



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BORTEZOMİB'İN FARELERDE PREIMPLANTASYON DÖNEMİ  
EMBRIYO GELİŞİMİNE OLAN ETKİLERİNİN *in vitro* OLARAK  
ARAŞTIRILMASI**

**Cennet Sinem ÇOBAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**  
**Dr. Öğr. Üyesi Duygu MUTLUAY**

**BURDUR-2019**



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BORTEZOMİB'İN FARELERDE PREIMPLANTASYON DÖNEMİ  
EMBRIYO GELİŞİMİNE OLAN ETKİLERİNİN *in vitro* OLARAK  
ARAŞTIRILMASI**

**Cennet Sinem ÇOBAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Duygu MUTLUAY**

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0469-YL-17 proje numarası ve TÜBİTAK 2210-C Yurt içi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

**BURDUR-2019**

**KABUL ve ONAY**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

*Cennet Sinem ÇOBAN* tarafından Dr. Öğr. Üyesi Duygu MUTLUAY yönetiminde hazırlanan **Bortezomib'in Farelerde Preimplantasyon Dönemi Embriyo Gelişimine Olan Etkilerinin İn Vitro Olarak Araştırılması** başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Sınavı Tarihi**  
**14.03.2019**

  
Prof. Dr. Jale ÖNER

Burdur Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi Veteriner Fakültesi

**Başkan**

  
Prof. Dr. Korhan  
ALTUNBAŞ

Afyon Kocatepe  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi  
**Jüri**

  
Dr. Öğr. Üyesi  
Duygu MUTLUAY

Burdur Mehmet Akif  
Ersoy Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
**Jüri**

**ONAY**

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **31.05.2019** tarih ve **20**. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. M. Doğa

TEMİZSOYLU

Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

## TEŞEKKÜR

Yükseklisans eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında etkin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, maddi ve manevi desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bana her konuda yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Duygu MUTLUAY'a, yine yüksekisans eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen Anabilim Dalı hocalarıma, istatistiksel verilerin değerlendirilmesinde bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Cumhuri AKIN ve Doç. Dr. Mustafa Ağâh TEKİNDAL hocalarıma ve çalışmanın yapıldığı laboratuvarını bize açan Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER'e, tezimde desteklediğim TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programına ve bu güne gelmemde her zaman maddi ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ETİK BEYAN

*“Bortezomib’in Farelerde Preimplantasyon Dönemi Embriyo Gelişimine Olan Etkilerinin İn Vitro Olarak Araştırılması”* başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Duygu MUTLUAY danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Cennet Sinem ÇOBAN

21.02.2019

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ETİK BEYAN SAYFASI	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER	v
TABLolar	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TÜRKÇE ÖZET	viii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. GENEL BİLGİLER	2
1.1.1. Preimplantasyon Dönemi Embriyo Gelişimi	2
1.1.1.1. Yarıklanma, Kompaksiyon, ve Polarizasyon	2
1.1.1.2. Blastosist Evresi	6
1.1.1.3. Trofektoderm Hücrelerinde Epitelizasyon	8
1.1.2. Ubiquitin Proteazom Sistemi	9
1.1.3. 26S Proteazom	10
1.1.4. Bortezomib (PS-341)	11
1.1.4.1. Bortezomib'in Gebelik Üzerine Bilinen Etkileri	14
2. GEREÇ ve YÖNTEM	16
2.1. Gereç	16
2.1.1. Çalışma Materyali	16
2.2. Yöntem	16
2.2.1. Embriyo Toplanması	16
2.2.2. Bortezomib Uygulanması	18
2.2.3. Preimplantasyon Dönemi Embriyolarında Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi	21
2.2.4. Mikroskop Görüntülerinin Değerlendirilmesi	21
2.3. Biyoistatistiksel Analiz	22
3. BULGULAR	23
3.1.Embriyolara Farklı Dozlarda Uygulanan Bortezomib'in Embriyo Canlılıkları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	23
3.2.Farklı Dozlarda Uygulanan BTZ' in Embriyonun Gelişim Yeterliliğine Etkisinin Değerlendirilmesi	25
3.3.Bortezomib'in Fragmentasyonu İndüklediği Bulgusunun Değerlendirilmesi	26
3.4.Farklı Dozlarda Farklı Embriyo Gelişim Evrelerinde Uygulanan BTZ'in Embriyoların Gelişimine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi	27
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	46

## ŞEKİLLER

- Şekil 1.** Fare embriyosu preimplantasyon gelişim dönemi. **5**
- Şekil 2.1.** Farede vaginal plak gösterimi ve oviduktun disseke edilmesi. **17**
- Şekil 2.2.** (a) Elde edilen embriyoların medium içine transfer edildiği petri kabı ve oviduktun yıkanması sırasında kullanılan araçlar (b) Oviduktun medium ile yıkanması. **18**
- Şekil 3.1.** Kontrol grubu ve 20nM BTZ uygulanan 2 hücreli embriyoların 4 gün boyunca BTZ içerisinde inkübe edilmesini ve bu süreçteki embriyo gelişimi. **24**
- Şekil 3.2.** Bortezomib'in 2 hücreliden blastosist aşamasına kadar kültüre edilen embriyoların canlılığı üzerine etkisi. **24**
- Şekil 3.3.** Farklı dozlarda uygulanan BTZ'in embriyoların gelişim yeterliğine olan etkisi. **26**
- Şekil 3.4.** 5nM bortezomib içerisinde 2 hücreli evreden blastosist evresine kadar 72 sa boyunca kültüre edilen embriyoların gelişimi. **27**
- Şekil 3.5.** 10 nM bortezomib içerisinde 8 hücreli evreden blastosist evresine kadar 48 sa boyunca kültüre edilen embriyoların gelişimi. **27**
- Şekil 3.6.** Farklı dozlarda BTZ'e maruz bırakılan 2 hücreli embriyolardan 8 hücreli embriyo gelişimi. **29**
- Şekil 3.7.** Farklı dozlarda BTZ'e maruz bırakılan 8 hücreli embriyolardan morula aşamasına embriyo gelişimi. **29**
- Şekil 3.8.** Farklı dozlarda BTZ'e maruz bırakılan morula evresindeki embriyoların blastosist meydana getirmesinin gösterimi. **30**



## TABLolar

**Tablo 3.1.** 1.günden-4.güne kadar inkübe edilen kontrol ve deney grubu embriyoların 2., 3. ve 4. günlerde hayatta kalan embriyo sayıları ve 2 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist evresine ulaşabilen ve hayatta kalan embriyo sayılarının belirlenmesi için yapılan deneyler için kullanılan embriyo sayılarını gösteren tablo. **20**

**Tablo 3.2.** Farklı dozlarda (3nM, 5nM, 10nM) BTZ'ye farklı dönemlerde (2 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist) maruz bırakılan embriyoların bir sonraki evreye geçiş potansiyellerinin incelenmesi için yapılan deneylerde kullanılan embriyo sayılarını gösteren tablo. **20**

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>%</b>	Yüzde
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>µM</b>	Mikrometre
<b>AJ</b>	Adherens Bağlantı
<b>Ang</b>	Anjiyopietin
<b>BTZ</b>	Bortezomib
<b>Epi</b>	Epiblast
<b>HUVEC</b>	İnsan Umblikal Vasküler Endotelyal Hücreler
<b>ICM</b>	İç Hücre Kütlesi
<b>IGF</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<b>IL-1</b>	İnterlökin 1
<b>MMEC</b>	Çoklu Myelom Hastalarından Türetilen Endotel Hücreler
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NF-kB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>PrE</b>	Primitif Endoderm
<b>TE</b>	Trofektoderm
<b>TJ</b>	Sıkı Bağlantı
<b>VEGF</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>ZO</b>	Zonula Okludens

## ÖZET

### **Bortezomib'in Farelerde Preimplantasyon Dönemi Embriyo Gelişimine Olan Etkilerinin İn Vitro Olarak Araştırılması**

Bu tezde, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan selektif bir 26S proteozom inhibitörü olan Bortezomib'in farelerde preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine etkisinin anlaşılması ve araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, çiftleştirilmiş dişi CD1 farelerinden yıkama yöntemiyle elde edilen iki hücreli evre de bulunan embriyolar KSOM medyumunu kullanılarak %5 CO<sub>2</sub> ile 37 °C'de nemlendirilmiş hava inkübatöründe istenilen aşamalara kadar kültüre edilmiştir. İki hücreli aşamada bulunan embriyolar, preimplantasyon gelişiminin 1 ile 4. günü boyunca farklı konsantrasyonlarda (2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 10nM ve 20nM) Bortezomib'e maruz bırakılmıştır. Ayrıca Bortezomib'in farklı evrelerde bulunan embriyoların gelişimine olan etkisine bakılmak üzere embriyolar; 2 hücre, 8 hücre ve morula aşamalarında 3nM, 5nM ve 10nM bortezomib'e maruz bırakılmıştır. Embriyolarda meydana gelen morfolojik değişiklikler invert mikroskopta değerlendirilip fotograflanmış, elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda Bortezomib uygulamasının doza ve süreye bağlı olarak embriyo canlılık oranları ve embriyo gelişimi üzerinde istatistiki olarak anlamlı bir düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Farklı Bortezomib dozları ile farklı embriyonik aşamalarda Bortezomib'e maruz bırakılan embriyolar kontrol grupları karşılaştırıldığında, Bortezomib'e maruz kalan embriyonun maruz kaldığı embriyonik dönem ilerledikçe bir sonraki embriyonik aşamaya geçebilme yüzdesinin de arttığı görülmüştür. Ayrıca yapılan çalışma da doza ve süreye bağlı olarak embriyoların çeşitli evrelerinde embriyo fragmentasyonun arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu Bortezomib'in erken embriyo gelişimi sırasında apoptozu indüklediğini düşündürmektedir. Bununla birlikte 2 hücreli evrede Bortezomib'e maruz bırakılan embriyoların bir sonraki aşamaya geçemedikleri ve bu embriyoların gelişimlerinin 2 hücreli aşamada durduğu tespit edilmiştir. Literatürde Bortezomib'in preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine etkisinin olup olmadığı ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, bu tez çalışmasından elde edilen verilerin bu alanda literatüre özgün ve çok önemli katkı sağlayacağını beklemekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Bortezomib, Embriyo gelişimi, Preimplantasyon, Proteazom inhibitör.

## ABSTRACT

### **An investigation of Bortezomib effects on mouse preimplantation embryo development *in vitro***

In this thesis, we aimed to understand and investigate the effect of bortezomib, a selective 26S proteasome inhibitor that commonly used in cancer therapy, on preimplantation embryo development in mice. For this purpose, two cell stage embryos were flushed from mated female CD1 mice and were cultured to specified stages in KSOM medium at 37 °C with %5 CO<sub>2</sub> in humidified air incubator. Two cell stage embryos were exposed to different concentrations (2nM, 3nM,4nM, 5nM,10nM and 20nM) of bortezomib through 1th to 4th day of preimplantation development. We also exposed 3nM, 5nM and 10nM at 2 cell, 8 cell and morula stage separately. Morphologic alterations of the embryos were evaluated and photographed by inverted microscope and the datas were statistically analyzed. The present study showed that bortezomib exposure caused a statistically significant decrease in embryo viability and embryo development due to dose and time. We analyzed that when embryonic stage progresses, the percentage of formation of next stage embryo was increased. Moreover, it was observed that embryo fragmentation increased at various stages of embryos depending on higher dose and time suggesting that bortezomib induce apoptosis during early embryo development. Furthermore, 20nM bortezomib exposed at 2 cell stage embryo group showed there was an arrested embryos when compared with control group. Because there is no information in the literature about whether bortezomib has any effect on preimplantation embryo development, we hope that the data obtained from this thesis will make a unique and significant contribution to the literature in this field.

**Keywords:** Bortezomib, Embryo development, Preimplantation, Proteasome inhibitory.

## 1.GİRİŞ

Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapinin kısa ve uzun dönemli yan etkileri olduğu yıllardır bilinen bir gerçektir. Kemoterapi ilaçlarının somatik hücrelere mutajenik etkisi nedeniyle kanseri yenen hastalarda gen mutasyonları, kromozomal kırılma ve anöploidi gibi olayların şekillendiği bilinmektedir.

Son yıllarda kanser için geliştirilen tedavi yöntemleri sayesinde kanser tedavisi görüp hayatta kalan hasta sayısında artış görülmüştür. Bu durum hastaların kanser sonrası hayatlarının iyileşmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalarda kanseri yenen hastalar tedavi sürecinde kullandıkları kemoterapi ilaçlarının sağlıklı organları etkilemesi sebebi ile hayat boyu birtakım hastalıklar ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Özellikle genç yaşlarda uygulanan tedavilerin çocuklarda genital sistem organlarında hasar meydana getirdiği ve sonradan çocuk sahibi olmak istediklerinde problemler yaşadıkları ortaya konulmuştur. Tüm bunların yanı sıra tedavi sonrasında gebe kalınması durumunda uterusunda bulunan fetus kemoterapiye maruz kalabilmektedir ve birçok kemoterapi ilacının germ hücrelerine mutajenik olduğu düşünülürse bu tedavilerin fertilizasyon başarısının düşmesine, abortlara ya da anomalili yavrulara neden olması olası bir sonuçtur.

Kanser tedavisi sırasında gebe kalınması nadir görülen bir durumdur. Yapılan çalışmalarda insidansın 1000 gebelikte yaklaşık 1 olduğu tespit edilmiştir. Aslında tedavi gören kadınlarda gebe kalma oranının artması beklenmektedir, çünkü son yıllarda birçok kadın çocuk sahibi olmak için daha ileri yaşlara kadar beklemektedir ve çoğu kansere yakalanma riski yaşla birlikte artmaktadır. Ancak kullanılan kemoterapi ilacının hamilelik sırasında hem anneye hem de bebeğin sağlığına ne gibi olumsuz etkileri olacağı ile ilgili yeterli çalışma bulunmadığından anneler, birçok kanser tedavisi sırasında gebe kalmamaları konusunda uyarılmaktadır. Ancak bazı durumlarda anneler bebeklerini doğurmak istemektedir. Hem ilaç kullanımı sırasında hem de sonrasında ne gibi durumlar ile karşılaşılacağı tam olarak bilinmediğinden bu konuda yapılacak her çalışma büyük önem taşımaktadır.

Bu bilgiler ışığında projemizde, kanser tedavisinde sıkça kullanılan Bortezomib ile tedavi gören ve bu sırada gebe kalan bireylerde Bortezomib'in embriyo gelişimine herhangi bir etkisinin olup olmadığı etkisi var ise nasıl ve hangi dönemdeki embriyolar üzerine daha etkili olduğu yapılan fare *in vitro* embriyo kültürü çalışmamız sonucunda açıklığa kavuşmuş olacaktır.

## **1.1 GENEL BİLGİLER**

### **1.1.1 Preimplantasyon Dönemi Embriyo Gelişimi**

#### **1.1.1.1 Yarıklanma, Kompaksiyon ve Polarizasyon**

Farelerde embriyonik gelişim oviduktun ampulla bölgesinde metafaz II aşamasında bekleyen sekonder oositin sperm tarafından döllenmesi ile başlar. Döllenme, ikinci mayoz bölünmenin gerçekleşmesine ve sonucunda ikinci kutup cisimciğinin atılmasına neden olur. Nükleer lamin proteinlerini de içine alan nükleer membranlar maternal ve paternal kromozomlar etrafında oluşurlar ve ayrı haploid erkek ve dişi pronukleuslar meydana getirerek zigotun merkezine doğru hareket ederler. DNA replikasyonu bu göç sırasında gerçekleşir. Pronukleuslar kaynaşmaz ancak membranlar parçalanır ve kromozomlar mekik ipliği üzerinde toplanırlar, kısa bir süre sonra ise ilk yarıklanma meydana gelir (Nagy A ve ark., 2003).

Farelerde oositin döllenmesi ve sonucunda zigotun oluşumu, preimplantasyon embriyo gelişiminin başladığına işaret eder. Zigot (1 hücreli evre), daha sonra genel sitoplazmik hacmini değiştirmeden, protein içeren koruyucu bir membran (zona pellucida) içinde bir dizi asenkronize (eşzamansız) hücre bölünmesine maruz kalır. Sonuç olarak, her yarıklanma sonucu sayıları giderek artan ve gittikçe küçülen blastomer olarak bilinen küçük hücreler meydana gelir (Nagy A ve ark., 2003).

Farelerde preimplantasyon embriyo gelişimi sırasında meydana gelen ilk iki hücre bölünmesi, sonrasında gerçekleşen bölünmelerden daha uzun sürer. İlk iki yarıklanma fertilizasyondan yaklaşık 20 saat sonra gerçekleşirken bunu takip eden

yarıklanmalar ortalama 12 saatlik aralıklarla gerçekleşir (Artus ve Cohen-Tannoudji, 2008).

İlk yarıklanma sonucu iki blastomerli embriyo (2 hücreli evre) meydana gelir. Hücre siklus uzunluğu farklı embriyolar arasında farklılık gösterirken aynı embriyo içerisinde blastomerler arasında da bu farklılık görülebilir. Bu yüzden belirlenen bir zaman da bir embriyoda bulunan toplam blastomer sayısı  $2^n$ 'den farklılık gösterebilir (Alarcon ve Marikawa, 2009).

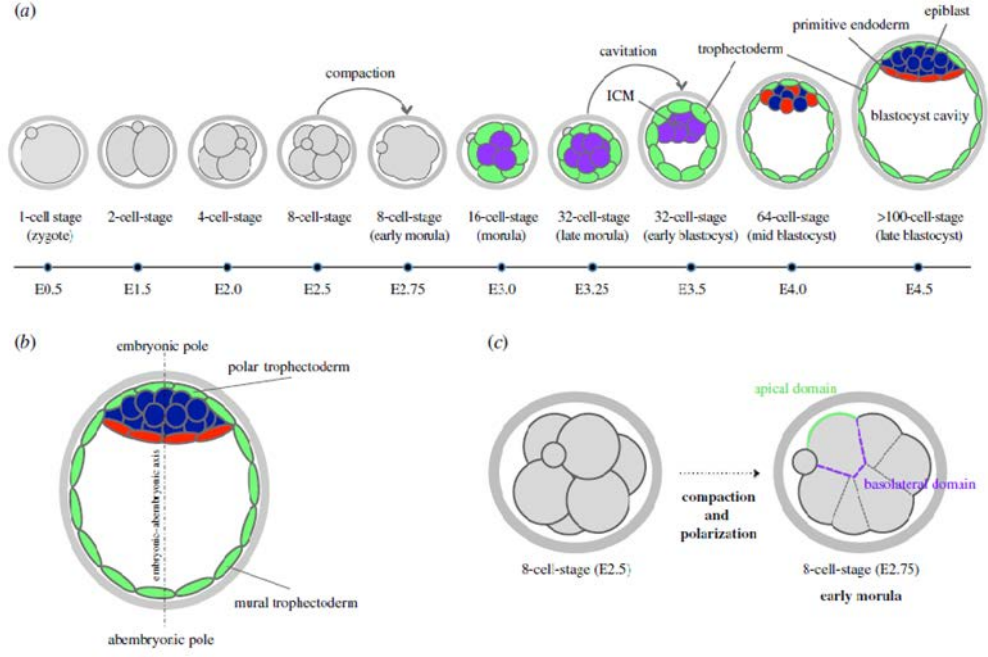
Erken yarıklanma aşamasındaki fare embriyoları rahatça uyarılabilir ve blastomerlerin deneysel olarak çıkarılması, eklenmesi ve yeniden düzenlenmesi gibi dışarıdan yapılan müdahalelere kolayca uyum sağlayabilir. Örneğin iki hücreli evredeki embriyodan bir blastomerin deneysel olarak hasar görmesi sağlanırsa kalan blastomer bu kaybı kompanse edebilir ve sonrasında gelişimini sağlıklı bir şekilde doğuma kadar sürdürüp tamamlayabilir (Tarkowski, 1959; Morris ve ark., 2012). 4 veya 8 hücreli evrede ki fare embriyosundan ayrılan tek tek hücreler, implantasyonun ötesinde bağımsız olarak gelişemezler ancak deneysel olarak diğer blastomerler ile kombine edildiğinde meydana gelen kimeraların tüm dokuları meydana getirebilirler. Bu da onların hala tam gelişimsel potansiyellerini koruduklarını göstermektedir (Tarkowski ve Wroblewska, 1967; Rossant, 1976).

Üçüncü yarıklanma sonucu 8 hücreli embriyo meydana gelir (Şekil1.a). 8 hücre evresine kadar, erken yarıklanma dönemi embriyolarının blastomerleri, morfolojik olarak birbirine benzeyen basolateral membran alanlarında birbirine temas eden yüzeyler ile apikal alanlarda temas etmeyen yüzeyler bulundurulur (Mihajlovic AI, 2017). 8 hücreli evrede, eşzamanlı olarak temas etmeyen yüzey alanı azaldıkça, komşu blastomerler arasındaki hücre içi temasın ölçüsü artar, böylece **kompaksiyon** olarak adlandırılan embriyo oluşumunda morfogenezle ilgili ilk olay meydana gelir. (Pratt ve ark., 1982). Kompaksiyon sırasında başlangıçta küresel şekilde olan blastomerler morfolojilerini değiştirirler ve hücreler arası teması artırır ve birbirlerine yaslanırlar. Sonuç olarak daha önceden gözlenebilen hücrelerarası sınırlar arasında adherens bağlantılar (AJ) hücre-hücre bağlantı alanları oluşturur ve sınırlar gözlenemez hale gelir. Kompaksiyon sürecinde ve AJ'ların

oluşumunda yer alan en önemli protein E-kaderin'dir. Kompaksiyondan önce E-kaderin 8 hücreli evrede bulunan blastomerlerin plazma membranlarının etrafını tamamıyla sarar. Ancak kompaksiyon sırasında AJ'ların oluşumu ile birlikte bunların hücre altı (subcellular) lokalizasyonunda değişiklik olur ve E-kaderin proteini basolateral hücre-hücre alanlarında sınırlanır (Vestweber ve ark., 1987). Deneyler sonucu elde edilen kanıtlar, kompaksiyonun uyarılması için gerekli olan proteinlerin 4 hücreli evredeki blastomerlerde bulunduğu bu nedenle, kompaksiyon işleminin başlaması için gereken tüm değişikliklerin büyük olasılıkla post-translasyonel seviyesinde düzenlendiğini göstermektedir (Kidder ve McLachlin, 1985; Levy ve ark., 1986).

Kompaksiyonun sonucu olarak dördüncü yarıklanma ile birlikte AJ hücre-hücre temas alanlarında şekillenerek **morula** olarak adlandırılan embriyonik yapı meydana gelir (Şekil 1.). Bu terim kompakte olmuş geç 8 hücreli evreden 32-hücre aşamasında blastosist oluşumunun öncesinde çeşitli gelişim evresinde ki embriyoları tanımlamak için kullanılmaktadır (Hynne ve ark., 2005). Kompaksiyona paralel olarak, blastomerler polarizasyon adı verilen apikal ve bazolateral membran alanları arasında tanımlanan hücresel komponentlerin asimetrik dağılımı ile sonuçlanan bir süreci geçirirler (Johnson ve Ziomek 1981). En önemlisi, bu aşamada, apikal ve bazolateral alanlar arasındaki sınırdaki, bu iki membran alanını tanımlamaya yarayan sıkı bağlantı (TJ) oluşumu da başlatılmaktadır, bunların her biri sonraki hücrelerde hücre kaderi kimliğinin uygun bir şekilde gerçekleşebilmesi için gereklidir (Fleming ve ark., 1989). Gerçekten de, hem polarizasyonun hem dekompaksiyonun başarılı bir şekilde sonuçlanması, hücre kaderinin, 8-16 hücreye ve 16 ila 32 hücreye geçişlerde hücrelerin iç veya embriyonun dışında pozisyon almasına bağlı olarak ortaya çıkan, iki morfolojik ve boyutsal olarak farklı blastomer popülasyonlarına uygun şekilde ayrılması için gerekli bir ön koşuldur (Şekil 1) (Balakier ve Pedersen., 1982; Fleming 1987).





**Şekil 1.** Fare embriyosu preimplantasyon gelişim dönemi (a) Preimplantasyon fare embriyosunun gelişmesi boyunca, birinci ve ikinci hücre-kader kararlarının bir sonucu olarak meydana gelen ilgili embriyonik aşamalar ve hücre soylarını gösteren şema. (b) Embriyonun geç blastosist aşamasında embriyonik- abembriyonik ekseninin oryantasyonu (E4.5). Sırasıyla embriyonun embriyonik ve abembriyonik kutuplarında mural ve polar trofektoderm konumunun görünümü (c) Kompakt olmayan 8 hücreli bir embriyonun erken morula evresinde geçirdiği morfojenetik olayları göstermektedir. Bununla birlikte, hücre içi polarizasyon, bireysel blastomerlerin apikal (yeşil) ve bazolateral (mor) membran alanları ile gösterildiği gibi oluşturulur (Mihajlovic AI, 2017).

Bunun sebebi, başlangıçta oluşan pozisyon (dış / iç) ve hücre içi organizasyondaki (polarize / polarize olmamış) farklılıklardır. Bu türden elde edilen hücreler, ilk hücre kader belirlenmesi olarak tanımlanan (“pozisyon” ve “polarite” modelleri ile temsil edilen iki klasik teori) trofektoderm (TE) ve iç hücre kütlesi (ICM) olmak üzere iki farklı hücre soyuna ayrılırlar. Buna göre, dışta yer alan (eksternal blastomer) hücre içi polaritelerini sürdürür ve TE’i meydana getirirken, polarize olmamış içte bulunan (internal blastomer) ICM hücrelerini meydana getirir. Ancak, bu tür uzaysal ayrışma ve farklı polarizasyon durumu trofektoderm ve ICM soylarının hemen geri dönüşümsüz bir şekilde kurulmasına neden olmaz. Bu 16 hücreli evrede bulunan ya iç ya da dış blastomer popülasyonlarından meydana gelen blastomer agregatları preimplantasyon gelişim programını yeniden oluşturabilir

(Ziomek ve Johnson, 1982) ve bunlar yalancı gebe taşıyıcı annenin uterusuna nakledildiğinde normal ve fertil bir fareyi meydana getirebilir (Suwinska ve ark., 2008). Bu veri 16 hücreli evrede hem iç hem de dış blastomerlerin halen embriyo içerisindeki yerleriyle bağlantılı olarak TE ya da ICM'i meydana getirebileceğini göstermektedir. Bu da bu blastomerlerin bir ya da diğer hücre soyuna geri dönüşümsüz olarak bağlı olmadıklarını göstermektedir (Mihajlovic AI, 2017).

Beşinci yarıklanma ile 32 hücreli/blastosist evresi (kavitasyonun ilk başladığı gelişim noktası) yapılan benzer deneylerde benzer plastisiteye sahip olmadığı göz önüne alındığında, dış ve iç hücre topluluklarının geri dönüşümsüz şekilde TE ve ICM olma yönünde kalıtıldığı ve bunun ilk hücrel kader kararının kesinleştiği nokta olduğunun tartışılabilir olduğu önerilmiştir (Suwinska ve ark., 2008). Bununla birlikte, sonraki deneyler, bu blastosistlerin en azından bazı blastomerlerinin tam potansiyellerini koruduklarını ortaya çıkarmıştır (Tarkowski ve ark., 2010). Bu verilerle tutarlı olarak, son zamanlarda trofektoderm hücrelerinin gelişimsel potansiyelinin geç 32 hücre evresinde son olarak sınırlanmış olduğu ve ICM hücrelerinin ise 32-64 hücreli evreye geçişte artık TE hücrelerine dönüşebilme yeteneklerini kayb ettiklerini ve tam olarak sadece ICM olma yönünde kalıtıldıkları bildirilmiştir (Posfai ve ark., 2017).

#### **1.1.1.2. Blastosist Evresi**

Embriyoda gerçekleşen beşinci bölünmeyle birlikte blastomerler arasında bir veya daha fazla kavite oluşmaya başlar. Boşluklar daha sonra genişler ve birbirleriyle kaynaşarak tek bir büyük kavite oluştururlar. Bu aşamada bulunan embriyo, "blastosist" olarak adlandırılır (Marikawa ve Alarcon, 2009).

Memeli gelişimde ilk hücre farklılaşması olayı trofektoderm (TE) ve iç hücre kütlesi (ICM) olmak üzere iki farklı hücre soyunun oluşumu ile meydana gelir. Meydana gelecek olan ilk embriyonik doku blastosistin dış katmanı oluşturan epitel kökenli olan TE'dir. İç hücre kütlesi ise blastosistin kaviteye bakan fetüsü meydana getirecek pluripotent hücrelerden oluşur (Marikawa ve Alarcon, 2012). Blastosistin

annenin endometriyumuna implantasyona aracılık eden aynı zamanda plasentasyona katkıda bulunan TE hücreleri trofoblastların progenitörüdür. Blastosistte trofoblastların kavite ile temasta olan kısmı mural trofektoderm olarak adlandırılırken, bunun karşı kısmında bulunan ICM'yi kaplayan kısmı, polar troektoderm olarak isimlendirilir (Şekil 1.b) (Mihajlovic AI, 2017).

Trofektodermin spesifikasyonunu ve blastosist boşluğunun oluşumunu takiben, ikinci hücre-kaderi kararının bir sonucu olarak iki farklı ICM soyu, pluripotent epiblast ve farklılaşan ekstra embriyonik primitif endoderm oluşur (Şekil 2.1). Bu iki soyun prekürsör hücreleri, erken blastosist ICM'si boyunca rastgele dağılmıştır ve "tuz ve biber" modeli olarak bilinir (Chazaud ve ark., 2006).

Toplam yedi bölünme bölümünü tamamladıktan sonra, fare embriyosu, zona pellucida'dan kurtulur ve morfolojik olarak tanınan ve üç farklı hücre soyunu içeren ve uterusu implante olma yeteneğinde olan, geç blastosist adı verilen farklı yapıdaki embrioyu oluşturur. Böylelikle farelerde embriyo gelişiminin preimplantasyon dönemi son bulmuş olur. Bununla birlikte, blastosist geliştikçe, hücre sınıflandırma ve programlanmış hücre ölümü süreçleri aracılığıyla bu hücreler epiblast (Epi) ve primitif endoderm (PrE) kompartmanlarına yavaş yavaş ayrılırlar. Böylece preimplantasyon gelişiminde embriyonik gün 4.5 (E 4.5)'de primitif endoderm hücreleri blastosist kavitesi ile temas halinde hücre içi polarize hücrelerden tek hücreli tek bir katman oluştururken epiblast hücreleri primitif endoderm ve üstte yer alan polar trofektoderm arasında bir hücre kütlesi olarak yer alır (Şekil 2.1) (Plusa ve ark., 2008; Meilhac ve ark., 2009).

Blastosistin implantasyonundan sonra PrE vitellüs kesesine katkıda bulunacak olan viseral ve parietal endodermi meydana getirir. PrE endoderm aynı zamanda Epi'den meydana gelen dokularda vücut ekseninin belirlenmesinde kritik roller üstlenir (Chazaud ve ark., 2006; Plusa ve ark., 2008; Çoban ve Mutluay, 2017). Epi embrioyu oluşturacak birçok hücreyi meydana getirmesinin yanı sıra amniyon, allantois ve viseral vitellüs kesesini çevreleyen ekstraembriyonik mezoderm hücrelerini meydana getirir (Artus ve ark., 2011; Mutluay, 2016; Rossant, 2004).

### 1.1.1.3. Trofektoderm Hücrelerinde Epitelizasyon

Fare embriyolarında, epitel oluşumu geç 8 hücreli evrede kompaksiyon ile başlar, önümüzdeki 24 saat boyunca devam eder ve 32 hücreli evrede tamamlanır. Kompaksiyon sırasında, hücreler arası bağlantı esas olarak  $Ca^{2+}$  bağlı adezyon molekülü E-kaderin aktivitesi vasıtasıyla belirgin şekilde artırılır. Birçok epitel dokularında bulunan protein komplekslerinden olan E-kaderin adherens bağlantılarının ana elemanlarından birisidir. Fare embriyolarında, E-kaderin ekspresyonunun yoksunluğu, Adherens Junction (AJ)'da bozulmaya yol açar (Yamanaka ve ark., 2006).

Olgun TE hücreleri apikal mikrovilluslu polarize olmuş bir epitelin farklı özelliklerini ve polarize olmuş bir dağılım gösteren sıkı ve adherens bağlantılar gibi özel protein komplekslerinin kutupsal dağılımının özelliklerini taşır (Yamanaka ve ark., 2006).

Tipik bir epitelde, hücre membranları, claudin, occludin ve zonula occludens (ZO) proteinleri gibi farklı proteinlerden oluşan ve sıvıyı hemen hemen geçirmeyen bir bariyer oluşturan TJ yoluyla sıkıca bağlanırlar. Embriyolarda, TJ bileşenlerinin bazıları, kompaksiyon sırasında hücre-hücre sınırlarının apikal yanına lokalize olurlar ve blastosist kavitesini kapatma yeteğinde olan olgun TJ meydana gelmesi yaklaşık 32 hücreli evrede tamamlanır. Çeşitli deneysel çalışmalar, TJ bileşenlerinin çoğunun blastosist kavitesi oluşumu ve sürdürülmesi için kritik roller oynadığını göstermiştir. ZO bileşenleri, ZO-1, ZO-2 ve klauidin'i 4/6 içerir ve bunların bulunmaması ya da inhibasyonlarıyla bozulmuş veya gecikmiş kavite oluşumu meydana gelir. (Alarcon ve Marikawa, 2009).

Blastosist kavitesi oluşması ve genişlemesi için, TE'nin sadece fonksiyonel komplekslerle sıkı sıkıya sızdırmaz bir tabaka oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda sıvıyı boşluğa pompalamaya ihtiyacı vardır. TE'nin apikal kısmından bazal kısmına doğru su akışının ana yürütücü güç, epitelin bazal tarafında artan bir sodyum iyon ( $Na^{+}$ ) konsantrasyonu sonucu meydana gelen ozmotik güçtür. Blastosist boşluğunun şekillenmeye başladığı bazal tarafa sodyum iyonlarının transportu, apikal membrandan

Na<sup>+</sup> ie akışı için gerekli olan Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> dönüştürücüsü ve bazal membranda Na<sup>+</sup> dışa akışı için gerekli olan Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz çeşitli taşıyıcı hareketleri ile sağlanır. (Alarcon ve Marikawa, 2009).

### 1.1.2. Ubikitin Proteazom Sistemi

Hcrenel proteolitik işaretleyici peptid olan ubikitin, hücre siklusunun ilerlemesi (Goltzer ve ark., 1991), protein yıkımı, yeniden kullanılması (Ciechanover ve ark., 1984) ve membran reseptör endositozu (Strous ve Govers,1999) gibi olayları kontrol eder. Bu olaylar 76-amino asit ve 8.5 kDa ubikitin'in Lys-rezidü substratı E-amino gruplarına kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu reaksiyon ATP'nin hidrolizini gerektirir ve memelilerde bir dizi ubikitin taşıyıcı ve E1-E4 olarak adlandırılan ligazlarla katalize edilir (Ciechanover,1994; Herskho ve Ciechanover, 1998).

Ubikitinasyon, protein döngüsünden (Ciechanover, 1994) Alzheimer hastalığına ve HIV'e (Cochran ve ark., 1991) kadar değişen fizyolojik ve patolojik olayları kontrol eden çok yönlü hücrenel düzenleyici mekanizmalardan biridir. Ayrıca, ubikitinasyon, bir protein üzerindeki hedef lizin amino asitleri modifiye eden ve dolayısıyla işlevini ve turnover etkileyen post-translasyonel bir modifikasyondur. Bu protein ökaryotlarda korunmuştur ve ubikuitin benzeri proteinler son zamanlarda prokaryotlarda da bildirilmiştir (Pearce ve ark. 2008). Üç farklı enzim grubunu içeren çok enzim basamaklı bir süreç olduğu bilinmektedir: E1 aktive edici enzimler, E2-konjuge edici enzimler ve E3 ubikitin ligazları. 76 amino asitin evrimsel olarak korunmuş olan ubikitin parçasını lizin amino asitine takmak için hızlı bir şekilde çalışır. Son tahminlere göre, insan genomu sadece iki E1 kodlayan gen içerir: ~40 E2 kodlayan genler ve > 600 farklı E3 ligazları (Li ve ark. 2008). E1 enzimleri, ubikitin reaksiyonunu ubikitinin ATP bağımlı aktivasyonu ve onun bir E2'ye bağlanmasıyla başlatır. E3 ligazları, substratın spesifitesini saptar ve bu aktif kompleksin hedef proteine transferini kolaylaştırır (David ve ark., 2011). Sıralı K48 bağlantısı ile oluşturulan ubikuitin zincirleri K63'e bağlı ubikuitin zincirleri sinyalleşmeyi

düzenlerken, 26S proteazom yoluyla protein bozulmasına yol açar (Thrower ve ark., 2000).

Ubikuitin-proteazom yolağı hücre içi bozunma, oksitlenme veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkılmasında aynı zamanda hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli rol oynar (Hochstrasser M, 1995; Jentsch ve Schlenker, 1995; Herskho A, 1998; Ling ve ark.,2003; Tamura ve ark., 2010). Hasar görmüş, oksite olmuş veya yanlış katlanmış proteinler ubikuitin-proteazom sistemi için substrat olarak tanımlanır (Ciechanover ve ark., 1991; Treier ve ark., 1994; Desai ve ark., 1997; Ling ve ark., 2003). Buna ek olarak bu sistem hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, farklılaşma, hayatta kalma, apoptozis, anjiyogenezis ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu sistemde meydana gelebilecek çeşitli aksaklıklar kanseri de içine alan birçok hastalığın meydana gelmesi ile de ilişkilidir. (Mani ve Gelmann, 2005; Rajkumar ve ark., 2005; Genini ve ark., 2008).

### **1.1.3. 26S Proteozom**

Proteazomlar, hücre içi proteinleri seçici olarak yıkımlayan büyük çok alt birimli proteaz komplekslerdir. Bu proteazlar tarafından uzaklaştırılan proteinlerin çoğu, ubikitinasyon ile yıkımın gerçekleşmesi için etiketlenirler. Proteozomlar, anahtar enzimlerin ve düzenleyici proteinlerin sinyal aracılı proteolizi yoluyla, metabolizma ve hücre döngüsü gibi hücresel süreçleri kontrol etmede rol oynarlar. Ayrıca, stres yanıtında, anormal proteinleri çıkararak, bağışıklık yanıtında ise antijenik peptitler üreterek iş görürler (Hilt ve Wolf, 1996).

Büyük bir hücresel organel olan 26S proteazom tüm ökaryotik hücrelerde sitoplazma ve çekirdekte bulunan multikatalitik bir proteazdır. ATP'ye bağımlı bir proteolitik sistem olan 26S proteazom, normal metabolik koşullar altında kısa ömürlü proteinlerin bozulmasına aynı zamanda uzun ömürlü proteinlerin ayrışması, bazı proteinlerin kısmi sindirimi / işlenmesi (örn., Nükleer Faktör kappa B (NF-Kb)) ve antijen sunumuna neden olur (Yerlikaya, 2004). Ayrıca 26S proteazom, transkripsiyon faktörlerinin işlenmesi ve yıkımı, hücre döngüsünün durdurulması, apoptozis, onkoproteinlerin ve birtakım düzenleyici proteinlerin ATP bağımlı

proteolitik yıkımından sorumludur. 26S proteazom, protein bozunmasını katalize eden 1 adet 20S proteozom ve 2 tane 19S düzenleyici komplekse sahip 2.5-MDa ağırlığında moleküler bir makinedir. 20S proteolitik çekirdek kompleksi proteazomun asıl proteolitik aktivitesini meydana getirirken 19S düzenleyici kompleksler ubikitinlenmiş proteinlerin tanınmasını sağlarlar. Düzenleyici kompleksler aynı zamanda, ubikuitinli hedeflerin oligopeptidlere ayrıştığı 20S kompleksinin içine açılmaları ve yer değiştirmelerinde de rol oynarlar. Ökaryotik 20S proteazom kompleksi (700 kDa), 7 farklı  $\alpha$  ve 7 farklı  $\beta$  tipi alt birimler olmak üzere her birinde 2 kopya olmak üzere 4 tabakalı silindir şeklinde bir yapı meydana getirir.  $\alpha$  alt birimleri 2 dış katmanı oluştururken  $\beta$  alt birimi yapının 2 iç halkasını oluşturur. (Peters 1993; Hershko A. ve Ciechanover 1998; Voges 1999).

#### **1.1.4. Bortezomib (PS-341)**

Bortezomib (BTZ), intrasellüler proteinlerin bozunmasında yer alan, memeli hücrelerinde hücre siklus düzenlenmesini etkileyen ve 20S proteazomu inhibe eden bir dipeptid boronik asittir. Molekül ağırlığı 384,24 olup, molekül formülü  $C_{19}H_{25}BNO_4$ . Monomerik borik asit olan BTZ'in suda çözünürlüğü, 2-6.5 pH aralığında 3.3-3.8 mg/ml'dir. BTZ, intravenöz (IV) enjeksiyonu için 3.5 mg BTZ ve 35 mg mannitol, ubikuitin ve proteazom bağımlı proteolitik sistem (UPS) içeren tek dozlu flakonlarda steril liyofilize toz olarak bulunmaktadır (Bross ve ark., 2004). BTZ, 3 ila 5 saniye içinde IV olarak uygulanır, vasküler bölmeden hızla kaybolur ve yaklaşık 24 saatlik bir biyolojik yarı ömrüyle proteazomu inhibe eder (Richardson ve ark., 2003).

Proteazom inhibitörleri, proteazomları etkilerini inhibe ederek gen ekspresyonlarına bağlı olarak protein yapımını ve çoklu sinyal iletimini engellerler. Sinyal iletiminin engellenmesi sonucunda apoptozis meydana gelir ve kanserli hücreler yaşamını yitirir, böylelikle tümörün büyümesi baskılanır (Karp, 1999; Engür ve Dikmen 2015). Bununla birlikte proteazom inhibitörlerinin anjiyogenezisi, hücre-hücre adezyonunu ve hücre migrasyonunu inhibe ettiği de bildirilmiştir (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012; Engür ve Dikmen 2015).

Seçici 26S proteazom inhibitörü olan BTZ (PS-341, LDP-341 ve MLM341), insanlarda görülen kanserlerde ve özellikle klinik olarak multipl miyeloma görülen hastaların tedavisinde etkili antitümör aktivitesi göstermesinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır (APEX, 2003; Jung ve ark., 2004; Richardson ve ark., 2006). BTZ, hem katı tümörler hem de hematolojik malignitelerde anti kanser aktivitesi gösteren ilk proteazom inhibitörüdür (Roccaro ve ark., 2006). Başlangıçta ilacın ana etki mekanizmasının Bcl-2, c-IP2 ve survivin gibi anti-apoptotik proteinler için bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gören nükleer faktör kapp B'nin (NF-κB) inhibisyonu olduğu düşünülüyordu. Toplanan veriler BTZ'in NF-κB'yi inhibe ve p53, p21 ve p27'yi stabilize ederek, ayrıca bu süreçte miyeloma hücrelerinin proliferasyonunda önemli rol oynayan siklinleri modifiye ve IL-6'nın up regülasyonunun inhibe ederek hücre siklusuna zarar verip anti kanser aktivitesini gerçekleştirdiğini göstermiştir. (Hideshima ve ark., 2001; Pham ve ark., 2003; Ling ve ark.,2003; Strauss ve ark., 2007). Ayrıca proteazom, hücre döngüsü progresyonunu düzenleyen proteinleri indirgemektedir ve NF-κB, IκB kinazın endojen inhibitörünün proteolizine neden olur. IκB'nin proteazomlar tarafından parçalanması, NF-κB'yi aktive eder bu da hücre sağ kalımını, büyümeyi teşvik eden ve apoptoza yatkınlığı azaltacak proteinlerin transkripsiyonunu up regüle eder. NF-κB aktivasyonu ayrıca miyelom hücrelerinde ilaç direnci oluşturur ve miyeloma hücrelerinin ilaçlara karşı direncinde yer alan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu up regüle eder. Ek olarak miyelom hücrelerinin büyümesi, hayatta kalması ve migrasyonuna aracılık eden salgıyı sitokinlerin kemik iliği stromal hücreleri tarafından modüle eder (Richardson ve ark., 2003).

BTZ, refrakter ve tekrarlayan multipl miyelomalı hastalarda kullanılmak üzere Amerika Birleşik Devletleri'nde Millennium Pharmaceuticals tarafından 13 Mayıs 2003 tarihinde pazarlama onayı verilmiştir (Bross ve ark.,2004). Avrupa Komisyonu 2004 yılında, Avrupa Birliği üye ülkelerinde bu endikasyon için bortezomib kullanımını onaylamıştır. Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından 60 kanser hücre hattında yapılan çalışmada, BTZ'in hücre büyümesini inhibe ettiği ve bazı hastalarda insan tümör hücrelerine karşı sitotoksik olduğu görülmüştür (Jung ve ark., 2004). BTZ'in klinik etkinliği belirgindir. En sık görülen yan etkiler gastrointestinal semptomlar, nötropeni, trombositopeni, kalp yetmezliği, duyuşal nöropati ve



yorgunluktur (Richardson ve ark., 2003; Hou ve ark., 2014). BTZ'nin insanlarda önerilen dozu  $1.3 \text{ mg/m}^2$ , iki haftalık sürede haftada iki kez (1., 4., 8., ve 11., gün) ve 10 günlük dinlenme periyodu (12-21 günler) şeklinde uygulanmaktadır (Bross ve ark., 2004).

BTZ, melfalan ve prednizon ile birlikte, yüksek doz kemoterapi için aday olmayan daha önce tedavi edilmemiş multipl miyelomalı hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca önceden tedavi edilmemiş multipl miyeloma ile 65 yaş altı hastalar için otolog kök hücre transasyonu ile yüksek doz kemoterapi öncesi indüksiyon tedavi için de endikedir. BTZ, en az bir önceki terapi gören ve hastalığı ilerleyen multipl miyelom hastalarının tedavisinde ve rituksimab, siklofosfamid, doksorubisin ve prednizon ile birlikte kullanılmaktadır (Velcade janssen).

Proteazom benzeri yapıların mitokondri de var olduğu bilinmemekle birlikte, sitoplazmik bölgedeki hareketi mitokondriyal fonksiyonu dolaylı yönde etkileyebilmektedir. Örneğin, BTZ kanser hücrelerinde, muhtemelen sinyal bozulmasını önleyerek mitokondriyi birkaç pro-apoptotik sinyallerin etkilerine karşı hassaslaştırdığı görülmüştür (Naumann ve ark., 2011; Unterkircher ve ark., 2011). BTZ'nin dolaylı anti-anjiyojenik aktivitesi yaygın şekilde bilinmektedir ve anjiyojenik fenotip için gerekli olan genlerin ekspresyonunu down regüle eder. BTZ multipl miyelom hastalarından türetilen endotel hücrelerde (MMEC) vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve interlökin-6 (IL-6) sekresyonunu inhibe etmektedir. BTZ'nin vasküler endotel hücrelerindeki büyümeyi önleyici mekanizması özellikle hücre döngüsünde belirsizdir. Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), insan umbilikal vasküler endotel hücrelerinin (HUVEC'lerin) hücrel büyümesini inhibe ederek apoptozun indüklenmesine neden olmaktadır. Bortezomib, HUVEC'lerin vasküler geçirgenliğini önemli ölçüde artırırken, bir trozin kinaz inhibitörü olan VEGFR-2 ise HUVEC'lerin vasküler geçirgenliği azaltmaktadır. BTZ,  $0.1 \mu\text{M}$ 'lik bir dozda kaspaz 3'ün aktivasyonunu indükler ve daha sonra doz ve zamana bağımlı bir şekilde HUVEC'lerde PARP ayrılmasına neden olmaktadır. Ayrıca BTZ vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ve Anjiyopietin-2 (Ang2) genlerin ekspresyonu ilaç dozuna bağımlı olarak down regülasyonu indüklemektedir

(Anjiyopoietin-1 (Ang1) hariç). Ang1 ekspresyonun, yalnızca en yüksek BTZ dozu (7.5 nmol/L) kullanılarak azaltılabildiği görülmüştür. Yapılan bu çalışmalar BTZ'nin HUVEC hücrelerini uyarabildiğini göstermiştir. (Hideshima ve ark., 2001; Hideshima ve ark., 2003; Roccaro ve ark., 2006; Tamura ve ark., 2010).

Bortezomib'in cdc2/siklin B kinaz aktivitesini azalttığı düşünülmektedir. G<sub>2</sub> / M geçişindeki hücre döngüsü ilerlemesi cdc2 / siklin B kompleksi aktivitesi ile düzenlenir ve bu kompleksin aktivasyonu art arda meydana gelen şu süreçlerle kontrol edilir: (i) Siklin B proteininin seviyeleri geç S ve G<sub>2</sub> fazları süresince artar; (ii) Siklin B, fosforile edilmemiş cdc2'ye bağlanır ve bir inaktif cdc2 / siklin B kompleksi oluşturur; (iii) Cdc2, G<sub>2</sub> fazı esnasında T14, Y15 ve T161 kalıntılarında fosforile edilir; (iv) Fosfataz cdc25 ile cdc2 üzerindeki T14 ve Y15'in defosforilasyonu cdc2 / siklin B kompleksini aktive eder ve bunun sonucunda hücreler mitoz girer. G<sub>2</sub> / M fazı ile ilgili hücre döngüsü düzenlenmesinde yer alan bu protein modifikasyonlarının, M fazını durdurmak (arrest) yerine G<sub>2</sub>-M geçişini baskıladığı görülmüştür (Tamura ve ark., 2010).

#### **1.1.4.1. Bortezomib'in Gebelik Üzerine Bilinen Etkileri**

BTZ ile tedavi gören çocuk sahibi olma potansiyeline sahip kadınların hamile kalmaması önerilmektedir. BTZ'nin plasenta yoluyla yavruya transferi bilinmemekle birlikte olası bir durumda fetüs gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir ancak rat ve tavşanlarda tolere edilen maksimum dozlarda herhangi bir teratojenitenin gözlenmediği belirtilmiştir. BTZ, organogenez sırasında uygulandığında test edilen en yüksek dozda (yaklaşık 0.5 mg / m<sup>2</sup> / gün) sıçanlarda ve tavşanlarda klinik olmayan gelişimsel toksisite çalışmalarında teratojenik olmadığı tespit edilmiştir. Bu dozlar vücut yüzey alanına dayalı 1.3 mg / m<sup>2</sup> klinik dozun yaklaşık yarısı kadardır ve tek doz bazında hesaplanmıştır. Maternal olarak toksik bir doz olan, en yüksek dozda tavşanlarda yapılan çalışmalarda, implantasyon sonrası kayıpların arttığı ve fetal ağırlığın ise azaldığı bilinmektedir. Materno-toksik olmayan dozda (ortalama 0.3mg/m<sup>2</sup>/gün) yavrudaki değerlerin etkilenmediği görülmüştür (Velcade janssen).

Bu verilerin ışığında sunulan tez çalışmasında in vitro embriyo kültürü yöntemiyle BTZ'nin farklı dönemlerinde bulunan embriyoların gelişimine, canlılığına ve gelişim potansiyelleri üzerinde doza bağlı olarak herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.



## **2.GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. Gereç**

#### **2.1.1. Çalışma Materyali**

Mevcut tez çalışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 02.08.2017 tarihli 93773921/2017/306 sayılı karar ile onay alınmıştır. Sunulan tez çalışmasında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen CD1 ırkına ait 10-12 haftalık 20-28gr ağırlığında dişi (n=40) ve erkek (n=10) farelerin çiftleştirilmesi ile elde edilen embriyolar (n=450) kullanılmıştır. Deney süresince tüm fareler, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde 20-22 °C oda sıcaklığında barındırılarak, yem ve su *ad libitum* olarak verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir.

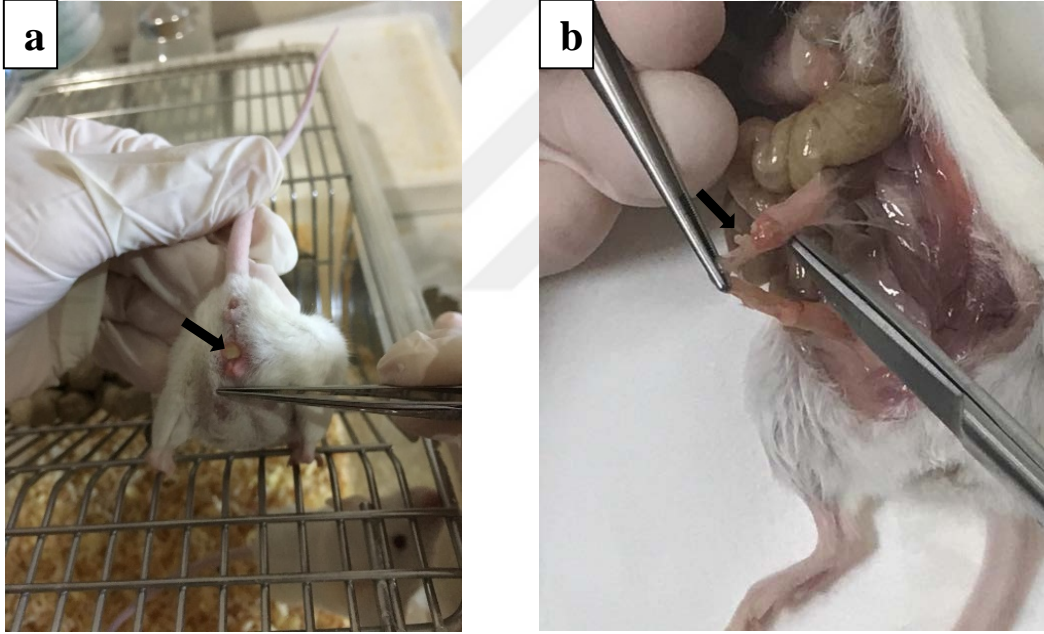
Sunulan tez çalışmasına benzer bir çalışmaya rastlanmadığından Bortezomib'in embriyo gelişimine etkisinin belirlenmesi amacıyla ön çalışma yapılarak doz belirlenmesi yapılmıştır. Bu çalışmada, bir Kontrol (K) grubu ve farklı dozlarda BTZ içeren deney grupları (2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 10nM ve 20nM) yer almaktadır. Kontrol grubu embriyolar üzerine herhangi bir bortezomib uygulaması yapılmamıştır. Deney grubunda ise medium içerisine farklı miktarlarda bortezomib uygulaması yapılmıştır.

### **2.2. Yöntem**

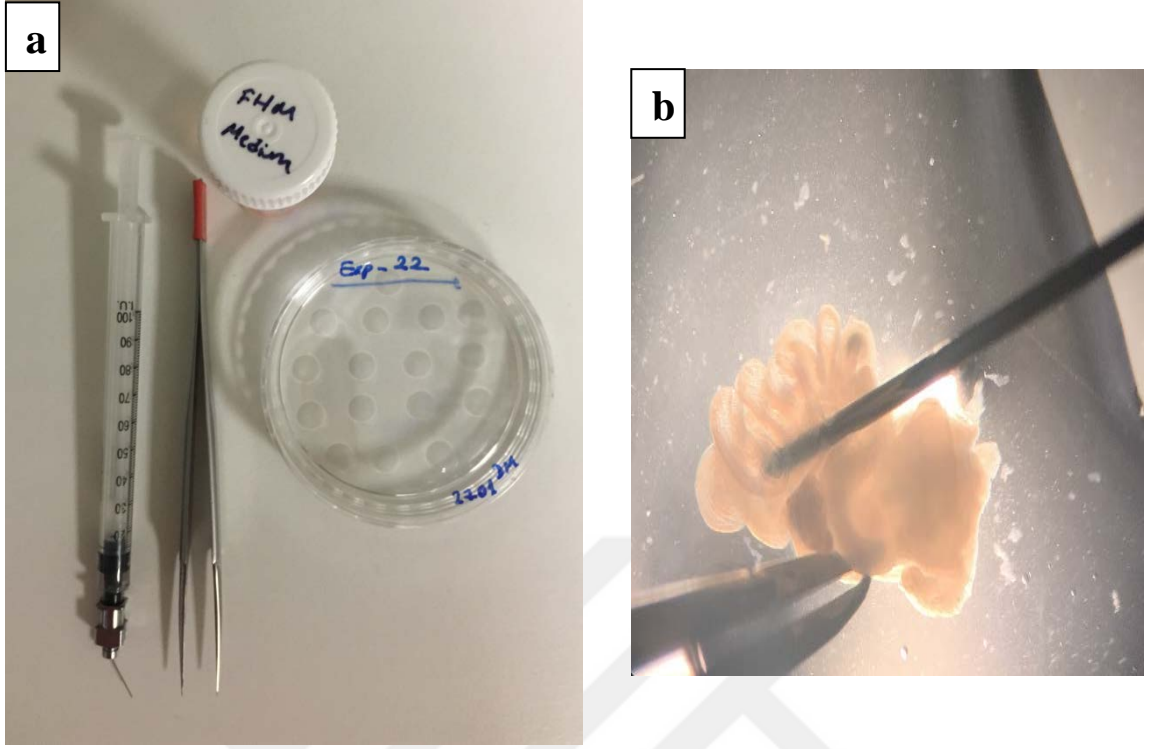
#### **2.2.1. Embriyo Toplanması**

CD-1 ırkı dişi fareler, her kafese en fazla 2 dişi fare olacak şekilde tek olarak kalan erkek farelerin kafeslerine doğal çiftleşmenin sağlanması için dişi fareler yerleştirildi. Ertesi sabah çiftleşmenin etkinliğini gözlemlemek için vaginal plak kontrolü yapılmıştır. Plağın görüldüğü gün 0. gün olarak kabul edilmiş, ertesi gün yani embriyoların iki hücreli evreye ulaştığı gün ise embriyonal dönemin 1. günü

olarak kabul edilmiştir. 1. gün dişi fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Oviduktlar disseke edildikten sonra stereomikroskop altında ovidukt enjektör yardımı ile FHM HEPES- buffered medium (MR-024-D; Milipore) kullanılarak basınçla yıkanmış, iki hücreli embriyolar stereomikroskop altında toplanmıştır. Embriyolar istenilen evrede kullanılmak üzere mineral yağ ile kaplanmış KSOM mediumu (MR-020P-D; Milipore) içinde 37°C’de %5’lik CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş havalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Kontrol grubu, iki hücreli embriyolar inkübatöre konulduktan yaklaşık 24-36 saat (sa) sonra sekiz hücreli embriyo evresine, yaklaşık 42-48 sa sonra morula evresine, yaklaşık 54-66 sa sonra da blastosist evresine ulaşan embriyolar çalışmada kullanılmıştır.



**Şekil 2.1.** (a) Farede vaginal plak (ok) gösterimi ve (b) oviduktun (ok) disseke edilmesi.



**Şekil 2.2.** (a) Elde edilen embriyoların medium içine transfer edildiği petri kabı ve oviduktun yıkanması sırasında kullanılan araçlar (b) Oviduktun medium ile yıkanması.

### 2.2.2. Bortezomib Uygulaması

Kontrol grubu ve yapılan ön çalışma sonucu belirlenen BTZ dozlarına göre oluşturulan her bir deney grubu için 2 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist evrelerinde embriyoları bulunduran petri kapları hazırlanmıştır. BTZ çözücüsü olarak DMSO kullanıldığından öncelikle belirlenen BTZ dozları göz önünde bulundurularak aynı dozlarda DMSO grupları hazırlanmıştır. Kontrol, DMSO ve farklı dozlarda BTZ içeren deney grupları karşılaştırıldığında DMSO'nun Kontrol grubu ile aynı olduğu ve herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı belirlenmiştir (gösterilmeyen data). Bu nedenle çalışmamızda DMSO grubu kullanılmamıştır. Kontrol grubu için 2 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist evrelerinde bulunan embriyolar, 6 cm'lik petri kapları içinde oluşturulan 25µl'lik KSOM mediumu içerisine transfer edilmiştir. Her bir embriyo evresinde farklı BTZ dozları için hazırlanan her bir deney grubu için ayrı ayrı kontrol grupları oluşturulmuş ve bu

oluşturulan 25µl'lik damlaların üzeri mineral yağ ile kaplanarak 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş havalı inkübatöre yerleştirilmiştir.

Öncelikli olarak, farklı BTZ dozları (2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 10nM, 20nM) ile hazırlanmış KSOM medium içerisine iki hücreli evrede (1. gün) bulunan embriyolar transfer edilmiş ve 4. güne kadar belirtilen dozlarda ki mediumlar içerisinde inkübe edilerek, 2., 3. ve 4. günlerde deney grubunda yer alan embriyolardan hayatta kalan (canlı) embriyo sayıları ile kontrol embriyo sayısı karşılaştırılmıştır (Tablo 3.1). Ayrıca 1. günden 4. güne kadar geçen süreçte farklı BTZ dozlarına maruz kalan 2 hücreli embriyolardan, 4 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist aşamasına gelen embriyoların sayıları kontrol embriyoları ile karşılaştırılmıştır ve bununla ilgili grafikler hazırlanmıştır. Bu deney prosedürü sırasında gruplar arasında doğru istatistiksel verileri elde etmek amacıyla her bir deney grubu birbirinden bağımsız olarak 4 kez tekrar edilmiştir.

Aynı zamanda BTZ'in farklı dönemlerde bulunan embriyoların gelişim potansiyellerine (her evredeki embriyonun bir sonraki evreye geçmesi gereken süre boyunca BTZ içeren KSOM medium içerisinde inkübe edilmiş ve kontrol embriyoları ile karşılaştırılmıştır) olan etkisi araştırılmıştır (Tablo 2). Kontrol grubunda olduğu gibi deney grubunda her bir deney grubu (3nM, 5nM ve 10nM) için iki hücreli, sekiz hücreli ve morula ve blastosist evrelerinde olan embriyolar kullanılarak belirtilen dozlarda (3nM, 5nM, 10nM) BTZ içeren medium içerisine transfer edilmiştir. Böylece 2 hücreli evrede belirtilen dozlarda BTZ'e maruz kalan embriyoların 8 hücreli embriyo oluşması, 8 hücreli aşamada belirtilen dozlarda BTZ'e maruz kalan embriyoların morula oluşturan embriyo sayısı ve morula evresinde belirtilen dozlarda BTZ'e maruz kalan embriyolardan blastosist dönemine geçebilen embriyoların yüzde oranları kontrol embriyoları ile karşılaştırılmıştır. Bu deney prosedürü sırasında gruplar arasında doğru istatistiksel verileri elde etmek amacıyla her bir deney grubu birbirinden bağımsız olarak 5 kez tekrar edilmiştir.

**Tablo 3.1.** 1. günden- 4. güne kadar inkübe edilen kontrol ve deney grubu embriyoların 2., 3. ve 4. günlerde hayatta kalan embriyo sayıları ve 2 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist evresine ulaşabilen ve hayatta kalan embriyo sayılarının belirlenmesi için yapılan deneyler için kullanılan embriyo sayılarını gösteren tablo.

Gruplar	Embryo Dönemi [1.günden (2 hücre) - 4.gün (blastosist) aşamasına kadar embriyo gelişimi]
	<b>Kontrol</b>
<b>2 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>
<b>3 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>
<b>4 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>
<b>5 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>
<b>10 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>
<b>20 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>

**Tablo 3. 2.** Farklı dozlarda (3nM, 5nM, 10nM) BTZ'ye farklı dönemlerde (2 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist) maruz bırakılan embriyoların bir sonraki evreye geçiş potansiyellerinin incelenmesi için yapılan deneylerde kullanılan embriyo sayılarını gösteren tablo

Gruplar	Embryo Dönemleri		
	2 hücre-8 hücre	8 hücre-Morula	Morula-Blastosist
<b>Kontrol</b>	<b>(n=30)</b>	<b>(n=15)</b>	<b>(n=15)</b>
<b>3 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>	<b>(n=30)</b>	<b>(n=30)</b>
<b>5 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>	<b>(n=35)</b>	<b>(n=35)</b>
<b>10 nM BTZ</b>	<b>(n=30)</b>	<b>(n=40)</b>	<b>(n=40)</b>



### **2.2.3. Preimplantasyon Dönemi Embriolarında Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi**

Sunulan tez çalışmasında izole edilen, kontrol ve deney (BTZ uygulanan) grubu farklı evrelerdeki embriyoların gelişim yeterlilikleri değerlendirilmiştir. BTZ'in, 2 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist dönemindeki embriyolar üzerine olan muhtemel etkileri embriyolarda görülebilecek tüm morfolojik değişimlere bakılarak stereomikroskop altında değerlendirilmiştir. Genel olarak embriyolar; hücrelerin düzensizliği, blastomerlerin rengi, yapısı, fragmentlerin varlığı ve derecesi, blastomerlerin boyutlarının eşitliğinin derecesi, hücre sayısı gibi kriterlere bakılarak morfolojik olarak değerlendirilmiştir (Van Soom ve ark, 2003; Nasiri ve ark, 2015).

İki hücreli ve sekiz hücreli embriyolar, blastomer fragmentasyonu, hücrede büzüşme (cell shrinkage), bozulmamış zona pellusidanın ayrılması, döllenmemiş oosit ya da yarıklanmayı gerçekleştirilememiş olan zigotlar gibi faktörlere bakılarak değerlendirilmiştir. Morula döneminde embriyo 16-32 kompakt hücreye sahiptir. Normal bir blastosist ise iç hücre kitlesi ve blastosist kavitesini çevreleyen trofoblast hücrelerine farklı olan 32 hücreden fazla blastomer içerir ve tek bir blastosist kavitesi bulundurur. E4.5-5.0 döneminde hatching (blastosistinin artık implantasyon için son hazırlıkları yaptığı zona pellusidadan kurtulması) adı verilen olay gerçekleşene kadar blastosist zona pellusida ile çevrilidir. Bu bilgiler ışığında morula ve blastosist dönemi embriyolar, normal (embriyolar > 10 hücre) ve anormal embriyolar üç tip altında 1) az sayıda (<10) blastomer içeren embriyolar 2) lizis ya da anormal hücreli organizasyonu olan embriyolar ve 3) döllenmemiş oosit ya da yarıklanmayı gerçekleştirilememiş olan zigotlar bu kriterlere bakılarak değerlendirilmiştir (Titenko-Holland ve ark., 1998).

### **2.2.4. Mikroskop ve Görüntü Analizleri**

Aynı deney ve kontrol grubundan olan embriyolar invert mikroskop kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### 2.3. İstatistik Analiz

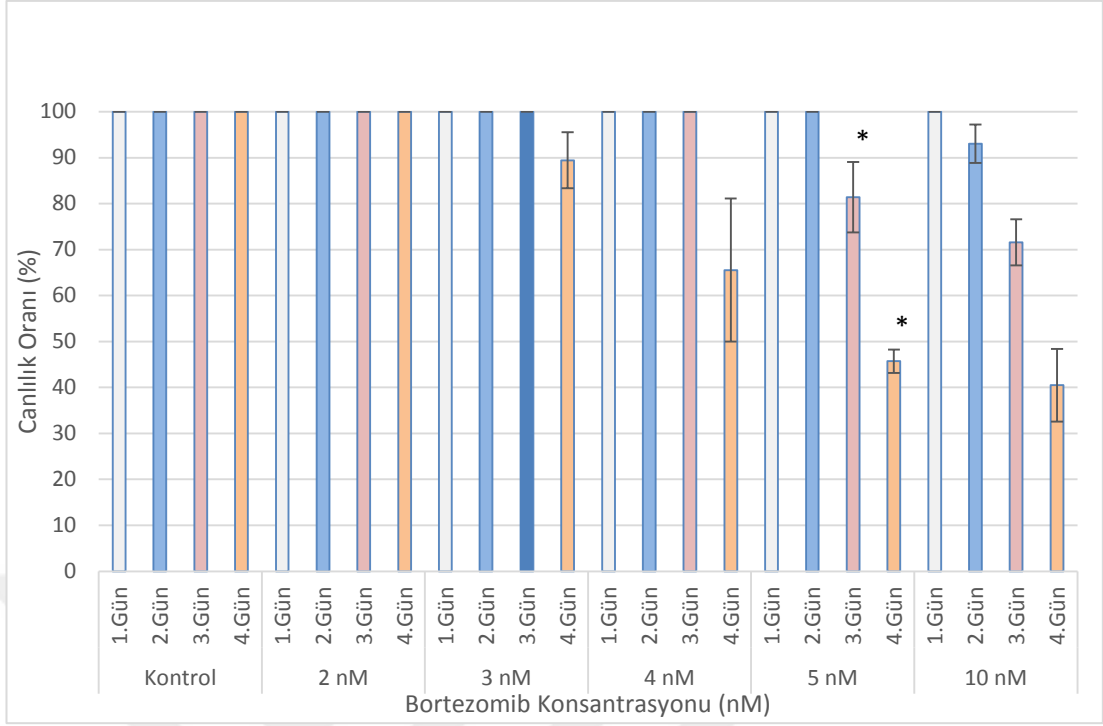
Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılmıştır Değişkenler ortalama±standart hata ile yüzde ve frekans değerleri kullanılmıştır. Ayrıca parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği “ Levene ” testi ile kontrol edilmiştir. Normallik varsayımına ise “ Shapiro-Wilk” testi ile bakılmıştır. Üç ve daha fazla grup karşılaştırması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi ile sağlanmadığında ise Kruskal Wallis ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak dikkate alınmıştır.

### 3. BULGULAR

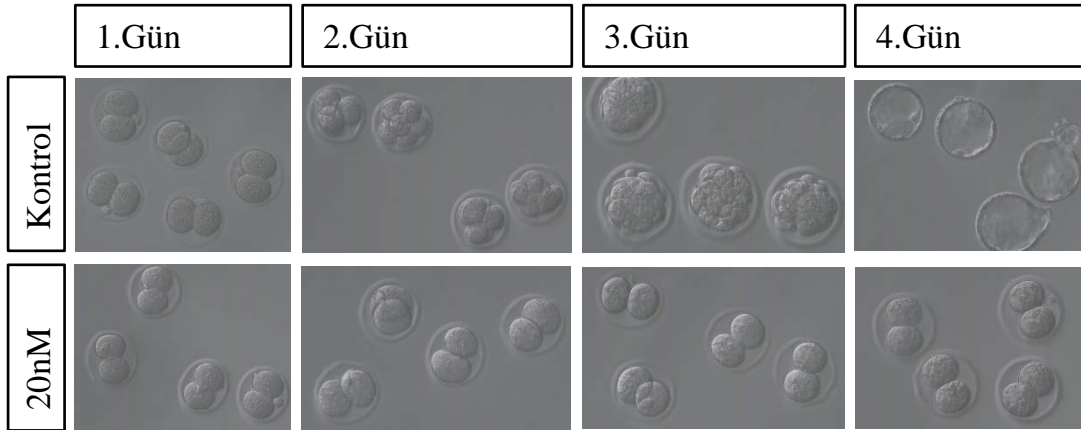
#### 3.1. Embriyolara Farklı Dozlarda Uygulanan Bortezomib'in Embriyo Canlılıkları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

2 hücreli evrede bulunan embriyolar, kontrol (0 nM) ve deney grupları için 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 10nM ve 20nM dozlarda BTZ uygulanmış olan petri kaplarında, 2 hücreli evreden (1.gün) blastosist evresine (4. gün) kadar maruz bırakılarak kültüre edilmiştir. Embriyo canlılıkları, 1. günde BTZ'e maruz bırakılan ve maruz kalmaya devam edilen (4. güne kadar) embriyolar 2., 3. ve 4. günlerde değerlendirilmiştir. BTZ'in hayatta kalan embriyo sayıları yani embriyo canlılıklarına etkisine ilişkin grafik Şekil 3.2' de belirtilmiştir. İlgili grafiğe bakıldığında 2nM, 3nM konsantrasyonların embriyo canlılığı üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ). 3nM konsantrasyonun ise istatistiksel olarak embriyo canlılığında anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ancak embriyoların 4. gündeki canlılık yüzdeleri kontrol embriyoları ile karşılaştırıldığında 4nM, 5nM, 10nM konsantrasyon değerleri için sırasıyla; %65,54, %45,72, %40,48 oranında düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.2). 10nM dozu, diğer BTZ dozları ile karşılaştırıldığında da embriyo canlılık oranlarındaki farklılığın ilk olarak 2. günde görülmeye başlandığı görülmektedir.

20nM dozunun, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise bu konsantrasyonun embriyonik arrest meydana getirdiği ve 2 hücreli embriyoların büyük çoğunluğunun bir sonraki evreye geçemedikleri saptanmıştır (Şekil 3.1). Bu nedenle embriyo canlılığına ilişkin grafikte 20nM konsantrasyonu gösterilmemiştir.



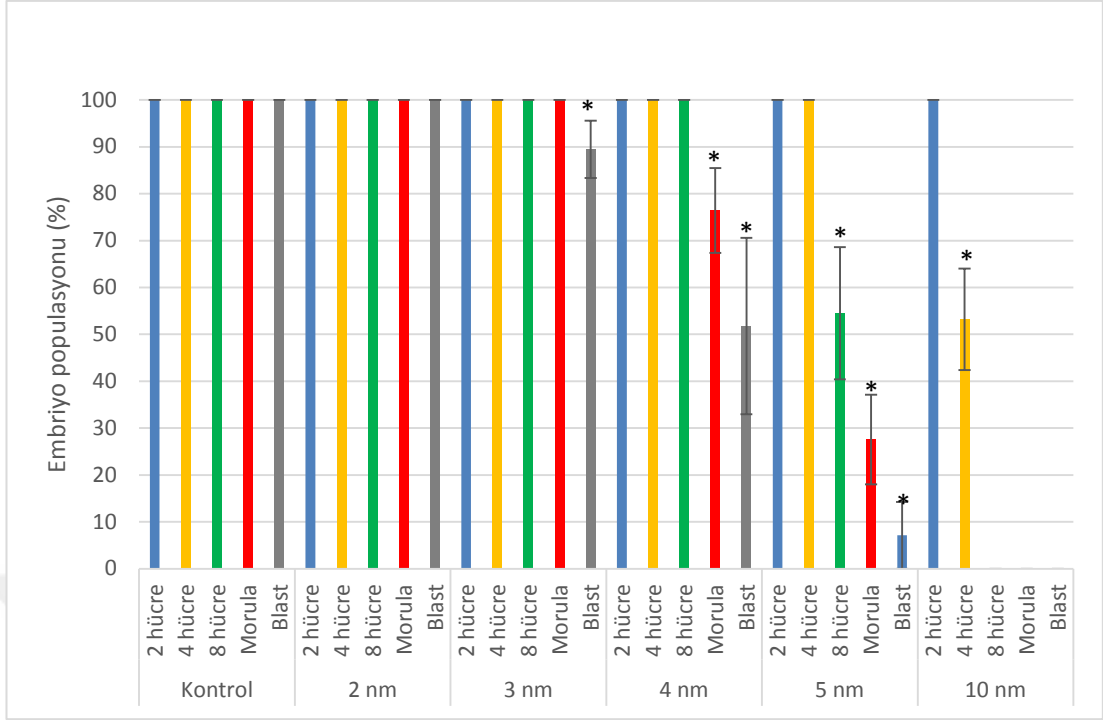
**Şekil 3.1.** BTZ'in 2 hücreli blastosist aşamasına kadar kültüre edilen embriyoların canlılığı üzerine etkisi. Kültürler 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 10nM dozlarda BTZ'e maruz bırakılmıştır ve embriyo canlılık oranları 1, 2, 3 ve 4. gün için değerlendirilmiştir. Değerler birbirinden bağımsız olup dört deneyin ortalama  $\pm$  standart hatası (SEM) (bar) ile gösterilmektedir. Eşleştirilmiş kontrollere kıyasla, \* $p < 0.05$ .



**Şekil 3.2.** Kontrol grubu ve 20nM BTZ uygulanan 2 hücreli embriyoların 4 gün boyunca BTZ içerisinde inkübe edilmesi ve bu süreçteki embriyo gelişimi.

### 3.2. Farklı Dozlarda Uygulanan BTZ'in Embriyoların Gelişim Yeterliliğine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

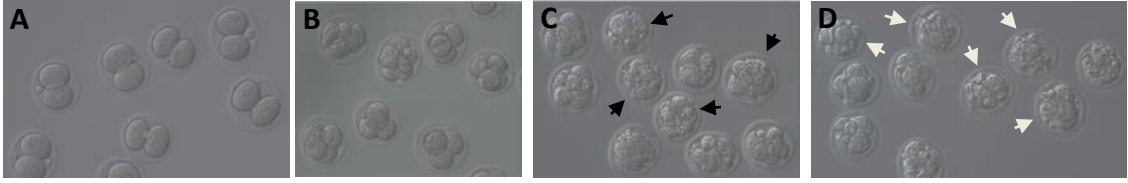
BTZ'in embriyonal gelişim yeterliliğine olan etkisini değerlendirmek amacıyla kontrol ve 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 10nM dozlar için 1. günden (2 hücre), 4. güne (blastosist) kadar belirtilen dozlarda BTZ içerisinde kültüre edilen 2 hücreli embriyolardan 4 hücre, 8 hücre, Morula ve Blastosist meydana gelebilme (oluşma) oranlarına bakılmıştır. 2nM BTZ dozunun embriyo gelişim yeterliği üzerine herhangi bir olumsuz etki olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ) (Şekil 3.3). 3nM dozda ise 2 hücreliden morula aşamasına ulaşmada olumsuz bir etki görülmezken; morula evresinden blastosist (%89,45) evresine ulaşmada kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3.3). Aynı grafikte, 4nM BTZ dozuna bakıldığında 2 hücreliden 8 hücreli aşamaya ulaşmada BTZ'in olumsuz bir etkisinin olmadığı; ancak 8 hücreliden morula (%76,43) ve blastosist (%51,79) evresine ulaşma yeterliliğinde kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). 5 nM doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 hücreli aşama hariç diğer tüm embriyonik dönemler için (8 hücreli %54,53; morula 27,59; blastosist %7,14) ilgili evrelere geçiş gelişim yeterliğinin önemli düzeyde düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca 10 nM konsantrasyonda kültüre edilen 2 hücreli embriyoların 4 hücreli aşamaya kadar gelişebildiği (%53,21), ancak sonraki embriyonik dönemlere geçemediği belirlenmiştir (Şekil 3.3).



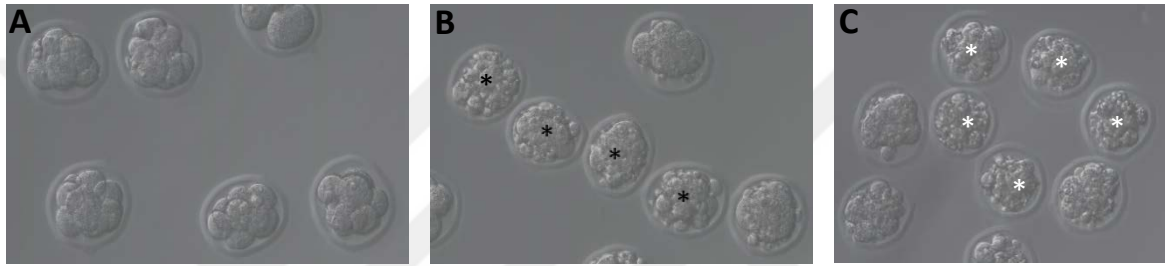
**Şekil 3.3.** Farklı Dozlarda Uygulanan BTZ'in Embriyoların Gelişim Yeterliliğine Olan Etkisi. Kontrol ve farklı dozlarda BTZ ile kültüre edilen embriyoların 2 hücreliden, 4 hücre, 8 hücre, Morula ve Blastosist evresine ulaşma oranlarını göstermektedir. Yıldız işaretleri, aynı aşamadaki kontrollere göre anlamlı bir fark ( $p < 0.05$ ) olduğunu gösterir. Değerler yapılmış olan, dört ayrı deneyin ortalamaları  $\pm$  SEM'dir.

### 3.3. Bortezomib'in Fragmentasyonu İndüklediği Bulgusunun Değerlendirilmesi

Çalışmada 72 saat boyunca 5nM BTZ'e maruz kalan 2 hücreli embriyolarda BTZ'in fragmentasyonu indüklediği görülmüştür (Şekil 3.4). Ayrıca 24 saat boyunca 10nM BTZ'e maruz kalan 8 hücreli embriyolarda fragmentasyonun arttığı invert mikroskop ile çekilen görüntülerle gösterilmiştir (Şekil 3.5).



**Şekil 3.4.** 5nM bortezomib içerisinde 2 hücreli evreden blastosist evresine kadar 72 sa boyunca kültüre edilen embriyoların gelişimi. (A) BTZ de kültüre edilmeye başlanan 2 hücreli embriyolar; (B) 24 sa boyunca BTZ'e maruz kalan embriyolar; (C) 48 sa boyunca BTZ'e maruz kalan embriyolar, embriyolarda ki sitoplazmik fragmentasyonun gösterimi (siyah ok) (D) 72 sa boyunca BTZ'e maruz kalan embriyolar, embriyolarda ki sitoplazmik fragmentasyonun gösterimi (beyaz ok)



**Şekil 3.5.** 10 nM bortezomib içerisinde 8 hücreli evreden blastosist evresine kadar 48 sa boyunca kültüre edilen embriyoların gelişimi. (A) BTZ de kültüre edilmeye başlanan 8 hücreli embriyolar; (B) 24 sa boyunca BTZ'e maruz kalan embriyolar, embriyolardaki sitoplazmik fragmentasyonun bulunduğu gösterimi (siyah yıldız); (C) 48 sa boyunca BTZ'e maruz kalan embriyolar, embriyolarda sitoplazmik fragmentasyonun yoğun olarak görüldüğü embriyoların gösterimi (beyaz yıldız).

### 3.4 Farklı Dozlarda Farklı Embriyo Gelişim Evrelerinde Uygulanan BTZ'in Embriyoların Gelişimine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmada BTZ'in 3nM, 5nM, 10nM dozları, embriyonik gelişimin farklı evrelerinde (2 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist) ayrı ayrı uygulanmıştır. BTZ'in embriyo gelişimine olan etkisini değerlendirmek amacıyla 2 hücreli aşamada bulunan embriyolar kontrol ve belirtilen dozlarda BTZ'e maruz bırakılmıştır ve yaklaşık 24 saat sonra bu 2 hücreli embriyolardan 8 hücreli embriyo meydana getirenlerin sayıları tespit edilmiştir. Aynı şekilde 8 hücreli aşamada kontrol ve belirtilen dozlarda BTZ'e maruz bırakılan embriyolar yaklaşık 24 saat sonra 8 hücreli embriyolardan morula aşamasına geçen embriyo sayıları belirlenmiştir. Ayrıca morula aşamasında bulunan kontrol ve belirtilen dozlarda BTZ'e maruz bırakılmış

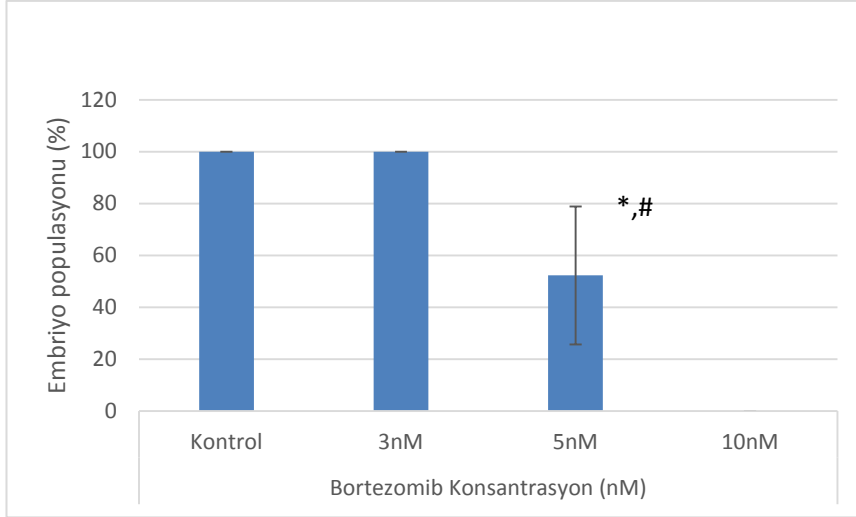
yaklaşık 24 saat sonra blastosist meydana gelen embriyo sayıları belirlenmiştir (Şekil 3.6).

3nM BTZ dozunun 2 hücre, 8 hücre aşamasında bulunan embriyoların sırasıyla 8 hücre ve morula meydana getirmesi üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı görülmüşken morula aşamasında BTZ'e maruz bırakılan embriyoların blastosist meydana getirenlerinin oranı ise %94 olarak hesaplanmıştır ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3.6).

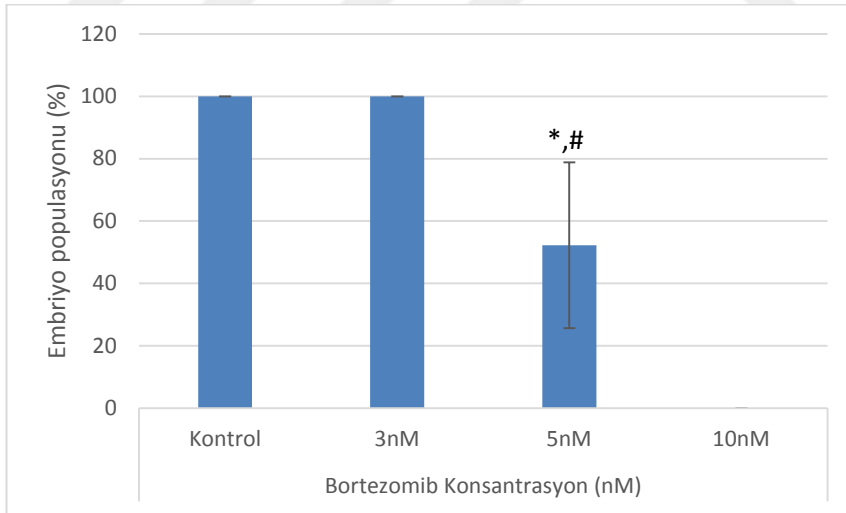
5nM doz için ise 2 hücre, 8 hücre ve morula aşamasında bulunan embriyoların sırasıyla 8 hücre, morula ve blastosist meydana getirme yüzdeleri kontrol ile karşılaştırıldığında, bu oranlar %52,28, %52,28 ve %81,48 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.7).

10nM doza bakıldığında ise 2 hücreli ve 8 hücreli aşamada BTZ'e maruz bırakılan embriyoların hiçbirisinin sırasıyla 8 hücreli ve morula aşamasına geçemediği görülmüştür. Ancak morula aşamasında 10nM BTZ uygulanan embriyoların %52,22'sinin blastosist meydana getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.8).

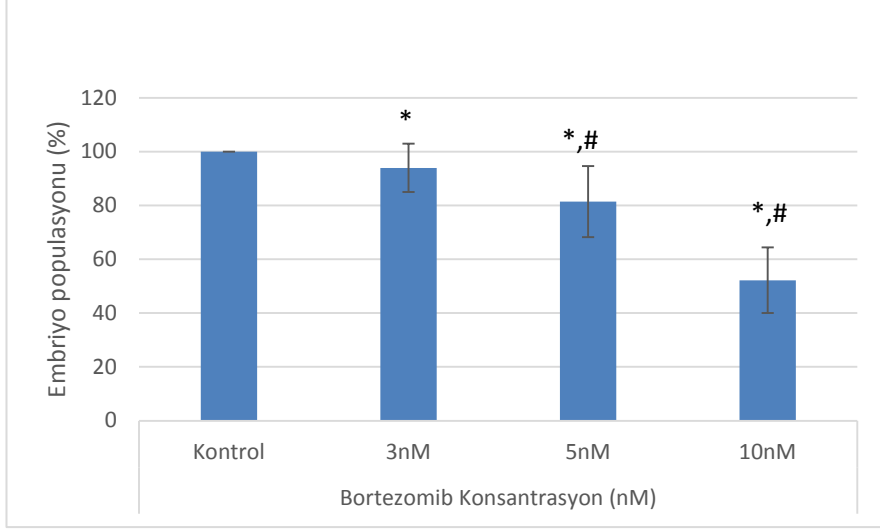




**Şekil 3.6.**Farklı dozlarda BTZ'e maruz bırakılan 2 hücreli embriyolardan 8 hücreli embriyo gelişimi. Kontrol ve farklı dozlarda BTZ ile kültüre edilen embriyoların 2 hücreli evreden 8 hücreli evreye ulaşan embriyoların popülasyonunu göstermektedir. Yıldız işareti, aynı aşamadaki kontrollere göre; # işareti ise 3nM doza göre anlamlı bir fark ( $p < 0.05$ ) olduğunu gösterir. Değerler yapılmış olan, beş ayrı deneyin ortalamaları  $\pm$  SEM'dir.



**Şekil 3.7.**Farklı dozlarda BTZ'e maruz bırakılan 8 hücreli embriyolardan morula aşamasına embriyo gelişimi. Kontrol ve farklı dozlarda BTZ ile kültüre edilen embriyoların 8 hücreli evreden morula evresine ulaşan embriyoların popülasyonunu göstermektedir. Yıldız işareti, aynı aşamadaki kontrollere göre; # işareti ise 3nM doza göre anlamlı bir fark ( $p < 0.05$ ) olduğunu gösterir. Değerler yapılmış olan, beş ayrı deneyin ortalamaları  $\pm$  SEM'dir.



**Şekil 3.8.**Farklı dozlarda BTZ'e maruz bırakılan morula evresindeki embriyoların blastosist meydana getirmesi. Kontrol ve farklı dozlarda BTZ ile kültüre edilen embriyoların morula evresinden blastosist evresine ulaşan embriyoların populasyonunu göstermektedir. Yıldız işareti, aynı aşamadaki kontrollere göre; # işareti ise 3nM doza göre anlamlı bir fark ( $p < 0.05$ ) olduğunu gösterir. Değerler yapılmış olan, beş ayrı deneyin ortalamaları  $\pm$  SEM'dir.

#### 4.TARTIŞMA

Proteazom, nonlizozomal ve ATP-bağımlı proteolitik yollar için esansiyel olan tüm hücrelerde bulunan bir enzim kompleksidir. Ubikuitin-proteazom yolu, hücre döngüsü ilerlemesinin yanı sıra hasarlı, oksitlenmiş veya yanlış katlanmış proteinlerin (Ling ve ark., 2003; Hochstrasser 1995; Jentsch ve ark., 1995; Hershko ve ark., 1998) hücre içi bozulmasında önemli bir rol oynar. Bu hasarlı, oksitlenmiş veya yanlış katlanmış proteinler, UPS için substratlar olarak tanımlanmıştır (Ling ve ark., 2003, Desai ve ark., 1997; Ciechanover ve ark., 1991). Ayrıca, bu sistem, hücre proliferasyonu, farklılaşması, hayatta kalma, apoptoz ve anjiyogenezin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Grimm ve ark., 1996; Roccaro ve ark., 2006). Ubikuitin-proteazom yolu, nükleer ve sitosolik proteinlerin ve özellikle büyümeyi, aktivasyonu ve sinyalleme yöneten kısa süreli düzenleyici proteinlerin çoğunun parçalandığı ana mekanizmayı temsil eder (Chu ve ark., 2009). Proteazom/ubikuitin sisteminin hücresel regülasyon üzerindeki bu benzersiz etkileri nedeniyle, proteazom kanser tedavisi için yeni ve umut verici bir ilaç olarak değerlendirilmektedir (Rajkumar ve ark., 2005; Mani ve Gelmann, 2005).

Seçici 26S proteazom inhibitörü olan bortezomib (PS-341), proteazom için yüksek spesifisiteye sahip bir dipeptid boronik asit inhibitörüdür (Adams, 2003). Bortezomib bir dizi çoklu miyeloma tedavisi için kullanılan lisanslı bir ilaçtır. Bortezomib'in antitümör etkileri ayrıca, göğüs (Teicher ve ark., 1999), akciğer (Ling ve ark., 2003), kolon (Cusack ve ark., 2001), mesane (Johnson ve ark., 2003), pankreas (Nawrocki ve ark., 2004), yumurtalık (Frankel ve ark., 2000), prostat (Frankel ve ark., 2000) ve tiroid (Mitsiades ve ark., 2006) karsinomları dahil olmak üzere çok çeşitli solid tümörler/ solid tümörlerden elde edilmiş hücre hatlarında kapsamlı olarak çalışılmıştır.

Proteazom inhibisyonun kabul edilen mekanizmaları, BTZ'nin prelinik çalışmalarına dayanılarak belirlenmiştir. Bortezomib tümör hücrelerinde intrinsik mitokondriyal yolk, ekstrinsik ölüm-reseptör yolu ve endoplazmik retikulum stres yanıtı yolu aracılığı ile apoptozise neden olur (Nencioni ve ark., 2007; Lee ve ark., 2003; Mitsiades ve ark., 2002). Bu aktivitenin, çeşitli düzenleyici ve pro-apoptotik

proteinlerin degradasyonunun inhibisyonundan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bu süreç, inhibitör I $\kappa$ B'nin bozunmasını önleyerek nükleer faktör (NF)  $\kappa$ B aktivitesinin inhibisyonu; siklinlerin turnover'ların kaldırılması ve sikline bağımlı kinaz aktivitesinin bozulması; JNK stabilizasyonu ve Fas upregulasyonu; bir tümör baskılayıcı olan p53'ün stabilizasyonu ve Bcl-2 protein ailesinde bulunan proteinlerde ki pro-apoptotik ve anti-apoptotik dengenin değişmesi gibi durumları içerir (Nencioni ve ark., 2007). Ayrıca, bortezomib ile meydana gelen proteazom inhibisyonu, katlanmamış protein tepkisi bozulmasına, reaktif oksijen türlerinin üretilmesine ve oksidatif strese neden olur (Dick ve ark., 2010).

Gonadal ve germ hücrelerinin farklılaşması sırasında ubikuitin, ubikuitin aktive ve konjuge eden enzim E1, E2 ve UBC4 ve ubikuitin C terminali hidrolaz L1 (UCH L1), sertoli hücreleri, spermatogonia ve spermatitler tarafından yüksek oranda eksprese edilir (Sutovsky ., 2003). UPS, spermatogenezin mitotik, mayotik ve postmayotik gelişme fazları boyunca sayısız proteinin bozunması için gereklidir (Chu ve ark., 2009). UPS'nin aktivitesi spermatogenez sırasında sitoplazmik ve nükleer proteinlerin büyük çapta yıkımına zorunlu olması nedeniyle yüksektir ((Rajapurohitam ve ark., 2002; Baarends ve ark., 1999; Dickins ve ark., 2002; Sutovsky ve ark., 2002). UPS sahip olduğu birçok fonksiyonla uyumlu olarak, UPS'teki değişiklikler içerisinde patolojik süreç ve sub/infertilitede yer alır. Gerçekten de poliubikuitin geni olan *Ubb (ubikuitin b)*'nin hedeflenen bozulmasının erkek ve kadın infertilitesi (Ryu ve ark., 2008) ve testiküler gen ekspresyon paternlerinde değişikliğe neden olduğu gözlenmiştir (Sinnar ve ark., 2011). Ubikuitin-protein kompleksinden monoübikitin yenilenmesinden sorumlu UCHL1 kaybı, ilk spermatogenezde apoptoz oranını düşürdüğü ve olgunlaşmamış farelerde premayotik germ hücrelerinin sayısını arttırdığı görülmüştür (Kwon ve ark., 2005). Spermatogonialardaki UCHL1'in asimetric dağılımının spermatogonial kök hücrelerin farklılaşması ve sürekliliği ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Luo ve ark., 2009). Bu bilgilere dayanarak bortezomib sonucu meydana gelen proteazom inhibisyonu, katlanmamış protein cevabının bozulmasına, reaktif oksijen türlerinin üretilmesine ve oksidatif strese neden olduğu düşünülmektedir (Hou ve ark., 2014). Hou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BTZ enjeksiyonundan 2 gün sonra testis ağırlığı ve sperm konsantrasyonunda belirgin bir akut azalma olduğu ve sadece hızla

bölünen germ hücrelerini etkilemekle kalmayıp, durgun spermatogonial kök hücre sayısını da düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca germinal epitelyal hasara neden olup ve pubertal seminifer tübüllerin boyuna büyümesini de azaltmaktadır. Erkeklerde doğurganlığı bozmadığı ve BTZ tedavisinin ilk kuşağı etkilemediği görülmüştür. Fakat prepubertal erkek çocukların BTZ ile tedavisin erkek üremesi üzerinde olumsuz etkileri olabileceği düşünülmektedir. Tek bir BTZ döngüsünün sistemik uygulanmasının spermatogenezi önemli ölçüde etkilediği ve sertoli hücre işlev bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir. BTZ, p53 vasıtasıyla germ hücreli apoptozu, kaspaz 8 ve kaspaz 3 yollarını indükler ve FSH düzeyini arttırmaktadır. Böylece BTZ'nin güçlü bir gonadal toksik ilaç olduğu önerilmiştir. Bu sebeple BTZ ile tedavi gören hastalarda gonadal fonksiyonun dikkatle izlenmesi önerilmektedir ( Hou ve ark., 2014).

Bilindiği üzere ubiquitin proteasome yolağı (UPP), tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, en önemli düzenlenmiş hücre içi protein parçalanma sistemidir ve diğerlerinin yanı sıra apoptoz, hücre sağ kalımı, hücre döngüsü ilerlemesi, DNA onarımı gibi işlemlerde yer alır. (Manasanch E ve Orłowski, 2017). Proteazom inhibitörleri, başlangıçta, UPP'nin protein dönüşümünde rolü nedeniyle, kansere bağlı kaşeksinin önlenmesinde faydalı olan ajanlar olarak geliştirilmiştir. Daha sonra, küçük molekül proteazom inhibitörlerinin, kültüre edilmiş hücre dizilerinde ve murin kanser modellerinde apoptozu indükleyebildiğini ve böylece kemoterapötik olarak kullanılabilceği birçok prelinik çalışmalar ile ortaya konmuştur (Manasanch E ve Orłowski, 2017).

Apoptozis, kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi (küçülmesi), zarın kabarcık oluşturması (membrane blebbing), DNA fragmantasyonu, ATP gereksinimi, komşu hücrelerle fagositoz oluşturması ve komşu hücreler üzerinde yararlı etkileri ile karakterize programlanmış bir hücre ölümüdür (Liu ve ark., 2000; Mevorach ve ark., 2010; Kanduc ve ark., 2002; Silva, 2010). Diğer yandan nekroz ise yaralanma nedeniyle meydana gelen hücre ölümüdür ve hücre şişmesi, hasarlı membranın geçirgenliğinin artması, ATP'nin hızlı tükenmesi, DNA fragmentasyonu, hücre lizisi ve komşu hücreye verdiği zararlı etkileri ile karakterize edilir (Mevorach ve ark., 2010; Kanduc ve ark., 2002; Silva, 2010). Nekrozun aksine apoptozis hasarlı

blastomerlerin elimine edilmesini sağlayarak gelişen embriyo için koruyucu bir görev üstlenir ancak apoptotik blastomerlerin oranı arttığı zaman tüm embriyonun da gelişimi durabilir ya da nekrozda olduğu gibi embriyo ölebilir (Chi ve ark., 2011). Sunulan tez çalışmasında doza ve süreye bağımlı olarak embriyoların çeşitli evrelerinde embriyo fragmentasyonunun arttığı gözlemlenmiştir ancak apoptoz ve nekroz için spesifik bir etiketleme yapmadığımızdan oluşan fragmentasyonun hem apoptoz hem de nekroz ile ilgili olma ihtimalini göz ardı edemeyiz. Chi ve ark., fragmente olmuş embriyolarda yaptıkları bir çalışmada fragmentasyon olayının apoptotik hücre ölümünden çok nekroz ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Chi ve ark., 2011). Ancak bazı araştırmacılar ise apoptozu belirlemek için yapılan annexin V boyaması ve nekrozu göstermek için uygulanan PI boyamasının durmuş (arrest) olan ve fragmente olan tüm insan embriyolarında bulunduğunu belirtmişlerdir (Chi ve ark.,2011; Liu ve ark., 2000; Levy ve ark., 1998). BTZ'nin etki mekanizmasına bakıldığında proapoptotik genlerin aktivasyonunu ve antiapoptotik genlerin ise inhibisyonuna neden olmaktadır (Frankland-Searby ve Bhaumik., 2012). Ayrıca proteazom inhibitörlerinin apoptozu indüklediği bu nedenle de kanser tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Manasanch E ve Orłowski, 2017; Chu ve ark., 2009). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda da elde ettiğimiz bulgularda özellikle 5nM ve 10nM konsantrasyonlar da kültüre edilen embriyolarda süreye bağlı olarak blastomer fragmentasyonunun arttığı görülmüştür. Bu fragmentasyon artışının BTZ'nin apoptozu indüklemesi sonucunda şekillendiğini öngörmekteyiz ancak fragmentasyonun sadece apoptoz kaynaklı olduğunu söyleyebilmek için ayırıcı analizlerin yapılması gerekmektedir.

10nM diğer BTZ konsantrasyonlar ile karşılaştırıldığında embriyo canlılık oranlarında ki istatistiksel olarak anlamlı farklılık (düşüş) ilk olarak 2. günde görülmeye başlamışken 5nM konsantrasyonda 3. gün, 4nM ise 4. günde görülmüştür. Bu bulgu bize BTZ uygulamasının doza ve süreye bağlı olarak embriyo canlılık oranları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sebep olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalar, 26S proteasomunun proteolitik fonksiyonunun inhibisyonunun, hücre döngüsü durmasını tetiklediğini göstermiştir (Frankland-Searby ve Bhaumik., 2012). Bu çalışmalarla uyumlu olarak 2 hücreli embriyonik

dönem de 20nM konsantrasyon da BTZ maruz kalan embriyolarda embriyonik arreste meydana geldiği çekilen invert mikroskop görüntüleri ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda 2 hücreli evrede bulunan embriyolar farklı dozlarda BTZ'e maruz bırakılıp, 5 nM doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 hücreli aşama hariç diğer tüm embriyonik dönemler için gelişim yeterliğinin önemli düzeyde düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca 10 nM konsantrasyonda kültüre edilen 2 hücreli embriyoların 4 hücreli aşamaya kadar gelişebildiği ancak sonraki embriyonik dönemlere geçemediği belirlenmiştir. Bu bulgu bize doza ve süreye bağlı olarak BTZ'in erken embriyonik dönem de embriyo gelişimine istatistiki olarak önemli etkisinin olduğu göstermiştir.

Sunulan tez çalışmasında, BTZ'in 3nM, 5nM, 10nM dozları, gelişimin farklı evrelerinde bulunan embriyolara uygulanmış ve BTZ'in farklı evrelerde bulunan embriyoların gelişimine olan etkisi istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre 2 hücreli aşamada 5nM doza maruz bırakılan embriyoların 8 hücreli embriyo oluşturma yüzdeleri kontrol ve 3nM BTZ konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Morula aşamasında 10nM doza maruz bırakılan embriyoların blastosist oluşturma yüzdeleri kontrol ve 3nM BTZ konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Preimplantasyon döneminin ilk evresi olan 2 hücreli aşamada 10nM BTZ maruz bırakılan embriyoların hiçbirinin bir sonraki evreye geçemediği ancak 10nM BTZ'e maruz bırakılan morula evresindeki embriyoların %52,22'sinin blastosist aşamasına gelebildiği tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında farklı embriyonik aşamalarda BTZ'e maruz bırakılan embriyoların gelişim evreleri ilerledikçe bir sonraki embriyonik aşamaya geçebilme yüzdesinin arttığı görülmüştür.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez projesi ile in vitro embriyo kültür yöntemi kullanılarak preimplantasyon döneminin ilk evresi olan 2 hücreli evrede (1. gün) farklı dozlarda BTZ' e maruz bırakılan embriyoların 2. 3. ve 4. günde canlılıkları ve embriyo gelişim yeterlikleri incelenmiştir. Buna ek olarak BTZ'in farklı dönemlerinde bulunan embriyoların gelişimi üzerinde doza bağlı olarak herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda BTZ uygulamasının doza ve süreye bağlı olarak embriyo canlılık oranları ve embriyo gelişimi üzerinde istatistiki olarak anlamlı bir düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Farklı BTZ dozları ile farklı embriyonik aşamalarda BTZ'e maruz bırakılan embriyolar kontrol grupları karşılaştırıldığında, BTZ maruz kalan embriyonun maruz kaldığı embriyonik dönem ilerledikçe bir sonraki embriyonik aşamaya geçebilme yüzdesinin de arttığı görülmüştür. Ayrıca yapılan çalışma da doza ve süreye bağımlı olarak embriyoların çeşitli evrelerinde embriyo fragmentasyonun arttığı gözlemlenmiştir. Proteazom inhibitörlerinin apoptozu indüklediği bilindiğinden embriyolarda meydana gelen fragmentasyonun daha çok apoptozis kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Bununla birlikte 2 hücreli evrede BTZ'e maruz bırakılan embriyoların bir sonraki aşamaya geçemedikleri ve bu embriyolar da embriyonik arrest meydana geldiği tespit edilmiştir.

Literatürde BTZ'in preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, bu tez çalışmasından elde edilen verilerin bu alanda literatüre özgün ve çok önemli katkı sağlayacağını ummaktayız. Bununla birlikte, embriyoda meydana gelen fragmentasyonun apoptoz ya da nekroz kaynaklı olup olmadığının, farklı dozlarda uygulanan BTZ'in, embriyoda DNA hasarına neden olup olmadığının incelenmesi yararlı olacaktır. Ayrıca BTZ'e maruz bırakıp morfolojik olarak incelediğimiz embriyoların embriyo transferi yapılarak, implantasyon başarısına ve post implantasyon gelişimine bakılması da gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

**Adams J (2003).** The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell.*, **5**, 417-421.

**APEX,(2003).**[https://www.myeloma.org/sites/default/files/images/publications/International/PDF/turkish/u-vel\\_2012\\_turk\\_j2web.pdf](https://www.myeloma.org/sites/default/files/images/publications/International/PDF/turkish/u-vel_2012_turk_j2web.pdf) . Erişim Tarihi (09.09.2018).

**Artus J, Cohen-Tannoudji M (2008).** Cell cycle regulation during early mouse embryogenesis. *MCE*, **282**, 78-86.

**Artus J, Piliszek A, Hadjantonakis AK (2011).** The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev Biol.*, **350(2)**, 393-404.

**Baarends WM, Roest HP, Grootegoed JA (1999).** The ubiquitin system in gametogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **151**, 5–16.

**Balakier H, Pedersen RA (1982).** Allocation of cells to inner cell mass and trophectoderm lineages in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol.*, **90**, 352–362.

**Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, Leighton J (2004).** Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *AACR*, **10(12)**, 3954-3964.

**Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003).** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, **113(5)**, 643-655.

**Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J (2006).** Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Developmental Cell*, **10(5)**, 615-624.

**Chi HJ, Koo JJ, Choi SY, Jeong HJ, Roh SI (2011).** Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. *Fertility and Sterility*, **96(1)**, 187-92.

**Chu S, Alexiadis M, Fuller PJ (2009).** Proteasome inhibition by bortezomib decreases proliferation and increases apoptosis in ovarian granulosa cell tumors. *SRI*, **16(4)**, 397-407.

**Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A (1984).** Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutants. *Cell*, **37**, 57-66.

**Ciechanover A** (1994). The ubiquitin- proteasome proteolytic pathway. *Cell*, **79**, 13-21.

**Ciechanover A, DiGiuseppe JA, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM** (1991). Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro. *PNAS*, **88**(1), 139-143.

**Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A** (1984). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, **37**(1), 57-66.

**Cochran E, Bacci B, Chen Y, Patton A, Gambetti P, & Autilio-Gambetti L** (1991). Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease. *AJP*, **139**(3), 485.

**Cusack JC Jr, Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, Baldwin AS** (2001). Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Research*, **61**, 3535-3540.

**Çoban CS, Mutluay D** (2017). Fare Blastosistlerinde Hücre Kaderinin Belirlenmesi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, **5**(2), 218-226.

**David Y, Ternette N, Edelmann MJ, Ziv T, Gayer B, Sertchook R, ... & Navon A** (2011). E3 ligases determine ubiquitination site and conjugate type by enforcing specificity on E2 enzymes. *JBC*, **286**(51), 44104-44115.

**Desai SD, Liu LF, Vazquez-Abad D, D'Arpa P.** Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J Biol Chem.*, **272**, 24159-24164.

**Dick LR, Fleming PE** (2010). Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discovery Today*, **15**, 243-249.

**Dickins RA, Frew IJ, House CM, O'Bryan MK, Holloway AJ, Haviv I, Traficante N, De Kretser DM, Bowtell DD** (2002). The ubiquitin ligase component Siah1a is required for completion of meiosis I in male mice. *Mol Cell Biol.*, **22**, 2294–2303.

**Engür S, Dikmen M** (2015). Kanser tedavisinde proteozom inhibitörlerinin önemi. *FBE*, **31**(4), 182-190.

**Fleming TP, McConnell J, Johnson MH, Stevenson BR** (1989). Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. *J. Cell Biol.*, **108**, 1407–1418.

**Fleming TP (1987).** A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.*, **119**, 520–531.

**Frankland-Searby S, Bhaumik SR (2012).** The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *BBA.*, **1825(1)**, 64-76.

**Genini S, Delputte PL, Malinverni R, Cecere M, Stella A, Nauwynck HJ, Giuffra E (2008).** Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, **89(10)**, 2550-2564.

**Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991).** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.

**Grimm LM, Goldberg AL, Poirier GG, Schwartz LM, Osborne BA (1996).** Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *The EMBO Journal*, **15**, 3835–3844.

**Hershko A, Ciechanover A (1998).** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.*, **67**, 425-479.

**Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Anderson KC (2003).** Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, **101(4)**, 1530-1534.

**Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC (2001).** The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, **61(7)**, 3071-3076.

**Hilt W, Wolf DH (1996).** Proteasomes: destruction as a programme. *Trends in Biochemical Sciences*, **21(3)**, 96-102.

**Hochstrasser M (1995).** Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*, **7(2)**, 215-223.

**Hou M, Eriksson E, Svechnikov K, Jahnukainen K, Söder O, Meinhardt A, Sävendahl L (2014).** Bortezomib treatment causes long-term testicular dysfunction in young male mice. *Mol Cancer*, **13**, 1-10.

**Hyenne V, Louvet-Vallee S, El-Amraoui A, Petit C, Maro B, Simmler MC (2005).** Vezatin, a protein associated to adherens junctions, is required for mouse blastocyst morphogenesis. *Dev Biol.*, **287**, 180–191.

**Jentsch S, Schlenker S (1995).** Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell*, **82(6)**, 881-884.

**Johnson MH, Ziomek CA (1981).** Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol.*, **91**, 303–308.

**Johnson TR, Stone K, Nikrad M, Yeh T, Zong WX, Thompson CB, Nesterov A, Kraft AS (2003).** The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. *Oncogene*, **22**, 4953–4963.

**Jung L, Holle PL, Dalton PWS (2004).** Discovery, Development, and Clinical Applications of Bortezomib. *Oncology*, **18**, 1-2.

**Kanduc D, Mittleman A, Spermico R, Sinigaglia E, Sinha A, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E (2002).** Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol.*, **21**:165–170.

**Karp G (1999).** *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*, John Wiley and Sons Inc., New York, p: 123-231.

**Kidder GM, McLachlin JR (1985).** Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol.*, **112**, 265–275

**Kwon J, Mochida K, Wang YL, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, Wada K (2005).** Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol Reprad*, **73**, 29–35.

**Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH (2003).** Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci.*, **100**, 9946–9951

**Levy JB, Johnson MH, Goodall H, Maro B (1986).** The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol.*, **95**, 213–237.

**Levy R, Benchaib M, Cordonier H, Souchier C, Guerin JF (1998).** Annexin V labeling and terminal transferase-mediated DNA end labeling (TUNEL) assay in human arrested embryos. *Mol Hum Reprod.*, **4**, 775–83.

**Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA., Orth A, ... & Joazeiro CA (2008).** Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PloS one*, **3**(1), 1487.

**Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R (2003).** Mechanisms of proteasome inhibitor PS- 341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res.*, **9**, 1145–1154.

**Liu HC, He ZY, Mele CA, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z (2000).** Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet.*, **17**, 521–533.

**Luo J, Megee S, Dobrinski I (2009).** Asymmetric distribution of UCH-L1 in spermatogonia is associated with maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol.*, **220**, 460–468.

**Manasanch EE, Orlowski RZ (2017).** Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.*, **14**(7), 417-433.

**Mani A, Gelmann EP (2005).** The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *Journal of clinical oncology*, **23**(21), 4776-4789.

**Marikawa Y, Alarcón VB (2009).** Establishment of trophoctoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Molecular Reproduction and Development*, **76**(11), 1019-1032.

**Marikawa Y, Alarcon VB (2012).** *Creation of trophoctoderm, the first epithelium, in mouse preimplantation development.* In *Mouse Development*. Springer, Berlin: Heidelberg, p: 165-184.

**Meilhac SM, Adams RJ, Morris SA, Danckaert A, Le Garrec JF, Zernicka-Goetz M (2009).** Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the Mouse blastocyst. *Dev Biol.*, **331**, 210–221.

**Mevorach D, Trahtemberg U, Krispin A, Attalah M, Zazoun J, Tabib A, Grau A, Verborevski-Reiner I (2010).** What do we mean when we write senescence, apoptosis, necrosis or clearance of dying cells?. *Ann NY Acad Sci.*, **1209**, 1-9.

**Mihajlović AI, Bruce AW (2017).** The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open biology*, **7**(11), 170-210.

**Mitsiades CS, McMillin D, Kotoula V, Poulaki V, McMullan C, Negri J, Fanourakis G, Tseleni-Balafouta S, Ain KB, Mitsiades N (2006).** Antitumor effects of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.*, **91**, 4013-4021.

- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2002).** Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 14374–14379.
- Morris SA, Guo Y, Zernicka-Goetz M (2012).** Developmental plasticity is bound by pluripotency and the Fgf and Wnt signaling pathways. *Cell Rep.*, **2**, 756–765.
- Mutluay D (2016).** Distribution of primitive endoderm and epiblast lineage specific factors in late stage blastocysts. *Slovenian Veterinary Research*, **53(4)**, 211-217.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., & Behringer, R. (2003).** *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Firefly Books.
- Nasiri N, Eftekhari-Yazdi P (2015).** An overview of the available methods for morphological scoring of pre-implantation embryos in in vitro fertilization. *Cell Journal*, **16(4)**, 392-405.
- Naumann I, Kappler R, Von Schweinitz D, Debatin KM, Fulda S (2011).** Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway. *Clin Cancer Res.*, **17(10)**, 1-15.
- Nawrocki ST, Sweeney-Gotsch B, Takamori R, McConke, DJ (2004).** The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics*, **3(1)**, 59-70.
- Nencioni A, Grünebach F, Patrone F, Balestrero A, Brossart P (2007).** Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia*, **21**, 30–36.
- Pearce MJ, Mintseris J, Ferreyra J, Gygi SP, Darwin KH (2008).** Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of Mycobacterium tuberculosis. *Science*, **322(5904)**, 1104-1107.
- Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W (1993).** Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol*, **234**, 932-937.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ (2003).** Inhibition of constitutive NF- $\kappa$ B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *The Journal of Immunology*, **171(1)**, 88-95.
- Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis AK (2008).** Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development*, **135**, 3081– 3091.

**Posfai E, Petropoulos S, de Barros FR, Schell JP, Jurisica I, Sandberg R, Lanner F, Rossant J (2017).** Position- and Hippo signaling-dependent plasticity during lineage segregation in the early Mouse embryo. *Elife*, **6**, 1-24.

**Pratt HP, Ziomek CA, Reeve WJ, Johnson MH (1982).** Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J Embryol Exp Morphol.*, **70**, 113–132.

**Rajapurohitam V, Bedard N, Wing SS (2002).** Control of ubiquitination of proteins in rat tissues by ubiquitin conjugating enzymes and isopeptidases. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **282**, 739-745.

**Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2005).** Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol.*, **23**, 630–639.

**Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Siegel D (2003).** A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *New England Journal of Medicine*, **348(26)**, 2609-2617.

**Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS, Jagannath S, Zeldenrust SR, Alsina M, Munshi NC (2006).** A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, **108(10)**, 3458-3464.

**Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2003).** Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control*, **10(5)**, 361-369.

**Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, Dammacco F (2006).** Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Research*, **66(1)**, 184-191.

**Rossant J (1976).** Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell Mouse eggs. *J Embryol Exp.Morphol.*, **36**, 283–290.

**Rossant J (2004).** Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *In Seminars in cell & developmental biology*, **15**, 573-581.

**Roti, E. C. R., Ringelstetter, A. K., Kropp, J., Abbott, D. H., & Salih, S. M. (2014).** Bortezomib prevents acute doxorubicin ovarian insult and follicle demise, improving the fertility window and pup birth weight in mice. *PLoS One*, **9(9)**, e108174.

**Ryu KY, Sinnar SA, Reinholdt LG, Vaccari S, Hall S, Garcia MA, Zaitseva TS, Bouley DM, Boekelheide K, Handel MA, Conti M, Kopito RR:** The Mouse

polyubiquitin gene Ubb is essential for meiotic progression. *Mol Cell Biol* 2008, 28:1136–1146.

**Sinnar SA, Small CL, Evanoff RM, Reinholdt LG, Griswold MD, Kopito RR, Ryu KY:** Altered testicular gene expression patterns in mice lacking the polyubiquitin gene Ubb. *Mol Reprod Dev* 2011, 78:415–425.

**Silva MT.** Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Letters* 2010;584:4491–9.

**Strauss, S. J., Higginbottom, K., Jülicher, S., Maharaj, L., Allen, P., Schenkein, D., ... & Joel, S. P. (2007).** The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer research*, 67(6), 2783-2790.

**Strous GJ, Govers R.** 1999. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 112:1417-1423.

**Sutovsky P, Neuber E, Schatten G:** Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev* 2002, 61:406–413.

**Sutovsky P (2003).** Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech.*, **61(1)**, 88-102.

**Suwinska A, Czolowska R, Ozdzanski W, Tarkowski AK (2008).** Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol.*, **322**, 133–144.

**Tamura D, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Matsumoto K, Kudo K., Kotani Y (2010).** Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Science*, **101(6)**, 1403-1408.

**Tarkowski AK, Suwinska A, Czolowska R, Ozdzanski W (2010).** Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Dev Biol.*, **348**, 190–198.

**Tarkowski AK, Wroblewska J (1967).** Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8 cell stage. *J Embryol Exp Morphol.*, **18**, 155–180.

**Tarkowski AK (1959).** Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*, **184**, 1286–1287.



- Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J (1999).** The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res.*, **5**, 2638-2645.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000).** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The Embo Journal*, **19(1)**, 94-102.
- Titenko-Holland N, Ahlborn T, Lowe X, Shang N, Smith MT, Wyrobek AJ (1998).** Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day mouse embryos after paternal treatment with acrylamide. *Environ Mol Mutagen.*, **31(3)**, 206-17.
- Treier M, Staszewski LM, Bohmann D (1994).** Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the  $\delta$  domain. *Cell*, **78(5)**, 787-798.
- Unterkircher T, Cristofanon S, Vellank, SHK, Nonnenmacher L, Karpel-Massler G., Wirtz C, Fulda S (2011).** *Bortezomib primes glioblastoma including glioblastoma stem cells for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis.* Clin Cancer Res., clincanres, p: 0075.
- Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A (2003).** Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reprod Biomed Online.*, **7(6)**, 664-670.
- VelcadeJanssen®(2016).**[https://www.janssen.com/australia/sites/www\\_janssen\\_com\\_australia/files/prod\\_files/live/velcade\\_pi.pdf](https://www.janssen.com/australia/sites/www_janssen_com_australia/files/prod_files/live/velcade_pi.pdf) . (Erişim Tarihi: 09.09.2018).
- Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R (1987).** Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol.*, **124**, 451-456.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999).** The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry*, **68(1)**, 1015-1068.
- Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant, J (2006).** Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Developmental Dynamics*, **235(9)**, 2301-2314.
- Yerlikaya A (2004).** Cellular functions of the 26S proteasome. *Turkish Journal of Biology*, **28(1)**, 31-38.
- Ziomek CA, Johnson MH (1982).** The roles of phenotype and position in guiding the fate of 16-cell mouse blastomeres. *Dev Biol.*, **91**, 440-447.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adıve Soyadı** : Cennet Sinem ÇOBAN  
**Doğum Yeri ve Yılı** : KUMLUCA \1994  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**Uyruğu** : TC  
**Telefon No** : 0553 850 00 08  
**Elektronik Posta** :cennetsinem@yahoo.com  
**İletişim Adresi** :Göksu Mahallesi 6895.  
Sokak No:18 Kat:2  
Daire:10  
Kepez/ANTALYA



### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

**Lise:** Kumluca Anadolu Lisesi

**Lisans:** Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık  
Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü, 2016

