

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÖSTROJEN VE PROGESTERONUN ENDOMETRİYUM
HÜCRELERİNDE MİTOJENLE AKTİVE OLAN PROTEİN
KİNAZLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

Gözde KÖKSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2009

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÖSTROJEN VE PROGESTERONUN ENDOMETRİYUM
HÜCRELERİNDE MİTOJENLE AKTİVE OLAN PROTEİN
KİNAZLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

Gözde KÖKSAL

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. ENDOMETRİYUM YAPISI	5
4.2. ISHIKAWA HÜCRE SOYU.....	5
4.3. ENDOMETRİYUMUN HORMONAL KONTROLÜ	6
4.3.1. Endometriyal Siklus.....	6
4.3.1.1. Proliferatif Faz.....	7
4.3.1.2. Sekretuar Faz.....	8
4.4. HÜCRE SİKLUSU	9
4.4.1. BrdU İnkorporasyonu.....	10
4.5. STEROİD HORMONLAR.....	11
4.5.1. Östrojen.....	11
4.5.2. Progesteron.....	12
4.6. FULVESTRANT	13
4.7. MAPK SİNYAL İLETİ YOLU	13
4.7.1. p38 Sinyal İleti Yolu.....	14
4.7.2. JNK Sinyal İleti Yolu	15
4.7.2.1. c-Jun.....	15
4.7.3. ERK Sinyal İleti Yolu.....	16
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	17
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	18
5.2.1. Hücre Kültürü.....	18
5.2.2. İmmünohistokimya.....	18
5.2.2.1. BrdU İmmünohistokimyası.....	18
5.2.2.2. p38, JNK, c-Jun İmmünohistokimyası	19
5.3. MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRME.....	19

5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	19
6. BULGULAR	20
6.1. STEROİD HORMONLARIN ISHIKAWA HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİ.....	20
6.2. STEROİD HORMONLARIN c-JUN VE JNK ÜZERİNE ETKİSİ	22
6.3. STEROİD HORMONLARIN p38 ÜZERİNE ETKİSİ	24
7. TARTIŞMA.....	26
8. SONUÇ	29
9. TEŞEKKÜR	30
10. KAYNAKLAR	31

SİMGE VE KISALTMALAR

AP-1	: Aktivatör protein-1/Activator protein-1
BrdU	: 5- bromo2'-deoksi-üridin
CDK	: Siklin bağımlı kinaz/Cyclin dependent kinase
ER	: Östrojen reseptörü/Estrogen receptor
ERK	: Hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz/Extracellular signal-regulated kinase
HCL	: Hidroklorik asit
IEG	: Uyarana ilk yanıt veren gen ailesi/Immediately early gene
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü /Insuline-like growth factor
IGFBP-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1/Insulin-like growth factor binding protein 1
JNK	: Jun N- terminal kinaz
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz /Mitogen-activated protein kinase
MMP	: Matriks metalloproteinaz/Matrix metalloproteinase
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü/Platelet-derived growth factor
PR	: Progesteron reseptörü /Progesterone receptor
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü/Transforming growth factor
Araştırma Projesi No	: HE/0242007

1. ÖZET

Endometriyum, menstrual siklus boyunca başarılı bir implantasyon için steroid hormonlara cevap olarak bir dizi değişiklik geçirir. Hormonların koordineli üretimleri döngüsel olarak meydana gelen bu değişimde anahtar düzenleyicidir. Östrojen, siklusun ilk evresinde endometriyal proliferasyondan sorumludur. Progesteron artmış östrojenik etkiyi baskılayarak dokunun diferansiye olmasını sağlar. Östrojen reseptör antagonisti olan fulvestrant ise östrojen reseptörüne bağlanarak reseptörü inaktif duruma getirir ve proliferasyonu inhibe eder.

Çalışmamızda Ishikawa endometriyum epitel hücrelerinde 17-β-östradiol, fulvestrant ve progesteronun proliferasyon üzerine olan etkileri 5- bromo2'-deoksi-üridin (BrdU) işaretleme yöntemi ile S faz hücre oranları karşılaştırılarak değerlendirildi. Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) embriyogenez, proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz gibi işlevlerin ilerleyişinden ve strese yanıt oluşumundan sorumludurlar. MAPK ailesinin üyeleri olan p38, JNK ve uyarana ilk yanıt veren protoonkogenlerden c-jun'un steroid hormonların etkisi altındaki aktivasyon düzeyleri incelendi. 17-β-östradiol ile inkübe edilen hücrelerde S faz hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdi. Ancak fulvestrantın östrojenin proliferatif etkisini antagonize etmediği izlendi. Progesteron uygulanan hücrelerde proliferasyon oranında anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. Uygulanan konsantrasyon ve sürelerde östrojen, fulvestrant ve progesteronun JNK, fosfo p38 ve fosfo c-jun ekspresyon düzeylerinde bir değişikliğe yol açmadığı belirlendi.

Elde edilen bulgular doğrultusunda endometriyum epitel hücrelerinde, siklus evrelerini kontrol eden östrojen ve progesteronun etkilerini JNK, fosfo p38 ve fosfo c-jun ekspresyonlarından bağımsız olarak gösterdiği sonucuna varılmıştır.

2. SUMMARY

During menstrual cycle endometrium makes serial changes in response to steroid hormones for a successful implantation. Coordinated production of these hormones takes a key role in this change that happens in a cyclic way. Estrogen is responsible for endometrial proliferation in the first phase of cycle. Progesterone differentiates the tissue by suppressing the increased estrogen effect. Fulvestrant, estrogen receptor antagonist, binds and inhibits estrogen receptor and proliferation is inhibited.

In our study in Ishikawa endometrium epithelium cells the effect of 17- β -*o*estradiol, fulvestrant and progesterone on proliferation is evaluated with comparison of S phase cell rates using 5-bromo 2'-deoxy-uridin labeling technique. Mitogen activated protein kinases (MAPK) are responsible for progress of functions such as embryogenesis, proliferation, differentiation and apoptosis and respond to stress. Activation levels of P38, JNK and c-jun which is immediately early response protooncogene are the member of MAPK family were examined under the influence of steroid hormones. In the cells which incubated with 17- β -*o*estradiol, S phase cell rates increased statistically but fulvestrant did not antagonized proliferative effect of estrogen. On the cells that progesterone is applied proliferation rate did not change statistically. During time and concentration that is applied, estrogen, fulvestrant, and progesterone did not change the expression levels of JNK, phospho p38 and phospho c-jun.

According to the findings that obtained, we conclude that in endometrium epithelial cells, estrogen and progesterone that control cycle phases show their effect independently from expressions of JNK, phospho p38 and phospho c-jun.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Embriyo implantasyonunda önemli bir role sahip olan endometriyum uterusun lümene bakan tabakasıdır. Endometriyum menstrual siklus boyunca östrojen ve progesteron etkisiyle proliferasyon, diferansiyasyon, doku yıkımı ve dökülme gibi birçok değişikliğe uğrar. Bu ovaryan steroid hormonların koordineli ve sıralı üretimleri endometriyumun düzgün ve döngüsel gelişimi için gereklidir (1-3). Östrojen büyüme, diferansiyasyon ve işlevsel yönden hedef dokularda anahtar düzenleyici olarak görev yapar (1). Progesteronun endometriyum üzerinde asıl görevi proliferasyonu baskılayarak diferansiyasyonu tetiklemektir (4). Fulvestrant (ICI 182-780) ise östrojen reseptör antagonistidir (5). Hücre siklusu, proliferere olmak üzere uyarılmış hücrelerin bir dizi geçici biyokimyasal olay ve sonrasında morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir zaman periyodudur. Siklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirinin aynı iki hücre oluşumuyla döngüyü bitirir (6). Siklustaki hücrelerin işaretlenerek oranlarının belirlenmesi amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. BrdU inkorporasyonu, hücre döngüsünün S fazına özgü işaretleme yöntemidir. DNA ya inkorpore olan BrdU, anti-BrdU antikoru ile işaretlenerek proliferere olan hücrelerin işaretlenmesini sağlar (7). Prolifere olmak üzere bölünme sinyalini alan hücrede MAP kinaz ve Protein Kinaz C gibi özgün sinyal iletileri devreye girer (6). Sinyal ileti mekanizması; hücrenin normal işlevlerinin devamlılığı için gerekli iletişim ve etkileşimden sorumludur (8). Ökaryotik hücrelerin tamamında yer alan bu proteinler hücre membranından nukleusa bilgi aktarılmasında önemli görevlere sahiptir. Hücre sinyal ileti kaskadları embriyogenez, proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır (9). MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır (10). p38 ve JNK (Jun N-terminal kinaz) çevresel strese karşı cevap oluştururken, ERK (Hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz) mitojenik uyarımla aktive olur. p38 ve JNK hücre döngüsünün ilerleyişi, diferansiyasyon, apoptoz ve inflamatuvar cevap gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadır (11). ERK ise büyüme faktörleri ve hormonlar gibi uyarıcı faktörlerle aktive olur ve hücrede hayatta kalım, proliferasyon ve diferansiyasyonu yönetir (12).

Araştırmanız da in-vitro endometriyum modeli için uygunluğu kabul edilmiş olan Ishikawa hücre soyu kullanıldı. Bu hücre soyu üzerinde steroid hormonların etkisi altında, MAPK sinyal ileti yolunun, embriyo implantasyonu için de önemli olan endometriyal proliferasyon ve diferansiyasyona olan etkisi değerlendirildi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. ENDOMETRİYUM YAPISI

Embriyo implantasyonunda önemli bir role sahip olan endometriyum uterusun lümene bakan tabakasıdır. Tek katlı silli, silindirik epitel ile döşelidir. Epitel hücreleri, tübüler endometriyal bezlerin epiteli ile devam eder. Bu hücrelerin altında lamina propiia bulunmaktadır (1).

Endometriyum işlevsel olarak değerlendirildiğinde iki tabakadan oluşmaktadır. İlk tabaka fonksiyonel tabaka olarak adlandırılır ve endometriyumun üst 2/3'lük kısmını oluşturur. Embriyo implantasyonunda önemli bir yere sahip bu tabaka ayrıca endometriyal siklus içerisinde proliferasyon, sekresyon ve dejenerasyonun görüldüğü yerdir. İkinci tabaka bazal tabakadır ve endometriyumun 1/3'lük alt kısmını oluşturur. Endometriyal sıklusta fonksiyonel tabakanın kaybı sonrası endometriyum bazal tabaka tarafından yeniden yapılandırılır (2).

4.2. ISHIKAWA HÜCRE SOYU

İyi diferansiye insan adenokarsinoma hücre dizisi olan Ishikawa hücre soyu implantasyon çalışmalarında, insan endometriyal hücre soylarının sınırlı olması ve primer hücre kültürlerinin uzun süreli kültürünün zorlukları nedeniyle araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir.

İnsan endometriyumuna benzer olarak Ishikawa hücre soyunun da östrojen ve progesteron reseptörü içermesi, insan endometriyumu üzerindeki, fizyolojik ve patofizyolojik çalışmaların aydınlatılmasında kullanım kolaylığı sağlamaktadır (13).

4.3. ENDOMETRİYUMUN HORMONAL KONTROLÜ

Embriyo implantasyonu ve gelişiminin sürekliliği implantasyon gerçekleşmeden önce ovaryumlardan salgılanan steroid hormonlarca denetlenen bir dizi karmaşık, hücrel ve moleküler olaya bağlıdır (14).

Endometriyum menstrual siklus boyunca östrojen ve progesteron gibi steroid hormonların etkisiyle proliferasyon, diferansiyasyon, doku yıkımı ve dökülme gibi birçok değişikliğe uğrar. Bu ovaryan steroid hormonların koordineli ve sıralı üretimleri endometriyumun düzgün ve döngüsel gelişimi için gereklidir, aksi takdirde düzensiz üretim endometriyum kaynaklı hastalıkların oluşma riskini artırmaktadır (3).

4.3.1. Endometriyal Siklus

Endometriyal siklus, uterusun 28 günlük periyotta geçirdiği değişiklikleri kapsar. Bu süreçte steroid hormonlara cevap olarak endometriyumun vasküler, stromal ve glandular komponentlerinde değişiklikler gözlenir. Bu sayede fertilizasyon gerçekleşirse endometriyum implantasyona hazırlanmış olur.

Ovaryal siklusta folüküler fazda östrojen artışı uterotrofik etkiye sahiptir ve endometriyal hücrelerde proliferasyon ve glandular yapıda sayısal artışa sebep olur. Bu menstrual siklusta proliferatif faza karşılık gelmektedir. Ovaryal siklusun luteal fazında ise kademeli progesteron artışı stromal proliferasyon ve spiral arterlerin gelişmesiyle sonuçlanır. Endometriyal glandlar tamamen aktive olur ve endometriyal siklusun sekretuar fazına karşılık gelir.

Eğer fertilizasyon gerçekleşmez ise plazma östrojen-progesteron seviyeleri düşer, endometriyum hormonal destekten mahrum kalır ve fonksiyonel tabakanın dökülmesiyle menstruasyon oluşur. Menstruasyon sırasında prostoglandinler tarafından uterin kontraksiyonlar stimüle edilir (15).

4.3.1.1. Proliferatif Faz

Proliferatif faz sırasında endometriyumun asıl görevi apoptotik faktörleri baskılamak, yeni doku oluşumu sırasında anjiogenezisi desteklemek ve proliferasyondur. Proliferatif faz sırasında endometriyumun yeterli gelişimi sekretuar faz endometriyumunda ki implantasyon aşamaları için çok önemlidir (16).

Endometriyal proliferasyon başta östradiol olmak üzere östrojen tarafından kontrol edilir. Endometriyumdaki hedef dokularda bulunan östrojen reseptörlerine bağlanan östrojen, homodimer yapı oluşturur ve yapısal değişiklikler geçirerek kromozomal DNA'nın östrojenden sorumlu bölümüne bağlanır. Bu bağlanma östrojenik etkiye bağlı hedef hücrelerin proliferasyondan sorumlu genlerin transkripsiyonunu aktifler (17). Yapılan microarray analizlerde, endometriyumda ekspresyonu östrojen tarafından düzenlenen farklı gen ürünleri tanımlanmıştır (trefoil peptitler, mammaglobinler, wnt ailesi gibi). Hepsi menstruasyon prosesleri boyunca doku dejenerasyonu, inflamasyon, hipoksi, epitelyal onarım ve anjiogenez sırasında aktif durumdadır (18).

Bu faz sırasında endometriyum gibi yüksek proliferasyonun olduğu dokularda, anjiogenezis için yeterli besin sağlanmak zorundadır. Anjiogenezisin gözleendiği yer bazal tabakadır ve majör damarların uzaması proliferatif fazda gerçekleşmektedir (19). Bu aşamaların farklı zamanlarda ve sıralı ilerlemesi, anjiogenezin bir çok faktör tarafından düzenlenmesine bağlıdır. Bunlara örnek olarak nitrik oksit, MMPs (Matriks metalloproteinazlar), fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü verilebilir (20). Vasküler epitelyal büyüme faktörünün bir başka fonksiyonu ise proliferatif fazda epitel hücrelerinde proliferasyon üzerinedir (21). MMP'lerin rolünün doku rejenerasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Örneğin; MMP-7'nin erken proliferatif fazda etkin olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (22).

Bunlara ek olarak ovaryan hormonlar, IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü/ Insuline-like growth factor), TGF- α (Transforme edici büyüme faktörü/Transforming growth factor), PDGF (Platelet kaynaklı büyüme faktörü/Platelet-derived growth factor) gibi birçok faktörü düzenlemektedir. Yapılan çalışmalarda bu faktörlerin menstrual siklus sırasında düzenlendiği görülmüştür. Proliferatif faz boyunca IGF reseptör 1 (HER1), TGF- α ve amfiregulin ekspresyonun arttığı ve bazal katmanda epitel hücreleri için mitojenik etki gösterdiği görülmüştür (23). IGF-1'in tetiklenmesi de östrojen tarafından proliferatif faz

sırasında olmaktadır. Bu olayın, endometriyum proliferasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir (24).

Özetle proliferatif faz; uyumlu doku değişimi, proliferatif ve anti- apoptotik süreçler ve anjiogenezis ile karakterize bir süreçtir.

4.3.1.2. Sekretuar Faz

Endometriyal siklusun ikinci yarısı olarak adlandırılan sekretuar fazın kilit ismi progesterondur. Reseptör aracılığı ile hareket eden progesteron, endometriyal proliferasyonu baskılamakta ve diferansiyasyonu tetiklemektedir (4). Progesteron A ve B olmak üzere iki tip reseptöre sahiptir ve bunlardan progesteron reseptör B endometriyal glandular hücrelerde az bulunurken, stromal hücrelerde daha çok kendini göstermektedir (25). Buna bağlı olarak implantasyon penceresinin oluşumu sırasında progesteron hareketinin stromal kompartmanda progesteron reseptör B üzerinden olduğu düşünülmektedir (26).

Sekretuar fazın sonlarına doğru morfolojik değişikliklerle karakterize olan desidualizasyon meydana gelir. Stromal hücrelerde meydana gelen desidualizasyonla birlikte doku faktörleri, IGFBP-1 (Insulin-like growth factor binding protein 1), prolaktin gibi farklı desidual proteinlerin üretimi ve sekresyonu bu fazda olmaktadır (27).

Geç sekretuar faz ortalarında desidual reaksiyona ek olarak kemik iliğindeki çeşitli immün hücreler endometriyum içerisine geçerler. Bu popülasyonun bir kısmını (%70'in üstünde) doğal öldürücü hücreler, T hücreleri ve makrofajlar teşkil etmektedir. Ayrıca bu fazda anjiogenik mekanizma ve spiral arterlerde değişiklikler görülür (19).

Bu morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile blastosist implantasyonu için endometriyum hazırlanmış olur. Eğer fertilizasyon gerçekleşir ise embriyo endometriyum epiteline tutunur ve endometriyal stromaya doğru hücum eder (28).

Fertilizasyon gerçekleşmez ise plazma östrojen-progesteron seviyeleri düşer, endometriyum hormonal destekten mahrum kalır ve fonksiyonel tabakanın dökülmesiyle menstruasyon oluşur (15).

4.4. HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu, proliferere olmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen bir dizi geçici biyokimyasal aktivite ve morfolojik değişikliğin görüldüğü süreçtir. Siklus morfolojik ve genetik olarak birbirinin aynı iki hücre oluşumuyla sonlanır.

Hücreler genel olarak bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve G0 fazında beklerler. Hücreler büyüme faktörleri, sitokin ve mitojenler gibi çeşitli sinyallerin etkisi ile bölünmek üzere sıklusa girerler. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda sinyal ileti mekanizması devreye girer. Bu ileti mekanizması; transkripsiyonu, hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller ya da doğrudan nukleusa ulaşıp transkripsiyonu düzenler. Böylece, hücre sıklusa sokularak mitozla yönlendirilir.

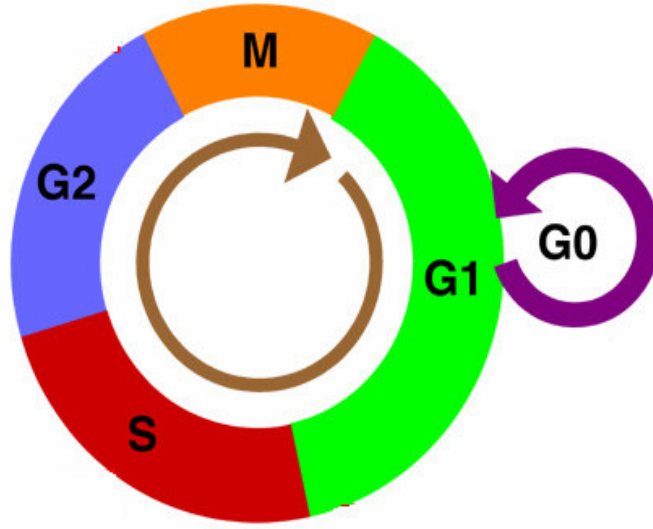
Hücreler mitozla girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bölünme için gerekli olan düzenleyici proteinleri sentezlerler. Bu hazırlık safhasına interfaz denir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt bölümlerden oluşur. Mitozis ve interfaz birlikte hücre siklusu olarak bilinen süreci oluştururlar. Hücre siklusu, işleyiş sırasına göre; G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 ve G2 kısaltmaları “gap” ara, boşluk sözcüğünden gelmekte olup S evresi DNA sentez aşamasının bir göstergesi olarak “S” ile ifade edilir. “M” ise mitoz anlamına gelmektedir. G0 fazı ise hücre siklusu içinde yer almayan veya sıklusdan çıkmış hücrelerin dinlenme evresidir. Hücreler sıklusa girme uyarısı aldıkları zaman G0 fazından çıkıp G1 fazına yani siklusun ilk fazına girerler. G1 fazından ayrılan hücreler ise diferansiye olmak üzere farklı yöne kayarlar.

G1 fazında hücre ya bölünmek ya diferansiye olmak ya da ölmek için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar. G1 fazında gerçekleşen değişiklikler başlıca c-fos, c-myc ve c-jun gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonundan sorumlu genlerde görülür. Bu transkripsiyon faktörleri DNA üzerinde regülatör dizilere bağlanırlar. İlgili genlerin aktivasyonu sonucu siklin ve CDK’(Siklin bağımlı kinaz/Cyclin dependent kinase) ların aktivasyonları sağlanır.

Hücre siklusuna giren bir hücre DNA sentezi yapar ve mitozla iki kardeş hücreye eşit olarak dağılır. G1 ile G2 fazları arasında RNA ve protein sentezleri yapılır, ayrıca hücre bölünme için kendini yeniden organize eder.

S fazında, hücre DNA'sı hızla replike olur, çünkü bu fazda DNA sarmalları birbirinden ayrılır ve dış etmenlerin olası etkilerine açık hale gelir. G2 fazında, DNA ve kromatin proteinleri kondanse olur ve paketlenirler. Tamir mekanizmaları tarafından tanımlanmamış hasarlı veya replike olmamış DNA G2 fazında ki kontrol noktasında tespit edilir.

M fazında hücre profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez evrelerini geçirek bölünür (6).



Şekil-1: Hücre döngüsü şematik görünümü.

4.4.1. BrdU İnkorporasyonu

BrdU (5-bromo 2- deoksi- üridin), hücrelerde proliferasyonu tanımlayabilmek amacı ile kullanılan, hücre döngüsünün S fazına özgü işaretleme yöntemidir. DNA ya inkorpore olan BrdU, spesifik anti-BrdU antikoruna ile işaretlenir ve proliferasyon yapan hücreler tespit edilir (7). 1982 yılında Gratzner ve arkadaşları hücre döngüsünün S fazının saptanmasını, timidin analogu olan BrdU ya karşı antikor kullanım temeline dayandırarak rapor etmiştir (29). BrdU nun hücresel inkorporasyonu membran geçirgenliğini izleyen anti-BrdU spesifik

antikorları tarafından saptanabilir. BrdU pozitif hücrelerin miktarını belirleyebilmek için sitometrik akışkanlık veya immünohistokimya gibi rutin metodların kullanımı mümkündür.

BrdU immünohistokimyasının timidin inkorporasyonu ve otoradyografi ile karşılaştırıldığında bir avantajı, daha az zaman alması ve daha yüksek çözünürlük sağlamasıdır (30). BrdU inkorporasyonunun immünohistokimyasal boyanması, kanser ve normal dokularda, farklı hücre popülasyonlarında, proliferasyon oranlarının ve hücre döngüsü kinetiklerinin saptanmasında halen sık kullanılan bir yöntemdir (31).

BrdU için etkili boyama elde etmede en yaygın karşılaşılan zorluk, DNA iplikleri arasına antikorun penetre olabilmesindeki yetersizliktir. Antikorun BrdU ya penetre olabilmesi için hücre geçirgenliği ve DNA zincirinin açılması önemlidir. Bu sebeple BrdU uygulamasında genellikle HCL (Hidroklorik asit) ile muamele, ethanol fiksasyonu, enzimatik sindirim veya tedavi öncesi mikrodalga metodları kullanılır.

HCL ve enzimatik sindirim ile muamele, DNA zincirinin yapısına, ayrıca diğer antijenler için immünoreaktiviteye zarar vermektedir. Bu sorunu azaltmak ve immün boyamayı geliştirmek için methacarn gibi alternatif fiksatifler veya sitrat tampon kullanılarak antijen iyileştirme teknikleri, antijenik bölgeleri ortaya çıkartmak için kullanılır (32).

4.5. STEROİD HORMONLAR

4.5.1. Östrojen

Bir steroid hormon olan östrojen büyüme, diferansiyasyon ve işlevsel yönden hedef dokularda anahtar düzenleyici olarak görev yapar. Kadın ve erkek reproduktif organlarında, meme bezlerinde, iskelet ve kardiovasküler sistemde bulunmaktadır. Genel olarak biyolojik etkisine iki intrasellüler reseptör arabuluculuk eder. Bunlar östrojen reseptör- α ve östrojen reseptör- β 'dir. Her ikisinde kendine özgü genler tarafından kodlanır (33). Yapılan çalışmalar östrojen reseptör- α nın uterus, serviks, vajina, meme ve birkaç hedef dokuda baskın olduğunu, östrojen reseptör- β 'nin ise ovaryum, prostat, testis, dalak, akciğer, timus ve hipotalamusta bulunduğunu göstermektedir (34).

Östradiol, östriol ve östron olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır. En etkin ovaryum östrojeni olan östradiol başlıca granüloza ve granüloza lutein hücrelerince üretilir. Daha az

etkin olan östriolün önemli miktarı gebelik sırasında karaciğerde östrondan üretilir. İçlerinde en az etkin olan östron ise periferik dokularda östradiol ya da androstenedionun dönüştürülmesi ile oluşur (1).

Primer östrojen yanıt genleri grubuna dahil olan az sayıda gen östrojenik etkiye yanıt elemanları taşırlar. Bunlar AP-1 transkripsiyon faktörünün bir parçası olan c-fos genidir. Farklı olarak, östrojen tarafından indüklenen birçok gende (epidermal büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü ve hücre siklusu ile ilişkili siklin D1 gibi) östrojen yanıt elemanları bulunmaz. Bu genler östrojene yanıt veren sekonder gen grubu içerisinde dirler ve östrojenik etkinin bu genlerin transkripsiyon/ekspresyonuna nasıl etki ettiği tam olarak netleşmemiştir. Yapılan çalışmalar östrojen ve diğer seks steroid hormonlarının gen transkripsiyon/ekspresyonunu kapsayan mekanizmalarla değil; ancak ERK gibi sinyal ileti yollarının aktivasyonu ile hücreleri etkiliyor olabileceğini göstermiştir (35).

4.5.2. Progesteron

Progesteronun endometriyum üzerindeki asıl görevi proliferasyonu baskılayarak diferansiyasyonu tetiklemektir (4).

İnsan endometriyumunda ovulasyon sonrası progesteron üretimi östrojene duyarlı endometriyal glandular hücrelerin değişimine yol açar ve böylece bu hücreler endometriyal siklusun sekretuar fazında implantasyon için kritik önemi olan (glikodelin gibi) birçok biyoaktif madde üretir (13).

Uzun süre progesteron olmadan sadece östrojene maruz kalmanın endometriyal hiperplazi ve kansere sebep olacağı düşünülmektedir. Progesterona yetersiz cevaptan kaynaklanan iyi diferansiye endometriyal kanser, endometriyozis, endometriyal fonksiyon bozukluğu gibi hastalıkların tedavisinde progesteron kaynaklı tedaviler yaygın olarak kullanılmaktadır (3). Progesteronla uygulanan bu tedavinin amacı östrojenin endometriyum proliferasyonu üzerine artmış olan etkisi ile mücadele ederek endometriyumda uygun diferansiyasyonu sağlamaktır (36).

4.6. FULVESTRANT

Fulvestrant ayrıca ICI 182-780 olarak bilinmektedir. Östrojen reseptör antagonistidir. Günümüzde halen östrojen reseptörü pozitif metastatik kanser teşhisi konulmuş bazı postmenopozal hastalarda hormonal tedavi olarak uygulanmaktadır (5).

Birçok proliferasyona yatkın doku östrojen reseptörüne sahiptir ve bu dokuların büyümesi östrojen tarafından stimüle edilmektedir. Fulvestrant, östrojen reseptörüne bağlanarak östradiol molekülü şeklinde hareket eder. Bu sayede östrojen reseptörü bloke edilir ve östrojenin proliferatif etkisi baskılanır (37).

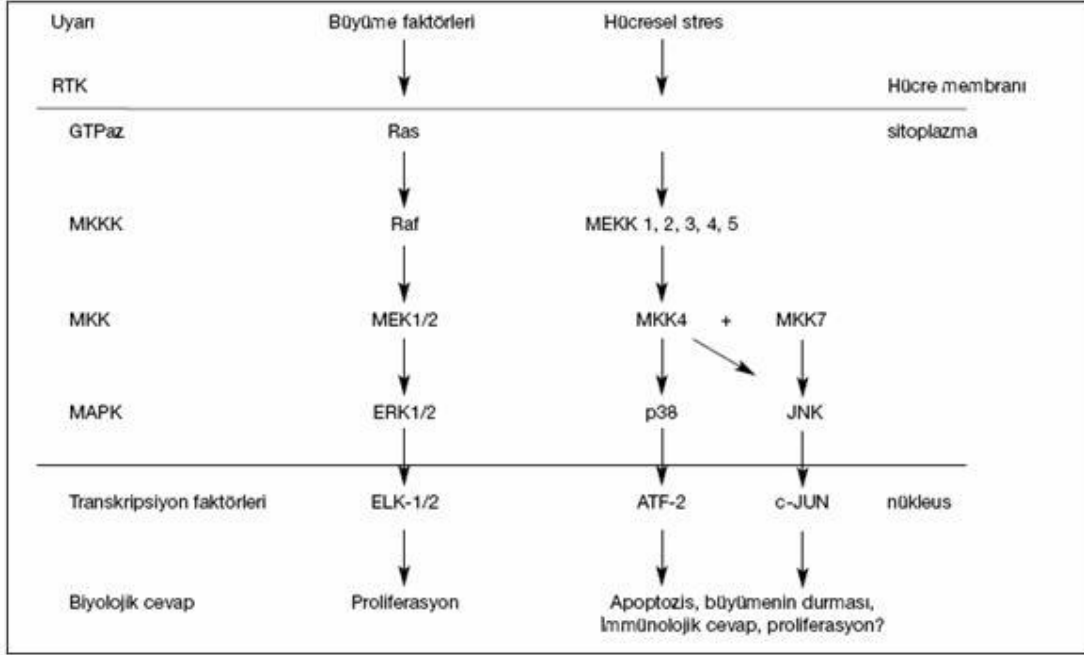
4.7. MAPK SİNYAL İLETİ YOLU

Sinyal ileti mekanizması; hücrenin normal işlevlerinin devamlılığı için gerekli iletişim ve etkileşimden sorumludur (8). Ökaryotik hücrelerin tamamında yer alan bu proteinler hücre membranından nükleusa bilgi aktarılmasında önemli görevlere sahiptir. Bu sinyal iletim kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiyasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır (9).

MAPK (Mitojenle aktive olan protein kinaz/ Mitogen activated protein kinase) sinyal ileti yolu hücre içerisinde birçok merkezi role sahiptir. 1987 yılında mikrotübül düzenleyici faktör olarak kısaltılan MAPK (8) daha sonra major aktivatörünün mitojenik büyüme faktörü olduğu ve mikrotübül düzenleyici protein dışında substratlarının olduğunun saptanmasıyla mitojenle aktive olan protein kinazlar olarak tanımlanmıştır (38).

MAP kinaz yolu reseptör aracılığı ile sinyalin hücre içine iletiminden sorumludur. Sinyalin iletimi G-proteinin aktive olması ile başlar (Ras aktivasyonu) ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin bu sinyale karşı vereceği biyolojik cevap oluşur. Üç alt tipi bulunmaktadır; (10)

1. p38
2. JNK (Jun N- terminal kinase/ Jun N- terminal kinaz)
3. ERK (Extracellular signal regulated kinase/ Hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz)



Şekil-2: MAPK sinyal ileti yolları (10).

4.7.1. p38 Sinyal İleti Yolu

p38; çevresel strese karşı cevap oluşturan önemli bir düzenleyicidir. p38 in hedefleri arasında, transkripsiyon faktörleri, translasyon mekanizmasının komponentleri ve serin-treonin kinazlar bulunur (39).

p38, UV ışınları, sodyum arsenat, ısı şoku, bakteriyel lipopolisakkarit, proinflamatuvar sitokinler gibi birçok çevresel faktöre bağlı olarak aktive olur (40). Hücre döngüsünün ilerleyişi, diferansiyasyon, apoptozis ve inflamatuvar cevap gibi fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (11).

Memeli hücrelerinde 4 tip p38 tanımlanmıştır. Bunlar; p38 α (SAPK2a), p38 β (SAPK2b), p38 γ (SAPK3) ve p38 δ (SAPK4)'dır. Bu enzimlerin hepsi MAPKK 6 tarafından fosforile ve aktive edilir (41).

4.7.2. JNK Sinyal İleti Yolu

Hücreyel birçok olayda önemli roller oynayan JNK, hücre gelişimi, büyümesi, apoptoz ve immün cevaptan sorumludur (42). Stres faktörlerine cevap sırasında aktive olduğu için stres ile aktive olan protein kinaz (Stress-activated protein kinase, SAPK) olarak da bilinir. JNK1, JNK2, JNK3 genleri tarafından kodlanır (43). Hücrede stres oluşturan ısı şoku, osmolarite değişimleri ve DNA hasarına hemen her zaman JNK ve p38 aktivasyonu eşlik eder (10).

Bu yolda, hücre de nükleusa giren sinyal, c-Jun'u fosforile ederek transkripsiyon faktörlerini aktive eden protein AP-1 (Aktivatör protein-1/Activator protein-1)' i etkin hale getirir (44). JNK, hücrede hem apoptoz hemde hayatta kalım arasında önemli bir denge unsurudur. JNK-1'in strese karşı reaksiyonundan sonra kinaz aktivasyonunun apoptozla neticelenmesine karşın, bazı kanser hücrelerinde aktivasyonu kontrolsüz çoğalmayı teşvik etmektedir (45).

4.7.2.1. c-Jun

IEG (Uyarana ilk yanıt veren gen/Immediately-Early Gene) grubundan bir proto-onkogen olan c-jun geni ve AP-1 ailesi üyesi olan onkoproteinlerden jun proteinlerinin ekspresyonu hücrede çeşitli uyarılarla birlikte artış göstermektedir (46). c-jun geni JNK sinyal ileti yolunda önemli bir yere sahiptir. JNK tarafından düzenlenen c-jun aktivitesinin stresin indüklediği apoptoz gelişiminde, genotoksik hasara cevaben DNA onarım aşamalarında, ayrıca hücre siklusunun durdurulmasında rol oynadığı düşünülmektedir (47).

JNK ile oluşan Jun proteininin fosforilasyonu, c-jun geninin ekspresyonunda artışa neden olur ve AP-1 kompleksi oluşur. AP-1 kompleksi hızlı-erken gen ekspresyonunun güçlü bir aktivatörüdür. Membrandaki reseptör aktivasyonunu nükleusda ilgili genetik materyal bölümüne aktarırlar (48).

4.7.3. ERK Sinyal İleti Yolu

ERK (Hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz/Ekstracelluler regulated kinase) bilinen sitoplazmik sinyal iletim yollarından biridir. Ökaryotik hücrede hayatta kalım, proliferasyon ve diferansiyasyonu yönetir (49). Büyüme faktörleri ve hormonlar başlıca uyarandır (12). İleti zinciri üç seri fosforile protein kinazdan meydana gelir; RAF, MEK, ERK. Büyüme faktörleri ve mitojenler hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak bu yolağı aktive eder. Bu sırada GDP/GTP değişimiyle RAS ve sonrasında bir serin-treonin protein kinaz olan RAF'ın RAS tarafından aktivasyonu meydana gelir. RAF bundan sonra MEK-1 ve MEK-2'yi aktive eder. Bu basamakların ardından ERK-1 ve ERK-2'nin aktivasyonu gerçekleşir (50).

ERK fosforilasyonu sonucunda, sitoplazmik ERK nükleusa geçer ve Elk-1, Rsk, ERF, c-Myc ve Cbfa1 gibi transkripsiyon faktörleriyle kompleks oluşturur ve hücrede gen aktivasyonu oluşur (51).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) 17- β -estradiol, Sigma
- 2) NaCl, Atabay AT091-950
- 3) Na₂HPO₄, Riedel-de H en 81890
- 4) NaH₂PO₄, Riedel-de H en 8210A
- 5) HCl, Merck K23226314 632
- 6) DMEM, Sigma D5546
- 7) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 8) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 9) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 10) Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
- 11) Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
- 12) Anti-JNK antikoru, Santa Cruz SC474
- 13) Anti-fosfo c- jun antikoru, Santa Cruz SC16311
- 14) Anti-fosfo p38 antikoru, Santa Cruz SC7973
- 15) Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
- 16) Aminoetilkarbazol (AEC), Zymed -00-2007
- 17) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 18) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
- 19) DMSO, Sigma D 2650
- 20) Borik Asit, Sigma B0252
- 21) Sodyum tetra borat, Sigma B012
- 22) Fulvestrant, Faslodeks, Astra Zeneca

5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Hücre Kültürü

Ishikawa hücreleri, 37°C de %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde %10 fetal sığır serumu ve antibiotik (100 U/ml penisilin G, 100 ug/ml streptomycin) içeren DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) medyumunda flasklar içerisinde büyütüldü. Kontrol grubu hücreler normal medyumlar içerisinde tutuldu. Östrojenin etkinliğini gözlemlemek amacıyla oluşturulan deney grubu medyumuna 17-β-östradiol (0.4 µM) eklendi. Progesteron etkinliğinin incelendiği gruba hidrokspirogesteron kaproat (1 µg/ml) uygulandı. Hücre proliferasyonunun değerlendirileceği deney gruplarında belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyon yapıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrası JNK ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. p38 ve c-jun fosforilasyonları ise kısa süreli 15 dakikalık hormon inkübasyonları sonrası saptandı (52).

5.2.2. İmmünohistokimya

5.2.2.1. BrdU İmmünohistokimyası

Düzenlenen deney gruplarına ait hücreler fiksasyon öncesi BrdU (1mM) ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Metanolle fiksasyonu takiben hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCL ile 37°C'de 30 dakika denatüre edildi ve takiben borat tampon ile (pH:8) nötralize edildi. PBS ile yıkandıktan sonra spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için serumla 20 dakika bloklama işlemi uygulandı. Anti-BrdU primer antikoru (Mouse monoclonal-NeoMarkers) ile 1/100 dilüsyonda, oda ısısında, 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkamalar sonrasında sırasıyla biyotin-bağlı ve streptavidin-peroksidaz sekonder antikorları (Histostain Plus Kit, Zymed) 20 dakika uygulandı. Spesifik renk reaksiyonunu görüntülemek amacıyla AEC kromojeni uygulandı.

5.2.2.2. p38, JNK, c-Jun İmmünotokimyası

p38, JNK ve c-jun ekspresyon düzeylerinin immünotokimyasal incelemesi için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler -20°C de metanol ile 5 dakika fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaları engellemek için serumla (Histostain Plus Kit, Zymed) 20 dakika bloklama işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında anti-fosfo p38, anti-JNK ve anti-fosfo c-jun monoklonal primer antikorları ile 3µl/ml dilüsyonda oda ısısında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben biotinle işaretli sekonder antikor 20 dakika uygulandı. PBS yıkamalarını takiben streptavidin enzim konjugatıyla 20 dakika inkübasyon yapıldı ve yıkamalar sonrasında AEC kromojeni uygulandı. Kromojen aşamasında invert mikroskopta yapılan incelemede spesifik renk reaksiyonu izlendikten sonra reaksiyon durduruldu. Su bazlı kapatma solüsyonuyla örnekler kapatıldı.

5.3. MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Çalışmada kültüre edilen hücrelerin inceleme ve değerlendirmeleri Olympus X70 invert mikroskopta gerçekleştirildi. İmmünotokimyasal boyamaların inceleme, değerlendirilme ve fotoğraflandırma işlemleri ise Olympus BX 50 ışık mikroskobunda gerçekleştirildi.

5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

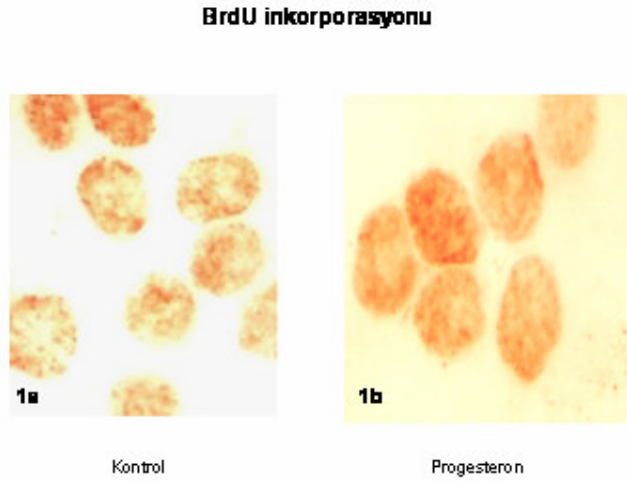
BrdU işaretli S fazındaki işaretlenmiş hücreler üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının değerlendirilmesiyle hesaplandı. Proliferasyon indeksi, mikroskop alanındaki pozitif işaretli hücrelerin/toplam hücre sayısına oranı alınarak bulundu.

İstatistiksel inceleme, SPSS 10.0 ile çoklu grup karşılaştırmaları için Kruskal Wallis, ikili grup karşılaştırmaları için Mann Whitney-U testleri uygulanarak değerlendirildi. p<0,05 değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

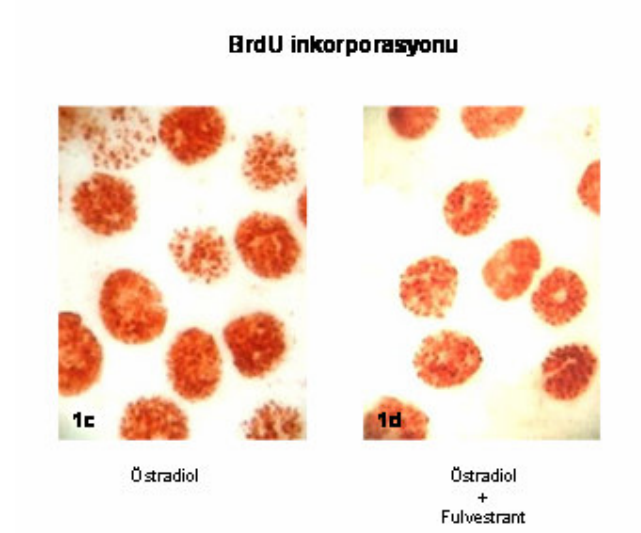
6.1. STEROİD HORMONLARIN ISHIKAWA HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİ

Endometriyum kaynaklı Ishikawa hücrelerinde fizyolojik dozda uygulanan steroid hormonların proliferasyon üzerine etkileri değerlendirildi. Hücrelerde proliferatif etki BrdU inkorporasyonu tekniği uygulanarak incelendi. Hücre siklusunun S fazındaki hücre oranı kontrol grubunda 52.93 ± 6.63 , progesteron ($1 \mu\text{g/ml}$) inkübasyonu uygulanan grupta ise 53.20 ± 6.51 olarak bulundu ve gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı (Resim 1a,b).



Resim 1a,b: BrdU işaretli S fazı kontrol grubu Ishikawa hücreleri (1a) progesteron inkübasyonuna tabi tutulmuş BrdU işaretli hücreler (1b). X600.

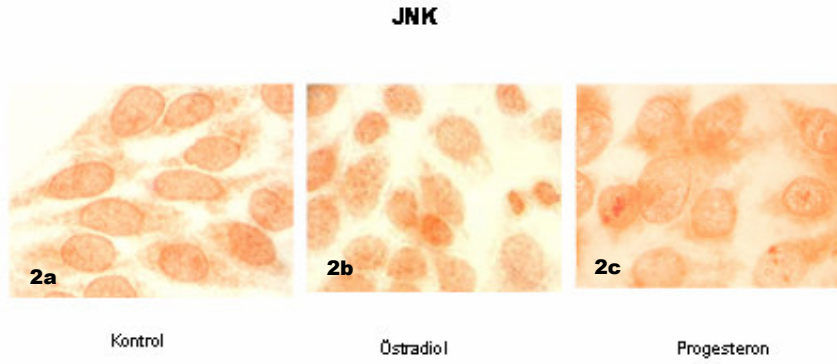
24 saat 0.4 μ M östradiol ile inkübasyondan sonra yapılan BrdU inkorporasyonu deneyi sonucunda östradiol'ün Ishikawa hücrelerinde proliferasyonu anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlendi (60.26 ± 9.29), fulvestrantın (58.00 ± 7.31) ise östrojenin proliferatif etkisini antagonize etmediği izlendi (Resim 1c,d).



Resim 1c,d: Ishikawa hücre soyunda östradiol (1c) ve östradiol+fulvestrant (1d) kombine tedavisi sonrası BrdU inkorporasyonu. X600.

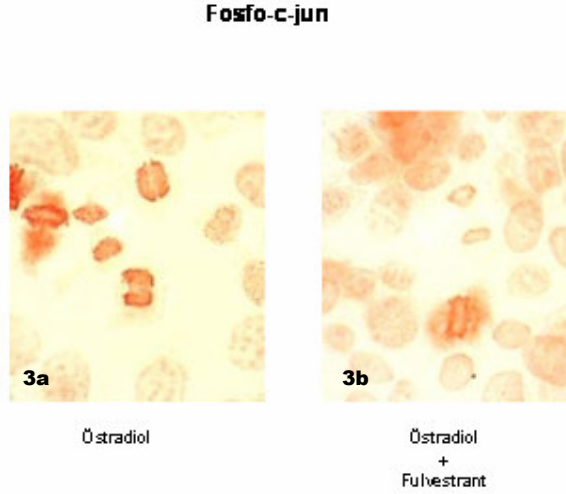
6.2. STEROİD HORMONLARIN c-JUN ve JNK ÜZERİNE ETKİSİ

Ishikawa hücrelerinde steroid hormonların stresle aktive olan JNK ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi incelendi. 48 saat östradiol ve progesteron ile inkübasyondan sonra anti-JNK primer antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimya deneyinde, östradiol ve progesteronun JNK ekspresyon düzeylerinde değişikliğe yol açmadığı saptandı (Resim 2 a,b,c).

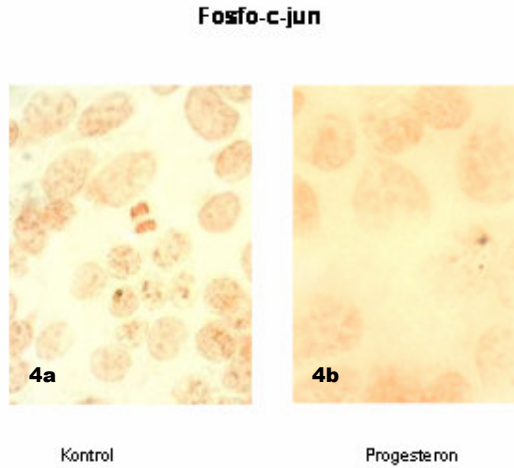


Resim 2 a,b,c: Ishikawa hücresi kontrol grubu (2a) östradiol grubu (2b) ve progesteron grubu (2c) JNK ekspresyon düzeyleri. X600.

Östradiol inkübasyonu sonrasında anti-fosfo c-jun antikoruna kullanılarak yapılan immünohistokimya deneyinde, östradiolün c-jun aktivasyonuna yol açmadığı görüldü. Östrojen reseptör antagonisti olan fulvestrantında c-jun fosforilasyonuna yol açmadığı izlendi (Resim 3a,b). Progesteronun ise östrojen benzeri bir etki gösterdiği ve fosfo c-jun ekspresyonu oluşturmadığı gözlemlendi (Resim 4a,b).



Resim 3 a,b: Ishikawa hücrelerinde östradiol ile inkübasyon sonrası c-jun aktivasyonu (3a), östradiol+fulvestrant kombine tedavisi sonrası fosfo c-jun ekspresyonu (3b). X600.

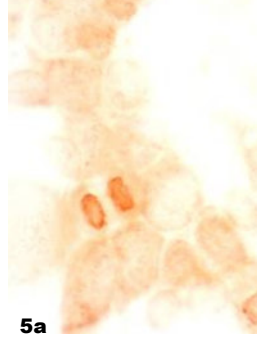


Resim 4 a,b: Ishikawa hücreleri kontrol grubu (4a) ve progesteron ile inkübe edilen hücrelerde fosfo c-jun ekspresyonu (4b). X600.

6.3. STEROİD HORMONLARIN p38 ÜZERİNE ETKİSİ

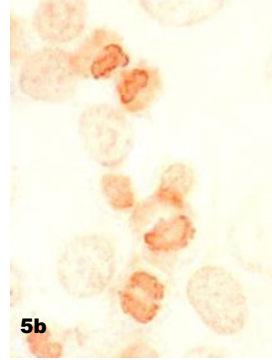
Ishikawa hücrelerinde östrojen ve progesteronun, MAPK sinyal ileti yolunun stresle aktive olan üyesi p38 üzerine etkisi incelendi. Östradiol ile inkübasyondan sonra anti-fosfo-p38 kinaz primer antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal incelemede, östradiol'ün p38 aktivasyonu oluşturmadığı görüldü (Resim 5a,b). Östrojen reseptör antagonisti olan fulvestrantın ise bu sinyal ileti yolu üzerinde bir etkisi saptanmadı. Progesteron inkübasyonunun da p38 proteinini aktive etmediği görüldü (Resim 6a,b).

Fosfo-p38 kinaz



5a

Östradiol

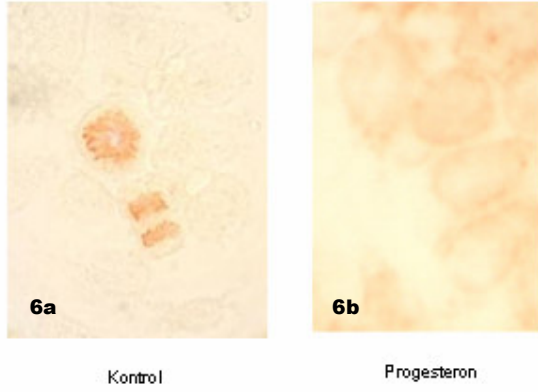


5b

Östradiol
+
Fulvestrant

Resim 5 a,b: Ishikawa hücrelerinde östradiol inkübasyonu sonrası p38 aktivasyonu (5a) östradiol+fulvestrant tedavisi sonrası p38 aktivasyonu (5b). X600.

Fosfo-p38 kinaz



Resim 6 a,b: Kontrol gurubu (6a) ve progesteron ile inkübe edilen Ishikawa hücrelerinde (6b) p38 aktivasyonu. X600.

7. TARTIŞMA

Endometriyal değişiklikler, embriyo implantasyonu ve gelişiminin sürekliliği için implantasyon gerçekleşmeden önce ovaryumlardan salgılanan steroid hormonlarca denetlenen bir dizi karmaşık, hücresele ve moleküler olaya bağlıdır (14). Bu ovaryan steroid hormonların koordineli ve sıralı üretimi endometriyumun düzgün ve döngüsel gelişimi için gereklidir, aksi takdirde düzensiz üretim embriyo implantasyon problemleri ve endometriyum kaynaklı hastalıkların oluşma riskini artırmaktadır (3). Steroid hormonların etkisini değerlendirdiğimiz çalışmamızda hücre siklusunun S fazına özgü bir işaretleyici olan BrdU yöntemi kullanarak 24 saat östrojenle inkübe edilen Ishikawa hücrelerinde östrojenin proliferatif etkisinin olduğu görüldü. Östrojenin proliferatif etkisine bakılan *in vivo* bir çalışmada da immatür farelerde ve overektomi yapılmış maymunlarda östradiolün uterotropik etkisinin kaybolduğu bildirilmiştir (53). Bu durum, proliferatif etkinin ovaryan kaynaklı steroid hormonların etkisi altında gerçekleştiği sonucunu desteklemektedir. Yaptığımız deneylerde bir östrojen reseptör antagonisti olan fulvestrant ise beklenenin aksine östrojenin proliferatif etkisini antagonize etmemiştir. Progesteronun da uygulanan konsantrasyon ve sürede Ishikawa hücrelerinde proliferasyon ya da diferansiyasyon üzerine etki etmediği görülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca steroid hormonların etkisi altındaki Ishikawa hücre soyunda MAPK sinyal ileti yolunun strese bağlı olarak aktive olan üyelerinin ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. p38 ve JNK çevresel strese karşı cevap oluştururken, ERK bu iki üyeden farklı olarak mitojenik uyarımla aktive olmaktadır. p38 ve JNK hücre döngüsünün ilerleyişi, diferansiyasyon, apoptozis ve inflamatuvar cevap gibi fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (11). Yaptığımız çalışmada kısa süreli östrojen ile inkübasyon sonrasında östrojenik etkiye bağlı olarak, Ishikawa hücrelerinde p38 ekspresyon düzeyinde bir farklılık olmadığı görülmüştür. Ancak Razandi ve arkadaşları tarafından 10 dakikalık östrojen inkübasyonuna tabi tutulan sığır aortik endometriyal epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada östrojenik etkinin, p38- α ekspresyonunu inhibe ederken p38- β ekspresyonunu stimüle ettiği bildirilmektedir (54). İnsan endometriyum epitel hücre serisi olan RL95-2 ile birlikte BeWo trofoblast hücreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada progesteron ve nitrik oksitin p38 yolu ile endometriyal epitel hücrelerinde apoptozisi indükleyebileceği rapor edilmiştir. Ayrıca endometriyum-trofoblast ko-

kültüründe, endometriyal epitel hücrelerinde implantasyon oluşumu ve apoptozis sırasında, trofoblast hücrelerinin p38'i aktive ettiği görülmüştür. Bizim çalışmamız da ise progesteron etkisi altında Ishikawa hücrelerinde p38 ekspresyonunda artış gözlenmemiştir (55). İn-vivo ve in-vitro olmak üzere iki farklı deney grubunda yapılan çalışmada ise in-vivo olarak östrojen etkisi altındaki endometriyum stromasında p38 ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Aynı çalışmanın devamı olarak total p38/fosforile p38 oranına bakıldığında endometriyum epitel hücrelerinde (Ishikawa hücre soyunda) stromal hücrelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca fonksiyonel tabakada fosforile p38/total p38 oranı bazal tabakayla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Endometriyal siklus fazları arasında ise bu oranda bir fark gözlenmemiştir. Östrojen antagonisti olan ICI 182-780 (fulvestrant) ise östrojenin indüklediği p38 ekspresyonunu hem stromada hemde epitel hücrelerde tersine çevirmiştir (56). Çalışmamızda ise uygulanan süre ve konsantrasyonlarda fulvestrant+östrojen kombine tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

MAPK ailesinden stresle aktive olan JNK sinyal ileti yolunun yaptığımız çalışmada östrojen ve progesterona bağlı olarak ekspresyon düzeylerinde değişiklik olmadığı görülmüştür. Veritabanlarına kayıtlı literatürlerde endometriyumdaki JNK ekspresyon düzeyleriyle ilgili bilgi rapor edilmemiştir. Hücrede uyarana karşı ilk yanıt veren protoonkogenlerden olan c-jun ise transkripsiyon düzenleyici faktörleri kodlamaktadır (57). İnsan endometriyumu glandular hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada c-jun'un, östrojenin indüklediği büyüme ve diferansiyasyonda önemli bir düzenleyici olduğu görülmüştür. Bu çalışmada immünohistokimyasal analizlere dayalı sonuçlarda östrojenle inkübe edilmiş insan normal glandular endometriyum hücrelerinde c-jun ekspresyonu sadece menstrual siklusun proliferatif fazında görülürken, yine bir uyarana karşı ilk yanıt veren gen ailesi üyesi olan ve hücrede büyüme, proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozis ile ilgili bir gen olan c-fos gen ekspresyonu endometriyal glandular hücrelerde hem proliferatif hemde sekretuar faz da görülmüştür (58). Deneylerimiz sonucunda Ishikawa hücrelerinde kontrol grubu ve östrojen ile inkübe edilen hücre grubu arasında c-jun aktivasyonunda anlamlı bir fark olmamıştır. Buna bağlı olarak c-jun aktivasyonunun östrojenik etkiye bağlı olmadığı görülmüştür. Sonuçlarımızın aksine immatür sıçan uterus luminal epitelinde östrojenin c-jun mRNA seviyesini düzenlediği görülmüştür. Progesteron ise c-jun aktivasyonunu ve östrojenin indüklediği hücresel proliferasyonu bloke

etmiştir (59). Deney grubumuzda, progesteron ile inkübe ettiğimiz Ishikawa hücrelerinde ise progesteronun fosfo c-jun ekspresyonuna etki etmediği görülmüştür. Fulvestrant+östrojen kombine tedavisinin ise c-jun aktivasyonuna pozitif ya da negatif hiç bir etkisi olmamıştır.

İnsan normal endometriyal dokusunda yapılan deneylerde ise c-jun aktivasyonunun menstrual siklus fazları arasında östrojenik etkiye bağlı olarak arttığı görülmüştür. Çalışmada proliferatif faz da ki ekspresyon miktarı sekretuar faza göre yüksek bulunmuştur (60). Salmi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise insan endometriyum epitelinde c-jun aktivasyonu ve endometriyal proliferasyon ilişkisinin olduğu gösterilmiş, c-jun'nun östrojenin indüklediği epitel proliferasyonunda önemli bir düzenleyici olduğu rapor edilmiştir. Proliferasyonla birlikte endometriyum epitel hücrelerinde görülen c-jun mRNA ekspresyonu ise stromal hücrelerde aynı kalmıştır. Glandular hücrelerde c-jun mRNA ekspresyonu luminal hücrelere göre daha düşük görülmüştür (61). Udou ve arkadaşları da insan endometriyum üzerinde yaptıkları çalışmada c-jun ekspresyonundaki siklik değişikliklerin glandular hücrelerde apoptoz ve proliferasyon da önemli rol oynadığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca endometriyum epitel hücrelerindeki c-jun ekspresyon miktarının proliferatif fazda geç sekretuar faza göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (57).

8. SONUÇ

- Endometriyumun, embriyo implantasyonu için hazırlanmasında steroid hormonlar önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda insan endometriyumuna benzer olarak östrojen ve progesteron reseptörü içeren iyi diferansiye insan endometriyal adenokarsinoma hücre dizisi olan Ishikawa hücre soyu üzerinde östrojen ve progesteronun etkisi incelenmiştir.
- Deney sonuçlarımıza göre progesteron, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. 17- β östradiol ise BrdU işaretli S faz hücre oranında anlamlı bir proliferasyon artışına yol açmıştır.
- Fulvestrantın, östrojen reseptör antagonisti olarak Ishikawa hücrelerinde östrojenin tetiklediği proliferasyonu inhibe etmediği gözlenmiştir.
- MAPK ileti yolu üyelerinden olan p38 ve JNK hücrel strese karşı cevap oluşturur. c-jun uyarana ilk yanıt veren gen ailesinden bir protoonkogendir. Çalışmamızda östrojen ve progesteron ile inkübe edilen Ishikawa hücrelerinde kontrol gruplarına göre JNK, fosfo p38 ve fosfo c-jun ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- Östrojen+fulvestrant inkübasyonunun ise Ishikawa hücrelerinde p38 ve c-jun aktivasyonunda değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansım süresince, eğitimimin tüm aşamalarında ve tez çalışmamın yürütülmesinde, bilgisini ve desteğini hiç eksik etmeyen, özveri ve hoşgörüsünü her zaman hissettiğim, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e, tez konumun seçilmesinde yol gösterici olan ve çalışmam için gerekli ortamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Nedret ALTIÖK'a, Ishikawa hücre soyunu hediye eden Sayın Doç. Dr. Ümit A. KAYIŞLI'ya teşekkür ederim.

Deney aşamasında her zaman yanımda olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım laboratuvar sorumlularımız Melike ERSÖZ'e ve Türkan SARIOĞLU'na, Yüksek Lisansımın en büyük kazanımlarından biri olan, her zaman yanımda olup desteğini hiç esirgemeyen arkadaşım İlknur KARAOSMANOĞLU'na, çalışma arkadaşım Canan ASLAN'a ve Yüksek Lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

En büyük desteğim olan sevgili ailem ve arkadaşlarım Ercan DÖVER, Tuğba ÇOLAK, Emine ÖZTÜRK'e yaşamımın tüm evrelerinde bana gösterdikleri anlayış ve sabır için teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Abraham L. Kierszenbaum, MD, PhD, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
2. Demure R, Suziki T, Tajima S. Human plasma free activin and inhibin levels during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 76:1080-1082.
3. Punyadeera C, Verbost P, Groothuis P. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003, 84:393-410.
4. Wang H, Critchley HO, Kelly RW, Shen D, Baird DT. Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4:407-412.
5. Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L. & Ben-Jonathan N. Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol.* 2005, 15;239:27-36.
6. Ulukaya E. Bölüm III, Akciğer Kanserleri: Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Ed: Engin K. ve Özyardımcı N. İstanbul, Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti., 2001.
7. Yu CC, Woods AL, Levison DA. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem J.* 1992, 24 (3):121-131.
8. Ray LB, Sturgill TW. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *PNAS.* 1987, 84:1502-1506.
9. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood.* 2003, 101:4667-79.
10. Kolch W. Meaningful relationships: The regulations of the Ras/ Raf/ MEK/ ERK pathway by the protein interactions. *Biochem J.* 2000, 351:289-305.
11. Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 2000, 25:257-260.
12. Ozaki T, Takahashi K, Kanasaki H, Miyazaki K. Expression and activation of mitogen activated protein kinase in the human endometrium during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195:1343-1350.

13. Uchida E, Maruyama T, Nagashima T, Asada H, Yashimura Y. Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodeilin. *Endocrinology*. 2005, 146:5365-5373.
14. Nas E, Erdoğan D, Take G, Taş M. Yaşın ilerlemesiyle endometriyumda meydana gelen değişiklikler. *Gazi Tıp Dergisi*. 2006, 17:88-94.
15. Campling G. Uterine Physiology. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2008, 9:122-123.
16. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PGA. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online*. 2004, 9:692-715.
17. Kartal A, Saygılı H, Özgüven Ö, Akhan SE, Baysoy A, Jamal H, Turfanda A. Endometriyal hiperplazi saptanan ve saptanmayan, normal premenepozal kadınlar arasında endometriyal histopatoloji, endometriyal kalınlık, telomeraz aktivitesi ve VKİ ilişkisi. *İstanbul Tıp Dergisi*. 2004, 3:1-7.
18. Punyadeera C, Dassen H, Klomp J, Dunselman G, Kamps R, Dijcks F, Ederveen A, Goeij A, Groothuis P. Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cell Mol Life Sci*. 2005, 62:239-250.
19. Gambino LS, Wreford NG, Bertram JF, Dockery P, Lederman F, Rogers PA. Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum Reprod*. 2002, 17:1199-1206.
20. Print C, Valtola R, Evans A, Lessan K, Malik S, Smith S. Soluble factors from human endometrium promote angiogenesis and regulate the endothelial cell transcriptome. *Hum Reprod*. 2004, 19:2356-2366.
21. Hastings JM, Licence DR, Burton GJ, Charnock-Jones DS, Smith SK. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17 beta-estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology*. 2003, 144:326-334.
22. Hirota Y, Osuga Y, Hirata T, Koga K, Yoshino O, Harada M, Morimoto C, Nose E, Yano T, Tsutsumi O. Evidence for the presence of protease-activated receptor 2 and its possible implication in remodeling of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, 90:1662-1669.

23. Ejksjaer K, Sorensen BS, Poulsen SS, Mogensen O, Forman A, Nexø E. Expression of the epidermal growth factor system in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 2005, 11:543–551.
24. Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 76:1115–1122.
25. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Hum Reprod.* 2000, 15:48–56.
26. Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, Astle S, Thornton S, Peltoketo H, Lam EW, Gellersen B, Huhtaniemi I, Allen J. Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J Endocrinol.* 2005, 187:89–101.
27. Irwin JC, Kirk D, King RJB, Quigley MM, Gwatkin RBL. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril.* 1989, 52:761–768.
28. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren B.M. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril.* 2001, 76:782–791.
29. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5- bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982, 218:474-475.
30. Hume WJ. A reproducible technique combining tritiated thymidine autoradiography with immunodetection of bromodeoxyuridine for double labeling studies of cell proliferation in paraffin sections of tissues. *Cell Tissue Kinet.* 1990, 23:161-168.
31. Robertson H, Wheeler J, Morley A. R. *In vivo* bromodeoxyuridine incorporation in normal mouse kidney: immunohistochemical detection and measurement of labeling indices. *Histochem J.* 1990, 22:209-214.
32. Dover R, Patel K. Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry.* 1994, 102:383-387.
33. Giguere V, Tremblay A, Tremblay GB. Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and anti estrogen signaling. *Steroids.* 1998, 63:335-339.

34. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α and estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER- α knockout mouse. *Endocrinology*. 1997, 138:4613-4621.
35. Hall G, Phillips TJS. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol*. 2005, 53:555-68.
36. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. 2002, 108:465-474.
37. <http://www1.astrazeneca-us.com/pi/faslodex.pdf>
38. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, Depinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991, 65:663-675.
39. Seternes OM, Bjarne J, Hegge B, Johannessen M, Keyse SM, Moens U. Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress. *Mol Cell Biol*. 2002, 22:6931-6945.
40. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher T.F, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994, 372:739-746.
41. Martin-Blanco E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *BioEssays*. 2000, 22:637-645.
42. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000, 103:239-252.
43. Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR, Karin M. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol*. 1999, 19:751-763.
44. Pirkevi C, Başak AN. Friedreich ataksi'sinin moleküler temeli: Türk hastalarda DNA analizi ve tanı. *Türk Nöroloji Dergisi*. 2005, 6:547-565.
45. Chinery R, Brockman JR, Peller MO, Shry Y, Beauchamp RD, Coffey RJ. Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer—a p53 independent induction p21 WAF1/ CIP1 via C/EBP α . *Nat Med*. 1997, 3: 233-241.

46. Roche E, Buteau J, Aniento I, Reig J. A, Soria B, Prentki M. Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes*. 1999, 48:2007-2014.
47. May GH, Allen KE, Clark W, Funk M, Gillespie DA. Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal Kinase in Vivo. *J Biol Chem*. 1998, 273:33429-33435.
48. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AD. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994, 78:1027-1037.
49. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Oncol*. 2003, 22: 469-480.
50. Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D. The Ras-Raf- MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*. 2002, 25:511-518.
51. Weinstein-Oppenheimer CR, Blalock WL, Steelman LS, Chang F, Mc Cubrey JA. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. *Pharmacol Ther*. 2000, 88:229-279.
52. Altioek N, Koyuturk M, Altioek S. JNK pathway regulates estradiol-induced apoptosis in hormone-dependent human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2007,105:247-254.
53. Loutradis D, Beretsos P, Arabatzi E, Anagnostou E, Drakakis P. The role of steroid hormones in ART. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008, 112:1-4.
54. Razandi M, Pedram A, Levin ER. Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem*. 2000, 275:38540-38546.
55. Hsu WL, Chen YH, Chao KC, Chang SP, Tsui KH, Li HY, Sung YJ. Anti-Fas activating antibody enhances trophoblast outgrowth on endometrial epithelial cells by induction of P38 MAPK/JNK-mediated apoptosis. *Placenta*. 2008, 29: 338-346.
56. Seval Y, Cakmak H, Kayisli UA, Arici A. Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006, 91:2349-57.

- 57.** Udou T, Hachisuga T, Tsujioka H, Kawarabayashi T. The role of c-jun protein in proliferation and apoptosis of the endometrium throughout the menstrual cycle. *Gynecol Obstet Invest.* 2004, 57:121-126.
- 58.** Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H. Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-jun to an AP-1 sequence. *Oncogene.* 2004, 23:8603-8610.
- 59.** Bigsby RM, Li A. Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endocrinology.* 1994, 134:1820-1826.
- 60.** Fujimoto J, Hori M, Ichigo S. Clinical implication of fos and jun expressions and protein kinase activity in endometrial cancers. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1995, 16: 138-146.
- 61.** Salmi A, Heikkila P, Lintula S, Rutanen EM. Cellular localization of c-jun messenger ribonucleic acid and protein and their relation to the proliferation marker Ki-67 in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83:1788-1796.