

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**PREİMLANTİF DÖNEM FARE EMBRİYO GELİŞİMİNDE**  
**p38 MAPK ARACILI GLUT EKSPRESYONUNUN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Berna SÖZEN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2013**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**PREİMLANTİF DÖNEM FARE EMBRİYO GELİŞİMİNDE  
p38 MAPK ARACILI GLUT EKSPRESYONUNUN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Berna SÖZEN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Necdet DEMİR**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2011.02.0122.005)

**“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”**

**Antalya, 2013**

**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;**

Bu alışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. ....//..../2013

- Tez Danışmanı** : Prof Dr. Necdet DEMİR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Münire Erman AKAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
- Üye : Doç. Dr. iler elik Özenci  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- Üye : Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ....//..../2013 tarih ve ....//.... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Fertilizasyon ile implantasyon arasında geçen yaklaşık bir haftalık süre preimplantasyon gelişim dönemi olarak tanımlanır. Bu dönemde meydana gelebilecek herhangi bir anormallik, embriyonun gelişim potansiyelini ve/veya yaşayabilirliğini etkileyebilmektedir.

Glukoz preimplantasyon embriyolarda 8-hücreli embriyo aşamasından önce kullanılmazken, kompaksiyonun gerçekleşmesinden itibaren embriyo gelişimini destekleyen temel enerji kaynağıdır. Preimplantasyon embriyolarda glukoz transportu, “kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcıları” olarak bilinen GLUT proteinleri aracılığı ile gerçekleştirilir. GLUT proteinleri, preimplantasyon embriyoların değişen çevresel koşullara ve metabolik ihtiyaçlara adaptasyon yeteneğini sağlamaktadırlar.

p38 MAPK (mitojenle-aktive edilen protein kinaz) sinyal yolağı çok sayıda önemli hücrel aktivitede rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, p38 MAPK sinyalinin farmakolojik inhibitörü olan Sitokin Baskılayıcı Anti-İnflamatuar İlaçlar (CSAIDs) kullanılarak p38 MAPK aktivitesinin inhibe edilmesinin, preimplantif gelişimi yavaşlattığı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, p38 MAPK sinyali ile GLUT ekspresyonu arasında bir ilişki olduğu da farklı somatik hücre hatlarında ortaya konulmuştur. Bu bulgular, p38 MAPK yolağının preimplantasyon embriyolarda da glukoz metabolizması ile ilişkili bir mekanizma olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmada 5-6 haftalık dişi farelerden (Balb/C) toplanan 2-hücreli embriyolardan kontrol, çözgen (inhibitör çözücüsünün verildiği) ve inhibitör (20 µM SB203580 verilen) olarak üç grup oluşturulmuştur. *In vitro* kültür süresince embriyoların gelişim potansiyelleri takip edildi ve kontrol grubundaki yarıklanma süresi esas alınarak karşılaştırıldı. Bu üç gruptan *in vitro* ortamda elde edilen 8-hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda GLUT1 ve GLUT4 ekspresyon düzeyleri belirlendi. GLUT1 ve GLUT4 proteinlerinin kalitatif değerlendirmeleri immünfloresan yöntemiyle; bu genlerin mRNA ekspresyonları ise qRT-PCR (kantitatif real time PCR) yöntemi ile belirlendi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, p38 MAPK sinyal aktivitesinin preimplantasyon gelişiminin devamı için gerekli mekanizmalardan biri olduğu görülmektedir. Hücre içerisindeki p38 MAPK sinyal aktivitesinin durdurulmasına bağlı olarak, GLUT1 protein ekspresyonu morula ve blastosist evresi embriyolarda; GLUT4 protein ekspresyonu blastosist evresi embriyolarda belirgin düzeyde azalmaktadır. Ayrıca, p38 MAPK inhibisyonunda blastosistlerde *Glut1* ve *Glut4* mRNA ekspresyon düzeyinde artış gözlenmiş, fakat bu artış anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, preimplantasyon dönem embriyolardaki p38 MAPK sinyali, GLUT1 ve GLUT4 protein ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Çalışmamız, preimplantasyon gelişimi düzenleyen hücre içi mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Preimplantif Embryo, GLUT, p38 MAPK, İmmunofloresan, Fare

## ABSTRACT

Approximately one-week period between fertilization and implantation is defined as preimplantation development. Appearance of any aberration in the cascade of this sequential events may affect the developmental potential and/or the survival of the embryo.

Although glucose is not used in the preimplantation embryos before 8-cell stage, after compaction occurs it is the major energy source to support embryonic improvement. Glucose transport in the embryos is achieved by GLUT proteins known as facilitative glucose transporters. GLUT proteins provide adaptation capability of the the preimplantation embryos to the variable environmental conditions and metabolic demands.

p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling pathway plays a role in many important cellular activities. It has been showed that inhibition of p38 MAPK activity by using the Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drugs (CSAIDs) which is a pharmacological inhibitor of p38 MAPK resulted in decreasing the preimplantation development. In the studies conducted recently, presence of relation between p38 MAPK signalling and GLUT expression has been revealed in different somatic cell lines. These findings thought that p38 MAPK pathway may be associated with the mechanism of glucose metabolism inpreimplantation embryo.

In this study, inhibition of p38 MAPK signaling pathway by using SB203580 (CSAID<sup>TM</sup>) molecule was taken place *in vitro* development of 8-cell, morula and blastocyst stages at which time development is glucose-dependent in mouse (BalbC) embryos. Three groups such as the experiment group (inhibitor-treated group), the vehicle group (inhibitor-solvent treated) and the control group were formed. GLUT1 and GLUT4 expression levels were determined in the 8-cell, morula and blastocyst embryos which had been obtained from those three groups. Qualitative expression of GLUT1 and GLUT4 proteins with immunofluorescence technique and mRNA levels of these genes have been determined with qRT-PCR (quantitative real time PCR) technique.

According to our results, the activity of p38 MAPK signalling pathway appears to be one of the mechanisms necessary for the continuation of preimplantation development. In case of the suppression of the activity of p38 MAPK signal inside the cell, GLUT1 protein expression in morula and blastocyst stage embryos; GLUT4 protein expression in blastocyst stage embryos was significantly decreased. In addition, in the precense of p38 MAPK inhibition, increased level of *Glut1* and *Glut4* mRNA expression was observed in blastocysts, but this increased was not statistically significant.

As a result, p38 MAPK signalling pathway in preimplantation embryos plays a role in the regulation of GLUT1 and GLUT4 protein expression. Our study may contribute to the understanding the intracellular mechanisms that regulate preimplantation development.

**Keywords:** Preimplantation Embryo, GLUT, p38 MAPK, Immunofluorescence, Mouse

## TEŞEKKÜR

Akademik yoldaki ilk basamağım olan yüksek lisans eğitimim süresince yol göstericiliği ve tez projemin gerçekleştirilmesi için hem maddi hem de manevi desteğiyle her zaman yanımda olan sayın danışman hocam Prof. Dr. Necdet Demir'e;

Tezimin projelendirilmesi sırasında görüş ve önerileri ile destek olan Yrd. Doç. Dr. Aylin Yaba Uçar'a;

Tez projemi gerçekleştirirken gerek bilgi ve tecrübeleri gerekse manevi desteği ile yardımcı olan Araş. Gör. Saffet Öztürk'e;

Çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum her an yanımda oldukları için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına;

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına;

Tüm eğitim yaşamım boyunca sağladıkları imkanlar ve yoğun destekleri için sevgili ailemin tüm fertlerine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	xiv
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	4
<b>2.1. Fare Preimplantasyon Embriyo Gelişimi: Fertilizasyondan İmplantasyona</b>	4
<b>2.1.1. Zigot Yarıklanmaları</b>	5
<b>2.1.2. Embriyonik Genom Aktivasyonu</b>	6
<b>2.1.3. Kompaksiyon: Sıkılaşıma ve Hücre Polarizasyonunun Kazanılması</b>	6
<b>2.1.4. Kavitasyon ve Blastosist Oluşumu</b>	8
<b>2.2. Preimplantasyon Dönem Embriyoların Nitelikleri</b>	9
<b>2.2.1. Erken Dönem Preimplantasyon Embriyolar</b>	10
<b>2.2.2. Geç Dönem Preimplantasyon Embriyolar</b>	10
<b>2.3. Preimplantasyon Embriyolarda Metabolik Adaptasyon</b>	11
<b>2.3.1. Preimplantasyon Embriyolarda Trikarboksilik Asit Döngüsü (TCA)</b>	12
<b>2.3.2. Preimplantasyon Embriyolarda Glikolitik Yolak</b>	13
<b>2.4. Preimplantasyon Embriyo Gelişiminde Metabolik Kontrolün Düzenlenmesi</b>	15
<b>2.4.1. Preimplantasyon Embriyo Gelişiminde İntrinsik Faktörler</b>	15

2.4.1.1.	Enzim Sistemleri	15
2.4.1.2.	Plazma Membran Transport Sistemleri	16
2.4.2.	Preimplantasyon Embriyo Gelişiminde Ekstrinsik Faktörler	20
2.4.2.1.	Fare Dişi Üreme Sistemindeki Metabolik Koşullar	20
2.5.	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolağı	21
2.5.1.	p38 MAPK Sinyal Yolağı	22
2.5.1.1.	p38 MAPK İzofomları	22
2.5.1.2.	p38 MAPK Üst Basamak Substratları	23
2.5.1.3.	p38 MAPK Alt Basamak Substratları	23
2.5.1.4.	p38 MAPK Tarafından Aktive Edilen Transkripsiyon Faktörleri	24
2.5.1.5.	p38 MAPK Regülasyonunun Baskılanması	25
2.6.	Çalışmanın Hipotezi	26
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>		<b>27</b>
3.1.	Süperovulasyon Protokolü	27
3.1.1.	Gonadotropinlerin Hazırlanışı	27
3.1.2.	Gonadotropinlerin Uygulanması	27
3.2.	Embriyoların Toplanması	27
3.3.	Embriyo Kültürü ve İnhibitör Uygulaması	28
3.3.1.	Çalışmada Kullanılan <i>In Vitro</i> Embriyo Kültür Medyumları	28
3.3.2.	İnhibitörün Hazırlanışı	29
3.3.3.	Deney Grupları	29
3.3.4.	Embriyoların Gelişim Takibi ve İvert Mikroskopta Değerlendirilmesi	30
3.3.5.	İstatistiksel Analiz	30
3.4.	İmmünofloresan Boyama	30
3.4.1.	Preimplantasyon Embriyolarda p38 MAPK Sinyal Yolağı İnhibisyonunun Gösterilmesi	31
3.4.2.	Preimplantasyon Embriyolarda Glukoz Taşıyıcı Proteinlerin Gösterilmesi	32
3.4.3.	İmmünofloresan Boyama Yöntem Basamakları	32



3.5.	Kantitatif Real-Time PCR Tekniği	33
3.5.1.	Total RNA İzolasyon Basamakları	34
3.5.2.	cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	34
3.5.3.	Kantitatif Real-Time PCR Uygulama Basamakları	35
3.5.4.	İstatistiksel Analiz	36
<b>BULGULAR</b>		<b>37</b>
4.1.	<i>İn vitro</i> Kùltür Ortamlarındaki Embriyoların Gelişim Potansiyelleri	37
4.1.1.	Embriyoların Gelişim Takibi	37
4.1.2.	Embriyoların Gelişme Oranlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi	38
4.1.3.	Evre-Spesifik Gelişim Oranları ve Embriyoların İvert Mikroskobunda Değerlendirilmesi	39
4.1.3.1.	Sekiz-Hücreli Embriyo Evresi	39
4.1.3.2.	Kompakt Morula Evresi	40
4.1.3.3.	Blastosist Evresi	42
4.2.	İmmünofloresan Bulguları	44
4.2.1.	Preimplantasyon Embriyolarda p38 MAPK Sinyal Yolağı İnhibisyonunun Gösterilmesi	44
4.2.1.1.	Sekiz-Hücreli Embriyo Evresinde p38 MAPK İnhibisyonunun Gösterilmesi	44
4.2.1.2.	Morula Evresi Embriyolarda p38 MAPK İnhibisyonunun Gösterilmesi	45
4.2.1.3.	Blastosist Evresi Embriyolarda p38 MAPK İnhibisyonunun Gösterilmesi	46
4.2.2.	p38 MAPK Aktivitesi Baskılanan Preimplantasyon Embriyolarda Glukoz Taşıyıcı Protein Ekspresyonları	47
4.2.2.1.	Sekiz-Hücreli Embriyo Evresinde GLUT1 İmmünofloresan Bulguları	48
4.2.2.2.	Morula Evresi Embriyolarda GLUT1 İmmünofloresan Bulguları	49
4.2.2.3.	Blastosist Evresi Embriyolarda GLUT1 ve GLUT4 İmmünofloresan Bulguları	50
4.3.	Kantitatif Real-Time PCR Bulguları	51

4.3.1.	İnhibitör Uygulamasının Embriyolardaki <i>Glut1</i> mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi	52
4.3.2.	İnhibitör Uygulamasının Blastosistlerdeki <i>Glut4</i> mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi	52
	<b>TARTIŞMA</b>	<b>53</b>
	<b>SONUÇLAR</b>	<b>60</b>
	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>62</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>73</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>BSA</b>	:	Sığır Serum Albumin
<b>cDNA</b>	:	Komplementer DNA
<b>CSAID</b>	:	Sitokin Baskılayıcı Anti İnflamatuar İlaç
<b>DAPI</b>	:	4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
<b>DMSO</b>	:	Dimetil Sülfoksit
<b>EGA</b>	:	Embriyonik Genom Aktivasyonu
<b>E-kadherin</b>	:	Epitelyal kadherin
<b>F6P</b>	:	Fruktoz-6-Fosfat
<b>FAO</b>	:	Yağ Asidi Oksidasyonu
<b>FSH</b>	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>G6P</b>	:	Glukoz-6-Fosfat
<b>G6PD</b>	:	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
<b>GLS</b>	:	Glutasyon-S-Transferaz
<b>GLUT</b>	:	Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcısı
<b>hCG</b>	:	İnsan Koryonik Gonadotropini
<b>HK</b>	:	Hekzokinaz
<b>HTF</b>	:	İnsan Tubal Sıvısı
<b>I.U.</b>	:	International Unit
<b>LDH</b>	:	Laktat Dehidrogenaz
<b>LH</b>	:	Luteinize Hormon
<b>MAPK</b>	:	Mitogenle-Aktive Edilmiş Protein Kina
<b>MCT</b>	:	Monokarboksilat taşıyıcısı
<b>ME</b>	:	Malik Enzim
<b>NADPH</b>	:	Nikotinami de Adenin di Nükleotid Fosfat
<b>NGS</b>	:	Normal Keçi Serumu
<b>PBS</b>	:	Fosfat tamponlu Tuz
<b>PDH</b>	:	Piruvat Dehidrogenaz
<b>PDK</b>	:	Fosfat Dehidrogenaz
<b>PFK</b>	:	6-Fosfofruktokinaz
<b>PGAM</b>	:	Fosfogliseramutaz
<b>p-hsp27</b>	:	fosfo-ı11 şok proteini 27
<b>p-MK2</b>	:	fosfo-MAPKAPK2
<b>PMSG</b>	:	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
<b>SGLT</b>	:	Sodyum bağlı glukoz taşıyıcıları
<b>qRT-PCR</b>	:	quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction
<b>TCA</b>	:	Trikarboksilik Asit Döngüsü
<b>ZO-1</b>	:	Zonula Okludens-1

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa No
2.1.	Fertilizasyondan sonra pronukleusların füzyonu	4
2.2.	Farede preimplantasyon gelişim süreci	5
2.3.	Fare preimplantasyon gelişiminde embriyonik genom aktivasyonu	6
2.4.	Kompaksiyon SEM görüntüleri	7
2.5.	Kompaksiyonun başlaması ile embriyonik polarizasyonun indüklenmesi	7
2.6.	Kompaksiyon sürecinde embriyolardaki hücrel polarizasyon	8
2.7.	Trofoekderm hücrelerindeki su ve iyon transport	9
2.8.	Fare blastosist aşaması embriyosu	9
2.9.	Fare erken dönem preimplantasyon embriyo aşamaları	10
2.10.	Fare geç dönem preimplantasyon embriyo aşamaları	10
2.11.	Preimplantasyon sürecinde embriyoların kullandığı enerji substratlarının moleküler yapıları ve bu substratların glikoliz ve TCA döngüsü ile metabolizasyonları	12
2.12.	Glukoz metabolik yolağı	13
2.13.	Preimplantasyon embriyolarda metabolik adaptasyon	14
2.14.	Hücre membranında glukoz transportu	17
2.15.	Glukoz transporter ailesinin dentogramı	18
2.16.	Blastosistte glukoz transport modeli	19
2.17.	MAPK sinyal yolağı ve hücrel yanıtlar	22
2.18.	p38 MAPK sinyali	24
3.1.	Çalışmada uygulanan <i>in vitro</i> kültür deney düzeneğı	28
3.2.	Çalışmada kullanılan kültür düzeneğı	29
3.3.	Hücre içerisindeki p38 MAPK sinyal aktivitesi doğrultusunda hsp27 ve MK2 proteinlerinin fosforillenmesi	32
4.1.	<i>In vitro</i> kültür ortamlarındaki gelişme oranlarının total sonuçları	38
4.2.	<i>In vitro</i> kültür gruplarındaki embriyoların 8-hücreli embriyo aşamasına gelişme oranları	39

4.3.	Kültürdeki 8-hücreli embriyoların invert mikroskopunda değerlendirilmesi	40
4.4.	<i>İn vitro</i> kültür gruplarındaki embriyoların morula aşamasına gelişme oranları	41
4.5.	Morula evresine ulaşmış embriyoların invert mikroskopunda değerlendirilmesi	41
4.6.	<i>İn vitro</i> kültür gruplarındaki embriyoların blastosist aşamasına gelişimsel oranları	42
4.7.	<i>İn vitro</i> kültürde blastosist evresine ulaşmış embriyoların invert mikroskopunda değerlendirilmesi.	43
4.8.	<i>İn vitro</i> kültürde blastosist evresine ulaşmış embriyoların morfolojik görüntüleri	44
4.9.	Sekiz-hücreli embriyolarda p38 MAPK inhibisyonunun MK2 ve hsp27 protein fosforilasyonları üzerine etkisi	45
4.10.	Morula aşamasındaki embriyolarda p38 MAPK inhibisyonunun MK2 ve hsp27 protein fosforilasyonları üzerine etkisi	46
4.11.	Blastosist aşamasındaki embriyolarda p38 MAPK inhibisyonunun MK2 ve hsp27 protein fosforilasyonları üzerine etkisi	47
4.12.	Sekiz-hücreli embriyolarda GLUT1 protein ekspresyonları	48
4.13.	Morula evresi embriyolarda GLUT1 protein ekspresyonları	49
4.14.	Blastosist evresi embriyolarda GLUT1 ve GLUT4 protein ekspresyonları	51
4.15.	<i>İn vitro</i> kültür gruplarındaki embriyonik gelişim süresince <i>Glut1</i> mRNA ekspresyonu	52
4.16.	<i>İn vitro</i> kültür gruplarındaki blastosistlerde <i>Glut4</i> mRNA ekspresyonu	52

## TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa No
2.1.	Preimplantasyon embriyolardaki enerji metabolitlerinin seviyeleri	14
2.2.	Preimplantasyon dönem fare embriyolarında PFK ve KH aktivitesi	16
2.3.	Fare preimplantasyon dönem embriyolarda tanımlanmış monokarboksilat taşıyıcılar	16
2.4.	Fare preimplantasyon dönem embriyolarda tanımlanmış glukoz taşıyıcıları	20
2.5.	p38 MAPK izoformlarının özellikleri	22
3.1.	İmmüno floresan işaretleme yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve dilüsyon oranları	33
3.2.	Komplementer DNA eldesinde kullanılan içerikler ve konsantrasyonları	35
3.3.	qRT-PCR yönteminde kullanılan içerikler ve miktarları	35
3.4.	qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler	36
3.5.	Çalışmada kullanılan PCR programı	36
4.1.	Embriyoların <i>in vitro</i> gelişim potansiyelleri	37

# GİRİŞ

## 1.1 Hipotezin Temeli ve Amaç

Memeli gelişimi, yüksek derecede farklılaşmış, transkripsiyonel olarak sessiz iki germ hücresinin füzyonu ile başlar. Fertilizasyonun gerçekleşmesinden sonra oluşan zigotun endometriyuma implante olana kadar geçirdiği yaklaşık bir haftalık süreç preimplantasyon (tutunma öncesi) gelişim olarak tanımlanır. Preimplantasyon gelişimi, embriyonun bir seri yarıklanma bölünmesi geçirmesi, embriyonik genom aktivasyonu (EGA), kompaksiyon, kavitasyon (blastosöl oluşumu) ve sonunda zona pellusidadan çıkarak (hatching) endometriyuma implantasyonu ile karakterizedir. Bu süreçlerin başarılı bir şekilde tamamlanması, gebeliğin sürdürülmesi için ilk koşuldur. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, preimplantasyon dönem embriyoların çevresel koşullara duyarlı olduğunu göstermişlerdir (1, 2). Bu çevresel koşullar, hem prenatal hem de postnatal dönemdeki büyüme ve gelişim potansiyelini etkileyebilir.

Preimplantif embriyo gelişim süreci, erken ve geç dönem olmak üzere iki evreye ayrılmaktadır. Kompaksiyon öncesi erken yarıklanma dönemi embriyolar, nisbeten daha basit bir fizyoloji sergilerken; kompaksiyondan sonra daha çok somatik hücre benzeri bir fizyoloji kazanırlar ve metabolik ihtiyaçları artar (3). Erken yarıklanma dönemindeki embriyolar (zigot, 2-hücreli, 4-hücreli embriyo) metabolik enerji kaynağı olarak piruvata ihtiyaç duyar. Farede, zigotun birinci yarıklanması piruvatın varlığına ihtiyaç duyarken (4), ikinci yarıklanma ise hem piruvat hem de laktat kullanımı ile gerçekleşmektedir (5, 6). Kompaksiyon sürecinde piruvat ve laktatın oksidasyonu devam ederken, glukolitik metabolizma da başlar. Kompaksiyondan sonra, geç yarıklanma dönemindeki embriyolar (8-hücreli, morula ve blastosist) ise enerji kaynağı olarak glukozu bağımlı hale gelir (7, 8, 9). Preimplantif embriyoların gelişim döneminde enerji elde ettikleri yollar farklılık göstermektedir. Kompaksiyondan önceki dönemde embriyolar buldukları mikroçevreden aldıkları piruvat ve laktatı, mitokondrilerde gerçekleşen trikarboksilik asit döngüsüyle (TCA) enerji eldesinde kullanmaktadırlar. Bu dönemdeki embriyoların, glukozdan piruvatın elde edildiği yolak olan glikoliz için gerekli enzim miktar ve aktiviteleri oldukça düşüktür. Kompaksiyonun gerçekleşmesi ile birlikte glikolitik enzimlerin miktar ve aktivitesinde de artış meydana gelmektedir (71, 72). Böylece, geç yarıklanma dönemi embriyolar, sitozolde bulunan glikolitik yolağa ait enzimler ile glukozu parçalar ve enerji ihtiyacını karşılar. Sonuçta, kompaksiyona girmemiş embriyolar sitozolde glukozu piruvata kadar parçayamayacaklarından dışarıdan hazır piruvat veya laktat alıp yalnızca TCA döngüsü kullanırken, kompaksiyon sonrası embriyolar glikolitik yolak ile sitozoldeki glukozu parçalayabilirler. Preimplantasyon gelişimde 8-hücreli evreden itibaren glukoz alınımı ve kullanımı embriyonun canlılığının devamlılığı ve gelişimi kritik bir öneme sahiptir. Geç yarıklanma döneminde, hücre içerisine glukoz alınımı ve hücre içerisinde glukoz kullanımında oluşabilecek bozukluklar embriyo gelişimini etkileyerek, embriyonik letaliteye sebep olabilmektedir (10, 11).

Plazma membranı boyunca glukoz taşınımı, ökaryotik hücrelerde glukoz taşıyıcı kanallar aracılığı ile olmaktadır. Bu kanallar hücrelere metabolik destek

sağlayarak, enerji ihtiyacının karşılanmasından sorumludurlar. Glukoz taşıyıcılarının iki sınıfı bulunmaktadır: konsantrasyon gradienti ile çalışan Sodyum-Bağımlı Glukoz Taşıyıcıları (SGLT) ve enerji bağımsız Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcıları (GLUT). SGLT ailesinin, preimplantasyon dönem embriyo gelişimindeki varlığı kesinlik kazanmamıştır (81).

Mevcut bilgilere göre, GLUT ailesinin GLUT1-12 ve H<sup>+</sup> bağılı myo-inositol-taşıyıcı (HMIT) olmak üzere yüksek derecede sekans homolojisi gösteren on üç üyesi bulunmaktadır.. GLUT ailesi proteinleri, sekans benzerliği ve karakteristik elementlerine göre üç alt sınıfa ayrılmıştır. Bunlar GLUT 1-4'ü içeren, sınıf I; GLUT 5,7,9,11'i içeren, sınıf II; ve GLUT 6,8,10,12 ve HMIT'i içeren, sınıf III'tür. GLUT proteinleri substrat özgünlüğü, kinetik karakteristiği, doku ve hücresele dağılımları bakımından farklı özelliklere sahiptirler (12). Yapılan çalışmalarda, gelişimin farklı aşamalarındaki preimplantif embriyolarda çeşitli GLUT proteinlerinin varlığı ve her bir transport kanalının farklı hücresele lokalizasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda, gelişim sürecinde önemli rollere sahip olduğu bilinen bu transport proteinlerinin ekspresyonunu kontrol eden hücre içi sinyal mekanizmalarına ilişkin çalışmalar yayınlanmış olsa da, literatürde bu proteinlerin erken embriyonik gelişimdeki kontrol mekanizmalarına ilişkin net bir bilgi bulunmamaktadır (13, 14, 15).

Mitojenle-aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı hücre proliferasyonu, büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi pek çok hücresele süreçte rol oynamaktadır (16). MAPK süperailisi dört farklı ardışık sinyal basamağından oluşmaktadır: c-Jun N-terminal kinaz veya stres aktivasyonlu protein kinazlar (JNK/SPKs) (17, 18), ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazlar (ERKs) (19), ERK5 veya büyük MAP kinaz 1 (20, 21) ve p38 MAPK grup kinazlar (22). Preimplantasyon dönemi embriyolarda p38 MAPK sinyal yolağı varlığı ilk kez 2004 yılında Natale D.R. ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (23). Bu çalışmada, p38 MAPK sinyalinin blastosiste kadar gelişen embriyonun normal gelişimini sürdürebilmesi için gerekli olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, p38 MAPK'nin farmakolojik inhibitörleri olan sitokin baskılayıcı anti-inflamatuar ilaçlar (CSAIDs) kullanılarak yapılan p38 MAPK aktivitesinin inhibe edilmesi sonucunda preimplantif gelişimin yavaşladığı gösterilmiştir (23). Yine, daha sonraki yıllarda p38 MAPK inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda bulgular, özellikle kompaksiyon sonrası aşamalarındaki preimplantif embriyoların bu inhibisyonla etkilendiği, embriyonik gelişimde durma ve blastosist aşamasında belirgin morfolojik defektlere neden olduğu yönündedir (24, 25, 26). Literatürde var olan p38 MAPK inhibisyonunun preimplantif dönem embriyolarda neden olduğu gelişimsel defektlerin özellikle embriyonun glukoza bağımlı olduğu 8-hücreli embriyo aşamasından sonra (kompaksiyon sonrasında) gerçekleşmesi, bu inhibisyonun metabolik ihtiyaçları karşılayan mekanizmalarla da ilişkili olabileceği fikrini akla getirmektedir.

Farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalar, MAPK sinyali ile GLUT ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu da göstermektedir. GLUT aktivasyonunda p38 MAPK sinyal yolağı etkili olduğu farklı laboratuvarlarda ve farklı hücre hatlarında gösterilmiştir (27, 28). Taha C. ve arkadaşları tarafından L6 kas hücresi hattında yapılan çalışmada GLUT1 ekspresyonunun p38 MAPK aracılığıyla olduğu



gösterilmiştir (29). Montessuit C. ve arkadaşlarının ergin rat kalp kası hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, plasmid transfeksiyonu ile arttırılan p38 MAPK sinyal yolağı aktivitesinin GLUT4 ekspresyonunu arttırdığı immunoblot analizleri ile göstermişlerdir (30). Çalışmada kültüre p38 MAPK seçici inhibitörü olan SB203580 (CSAID) eklendiğinde ise GLUT4 ekspresyonunun azaldığı belirtilmektedir. Ayrıca, bu çalışmada yenidoğan rat kalp kası hücrelerindeki p38 MAPK sinyalinin, GLUT4 promoter transkripsiyonel aktivitesini de stimule ettiği, GLUT4 mRNA'sının p38 MAPK-bağımlı ekspre olduğu kantitatif RT-PCR analizleri ile belirlenmiştir. p38 MAPK seçici inhibitörü SB203580 ile muamele sonucunda kantitatif RT-PCR sonuçlarına göre GLUT4 mRNA miktarı azalmaktadır (30). Riera ve arkadaşları tarafından bu kez Sertoli hücrelerinde glukoz kullanımının moleküler temelleri üzerine yapılan çalışmada ise GLUT1 ekspresyonunun p38 MAPK sinyal aracılı olduğu ortaya konulmuştur (31). Çalışmada, rat testis dokusundan izole edilen Sertoli hücreleri p38 MAPK seçici inhibitörü SB203580 ile kültüre edildiklerinde GLUT1 mRNA seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (31). Marko A.J. ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı başka bir çalışmada ise; MAPK sinyalinin T lenfositlerde glukoz metabolizmasını düzenlediğini göstermişlerdir (32).

Literatürde çeşitli somatik dokulardaki p38 MAPK sinyal aracılı GLUT ekspresyonlarına ilişkin hem protein hem de mRNA düzeyinde yapılan çalışmalar bulunmasına karşın, glukoz kullanımının hayati önem taşıdığı preimplantasyon embriyo gelişiminde bu konu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalar, GLUT ekspresyonlarının p38 MAPK sinyal aracılı olduğunu açıkça gösterilmiştir. Bu çalışmada, embriyo yaşayabilirliği ile direkt ilişkili olan bu transport proteinlerini ve dolayısı ile embriyo içerisine glukoz alınımını kontrol eden sinyal mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır.

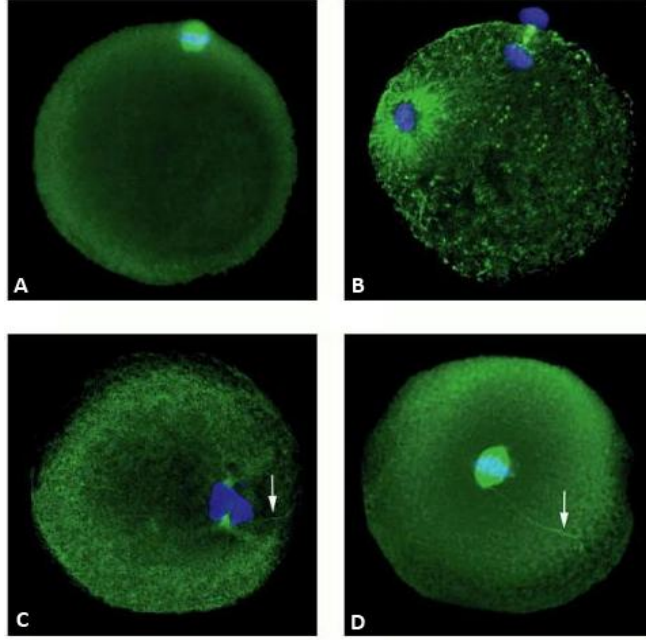
Çalışmanın Hipotezi: Kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcıları olarak bilinen GLUT proteinlerinin, gelişen preimplantif embriyoya metabolik destek sağladığı ve özellikle embriyonun metabolik enerji kaynağı olarak glukozla bağımlı olduğu 8-hücre aşamasından itibaren glukoz transportundan sorumlu oldukları bilinmektedir. Direkt olarak embriyo yaşayabilirliği üzerinde etkili olan GLUT proteinlerin pek çok dokudaki ekspresyonel kontrolünü p38 MAPK sinyalinin yaptığı bildirilmiştir. Preimplantif dönem embriyolarda p38 MAPK inhibisyonunun gelişimsel defektlere neden olduğu, bu defektlerin de özellikle embriyonun glukozla bağımlı olduğu 8-hücreli embriyo aşamasından sonra (kompaksiyon sonrasında) gerçekleştiği bilgisi de literatürde mevcuttur. Bu bilgiler; preimplantif dönem embriyonik gelişimde GLUT proteinlerinin ekspresyonlarının p38 MAPK sinyal aracılı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada Balb/C ırkı dişi farelerden hormonal indüksiyon (PMSG ve hCG) ile elde edilen 2-hücre aşamasındaki embriyolar, kontrol, çözen (inhibitör çözücüsünün verildiği) ve inhibitör (SB203580, CSAID<sup>TM</sup> verilen) olarak üç grupta *in vitro* kültüre edilmiştir. Kültürde 8-hücre, morula ve blastosist aşamasına ulaşan embriyolarda (glukozla bağımlı aşamalar) GLUT1 ve GLUT4 ekspresyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. GLUT1 ve GLUT4 ekspresyonel değişimleri immünofloresan ile protein düzeyinde ve qRT-PCR ile mRNA düzeyinde ortaya konulmuştur.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Fare Preimplantasyon Embriyo Gelişimi: Fertilizasyondan İmplantasyona

Olgunlaşmasını tamamlamış, metafaz-II aşamasındaki fare oositleri ovaryumdan atılır ve oviduktun ampulla bölgesinde fertilizasyon meydana gelir (33). Sperm zona pellusida içerisine penetre olup, oosite temas ettiğinde, oosit membranında meydana gelen ufak kabarıklık fertilizasyon konisi olarak adlandırılır (34). Fertilizasyon esnasında dişi ve erkek pronükleuslarının füzyonu gerçekleşir (Şekil 2.1). Fertilizasyon sonucunda; diploid kromozom sayısına tekrar ulaşılır, cinsiyet belirlenmiş olur, ilk mitoz bölünme ile (yarıklanma/klevaj) yaşam başlar ve iki hücreli embriyo oluşur (35).



**Şekil 2.1.** Fertilizasyondan sonra pronükleusların füzyonu. Mikrotübüller yeşil floresan, DNA mavi floresan ile işaretlenmiştir. **A)** Maturasyonu tamamlamış, fertilizasyon öncesi oosit **B)** Sperm penetrasyonundan sonra fertilize oositin ikinci polar cisim atması. Sperm nüklear içeriği sol tarafta görünmektedir. **C)** Pronükleus zarlarının parçalanması ve pronükleusların füzyonu **D)** Dişi ve erkek pronükleusuna ait kromozomların metafaz plağında hizalanması. C ve D'de görülen ok oosit içerisine penetre olmuş sperm kuyruğunu işaret etmektedir (35).

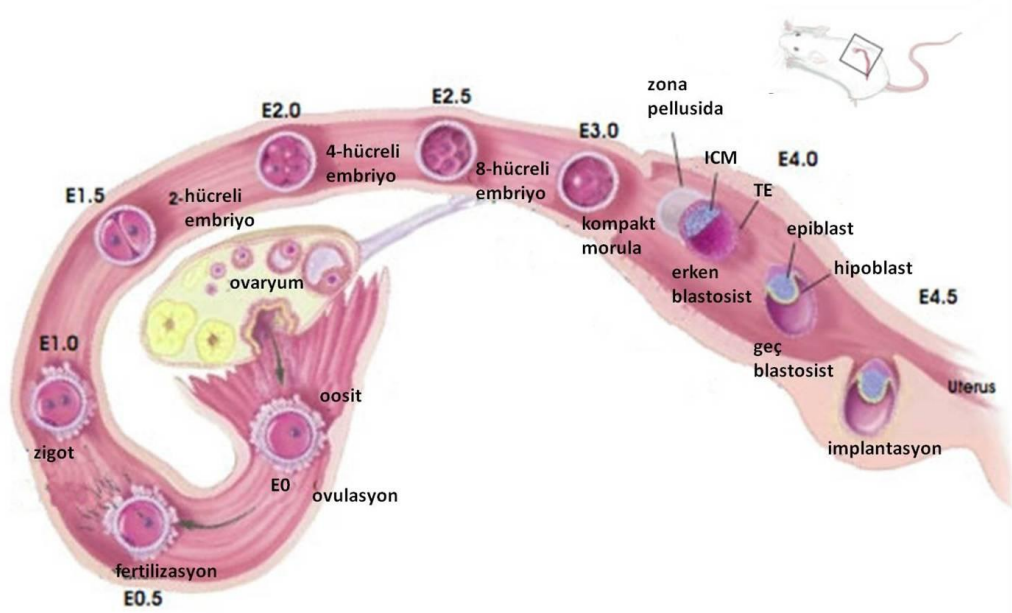
Oositin sperm ile karşılaşması ve devamında fertilizasyonu, oviduktun ampulla bölgesinde gerçekleşir. Döllenme sonucu oluşan yeni canlının taslağını oluşturan ortak hücre “zigot” olarak adlandırılır. Zigot sıradan bir hücre olmayıp, birleşenlerin tüm özelliğini yansıtacak saklı potansiyele sahiptir. Fertilizasyonun gerçekleşmesinin ardından devam eden günlerde, embriyo oviduktan uterusu kadar yol alır ve implantasyona hazırlanır. Fertilizasyonun gerçekleşmesinden sonra oluşan

zigotun endometriyuma implante olana kadar geçirdiği süreç “preimplantasyon gelişimi” olarak tanımlanır (36).

Preimplantasyon gelişim periyodu tüm memelilerde özdeş olup, sırasıyla; fertilize olmuş zigotun yarıklanma bölünmelerine başlaması, embriyonik genom aktivasyonu, kompaksiyon, kavitasyon ve blastosist oluşumu ile karakterizedir (37).

### 2.1.1. Zigot Yarıklanmaları

Zigot iki hücreli evreye ulaştıktan sonra, peşpeşe bir seri mitotik bölünmeye girerek hücre sayısını artırmaktadır. Preimplantasyon boyunca tuba uterinanın periyodik kontraksiyonları, silya hareketleri ve kimyasal sıvı akımı ile gelişen embriyonun ovidukt duvarına yapışması engellenir. (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Farede preimplantasyon gelişim süreci (37).

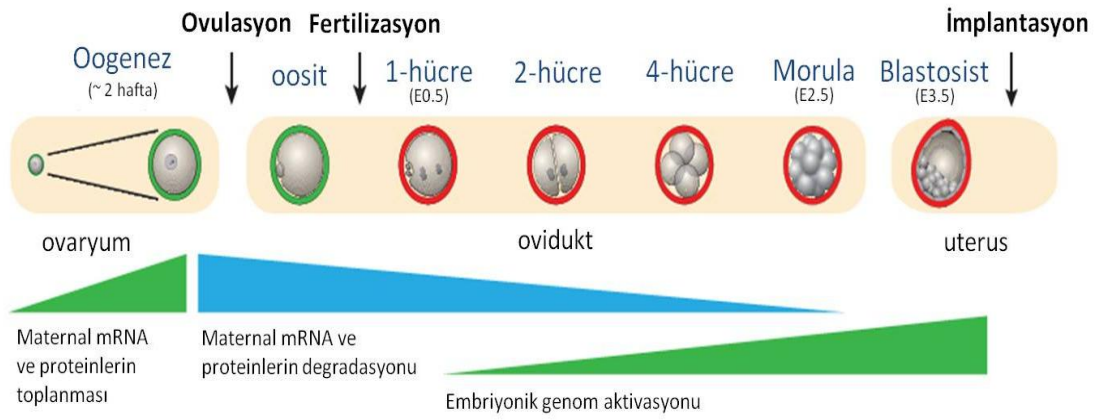
Farede birinci yarıklanma fertilizasyondan bir gün sonra gerçekleşir. Birinci yarıklanma ekseninin pozisyonu hakkında öne sürülmüş birkaç model ve farklı fikirler bulunsa da (38, 39, 40), kabul edilen tanımlama, ilk yarıklanma ekseninin kutup cisimlerinin pozisyonu ile ilişkili olduğudur. Plazma membranı ile zona pellusida arasında yer alan I. ve II. kutup cisimlerinin bulunduğu noktada plazma membranı hafifçe çöktür ve ilk bölünme bu çökük olan noktadan başlar, karşı tarafa kadar devam eder. Bir bakıma kutup hücreleri ilk yarıklanmanın yol göstericisidir. İki hücreli evreyi, tekrarlanan diğer yarıklanma bölünmeleri (cleavage) takip eder. İlk bölünme ve onu takip eden bölünmeler sonucu oluşan yeni hücelere blastomer adı verilir (36, 37).

Fare embriyolarının 1-hücre (zigot) evresinden, 32 veya daha fazla hücre içeren blastosist evresine gelişmeleri yaklaşık 3,5 günde tamamlanır. Türler arasında farklı olmakla birlikte, fare embriyolarının birinci yarıklanması (2-hücreli aşamaya geçiş) yaklaşık 16-20 saatte, ikinci yarıklanması (4-hücreli aşamaya geçiş) yaklaşık

18-22 saatte gerçekleşir (41, 42, 43). Yapılan çalışmalarda, yarıklanma sürelerinin genetik faktörler ile de ilişkili olduğu açıklanmıştır (44).

### 2.1.2. Embriyonik Genom Aktivasyonu

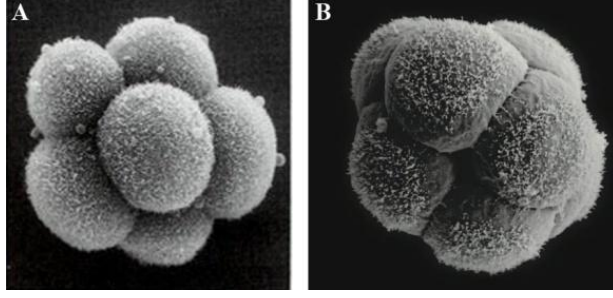
Preimplantasyon gelişimde fare embriyoları, 2-hücreli embriyo evresine kadar protein sentezini maternal mRNA'lar tarafından gerçekleştirir. Preimplantasyon gelişimin 2-hücreli aşamasında maternal transkript rezervi tükenmeye başlar ve maternal kaynaklı transkripler ile zigotun ekspresyonlarının yer değişimi gerçekleşir. Zigota özgü genlerin ekspresyonel artışı ile birlikte zigotik gen aktivasyonu 2-hücreli aşamada başlar (45, 46). Gelişen embriyo artık proteinlerinin sentezi için kendi mRNA'larını kullanacaktır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Fare preimplantasyon gelişiminde embriyonik genom aktivasyonu (46).

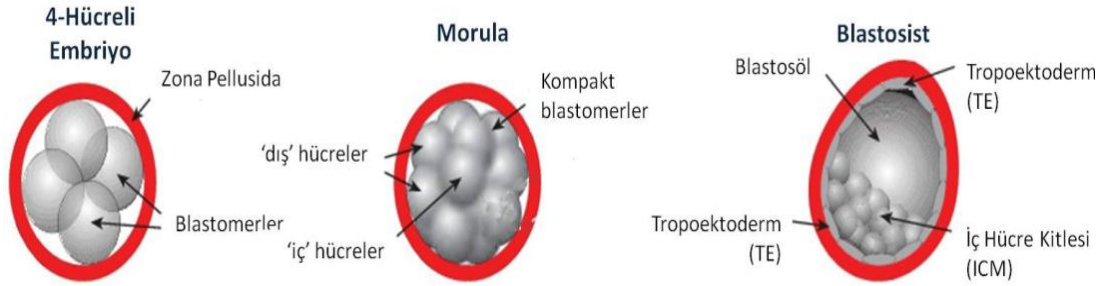
### 2.1.3. Kompaksiyon: Sıkılaşıma ve Hücre Polarizasyonunun Kazanılması

Preimplantasyon gelişimde embriyoların geçirdiği bir sonraki değişim kompaktlaşma sürecidir. Bu süreç, morfogenik ve hücrel farklanmanın ilk basamağıdır. Kompaktlaşma, hücre yüzeyi adezyon glikoproteinlerince, başlıca E-kadherin tarafından gerçekleştirilir. Kompaktlaşma esnasında E-kadherin fosforile olur. Ayrıca ZO-1 (Zonula Okludens-1), laminin, cingulin gibi hücre bağlantı molekülleri miktarında artış meydana gelerek hücreler arası etkileşim artar. Blastomerler şekil değiştirir ve embriyo sıkı bir hücre topu haline dönüşür (Şekil 2.4). Kompaktlaşma sonunda hücrelerde kutuplaşma (polarizasyon) gözlenir (apikal-bazal) (36, 46).



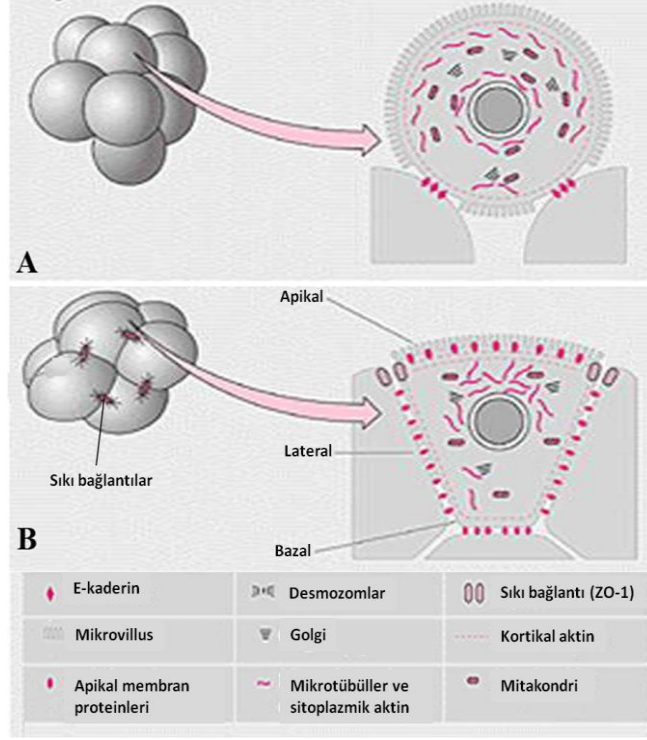
**Şekil 2.4.** Kompaksiyon SEM görüntüleri. **A)** Kompaktlaşmamış 8-hücreli embriyo, **B)** Kompakt morula (96).

Kompaksiyon süresince meydana gelen en önemli olay, iki farklı hücre popülasyonunun ortaya çıkmasıdır: dışarıyla temas halinde kalan dış blastomerler trofoektoderm (TE) tabakasını oluşturmak için seçilmişken, içerideki blastomerler iç hücre kitlesini (ICM) oluşturmak üzere seçilmiştir (Şekil 2.5) (46).



**Şekil 2.5.** Kompaksiyonun başlaması ile embriyonik polarizasyonun indüklenmesi (46).

Dört-hücreli embriyoda, blastomerlerin belirgin hücresel sınırları bulunmaktadır ve her bir blastomer hala pluripotent özelliktedir. 8-, 16- ve 32-hücreli aşamalar süresince, belirli hücreler kendi morfolojik ve işlevsel fenotipini, kutuplanmış (polarize) bir forma değiştirmek için indüklenir. Bu olay, gelişim süresince yarıklanmaya devam eden 8-hücreli embriyonun, embriyo içerisinde ortalama 7 adet apolar "iç" ve 9 adet polar, daha büyük "dış" hücre meydana getirmesi ile başlar (Şekil 2.5) (47). Dışarıdaki hücrelerde polarize bir fenotip gelişiminin tetiklenmesi, interselüler temasların yapısı ile ilgili olabilir: bir hücre ile temas halindeyken polariteyi geliştiren bir hücre, diğer hücrelerce tamamen çevrelendiğinde ise polarizasyonu baskılanır. Hücreler arasındaki yakın temaslar, hücre-hücre temas noktalarında artan oranda dağılmaya başlayan hücre adezyon moleküllerinin varlığı ile oluşturulur. Adezyon molekülleri polarize olmuş dış hücrelerin apikal yüzeylerinde bulunmaz (48). Dış hücrelerin polarizasyonu, nükleusun bazale göçü ve aktin, klatrin, endozom ve mikrovillusların apikal sitoplazmada yoğunlaşmasıyla bariz olarak izlenir (Şekil 2.6).



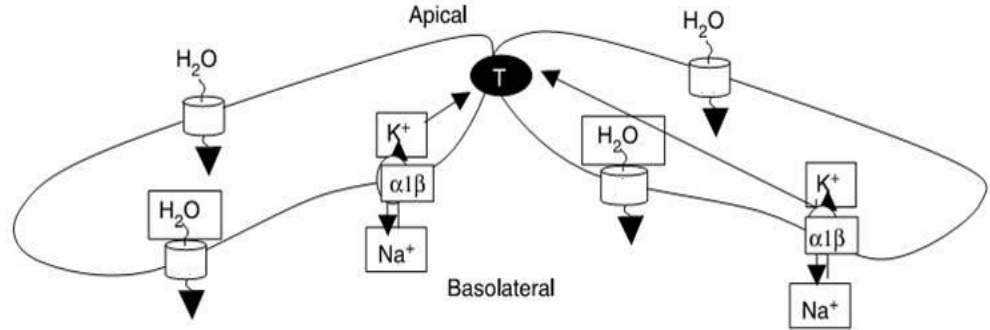
**Şekil 2.6.** Kompaksiyon sürecinde embriyolardaki hüresel polarizasyon. **A)** Sekiz-hücreli embriyo; non-polar fakat lokal temas etkisinde. **B)** Kompakt embriyo; polar, bazolateral ve apikal kutuplar farklılaşmış.

Bir hücre polarite kazandıktan sonra devamındaki hücre soyları, devam eden yarıklanma düzleminin oryantasyonundan etkilenecek, dolayısı ile ya iki polar, ya da bir polar bir apolar hücreler ortaya çıkacaktır. Farklılaşmadaki bu ilk adım aynı zamanda embriyonun hücre totipotensisindeki ilk gerilemedir. Morula içerisindeki apolar hücre alt-populasyonu gelişen blastosistte tercihli olarak iç hücre kitlesini (ICM) oluşturacak, dışarıdaki polar hücreler ise trofoektoderm özellikleri geliştirecektir (45).

#### 2.1.4. Kaviteasyon ve Blastosist Oluşumu

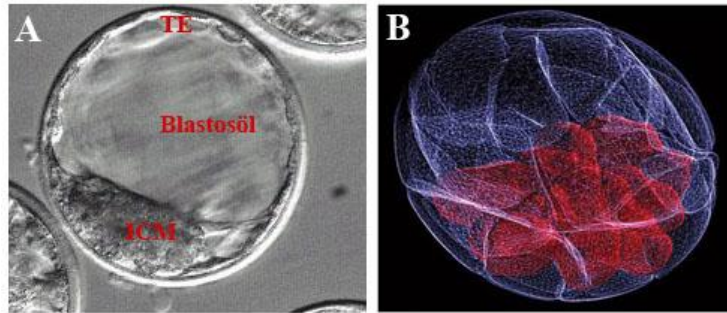
Kompaksiyonun tamamlanması ile birlikte, trofoektodermal hücreler sıkı bağlantı komplekslerini bir araya getirmiş ve yassılaştırmış epitelyal hücre karakteristiği kazanırlar (50). Fare embriyosu yaklaşık 32-hücreli aşamaya geldiğinde, trofoektodermal hücreler, hücre içi ve daha sonra hücre dışı alanlara sıvı pompalayarak blastosist kavitesini oluşturmaya başlar (51). Trofoektoderm iyon transport sistemi, epitelyum boyunca iyon konsantrasyon gradientinin oluşturulmasında ve böylece suyun blastosöl sıvısına akışının sağlanmasında önemli rol oynar. Elektron-prob mikro analizleri  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  iyonlarının blastosöl sıvısı içerisinde yoğunlaştığını göstermiştir (51). Bu iyonların konsantrasyon gradientlerine göre taşınması aktif bir transport mekanizmasına sahip olmayı gerektirir. Bu süreç trofoektoderm bazolateral kısmında yerleşik bulunan sodyum-potasyum ATPaz ( $\text{Na,K-ATPaz}$ ) sistemi ile başarılır. Ayrıca, sıkı bağlantı komplekslerinin varlığı da önemlidir. Bu kompleksler, hücreler arasında geçirgen

olmayan (impermeabl) bir yapı sağlayarak, sıvı toplanmasına, paraselüler transportun düzenlenmesine izin verirken Na,K-ATPaz dağılımının polarizasyonuna katkıda bulunur (Şekil 2.7 ) (52).



**Şekil 2.7.** Trofoektoderm hücrelerindeki su ve iyon transportu. TE hücreleri blastosist oluşumunu kontrol eden sıvı dinamiğini kontrol eder. Trofoektoderm hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar embriyo dışına sıvı kaybını engeller (52).

Kompaktlaşma sürecini tamamlayarak önce morula, daha sonra da blastosist evresine geçen embriyodan iki tip hücre elde edilir: embriyonik tabakaları verecek olan ICM ve plasenta ve ekstraembriyonik membranların oluşumuna katılacak olan TE tabakası (Şekil 2.8.).



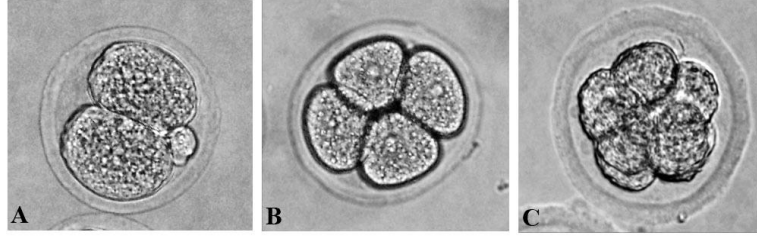
**Şekil 2.8.** Fare blastosist aşaması embriyosu. **A)** Faz kontrast görüntü. **B)** Üç boyutlu yeniden oluşturulmuş blastosist konfokal mikroskop görüntüsü. ICM kırmızı, TE mavi (78).

## 2.2. Preimplantasyon Dönem Embriyoların Nitelikleri

Farede yaklaşık 4,5 günlük bir süreçte ilerleyen preimplantasyon gelişimi, embriyoların ovidukt ve uterus içerisinde geçirdikleri zamanla uyumlu olarak, erken ve geç dönem olmak üzere iki evreye ayrılabilir (3).

### 2.2.1. Erken Dönem Preimplantasyon Embriyolar

Bu süreç zigot oluşumunu takiben 2-, 4- ve 8-hücreli embriyo aşamalarını kapsar (Şekil 2.9). Erken dönem preimplantif embriyolar hücresel olarak farklılaşmamıştır, yüksek mitotik aktiviteye sahiptir ve tekrarlayan yarıklanma bölünmeleri geçirirler fakat belirgin bir büyüme göstermezler (53). Embriyonik genom aktif olana kadar gelişimin genetik kontrolü maternal genoma bağlıdır. Bu aşamadaki embriyolar hormonlara ve büyüme faktörlerine son derece hassasiyet gösterirler. Fare erken dönem preimplantif embriyoların oksijen tüketimi, DNA, RNA ve protein sentezi açısından metabolik aktiviteleri düşüktür (54, 55).

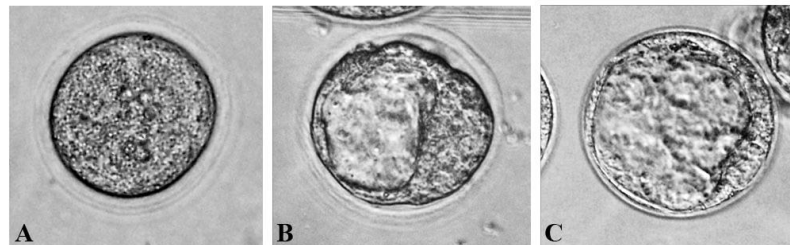


Şekil 2.9. Fare erken dönem preimplantasyon embriyo aşamaları. A) 2-hücreli embriyo B) 4-hücreli embriyo C) 8-hücreli embriyo

Ovidukt içerisindeki erken dönem preimplantasyon embriyolar nispeten dış ortamdan bağımsız, kendini idare edebilen niteliktedirler ve kontrolleri çoğunlukla kendi iç (intrinsik) faktörlerine bağlıdır. Bu nedenle, *in vitro* kültür uygulamalarında, erken dönem embriyoların kültürdeki ihtiyaçları nisbeten basittir (3).

### 2.2.2. Geç Dönem Preimplantasyon Embriyolar

Kompaksiyonunu tamamlamış ve daha sonraki aşamalarda bulunan embriyolar, geç dönem preimplantasyon embriyolar olarak tanımlanırlar (Şekil 2.10). Erken dönemin aksine, geç dönem preimplantif embriyolar özellikle blastosist aşamasında net büyüme (56) ve trofoektoderm ve iç hücre kitlesi olarak hücresel farklılaşma gösterirler. Bu dönemdeki embriyolar hormonlara ve büyüme faktörlerine aşırı hassasiyet gösterirler. Gelişimin kontrolü artık embriyonik genom tarafından düzenlenir ve metabolik aktiviteleri yüksektir.



Şekil 2.10. Fare geç dönem preimplantasyon embriyo aşamaları. A) Kompakt morula B) Blastosist (3,5. Gün) C) Ekspanse blastosist (4,5. Gün)



Uterus içerisindeki geç dönem preimplantasyon embriyolar daha az kendini idare edebilir, daha çok dış (ekstrinsik) faktörlerin desteğine bağımlı niteliktedir. Bu nedenle, *in vitro* ortamlarda gelişebilmeleri için daha karmaşık kültür ortamlarına ihtiyaç duyarlar (3).

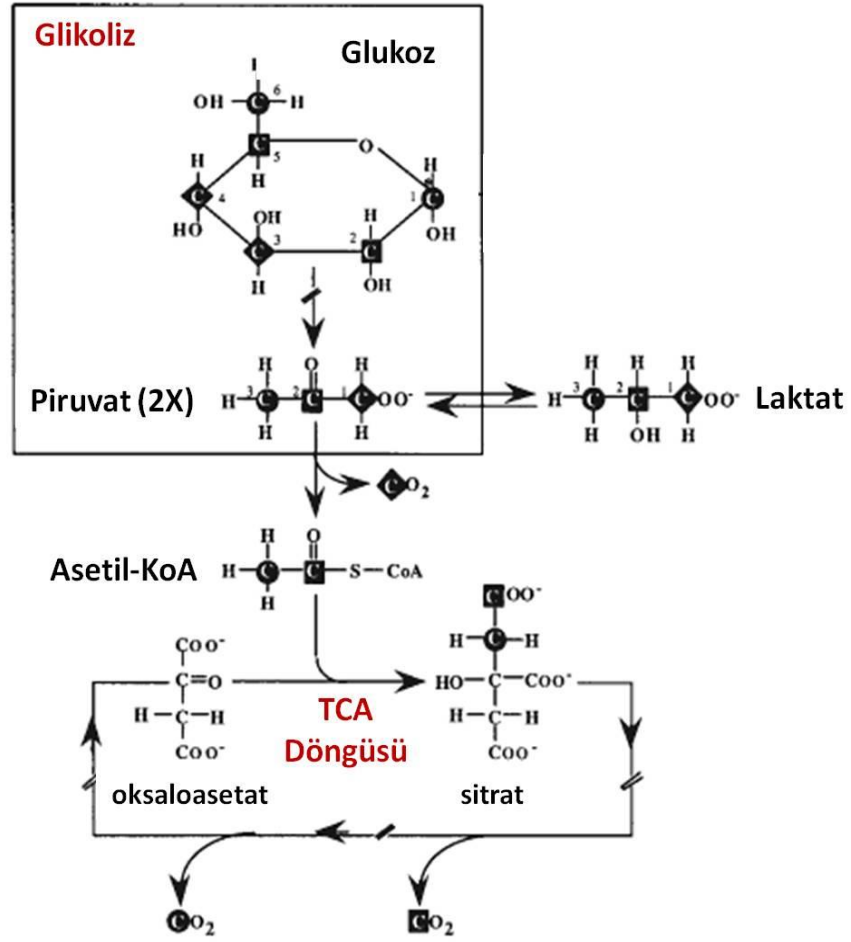
### **2.3. Preimplantasyon Embriyolarda Metabolik Adaptasyon**

Preimplantasyon embriyo gelişimi süresince embriyoların geçirdiği en önemli değişimlerden biri enerji ihtiyaçlarındaki farklanmadır. Gelişim süresince embriyolar farklı enerji substratlarına ihtiyaç duyarlar ve hücre içerisine alınan bu substratlar, farklı enerji metabolizma yolları ile metabolize edilir (Şekil 2.11) (59).

Fare preimplantasyon embriyo kültür çalışmaları, zigotun ilk yarıklanmasının mutlak piruvat gereksinimi duyduğunu göstermiştir (6). İki hücreli aşamada, ikinci yarıklanmadan itibaren, embriyonik gelişim ortamındaki laktat varlığında desteklenir (5, 6). Embriyonik gelişimin 8-hücreli aşamasından itibaren ise, embriyo içerisine piruvat ve laktatın alınımı geriler ve özellikle blastosist aşamasındaki embriyonik gelişim mutlak glukoz varlığına ihtiyaç duyar (5, 57). Yani, farede 8-hücreli aşamaya kadar glukoz erken embriyonik gelişimi desteklemezken, 8-hücreli aşamadan sonra ise embriyolar glukoz bağımlı hale gelir. Gelişim ilerledikçe ortaya çıkan glukoz kullanımındaki bu dramatik değişim bir dizi metabolik ihtiyacın varlığı ile ilgilidir:

1. Kompaksiyon süreci ve blastosist oluşumu esnasında, embriyolardaki protein sentezinin artmasına bağlı olarak enerji ihtiyaçları da artar.
2. Glukoz, nükleik asit sentezi için pentoz kısmını oluşturur ve bu nedenle fosfolipit ve esansiyel olmayan aminoasitlerin biyosentezinde gereklidir.
3. Kompaksiyondan sonra, geç yarıklanma dönemi embriyolarda spesifik enzimlerin ve enzim aktivasyonlarını sağlayacak kofaktörlerin sentezi başlar (58).
4. Blastosist aşamasındaki embriyo, implantasyon esnasındaki oksijensiz ortama uyum sağlamak için, anaerobik glikoliz (oksijensiz solunum) yapmaya yüksek derecede uyum sağlamıştır (10).

Preimplantasyon sürecinde besin ihtiyacındaki bu değişim, embriyo enerji metabolizmasındaki önemli bir adaptasyonu da beraberinde getirmektedir. Bu adaptasyon, kompaksiyon zamanında, embriyoların trikarboksilik asit döngüsüne bağımlılıktan, glikolize dayanan bir metabolizmaya geçmesidir (59).



**Şekil 2.11.** Preimplantasyon sürecinde embriyoların kullandığı enerji substratlarının moleküler yapıları ve bu substratların glikoliz ve TCA döngüsü ile metabolizasyonları. Kırık hatlar iki veya daha fazla reaksiyon basamaklarını işaret etmektedir (59).

### 2.3.1. Preimplantasyon Embriyolarda Trikarboksilik Asit Döngüsü (TCA)

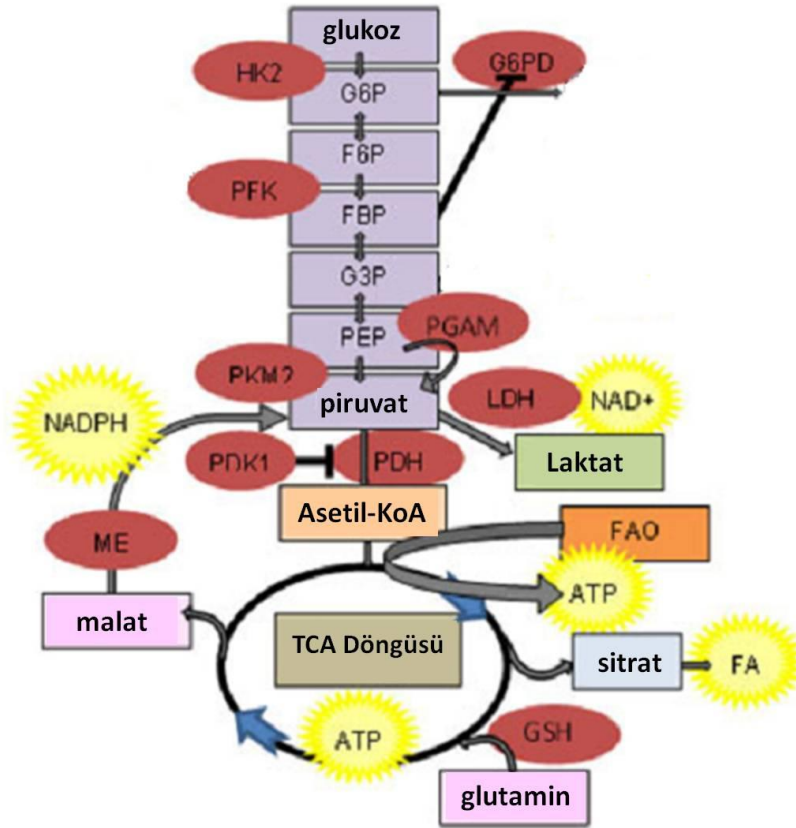
Trikarboksilik asit döngüsü (TCA) tüm ökaryotik hücrelerde olduğu gibi, preimplantasyon dönem embriyolarda da mitokondri matriksinde gerçekleşmektedir. Preimplantasyon sürecindeki embriyonun ilk yarıklanmasında (zigot aşamasından iki hücreli evreye geçiş), mikroçevreden alınan iki molekül piruvat sitoplazmadan, mitokondri içerisine tanınır. İkinci yarıklanmadan itibaren (2-hücreli aşamadan 4-hücreli embriyo aşamasına geçiş) ise embriyolar mikroçevrelerinden piruvat ile birlikte laktat molekülleri de almaya başlarlar. Embriyo içerisine alınan laktat, öncelikle sitoplazmadaki laktat dehidrogenaz (LDH, EC 1.1.1.27) enzimi ile piruvata dönüştürür ve daha sonra mitokondri içerisine transfer edilir (Şekil 2.11). Piruvat ve laktat molekülleri birbirlerine dönüşebilir özelliktedir ve karbon numaraları aynıdır. Mitokondride piruvat molekülü, piruvat dehidrogenaz (PDH, EC 1.2.4.1) enzimi ile dekarboksile ederek TCA döngüsünü başlatacak olan asetil-KoA molekülü oluşturulur. Piruvat dehidrogenaz enzimi tarafından piruvatın asetil-KoA molekülüne dönüştürülmesi sırasında piruvat molekülünün 1. karbon atomu [C-1], CO<sub>2</sub> olarak salınır (Şekil 2.11) (59). TCA döngüsünün ilk ürünü sitrat, son ürünü ise oksaloasetat

molekölüdür. Mitokondri içerisindeki toplamda sekiz reaksiyonun ardından TCA tamamlanır ve enerji üretimi sağlanır.

Yapılan çalışmalarda 2-hücreli fare embriyolarının, piruvat [C-1] ve [C-2] ile laktat [C-1] ve [C-2] atomlarından CO<sub>2</sub> üretimini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu durum, erken dönem embriyolarda TCA döngüsünün aktif olduğunu göstermektedir (60). Bununla birlikte, TCA döngüsü ara ürünlerinden olan malat molekülünün CO<sub>2</sub>'e metabolizasyonu 8-hücreli embriyolarda, 2-hücreli embriyolara nazaran daha fazladır. Bu durum, birinci ve üçüncü yarıklanmalar arasında hücre membranının malat molekülüne geçirgenliğinin arttığını ve preimplantasyonun geç evrelerinde de TCA döngüsünün devam ettiğini göstermektedir (61).

### 2.3.2. Preimplantasyon Embriyolarda Glikolitik Yolak

Glikolitik yolak, tüm hücrelerde olduğu gibi preimplantasyon dönem embriyolarda da sitoplazma içerisinde gerçekleşir. Kompaksiyonun başlaması ile birlikte, geç yarıklanma dönemi embriyoların mikroçevrelerinden sitoplazma içerisine aldıkları glukoz, öncelikle heksokinaz enzimi (HK, EC 2.7.1.1) ile glukoz-6-fosfat (G6P) molekülüne dönüştürülür. Ardından sitoplazma içerisinde bulunan glikolitik yolağa ait bir seri enzim varlığında, anaerobik koşullarda, her bir glukoz molekülü 2 molekül piruvata kadar yıkılır ve enerji üretimi sağlanır (Şekil 2.12) (62).



Şekil 2.12. Glukoz metabolik yolağı. Enzimler kırmızı, son ürünler sarı, glikoliz basamakları mor işaretlenmiştir (99).

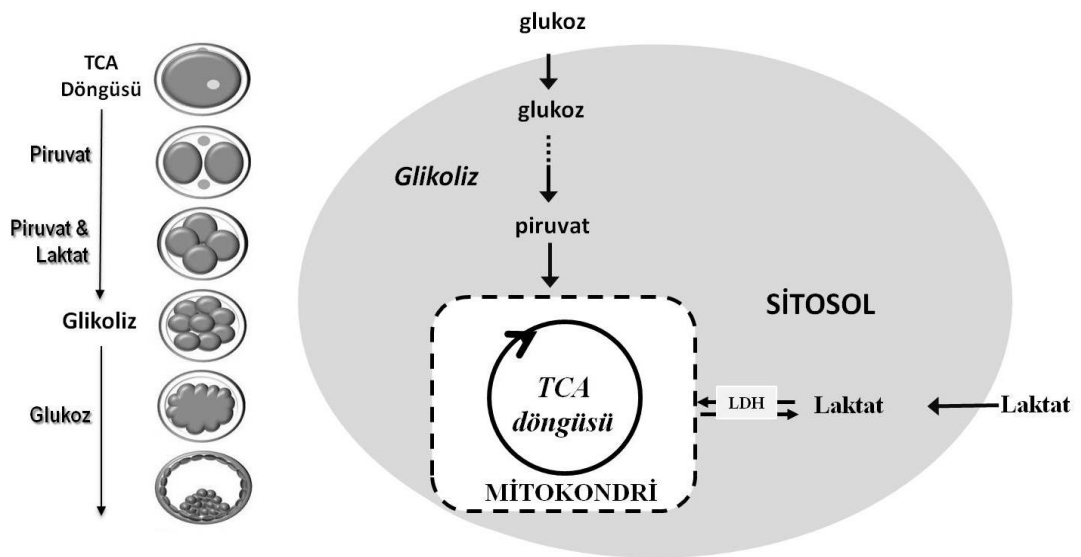
Hücre içerisindeki glikolitik yolak ara metabolitlerinin seviyesi incelendiğinde, embriyoların metabolik adaptasyonları daha iyi anlaşılmaktadır. Glukoz-6-fosfat seviyesi, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda, 2-hücreli embriyolara kıyasla 4 kat fazladır (Tablo 2.1). Aynı şekilde, diğer bir glikoliz yolu ara basamak metaboliti olan fruktoz-6-fosfat seviyesi, morula blastosist aşamasındaki embriyolarda, 2- ve 8-hücreli embriyolara kıyasla yaklaşık 3 kat fazladır (Tablo 2.1). Geç dönem embriyoların her iki ara metabolit için yüksek seviyeye sahip olması, hücre içerisinde etkin glikoliz metabolizmasına sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, erken dönem embriyolardaki düşük seviye ise, bu dönemdeki glikolitik yolak blokajının göstergesidir (62).

**Tablo 2.1.** Preimplantasyon embriyodaki enerji metabolitlerinin seviyeleri ( $\mu\text{mol/kg}$ ) (62).

Metabolit	2-Hücreli Embriyo	8-Hücreli Embriyo	Morula	Blastosist
Glukoz-6-P	$53 \pm 4$	$81 \pm 13$	$200 \pm 14$	$220 \pm 18$
Fruktoz-6-P	$28 \pm 6$	$14 \pm 7$	$48 \pm 7$	$82 \pm 7$
Malat	$390 \pm 31$	$390 \pm 30$	$380 \pm 44$	$430 \pm 31$

Glukoz molekülünün sitoplazmada piruvata metabolizasyonu sonunda, glukoz molekülünde bulunan 1. ve 2. karbon [C-1 ve C-2] atomu piruvat molekülündeki 3. karbon [C-3] atomuna, glukoz molekülündeki 2. ve 5. karbon [C-2 ve C-5] atomu piruvat molekülündeki 2. karbon [C-2] atomuna, glukoz molekülündeki 3. ve 4. karbon [C-3 ve C-4] atomu ise piruvat molekülündeki 1. karbon [C-1] atomuna dönüşür (Şekil 2.11) (59).

Özet olarak, kompaksiyona girmemiş embriyolar sitozolde glukozu piruvata kadar parçalayamayacaklarından dışarıdan hazır piruvat veya laktat alıp yalnızca TCA döngüsü kullanırken, kompaksiyon sonrası embriyolar glikolitik yolak ile sitozoldeki glukozu parçalayabilirler ve elde ettikleri piruvata TCA döngüsünde kullanırlar (Şekil 2.13).



**Şekil 2.13.** Preimplantasyon embriyolarda metabolik adaptasyon.

## 2.4. Preimplantasyon Embriyo Gelişiminde Metabolik Kontrolün Düzenlenmesi

Preimplantasyon embriyo gelişiminin metabolik kontrolü iki potansiyel sınıfa ayrılabilir (3):

- (i) **İntrinsik (İç) Faktörler:** enzim miktarları ve aktiviteleri, hücre içi araçlar ve plazma membran transport sistemleri tarafından oluşturulur.
- (ii) **Ekstrinsik (Dış) Faktörler:** dışı üreme kanalı tarafından desteklenen çevre tarafından oluşturulur.

### 2.4.1. Preimplantasyon Embriyo Gelişiminde İntrinsik Faktörler

#### 2.4.1.1. Enzim Sistemleri

Embriyo içerisine alınan enerji substratlarının, hücre içerisinde metabolize edilmesi gerekmektedir. Embriyonun farklı substrat ihtiyaçlarından doğan farklı yolları kullanmasına paralel olarak, hücre içerisindeki enzim miktarları ve aktiviteleri de gelişim süresince değişim göstermektedir.

Laktat dehidrogenaz enzimi (LDH, EC 1.1.1.27), tersinir özellikte bir enzimdir ve laktat-piruvat dönüşümünü gerçekleştirerek piruvatın TCA döngüsüne girmesine ve okside olmasına imkan verir. Yapılan çalışmalarda fare ve insan embriyolarındaki LDH aktivitesi zigot aşamasında en yüksek seviyede iken, blastosist aşamasına doğru gerilemektedir (63, 64, 65).

Preimplantasyon embriyolardaki enerji metabolizmasının anahtar enzimleri, 6-fosfofruktokinaz (PFK, EC 2.7.1.11) ve heksokinaz (HK, EC 2.7.1.1) olarak tanımlanmıştır (66, 67, 68). Embriyolardaki 6-fosfofruktokinaz aktivite düzeyi, heksokinaz aktivitesinden daha fazladır ve preimplantasyon gelişim süresince belirli bir değişim göstermez. Bununla birlikte, erken dönem embriyo gelişimi süresince glukoz kullanılmamasına bağlı olarak, embriyolardaki heksokinaz (HK) enzim aktivitesinin oldukça düşük olduğu (69, 70), glukoz tüketiminin başladığı aşamalar olan geç dönem preimplantasyon sürecindeki embriyolarda ise, beklenildiği gibi, heksokinaz aktivitesinin yaklaşık 4 kat artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 2.2) (7, 57, 71). Heksokinaz aktivitesindeki bu farklılık, geç dönem embriyolardaki glukoz-6-fosfat seviyesinin, erken dönem embriyolara göre 4 kat fazla olmasının nedenidir (Tablo 2.1). Erken dönemdeki embriyolar, heksokinazın enzimatik aktivitesinden yoksun oldukları için hücre sitoplazmasında glukozdan glukoz-6-fosfat metabolizasyonunu gerçekleştiremezler (62).

**Tablo 2.2.** Preimplantasyon dönem fare embriyolarında PFK ve KH aktivitesi. \*her embriyoda saat başına dönüştürülen substratın molü x10<sup>12</sup>.

Gelişim Evresi	PFK Aktivitesi*	HK Aktivitesi*
Fertilize olmamış oosit	35.0	1.23
Fertilize oosit	32.4	1.76
2. Gün	32.2	1.70
3. Gün	30.1	2.24
4. Gün	22.6	6.79
5. Gün	22.7	9.40
Referans	(72)	(71)

#### 2.4.1.2. Plazma Membran Transport Sistemleri

Preimplantasyon gelişim süresince embriyonun ihtiyaç duyduğu ekzojen besinlerin embriyo içerisine transport edilmesi gerekmektedir. Plazma membran transport sistemleri embriyo için son derece önemli olup, gelişen embriyonun hayatta kalabilmesi için besin ihtiyacını karşılamaktadır.

- **Monokarboksilat Taşıyıcıları (MCTs)**

Kompaksiyondan önce preimplantasyon dönem embriyolar birincil enerji ihtiyacı olarak piruvat ve laktat kullanır (7). Fare ve insanda embriyo içerisine piruvat ve laktat monokarboksilat taşıyıcıları (MCTs) ile alınır (7,73). Preimplantif gelişim süresince MCT 1, 2, 3 ve 4'ün varlığı tanımlanmıştır fakat bu taşıyıcıların rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir (Tablo 2.3). Monokarboksilat alınımına ek olarak, MCT1 fare embriyolarının 2-hücreli aşamadan blastosist aşamasına geçişi süresince hücre içi pH dengesinin sürdürülmesinde de rol oynadığı bilinmektedir (74, 75). Glukozun kullanıldığı glukolitik metabolizma kompaksiyon esnasında başlarken, embriyo içerisindeki laktat ve piruvatın oksidasyonu da devam eder (7, 11, 57). Bu nedenle monokarboksilat taşıyıcılarına preimplantif gelişimin tüm aşamalarında ihtiyaç vardır.

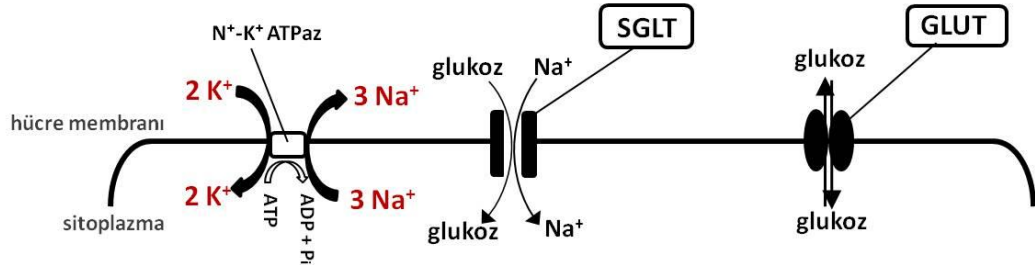
**Tablo 2.3.** Fare preimplantasyon dönem embriyolarda tanımlanmış monokarboksilat taşıyıcılar.

MCT	Lokasyon	Evre	mRNA	protein	Ref.
1	Blastosist TE'de sitoplazmada	tüm aşamalar	X	X	75, 76, 77
2	Bütün aşamalarda sitoplazma ve plazma membranında, morula ve blastosiste apikal plazma membranında	tüm aşamalar	X	X	75, 77
3	-	tüm aşamalar	X	X	75
4	Yarıklanma dönemi embriyoların plazma membranında, diğer aşamalarda nüklear veya perinüklear	tüm aşamalar	X	X	76, 77

- **Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcıları (GLUTs)**

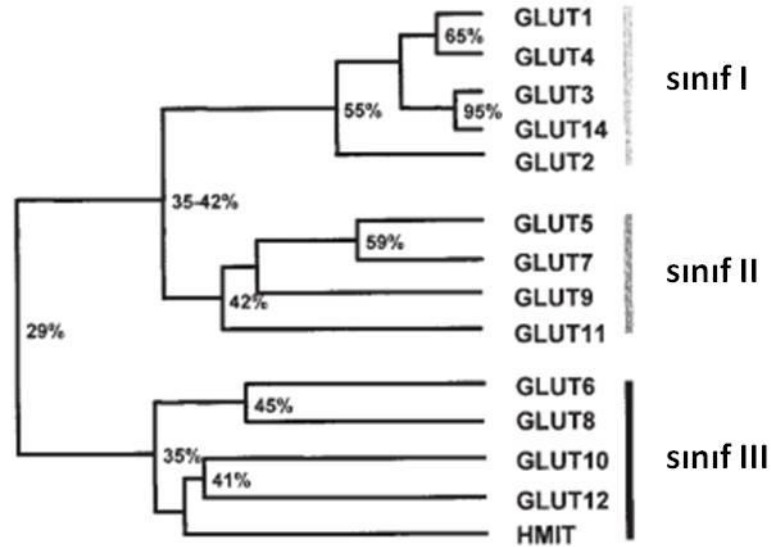
Ökaryotik hücrelerde glukoz taşıyıcılarının iki farklı sınıfı bulunmaktadır: Sodyum-Bağımlı Glukoz Taşıyıcıları (SGLT) ve Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcıları (GLUT). Bu mekanizmaların ilki, Sodyum-Bağımlı Glukoz Taşıyıcıları (SGLT), hücredeki  $N^+-K^+$  ATPaz'lar tarafından oluşturulan konsantrasyon gradienti ile iki molekül glukozu hücre içerisine  $Na^+$  molekülleri ile birlikte taşır (Şekil 2.4.1.2.2.1). Sodyum-Bağımlı Glukoz Taşıyıcılarının preimplantasyon dönem embriyo gelişimindeki varlığı kesinlik kazanmamıştır. İmmünojenik çalışmalarda apikal trofoektoderm membranında SGLT'nin varlığı tespit edilmiş olmasına karşın (79), farmakolojik çalışmalar SGLT'lerin bazolateral membranlarda bulunduğunu öne sürmüştür (80). Preimplantif gelişimde aktif glukoz transportu tespit edilemediği için SGLT'lerin bu dönemdeki varlığı ve fizyolojik rolleri de aydınlatılamamıştır (81).

Hücre içerisine glukoz taşınımından sorumlu diğer mekanizma olan Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcıları (GLUT) ise enerji-bağımsız çalışmaktadır (Şekil 2.14). GLUT ailesi proteinleri, sekans benzerliği ve karakteristik elementlerine göre üç alt sınıfa ayrılmıştır; GLUT 1-4'ü içeren, sınıf I; GLUT 5,7,9,11'i içeren, sınıf II; ve GLUT 6,8,10,12 ve HMIT'i içeren, sınıf III'tür. GLUT proteinleri substrat özgünlüğü, kinetik karakteristiği, doku ve hücrel dağılımları bakımından farklı özelliklere sahiptirler (12). GLUT protein ailesi yüksek derecede sekans homolojisi gösterirken; substrat özgünlüğü, kinetik karakteristiği, doku ve hücrel dağılımları bakımından farklı özelliklere sahiptirler (Şekil 2.15.) (12).



Şekil 2.14. Hücre membranında glukoz transportu.

Fare preimplantasyon embriyo gelişiminin farklı aşamalarında, çeşitli GLUT proteinlerinin varlığı ve her bir transport kanalının farklı hücrel lokalizasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.4). Preimplantasyon dönem embriyolarının uterusu implante olana kadar geçirecekleri süreçte, GLUT proteinleri gelişen çevresel koşullara ve metabolik ihtiyaçlara adaptasyon yeteneği sağlamaktadırlar. Post-kompaksiyon aşamasına kadar embriyolar glukozu mutlak ihtiyaç duymamalarına rağmen, embriyo içerisine glukoz alınımı gelişimin tüm aşamalarında mevcuttur. Kompaksiyondan önce embriyo içerisine alınan glukoz gelişimi destekler, apoptozu önler, biyosentetik rollerde kullanılır ve belirli genlerin transkripsiyonu için gereklidir (13, 14, 15, 82).

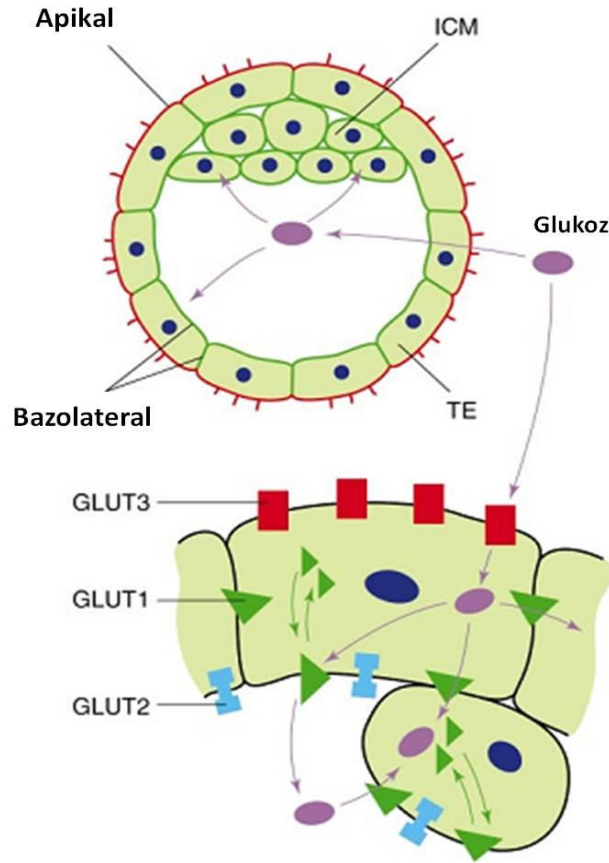


**Şekil 2.15.** Glukoz transporter ailesinin dentogramı. Protein benzerlik oranları ağacın dallarındaki rakamlarla gösterilmiştir (12).

Erken yarıklanma, morula ve blastosist evrelerindeki embriyoların apikal, lateral, bazal, bazolateral hücre yüzeylerinde ve intraselüler kompartmanlarında bulunduğu tanımlanan GLUT protein ailesinin farklı üyeleri, embriyonik gelişim süresince gelişimi desteklemekte ve metabolik ihtiyaçları karşılamaktadır (Şekil 2.16.) (82). Pek çok GLUT protein ekspresyon zamanının, kompaksiyon esnasında glukoz kullanımına geçiş ile birlikte gerçekleşmesi, bu taşıyıcıların glukoz kullanımı ile fonksiyonel ilişkisini göstermektedir (Tablo 2.4.).

GLUT1 preimplantasyonun tüm gelişim aşamalarındaki embriyolarda bulunmaktadır. Kompaksiyondan sonra GLUT1 blastosistte trofoblastların apikal ve özellikle bazolateral plazma membranında, iç hücre kitlesinde plazma membranında lokalize olmaktadır (83). Bu kanal, glukozun hücreler arası transportunu gerçekleştirmekte ve muhtemelen glukozu blastosöl boşluğundan iç hücre kitlesine aktarmaktadır (2). Sekiz-hücreli aşamadan sonra gözlenen GLUT2 ekspresyonu, iç kısımlara yerleşik blastomerde intraselüler olarak ve plazma membranında bulunurken, trofoblastlardaki GLUT2 lokalizasyonun bazolateral yüzeyde bulunması, bu proteinin GLUT1 ile benzer görevde olabileceğine işaret etmektedir (84, 85). GLUT3 ise yüksek-kapasiteli bir glukoz taşıyıcısıdır ve ilk olarak kompaksiyon esnasında ekspre olmaya başlar (85). Morula ve blastosistlerde, GLUT3 apikal plazma membranında lokalize olur ve muhtemelen glukozu maternal çevreden embriyo içerisine transport eder. Embriyolarda GLUT3 proteininin çıkarılması, blastosist oluşumunu ve morula aşamasındaki glukoz alınımını geriletir (85). GLUT4 yüksek-afiniteli bir glukoz taşıyıcısıdır ve çoğunlukla kalp, iskelet kası, yağ dokusu gibi insülin-duyarlı dokularda ekspre olduğu bilinmektedir. İnsülin, GLUT4'ün intraselüler membranlardan plazma membranına translokasyonunu stimüle ederek, hücre içerisindeki glukoz transportunun aniden 10-20 kat artışına neden olur (86, 87). GLUT4 preimplantasyon döneminde görevi tam olarak tanımlanmamış olmakla birlikte, sadece blastosistte bulunduğu bilinmektedir (88).





**Şekil 2.16.** Blastosiste glukoz transport modeli. Trofoektoderm (TE) hücrelerinin apikal yüzeyinde dağılım gösteren GLUT3 maternal glukozun embriyo içerisinde alınımından sorumlu iken, alınan glukozun hücreler arası transportu bazal ve bazolateral yüzeydeki GLUT1 ile gerçekleştirilir. Ayrıca GLUT1, blastosölden iç hücre kitlesi (ICM) hücrelerine glukoz transportunu yürütür. Şekilde TE ve ICM'de bazal yüzeyde bulunan GLUT2 proteini de gösterilmiştir. GLUT2'nin transporttaki rolü kesin olarak bilinmemektedir (82).

Bir diğer glukoz taşıyıcısı olan GLUT5 ise, insan veya fare embriyolarında bulunamamış fakat diğer türlerde saptanmıştır (89). GLUT8, fare blastosistlerinde insülin duyarlıdır ve insülin ile muamelesinin ardından transportunu intraselüler kompartmandan plazma membranına doğru yapmaktadır (90).

Preimplantasyon embriyolardaki diğer üç glukoz taşıyıcı protein ise yakın zamanlarda tanımlanmış fakat kesin fizyolojik rolleri belirlenmemiştir. Farede, GLUT9 proteini blastosist aşamasında bulunmakta ve trofoektoderm hücrelerinde intraselüler olarak lokalize olmaktadır (91). GLUT12 mRNA transkriptlerinin fare oositlerinde, zigotta ve 2-hücreli embriyo aşamasında var olduğu, morula aşamasında ekspresyonunun durduğu ve blastosiste tekrar ekspre edildiği tanımlanmıştır (92). GLUT12 ile GLUT8 yüksek derecede sekans homolojisi gösterir ve insülin duyarlı olarak ekspre olur (93). GLUT14 ilk olarak insan testisinde tanımlanmış olup GLUT3 ile oldukça benzerdir (94). Daha sonraları bu glukoz taşıyıcı protein sığır blastosistlerinde de tanımlanmış fakat embriyodaki rolleri araştırılmamıştır (95).

**Tablo 2.4.** Fare preimplantasyon dönem embriyolarda tanımlanmış glukoz taşıyıcıları.

GLUT	Lokasyon	Evre	mRNA	protein	Ref.
1	Sitoplazma boyunca, blastosistte TE'de yoğun	tüm aşamalar	X	X	83, 97
2	Sitoplazma boyunca, trofoblastta bazolateral plazma membranında, iç hücre kitlesi hücrelerinin plazma membranında	8-hücre ve sonrası	X	X	84, 97
3	Erken aşamalarda sitoplazmada, morula ve blastosistte apikal plazma membranında	4-6 hücre ve sonrası	X	X	85
4	Sitoplazmada ve perinükleer alanlarda	Blastosist	X	X	87, 88, 89
8	İnsüline cevap olarak trofoblastların apikal plazma membranında	Blastosist	X	X	89, 90
9	1 ve 2-hücreli plazma membranında, trofoblastta sitoplazmada	Tüm aşamalar	X	X	91
12	-	1-2 hücre ve blastosist	X		84

#### 2.4.2. Preimplantasyon Embriyo Gelişiminde Ekstrinsik Faktörler

Tüm türlerde olduğu gibi, fare ovidukt ve uterusu da spesifik fizyolojik ve biyokimyasal koşullara sahiptir. Bu koşullar, embriyonun metabolik ihtiyaçlarını karşılayarak, gelişimini destekler.

##### 2.4.2.1. Fare Dişi Üreme Sistemindeki Metabolik Koşullar

Preimplantif dönem embriyonun gelişim süresince ihtiyaç duyduğu piruvat, laktat ve glukoz gibi ekzojen besinler ovidukt ve uterus tarafından sağlanır. Enerji substratlarının konsantrasyonları oviduktun ampulla bölgesinden uterusu kadar kademeli olarak değişir. Bu değişim embriyoların gereksinimlerini karşılayacak doğrultudadır (3).

Fare oviduktunun piruvat konsantrasyonu ampulla bölgesinde en yüksek seviyede iken, uterusu en düşük durumdadır (98). Fare embriyolarının ilk yarıklanma bölünmesinde piruvat zorunlu olduğu için, ampulladaki konsantrasyonun en yüksek düzeyde olması beklenen bir durumdur (3). Glukoz için ise tam tersi bir durum söz konusudur. Farede dişi üreme kanalında oviduktun uterusu doğru glukoz konsantrasyonu artmaktadır. Dişi üreme kanalındaki bu fizyolojik koşul, erken yarıklanma embriyolarının glukoz kullanmadığı, geç dönemde ise glukozu mutlak gereksinim duyduğu metabolik adaptasyonları ile doğru orantılıdır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda kültür ortamındaki glukozun erken dönem fare embriyolarında gelişimi olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (100). Bu nedenle, embriyoları çok yüksek glukoz maruziyetinden korumak için oviduktun, düşük glukoz konsantrasyonuna adapte olduğu düşünülebilir.

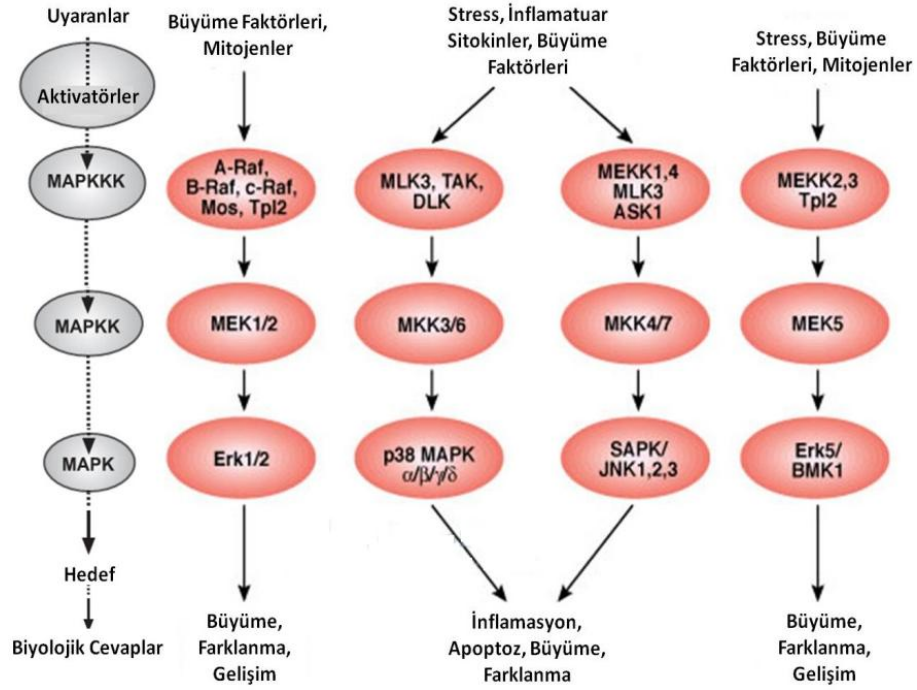
## 2.5. Mitojenle-Aktive Edilmiş Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolağı

Sinyal transdüksiyon ağları, hücrelerin extraselüler ortamlarındaki değişimleri algılamalarına ve bu değişimlere uygun cevabı vermelerine olanak sağlar. Mitojenle-aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ardışık basamakları (kaskat), sinyal transdüksiyon ağları arasında en kapsamlı çalışılanlarından biridir ve hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre hareketinin yeniden düzenlenmesi, hücre bölünmesi, hücre çoğalması (proliferasyon) ve hücre ölümü (apoptoz) gibi pek çok hücrel programlanma süreçlerine dahil olduğu gösterilmiştir (16, 101). Mitojenle-aktive edilmiş protein kinaz sinyal yolağı ligand-reseptör etkileşimlerinden gelen iletilerin aktarımını ve bu iletilerin çok çeşitli hücrel cevaplar (apoptoz, proliferasyon..vs) şeklinde dönüştürülmesini sağlar (102, 103).

MAPK süperailisi, her biri ökaryotik sistemlerde yüksek derecede korunmuş, birbirinden bağımsız dört ardışık sinyal basamağından oluşmaktadır (101):

1. c-Jun N-terminal Kinaz veya Stres Aktivasyonlu Protein Kinazlar (JNK/SPKs) (17, 18)
2. Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinazlar (ERKs) (19)
3. ERK5 veya Büyük MAP Kinaz1 ailesi (20, 21)
4. p38 MAPK ailesi (22)

Mitojenle-aktive edilmiş protein kinazlar bir Serin/Treonin (Ser/Thr) protein kinaz ailesidir. Hedef protein substratlarının serin ve treonin rezidüleri spesifik MAPK'lar tarafından fosforillenmekte ve hücrel yanıtlar oluşturulmaktadır. MAPK sinyal kaskatı üç katmanlı modüller halinde hiyerarşik olarak düzenlenir. MAPK'lar MAPK-kinazlar (MAPKKs) tarafından fosforillenir ve aktive edilir. MAPKK'lar da bir üst basamaktaki MAPKK-kinazlar (MAPKKKs) tarafından fosforillenmekte ve aktive edilmektedir. Sinyalin en üst basamağında bulunan MAPKKK'ların aktivasyonu ise, eksternal uyarıların veya hücre yüzey reseptörlerinin MAPK modüllerine bağlanmasıyla, küçük bir GTPaz ailesi ve/veya diğer protein kinazların etkileşimi tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.17.) (16, 102, 103).



**Şekil 2.17.** MAPK sinyal yolağı ve hüresel yanıtlar. MAPK sinyal yolağı, üst basamaklardaki kinazların hücre yüzey reseptörleri tarafından aktive edilmesinin ardından, MAPK modüllerinin (MAPKKK – MAPKK – MAPK) ardışık aktivasyonları ile organize modüler bir kaskattır (49).

## 2.5.1. p38 MAPK Sinyal Yolağı

### 2.5.1.1. p38 MAPK İzofomları

MAPK kaskatının alt ailesi olan p38 MAPK sinyali, inflamasyon, hücre iskeleti yeniden-düzenlenmesi, hücre proliferasyonu ve apoptozu gibi çok çeşitli hüresel süreçleri düzenleyen dört protein izoformundan oluşmaktadır: p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  (22, 104). p38 $\alpha$  ilk izole edilen 38-kDa'luk proteindir ve uyarılara yanıt olarak hızlı bir şekilde tirozin fosforiller. p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  sürekli olarak ekspre edilirken (105), p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$ 'nın dokulardaki ekspresyonları birbirinden farklıdır (106). Sekans karşılaştırmaları, her bir p38 izoformunun kendi arasında %60'tan fazla benzerlik içerdiğini, fakat diğer MAPK üyeleri ile yalnızca %40-45 oranında benzerlik taşıdığını göstermiştir (Tablo 2.5) (22).

**Tablo 2.5.** p38 MAPK izoformlarının özellikleri (22).

p38 İzofomları	Aminoasit Numarası	mRNA Boyutu (kB)	Moleküler Ağırlık (kDa)	SB203580'e duyarlılık
p38 $\alpha$	360	3.5	38	+
p38 $\beta$	364	2.5	39	+
p38 $\gamma$	367	2.0	43	-
p38 $\delta$	366	1.8	40	-

Fare preimplantasyon gelişiminin tüm basamaklarında (zigot, 2-hücreli, 4-hücreli, 8-hücreli embriyo, morula ve blastosist) p38 MAPK tüm izoformlarını ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) kodlayan mRNA'lar tespit edilmiştir (23). Protein analizlerinde ise, p38 MAPK'nın hem total, hem de fosforile formunun preimplantasyonun tüm gelişim basamaklarında, blastomer sitoplazmasında bulunduğu gösterilmiştir (23, 24).

### 2.5.1.2. p38 MAPK Üst Basamak Substratları

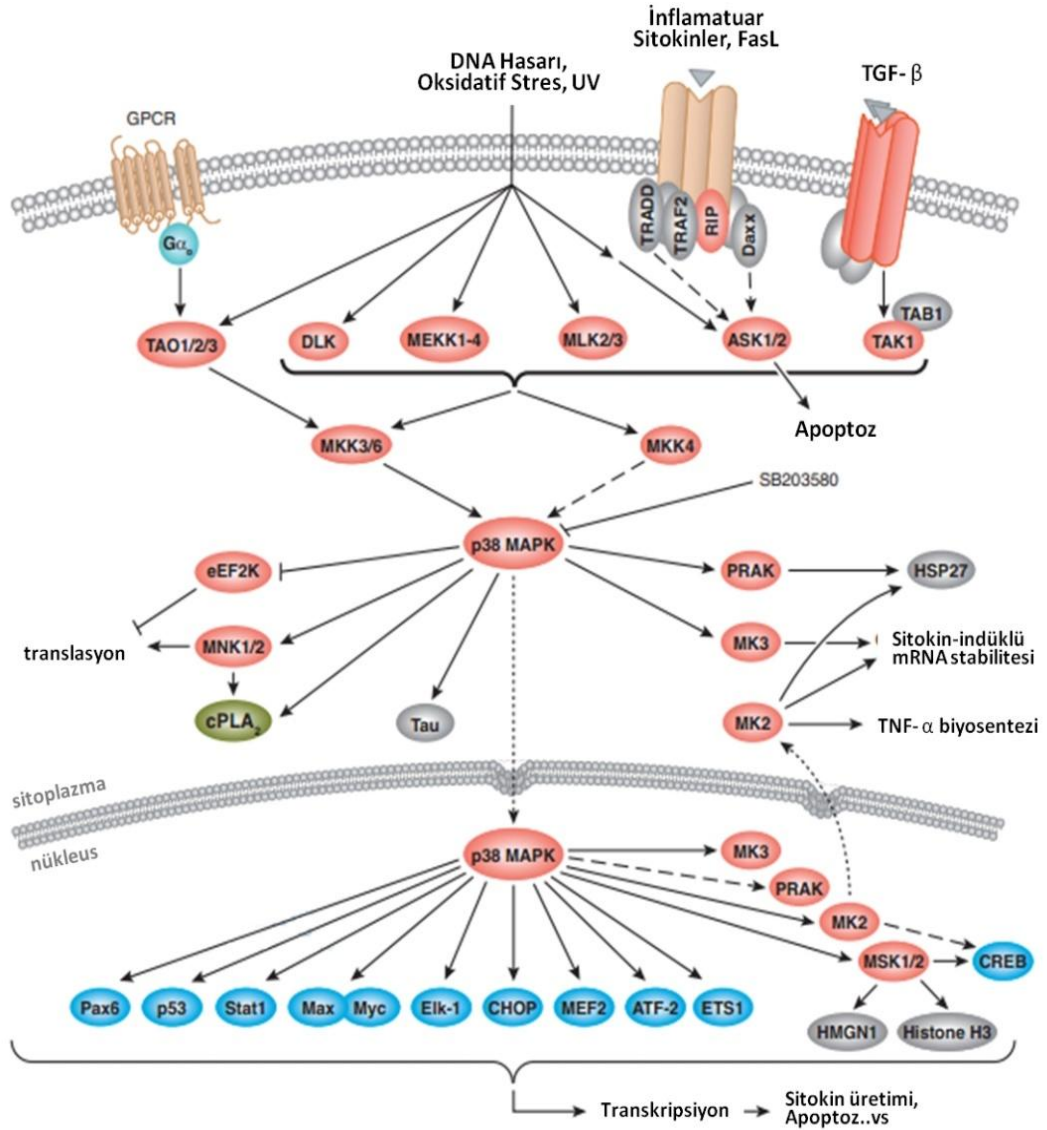
Memelilerde p38 MAPK sinyali çevresel stres, büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler gibi çok çeşitli etkenler tarafından aktive edilebilmektedir (107, 108, 109). p38 izoformlarını ise spesifik olarak aktive eden üst basamak kinazları bulunmaktadır (Şekil 2.18). MKK3 ve MKK6 etkin bir şekilde p38 $\beta$ 'yı aktive edemezken, p38 $\delta$  yalnızca bu iki üst basamak kinazı tarafından aktive edilebilmektedir. Bu durum, p38 izoformlarının farklı regülatörler tarafından aktive edildiğini göstermektedir (110).

Tüm MAPK'lar gibi, p38 grup kinazlar da çiftli kinazlar olan MAP kinaz kinazlar (MKKs) tarafından aktive edilmektedir. MKK6, dört p38 izoformunu da aktive edebilirken, MKK6'nın %80 homoloğu olan MKK3, p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$ 'yı aktive etmektedir. Ayrıca p38 $\alpha$  ve p38 $\delta$ 'nın MKK4 tarafından da aktive olduğu bildirilmiştir (111).

### 2.5.1.3. p38 MAPK Alt Basamak Substratları

MAP kinazla aktive olmuş protein kinaz 2 (MAPKAP-2 veya MK-2) ilk tanımlanmış p38 alt basamak substratıdır. MK-2'nin *in vitro* aktivasyonu, p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  spesifik inhibitör olan SB203580 tarafından inhibe edilir (112). MK-3 tanımlanmış bir diğer p38 alt basamak substratıdır (113). Aktive olmuş MK-2 ve MK-3 proteinleri, ısı şok proteini 27 (HSP27), lenfosit-spesifik protein 1 (LSP1), cAMP cevaplı element-bağlanma proteini (CREB), tirozin hidroksilaz gibi pek çok substratı fosforiller (114, 115). Stress ile aktive olan bir protein kinaz olan, p38 ile regüle/aktive olmuş kinaz (PRAK)'da, p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  tarafından aktive edilmektedir.

p38 MAPK sinyalinin hücre içerisindeki alt basamak hedefleri olan PRAK, MK-2 ve HSP27 mRNA'ları ile bu proteinlerin total ve fosforile formları, preimplantasyon gelişimin tüm aşamalarındaki varlığı gösterilmiştir. Protein lokalizasyon çalışmalarında p38 MAPK'nın fosforile olmuş alt basamak hedeflerinin tespit edilmesi, bu yolağın preimplantasyon gelişimi süresince, hücre içerisindeki aktif sinyal aracı mekanizma olduğunu göstermektedir (23, 24, 25, 26).



Şekil 2.18. p38 MAPK sinyali (49).

#### 2.5.1.4. p38 MAPK Tarafından Aktive Edilen Transkripsiyon Faktörleri

Birkaç transkripsiyon faktörünün p38 sinyali tarafından fosforillendiği ve böylece aktive edildiği gösterilmiştir. Bu transkripsiyon faktörlerinden bazıları şu şekilde sıralanabilir;

- Aktive edici transkripsiyon faktörü-2 (ATF-2) ve ATF-1 (115)
- SRF aksesuar protein 1 (Sap1) (118)
- Büyüme durdurucu ve DNA hasar indükleyici gen 153 (CHOP veya GADD153) (116)
- p53 (119)
- Miyosit çoğaltıcı faktör 2C (MEF2C) ve MEF2A (117)

### 2.5.1.5. p38 MAPK Regülasyonunun Baskılanması

Fizyolojik koşullarda, MAP kinaz aktivitesi çoğunlukla kısa sürelidir. MAP kinazların düzeyi sitümlasyon boyunca asla değişmediği için, fosfatazlar tarafından MAPK defosforilasyonu, MAPK aktivitesinin durdurulmasında major rol oynamaktadır. Fosfatazların bir grubu tanımlanmıştır. MAP kinaz fosfataz (MKP)-1 bu grubun bir örneğidir ve ERK, JNK ve p38'leri içeren bir kaç MAP kinazların aktivitesini baskılamaktadır (120). Diğer dokuz fosfataz tipi memelilerde tanımlanmıştır ve bunların bazıları sıkı transkripsiyonel koşullar altında ve belirli dokularda patern gösterir (121, 122).

*In vitro* geçici transfeksiyon çalışmaları MKP-1, MKP-4 ve MKP-5'in p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$ 'yi etkin bir şekilde defosforile ettiğini göstermiştir (123, 124). İlginç bir şekilde p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$  ise tüm MKP ailesi üyelerine direnç göstermektedir. Bu durum, p38 izoformlarının farklı regüle olmasından kaynaklanmaktadır.

p38 MAPK sinyal yolağının baskılayan bazı farmakolojik inhibitör molekülleri de bulunmaktadır. p38 spesifik inhibitörü olan SB203580'nin (pyridine, 4-[4-(4-fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfinyl)phenyl]-1H-imidazol-5-yl]) yapısal analizleri, bu molekülün ATP bölgelerine bağlanarak, enzimatik aktiviteyi spesifik olarak inhibe ettiğini göstermiştir (125). SB203580 ile benzer davranışta, piroller olarak bilinen bir kaç farklı inhibitör daha bulunmaktadır ve bu inhibitörlerin *in vitro* ve *in vivo* ortamlardaki potansiyel anti-inflamatuar etkisi ortaya konulmuştur (126, 127).

p38 sinyal yolağının farmakolojik inhibitörlerine sitokin-baskılayıcı anti inflammatuar ilaçlar (CSAID) adı verilmektedir ve bu ilaçların inflamasyon ile ilişkili hastalıklardaki rolü birkaç hayvan modellerinde çalışılmıştır. SB203580 molekülü tarafından p38 aktivitesinin baskılanması, fare endotoksin-indüklenmiş şok modellerinde mortaliteyi düşürmekte ve fare kollojen-indüklü artiritin ve rat adjuvan artiritinin gelişimini baskılamaktadır (127). Bununla birlikte, bir diğer p38 inhibitörü olan SB220025'in granülomanın vasküler yoğunluğunu doz-bağımlı düzeyde belirgin bir şekilde geriletteği gösterilmiştir (128). Bir başka çalışmada ise, SB203580 uygulamasının fare endometriyozis modelinde IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MMP-2 ve MMP-9 seviyelerini azaltarak, endometriyotik lezyonları geriletteği gösterilmiştir (129). Bu sonuçlar, p38 sinyalinin veya komponentlerinin, inflammatuar hastalıklar için tedavi edici hedefler olabileceğini önermektedir (22). p38 MAPK sinyali, TNF- $\alpha$  ve IL-1 üretimini düzenlediği için, p38 inhibitörlerinin yalnızca pro-inflamatuar sitokin üretimini değil, onların etkilerini de baskılaması ve böylece inflammatuar ve immün cevaplı hastalıklara neden olan habis siklusları da durdurması beklenmektedir (130).

p38 MAPK'nın ve alt basamak hedeflerinin preimplantasyon süresince tespit edilmesinin ardından, son yıllarda yapılan bazı çalışmalar ile birlikte, bu yolağın embriyo gelişimindeki fizyolojik rolleri de araştırılmaya başlanmıştır. p38 MAPK'nın farmakolojik inhibitörleri olan CSAID'lerin *in vitro* embriyo kültür ortamlarında uygulanması dikkat çekici bazı sonuçlara işaret etmektedir. *In vitro* kültürde SB220025 ve SB203580 uygulaması ile p38 MAPK aktivitesi baskılanmış embriyoların 8-16 hücre aşamasında gelişimlerinin gerilediği ve bir çoğunun blastosist aşamasına ulaşamadığı gösterilmiştir (24, 25, 26). Buna karşılık p38

MAPK aktivesi baskılanmış erken yarıklanma dönemindeki embriyolarda belirgin bir gelişim geriliği olmamaktadır (24). Bu sonuçlar, aktif p38 MAPK sinyalinin normal bir preimplantasyon gelişimi için mutlak gerekli mekanizmalardan biri olduğunu göstermektedir.

## **2.6. Çalışmanın Hipotezi**

Preimplantasyon embriyo gelişimi süresince gerek embriyonun metabolik ihtiyaçları, gerekse bu ihtiyaçları karşılayacak olan transport sistemleri ve enzimatik aktiviteler tanımlanmış olmasına karşın, bu sistemlerin hücre içerisinde kontrolünü düzenleyen sinyal araçlarına ilişkin bilgiler bulunmamaktadır. Dahası, p38 MAPK sinyali bloke edilmiş embriyolarda, preimplantasyon gelişim gerilikleri tespit edilmiş fakat bu durumun fizyolojik nedenleri aydınlatılamamıştır. Preimplantasyon süresince embriyolardaki p38 MAPK aktivitesinin bloke edilmesi, metabolik ihtiyaçların değiştiği ve aktivitenin yüksek olduğu geç dönem embriyo gelişimi üzerinde etkisini göstermesi, bu yolağın embriyoda metabolik süreçleri düzenleyen hücre içi aracı mekanizmalardan biri olabileceğini akla getirmektedir. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda, direkt olarak embriyo yaşayabilirliği üzerinde etkili olan GLUT proteinlerin pek çok dokudaki ekspresyonel kontrolünü p38 MAPK sinyalinin yaptığı bildirilmiştir (27-32). Bu bilgilerden yola çıkarak şu hipotezi kurduk: Preimplantif dönem embriyonik gelişimde GLUT transport proteinlerinin ekspresyonları p38 MAPK sinyal aracılığıyla gerçekleşir. Bu bağlamda amacımız; p38 MAPK inhibisyonunda GLUT1 ve GLUT4 protein ve mRNA ekspresyon düzeylerini belirlemektir.



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Süperovulasyon Protokolü

Süperovulasyon, dışarıdan hormonal müdahale ile genital döngüyü kontrol altına alarak, normal fizyolojik koşullarda elde edilebilen kaliteye en yakın, çok daha fazla sayıda, eş zamanlı olarak oosit ve embriyo elde etmek amacıyla kullanılan yöntemdir. Bu çalışmada bir Folikül Situmulan Hormon (FSH) analogu olan Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, Sigma G-4877), dişi farelerde folikülogenezi stimüle etmek için; bir LH analogu olan Human Chorionic Gonadotropin (hCG, Sigma CG-10) ise dişi farelerde ovulasyonu indüklemek için kullanıldı.

#### 3.1.1. Gonadotropinlerin Hazırlanışı

Çoğu fare soylarında PMSG ve hCG'nin önerilen çözeltisinde dozu intraperitoneal 5 I.U. dir. Bu çalışmada, uygulamadan önce PMSG ve hCG steril enjeksiyonluk su içerisinde 50 I.U./ml olacak şekilde sulandırıldı. Stok solusyonlar alikvatlar içerisine ayrılarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de kullanıma kadar muhafaza edildi. Enjeksiyonun yapılacağı gün hazırlanan bu çözeltiden, her hayvana 0.1 ml intraperitoneal yolla enjekte edildi.

#### 3.1.2. Gonadotropinlerin Uygulanması

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen 5-6 haftalık BALB/C ırkı dişi ve çiftleştirme için 12-18 haftalık BALB/C ırkı erkek fareler kullanıldı. BALB/C ırkı dişi ve erkek fareler su ve besin kısıtlaması olmaksızın, on iki saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde muhafaza edildi. Folikülogenezi stimüle etmek için her bir dişi fareye intraperitoneal yolla 5 I.U. PMSG enjeksiyonu yapıldı. PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra, ovulasyonu indüklemek için intraperitoneal yolla 5 IU hCG enjeksiyonu yapıldı. hCG enjeksiyonunun yapıldığı günün akşamında dişi fareler, erkek fareler (2 dişi bir erkek olacak şekilde) ile gece boyunca çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi sabah vajinal plak kontrolü yapılan ve plak varlığı belirlenen dişi fareler fertilizasyonun 0,5. gününde kabul edildi.

### 3.2. Embriyoların Toplanması

Vajinal plak kontrolü yapılarak gebeliğin pozitif olduğu varsayılan dişi fareler hCG enjeksiyonundan 48 saat sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen farelerin oviduktları çıkartılarak %0,4 BSA (Sigma A8412) içeren Human Tubal Fluid (HTF) (Irvine Scientific 90126) medyumu içerisine alındı. Stereo mikroskop (Zeiss Stemi SV 11) altında yeni bir %0,4 BSA-HTF medyumu içerisine alınan oviduktun penset ile sabitlenmesi sağlanarak, ampulla bölgesi enjektör iğnesi ile patlatıldı ve embriyoların ovidukt içerisinden dışarıya çıkmaları sağlandı. Medyuma yayılan 2-hücreli embriyolar stereo mikroskop altında toplandı ve üç adet %0,4 BSA-HTF medyum damlasından geçirilerek yıkandıktan sonra, her

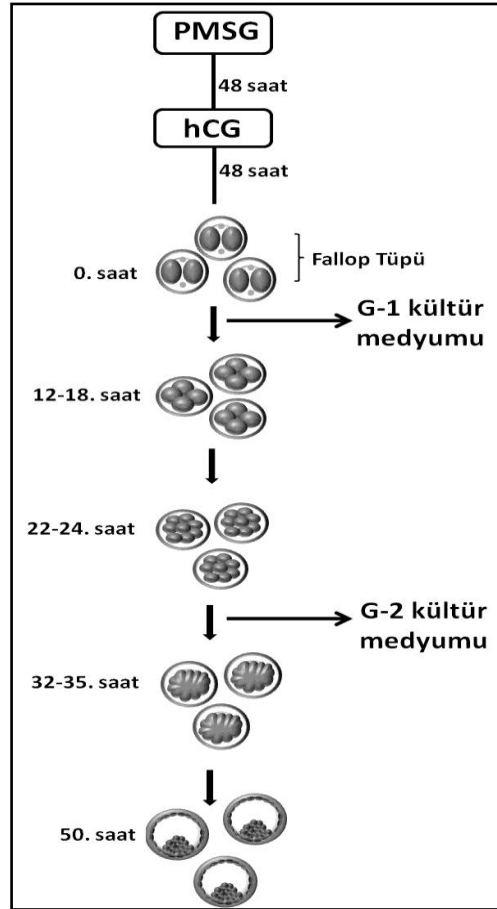
bir deney grubunda eşit sayıda embriyo içerecek şekilde kültür ortamlarına aktarıldı. Embriyoların medyumların birinden diğerine aktarılma işlemleri ucu inceltilmiş cam pastör pipetleri ve ağız pipeti kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.3. Embriyo kültürü ve İnhibitör Uygulaması

İki-hücreli aşamada toplanan embriyolar her bir deney grubuna ait *in vitro* kültürde 8-hücreli, morula ve blastosist aşamalarına kadar geliştirildi. İki-hücreli embriyoların kültür medyumlarına aktarıldığı saat kültürün sıfıncı (0.) saati olarak kabul edildi ve her bir deney grubu için embriyoların yarıklanma süreleri ve 8-hücreli, morula ve blastosist aşamalarına ulaştıkları saatler not edildi.

#### 3.3.1. Çalışmada Kullanılan *In-Vitro* Embriyo Kültür Medyumları

Çalışmada çok adımlı (sekansiyel) kültür medyumları sistemi kullanıldı. Sekansiyel medyumlar embriyonun fizyolojisindeki ve gereksinimlerindeki değişiklikler göz önüne alınarak geliştirilmiş özel medyumlardır. Embriyonun gereksinimleri hangi gelişim evresinde bulunduğuna göre değişir (5, 8, 10). Bu çalışmada, iki-hücreli aşamada toplanan embriyolar öncelikle piruvat ve laktat içeren G-1 (G-1<sup>TM</sup> PLUS v5 Cleavage Medium, Vitrolife 26080.02) medyumuna içerisine alındı. Sekiz-hücreli aşamaya geliştikleri gözlenen embriyolar glukoz içeren G-2 (G-2<sup>TM</sup> PLUS v5, Vitrolife 26082.02) medyumuna içerisine aktarıldı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Çalışmada uygulanan in-vitro kültür deney düzeneği.

### 3.3.2. İnhibitörün Hazırlanışı

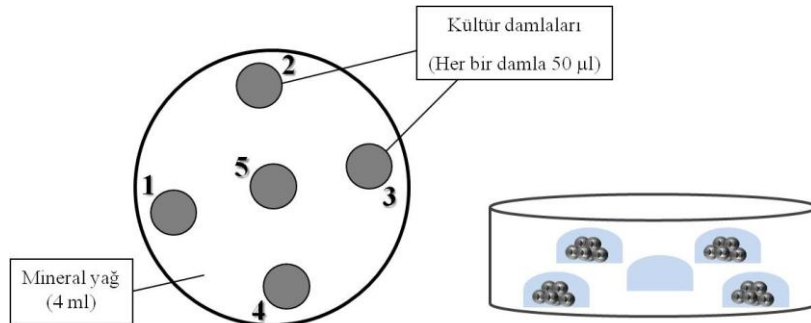
Çalışmada p38 MAPK selektif inhibitörü olan SB203580 (CSAID<sup>TM</sup>, Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drug, Calbiochem 559389) molekülü kullanıldı. Uygulamadan önce, stok 5 mg toz halindeki inhibitör, önerilen çözücüsü olan DMSO (dimetil sülfoksit, Sigma D2650) içerisinde, stok konsantrasyonu 20 mM/ml olacak şekilde çözüldü. Stok çözelti alikuatlara ayrıldı ve -20°C’de kullanıma kadar muhafaza edildi. Embriyo kültür medyumlarının hazırlanacağı gün oda sıcaklığına getirilen alikuatlardan, 20 µM/ml doz SB203580 içerecek şekilde kültür medyumları içerisine eklendi.

### 3.3.3. Deney Grupları

Çalışmada üç deney grubu oluşturuldu;

- 1) **Kontrol grubu;** sadece kültür medyumunu içeren ortam
- 2) **Çözgen grubu;** kültür medyumunu + inhibitör çözücüsünü (%0.1 DMSO) içeren ortam
- 3) **İnhibitör grubu;** kültür medyumunu + 20 µM SB203580 molekülü (CSAID<sup>TM</sup>, p38 MAPK selektif inhibitörü) içeren ortam (23-26).

Hazırlanan kültür medyumları ile steril petri kabı içerisinde 50 µl’lik 5 damla oluşturuldu. Kültür damlalarının üzeri buharlaşmayı, kontaminasyonu ve pH değişimlerini engellemek amacıyla 5 ml steril mineral yağ (Sigma M5310) ile örtüldü. Bu kültür düzeneği (Şekil 3.2) her bir deney grubu (kontrol, çözgen, inhibitör) için oluşturuldu. Bütün uygulamalar laminar flow kabin (Metisafe Class II Safety Cabinet) içerisinde gerçekleştirildi. Hazırlanan kültür ortamının 37°C ısı, %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> kültür koşullarına sahip inkübatörde (Heraeus HERA Cell 150) petri kabının kapağı açık bir şekilde en az 2 saat gazlanması sağlandı. Stereo mikroskop altında toplanan embriyolar, her damlada eşit sayıda embriyo olacak şekilde gazlanmış kültür damlalarına aktarıldı. Ortadaki damla boş bırakıldı ve toplanan embriyoları yıkama amacıyla kullanıldı. Toplanan embriyoların 3 deney grubuna ait kültür medyumlarına aktarım işlemi tamamlandıktan sonra, petri kabının kapağı kapalı bir şekilde inkübatöre (37 °C ısı, %95 nem, %5 CO<sub>2</sub>) kaldırıldı.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan kültür düzeneği.

### 3.3.4. Embriyoların Gelişim Takibi ve İnvirt Mikroskopta Değerlendirilmesi

p38 MAPK inhibitörünün preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine etkisini belirlemek için, embriyoların gelişim potansiyelleri her üç grupta, *in vitro* kültür süresince değerlendirildi. Embriyoların, invert mikroskop (Olympus IX71) altında her gün gelişimleri takip edildi, tüm gelişim aşamaları değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. İki-hücreli embriyoların toplandığı ve kültür medyumuna aktarıldığı gün kültürün 0. saati olarak kabul edildi. Gruplar arası kıyaslama kontrol grubundaki yarıklanma süreleri esas alınarak yapıldı. 0. saatten itibaren kültürde her üç grup için, 8-hücreli, morula ve blastosist aşamalarına ulaşan embriyo sayıları not edildi. Sonuçta bütün veriler toplandı ve istatistiksel analiz yapılarak, üç deney grubundaki embriyoların gelişim oranları belirlendi.

### 3.3.5. İstatistiksel Analiz

Kontrol, çözen ve inhibitör eklenmiş ortamlarda *in vitro* kültüre edilen embriyoların gelişim dağılımları istatistiksel olarak One-Way Anova testi ile değerlendirildi.  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

### 3.4. İmmünofloresan Boyama

Çalışmada bu yöntem kontrol, çözen ve inhibitör içeren kültür ortamlarında *in-vitro* kültür sonrası elde edilen 8-hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda araştırılan protein ekspresyonlarının belirlenmesi ve ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması için kullanıldı.

#### Kullanılan Solüsyonlar:

- **%3 Paraformaldehit Solüsyonu**

6 gr paraformaldehit 200 ml bidistile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica F20520162) çözünene kadar karıştırıldı, çözünmesi için içerisine NaOH eklendi. Berrak çözelti oluştuktan sonra 1 tablet PBS eklendi (1X PBS). pH=6.4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra solüsyon eşit hacimlere bölündü ve -20°C'de muhafaza edildi.

- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz) - %2 BSA Solüsyonu**

1 tablet PBS (Sigma P4417) 200 ml bidistile su içerisinde çözülerek 1X PBS hazırlandı. Ardından bu solüsyon içerisinde 2 gr toz BSA (Sigma A9647) çözüldü. En son olarak, hazırlanan 200 ml'lik tampon içerisine kontaminasyonu engellemek amacıyla 90 mg Sodyum Azid (%0,09 oranında) eklendi. pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.

- **Permeabilizasyon Solüsyonu**

100 µl Tween-20 (Sigma P1379) 100 ml PBS içerisinde (%0,1 oranında olacak şekilde) çözüldü.

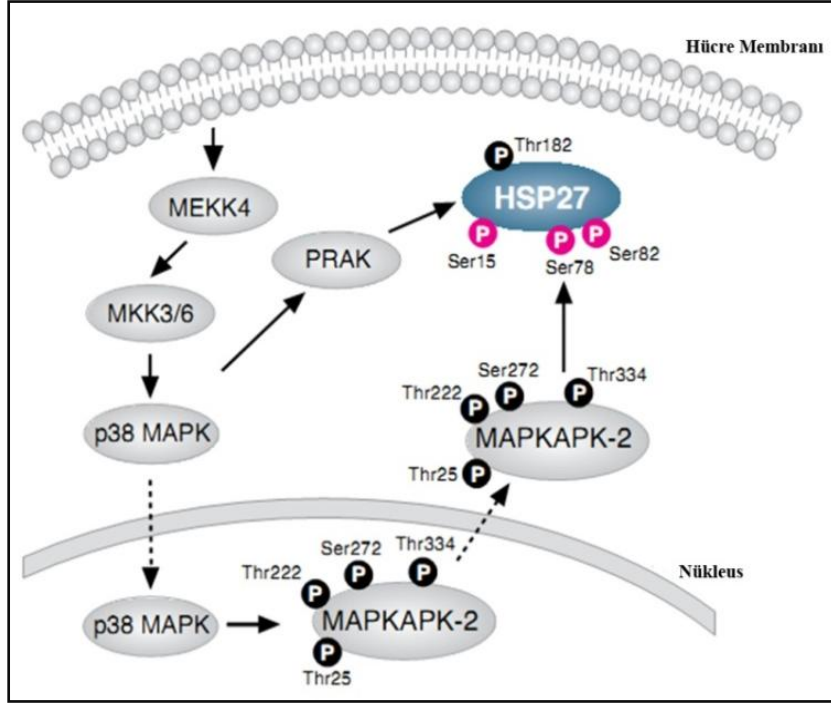
- **Bloklama Solüsyonları**
  - a. Normal Keçi Serumı (Vector N0912); %20'lik oranda serum içeren PBS - %0,1 Tween-20 solüsyonu hazırlandı.
  - b. Normal Eşek Serumı (Jackson ImmunoResearch 017-000-121); %20'lik oranda serum içeren PBS-%0,1 Tween-20 solüsyonu hazırlandı.
- **Antikor Diluent Solüsyonu**  
%0,05'lik Tween-20 içeren PBS - %2 BSA solüsyonu antikor dilüent olarak hazırlandı.
- **DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride)**  
Nükleer boyanma için DAPI (Sigma D8417) 1:500 konsantrasyonda 1X PBS içerisinde hazırlandı.
- **Kapatma Solüsyonu:** Vector Vectaschield H-1100

#### **Gözlem:**

- **Stereomikroskop:** Tüm immün boyama basamakları Zeiss Stemi SV11 marka stereomikroskop altında yapıldı.
- **Floresan Mikroskop:** İmmünboyama sonrası floresan-işaretlenmiş proteinlerin gözlemi ve değerlendirilmesi için Olympus BX61 marka floresan mikroskop kullanıldı.

#### **3.4.1. Preimplantasyon Embriyolarda p38 MAPK Sinyal Yolağı İnhibisyonunun Gösterilmesi**

Hücre sitoplazması içerisinde aktif olan p38 MAPK sinyali hsp27 proteinini fosforiller. Aktif p38 MAPK sinyali nükleus içerisine geçtikten sonra ise, nükleus içerisindeki MK2 proteininin fosforilasyonunu gerçekleştirir. Hücre içerisindeki aktif p38 MAPK sinyali p-MK2 ve p-hsp27 proteinlerinin varlığı ile belirlenir (Şekil 3.3). Çalışmada kullanılan inhibitör molekülünün (SB203580; p38 MAPK selektif inhibitörü) etkinliğinin doğrulanması için, p38 MAPK sinyal yolağının alt basamak hedefleri olan MK2 (MAPKAPK2) ve hsp27 (heat shock protein 27) proteinlerinin fosforilasyonları değerlendirildi. Her üç deney grubundan (kontrol, çözen, inhibitör uygulanmış) *in vitro* kültür sonrası elde edilen 8-hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda p-MK2 (cell signalling 3616) ve p-hsp27 (cell signalling 2401) proteinlerinin varlığı immünofloresan boyama yöntemi ile belirlendi ve inhibitör etkinliği gösterildi (23-26).



Şekil 3.3. Hücre içerisindeki p38 MAPK sinyal aktivitesi doğrultusunda hsp27 ve MK2 proteinlerinin fosforillenmesi (49).

### 3.4.2. Preimplantasyon Embriyolarda Glukoz Taşıyıcı Proteinlerin Gösterilmesi

Çalışmada Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcıları (GLUT) protein ailesinden GLUT1 ve GLUT4 proteinlerinin preimplantasyon dönemi embriyolarda varlığı her üç deney grubunda immünofloresan boyama yöntemi ile belirlendi ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Literatür bilgilerine göre, GLUT1 protein ve mRNA'sı preimplantasyon embriyonik gelişimin her aşamasında bulunmasına karşın, GLUT4 protein ve mRNA'sı preimplantasyon embriyonik gelişimin yalnızca blastosist aşamasında bulunmaktadır (13). Çalışmada GLUT1 (Abcam, ab652) proteini her üç deney grubundan (kontrol, çözgen, inhibitör uygulanmış) *in vitro* kültür sonrası elde edilen 8-hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda; GLUT4 (Abcam, a654) proteini her üç deney grubundan *in vitro* kültür sonrası elde edilmiş yalnızca blastosist aşamasındaki embriyolarda varlığı immünofloresan boyama yöntemi ile belirlendi ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı.

### 3.4.3. İmmünofloresan Boyama Yöntem Basamakları

Çalışmada uygulanan immünofloresan boyama prosedürü şu basamaklardan oluştu;

1. Embriyolar %3 paraformaldehit içerisinde alınarak 20 dakika fikse edildi.
2. Fiksasyon işleminden sonra embriyolar, 3 adet 10'ar dakika PBS - %2 BSA damlasından geçirilerek yıkandı.
3. Yıkama işleminin ardından embriyolar, %0.1'lik tween-20 içerisinde 30 dakika bekletilerek permeabilize edildi.

4. Bloklama solüsyonu içerisinde embriyolar 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
5. Bloklama süresinin sonunda embriyolar, antikor dilüent solüsyonu içerisinde hazırlanmış olan primer antikor içerisine aktarıldı ve gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Çalışmada araştırılan tüm primer antikorlar için gece boyu +4°C inkübasyon uygulandı.
6. İnkübasyon süresinin sonunda embriyolar tekrar 3 adet 10’ar dakika PBS - %2 BSA damlasından geçirilerek yıkandı.
7. Embriyolar antikor dilüent solüsyonu içerisinde hazırlanmış floresan işaretli sekonder antikorda, 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Sekonder antikor uygulamasından sonra embriyolar 3 adet 10’ar dakika PBS-%2BSA damlasından geçirilerek yıkandı.
9. Nükleer DNA boyaması için embriyolar DAPI solüsyonu içerisine alındı ve 1 dk solüsyon içerisinde inkübe edildi.
10. Embriyolar tek bir PBS-%2BSA damlasından geçirilerek yıkandı.
11. Embriyolar 5µl floresan ışımının solmasını engelleyen kapatma solüsyonu içerisine alarak, lamel ile hava boşluğu kalmayacak şekilde kapatıldı.

Primer antikorlar, sekonder antikorlar ve bunlara ait dilüsyon oranları Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** İmmünofloresan işaretleme yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve dilüsyon oranları.

PRİMER ANTİKOR	KATALOG NO	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	DİLÜSYON
GLUT1	Abcam Ab652	1/300	Alexa Flour 488 Eşek Anti-Tavşan A-21206 Invitrogen	1/500
GLUT4	Abcam Ab654	1/50		
p-MK2	Cell Signalling #3616	1/100	Alexa Flour 488 Keçi Anti-Tavşan A-11008 Invitrogen	
p-hsp27	Cell Signalling #2401	1/50		

### 3.5. Kantitatif Real-Time PCR Tekniği

Çalışmada qRT-PCR (quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction), tekniği, üç deney grubunda (kontrol, çözgen, inhibitor) GLUT1 ve GLUT4 gen ekspresyonlarını mRNA düzeyinde kantitatif düzeyde değerlendirmek amacıyla kullanıldı. Sekiz-hücreli, morula ve blastosist aşamasına kadar kültüre edilen embriyolar, her bir grup için 20 adet embriyo olacak şekilde liziz tamponu içerisine toplandı. Her bir grup için toplanan örneklerden RNA izolasyonu, izole edilen RNA’lardan reverse transkripsiyon ile cDNA eldesi ve elde edilen cDNA örnekleri ile real-time PCR uygulaması gerçekleştirildi.

### 3.5.1. Total RNA İzolasyon Basamakları

Sekiz-hücre, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolardan RNA izolasyonu RNAqueous-Micro (Micro Scale RNA Isolation Kit, Ambion Am1931) kiti ile gerçekleştirildi.

1. Her gruptan (kontrol, çözgen, inhibitör uygulanmış) elde edilen 20 embriyo, steril 0.5 ml tüpteki 50 µl lizis solüsyonu içerisine konuldu, +4 °C'de 10 dakika bekletildi.
2. Süre sonunda tüplere, 25 µl etanol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
3. Lizat + etanol karışımı belirli bir por çapına sahip micro filtreden 30 saniye 13200 rpm'de döndürülerek geçirildi. Böylece karışımdaki RNA'nın tamamının filtreden geçmesi sağlandı. RNA'lar, bu aşamada filtrelere tutundu.
4. Daha önceden oda ısısına getirilmiş 180 µl yıkama solüsyonu filtreyi içeren tüpe eklendi, 30 saniye 13200 rpm'de döndürülerek yıkandı. Prosedürün bu basamağı 2 kez tekrar edildi.
5. Ardından 13200 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
6. Filtre, yıkama tüpüne konuldu, +4 °C'de saklanan ve kullanım öncesi 75 °C'de önceden ısıtılan ayırma solüsyonundan 5 µl filtrenin tam merkezine gelecek şekilde eklendi. Kapağı kapatılıp oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra RNA'nın filtreden tüpün dibine inmesi için 13200 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.
7. Aynı işlem 5 µl ayırma solüsyonu ile bir kez daha gerçekleştirildi, RNA'ların mikro ayırma tüpünün dibinde toplanması sağlandı.
8. Mikro ayırma tüpünün dibindeki total RNA, (yaklaşık 10 µl) steril 0.2 ml'lik PCR tüpüne alındı.
9. Mikro ayırma tüpündeki karışımın hacminin %10'u kadar 10x DNaz I tamponu (1 µl) ve 1 µl 10x DNaz I konulup 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Böylece, genomik DNA'lar ortamdan uzaklaştırıldı.
10. Tüpteki hacmin %10'u kadar 10x DNaz inaktivasyon solüsyonu (1.2 µl) konuldu, iyice karıştırıldı ve oda ısısında 2 dk bekletildi.
11. Süre tamamlandıktan sonra, 13 200 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip DNA inaktivasyon solüsyonunun dibe çökmesi sağlandı. Tüpün üstteki kısmında yer alan RNA, yeni bir 0.2 ml'lik tüpe konuldu. İzole edilen RNA'lar, cDNA eldesi işlemine kadar -80 °C saklandı.

### 3.5.2. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

Çalışmada cDNA eldesi aşağıda belirtilen basamaklarla gerçekleştirildi;

1. Her bir tüp için hazırlanacak olan temel karışım Tablo 3.2.'de belirtilmiştir. Her tüpe koyulacak olan temel karışımın aynı içerik ve homojenitede olmasını sağlamak açısından örnek sayısına göre ana bir karışım hazırlanıp, tüplere bu karışımdan 8 µl aktarıldı. Uygulamada cDNA eldesi için Ambion RETROscript (AM1710) kiti kullanıldı.



**Tablo 3.2.** Komplementer DNA eldesinde kullanılan içerikler ve konsantrasyonları.

İçerikler	Hacim (µl)	Final konsantrasyon
10x Tampon RT	2.0	1x
dNTP (her bir dNTP 2.5 mM'dır.)	4.0	0.5 mM/ her bir dNTP
RNaz inhibitör (10 unit/µl)	1.0	10 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
MMLV-revers transkriptaz	1.0	100 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
<b>Toplam</b>	<b>8.0</b>	

- 0.2 µl'lik reaksiyon tüplerine izole edilmiş olan RNA'dan 10 µl konuldu. Ayrıca her bir tüpe 2 µl random decamer eklendi. İzole edilen RNA'lardaki sekonder kıvrımları aşmak için tüpler, 85 °C'de 3 dakika bekletildi.
- Her bir tüpe 8 µl temel karışımdan da konulup, karıştırıldı ve kısa süre (spin) döndürüldü.
- Reaksiyon tüpleri, 42 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra, tüpler 92 °C'de 10 dakika inkübe edildi ve elde edilen cDNA'lar, -20 °C'de saklandı.

### 3.5.3. Kantitatif Real-Time PCR Uygulama Basamakları

Görelî ve kesin mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan kantitatif real time RT-PCR tekniği, gen ekspresyonu çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Çalışmada bu teknik için, her hücrede belirli düzeyde eksprese olduğu bilinen house-keeping bir gen olan beta aktin ekspresyonu temel alındı ve gruplardaki GLUT1, GLUT4 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Kantitatif real-time PCR uygulama basamakları aşağıda belirtilmiştir.

- Yukarıda belirtildiği gibi RNA izolasyonu ve cDNA eldesi gerçekleştirildi.
- Tablo 3.3.'de belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu. Glut1 ve Glut4 genlerine ait primer dizileri Tablo 3.4.'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.3.** qRT-PCR yönteminde kullanılan içerikler ve miktarları.

İçerikler	Miktarları (µl)
2X SYBRGreen Supermix (BioRad 1708880)	12.5
Primer İleri (F) (10 µm)	0.5
Primer Geri (R) (10 µm)	0.5
Nükleaz içermeyen su	25 µl'ye tamamlandı.

**Tablo 3.4.** qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler.

Glut1 1F	5' -TGTGTACTGCGGCCTGACTACTG-3'
Glut1 2R	5' -AACAGCTCCAAGATGGTGACCTTC-3'
Glut4 1F	5' -AAGATGGCCACGGAGAGAG-3'
Glut4 2R	5' -GTGGGTTGTGGCAGTGAGTC-3'

Amplifikasyon, 30 siklusta, tablo 3.5.'de belirtilen PCR protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. PCR programı olarak touch-down sistemi kullanıldı. Üç grup için, beta aktin, GLUT1 ve GLUT4 genlerinin ekspresyonel değişimleri, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında bulunan real-time PCR cihazında (Light Cycler, Roche) okutuldu ve software programı yardımıyla belirlendi. Her dört gen için verilen eşik değerleri (ct değerleri)  $2[-\Delta\Delta C(T)] (2^{-\Delta\Delta CT})$  metodu kullanıldı, GLUT1 ve GLUT4 genlerinin göreceli ekspresyonları hesaplandı.

**Tablo 3.5.** Çalışmada kullanılan PCR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de	5 dakika
10 siklus (her siklusta sıcaklık bir derece düşmektedir)		
92 °C'de	30 saniye	
65 °C'de	20 saniye	
72 °C'de	1 dakika	
Geriye kalan 25 döngü		
92 °C'de	30 saniye	
55 °C'de	20 saniye	
72 °C'de	1 dakika	

### 3.5.4. İstatistiksel Analiz

Kantitatif Real-Time PCR bulgularının istatistiksel anlamlılık düzeyi Kruskal-Wallis One Way analizi ile değerlendirildi.  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Bu çalışmada, preimplantasyon dönem embriyo gelişiminde önemli bir intrinsik kontrol mekanizması olduğu bilinen p38 MAPK sinyal yolağı, *in vitro* kültür süresince embriyolarda inhibe edilerek, preimplantasyon embriyo gelişiminin glukozu bağımlı olduğu bilinen 8-hücreli, morula ve blastosist evrelerinde gelişime etkisi gözlemlendi ve kontrol grupları ile kıyaslandı. Ayrıca, preimplantasyon embriyolarda p38 MAPK sinyal yolağı inhibisyonunun, embriyodaki GLUT1 ve GLUT4 ekspresyonları üzerine etkisi protein ve gen düzeyinde araştırıldı.

### 4.1. *In-Vitro* Kültür Ortamlarındaki Embriyoların Gelişim Potansiyelleri

#### 4.1.1. Embriyoların Gelişim Takibi

Yapılan gelişim takibi gözlemleri sonucunda, kontrol ve çözgen grubuna ait embriyoların *in vitro* kültüründe yüksek oranda blastosist gelişimi gözlenirken; inhibitör uygulanmış grupta ise blastosist gelişiminin oldukça gerilemiş olduğu gözlemlendi. *In vitro* kültür süresince yapılan embriyo sayımına ait total sonuçlar Tablo 4.1.'de görülmektedir.

**Tablo 4.1.** Embriyoların *in vitro* gelişim potansiyelleri

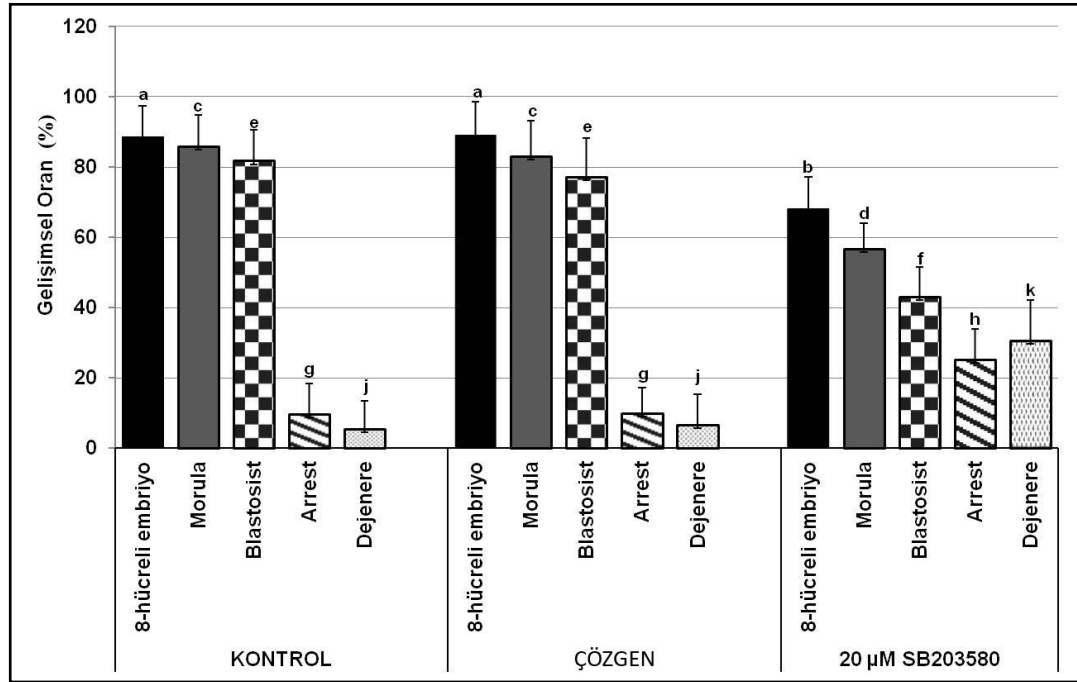
Elde edilen 2-hücreli embriyolar (n) (0. Saat)		8-hücreli embriyo (n) (22. Saat)	Kompakt Morula (n) (35. Saat)	Blastosist (n) (50. Saat)	Arrest (n)	Dejenere (n)	
Kültür Ortamları	Kontrol	195	172 (%88,69)	150 (%85,85)	122 (%81,78)	22 (%9,79)	10 (%5,52)
	Çözgen	195	173 (%89,13)	148 (%83,13)	121 (%77,19)	21 (%10,06)	11 (%6,70)
	20 µM SB203580	223	152 (%68,12)	117 (%56,78)	77 (%43,21)	56 (%25,21)	64 (%30,68)

İki-hücreli aşamada elde edilen embriyolar, normal kültür medyumunda kültüre edildiklerinde, toplamda 195 adet 2-hücreli embriyodan 172 tanesinin (%88,69) 8-hücreli aşamaya, 150 tanesinin (%85,85) kompakt morula aşamasına, 122 tanesinin (%81,78) blastosist aşamasına ulaştıkları gözlemlendi. İnhibitör çözücüsü olan %0.1 oranında DMSO içeren kültür medyumunda *in vitro* kültüre edilen toplamda 195 adet 2-hücreli embriyonun 173 tanesinin (%89,13) 8-hücreli aşamaya, 148 tanesinin (%83,13) kompakt morula aşamasına, 121 tanesinin (%77,19) blastosist aşamasına ulaştıkları gözlemlendi. 20 µM inhibitör molekülü içeren kültür medyumunda kültüre edilen toplamda 223 adet 2-hücreli embriyonun 152 tanesinin (%68,12) 8-hücreli aşamaya, 117 tanesinin (%56,78) kompakt morula aşamasına, 77 tanesinin (%43,21) blastosist aşamasına ulaştıkları gözlemlendi. İnhibitör molekülünün

bulunduğu *in vitro* kültür ortamındaki gerilemiş gelişim potansiyeli dikkat çekicidir. Kültürdeki arrest ve dejenere oranlarına bakıldığında, kontrol grubunda toplamda 195 adet embriyonun 22 tanesi (%9,79) arrest, 10 tanesi (%5,52) dejenere olduğu gözlemlendi. Çözgen grubunda ise toplamda 195 adet embriyonun 21 tanesi (%10,06) arrest, 11 tanesi (%6,70) dejenere olduğu gözlemlendi. İnhibitör ile muamele edilmiş grupta ise toplamda 223 adet embriyonun 56 (%25,21) arrest, 64 adet embriyonun (%30,68) dejenere oldukları görüldü. İnhibitör grubunda görülen arrest oranında kontrol grubuna göre 2.5 katlık; dejenere oranında kontrol grubuna göre 5.5 katlık artış olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.1.2. Embriyoların Gelişme Oranlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Kontrol, çözgen ve inhibitör uygulanmış *in vitro* ortamda embriyo gelişim dağılımlarının istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda; tüm değişkenler için (8-hücreli embriyo, morula, blastosist, arrest, dejenere) kontrol ve çözgen grupları arasındaki fark anlamlı bulunmazken ( $p>0,05$ ), inhibitör grubunun her iki grup ile arasındaki fark anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.1). İstatistiksel değerlendirme için One-Way Anova testi kullanıldı.



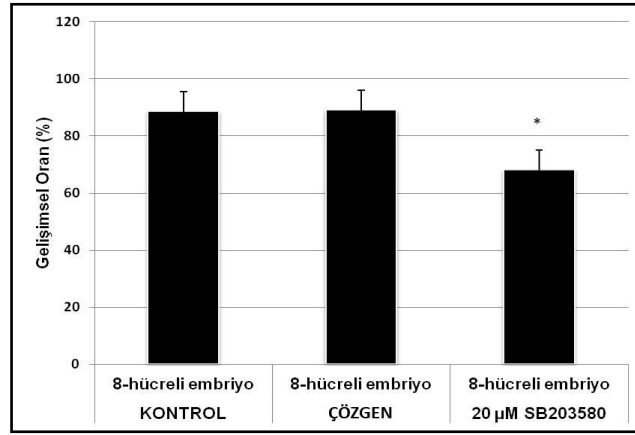
**Şekil 4.1.** *In vitro* kültür ortamlarındaki gelişme oranlarının total sonuçları. Kontrol ve çözgen grubu embriyoların gelişim oranları benzer ( $p>0,05$ ), inhibitör grubu embriyoların ise her iki gruba kıyasla düşük gelişim oranına sahip olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Ayrıca, kültür süresince gözlenen arrest ve dejenere embriyo oranının kontrol ve çözgen grupları arasında benzerlik gösterdiği ( $p>0,05$ ), inhibitör grubundaki oranın ise her iki gruba kıyasla oldukça yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).

#### 4.1.3. Evre-Spesifik Gelişim Oranları ve Embriyoların İvert Mikroskopunda Değerlendirilmesi

Kontrol, çözügen ve inhibitör uygulanmış *in vitro* kültür koşullarında embriyoların 8-hücreli, morula, blastosist evrelerine gelişimleri, invert mikroskop altında değerlendirilerek fotoğrafları çekildi ve gruplar arası kıyaslandı.

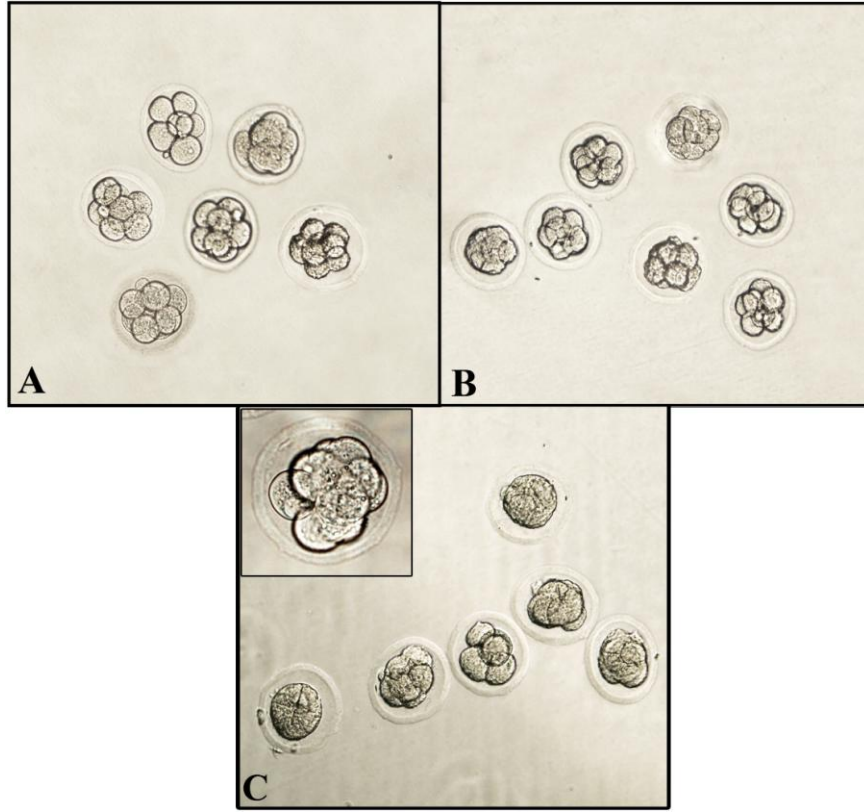
##### 4.1.3.1. Sekiz-Hücreli Embriyo Evresi

*In vitro* kültürün yaklaşık 22. saatinde embriyoların, 8-hücreli embriyo evresine ulaştıkları belirlendi. Her üç deney grubu için yüksek oranda 8-hücreli aşamaya gelişim gözlemlendi. Sekiz-hücreli embriyo evresine gelişim oranları kontrol ve çözügen grupları arasında istatistiksel açıdan bir değişim göstermezken, inhibitör grubunun her iki grup arasındaki değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *In vitro* kültür gruplarındaki embriyoların 8-hücreli embriyo aşamasına gelişme oranları. Kontrol ve çözügen gruplarında gelişim oranı benzer bulunurken, inhibitör grubundaki gelişim oranı her iki gruba kıyasla düşük gelişim oranına sahip olduğu görüldü (\* $p < 0,05$ ).

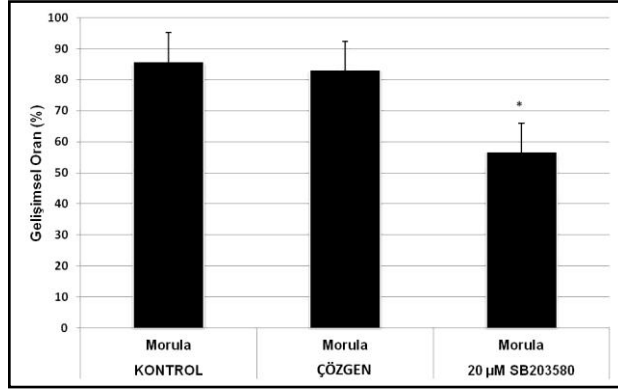
Kontrol ve çözügen gruplarına kıyasla, inhibitör uygulanmış grupta yüksek oranda arrest ve dejenere embriyoların varlığı dikkat çekici idi. Kontrol ve çözügen gruplarında yüksek çoğunlukta eşit blastomer büyüklüklere sahip embriyolar gözlenirken, inhibitör uygulanmış gruptaki 8-hücreli embriyoların çoğunluğunun eşit blastomer büyüklüklerine sahip olmadıkları görüldü (Şekil 4.3). Ayrıca, kontrol ve çözügen grubundaki embriyoların yarıklanmalarının yüksek oranda senkronize ilerlediği gözlenirken, inhibitör uygulanmış grupta yarıklanmaların senkronize ilerlememesine bağlı 4-hücre ve 6-hücreli aşamalarda embriyoların varlığı dikkat çekici idi.



**Şekil 4.3.** Kültürdeki 8-hücreli embriyoların invert mikroskobunda değerlendirilmesi. Kültürün 22. saati. A) Kontrol grubu, B) Çözgen grubu. Her iki grupta da blastomer büyüklükleri eşit 8-hücreli embriyolar görülmektedir. C) İnhibitör grubu. İç resimde, inhibitör ile muamele sonrası blastomer büyüklükleri eşit olmayan bir embriyo örneği görülmektedir. Büyütme 200X, iç resim 400X.

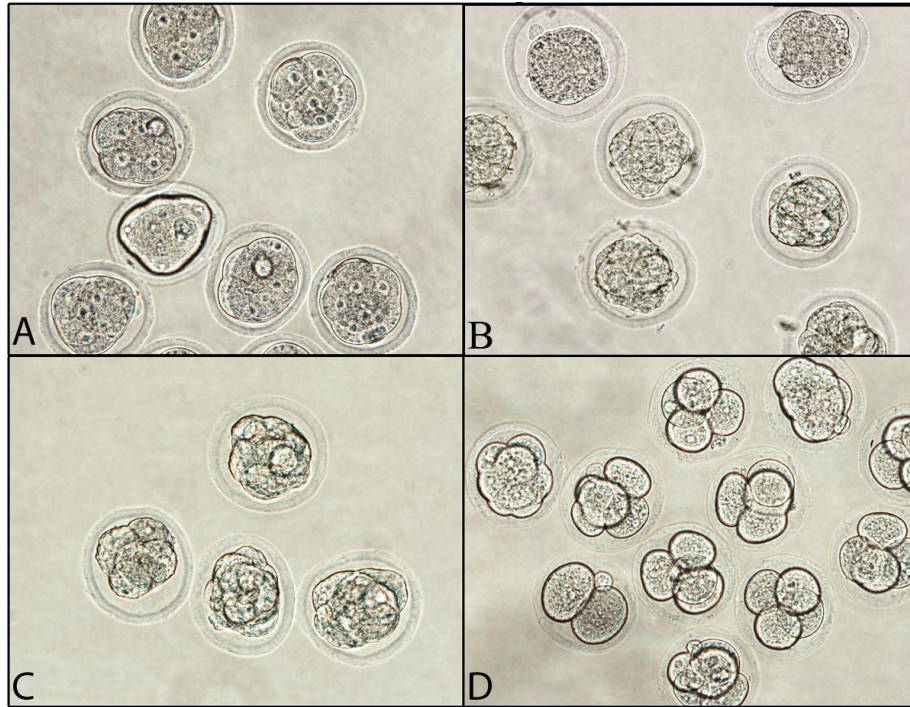
#### 4.1.3.2. Kompakt Morula Evresi

*İn vitro* kültürün yaklaşık 35. saatinde embriyoların, morula evresine ulaştıkları ve yüksek oranda kompaksiyonlarını tamamladıkları belirlendi. Kontrol ve çözgen grubuna ait embriyoların yüksek oranda morula evresine geliştikleri belirlenirken, inhibitör uygulanmış gruptaki morula evresine ulaşan embriyo oranında gerileme belirlendi. Morula gelişim oranları kontrol ve çözgen grupları arasında istatistiksel bir değişim göstermezken, inhibitör grubunun her iki grup arasındaki değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kontrol grubunda morula evresine gelişim oranı, inhibitör grubunda morula evresine ulaşan gelişim oranının yaklaşık 1.4 katı olduğu belirlendi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** *In vitro* kültür gruplarındaki embriyoların morula aşamasına gelişme oranları. Kontrol ve çözgen gruplarında gelişim oranı benzer bulunurken, inhibitör grubundaki gelişim oranı her iki gruba kıyasla düşük gelişim oranına sahip olduğu görüldü (\* $p < 0,05$ ). İnhibitör uygulanmış gruptaki embriyoların gelişim oranının kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1.4 kat gerileme gösterdiği dikkat çekicidir.

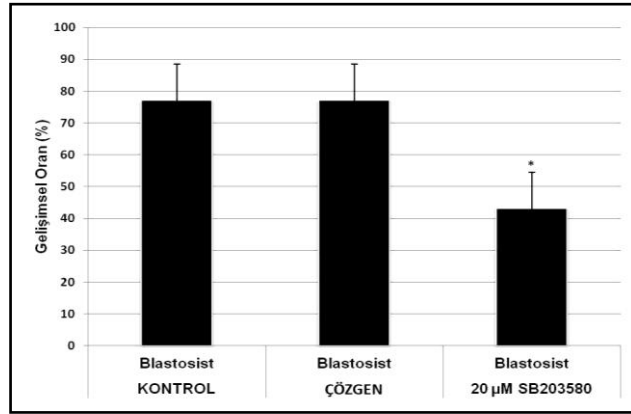
Kültürün 35. saatinde kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla, inhibitör uygulanmış grupta oldukça yüksek oranda arrest ve dejenere embriyoların varlığı dikkat çekici idi. Kültürün aynı saatinde yapılan kıyaslamada, kontrol ve çözgen gruplarındaki morula evresine ulaşan embriyoların büyük çoğunluğunun kompaksiyonlarını tamamladığı gözlenirken, inhibitör grubuna ait embriyoların çoğunluğunun kompaksiyonlarını tamamlayamadıkları gözlendi (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** Morula evresine ulaşmış embriyoların invert mikroskobunda değerlendirilmesi. Kültürün 35. saati. **A)** Kontrol grubu, **B)** Çözgen grubu. **C)** İnhibitör grubu. Embriyolardaki non-kompakt yapılar dikkat çekicidir. **D)** İnhibitör grubu. 20 µM SB203580 ile muamele edilmiş kültürün 35. saatinde gelişim geriliği gösteren ve arrest olmuş embriyolar görülmektedir. Büyütme 400X.

#### 4.1.3.3. Blastosist Evresi

*In vitro* kültürün yaklaşık 50. saatinde embriyoların kavitasyonlarını tamamladıkları ve blastosist evresine ulaştıkları belirlendi. Kültürün bu aşamasında gruplar arasında yapılan kıyaslamada, hem blastosist evresine gelişim oranı hem de blastosist morfolojisi yönünden inhibitör uygulanmış gruptaki embriyoların oldukça dikkat çekici şekilde etkilendikleri gözlemlendi. Blastosist gelişim oranları kontrol ve çözügen grupları arasında istatistiksel bir değişim göstermezken, inhibitör grubunun her iki grup arasındaki değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İnhibitör uygulanmış gruptaki embriyoların blastosist evresine gelişim oranının, kontrol ve çözügen gruplarına oranla yaklaşık 2 kat düşüş gösterdiği belirlendi (Şekil 4.6).

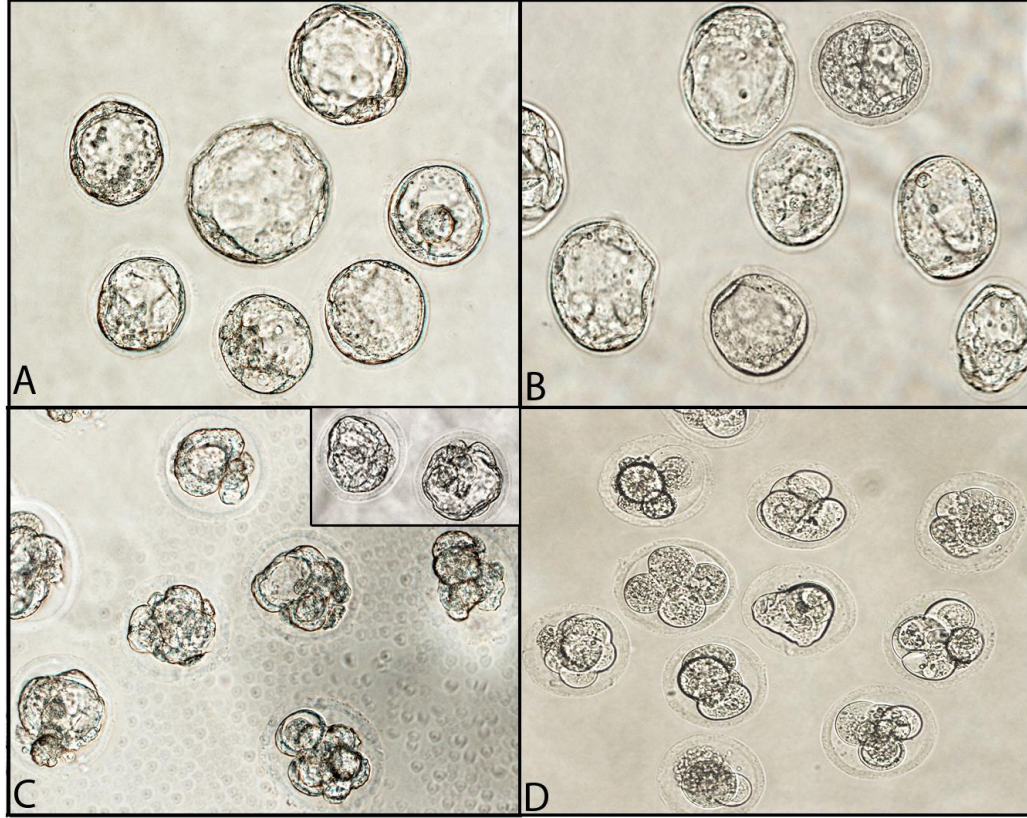


**Şekil 4.6.** *In vitro* kültür gruplarındaki embriyoların blastosist aşamasına gelişimsel oranları. Kontrol ve çözügen gruplarında gelişim oranı benzer bulunurken, inhibitör grubundaki gelişim oranı her iki gruba kıyasla düşük gelişim oranına sahip olduğu görüldü (\* $p < 0,05$ ). İnhibitör uygulanmış gruptaki embriyoların gelişim oranının kontrol ve çözügen grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat gerileme gösterdiği dikkat çekicidir.

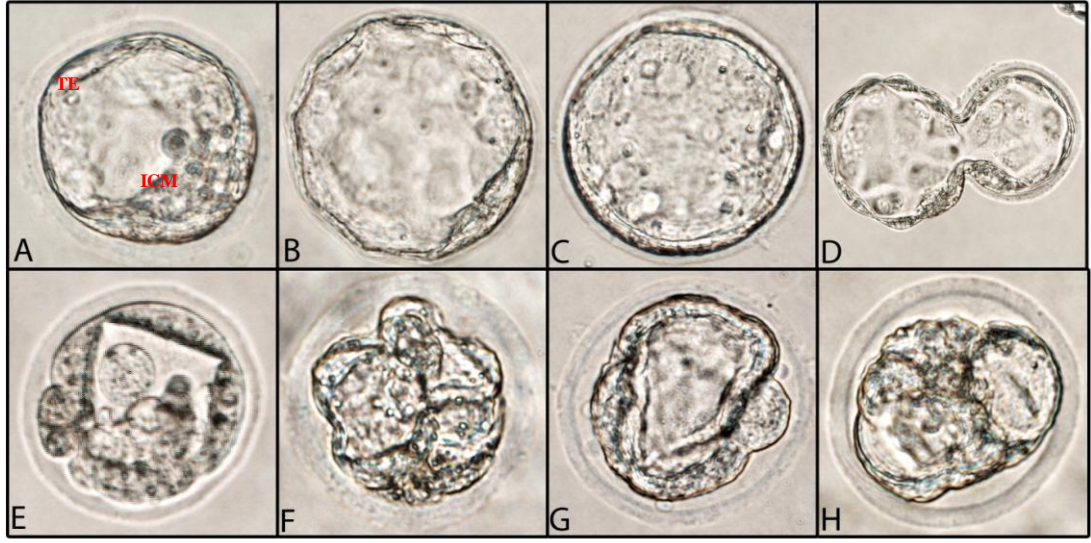
İnvert mikroskopu ile yapılan incelemelerde kontrol ve çözügen gruplarında *in vitro* kültüre edilmiş embriyoların oldukça sağlıklı bir morfolojiye sahip oldukları, kavitasyon, ekspansiyon ve hatching zamanlarının yüksek oranda senkronize ilerlediği gözlemlendi. Kontrol ve çözügen grubuna ait embriyolarda morfolojik olarak oldukça net trofoektoderm (TE) ve iç hücre kitlesi (ICM) oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.7. A, B). İnhibitör ile muamele edilmiş embriyoların ise oldukça şiddetli morfolojik hasarlara sahip oldukları gözlemlendi. İnhibitör uygulanmış grupta yüksek oranda blastosist aşamasına ulaşamamış ve/veya blastosist gelişimleri geri kalmış embriyolar dikkat çekmekte idi (Şekil 4.7. C, D). İnhibitör ile muamele sonrası blastosist aşamasında oldukları tanımlanan embriyoların ise, kavitasyonlarını tamamlayamamış oldukları veya hasarlı tamamladıkları gözlemlendi. Yine inhibitör ile muamele edilmiş embriyoların çok yüksek çoğunluğunun ekspansiyon olamadıkları, net bir trofoektoderm ve iç hücre kitlesi morfolojisine sahip olmadıkları gözlemlendi. İnhibitör grubu blastosistlerde oldukça kalın bir zona pelusidanın varlığı dikkat çekici idi. Bu durumun, inhibitör uygulanmış blastosistlerde ekspansiyonun olmamasına ve/veya kontrol gruplarına göre gelişimin geride kalmasına bağlı olabileceği saptandı. Ayrıca, inhibitör ile muamele edilmiş blastosistlerde neredeyse hiç hatching aşamasına ulaşmış embriyo görülmedi (Şekil 4.8. E-H).



Çalışmada yapılan gelişim oranlarının istatistiksel hesaplaması ve invert mikroskoptaki morfolojik değerlendirmeler sonucunda, p38 MAPK selektif inhibitörü olan SB203580 molekülünün *in vitro* kültür süresince en şiddetli etkisinin embriyonik gelişimin blastosist evresindeki embriyolar üzerine olduğu belirlendi.



**Şekil 4.7.** *In vitro* kültürde blastosist evresine ulaşmış embriyoların invert mikroskobunda değerlendirilmesi. Kültürün 50. saati. **A)** Kontrol grubu, **B)** Çözgen grubu. Her iki grupta da kavitasyon süreçleri tamamlanmış, ekspanse blastosistler görüldü. **C)** İnhibitör grubu. 20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiş kültürde gelişim geriliği gösteren embriyolar. İç resimde morfolojik defektli iki blastosist görülmektedir. **D)** İnhibitör grubu. 20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiş kültürün 50. saatinde blastosist aşamasına ulaşamamış, arrest ve dejenere embriyolar görülmektedir. Büyütme 400X.



**Şekil 4.8.** *In vitro* kültürde blastosist evresine ulaşmış embriyoların morfolojik görüntüleri. **A)** Kontrol grubuna ait erken-blastosist aşamasındaki embriyo. ICM ve TE ayırt edilebilmektedir. **B, C)** Çözgen grubuna ait geç-blastosist aşamasındaki embriyolar. Her iki blastosistin de ekspansiyon olduğu görülmektedir. **D)** Kontrol grubuna ait hatching-aşamasındaki embriyo. **E, F, G, H)** İnhibitör grubuna ait blastosist aşamasındaki embriyolar. 20  $\mu$ M SB203580 muamelesi sonrası blastosistlerdeki morfolojik hasarlar dikkat çekicidir. ICM ve TE ayrımı yapılamayan, hatalı kavite oluşumu gözlenen blastosistler, kontrol gruplarına kıyasla, oldukça kalın zona pellusida yapıları ile görülmektedir.

## 4.2. İmmüno Floresan Bulguları

İnhibitör molekülü ile *in vitro* kültür sonrasında embriyolarda p38 MAPK sinyal yolağı inhibisyonunun gerçekleştiğini belirlemek ve bu inhibisyonun preimplantasyon gelişimin glukoza bağımlı olduğu bilinen 8-hücreli, morula ve blastosist evrelerindeki GLUT1 ve GLUT4 protein ekspresyonları üzerindeki etkisini değerlendirmek için immüno floresan işaretleme yöntemi kullanıldı.

### 4.2.1. Preimplantasyon Embriyolarda p38 MAPK Sinyal Yolağı İnhibisyonunun Gösterilmesi

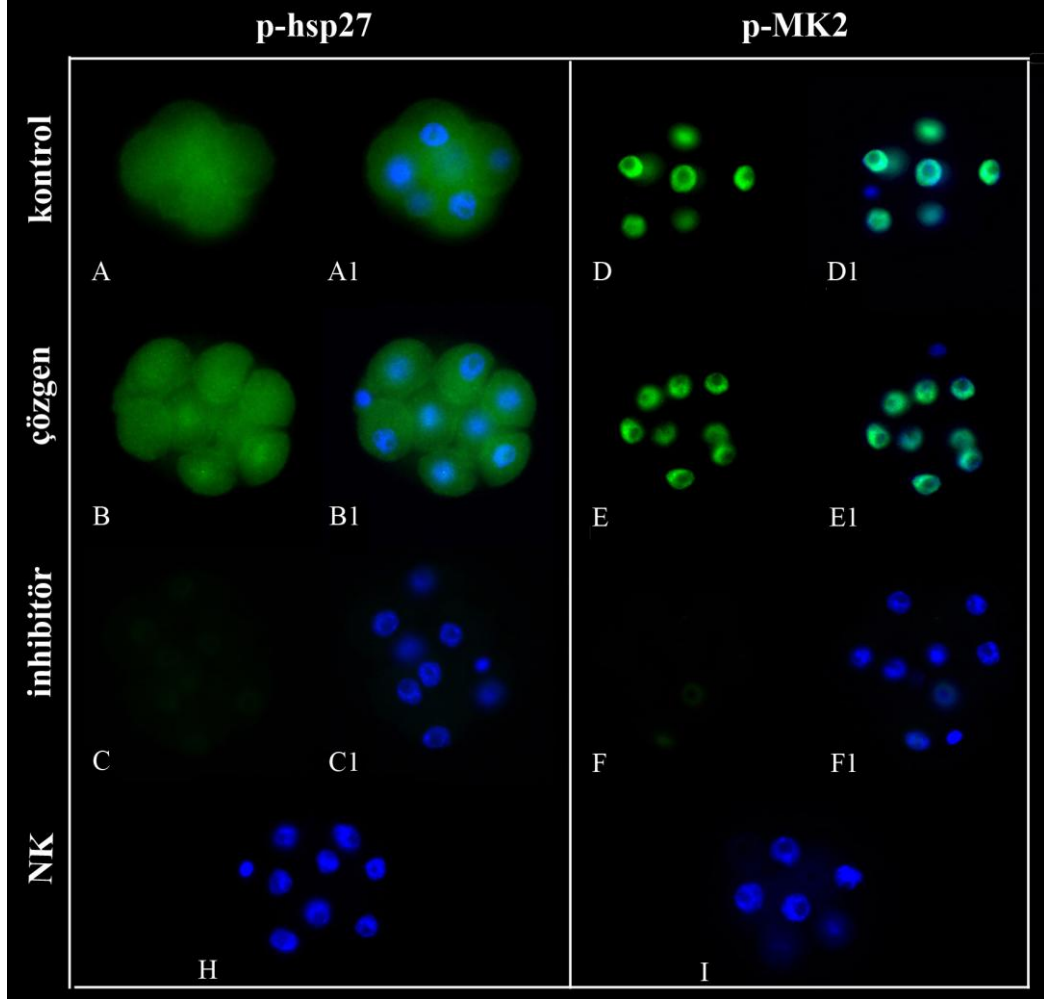
Çalışmada kullanılan inhibitör molekülünün (SB203580; p38 MAPK selektif inhibitörü) etkinliğinin doğrulanması için, p38 MAPK sinyal yolağının alt basamak hedefleri olan hsp27 ve MK2 proteinlerinin fosforilasyonları, *in vitro* kültürde 8-hücreli, morula ve blastosist evresine ulaşan embriyolarda değerlendirildi.

#### 4.2.1.1. Sekiz-Hücreli Embriyo Evresinde p38 MAPK İnhibisyonunun Gösterilmesi

Kontrol ve çözgen (%0,1 DMSO uygulanan) kültür gruplarındaki 8-hücreli embriyolarda p-hsp27 (Şekil 4.9. A, B) ve p-MK2 (Şekil 4.9. D, E) proteinlerinin beklenen ekspresyonları belirlendi. Buna karşılık, 20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiş 8-hücreli embriyolarda ise, her iki protein için floresan sinyali tespit edilemez düzeyde idi (Şekil 4.9. C, F). Bu durum inhibitör muamelesi sonrasında

p38 MAPK aktivesinin yokluđuna bađlı olarak, protein fosforilasyonlarının gerçekleřmemesinden kaynaklandıđı dűřunűlmektedir.

İmműnofloresan iřaretleme yűntemi sonucunda, 20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiř 8-hűcreli embriyolarda p38 MAPK sinyal yolađı aktivitesinin baskılandıđı tespit edildi.

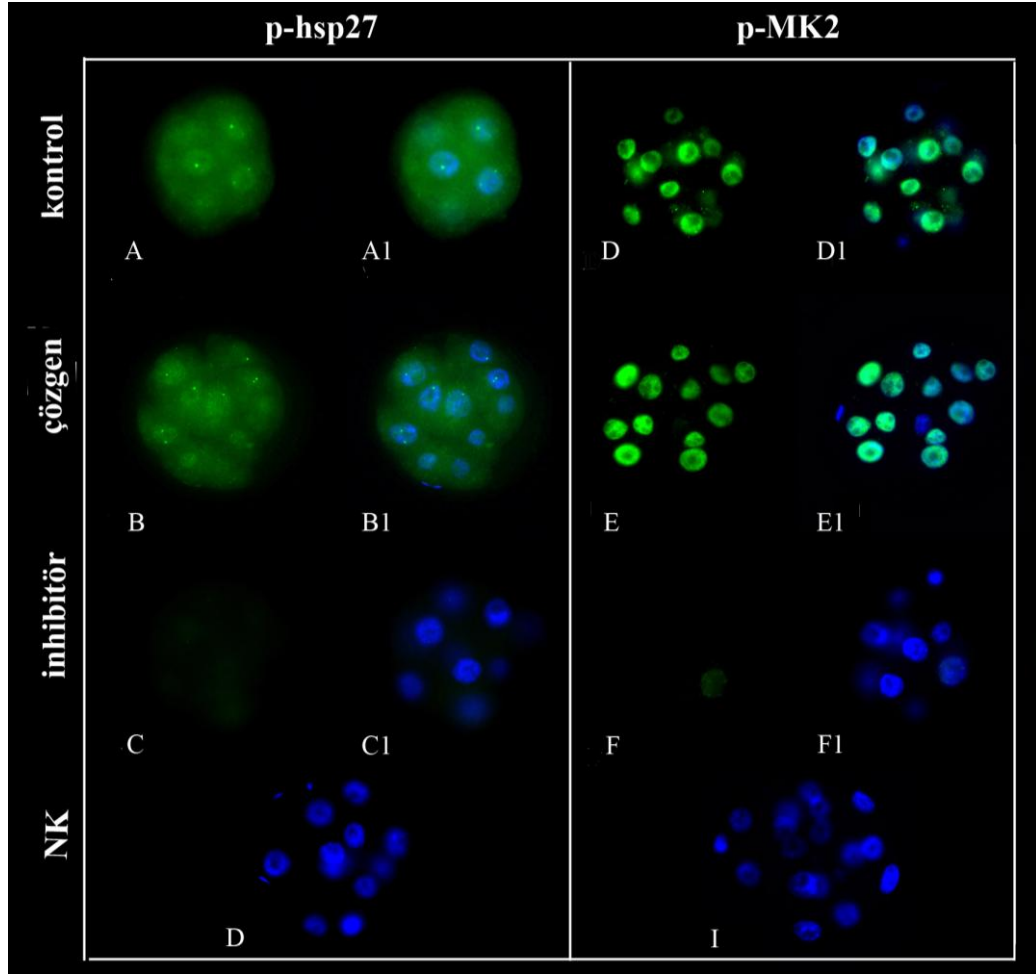


**řekil 4.9.** Sekiz-hűcreli embriyolarda p38 MAPK inhibisyonunun MK2 ve hsp27 protein fosforilasyonları űzerine etkisi. Bűtűn fotoğraflarda yeřil floresan primer antikora ait sinyali, mavi floresan nűkleusa ait sinyali (DAPI) gűstermektedir. **A)** Kontrol, **B)** özgen, **C)** İnhibitűr grubu, p-hsp27 ekspresyonları. **A1)** Kontrol, **B1)** özgen, **C1)** İnhibitűr grubu, p-hsp27 ve DAPI birleřtirilmiř gűrűntűleri. **D)** Kontrol, **E)** özgen, **F)** İnhibitűr grubu, p-MK2 ekspresyonları. **D1)** Kontrol, **E1)** özgen, **F1)** İnhibitűr grubu, p-MK2 ve DAPI birleřtirilmiř gűrűntűleri. **H, I)** Negatif kontroller. Tűm fotoğrafların bűyűtmesi 400X'dir.

#### 4.2.1.2. Morula Evresi Embriyolarda p38 MAPK İnhibisyonunun Gűsterilmesi

20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiř inhibitűr grubundaki morulalarda, p-hsp27 ve p-MK2 proteinleri için floresan sinyali tespit edilemez dűzeyde idi (řekil 4.10. C, F). Kontrol ve çözgen grubuna ait embriyolarda ise p-hsp27 ve p-MK2 proteinlerinin beklenen ekspresyonları belirlendi (řekil 4.10. A, B, D, E).

İmmünofloresan işaretleme yöntemi sonucunda, 20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiş morula aşamasındaki embriyolarda p38 MAPK sinyal yolağı aktivitesinin baskılandığı tespit edildi.

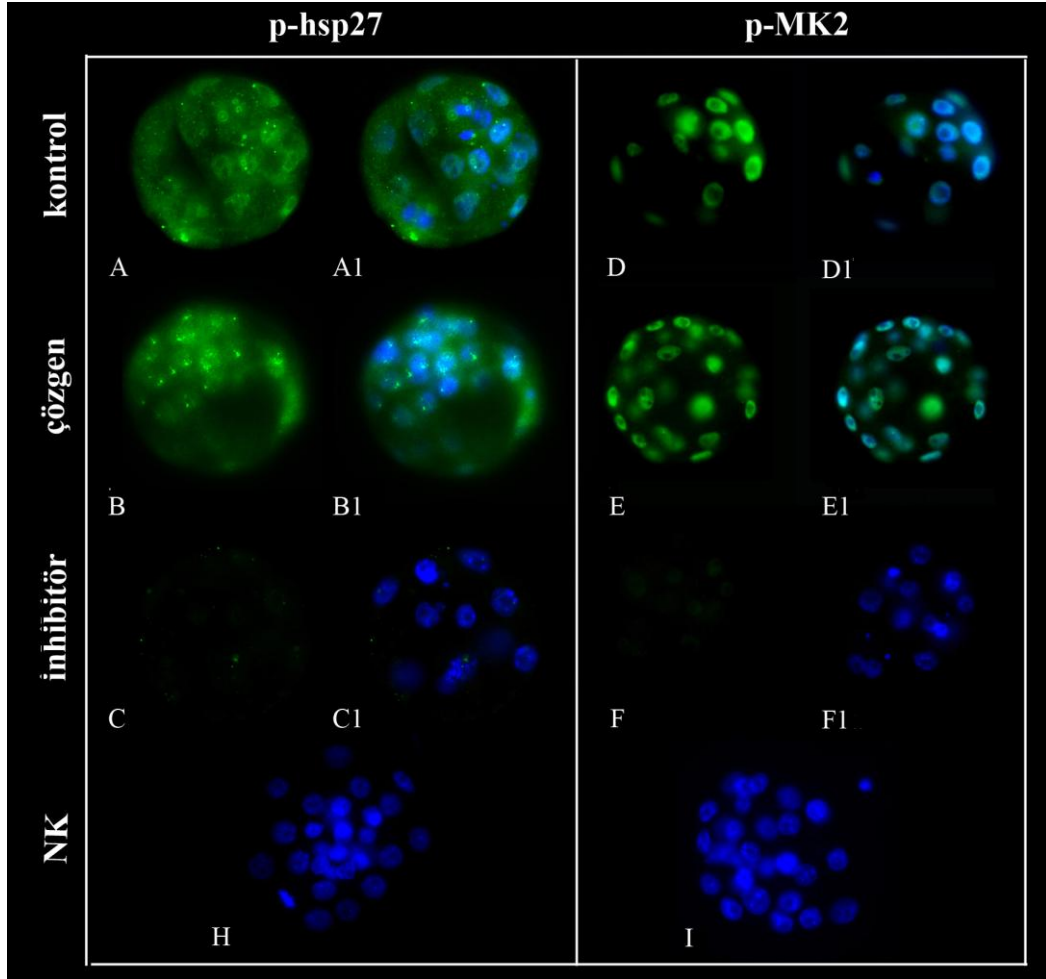


**Şekil 4.10.** Morula aşamasındaki embriyolarda p38 MAPK inhibisyonunun MK2 ve hsp27 protein fosforilasyonları üzerine etkisi. Bütün fotoğraflarda yeşil floresan primer antikora ait sinyali, mavi floresan nükleusa ait sinyali (DAPI) göstermektedir. **A)** Kontrol, **B)** Çözgen, **C)** İnhibitör grubu, p-hsp27 ekspresyonları. **A1)** Kontrol, **B1)** Çözgen, **C1)** İnhibitör grubu, p-hsp27 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **D)** Kontrol, **E)** Çözgen, **F)** İnhibitör grubu, p-MK2 ekspresyonları. **D1)** Kontrol, **E1)** Çözgen, **F1)** İnhibitör grubu, p-MK2 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **H, I)** Negatif kontroller. Tüm fotoğrafların büyütmesi 400X'dir.

#### 4.2.1.3. Blastosist Evresi Embriyolarda p38 MAPK İnhibisyonunun Gösterilmesi

Kontrol ve çözgen kültür gruplarındaki blastosistlerde p-hsp27 (Şekil 4.11. A, B) ve p-MK2 (Şekil 4.11. D, E) proteinlerinin beklenen ekspresyonları belirlendi. Buna karşılık, 20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiş inhibitör grubundaki blastosistlerde ise, her iki protein için floresan sinyali tespit edilemez düzeyde idi (Şekil 4.11. C, F).

İmmünofloresan işaretleme yöntemi sonucunda, 20  $\mu$ M SB203580 ile muamele edilmiş blastosistlerde p38 MAPK sinyal yolağı aktivitesinin baskılandığı tespit edildi.



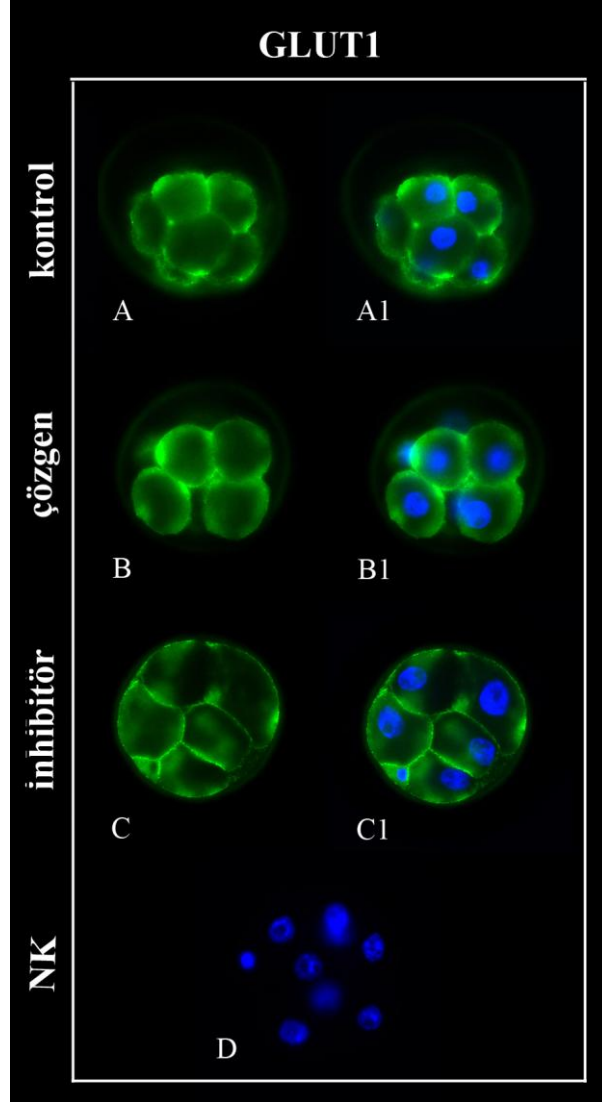
**Şekil 4.11.** Blastosist aşamasındaki embriyolarda p38 MAPK inhibisyonunun MK2 ve hsp27 protein fosforilasyonları üzerine etkisi. Bütün fotoğraflarda yeşil floresan primer antikora ait sinyali, mavi floresan nükleusa ait sinyali (DAPI) göstermektedir. **A)** Kontrol, **B)** Çözgen, **C)** İnhibitör grubu, p-hsp27 ekspresyonları. **A1)** Kontrol, **B1)** Çözgen, **C1)** İnhibitör grubu, p-hsp27 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **D)** Kontrol, **E)** Çözgen, **F)** İnhibitör grubu, p-MK2 ekspresyonları. **D1)** Kontrol, **E1)** Çözgen, **F1)** İnhibitör grubu, p-MK2 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **H, I)** Negatif kontroller. A, A1, B, B1, C, C1 H, I fotoğraflarının büyütmesi 600X; D, D1, E, E1, F, F1 fotoğraflarının büyütmesi 400X'dir.

#### 4.2.2. p38 MAPK Aktivitesi Baskılanan Preimplantasyon Embriyolarda Glukoz Taşıyıcı Protein Ekspresyonları

Bu çalışmada üç farklı kültür grubundaki (kontrol, çözgen, inhibitör) embriyolarda GLUT1 proteininin varlığı 8-hücreli, morula ve blastosist evrelerinde, GLUT4 proteininin varlığı blastosist evresinde immünofloresan işaretleme yöntemi ile belirlendi ve ekspresyon düzeyleri için gruplar arası karşılaştırma yapıldı.

#### 4.2.2.1. Sekiz-Hücreli Embriyo Evresinde GLUT1 İmmüno Floresan Bulguları

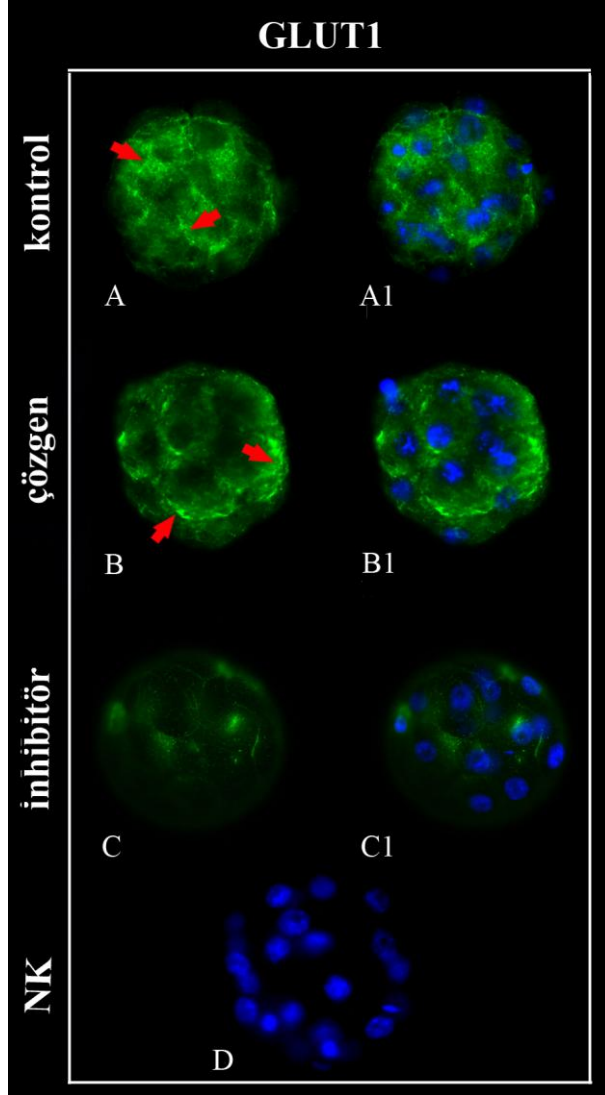
*In vitro* kültürün yaklaşık 22. saatinde kontrol, çözgen ve inhibitör gruplarında bulunan 8-hücreli embriyolarda, GLUT1 proteininin, beklenildiği gibi, esas olarak blastomer membranında lokalize olduğu belirlendi. Bununla birlikte, zayıf sitoplazmik ekspresyonların varlığı da tespit edildi (Şekil 4.12. A, B). p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış 8-hücreli embriyolarda, kontrol gruplarına kıyasla blastomer membranına lokalize GLUT1 sinyalinde bir fark görülmedi (Şekil 4.12. C).



**Şekil 4.12.** Sekiz-hücreli embriyolarda GLUT1 protein ekspresyonları. Bütün fotoğraflarda yeşil floresan primer antikora ait sinyali, mavi floresan nükleusa ait sinyali (DAPI) göstermektedir. **A)** Kontrol, **B)** Çözgen, **C)** İnhibitör grubu, GLUT1 ekspresyonları. **A1)** Kontrol, **B1)** Çözgen, **C1)** İnhibitör grubu, GLUT1 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **D)** Negatif kontrol. Tüm fotoğrafların büyütmesi 400X'dir.

#### 4.2.2.2. Morula Evresi Embriyolarda GLUT1 İmmü Floresan Bulguları

*In vitro* kültürün yaklaşık 35. saatinde kontrol ve çözgen gruplarında bulunan morula evresindeki embriyolarda, GLUT1 proteininin yoğun membranöz, zayıf sitoplazmik yerleşime sahip olduğu gözlenirken (Şekil 4.13. A, B); p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış morula evresi embriyolarda, kontrol gruplarına kıyasla GLUT1 ekspresyon şiddetinde gerileme olduğu belirlendi (Şekil 4.13. C).



**Şekil 4.13.** Morula evresi embriyolarda GLUT1 protein ekspresyonları. Bütün fotoğraflarda yeşil floresan primer antikora ait sinyali, mavi floresan nükleusa ait sinyali (DAPI) göstermektedir. **A)** Kontrol, **B)** Çözgen, **C)** İnhibitör grubu, GLUT1 ekspresyonları **A1)** Kontrol, **B1)** Çözgen, **C1)** İnhibitör grubu, GLUT1 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **D)** Negatif kontrol. Tüm fotoğrafların büyütmesi 400X'dir.

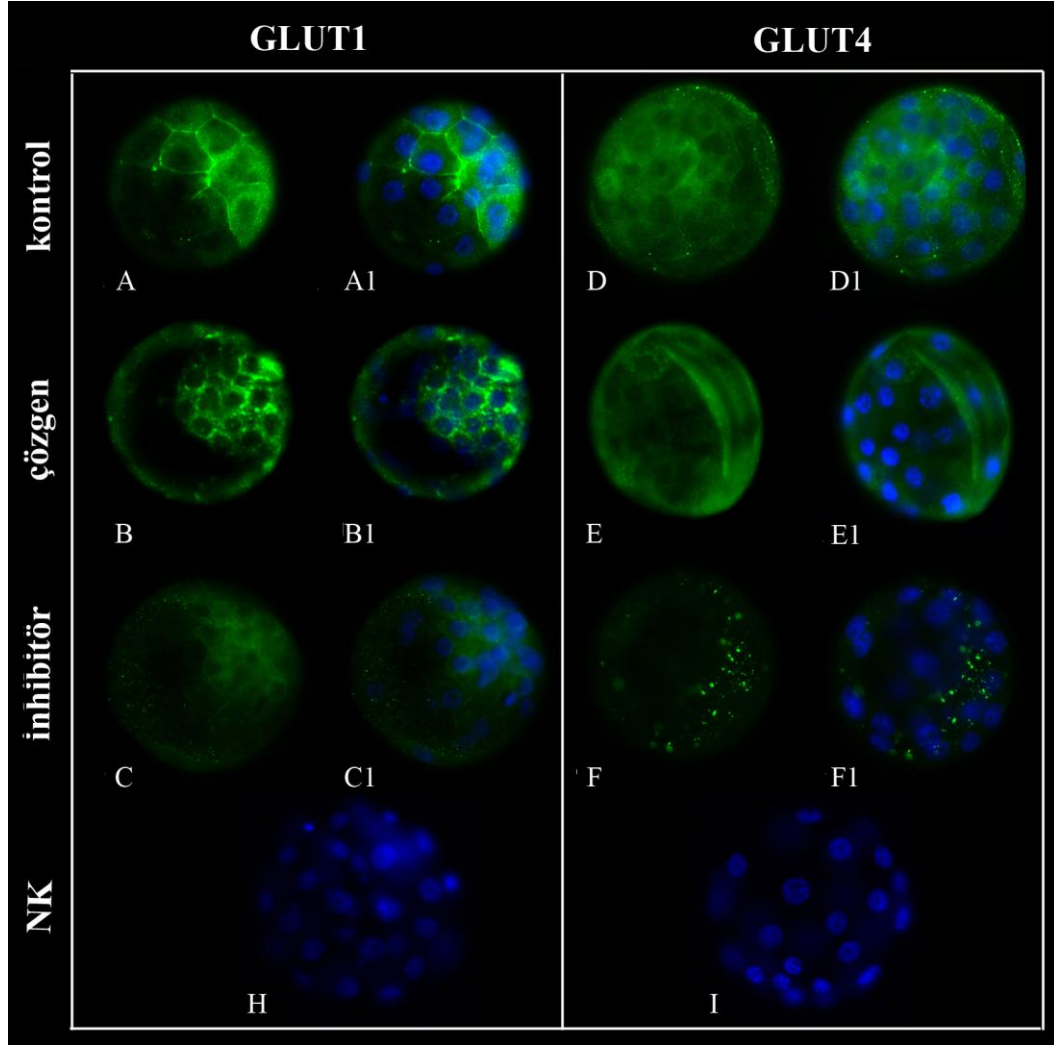
#### **4.2.2.3. Blastosist Evresi Embriyolarda GLUT1 ve GLUT4 İmmünfloresan Bulguları**

*İn vitro* kültürün yaklaşık 50. saatinde blastosist evresine ulaşmış olan embriyolarda GLUT1 ve GLUT4 ekspresyonları belirlendi ve gruplar arası kıyaslandı. Kontrol ve çözgen grubuna ait blastosistlerde esas olarak membrana lokalize GLUT1 ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.14. A, B). Ayrıca her iki grupta da zayıf sitoplazmik sinyallerin varlığı belirlendi. p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış blastosistlerin ise membrana lokalize GLUT1 ekspresyonundan yoksun olduğu belirlendi. Bununla birlikte, p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış embriyolarda oldukça zayıf sitoplazmik GLUT1 ekspresyonunun varlığı da gözlemlendi (Şekil 4.14. C).

GLUT4 ekspresyonunun ise kontrol ve çözgen grubuna ait blastosistlerde sitoplazmik olduğu belirlendi (Şekil 4.14. D, E). 20 µM SB203580 muamele edilmiş blastosistlerde ise, sitoplazmik GLUT4 ekspresyonunda belirgin gerileme olduğu görüldü. İlginç bir şekilde, inhibitörle muamele edilmiş blastosistlerdeki gerilemiş GLUT4 ekspresyonu, sitoplazmada kümelenmiş bir görünümde sinyal vermekte idi.

Sonuç olarak, kontrol gruplarına kıyasla, hücre içi p38 MAPK sinyal aktivitesinin yoksun olan blastosistlerde GLUT1 ve GLUT4 protein ekspresyonlarının açıkça gerilemiş olduğu tespit edildi (Şekil 4.14).





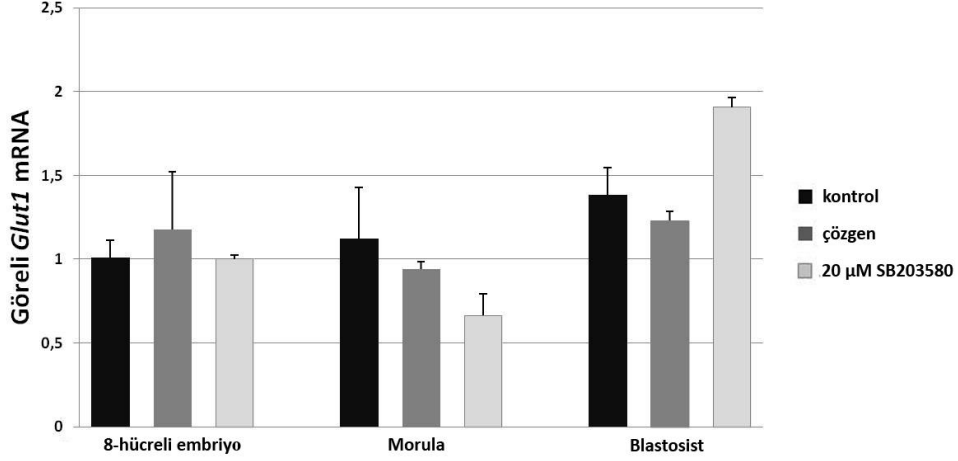
**Şekil 4.14.** Blastosist evresi embriyolarda GLUT1 ve GLUT4 protein ekspresyonları. Bütün fotoğraflarda yeşil floresan primer antikora ait sinyali, mavi floresan nükleusa ait sinyali (DAPI) göstermektedir. **A)** Kontrol, **B)** Çözgen, **C)** İnhibitör grubu, GLUT1 ekspresyonları. **A1)** Kontrol, **B1)** Çözgen, **C1)** İnhibitör grubu, GLUT1 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **D)** Kontrol, **E)** Çözgen, **F)** İnhibitör grubu, GLUT4 ekspresyonları. **D1)** Kontrol, **E1)** Çözgen, **F1)** İnhibitör grubu, GLUT4 ve DAPI birleştirilmiş görüntüleri. **H, I)** Negatif kontroller. Tüm fotoğrafların büyütmesi 400X'dir.

### 4.3. Kantitatif Real-Time PCR Bulguları

Çalışmada bu teknik, *in vitro* kültürde SB203580 uygulaması ile embriyolarda p38 MAPK sinyal aktivitesinin baskılanmasının *Glut1* ve *Glut4* mRNA ekspresyonları üzerine etkisini araştırmak için kullanıldı. Kontrol, çözgen ve inhibitör gruplarında *Glut1* mRNA ekspresyonu 8-hücreli, morula ve blastosistlerde; *Glut4* mRNA ekspresyonu blastosistlerde belirlendi ve gruplar arası kıyaslandı.

#### 4.3.1. İnhibitör Uygulamasının Embriyolardaki *Glut1* mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

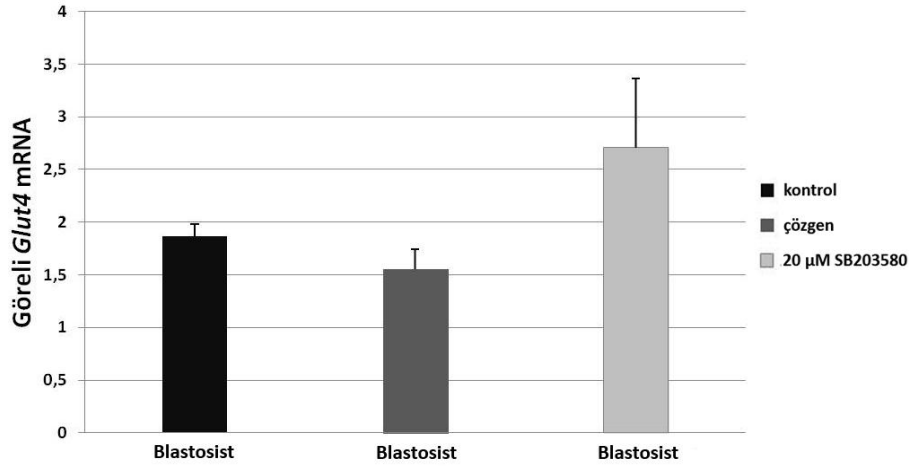
Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda, üç deney grubundaki embriyolarda evre-spesifik (8-hücreli, morula, blastosist) *Glut1* mRNA ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. İn-vitro kültür gruplarındaki embriyonik gelişim süresince *Glut1* mRNA ekspresyonu ( $p>0,05$ ).

#### 4.3.2. İnhibitör Uygulamasının Blastosistlerdeki *Glut4* mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda, üç deney grubundaki blastosistlerde *Glut4* mRNA ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, inhibitör uygulaması sonucunda p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış blastosistlerdeki *Glut4* mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol gruplarına kıyasla artmış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.16. İn-vitro kültür gruplarındaki blastosistlerde *Glut4* mRNA ekspresyonu ( $p>0,05$ ).

## TARTIŞMA

Preimplantasyon gelişim, implantasyonun başarıyla tamamlanması ve sağlıklı bir gebelik sürecinin sürdürülmesi için son derece önemlidir. Yapılan çalışmalarda, insan embriyolarının yalnızca %40'ının başarılı bir şekilde uterusu implante olduğu belirlenmiştir (131). Preimplantasyon dönem embriyolar, uterus içerisine implante oluncaya kadar geçirdikleri süreçte, ovidukt ve uterus tarafından desteklenen çevrelerinde, metabolik ihtiyaçlarında, sahip oldukları hücre sayısında ve farklılaşma derecelerinde önemli değişimler geçirirler. Glukoz preimplantasyonun erken evrelerinde gelişimi desteklemezken, geç evrelerinde (8-hücreli embriyo ve sonrası) glukoz transportu ve kullanımı, embriyonun gelişimi ve hayatta kalması için hayati bir önem taşımaktadır (7-11). Preimplantasyon gelişim sürecindeki embriyolarda bulunan çeşitli GLUT proteinleri, embriyoların geçirdiği önemli değişimlere adapte olmalarına imkan verir ve ihtiyaç duydukları glukozun mikroçevrelerinden hücre içerisine alınımını sağlar (13). Preimplantasyon embriyolardaki GLUT protein ekspresyonlarındaki azalmanın, hücre içerisine glukoz alınımında gerilemelere neden olduğu, geç aşamalarda embriyoların canlılığını tehlikeye attığı belirlenmiştir (15).

Günümüze kadar yapılan pek çok çalışma embriyoların gelişim basamaklarını ele almasına rağmen (42, 43, 48, 51), bu basamaklarda görev alan kilit protein ve gen ekspresyonlarının kontrolünü sağlayan hücre içi araçlar hakkında çok az şey bilinmektedir. Çalışmamızda, p38 MAPK sinyal aktivitesinin, GLUT protein ailesi üyelerinden GLUT1 ve GLUT4'ün potansiyel düzenleyicisi olabileceği üzerine odaklandık. *In vitro* gelişim ortamında, p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış geç dönem preimplantasyon embriyolardaki (8-hücreli, morula, blastosist), GLUT1 ve GLUT4 glukoz taşıyıcılarının protein ve mRNA düzeylerinde değişim olup olmadığını araştırdık.

Çalışmamızda öncelikle in-vitro gelişim ortamında kültüre edilen embriyoların, kültür süresince gelişimsel potansiyelleri değerlendirildi. Embriyolardaki p38 MAPK sinyal aktivitesini tanımlamak üzere yapılan daha önceki çalışmalarda, bu yolağın aktivitesinin baskılanması ile özellikle preimplantasyonun 8-16 hücreli aşamasından sonra embriyo gelişiminde yavaşlamalar ve gelişimsel arrest görüldüğü bildirilmiştir (23-26). Çalışmamızda, p38 MAPK inhibisyonunun geç dönem preimplantasyon embriyolardaki etkisi değerlendirilmiştir. *In vitro* kültür süresince gruplardaki embriyonik gelişim potansiyelleri incelendiğinde, inhibitör grubunda giderek azalan gelişim oranı dikkat çekicidir. Gelişim potansiyeli tablosunda, inhibitör grubundaki morula aşamasına ulaşmış embriyo oranının kontrol grubuna kıyasla 1.4 kat, blastosist aşamasına ulaşmış embriyo oranının ise 2 kat gerilemiş olduğu görülmektedir. Bu bulgular, p38 MAPK sinyal aktivitesinin durdurulmasının, preimplantasyonun geç aşamalarında gelişim geriliklerine neden olduğu bilgisi ile uyumludur.

Embriyoların gelişim potansiyellerinin değerlendirildiği tabloda dikkat çeken bir başka özellik, gruplarda belirlenen arrest ve dejerenere olmuş embriyo oranlarıdır. İnhibitör grubunda görülen arrest oranında kontrol grubuna göre 2.5

katlık; dejenere oranında kontrol grubuna göre 5.5 katlık artış, 20 µM SB203580 muamelesinin embriyolar üzerindeki dramatik etkisini net bir şekilde göstermektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, 20 µM dozundaki SB203580 uygulaması sonrası p38 aktivitesinin bloke edilmesinin, embriyo canlılığını tehlikeye attığı söylenebilir.

*In vitro* kültürün aynı saatinde gruplar arasında yaptığımız morfolojik değerlendirmelerde, inhibitörün embriyolar üzerindeki etkisi daha net anlaşılmaktadır. Çalışmamızda, kültürün yaklaşık 22. saatinde kontrol ve çözgen gruplarındaki embriyoların yarıklanmalarının çok yüksek oranda senkronize ilerlediği ve 8-hücreli aşamaya ulaştıkları gözlemlendi. Kültürün aynı saatinde 20 µM SB203580 uygulanmış grupta ise, yarıklanmaların senkronize ilerlememesine bağlı 4- ve 6-hücreli aşamalarda embriyoların varlığı, gelişimdeki gerilemeyi göstermektedir. Ayrıca, kontrol ve çözgen gruplarındaki eşit blastomer büyüklüklerine sahip 8-hücreli embriyoların aksine, inhibitör uygulanmış 8-hücreli embriyoların çoğunluğunun eşit blastomer büyüklüklerine sahip olmadığı izlendi. Ayrıca, 20 µM SB203580 muamelesinin kompaksiyon başlayana kadar embriyolardaki morfolojik etkisi nispeten daha az ayırt edilebilir düzeydeyken, kompaksiyonun başlaması ile birlikte belirgin morfolojik farklılıklar gözlenmeye başlandı.

Aktin mikrofilamenti, çok sayıdaki hücresel süreçte tamamlayıcı rolü bulunmaktadır. Bu rollerden biri, embriyonun kompaksiyon sürecinde, embriyonik hücrelerin birbirlerine yapışmaları için bağlantı komplekslerinin birbirine kenetlenmesini gerçekleştirmesidir (132). Hücre-hücre adezyon (yapışma) bağlantıları, hücre içi aktin mikrofilament ağı ile ilişkili olan kaderin'e bağımlı bir yapı gösterir (133, 134). Gelişen embriyoda komşu hücreler arasındaki yapışma bağlantı moleküllerinin oluşumu ve bu moleküllerin birbirine kenetlenmesi sonucunda, embriyonik hücrelerin birbirine gittikçe daha çok yaklaşması ve bağlanması gerçekleşir. Sonuçta, embriyonik hücrelerin bireysel sınırlarının kaybolması ile kompaksiyon tamamlanır (135). Paliga ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada, embriyolardaki p38 MAPK sinyal aktivitesinin 6 saatlik 20 µM SB220025 muamesi ile baskılanmasının, 8-16 hücreli aşamada embriyolardaki F-aktin'in depolimerizasyonuna neden olduğunu ve bu depolimerizasyonun sonucu olarak da  $\alpha$ -catenin protein lokalizasyonunun değiştiğini göstermişlerdir (25). Bu durum, CSAID-uygulanmış embriyolarda, stabil olmayan yapışma bağlantılarının oluşmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda bir diğer p38 farmakolojik inhibitörü olan, SB203580 molekülü kullanılmış ve bu CSAID molekülünün de, embriyolar üzerindeki morfolojik etkisinin SB220025 ile benzer olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, *in vitro* kültürün yaklaşık 35. saatinde kontrol ve çözgen gruplarına ait morulların yüksek çoğunluğunun kompaksiyonlarını tamamlamış oldukları gözlenmiştir. Fakat, *in vitro* kültürün aynı saatinde, 20 µM SB203580 uygulanmış morulların bir çoğunda hücresel sınırları hala net olarak ayırt edilebilen blastomerler saptanmıştır. Morfolojik sonuçlarımız Paliga ve arkadaşlarının, p38 aktivitesinin embriyolardaki kompaksiyon süreci ile ilişkili protein ekspresyonlarını düzenlediği bulgusu ile uyumludur. Ayrıca, iki farklı CSAID molekülü uygulanmış embriyoların da benzer morfolojik görünümde olması, çalışmamızda kullandığımız SB203580 molekülünün Paliga ve arkadaşlarının kullandığı SB220025 molekülü ile kompaksiyon süreçlerinde benzer etkiye sahip olduğunun işaret etmektedir. Bu sonuçlar, CSAID varlığında embriyoların büyük çoğunluğunun kompaksiyonlarını

tamamlayamadıklarının muhtemel nedeninin p38 sinyal aktivitesinin inhibe edilmesinin olduğunu düşündürmektedir. Embriyo hücreleri arasındaki yapışmada, bağlantı kompleks bileşenlerinin uygun kenetlenmesinin kompaksiyon için önemli olduğu görülmektedir.

p38 MAPK sinyal yolağının, nükleustaki bazı transkripsiyon faktörlerini fosforille ettiği ve böylece aktive ettiği bilinmektedir (115-119). Bu transkripsiyon faktörlerinden preimplantasyon fare embriyo gelişimi ile ilişkili olanlar, Maekawa M. ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada rapor edilmiştir (26). Çalışmada araştırmacılar, hem kompaksiyon hem de kavitasyon oluşumu için de novo mRNA sentezinin gerekli olduğunu belirtmişlerdir (26). Araştırmacılar yaptıkları mikroarray analizleri sonucunda, 20 µM SB203580 ile muamele edilmiş fare blastosistlerinde incelenen 156 transkriptin yaklaşık %4'ünün ekspresyonunun değiştiğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada araştırmacılar, kavitasyon oluşumu ile ilgili oldukları bilinen Dkk1, Sox7, Cdx1, Aqp8 gibi çeşitli genlerin blastosistteki ekspresyonlarının, p38 MAPK inaktivasyonunda değiştiğini belirtmişlerdir (26).

Çalışmamızda *in vitro* kültürdeki blastosist gelişimi değerlendirildiğinde, inhibitör molekülünün en şiddetli etkisinin blastosist gelişimi üzerine olduğu ve inhibitör uygulanmış blastosistlerin morfolojik görünümünün kontrol gruplarından belirgin bir şekilde farklılıklar gösterdikleri gözlenmiştir. 20 µM SB203580 uygulanmış blastosistlerdeki en dikkat çekici morfolojik bozukluk ise, hatalı kavitasyon oluşumuydu. CSAID ile muamele edilmiş blastosistlerin bazılarında kavitasyonun gerçekleşmediği, bazılarının kontrol gruplarına göre daha küçük kaviteye sahip oldukları, bazılarının ise iki farklı blastosöl boşluğuna sahip görünümde oldukları gözlemlendi. p38 aktivitesi baskılanmış blastosistlerde gözlenen bu hatalı kavitasyonun, Makaewa ve arkadaşlarının tanımladıkları kavitasyon ile ilişkili genlerin değişmiş ekspresyonu nedeniyle gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Hem bizim çalışmamızın, hem de Makaewa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın bulguları, p38 aktivitesinin kavitasyon oluşumu ile ilgili moleküllerin de muhtemel düzenleyicisi olduğuna işaret etmektedir.

Normal blastosist gelişiminde, ekspansiyon zamanında blastosöl boşluğuna biriken sıvıda artış meydana gelerek, blastosistin hacimsel oranlarında artış ve buna bağlı olarak zona pelusida kalınlığında azalma olmaktadır. Çalışmamızda, 20 µM SB203580 uygulanmış embriyolarda izlenen kalın zona pellusida yapıları, blastosistlerin ekspansiyon olamadıklarının bir göstergesidir. Ayrıca, *in vitro* kültürün aynı saatinde yapılan gruplar arası kıyaslamada, inhibitör ile muamele edilmiş blastosistlerde neredeyse hiç hatching aşamasına ulaşmış embriyo görülmemesi de embriyo gelişimindeki yavaşlamanın düzeyine işaret etmektedir. Kontrol ve çözgen gruplarındaki embriyoların ise beklenildiği gibi, blastosist oluşumu zamanında sağlıklı bir morfolojiye sahip oldukları, kavitasyon, ekspansiyon ve hatching zamanlarının yüksek oranda senkronize ilerlediği incelenmiştir.

Preimplantasyon embriyoların kompaksiyon zamanında polarize olmaları ile beraber hücresel farklılıkları da başlar. Cdx2 ve Oct3/4 transkripsiyon faktörlerinin, trofoektoderm (TE) ve iç hücre kitlesi (ICM) hücre kimliklerinin oluşturulmasından sorumlu transkripsiyonel programları düzenlediği tanımlanmıştır. Cdx2 ekspresyonu 8-hücreli blastomerlerde başlar ve TE tabakasını oluşturacak olan

hücrelerde ekspresyonu giderek artar (136). İlginç bir şekilde, Oct3/4 ve Cdx2 blastosist aşamasına kadar, embriyonik hücrelerde beraber eksprese olurken; blastosist gelişimi ile birlikte TE hücrelerindeki Oct3/4 ekspresyonu azalır (137, 138). TE hücrelerindeki Oct3/4 ekspresyonunun azaltılması ve/veya arttırılan Cdx2 ekspresyonu, hücrel farklanmayı TE tabakası olarak yönlendirir. Gelişen blastosistte Oct3/4 baskın hücreler ise ICM tabakasını oluşturmaktadır. Çalışmamızda, kontrol ve çözgen gruplarındaki normal blastosist gelişimine devam ettiği gözlenen embriyolarda morfolojik olarak oldukça net TE ve ICM oluşumu görülmüştür. İnhibitör grubundaki blastosistlerin yüksek çoğunluğunda ise morfolojik olarak TE/ICM ayrımı yapılamamıştır. Kültür ortamındaki bu morfolojik görüntü, inhibitör grubu blastositlerde hücrel farklanmada rolü olan moleküllerin bir şekilde etkilenmiş olabileceğini göstermektedir. Fakat, kesin olarak bir hücrel farklılaşma bozukluğundan bahsedebilmemiz için, TE/ICM belirteçleri ile yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

p38 MAPK inhibitörleri, sitokin-baskılayıcı anti inflamatuvar ilaçlar (CSAID) adı verilen farmakolojik moleküllerdir (130). Hücrelerdeki p38 MAPK aktivitesinin baskılanması için çalışmalarda, SB220025 veya SB203580 moleküllerinin farklı dozları uygulanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda her iki CSAID molekülünün (SB220025 ve SB203580) farklı dozlarının, farklı doku ve hücre tiplerindeki, p38 alt basamak hedefleri olan p-MK2 ve p-hsp25/27 proteinlerinin ekspresyonlarını tamamen baskıladığı gösterilmiştir (23, 25, 26, 30). Bu iki proteinin defosforile formları ise p38 inhibisyonundan etkilenmemektedir (23). Çalışmamızda kullandığımız inhibitör molekülün (SB203580) etkinliğinin ispatı için, p38 MAPK tarafından aktive edilmesi beklenen MK2 ve hsp27 proteinlerinin fosforilasyonları analiz edilmiştir. Kontrol ve çözgen grubuna ait 8-hücreli, morula ve blastosist evresi embriyolarda p-MK2 proteini nüklear; p-hsp27 proteini ise hem sitoplazmik hem nüklear yerleşim göstermekteydi. Her iki proteine ilişkin saptanan bu hücre içi yerleşimler literatür bilgileriyle uyumludur ve çalışmamızda oluşturduğumuz kültür koşullarında embriyolardaki p38 aktivitesinin normal devam ettiğinin göstergesidir. İnhibitör grubuna ait çalışılan embriyonik evrelerin hiçbirinde ise bu proteinlerin fosforile formları saptanamamıştır. Bu bulgumuz, 20 µM SB203580 uygulamasının embriyolardaki p38 MAPK sinyal aktivitesini tamamen baskıladığının net bir şekilde göstergesidir. Hücre içerisindeki aktif olmayan p38 sinyali, her iki alt basamak substratının da fosforilasyonunu gerçekleştirmez.

GLUT proteinleri, dokulara metabolik destek sağlayan glukoz taşıyıcılardır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, bu protein ailesinin bazı üyelerinin, somatik dokulardaki ekspresyonunun p38 MAPK sinyal aracılı olduğunu açıklamıştır. Bu çalışmalardan birinde, L6 kas hücre kültüründe SB203580 uygulamasının, GLUT1 protein ekspresyonunu azalttığı, GLUT4 protein ekspresyonunun ise değişmediği bildirilmiştir (29). Bu çalışmada, p38 MAPK sinyal aktivitesi L6 kas hücrelerindeki GLUT1'in aktivatörü olduğu belirtilmektedir (29). Bir başka çalışmada ise, Sertoli hücre kültüründeki 48 saatlik, 8 µM SB203580 uygulamasının, GLUT1'in hem protein hem de mRNA ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (31). Bir diğer glukoz taşıyıcısı olan GLUT4'ün ise, kalp kası hücrelerinde p38 MAPK sinyal aracılı ekspre olduğu tanımlanmıştır. Kalp kası hücre kültüründeki plasmid transfeksiyonu ile arttırılan p38 MAPK sinyal yolağı aktivitesinin GLUT4 ekspresyonunu da arttırdığı immunoblot analizleri ile gösterilmiştir (30). Aynı çalışmada, kültüre p38

MAPK seçici inhibitörü olan 10 $\mu$ M SB203580 eklendiğinde ise GLUT4 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.

Yaptığımız immüno Floresan değerlendirmelerde 20  $\mu$ M SB203580 uygulaması ile p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış 8-hücreli embriyolarda, kontrol gruplarına kıyasla GLUT1 protein ekspresyonunda bir fark olmadığı görülmesi, geç preimplantasyon döneminin ilk basamağı olarak nitelendirebileceğimiz bu aşamadaki GLUT1 ekspresyonunun, p38 aktivitesinin kontrolünde olmayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu bulgu, gelişim potansiyeli değerlendirmesinde, CSAID varlığında belirlenen, kontrol gruplarına göre düşük, fakat nisbeten yüksek (%68.12) 8-hücreli embriyo oranının açıklayıcısı olabilir. 8-hücreli embriyo aşamasında devam eden GLUT1 ekspresyonu ve embriyo içerisine muhtemel glukoz taşınımı nedeni ile hücre içi metabolik ihtiyaçların karşılanmasına bağlı olarak embriyonik gelişim oranının yüksek olabileceği düşüncesindeyiz. Ayrıca, hem daha önceki literatür bilgileri, hem de bizim çalışmamız, p38 MAPK sinyalinin embriyolardaki aktivitesinin durdurulmasının 8-16 hücreli aşamadan itibaren gelişimi etkilediğini göstermektedir. Dolayısı ile 8-16 hücreli aşamadan önce embriyonik gelişimin p38 MAPK aktivitesinin GLUT ekspresyonlarını düzenlemediği kanısındayız.

Morula evresi embriyolarda GLUT1 protein ekspresyonunun esas olarak hücre membranında yerleşik olduğu, bununla birlikte sitoplazmik zayıf ekspresyonların da bulunduğu immüno Floresan sonuçlarımızda gösterilmiştir. 20  $\mu$ M SB203580 uygulaması ile p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış morula evresi embriyolarda ise membrana lokalize GLUT1 ekspresyonunda belirgin azalma görülmüştür. Bununla birlikte sitoplazmik zayıf GLUT1 ekspresyonu inhibitör uygulanmış morulalarda izlenmiştir. Bu sonuçlar, p38 aktivitesi baskılanmış morulardaki, hücre içerisine glukoz transportunu gerçekleştirecek olan membrana lokalize GLUT1 miktarının azaldığını işaret etmektedir. Dahası, kültürde blastosist aşamasına ulaştığı belirlenen embriyolardaki GLUT1 ekspresyon karşılaştırmasında da benzer sonuçlar saptanmıştır. Kontrol ve çözgen gruplarındaki blastosistlerde, beklenildiği gibi, esas olarak membrana lokalize GLUT1 protein ekspresyonları tespit edilirken; zayıf sitoplazmik ekspresyonların varlığı da gözlemlendi. p38 aktivitesi baskılanmış blastosistlerde ise neredeyse hiç membrana yerleşik GLUT1 protein ekspresyonu görülmezken, sitoplazmik zayıf ekspresyonların varlığı belirlenmiştir. İnhibitör uygulanmış morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda tespit edilen membrana lokalize GLUT1 ekspresyonundaki belirgin azalma, bu aşamalarda embriyolardaki GLUT1 protein lokalizasyonunun p38 sinyali ile düzenlendiğini işaret etmektedir.

Şimdiye kadar yapılmış pek çok çalışmada, çeşitli somatik dokulardaki ve kompaksiyon sonrası dönem embriyolardaki GLUT1 ekspresyonunun belirgin bir şekilde membranöz olduğu ve bu yerleşimin mikroçevreden hücre içerisine glukoz alınımını gerçekleştirmesinden sorumlu olduğu açıklanmıştır. Pantaleon M. ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada, GLUT1 protein ekspresyonunun zigot ve 2-hücreli embriyolarda esas olarak nüklear membranda ve sitoplazmada, 4-hücreli aşamada esas olarak sitoplazmik ve zayıf membranöz, 8-hücreli aşamadan itibaren ise artan düzeyde membranöz yerleşimli olduğu gösterilmiştir (83). Pantaleon ve arkadaşlarının bu bulguları, embriyo glukoz bağımlı hale gelmeye

başladıkça, hücre içerisine mutlak glukoz transportu ihtiyacına cevap olarak, sitoplazmada üretilen GLUT1 proteininin blastomer membranına geçiş yaptığını göstermektedir. Çalışmamızda ilginç bir şekilde, p38 aktivite blokajında preimplantasyon gelişim ilerledikçe, GLUT1 membran ekspresyonu azalırken, sitoplazmik ekspresyonların değişmediği görülmüştür. Bu bulgu oldukça dikkat çekici olup, geç dönem embriyolardaki GLUT1 proteininin sitoplazmadan hücre membranına geçiş yapmasının, p38 MAPK sinyal aracılı olabileceğini önermektedir. Bu nedenle, morula ve blastosistlerde belirlediğimiz gerilemiş membranöz protein ekspresyonunu, hücre içerisindeki p38 MAPK sinyalinden yoksun olan embriyolarda GLUT1 proteininin gelişim ilerledikçe sitoplazmadan membrana geçiş yapmadığı şeklinde yorumladık. Ayrıca, p38 inaktivasyonunda embriyonik gelişim ilerledikçe oluşan membrana lokalize GLUT1 yoksunluğunun, morula ve özellikle de blastosistlerin artan glukoz ihtiyacını karşılayamıyor olabileceği düşüncesindeyiz. Bu sonucumuz, literatürde var olan p38 MAPK inaktivasyonunda preimplantasyon gelişimin 8-16 hücreli embriyo aşamasından sonra gelişimin gerilediği, gelişimsel defektlerin ve arrestlerin görüldüğü bulguların muhtemel bir nedeni olabilir. Aynı şekilde çalışmamızın bu sonucu, *in vitro* kültürdeki embriyonik gelişim potansiyellerini açıkladığımız tablodaki CSAID muamelesindeki morula ve blastosist oranlarındaki ciddi düşüşün muhtemel açıklayıcısıdır. p38 MAPK aktivitesi baskılanmış 8-hücreli, morula ve blastosist evresi embriyolardaki GLUT1 protein ekspresyonuna ilişkin bu orijinal bulgular ilk kez çalışmamız ile ortaya konulmuştur.

İnsülin-bağımlı bir glukoz taşıyıcısı olduğu bilinen GLUT4 proteininin daha önce fare preimplantasyon dönem embriyolardaki ekspresyonunu gösteren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, GLUT4 ekspresyonunun C57 ırkı fare blastosistlerinde, nüklear membranda ve sitoplazmada lokalize olduğu tanımlanmıştır (88). Çalışmamızda ise, kontrol ve çözen grubuna ait blastosistlerde GLUT4 proteininin sitoplazmik yerleşim gösterdiği belirlendi. Bu glukoz taşıyıcı proteinin immünofloresan bulgularının gruplar arası kıyaslamasının ise önemli bir sonucu işaret ettiği belirlendi. 20 µM SB203580 uygulaması ile p38 MAPK aktivitesi baskılanmış blastosistlerin sitoplazmik GLUT4 ekspresyonunda belirgin azalma tespit edildi ve bu gerilemiş GLUT4 ekspresyonunun sitoplazmada kümelenmiş bir görünümde olduğu gözlemlendi. Bu bulgumuz, p38 MAPK sinyal aktivitesinin blastosistlerdeki GLUT4 lokalizasyonunu düzenleyebileceğini düşündürmektedir. GLUT4 proteininin, blastosistlerdeki glukoz transportu sürecindeki görevleri henüz aydınlatılmadığı için, p38 MAPK blokajında blastosistlerdeki GLUT4 yerleşimindeki bu ilginç değişimi yorumlamamız oldukça zor görünmektedir. Ayrıca, immünofloresan bulgularımız CSAID muamelesindeki blastosistlerdeki GLUT4 protein ekspresyonunun azalmış olduğuna işaret etse de, net bir azalmanın varlığından bahsedebilmemiz için kantitatif bir değerlendirmeye ihtiyaç olduğu kanısındayız. GLUT1 proteininin ekspresyonu değerlendirmesinde olduğu gibi, p38 MAPK aktivitesi baskılanmış blastosistlerdeki GLUT4 protein ekspresyonuna ilişkin bu bulgular da ilk kez çalışmamız tarafından tarif edilmiştir.

Riera ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada, sıçan testis dokusundan izole edilen Sertoli hücreleri p38 MAPK seçici inhibitörü SB203580 ile kültüre edildiklerinde *Glut1* mRNA seviyesinin azaldığı belirtilmektedir (31). Çalışmamızda ise, 8-hücreli, morula ve blastosistlerdeki *Glut1* mRNA ekspresyonunda üç deney grubu arasında anlamlı bir değişim bulunmamıştır. Bu



bulgumuz, erken dönem embriyolardaki *Glut1*'in transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel kontrolünde p38 MAPK sinyal yolağının etkin olmayabileceğini göstermektedir.

Yenidoğan sıçan kalp kası hücrelerindeki p38 MAPK sinyalinin, *Glut4* promoter transkripsiyonel aktivitesini de stimüle ettiği, *Glut4* mRNA'sının p38 MAPK-bağımlı ekspre olduğu Montessuit C. ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada belirtilmektedir (30). Aynı çalışmada, p38 MAPK seçici inhibitörü SB203580 ile muamele sonucunda kantitatif RT-PCR sonuçlarına göre *Glut4* mRNA miktarı azalmaktadır (30). Bizim çalışmamızda ise, üç deney grubuna ait blastosistlerde saptanan *Glut4* mRNA ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, kantitatif RT-PCR bulgularımız incelendiğinde, inhibitör uygulaması sonucunda p38 MAPK sinyal aktivitesi baskılanmış blastosistlerdeki *Glut4* mRNA ekspresyonunda, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1.4 katlık artış olduğu görülmektedir. İmmünfloresan bulgularımız, p38 MAPK sinyali inhibe edilmiş blastosistlerde, GLUT4 protein ekspresyonunun azaldığı yönündeydi. Bu gruba ait blastosistlerde *Glut4* mRNA düzeyinin artışı, hücre içerisinde daha çok protein üretimi sağlamak için olabileceği kanısındayız. Şu ana kadar yapılan hiçbir çalışmada, embriyolardaki p38 MAPK aktivitesi durdurulduğunda, embriyolardaki *Glut1* ve *Glut4* mRNA'sının ekspresyon düzeyi değerlendirilmemiştir. Çalışmamız, bu açıdan bir ilktir.

## SONUÇLAR

Bu tez projesi çalışmasında, fare preimplantasyon gelişimde aktif ve gerekli hücre içi sinyal mekanizmalarından biri olduğu bilinen p38 MAPK sinyal yolağının, preimplantasyon gelişiminin glukoz kullanımına bağımlı olduğu geç dönemlerinde (8-hücreli, morula, blastosist) GLUT1 ve GLUT4 ekspresyonlarının düzenlenmesindeki muhtemel rolleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

1. Gelişim potansiyeli ve morfolojik bulgularımızı değerlendirdiğimizde: p38 MAPK sinyal aktivitesinin preimplantasyon gelişiminin devamı ve özellikle de normal blastosist gelişimi için gerekli mekanizmalardan biri olduğu görülmektedir.
2. GLUT1 protein ekspresyonunun 8-hücreli embriyonik evrede, hücre içerisindeki p38 MAPK sinyal aktivitesinin durdurulmasına bağılı olarak değişmediği görülmüştür. Bu bulgu gelişimin erken aşamasındaki GLUT ekspresyonunun p38 MAPK sinyali aracılı olmadığını düşündürmüştür.
3. Kontrol grubuna ait morula ve blastosist evresi embriyolarda GLUT1 protein yerleşiminin esas olarak membranöz, zayıf miktarda da sitoplazmik olduğu belirlenmiştir. 20µM SB203580 muamelesi ile p38 sinyali baskılanmış morula ve blastosistlerde ise membrana yerleşik GLUT1 protein ekspresyonunda belirgin bir azalma tespit edilmiştir.
4. Şimdiye kadar çok az çalışmada embriyolardaki varlığı gösterilen ve fonksiyonel yönleri açıklanamayan GLUT4 proteininin, blastosist evresi embriyolarda sitoplazmik yerleşime sahip olduğu çalışmamızda ortaya konulmuştur.
5. İmmünfloresan sonuçlarımız, 20µM SB203580 muamelesi ile p38 sinyali baskılanmış blastosistlerdeki GLUT4 protein ekspresyonunun azaldığını işaret etmektedir. Ayrıca, dikkat çekici bir şekilde inhibitör grubu blastosistlerdeki GLUT4 protein yerleşimi de değişmiştir.
6. Her iki glukoz taşıyıcısı proteine ilişkin bu bulgularımız, embriyolardaki p38 sinyalinin, GLUT1 ve GLUT4 protein ekspresyonlarını düzenlediği hipotezimizi doğrulamaktadır.
7. Yaptığımız kantitatif RT-PCR sonuçlarına göre gruplar arasında *Glut1* ve *Glut4* mRNA ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim görülmemektedir. Bu durum, preimplantasyon embriyolardaki p38

MAPK sinyal aktivitesinin, bu genleri transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde kontrol etmediğini düşündürmektedir.

8. Bu çalışma, p38 MAPK aktivitesinin preimplantasyon embriyolardaki GLUT1 ve GLUT4 ekspresyonları üzerindeki düzenleyici rollerinin, hem protein hem de mRNA düzeyinde araştırıldığı ilk çalışmadır.
9. Günümüzde deney hayvanı modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda tedavi edici yönleri araştırılan CSAID moleküllerinin, inflamasyon ile ilişkili çeşitli hastalıklarda potansiyel farmakolojik etkinlikleri klinikte belirlenmiştir (127-130). Araştırmamızın bu bulgu ve sonuçları, bu tedavilerin gebeliğin erken döneminde uygulanmasının preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine olabilecek olası olumsuz etkilerinin, göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Niemann H., Wrenzycki C., Alterations of Expression of Developmentally Important Genes in Preimplantation Bovine Embryos by In Vitro Culture Conditions: Implications for Subsequent Development, *Theriogenology*, 53, 21–34, (2000).
2. Gardner DK., Pool TB., Lane M., Embryo Nutrition and Energy Metabolism and Its Relationship to Embryo Growth, Differentiation, and Viability. *Semin Reprod Med*, 18(2), 205-18, (2000).
3. Leese HJ., Metabolic Control During Preimplantation Mammalian Development, *Hum Reprod*, 1, 63-72, (1995).
4. Brinster RL., Studies on the Development of Mouse Embryos In Vitro. IV. Interaction of Energy Sources. *J Reprod Fertil*, 10, 227–240, (1965).
5. Wales RG., Whittingham DG., A Comparison of the Uptake and Utilisation of Lactate and Pyruvate in One- and Two-Cell Mouse Embryos, *Biochim Biophys Acta*, 148, 703–712, (1967).
6. Biggers JD., Whittingham DG., Donahue RP., The Pattern of Energy Metabolism in the Mouse Oocyte and Zygote. *Proc Natl Acad Sci USA*, 58, 560–567, (1967).
7. Leese HJ., Barton, AM., Pyruvate and Glucose Uptake by Mouse Ova and Preimplantation Embryos, *J Reprod Fertil*, 72, 9–13, (1984).
8. Gott AL., Hardy K., Winston RM., Leese HJ., Non-invasive Measurement of Pyruvate and Glucose Uptake and Lactate Production by Single Human Preimplantation Embryos, *Human Reproduction*, 5(1), 104-8, (1990).
9. Martin KL., Leese HJ., Role of Developmental Factors in the Switch From Pyruvate to Glucose as the Major Exogenous Energy Substrate in the Preimplantation Mouse Embryo, *Reprod Fertil Dev.*, 11 (7-8), 425-33, (1999).
10. Gardner DK., Leese HJ., The Role of Glucose and Pyruvate Transport in Regulating Nutrient Utilization by Preimplantation Mouse Embryos, *Development*, 104(3), 423-9, (1988).
11. Pantaleon M., Scott J., Kaye PL., Nutrient Sensing by the Early Mouse Embryo: Hexosamine Biosynthesis and Glucose Signaling During Preimplantation Development, *Biology of Reproduction*, 78, 595–600. (2007).

12. Scheeper S A., Joost HG., Schürmann A., The Glucose Transporter Families SGLT and GLUT: Molecular Basis of Normal and Aberrant Function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 28(5), 364-71, (2004).
13. Purcell SH., Moley KH., Glucose Transporters in Gametes and Preimplantation Embryos, *Trends Endocrinol Metab*, 20(10), 483-9, (2009).
14. Hogan A., Heyner S., Charron MJ., Copeland NG., Gilbert DJ., Jenkins NA., Thorens B., Schultz GA., Glucose Transporter Gene Expression in Early Mouse Embryos, *Development*, 113(1), 363-72, (1991).
15. Leppens-luisier G., Urner F., Sakkas D., Facilitated Glucose Transporters Play a Crucial Role Throughout Mouse Preimplantation Embryo Development, *Hum Reprod*, 16(6), 1229-36, (2001).
16. Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu BE., Karandikar M., Berman K., Cobb MH., Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions, *Endocr Rev*, 22, 153-183, (2001).
17. Johnson GL., Lapadat R., Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases, *Science*, 298(5600), 1911-2, (2002).
18. Davis RJ., Signal Transduction by the JNK Group of MAP kinases, *Cell*, 103, 239-252, (2000).
19. Pouyssegur J., Volmat V., Lenormand P., Fidelity and Spatiotemporal Control in MAP Kinase (ERKs) Signalling, *Biochemical Pharmacology*, 64, 755–763, (2002).
20. Ramos JW., The Regulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Mammalian Cells, *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2707–2719, (2008).
21. Nishimoto S., Nishida E., MAPK Signalling: ERK5 Versus ERK1/2, *EMBO Rep*, 7(8), 782-6, (2006).
22. Ono, K. and Han, J. The p38 signal transduction pathway, activation and function. *Cell. Signal.* 12, 1–13, (2000).
23. Natale DR., Paliga AJ., Beier F., D'Souza SJ., Watson AJ., p38 MAPK Signaling During Murine Preimplantation Development, *Developmental Biology*, 268, 76–88, (2004).
24. Wang Y., Wang F., Sun T., Trostinskaia A., Wygle D., Puscheck E., Rappolee DA., Entire Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway Is Present in Preimplantation Mouse Embryos, *Developmental Dynamics*, 231, 72–87, (2004).

25. Paliga AJ., Natale DR., Watson AJ., p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) First Regulates Filamentous Actin at the 8-16-Cell Stage During Preimplantation Development, *Biol Cell*, 97(8), 629-40, (2005).
26. Maekawa M., Yamamoto T., Tanoue T., Yuasa Y., Chisaka O., Nishida E., Requirement of the MAP Kinase Signaling Pathways for Mouse Preimplantation Development, *Development*, 132(8), 1773-83, (2005).
27. Somwar R., Kim DY., Sweeney G., Huang C., Niu W., Lador C., Ramlal T., Klip A., GLUT4 Translocation Precedes the Stimulation of Glucose Uptake by Insulin in Muscle Cells : Potential Activation of GLUT4 via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, *Biochem J*, 359, 639-49, (2001).
28. Yamamoto Y., Yoshimasa Y., Koh M., Suga J., Masuzaki H., Ogawa Y., Hosoda K., Nishimura H., Watanabe Y., Inoue G., Nakao K., Constitutively Active Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Increases GLUT1 Expression and Recruits Both GLUT1 and GLUT4 at the Cell Surface in 3T3-L1 Adipocytes, *Diabetes*, 49, 332–339, (2000).
29. Taha C., Tsakiridis T., McCall A., Klip A., Glucose Transporter Expression in L6 Muscle Cells: Regulation Through Insulin- and Stress-Activated Pathways, *Am J Physiol*, 273, E68-76, (1997).
30. Montessuit C., Rosenblatt-Velin N., Papageorgiou I., Campos L., Pellioux C., Palma T., Lerch R., Regulation of Glucose Transporter Expression in Cardiac Myocytes: p38 MAPK is a Strong Inducer of GLUT4, *Cardiovasc Res*, 64, 94-104, (2004).
31. Riera MF., Galardo MN., Pellizzari EH., Meroni SB., Cigorraga SB., Molecular Mechanisms Involved in Sertoli Cell Adaptation to Glucose Deprivation, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E907–E914, (2009).
32. Marko AJ., Miller RA., Kelman A., Frauwirth KA., Induction of Glucose Metabolism in Stimulated T Lymphocytes Is Regulated by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling, *Plos One*, 5(11):e15425, (2010).
33. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. & Behringer, R., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor, NY, (2003).
34. Maro, B., Johnson, M. H., Pickering, S. J. & Flach, G., Changes in actin distribution during fertilization of the Mouse egg. *J Embryol Exp Morphol*. 81, 211–23, (1984).
35. Simerly C, Wu G., Zoran S. et al. The paternal inheritance of the chromosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans and the implications for infertility. *Nat Med*; 1:47-53, (1995).
36. Demir R., *İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ankara, Bölüm 4, Sayfa 78-120, (1995)

37. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixa.asp>
38. Piotrowska, K. & Zernicka-Goetz, M., Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 409, 517–521, (2001)
39. Davies, T. J. & Gardner, R. L., The plane of first cleavage is not related to the distribution of sperm components in the mouse. *Hum Reprod.* 17, 2368–2379, (2002).
40. Plusa, B., Piotrowska, K. & Zernicka-Goetz, M., Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote. *Genesis* 32, 193–198, (2002).
41. Bowman, P., and McLaren, A., Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 24:203-207, (1970).
42. Harlow, G.M., and Quinn, P., Development of preimplantation mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35:187-193., (1982).
43. Streffer, C., van Beuningen, D., Molls, M., Zamboglou, N., and Shulz, J., Kinetics of cell proliferation in the pre-implanted mouse embryo *in vivo* and *in vitro*. *Cell Tissue Kinet.*, 13:135-143, (1980)
44. Brownell, M.S., and Warner, C.M., *Pcd* gene expression by embryos cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 39:806-811, (1988).
45. Duranthon V, Watson AJ., Lonergan P. Preimplantation embryo programming: Transcription, epigenetics and culture environment. *Reproduction*; 135(2):141-50, (2008).
46. Lei Li, Ping Zheng, Jurrien Dean, Maternal control of early mouse development, *Development* 137, 859-870, (2010).
47. Johnson, M.H., and Ziomek, C.A. .Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability, *J. Cell Biol.*, 91:303-308, (1981).
48. Johnson, M.H., Maro, B., and Takeichi, M. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 93:239-255, (1986).
49. [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)
50. Ducibella, T., and Anderson, E. Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst., *Dev. Biol.*, 47:45-58, (1975).
51. Borland, R.M., Biggers, J.D., and LeChene, C.P. Control of protein synthesis during blastocyst formation in the mouse., *Dev. Biol.*, 68:440-452, (1977).

52. Watson, A.J., Damsky, C.H., and Kidder, G.M. Differentiation of an epithelium: factors affecting the polarized distribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase in mouse trophectoderm. *Dev. Biol.*,141:104-114, (1990).
53. Brinster RL, Protein content of the mouse embryo during the first five days of development, *J. Reprod. Fertil*, 13,413-420, (1967).
54. Leese.HJ., ConaghanJ., Martin.K.L. and Hardy.K. Early human embryo metabolism. *Bioessays*, 15, 259—264, (1993).
55. Epstein CJ. Gene expression and macromolecular synthesis during preimplantation embryonic development. *Biol. Repmd.*, 12, 82-105, (1975).
56. Morgan J.M. and Kanejvlt. Protein content of rabbit embryos: one cell to peri-implantation blastocysts. *J. Reprod. Fertil*, 97, 101-106, (1993).
57. Gardner DK, Leese HJ. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Hum Reprod*; 1:25–27.,(1986).
58. Martin A. Kramen and John D. Blggers. Uptake of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates by Preimplantation Mouse Embryos In Vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. 68, No. 11, pp. 2656-2659, (1971).
59. David K. Gardner,Michelle Lane,Andrew John Watson. *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo*, Oxford University Press.
60. Wales, RG., and Whittingham, DG., The metabolism of specifically labelled lactate and pyruvate by two-cell mouse embryos. *J Reprod Fertil.*, 33(2):207-22, (1973).
61. Wales RG, Biggers JD. The permeability of two- and eight-cell mouse embryos to L-malic acid. *J Reprod Fertil.*,15(1):103-11, (1968).
62. Barbehenn EK., Wales RG., Lowry OH. The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.A.*, 71, 1056-1060, (1974).
63. Brinster RL. The lactate dehydrogenase in the preimplantation embryos of Quackenbush and Swiss mice. *FEBS Lett*; 17:41–44, (1971).
64. Chi MM, Manchester JK, Yang VC, Curato AD, Stricker RC, Lowry OH. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biol Reprod*; 39:295–307, (1988).
65. Martin KL, Hardy K, Winston RML, Leese HJ. Activity of enzymes of energy metabolism in single human preimplantation embryos. *J Reprod Fertil*; 99:259–266, (1993).
66. Brinster RL. P-fructokinase activity in the preimplantation mouse embryo. *Wilhelm Roux Arch. Entw Mech. Org.*, 166, 300-302, (1975).



67. Hardy K, Hooper MA, Handyside AH, Rutherford AJ, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod.*; 4(2):188-91, (1989).
68. Martin KL., Hardy K., Winston RML, Leese H., Activity of enzymes of energy metabolism in single human preimplantation embryos. *Journal of reproduction and fertility.*, 99, 259-266, (1993).
69. Leese.HJ. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxf Rev Reprod Biol.*; 13:35-72, (1991).
70. Biggers JD., Gardner DK. and Leese HJ., Control of carbohydrate metabolism in preimplantation embryos. *Regulation of Growth in Development.* CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 19—32, (1989).
71. Brinster RL, Hexokinase activity in the preimplantation mouse embryo. *Enzymologia* 34, 304-308 (1968).
72. Brinster RL., Phosphofructokinase activity in the preimplantation mouse embryo. *Development genes and evolution* volume 166, number 3, 300-302, (1971).
73. Butcher L. Metabolism of pyruvate by the early human embryo. *Biol. Reprod.*, 58, 1054 – 1056, (1998).
74. Gibb CA. Control of cytosolic pH in two-cell mouse embryos: roles of H(+)-lactate cotransport and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Am. J. Physiol.*, 273, C404 – C419, (1997).
75. Harding EA, Day ML, Gibb CA, Johnson MH, Cook DI, The activity of the H<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter during pre-implantation development in the Mouse *Pflugers Arch.*; 438(3):397-404, (1999).
76. Jansen S. Glucose affects monocarboxylate cotransporter (MCT) 1 expression during mouse preimplantation development. *Reproduction*, 131, 469 – 479, (2006).
77. Herubel F. Genetic expression of monocarboxylate transporters during human and murine oocyte maturation and early embryonic development. *Zygote*, 10, 175– 18, (2002).
78. <http://www.gurdon.cam.ac.uk/~zernickagoetzlab/>
79. Wiley LM, Lever JE, Pape C and Kidder GM. Antibodies to a renal Na<sup>+</sup>/glucose cotransport system localize to the apical plasma membrane domain of polar mouse embryo blastomeres. *Developmental Biology.*, 143:149–161, (1991).
80. Chi MM, Manchester JK, Basuray R, Mahendra S, Strickler RC, McDougal DB, Jr and Lowry OH. An unusual active hexose transport

system in human and mouse preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90:10 023–10 025, (1993).

81. Gardner HG. and Kaye PL., Characterization of glucose transport in preimplantation mouse embryos *Reproduction Fertility and Development*, (7)41–50, (1995)
82. Pantaleon M. and Kaye PL., Glucose transporters in preimplantation development, *Reviews of Reproduction*, 3, 77–81, (1998).
83. Pantaleon, M. et al. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 64, 1247 – 1254, (2001).
84. Aghayan M. et al. Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development*, 115, 305 – 312, (1992).
85. Pantaleon M. et al. Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (3)795 – 3800, (1993).
86. Simpson IA, Cushman SW. Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu Rev Biochem.*; 55:1059–1089, (1986).
87. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 3:267–277, (2002).
88. Tonack S, Fischer B., Santos NA., Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. *Anat Embryol.*; 208:225–230, (2004).
89. Santos NA. et al. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction*, 128, 503 – 516, (2004).
90. Carayannopoulos MO. et al. GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 7 313 – 7318, (2000).
91. Carayannopoulos MO. et al. GLUT9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology.*, 145, 1435–1443, (2004).
92. Zhou, Y. et al. Identification of the facilitative glucose transporter 12 gene (*Glut12*) in mouse preimplantation embryos. *Gene Expr. Patterns*, 4, 621 – 631, (2004).
93. Rogers S. et al. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282, E733 – E738, (2002).

94. Wu X and Freeze HH. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*, 80, 553 – 557, (2002).
95. Adjaye J. et al. Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. *Physiol. Genomics*, 31, 315– 327, (2007).
96. T.W. Sadler, Langman's Medikal Embriyoloji, Palme Yayıncılık, 9. Baskı, Bölüm 2, Ankara, 2005.
97. Hogan A. et al. Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development*, 113, 363–37, (1991).
98. Gardner DK, Leese HJ., Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J Reprod Fertil.*, 88(1):361-8, (1990).
99. Krisher R.L., Prather S.A., A Role for the Warburg Effect in Preimplantation Embryo Development: Metabolic Modification to Support Rapid Cell Proliferation, *Molecular Reproduction & Development*, 79:311– 320, (2012).
100. Bermejo-Alvarez P, Roberts RM, Rosenfeld CS. Effect of glucose concentration during *in vitro* culture of mouse embryos on development to blastocyst, success of embryo transfer, and litter sex ratio. *Mol Reprod Dev.*, 79(5):329-36, (2012).
101. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiology Reviews*, 81:807 – 869, (2001).
102. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*; 129 – 18, (2002).
103. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology*, 206: 1107 – 1115, (2003).
104. Enslen H., Branch DM., Davis RJ. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J.*; 19, 1301– 1311, (2000).
105. Jiang Y., Chen C., Li Z., Guo W., Gegner JA., Lin S., Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*; 271:17920–6, (1996).
106. Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moler NPH, Ullrich A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4355–9, (1996).

107. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.*; 78(6): 1039-49, (1994).
108. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR., A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.*, 23;78(6):1027-37, (1994).
109. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al., A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis., *Nature.*, 22-29;372(6508):739-46, (1994).
110. Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ., Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6, *J Biol Chem.*, 16;273(3):1741-8, (1998).
111. Keesler GA, Bray J, Hunt J, Johnson DA, Gleason T, Yao Z, Wang SW, Parker C, Yamane H, Cole C, Lichenstein HS., Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein Expr Purif.*;14(2):221-8, (1998).
112. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR, A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins, *Cell.*, 23;78(6):1027-37, (1994).
113. McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP, Young PR. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem*; 271:8488–92, (1996).
114. Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, Gaestel M. Identification of MAPKAP kinase-2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS*; 313:307–13, (1992).
115. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J*; 15:4629–42, (1996).
116. Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science*; 272:1347–9, (1996).
117. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation, *Nature.*; 20;386(6622):296-9, (1997).

118. Janknecht R, Hunter T., Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.*;16(7):1620-7, (1997).
119. Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z., p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem.*; 30;274(18):12229-35, (1999).
120. Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK., MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell.*; 75(3):487-93, (1993).
121. Misra-Press A, Rim CS, Yao Y, Roberson MS, Stork PJS. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase: Structure, expression and regulation. *J Biol Chem*;270:14587–96, (1995).
122. Martell KJ, Seasholtz AF, Kwak SP, Clemens KK, Dixon JE. Hvh-5: a protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem*; 65:1823–33, (1995).
123. Camps M, Nichols A, Gillieron. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen activated protein kinase. *Science*; 280:1262–5, (1998).
124. Muda M, Theodosiou A. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*; 271:27205–8, (1996).
125. Tong L, Pav S, White DM, Rogers S, Crane KM, Cywin CL, Brown ML, Pargellis CA. A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol*; 4:311–6, (1997).
126. de Laszlo SE, Visco D, Pyrrolles and other heterocycles as inhibitors of p38 kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2689–94, (1998).
127. Badger AM, Bradbeer JN., Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in an animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther*; 279:1453–61, (1996).
128. Jackson JR, Bolognese B, Hillegass L, Kassis S, Adams J, Griswold DE, Winkler JD. Pharmacological effects of SB 220025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. *J Pharmacol Exp Ther.*; 284(2):687-92, (1998).
129. Zhou WD, Yang HM, Wang Q, Su DY, Liu FA, Zhao M, Chen QH, Chen QX., SB203580, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, suppresses the development of endometriosis by down-regulating proinflammatory cytokines and proteolytic factors in a mouse model, *Hum Reprod.*; 25(12):3110-6, (2010).

130. English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci.*, 23(1):40-5, (2002).
131. Edwards RG., Recent Scientific and Medical Advances in Assisted Human Conception, *Int J Dev Biol.*; 41, 255– 262, (1997).
132. Pratt, H.P., Ziomek, C.A., Reeve, W.J. and Johnson, M.H. Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J. Embryol. Exp. Morphol.*; 70, 113–132, (1982).
133. Levy, J.B., Johnson, M.H., Goodall, H. and Maro, B. The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*; 95, 213–237, (1986).
134. Goval JJ., Van Cauwenberge A. and Alexandre, H. Respective roles of protein tyrosine kinases and protein kinases C in the upregulation of beta-catenin distribution, and compaction in mouse preimplantation embryos: a pharmacological approach. *Biol. Cell.*; 92, 513–526, (2000).
135. Kidder GM. and McLachlin JR. Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.*; 112, 265–275, (1985).
136. Dietrich JE, Hiiragi T: Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development*, 134 :4219-4231, (2007).
137. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J: Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. *Cell*, 123:917-929, (2005).
138. Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophoctoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 313 :614-629, (2008).

## ÖZGEÇMİŞ

Berna SÖZEN 1987 yılında Antalya’da doğdu. İlköğrenimini 1998 yılında Dumlupınar İlkokulu’nda, ortaöğrenimini 2001 yılında Başöğretmen Atatürk İlköğretim Okulu’nda, lise öğretimini 2004 yılında Antalya Lisesi’nde tamamladı. Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2009 yılında onur derecesiyle lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda “Üreme Biyolojisi” yüksek lisans programına başladı. Yüksek lisans eğitimi sırasında, Avrupa Komisyonu Eğitim ve Staj (European Comission Education & Training) hareketliliği kapsamında, ERASMUS (European Community Action Scheme for the Mobility of University Students) bursunu kazanarak, 6 ay Southampton Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Merkezi, Gelişim Biyolojisi Departmanı, İngiltere’de eğitim aldı ve Prof. Dr. Tom P. Fleming ile birlikte çalıştı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.