeelis J**. pH regulation of the F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1 alpha. *Journal of Biological Chemistry* **1995**; 270(25):15222-15230.
36. **Speake, T, Elliott AC**. Modulation of calcium signals by intracellular pH in isolated rat pancreatic acinar cells. *The Journal of Physiology* **1998**; 506 (Pt 2)(Pt 2):415-430.
37. **Roos, A, Boron WF**. Intracellular pH. *Physiological Reviews* **1981**; 61(2):296-434.
38. **Lane, M, Gardner DK**. Regulation of ionic homeostasis by mammalian embryos. *Seminars in Reproductive Medicine* **2000**; 18(2):195-204.
39. **Cheng, J-M, Li J, et al**. Elevated intracellular pH appears in aged oocytes and causes oocyte aneuploidy associated with the loss of cohesion in mice. *Cell Cycle* **2016**; 15(18):2454-2463.
40. **Gu, Y, Xu J, et al**. Elevated intracellular pH of zygotes during mouse aging causes mitochondrial dysfunction associated with poor embryo development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2023**; 574:111991.
41. **Damkier, HH, Prasad V, et al**. Nhe1 is a luminal Na⁺/H⁺ exchanger in mouse choroid plexus and is targeted to the basolateral membrane in Ncbe/Nbcn2-null mice. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **2009**; 296(6):C1291-1300.
42. **Pedersen, SF, Counillon L, .** THE SLC9A-C MAMMALIAN Na⁺/H EXCHANGER FAMILY: MOLECULES, MECHANISMS, AND PHYSIOLOGY. **2019**; 99:2015-2113.

43. **Harding, EA, Gibb CA, et al.** Developmental changes in the management of acid loads during preimplantation mouse development. *Biology of Reproduction* **2002**; 67(5):1419-1429.
44. **Phillips, KP, Baltz JM.** Intracellular pH regulation by HCO₃⁻/Cl⁻ exchange is activated during early mouse zygote development. *Developmental Biology* **1999**; 208(2):392-405.
45. **Zhao, Y, Baltz JM.** Bicarbonate/chloride exchange and intracellular pH throughout preimplantation mouse embryo development. *American Journal of Physiology* **1996**; 271(5 Pt 1):C1512-1520.
46. **Romero, MF, Chen AP, et al.** The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Molecular Aspects of Medicine* **2013**; 34(2-3):159-182.
47. **Baltz, JM, Phillips KP.** Advances in Molecular Biology: A Comparative Methods Approach to the Study of Oocytes and Embryos, Oxford University Press, **1999**: Intracellular ion measurements in single eggs and embryos using ion-sensitive fluorophores.
48. **Dagilgan, S.** ERKEN EMBRİYONİK DÖNEMDE ALKALOZDAN SAVUNMA MEKANİZMASININ İNCELENMESİ Çukurova Üniversitesi, **2013**.
49. **B., LF, Casey JR, .** Measurement of Intracellular pH. **2010**:311-331.
50. **ILES, R.** Measurement of intracellular pH *Bioscience Reports* **1981**: 687-699
51. : <NMR spektroskopisi.pdf>.
52. **GRANT, RL, ACOST D.** RATIOMETRIC MEASUREMENT OF INTRACELLULAR pH OF CULTURED CELLS WITH BCECF IN A FLUORESCENCE MULTI-WELL PLATE READER *In vitro Cellular & Developmental Biology* **1997**.
53. **Bright, GR, Fisher GW, et al.** Methods in Cell Biology, Academic Press, **1989**: Chapter 6 Fluorescence Ratio Imaging Microscopy.
54. **Im, K, Mareninov S, et al.** An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in Molecular Biology* **2019**; 1897:299-311.
55. **Lewis, TL, Roth KA.** Pathobiology of Human Disease, San Diego, Academic Press, **2014**: Immunohistochemical Detection Methods.
56. **Guan, H, Tang H, et al.** Pregnancy predictors in unexplained infertility after intrauterine insemination. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* **2021**; 50(8):102071.
57. **Yang, A-M, Cui N, et al.** Letrozole for Female Infertility. *Frontiers in Endocrinology* **2021**; 12.

58. **Casarramona, G, Lalmahomed T, et al.** The efficacy and safety of luteal phase support with progesterone following ovarian stimulation and intrauterine insemination: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology* **2022**; 13.
59. A Textbook of Clinical Embryology, Cambridge: Cambridge University Press, **2021**
60. **Jin, H, Sun Y-J, Shu Y-M.** Impacts of assisted reproductive technology on perinatal outcomes and offspring health. *Reproductive and Developmental Medicine* **2023**; 7(1).
61. **Masereel, B, Pochet L, et al.** An overview of inhibitors of Na⁺/H⁺ exchanger. **2003**; 38:547-554.
62. **Schwark, J-R, Jansen HW, et al.** S3226, a novel inhibitor of Na⁺ /H⁺ exchanger subtype 3 in various cell types. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **1998**; 436(5):797-800.
63. **Steeves, CL, Lane M, et al.** Differences in intracellular pH regulation by Na⁺/H⁺ antiporter among two-cell mouse embryos derived from females of different strains. *Biology of Reproduction* **2001**; 65(1):14-22.
64. **Gibb, CA, Poronnik P, et al.** Control of cytosolic pH in two-cell mouse embryos: roles of H⁽⁺⁾-lactate cotransport and Na⁺/H⁺ exchange. *American Journal of Physiology* **1997**; 273(2 Pt 1):C404-419.
65. **Lane, M, Bavister BD.** Regulation of intracellular pH in bovine oocytes and cleavage stage embryos. *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* **1999**; 54(4):396-401.
66. **Lane, M, Baltz JM, Bavister BD.** Na⁺/H⁺ antiporter activity in hamster embryos is activated during fertilization. *Developmental Biology* **1999**; 208(1):244-252.
67. **Schultz, RM.** The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update* **2002**; 8(4):323-331.
68. **Latham, KE, Garrels JI, et al.** Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* **1991**; 112(4):921-932.
69. **H., S.** In vivo ve in vitro koşullarda embriyonik alkaloz defans mekanizmasının karşılaştırılması Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2016**.
70. **Vergaro, P, Sturmey RG.** Manual of Embryo Culture in Human Assisted Reproduction **2021**: Embryo Metabolism and What Does the Embryo Need?
71. **Gardner, DK, Harvey AJ.** Blastocyst metabolism. *Reproduction, Fertility, and Development* **2015**; 27(4):638-654.

72. **Barr, KJ, Garrill A, et al.** Contributions of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms to preimplantation development of the mouse. *Molecular Reproduction and Development* **1998**; 50(2):146-153.
73. Fertility treatment 2021: preliminary trends and figures 2023 Available from:
<https://www.hfea.gov.uk/about-us/publications/research-and-data/fertility-treatment-2021-preliminary-trends-and-figures/#section-1>.
74. **Khalife, D, Nassar A, et al.** Cumulative Live-Birth Rates by Maternal Age after One or Multiple In Vitro Fertilization Cycles: An Institutional Experience. *International Journal of Fertility and Sterility* **2020**; 14(1):34-40.
75. **Gnoth, C, Maxrath B, et al.** Final ART success rates: a 10 years survey. *Human Reproduction* **2011**; 26(8):2239-2246.
76. Assisted Reproductive Technology (ART) Data Available from:
https://nccd.cdc.gov/drh_art/rdPage.aspx?rdReport=DRH_ART.ClinicInfo&rdRequestForward=True&ClinicId=9999&ShowNational=1.