

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

**ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE**  
**LİTYUMUN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Biyolog Sibel EMEKLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2010**

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

**ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE**  
**LİTYUMUN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Biyolog Sibel EMEKLİ**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Vildan KARPUZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2010**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. ENDOMETRİYUM.....	4
4.1.1. Endometriyal Siklus ve Hormonal Kontrolü.....	4
4.2. İMPLANTASYON VE ENDOMETRİYUM.....	7
4.2.1. İmplantasyon Sırasında Endometriyum .....	7
4.2.2. İmplantasyonu Etkileyen Faktörler.....	8
4.3. HÜCRE SİKLUSU.....	9
4.3.1. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri.....	10
4.3.1.1. BrdU İnkorporasyonu.....	10
4.4. ISHIKAWA HÜCRE SOYU.....	10
4.5. HÜCREDE SİNYAL İLETİMİ .....	10
4.5.1. MAPK Sinyal İleti Yolu .....	11
4.5.1.1. JNK Sinyal İleti Yolu.....	12
4.6. LİTYUM .....	13
4.6.1. Lityum Kullanımı ve Etkileri .....	14
5. MATERYAL VE YÖNTEM .....	16
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	16
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	17
5.2.1. Hücre Kültürü.....	17
5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	17
5.2.2.1. Bromodeoksiüridin İmmünohistokimyası.....	17
5.2.3. JNK ve Fosfo c-jun İmmünohistokimyası.....	18
5.2.4. Mikroskopik İnceleme.....	18
5.2.5. İstatistiksel İnceleme.....	18

6. BULGULAR.....	19
6.1. LİTYUM KLORÜRÜN ISHIKAWA HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİ.....	19
6.1.1. Lityum Klorürün 17- $\beta$ -Östradiol ile Birlikte Kullanımının Ishikawa Hücrelerinde Proliferasyon Üzerine Etkisi.....	20
6.2. JNK EKSPRESYONU.....	23
6.3. FOSFO c-JUN EKSPRESYONU.....	24
7. TARTIŞMA.....	25
8. SONUÇ.....	29
9. TEŞEKKÜR.....	30
10. KAYNAKLAR.....	31

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>AEC</b>	: Aminoetilkarbazol kromojeni
<b>BrdU</b>	: 5-bromo2'-deoksi-üridin
<b>JNK</b>	: c-jun N-terminal kinaz
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>E1</b>	: Östron
<b>E2</b>	: Östradiol
<b>E3</b>	: Östriol
<b>ER</b>	: Östrojen reseptörü/Estrogen reseptor
<b>ERK</b>	: Hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz/Extracellular signal regulated kinase
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>FSH</b>	: Folikül stimulan hormon
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>GSK-3β</b>	: Glikojen sentez kinaz 3 beta
<b>HB-EGF</b>	: Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü
<b>HCG</b>	: İnsan koryonik gonadotropin hormonu
<b>IGF</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>LH</b>	: Luteinizan hormon
<b>LiCl</b>	: Lityum klorür
<b>LIF</b>	: Lösemi inhibitör faktör
<b>MAPK</b>	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz/ <b>Mitogen activated protein kinase</b>
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon solüsyonu
<b>SAPK</b>	: Stresle aktive olan protein kinaz/Stress-activated protein kinase.

**Araştırma Projesi No** : HE/0312008

## 1. ÖZET

Bu çalışmada in-vitro endometriyum epiteli hücre modelinde, lityum klorürün (LiCl), endometriyal siklusun östrojen hormonu kontrolünde gelişen proliferasyon evresindeki etkileri immünohistokimyasal olarak incelendi.

Çalışma, hiçbir uygulama yapılmayan, sadece LiCl ve sadece 17- $\beta$ -östradiol uygulanan, ayrıca LiCl ile 17- $\beta$ -östradiol'ün birlikte uygulandığı gruplardan oluşmaktaydı. Öncelikle LiCl'ün hücre proliferasyonu üzerine olan konsantrasyona bağlı etkileri incelendi. Ishikawa hücrelerinde proliferasyonun değerlendirilmesinde S fazına özgü bir işaretleyici olan bromodeoksiüridin (BrdU) immünohistokimyası uygulandı. Uygulanan dozda 17- $\beta$ -östradiolün hücre proliferasyonunu arttırdığı tespit edildi. Konsantrasyona bağlı olarak LiCl uygulamasının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlemlendi. Sadece LiCl ve LiCl ile 17- $\beta$ -östradiolün birlikte uygulandığı deney gruplarında 50, 75 ve 100 mM konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı proliferasyon inhibisyonu izlendi.

Proliferasyon inhibisyonu ile ilişkili sinyal yollarının açıklanabilmesi amacıyla çalışmaya maksimum inhibisyonun izlendiği 100 mM konsantrasyonda devam edildi. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesinin bir üyesi olan c-jun N-terminal kinaz (JNK) sinyal iletimindeki değişiklikler immünohistokimyasal olarak incelendi. JNK ve fosfo c-jun protein ekspresyon düzeylerinde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir değişiklik izlenmedi.

Yaptığımız çalışmalarda LiCl'ün, endometriyum hücre proliferasyonunda inhibisyona neden olduğu ve bu etkisini JNK ve fosfo c-jun ekspresyonlarından bağımsız olarak gerçekleştirdiği gösterildi. Bu bulgular doğrultusunda LiCl'ün, endometriyal kanserler ve uzun yıllar infertiliteye sebep olabilen endometriozis gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabilir potansiyeline sahip terapötik bir ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

## 2. SUMMARY

The effects of Lithium Chloride (LiCl) within an endometrium epithelial cell model at the proliferation stage that takes place under the control of estrogen hormone from the endometrial cycle have been investigated from an immunocytochemical perspective within this study.

The study has been conducted on groups that were not subject to any intervention, subject to LiCl only, subject to 17- $\beta$ -estradiol only; and subject to both LiCl and 17- $\beta$ -estradiol simultaneously. Initially, the effects of LiCl upon the cell proliferation process were examined. The immunocytochemistry of bromodeoxyuridine (BrdU), which is an indicator that is specific to the S phase during the evaluation of proliferation in Ishikawa cells, has been conducted. It was concluded that at the applied dosage, 17- $\beta$ -estradiol increased the amount of cell proliferation. It was observed that the application of LiCl inhibited the cell proliferation depending on the level of concentration. At experiment groups that were subject to LiCl only and that were subject to both LiCl and 17- $\beta$ -estradiol; the inhibition of proliferation at statistically meaningful levels have been observed at 50, 75 and 100 mM concentrations.

In order to explain the signal paths related to the inhibition of proliferation, the research proceeded at the 100 mM concentration where maximum level of inhibition has been observed. Changes at the signal messages of c-Jun N-terminal kinase (JNK), which is a member of the protein kinase family that activates with mitogens (MAPK), have been observed from an immunocytochemical perspective. A meaningful change at the JNK and phospho c-jun protein expression levels between the control groups and experiment groups has not been observed.

We have realized with our study that application of LiCl results in inhibition of endometrium cell proliferation and that this effect is independent of the JNK and phospho c-jun expressions. Under the light of these findings, it was concluded that LiCl could be evaluated as a therapeutic agent that has a potential of being used for the treatment of endometrial cancers and conditions such as endometriosis, which results in infertility over long periods.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Erişkin insan uterusunda mukozanın siklik yenilenmesi 17- $\beta$ -östradiol ve progesteron tarafından düzenlenir. Östradiol luminal ve glandular epitelde hücre proliferasyonunu teşvik eder. Progesteron ise, epitelyal hücre proliferasyonunu inhibe eder fakat stromal hücrelerde farklılaşmayı tetikler (1, 2). Östrojenin etkisiyle endometriyumun kalınlığı ve içerdiği su miktarı 2-3 kat artar. Sekretuar fazda korpus luteumdan salgılanan progesteron ve östrojenin ve kısmen de bağ dokusu içindeki sıvı artışının etkisiyle endometriyum implantasyon için hazır hale gelir (3). Son zamanlarda östrojen ve diğer üreme steroid hormonlarının gen transkripsiyon/ekspresyonunu kapsayan mekanizmalarla değil; ancak Src/Shc/ERK gibi sitoplazmik sinyal verici yolların aktivasyonu ile hücreleri etkiliyor olabileceği öne sürülmüştür (4). MAPK ailesinden stresle aktive olan protein kinaz (SAPK/JNK) sinyal ileti yolu, hücre proliferasyonunda dahil olduğu birçok hücrenel süreçte önemli rol almaktadır (5).

Lityum, ilk keşfedildiği 1817 yılından bu yana zamanla tıbbın hizmetine girmiştir. Lityum, bipolar bozukluğun hem akut fazında tedavi edici ve hem de sürdürüm tedavisi döneminde koruyucu olarak uzun süreli kullanımında FDA onayı almış ilk ilaçtır (6). Psikiyatrik bozukluklar dışında da; granülosit yapımını uyardığı için lökopenilerde, küme baş ağrılarında, kısa süreli tirotoksikozda, yüzeysel uygulama olarak da herpes simplex ve seboreik dermatit (7) gibi birçok alanda kullanılan lityumun etki mekanizması ve ilişkili sinyal ileti yolları yapılan birçok çalışmaya rağmen tam olarak açıklanamamıştır.

Terapötik etkisi bilinen LiCl'ün hücre proliferasyonu ve hücre inhibisyonuna yönelik bildirilmiş dual etkisinin olması nedeniyle üreme sistemi ve özellikle insan endometriyumundaki proliferasyon etkileri ve ilişkili sinyal ileti yollarının in-vitro endometriyum hücre modeli olarak çalıştığımız Ishikawa hücre soyunda değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. ENDOMETRİYUM

Uterus, armut şeklinde bir organ olup, gövde (korpus) ve silindirik bir yapı olan serviksten oluşur. Uterusun kubbe biçimli kısmına da fundus ismi verilir. Uterus duvarı üç katmandan oluşur. Uterusun farklı bölümlerine göre değişen seroza veya adventisya, bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinden oluşan miyometriyum ve epitel ile basit tübüler bezler içeren lamina propriyadan oluşan endometriyum. Uterus duvarının ana bileşenleri endometriyum denilen mukoza ile dōşeli miyometriyumdur.

Endometriyum epiteli tek katlı silyalı ve salgılayıcı silindirik epiteldir. Endometriyum tabakası iki bölüme ayrılır. Bazal tabaka, miyometriyuma komşu olan en alttaki bölümdür. Lamina propriya ve uterus bezlerinin başlangıç kısmını içerir, aylık dōngüler sırasında değişmeden kalır, menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturur ve düz arterler tarafından beslenir. Fonksiyonel tabaka ise, endometriyal stroma ve bezlerin geri kalanı ile yüzey epitelini içerir, aylık dōngüler sırasında büyük değişiklikler geçirerek menstruasyon sırasında dökülür ve kıvrımlı/spiral arterler tarafından beslenir (8, 9).

#### 4.1.1. Endometriyal Siklus ve Hormonal Kontrolü

Endometriyum, her siklus boyunca, olası bir fertilizasyon açısından, histolojik, morfolojik ve biyokimyasal açıdan değişik görünüm ve fonksiyon gösteren dinamik bir dokudur (10). Endometriyal siklus yaklaşık 28 gün sürer ve embriyo gelişimi ile endometriyumun implantasyona hazırlık evreleri senkronize bir şekilde gerçekleşir (11). Endometriyal siklus birbirini takip eden üç evreden oluşur. Proliferasyon evresi (östrojenik veya foliküler evre), sekretuar evre (luteal evre) ve menstrual evre (Şekil 1).

**1. Proliferasyon Evresi (östrojenik veya foliküler evre):** Her siklus başında endometriyum ince olup taşıdığı bezler düz ve dar lümenlidir. Bu esnada folikül stimulan hormon (FSH) seviyesindeki yükselme daha sonra içlerinden birisi dominans kazanacak

olan foliküllerin gelişmesini sağlar. Teka internaları geliştiğinde bu foliküller aktif olarak östrojen salgısına neden olur, bu da endometriyumun proliferasyonunu sağlar (12). Östrojenin uyarıcı etkisiyle hem epitelde hem de lamina propriyadaki hücrelerde mitoz görülür ve endometriyumun kalınlığı 3-5 kat artar. Spiral arterler uzar, tübüler bezlerin epitel hücreleri yukarıya doğru göç eder ve bezler kıvrımlı bir şekil alır bu evreye ‘proliferasyon evresi’ denir. Artan östrojen; FSH salgısını baskılar, ancak östrojen salgısı belli bir düzeye gelince lüteinizan hormon (LH) salgısını uyarır ve LH’in ani artışıyla ovulasyon meydana gelir (8, 12).

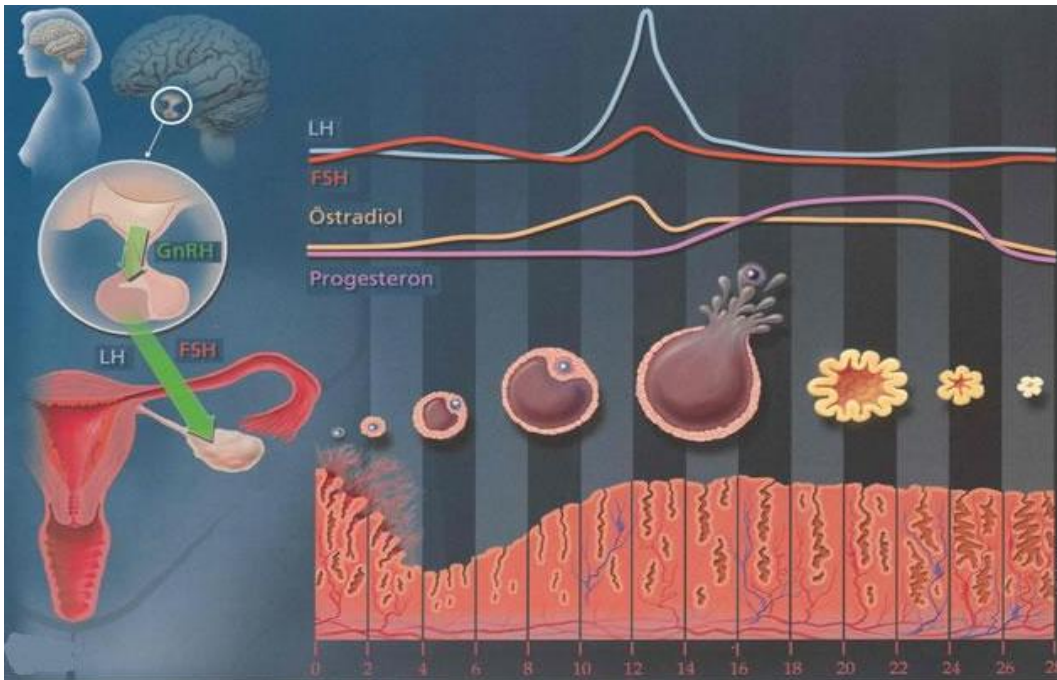
Proliferasyon evresine hakim olan östrojen; premenopozal dönemde overlerde ve postmenopozal kadınlarda periferik dokuda kolesterolden sentezlenen 18 karbonlu steroidlerdir. Çeşitli doku tiplerinde  $\alpha$  ve  $\beta$  adlı iki reseptörü klonlanmış ve saptanmıştır. Doğal östrojenlerin başlıcaları; östradiol (E2), östron (E1) ve östriol (E3)’dür. Bunlardan potent etkisi en fazla olan östradiol iken en az potent etkiye sahip olan östrioldür (4).

Over, premenopozal yıllarda östrojen üretiminin başlıca kaynağıdır. Granüloza hücreleri teka hücrelerinde kolesterolden köken alan androstenedionu aromataz enzimini kullanarak östradiole dönüştürür (4). Granüloza hücrelerinde teka kaynaklı ve LH bağımlı androjenlerden öncelikle östron ve takiben yine bu hücrelerde bulunan 17- $\beta$ -OH steroid-dehidrogenaz enzimi ile östradiol yapılır. Östradiol foliküler sıvının ağırlıklı östrojenidir (10). Östrojen ve progesteron uterus mukozasının siklik yenilenmesini beraber düzenlerler. Östrojen uterin epitelde hücre artışını indüklerken progesteron bu hücre artışını engeller ve farklılaşmayı tetikler. Uterin epitelde östrojen dominant sinyal iletiminden progesteron dominant sinyal iletimine moleküler geçişin regülasyonunda glikojen sentez kinaz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) merkezi rol oynar (1). Hücre çoğalmasını tetikleyen ardışık olaylar zinciri östrojen tarafından başlatılır. Östrojen stimülasyonu GSK-3 $\beta$ ’yi durdurucu bir fosforilasyona neden olur. Durdurulan GSK-3 $\beta$  siklin D1’i fosforile edemez ve nukleusta birikerek, hücre döngüsünün ilerlemesine neden olur (13). Çalışmalar göstermiştir ki hücre çoğalmasının stimülasyonu için östrojenin reseptörüne (ER $\alpha$ ) bağlanması zorunlu iken, bir kez iletim yolu başlayınca östrojen reseptöründen (ER) bağımsızdır (14). Bu gözlemler tutarlı olarak, östrojenin olmadığı durumda GSK-3 $\beta$ ’nin bir inhibitörle durdurulması östrojen varlığında gelişen proliferasyona benzer bir şekilde proliferasyonu sağlayabilmektedir (1).

Östrojenlerin, direk veya indirek olarak genlerin transkripsiyon/ekspresyonunu düzenleyen genotropik etkisi ve hücre sağ kalımını etkileyen sinyal verici yolları aktive eden ve/veya diğer büyüme faktörü sinyalleşmesini düzenleyen sitoplazmik etkisi olmak üzere iki farklı etki mekanizmasına sahip olabileceği bilinmektedir (4).

**2. Sekretuar Evre (luteal evre):** Ovulasyondan sonra korpus luteum tarafından üretilen progesteronun etkisiyle sekretuar evre başlar (15). Bu fazın önemli özelliklerinden biri üretilen progesteron nedeniyle bezlerin son derece kıvrımlı bir hale gelmesidir. Endometriyum yüksek derecede vaskülarize olur, glikojen birikir. Luteal evrenin ilerlemesiyle depolanan glikojen vakuolleri hücrenin tabanından lümeneye hareket eder ve bezler salgılarını artırır. Bu fazda endometriyum, salguların birikmesi ve stromadaki ödem sonucu maksimum kalınlığa ulaşır. Bu evreye 'sekresyon evresi' denir (9, 12) ve fertilizasyon gerçekleşmez ise menstrual evre başlar.

**3. Menstrual Evre:** Fertilizasyon gerçekleşmez ise, korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak kandaki progesteron ve östrojenin ani kaybı, endometriyumda normal kanlanmanın azalmasını ve aralıklı iskemiye başlatır. Bunu izleyen hipoksi, endometriyumun fonksiyonel tabakasında nekroza neden olur. Nekroze doku 3-4 gün içerisinde menstruasyonla birlikte dökülür. Bu evreye 'menstrual evre' denir. Endometriyal siklus sonunda endometriyumun sadece bazal tabakası kalır ve yeni bir siklus başlar (15).



Şekil 1: Endometriyal siklus ve hormonal kontrolü (16).

Fertilizasyon gerçekleşir ise; sekretuar evreden sonra, zigot yarıklanmalarını takiben gelişen blastosistin endometriyuma implantasyon süreci başlar.

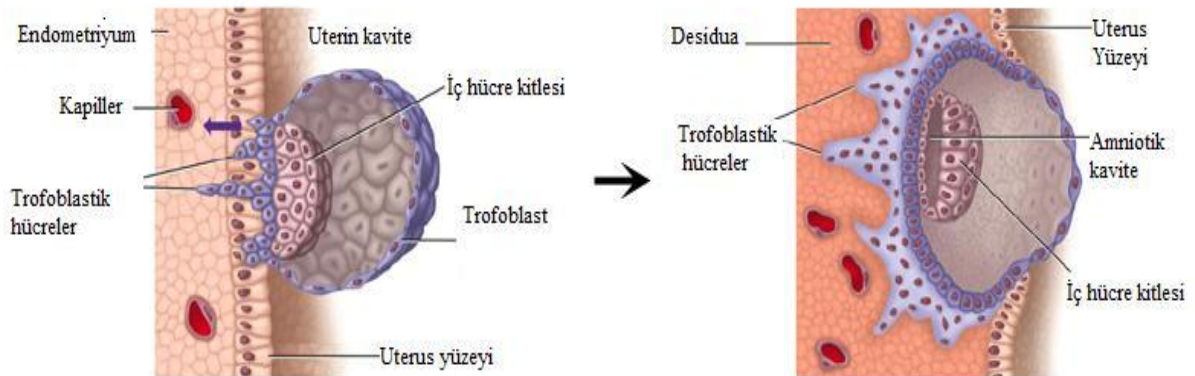
## 4.2. İMPLANTASYON VE ENDOMETRİYUM

### 4.2.1. İmplantasyon Sırasında Endometriyum

İnsanda implantasyon süreci, blastosistin endometriyal epitele yaklaşması (polarite veya apozisyon) (10, 17), zona pellusidadan ayrılan blastosistin endometriyal epitele tutunması, (adezyon, tutunma veya nidasyon) (8) ve blastosistin endometriyal stromal matrikse yayılarak gelişimini sürdürmesi (invazyon) basamaklarından oluşmaktadır (10, 17).

İmplantasyon, embriyonun invazyonu ve endometriyumun reseptivitesine bağlı olarak gelişir (18). Embriyonun implantasyonu için, endometriyumun kendi içindeki hazırlıklarını kapsayan döneme 'implantasyon penceresi' veya 'reseptivite penceresi' denmektedir (10).

İnsan blastosistleri intrusiv (zorla içeri giren) tip epitelyal penetrasyon sergilerler. Bu tip invazyon yüzey epitel hücreleri ile sinsityotrofoblastların uzantıları arasındaki penetrasyonu içerir. Bu durum, komşu epitel hücreleri arasındaki bağlantıların kaybına ve trofoblastlar ile epitel hücreleri arasında bağlantıların oluşmasına yol açar. Böylece, trofoblastlar kendilerini epitel hücreleri arasına sokmuş olur ve daha sonra yüzey epiteli altında yer alan bazal membrana doğru penetre olurlar (Şekil 2) (19).



Şekil 2: Blastosistin endometriyuma implantasyonu (20).

Endometriyum stromasına penetre olan blastosistin trofoblastı mitotik aktiviteye sahip tek çekirdekli hücrelerden oluşan sitotrofoblast hücre tabakasına ve endometriyum tarafında, embriyonik kutupta çok çekirdekli hücrelerden oluşmuş sinsiyotrofoblast hücre tabakasına farklanır (15, 8). Sitotrofoblastlar, gelişim sürecinde mitoz geçirerek hücre zarlarının kaynaşması ve hücre zarlarının kaybolması sonucunda sinsiyotrofoblastlara dönüşürler. Sinsiyotrofoblastlar ise, maternal lakünalar içinde insan koryonik gonadotropini (hCG) salgılamaya başlarlar. Korpus luteum tarafından östrojen ve progesteron salgılanması bundan sonra hCG'nin kontrolü altında gerçekleşir (3).

hCG ve üretilen LH sadece gebeliği teyit eden bir hormon olmayıp, bir sitokin veya büyüme hormonu gibi de etki göstermektedir. hCG intervillöz aralıkta triptofan katabolizmasını uyararak immünosupresyon yaratmaktadır. Gamet gelişimini uyarmakta, zigotun uterin kaviteye ulaşımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca salgılanan hCG implantasyonda önemli rol üstlenmekte olup, intervillöz aralığa olan kan akımını artırmaktadır (10).

#### **4.2.2. İmplantasyonu Etkileyen Faktörler**

Trofoblast aracılığıyla tutunma, uterus reseptivitesi ve implantasyonu etkileyen birçok faktör vardır.

Trofoblastların invazyonu; direkt ya da indirekt olarak hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından otokrin ve/veya parakrin yolla düzenlenmektedir. Örneğin bir sitokin olan lösemi inhibe edici faktörün (LIF) implantasyon için şart olduğu ve insan endometriyumunda orta ve geç luteal fazda LIF ve LIF mRNA'nın kuvvetli bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu faktörün tuba uterina epiteli tarafından salgılanması ise oldukça ilginçtir ve reseptivite için gerekli yapılanmada tuba uterina- endometriyum ilişkisini işaret eder (18, 21).

Çözünabilir heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) in-vitro ortamda, insan embriyolarının blastosist aşamasına ulaşma ve yerleşme yüzdesini arttırmaktadır (19).

Endositoz ve pinositoz mekanizmasında görevli pinopod oluşumları, endometriyal reseptivite döneminde belirgin bir görünüm kazanırlar. Blastosist yüzeyi ile yakın temas ve nidasyonu kolaylaştırıcı düzlemlerin oluşmasını sağlarlar (10).

Endometriyumun stromal hücreleri, hormonal uyarılara cevap vererek, prostaglandinleri sentezlerler; desidual hücelere dönüştükleri zamanda implantasyon sürecinde önemli rol onayan insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan protein, relaksin, renin gibi bir çok madde salgırlarlar (22).

Vasküler endometriyal büyüme faktörü, müsinler, prostoglandin sentezinde hızlandırıcı olan siklooksijenaz-2 enzimi, hox geni, kalsitonin, integrinler herbiri implantasyonda ayrı ayrı önemi olan faktörlerdir (10).

İmplantasyonu takiben, plasentasyon olarak da isimlendirilen evrede, plasenta oluşumu ile implantasyon olayı tamamlanır ve gebelik döneminin sonuna kadar embriyoyu destekleyecek olan yapı kurulmuş olur (19).

### 4.3. HÜCRE SIKLUSU (DÖNGÜSÜ)

İki yavru hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık HÜCRE SIKLUSU olarak tanımlanır.

Hücre siklusu interfaz (G0, G1, S, G2 fazları) ve mitoz olmak üzere iki aşamaya ayrılır.

**G0 fazı (istirahat fazı):** Hücre bölünme sinyali almadığı sürece G0 fazında bekleme halindedir.

**G1 fazı (ara faz, interfaz):** Spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir.

**S fazı (DNA sentezi fazı):** DNA replikasyonu ile DNA miktarı iki katına çıkar.

**G2 fazı:** DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik 'spindle' ların mikrotübüler prekürsörleri üretilerek hücre mitozu hazırlanır.

**M fazı (mitoz):** Profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmaktadır. Kopyalanmış kromozomlar ayrılarak paketlenir, sitoplazmik bölünme tamamlanarak aynı genetik materyale sahip iki yeni hücre meydana gelir. Mitozu takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler (23, 24, 25).

Hücre siklusu siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından kontrol edilir. Siklinler hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir, kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktifleştirirler ve etkilerini düzenlerler (23).

Hücre siklusu sıkı bir denetim altındadır. Hücre siklusunun G1-S geçişinde, G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde var olan kontrol noktaları kopyalama sırasında hasar oluşması, kromozomların tam olarak ayrışmaması, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi sırasında oluşabilecek hasarları kontrol ederek siklusun düzenli bir şekilde devam etmesini sağlar. Bu kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilir, varsa genetik defektler düzeltilir (26).

#### **4.3.1. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri**

##### **4.3.1.1. BrdU İnkorporasyonu**

BrdU (5-bromo2'-deoksi-üridin) inkorporasyonu, DNA kopyalanmasının ölçümü anlamına gelir. Proliferasyon hücrelerinde DNA kopyalanmasında BrdU inkorporasyonu proliferasyon miktarının tayininde kullanılır. BrdU bir timidin analogudur ve hücre siklusunun S fazındaki hücreler tarafından kullanılır. Anti-BrdU antikolarıyla işaretlenerek flow sitometri ve immünohistokimya gibi yöntemlerle sayısal olarak hesaplanabilir (27, 28).

#### **4.4. ISHIKAWA HÜCRE SOYU**

Ishikawa hücre soyu, 20 yılı aşkın süredir iyi diferansiye insan endometriyal adenokarsinoma hücre soyu olarak tanımlanmıştır. Çünkü bu hücre soyu östrojen ve progesteron reseptörleri taşımaktadır ve bu nedenle başta üreme biyolojisi olmak üzere özellikle endometriyumda implantasyon biyolojisi çalışmalarında ve bir çok araştırma alanında kullanılmaktadır (29).

#### **4.5. HÜCREDE SİNYAL İLETİMİ**

İnsan vücudundaki hücreler diğer hücrelerden ve çevreden gelen çok sayıda sinyali tanıyabilir ve sinyallere uygun cevapları verir. Hücrede sinyal iletimi olarak adlandırılan bu

mekanizma hücreler arası iletişime izin verir ve çok hücreli organizmaların işlevlerinin uyumu için gereklidir.

Sinyal molekülleri, bir hücreden salgılanabilir veya hücrenin yüzeyinde bulunabilir. Sinyal molekülleri aynı hücre yüzeyindeki veya başka hücrelerin yüzeyindeki reseptörlerine bağlanabilir. Bazı sinyal molekülleri, hücre yüzeyi reseptörüne bağlandıktan sonra hücre yüzeyinde görev alabilir, bazıları plazma membranını geçerek sitozolde ve nukleustaki reseptörlere bağlanır. Reseptörler hücre dışından hücre içine bilgi transferini sağlayan kanallardır.

Bir sinyal molekülü reseptörüne bağlandığında hücre çoğalması, farklılaşması, hareketi metabolizması ve davranışı gibi yaşamsal görevlerin düzenlenmesinde rol alan hücre içi bir takım tepkimeleri başlatır (8, 30).

Hücre içi sinyal iletiminin ana yolları; cAMP ve cGMP yolları, Fosfolipaz C-Ca<sup>2+</sup> yolu, NF-κB transkripsiyon yolu, Ca<sup>2+</sup> kalmodulin yolu, MAPK yolu ve JAK-STAT yoludur (8).

#### **4.5.1. MAPK Sinyal İleti Yolu**

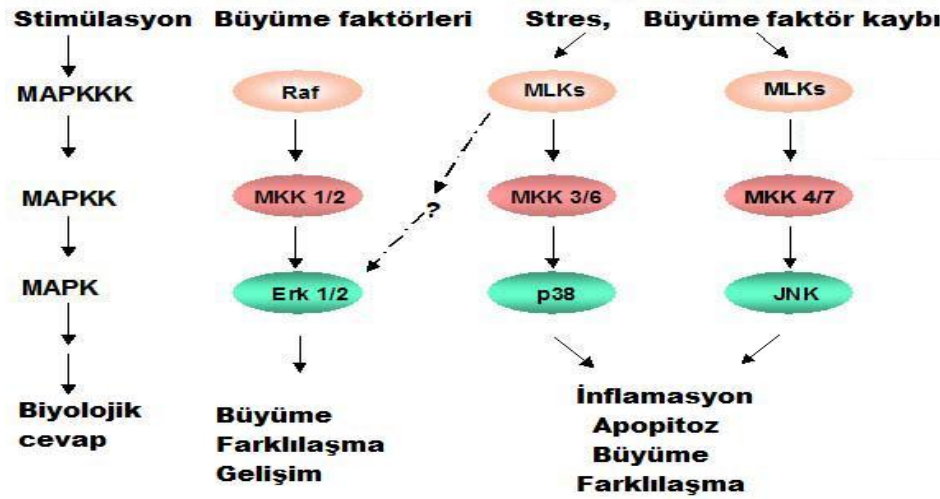
MAPK sinyal ileti yolları, maya, hayvan ve bitkiler dahil tüm ökaryotik organizmalarda hücre membranından nukleusa bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu sinyal ileti kaskadları, embriyogenezis, proliferasyon, oosit maturasyonu, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAPK'lar büyük bir serin:treonin:kinaz ailesi tarafından kodlanır. MAPK sinyal yolu enzimleri (MAPK, MAPKK, MAPKKK) hücre dışından gelen farklı uyarıcılarla düzenlenir ve hücre içinde ilgili metabolik yollara sinyalleri ileterek hücrel cevabın oluşmasına neden olurlar (31, 32, 33).

MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi hem sinyalin amplifikasyonu hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer



protein kinazlar) ve/veya nukleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (34).

MAPK'lerin alt grupları olan hücre dışı sinyalin aktiflediği kinaz (ERK) bölünme, yaşama ve farklılaşmada, JNK ve p38 ise inflamasyon ve hücresel streste aktif rol oynamaktadır (Şekil 3) (35).



Şekil 3: MAPK sinyal ileti yolu (36).

#### 4.5.1.1. JNK Sinyal İleti Yolu

JNK, MAP kinaz süperaillesinin stres ile aktive olan protein kinazı (SAPK) olarak bilinir. Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre dönüşümü, hücre göçü, apoptoz ve hücre iskeletinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. JNK ve p38 sinyal yolları, radyasyon, UV ışınları, toksinler, ısı, pH ve osmolarite değişimi gibi hücrede stres oluşturan etkenler tarafından aktive edilir (37).

JNK ve p38 MAP kinaz aktivasyonu sitokinler ve mor ötesi ışın tarafından Ras'dan farklı olan küçük GTP- bağlanma proteinlerinin aracılığıyla uyarılırlar. Bu kinazlar MEK tarafından aktive edilmezler fakat MKK (MAP kinaz kinaz) olarak adlandırılan farklı bir ikili kinaz tarafından aktive edilir (8). JNK aktivasyonu, spesifik MAPKK'lar SEK1 (MKK4) ve MKK7 (SEK2) tarafından, treonin ve tirozin fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir. Çünkü JNK Thr-Pro-Tyr şeklinde ikili fosforilasyon motifi içerir ve JNK aktivasyonu için tirozin ve treoninin her ikisinin de fosforilasyonu gerekmektedir. İn-vitro

ortamda yapılan son çalışmalar tirozinin SEK1 tarafından, treoninin ise MKK7 tarafından fosforile edildiğini göstermektedir (37, 5).

JNK protein kinazları jnk1, jnk2 ve jnk3 genleri tarafından kodlanır. Bu genler alternatif bağlanmalarla JNK izoformlarını oluştururlar (38). JNK, transkripsiyon faktörü AP-1 ailesi üyelerinin tamamında üç çeşit JUN'un (jun D, c-jun, jun B) amino terminal kısmını fosforile eder. Transkripsiyon faktörlerinden AP-1 ailesi JNK sinyal yolunun tetikleyicisidir (39). Bir proto-onkogen olan c-jun ise, AP-1 transkripsiyon faktörlerinin en önemli parçasıdır ve memeli hücrelerinde strese yanıt ve proliferasyonun düzenlenmesinde majör önemdedir. c-jun'un düzenlenme yolu ve buna bağlı olarak AP-1'in aktivitesi JNK vasıtasıyla (ser63 ve ser73) c-jun'un N-terminal ucundan fosforilasyonu yoluyla gerçekleşmektedir (40, 41).

#### **4.6. LİTYUM**

Lityum; periyodik cetvelin alkali metaller (IA) grubunda bulunan atom numarası 3, atom ağırlığı 7 olan bir elementtir. Elementin ismi Yunanca taş anlamına gelen 'lithos' kelimesinden türetilmiş olup, bu isim elementin minerallerden keşfedilmesi sebebi ile verilmiştir (6).

İlk olarak 1800'lü yılların ortalarında gut hastalığının tedavisi için kullanılmaya başlanan lityum günümüzde genel toplumda yaygın görülen ve kronik seyirli bir hastalık olan duygudurum bozukluklarının akut dönem ve koruyucu sağaltımında kullanılmaktadır. Bipolar bozuklukta lityumun asıl kullanım alanı, manik atakların akut, sürdürüm ve profilaksi dönemleridir. Aynı zamanda lityumun en azından bipolar hastalarda antidepresan etkisinin de olduğu gösterilmiştir. Mikst ataklar ve ağır manide yetersiz kalsa da, bugün lityumun en iyi duygudurum düzenleyicisi olduğu kabul edilmektedir (42, 43).

Lityumun, beyin hasarlı hayvan modellerinde, inme, Alzheimer, Huntington, Parkinson hastalıklarında, amyotrofik lateral sklerozda (ALS), spinal kord hasarlarında yararlı olduğu rapor edilmiştir. Son klinik denemeler lityumun amyotrofik lateral sklerozun ilerleyişini durdurduğunu ileri sürmektedir (44).

#### 4.6.1. Lityum Kullanımı ve Etkileri

Bipolar bozuklukta lityum koruyucu özelliği olan bir ilaçtır. Lityumun koruyucu etkinliği %80 dolayındadır. Lityum tedavisinde, tedavi edici düzeyin dar bir aralıkta olması ve lityum toksisitesi ile ilgili kliniğin spesifik özellikte olmaması nedeniyle ilacın kandaki düzeyinin düzenli bir şekilde izlenmesi gerekmektedir. Uzun yıllar düzenli lityum kullanan hastaların, kan düzey ölçümleri ve yan etkilere yönelik incelemeleri yaptırması zorunludur. Ayrıca lityum sağaltımı başlanmadan önce de yan etkilere yönelik böbrek, tiroid, karaciğer, kan ve kalp incelemeleri yapılmalıdır (45, 7).

Yapılan bir çalışmada lityumun serumdaki etkili doz aralığının 0.6-1.0 mM olduğu ve >1.5 mM olduğunda toksik olabileceği, serum lityum seviyesinin 1.5-2.0 mM olduğunda böbrekte, karaciğerde, kalpte ve bezlerde geri dönüşümlü toksik etki oluşturabileceği, serum seviyesi >2 mM olduğunda ise, serebral disfonksiyon da dahil olmak üzere nörolojik semptomlarla ilişkilendirilebileceği ve uzamış lityum zehirlenmelerinin >2 mM olduğunda gerçekleştiği ve kalıcı beyin hasarlarına sebep olabileceği belirtilmiştir. Lityum düşük mutajen ve karsinojenik riske sahiptir (44).

Lityum gebelikte birinci trimestirde potansiyel teratojenik etkisi olan bir ilaçtır. Gebelerde kullanımı gerekiyorsa potansiyel etkileri ve yararları dikkatlice değerlendirilmelidir (7).

Yapılan bir ön çalışmada iki uçlu duygudurum bozukluğu tanısı olan 10 divalproeks ve 10 lityum kullanan kadın hastanın üreme işlevlerini incelemişlerdir. Lityum kullanan bir hastada polikistik over sendromu bildirilmiştir. Hiçbir hastada üreme hormonlarında normalden farklılık gözlenmemiştir. En sık kullanılan ve duygudurum düzenleyici olarak evrensel kabul gören lityumun üreme endokrinolojisi üzerine yan etkisi olmadığı bilinmektedir. Lityum kullananların bir kısmında kilo alımı, hipo ve hiperglisemik yanıtlar görülmüştür. Genel olarak lityumun karbonhidrat metabolizmasını etkilemediği kabul görmektedir (46).

Ancak epileptik kadın hastalarda üreme işlevi bozuklukları sık görülmektedir. Epileptik kadınlarda, anovulatuvar ovaryen sikluslar, menstrual siklus düzensizlikleri, hipotalamik ve/veya hipofizer hormonlarda bozukluk ve gonadal steroidlerde değişiklikler ve infertilite en sık bildirilen durumlardır. Epileptik kadın hastalarda gonadotropin

salgılatıcı hormona (GnRH) hipofizin yanıtı bozulmuştur, bunun sonucunda hipofizden anormal LH pulsatif salınımı ve prolaktin salınımında artış görülmüştür (47).

50 yıldır kullanılmasına rağmen lityumun etki mekanizması halen tam olarak açıklanamamıştır (7).

## 5. MATERİYAL VE YÖNTEM

### 5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) 17- $\beta$ -estradiol, Sigma
- 2) LiCl Fluka 62478
- 3) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 4) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Riedel-de Hæn 81890
- 5) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Riedel-de Hæn 8210A
- 6) HCl, Merck K23226314 632
- 7) DMEM, Sigma D5546
- 8) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 9) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 10) Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
- 11) Anti-JNK antikoru, Santa Cruz, Sc-474
- 12) Anti-fosfo c-jun antikoru, Santa Cruz, Sc-16311
- 13) Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
- 14) NaCl, Atabay AT091-950
- 15) Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
- 16) Aminoetilkarbazol (AEC)
- 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 B0127

## **5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER**

### **5.2.1. Hücre Kültürü**

İyi diferansiye insan endometriyal adenokarsinoma hücre soyu olan Ishikawa hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotikler (100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren Dulbecco's modified Eagle's/F12 (DMEM-F12) medyumunda, 37°C de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütüldü. Deneylerde, kontrol grubu hücreler normal medyumlar içerisinde tutuldu. Östrojenin etkilerini belirlemek amacıyla oluşturulan deney grubunda medyum içerisine, 17-β-östradiol (0,5 µM) eklendi. Lityumun doza bağlı etkilerinin incelendiği deney gruplarına ise, 20 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM konsantrasyonlarda LiCl uygulandı. Hücre proliferasyonunun değerlendirileceği deney gruplarında belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyon yapıldı.

### **5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi**

#### **5.2.2.1. Bromodeoksiüridin İmmünohistokimyası**

Proliferasyon indeksi tayini için mitotik siklusun S fazına özgü olan BrdU işaretleme yöntemi kullanıldı. Düzenlenen deney gruplarına ait lameller üzerine ekilen hücreler 1 mM BrdU içeren medyumda 37 °C de 60 dk. inkübe edildi. PBS yıkamalarını takiben metanolle fiksasyonu yapıldı. Hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C de 30 dakika denatüre edildi. Borat tampon ile (pH:8) nötralize edildikten sonra 20 dakika bloklama işlemi uygulandı.

Anti-BrdU primer antikoru (Mouse monoclonal-NeoMarkers) ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkamalar sonrasında sırasıyla biyotin işaretli sekonder antikor ve Hrp-Streptavidin (C) ile 20 dk. inkübe edildi (Histostain Plus Kit, Zymed).

Spesifik renk reaksiyonunu görüntülemek amacıyla aminoetilkarbazol kromojeni (AEC) uygulandı. Hematoksilen uygulanarak nükleus zıt boyaması yapıldı.

### **5.2.3. JNK ve Fosfo c-jun İmmünohistokimyası**

JNK ve fosfo c-jun düzeylerinin immünohistokimyasal incelemesi için lameller üzerine ekilen hücreler -20°C de metanol ile 5 dakika fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaları engellemek için serumla (Histostain Plus Kit, Zymed) 20 dakika bloklama işlemi yapıldıktan sonra anti-JNK ve anti-fosfo c-jun monoklonal primer antikorları ile 3 µl/ml dilüsyonda oda ısısında bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra biyotinle işaretli sekonder antikor 20 dakika uygulandı. PBS yıkamaları yapıldı ve streptavidin enzim konjugatıyla 20 dakika inkübe edildi. Yıkamalardan sonra AEC kromojeni uygulandı. Kromojen aşamasında invert mikroskopta yapılan incelemede spesifik renk reaksiyonu izlendikten sonra reaksiyon durduruldu ve su bazlı kapatma solüsyonlarıyla örnekler kapatıldı.

### **5.2.4. Mikroskopik İnceleme**

Çalışmada kültüre edilen hücrelerin inceleme ve değerlendirmeleri Olympus X 70 invert mikroskopta, boyamaların inceleme, değerlendirilme ve fotoğraflandırma işlemleri ise Olympus BX 50 ışık mikroskobunda gerçekleştirildi.

S fazında BrdU işaretli hücrelerin oranı üç kez tekrarlanan deneylerin sonuçlarına göre değerlendirilerek hesaplandı. Proliferasyon indeksi, mikroskop alanındaki pozitif işaretli hücrelerin/toplam hücre sayısına oranı alınarak bulundu.

### **5.2.5. İstatistiksel İnceleme**

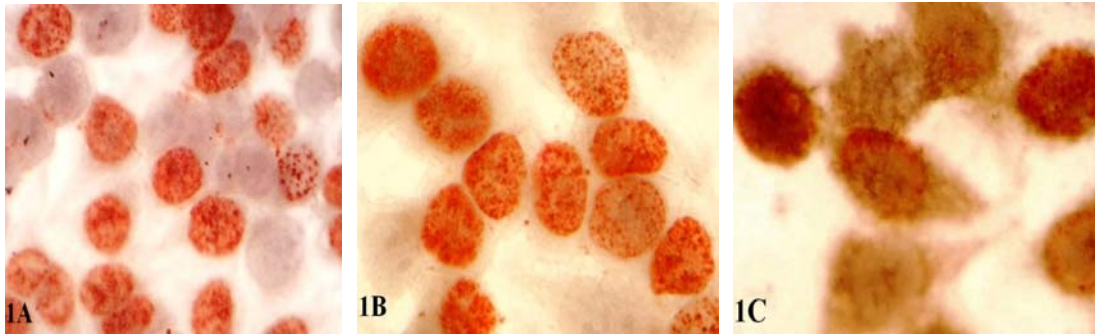
İstatistiksel inceleme, SPSS 10.0 (Sosyal Bilimler için İstatistik Programı) ile çoklu grup karşılaştırmaları için Kruskal Wallis, ikili grup karşılaştırmaları için Mann Whitney-U testleri uygulanarak değerlendirildi.  $p < 0.005$  değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. LİTYUM KLORÜRÜN İSHIKAWA HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİ

İnsan endometriyum modeli olan Ishikawa hücrelerinde farklı dozlarda uygulanan LiCl'ün proliferasyon üzerine etkileri değerlendirildi. Hücrelerde proliferasyon etkisi BrdU immünohistokimyası ile değerlendirildi.

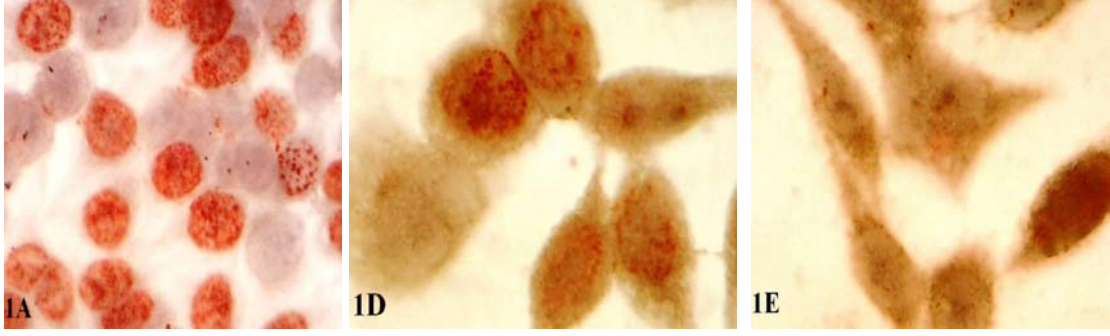
Kontrol grubu hücrelerde saptanan BrdU işaretli S faz hücreleri oranı ( $50,36 \pm 4,37$ ) (Resim 1A) ile 20 mM LiCl ve 50 mM LiCl uygulanan grupların hücre oranları (sırasıyla  $45,95 \pm 5,83$  ve  $42,00 \pm 8,11$ ) (Resim 1B, C) karşılaştırıldığında, BrdU işaretli S faz hücre oranlarında azalma gözlemlendi, fakat azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,005$ ).



**Resim 1A, B, C:** S faz Ishikawa hücreleri kontrol grubu (A), 20 mM LiCl uygulanan (B) ve 50 mM LiCl uygulanan (C) Ishikawa hücrelerinde inhibisyon etkisi. Hematoksilin-X600.

Kontrol grubu hücrelerde saptanan BrdU işaretli S faz hücreleri oranı ( $50,36 \pm 4,37$ ) (Resim 1A) ile 75 mM LiCl ve 100 mM LiCl uygulanan grupların hücre oranları (sırasıyla  $36,35 \pm 9,61$  ve  $17,43 \pm 6,89$ ) (Resim 1D, E) karşılaştırıldığında, hücre oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bulunan hücre inhibisyonu gözlemlendi ( $p < 0,005$ ).



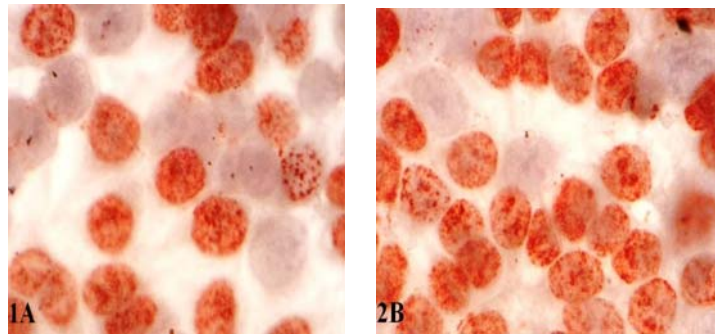


**Resim 1A, D, E:** S faz Ishikawa hücreleri kontrol grubu (A), 75 mM LiCl uygulanan (D) ve 100 mM LiCl uygulanan (E) Ishikawa hücrelerinde inhibisyon etkisi. Hematoksilen-X600.

#### **6.1.1. Lityum Klorürün 17- $\beta$ -Östradiol ile Birlikte Kullanımının Ishikawa Hücrelerinde Proliferasyon Üzerine Etkisi**

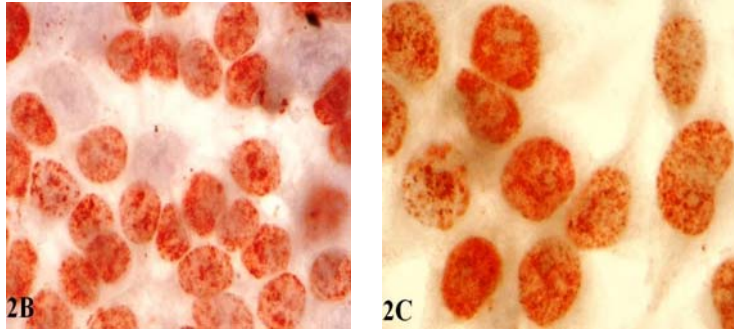
Ishikawa hücrelerinde doza bağlı uygulanan LiCl'ün 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte kullanımının proliferasyon üzerine etkileri incelendi.

Kontrol grubu hücrelerde saptanan S faz hücre oranı ile (50,36 $\pm$ 4,37) (Resim 1A), 24 saatlik 17- $\beta$ -östradiol (0,5  $\mu$ M) uygulandıktan sonraki hücre oranı (58,17 $\pm$ 6,40) karşılaştırıldığında bu oranın istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi (Resim 2B).



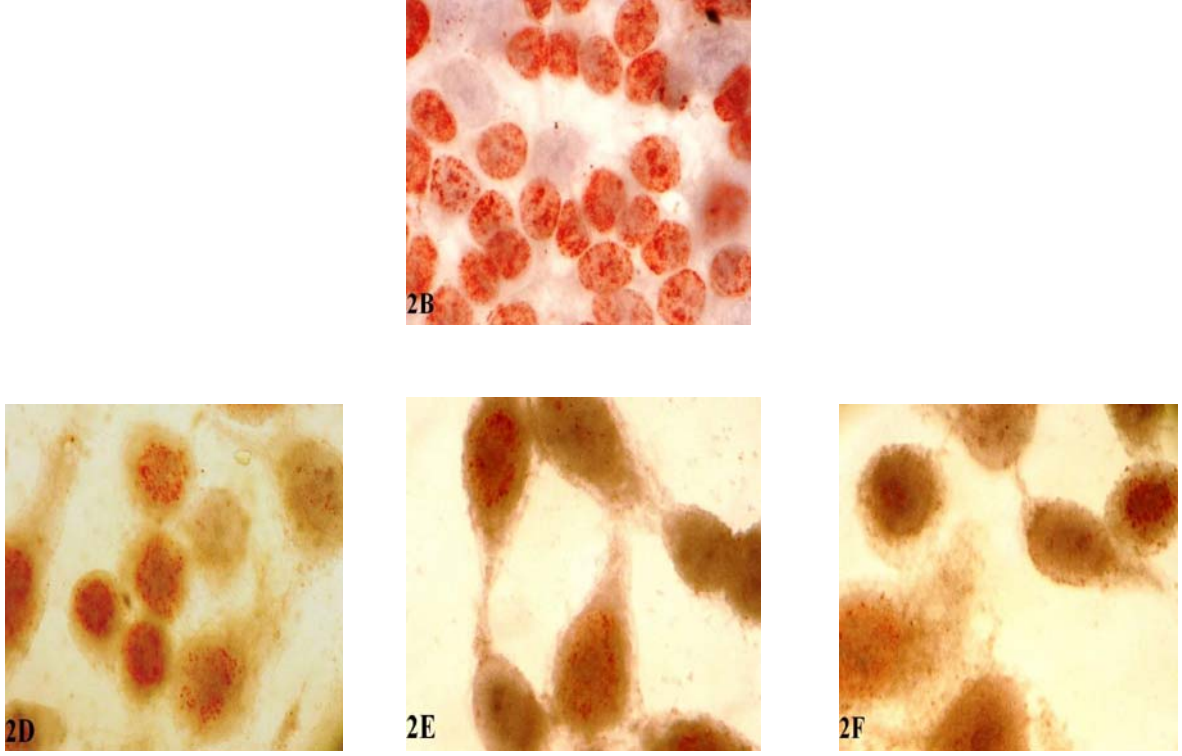
**Resim 1A, 2B:** S faz Ishikawa hücreleri kontrol grubu (A) ve 17- $\beta$ -östradiol uygulanan Ishikawa hücrelerinde artmış BrdU inkorporasyonu ve hücre proliferasyonu (B). Hematoksilen-X600.

17- $\beta$ -östradiol (0,5  $\mu$ M) inkübasyonu uygulanan grupta BrdU ile işaretli S faz hücre proliferasyon oranı (58,17 $\pm$ 6,40) (Resim 2B), 17- $\beta$ -östradiol ile 20 mM LiCl'ün birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinin proliferasyon oranı (51,89 $\pm$ 7,52) ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bir azalmanın olduğu ve proliferasyonu baskılamaya yetmediği tespit edildi ( $p>0,005$ ) (Resim 2C).

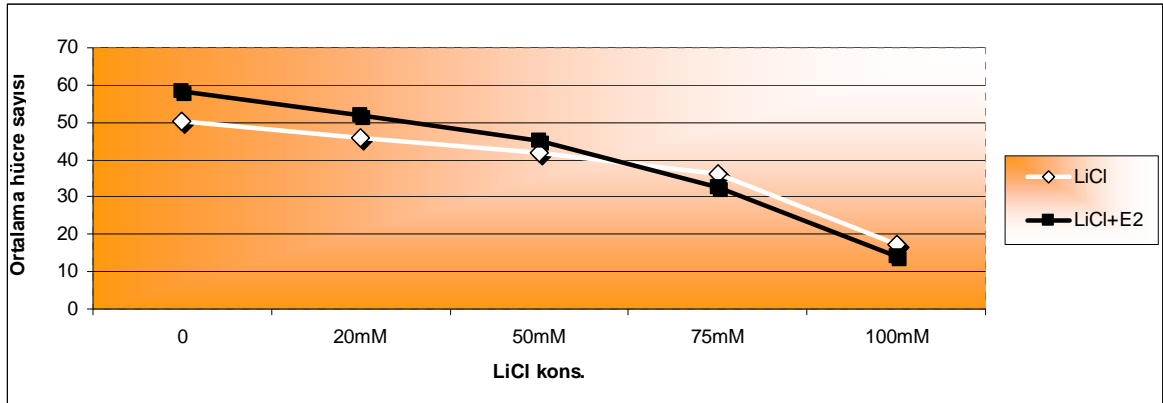


**Resim 2B, C:** S faz Ishikawa hücrelerinde 17- $\beta$ -östradiol uygulanan grupta görülen hücre proliferasyonu (B) ve 20 mM LiCl'ün 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulandığı grupta görülen hücre azalması (C). Hematoksilen-X600.

Ishikawa hücrelerinde 17- $\beta$ -östradiol (0,5  $\mu$ M) inkübasyonu uygulanan grupta BrdU ile işaretli S faz hücre proliferasyon oranı (58,17 $\pm$ 6,40) (Resim 2B), 17- $\beta$ -östradiol ile 50, 75 ve 100 mM LiCl'ün birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinin proliferasyon oranları (sırasıyla 45,25 $\pm$ 7,72 ve 32,73 $\pm$ 8,56 ve 14,24 $\pm$ 5,54) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunan proliferasyon inhibisyonu gözlenmiştir ( $p<0,005$ ) (Resim 2D, E, F).



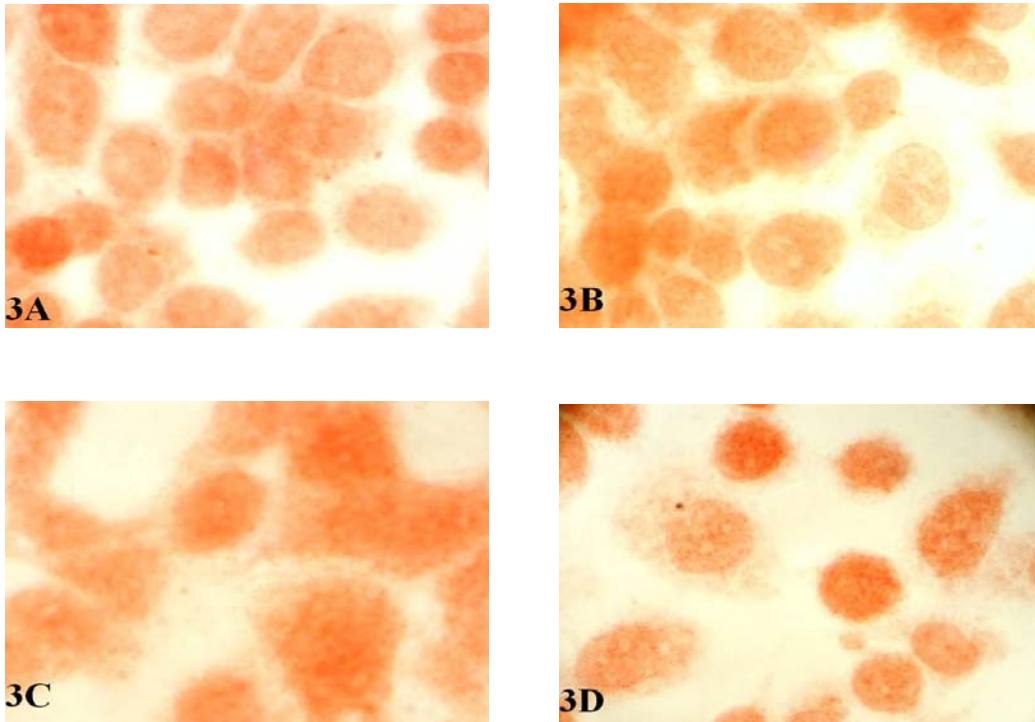
**Resim 2B, D, E, F:** S faz Ishikawa hücreleri 17- $\beta$ -östradiol uygulanan grupta gözlemlenen hücre proliferasyonu (B), 50, 75 ve 100 mM LiCl'ün 17- $\beta$ -östradiol birlikte uygulandığında gruplarda (sırasıyla D, E, F) gözlemlenen proliferasyon inhibisyonu. Hematoksilen-X600.



**Şekil 4:** Ishikawa hücre soyunda doza bağlı uygulanan LiCl'ün yalnız ve 17- $\beta$ -östradiol varlığında BrdU işaretli S faz hücre oranlarında oluşturduğu inhibisyon etkisi.

## 6.2. JNK EKSPRESYONU

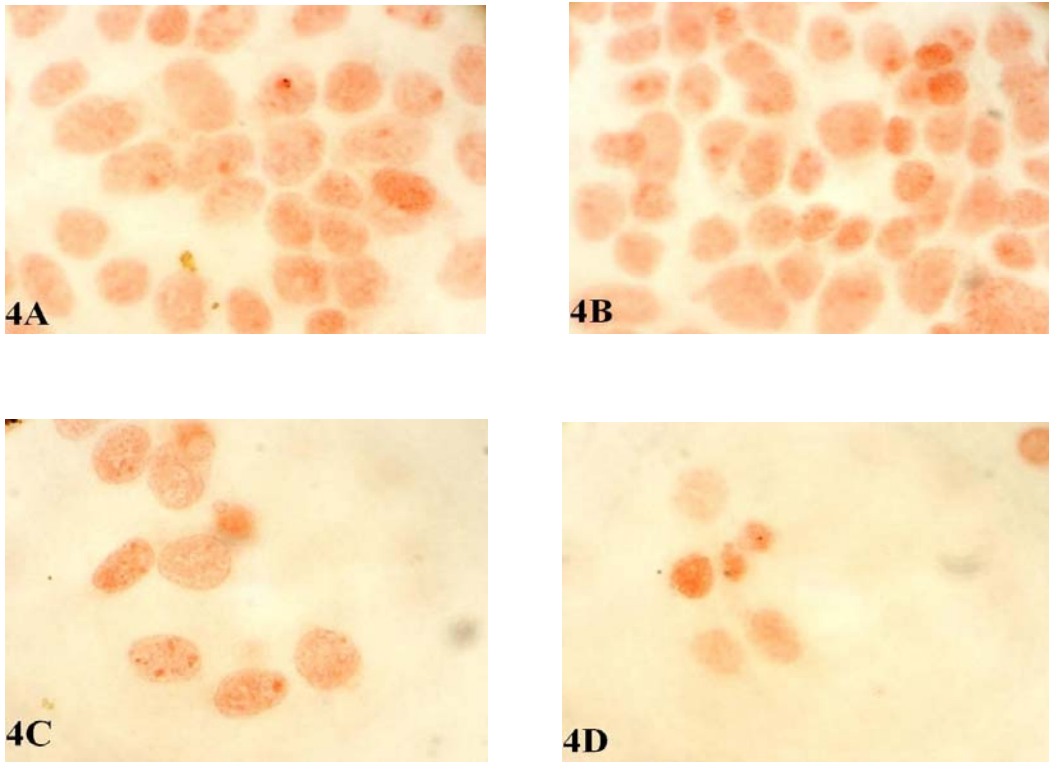
Ishikawa hücrelerinde proliferasyon inhibisyonuna neden olan LiCl'ün stresle aktive olan JNK ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi incelendi. LiCl'ün 24 saat inkübasyondan sonra anti-JNK primer antikoru kullanarak yapılan immünohistokimya çalışmasında, yalnız 17- $\beta$ -östradiol, yalnız 100 mM LiCl ve 100 mM LiCl ile birlikte 17- $\beta$ -östradiol uygulanan gruplardaki JNK ekspresyon düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark izlenmedi (Resim 3A, B, C, D).



**Resim 3A, B, C, D:** Ishikawa hücresi kontrol grubu (A), 17- $\beta$ -östradiol grubu (B), 100 mM LiCl grubu (C) ve 100 mM LiCl ile birlikte 17- $\beta$ -östradiol uygulanan grup (D) JNK ekspresyon düzeyleri. X600.

### 6.3 FOSFO c-JUN EKSPRESYONU

Ishikawa hücrelerinde proliferasyon inhibisyonuna neden olan LiCl'ün fosfo c-jun ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi incelendi. LiCl'ün 24 saat inkübasyondan sonra anti-fosfo c-jun primer antikoru kullanarak yapılan immünohistokimya çalışmasında, yalnız 17- $\beta$ -östradiol, yalnız 100 mM LiCl ve 100 mM LiCl ile birlikte 17- $\beta$ -östradiol uygulanan gruplardaki fosfo c-jun ekspresyon düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark izlenmedi (Resim 4A, B, C, D).



**Resim 4A, B, C, D:** Ishikawa hücresi kontrol grubu (A), 17- $\beta$ -östradiol grubu (B), 100 mM LiCl grubu (C) ve 100 mM LiCl ile birlikte 17- $\beta$ -östradiol uygulanan grup (D) fosfo c-jun ekspresyon düzeyleri. X600.

## 7. TARTIŞMA

Endometriyum, insanlardaki en kompleks dokulardan biridir. Endometriyum, reproduktif yaşam boyunca östrojen ve progesteron hormonlarının siklik değişikliklerine ve dokuya özgü otokrin/parakrin faktörler arasındaki kompleks ilişkilere yanıt olarak sürekli değişim göstermektedir. Endometriyumun tüm doku bileşenleri (bezler, stroma hücreleri ve endotel hücreleri), üreme fonksiyonunu gerçekleştirmek için her siklusta östrojen hormonunun etkisiyle proliferasyon gösterir (22). Çalışmamızı yürüttüğümüz ve insan endometriyum modeli olarak kullandığımız Ishikawa hücre soyunda 17-β-östradiolün proliferatif etkisini artan BrdU inkorporasyonu ile gözlemledik.

Lityum, bipolar bozuklukların tedavisinde uzun zamandır kullanılan en etkili ilaçtır. Fakat sinir hücreleri lityumun tek hedefi değildir. Birçok hücre tipini hedef alarak, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve ölümünü etkilediği bildirilmiştir (48).

Lityumun hücre tipine bağlı olarak GSK-3β aktivitesinin inhibisyonu yoluyla hücre dizilerinde veya bazı primer hücre kültürlerinin proliferasyonu ve hücre siklus geçişlerini stimüle veya inhibe ettiği tespit edilmiştir (49).

Duygu durum bozukluğu olan ve düzenleyicilerle tedavi gören kadınlarda endometriyal hiperplazi bildirilmiş (50), lityum alan kadınlarda artan menstrual bozukluklar, GSK-3β'nin durdurulmasının muhtemel aracılığı ve sonuçta hiperplazi ve karsinom gibi endometriyal proliferatif bozuklukların gelişme potansiyeli arasında bir bağ olabileceği ileri sürülmüştür (1). Lityumun kısa ve uzun dönem tedavilerinde uterusu morfojenetik ve proliferatif etkisini açıklayabilmek amacıyla fare uterusunda yapılan çalışma bu bilgiyi desteklemiştir. Bir ay boyunca hayvanlarda yapılan östradiol ve lityum tedavisinde atipik endometriyal hiperplazi insidansının anlamlı şekilde yükseldiği, 1 hafta veya 2 günlük östradiol ve lityum tedavisi sonrası, uterin kitle, luminal epiteldeki mitotik hücrelerin sayısı ve BrdU işaretli hücrelerde artış, glandular epitel, stromal ve miyometriyal hücrelerin önemli derecede büyük olduğu, oysaki bütün uterus bölümlerinde ERα, β-katenin ve GSK-3β düzeyinin önemli derecede düşük olduğu bildirilmiştir. Hayvanlarda yapılan lityum tedavisi sonuçlarında, uterusu östradiole bağlı proliferatif ve morfojenetik değişikliklerin arttığı, bu etkinin uterusu ERα'nın azalan ekspresyonu, β-katenin ve GSK-3β ile ilişki gösterdiği belirlenmiştir (51).

İnsan endometriyum modeli olarak kullandığımız Ishikawa hücrelerine değişik konsantrasyonlarda LiCl tek başına ve/veya 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulandı. BrdU işaretli S fazındaki hücrelerin değerlendirilmesi ile birlikte, yalnız LiCl uygulanan gruplarda anlamlı proliferasyon inhibisyonu 75 ve 100 mM konsantrasyonlarda gözlemlendi. 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulanan gruplardaki proliferasyon inhibisyonu, 50 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda gözlemlendi. Östradiol varlığında 20 mM LiCl'ün proliferasyonu baskılamaya yetmediği gözlemlendi.

Çalışmamıza paralel olarak, fare embriyolarında yapılan bir çalışmada, 10 mM lityumun fare embriyo hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği, benzer etkileri diğer hücrelerin farklılaşmasında da gösterdiği belirtilmiştir. Lityumun etkisini, G2 fazında siklin B kinaz aktivitesinin inhibisyonuna katılarak mitozaya girişte gerçekleştirdiği bildirilmiştir (52). LiCl tarafından proliferasyonun inhibe edildiği gözlemlenen bir diğer çalışmada, domuz solunum yolu epitel hücrelerinde 10mmol/L LiCl'ün 24 saatlik inkübasyonunda hücre siklusu yavaşlamış, S fazındaki hücre sayısı değişmemiş fakat hücre siklusunda G2/M aresti indüklenmiş, anlamlı olarak siklin B1 artmıştır. 10mmol/L LiCl'ün 12 saatlik inkübasyonunda ise, siklin D1 ekspresyonu yükselmiştir. Sonuç olarak LiCl'ün hücre siklusunu inhibe ederek domuz solunum yolu epitel hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı gözlenmiştir (53).

Bu sonuçların aksine; fare böbrek kapsülünün altına yerleştirilen proliferatif fazdaki insan endometriyumu üzerinde yapılan bir çalışmaya göre, 5 gün süreyle cilt altına enjeksiyon yoluyla uygulanan 125 ng. E2 tedavisi sonucunda epitelde karakteristik bir şekilde proliferasyonun stimüle edildiği gözlenmiştir. 20 gün süreyle %0.05 LiCl içeren su içirilen farenin endometriyum hücrelerinde de, istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Çoğalan hücre sayısının E2 tedavisi sonrasında görülen proliferasyon oranlarına benzer olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, insan endometriyumunun LiCl'e, E2'den bağımsız bir DNA sentezi ile cevap verdiği ve GSK-3 $\beta$ 'nın durdurulmasının insanda endometriyal epitel hücre çoğalmasını teşvik etmede yeterli olduğu gösterilmiştir. GSK-3 $\beta$  siklin D1'in nukleus lokalizasyonunu kontrol eden anahtar enzimdir ve gözlenen proliferasyonla tutarlı bir şekilde, siklin D1'in nukleus lokalizasyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca LiCl'ün E2 yokluğunda epitel proliferasyonunu indüklemesi, insan ve farelerde endometriyal çoğalmanın temel düzenleyici iletim yollarını paylaşıyor olabilecekleri hipotezini desteklemiştir (1).

Farklı hücre çalışmalarında elde edilen dual etkinin (proliferasyon ve inhibisyon) LiCl uygulanan hücre tipine bağlı olduğu kadar uygulanan doza da bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu verilere dayanarak; Ishikawa hücre soyunda 20-100 mM doz aralıklarında LiCl uygulaması sonucunda elde ettiğimiz inhibisyon etkisinin, LiCl'ün proliferasyon etkisinden farklı olarak, durdurulan GSK-3 $\beta$  üzerinden siklin D1'in nukleusta birikimi ve buna bağlı olarak hücre döngüsünde ilerlemeyle değil, hücre siklusunun G2 fazından mitoze geçişte G2/M arestini indükleyerek yani hücre siklusunu durdurarak gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Lityumla ilgili yapılan birçok çalışmaya rağmen etki mekanizması, ilişkili sinyal ileti yolu tam olarak açıklanamamıştır. Lityumun glikojen sentaz kinaz GSK-3 $\beta$ 'nın aktivitesini direkt inhibe ederek etki gösterdiği bildirilmiştir (54, 55). Hücre membranındaki fosfotidilinositol 4,5-bifosfat'ın (PIP<sub>2</sub>) fosfolipaz C tarafından hidrolizi sonucu inositol 1,4,5 trifosfat (IP<sub>3</sub>) ve diaçilgliserol meydana gelir. Fosfoinositol trifosfat, GSK-3 $\beta$  aracılı ilettime, diaçilgliserol ise çalışmamızda incelediğimiz JNK proteininin de bir üyesi olduğu MAPK ailesini kapsayan protein kinaz C aktivasyonuna yol açar (8).

Lityumun 10-20 mM doz aralıklarında tiroid ve bütün hücrelerde proliferasyon potansiyelini anlamlı ölçüde arttırdığı belirlenen çalışmada bu etkiyi GSK-3 $\beta$ 'nın tamamının inhibisyonu yoluyla Wnt sinyal yolunu aktive ederek gerçekleştirdiği belirtilmiştir (56). İn-vivo fare beyinde ve in-vitro nöronal orjinli insan hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, kronik lityum kullanımının JNK sinyal yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. Nöronal fonksiyonların ve gen ekspresyonun düzenlenmesinde lityumun uzun süreli terapötik etkisi majör rol oynamıştır (57). Kronik lityum tedavisine yönelik yapılan bir diğer çalışmada da, PKB/Akt-kinaz ve MAPK dahil olmak üzere ERK, JNK ve p38 sinyal yollarının lityum tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (58). Ancak Ishikawa hücre soyunda LiCl'ün inhibisyon etkisinin hangi sinyal ileti yolu ile ilişkili olduğuna yönelik oluşturduğumuz deney gruplarında, JNK ve fosfo c-jun ekspresyon düzeyleri arasında fark gözlenmedi.

Potansiyel terapötik ajan olarak bilinen LiCl'ün insan endometriyum modeli olarak kabul edilen Ishikawa hücre soyunda doza bağlı olarak proliferasyon inhibisyonu yönünde etkisi olduğunu gözlemledik. LiCl'ün Ishikawa hücre soyunda gösterdiği bu inhibisyon



etkisini JNK ve fosfo c-jun ekspresyonlarından bağımsız olarak gösterdiği sonucuna vardık.

Bu veriler doğrultusunda, bipolar bozuklukların tedavisinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılan lityumun, üreme sistemi üzerinde yapılan çalışmaların da detaylandırılması ve etki mekanizmasının anlaşılmasının ardından endometriyal kanserler ve uzun süreli infertilite sebeplerinden endometriyozis gibi endometriyuma bağlı hastalıkların tedavisinde LiCl'ün inhibisyon ve potansiyel terapötik etkisinin önem kazanacağını düşünmekteyiz.

## 8. SONUÇ

- Lityumun en yaygın olarak kullanıldığı ve FDA onayının bulunduğu alan, akut mani ve bipolar bozukluk profilaksisidir. Ancak lityumun etkisi sadece sinir hücreleri üzerinde değildir. Birçok farklı hücre tipinde, proliferasyon inhibisyonu veya stimülasyonunda önemli rol oynamaktadır.
- Çalışmamızda, LiCl'ün insan endometriyum modeli olarak kullandığımız Ishikawa hücre soyunda proliferasyon üzerine etkileri değerlendirildi.
- S faz Ishikawa hücrelerinde 20 mM LiCl'ün proliferasyon etkisi yoktu fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunan bir inhibisyon etkisi de gözlenmedi.
- S faz Ishikawa hücrelerinde 50 mM LiCl uygulandığında gerçekleşen inhibisyon da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
- Ishikawa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan LiCl'ün, istatistiksel olarak anlamlı bulunan inhibisyon etkisi 75 ve 100 mM konsantrasyonlarda gözlendi.
- S faz Ishikawa hücrelerine 20 mM LiCl 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulandığında proliferasyonu baskılamaya yetmediği, ancak 50, 75 ve 100 mM LiCl'ün 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulandığı deney gruplarında, istatistiksel olarak anlamlı proliferasyon inhibisyonuna neden olduğu gözlendi.
- Ishikawa hücre soyunun S faz hücrelerinde 100 mM LiCl uygulaması sonucu gerçekleşen en belirgin proliferasyon inhibisyonuyla ilişkili sinyal yoluna yönelik çalıştığımız gruplar arasında, JNK ve fosfo c-jun ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimde ve tezimi hazırlamam esnasında bilgi ve desteğini esirgemeyen, deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanı hocam Prof. Dr. Vildan KARPUZ'a,

Yüksek Lisansım süresince, tüm eğitimim ve çalışmalarım esnasında bilgi birikimini paylaşan, katkılarını ve hoşgörüsünü esirgemeyen hocam Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Bio. Melike ERSÖZ'e ve Bio. Türkan SARIOĞLU'na,

Yüksek Lisansımın her aşamasında desteği ve yardımı olan sevgili arkadaşım İlknur KARAOSMANOĞLU'na,

Yüksek Lisansımız süresince her zaman tam bir uyum içinde olduğumuz, her konuda destek ve hoşgörülerini esirgemeyen dönem arkadaşlarıma,

Yüksek Lisansım boyunca her ihtiyacım olduğunda kızımın bakımını üstlenen en büyük destekçim sevgili anneme,

Bugünlere gelmemde sonsuz emeği olan yine sevgili annem, sevgili babam, sevgili kardeşim ve tüm aileme,

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen sevgili eşime,

Ve Yüksek Lisansımın ilk günlerinden itibaren yanımda olan ve her zaman yanımda olacağına inandığım tezimin ortağı canım kızım NAZ'a,

TEŞEKKÜR EDERİM.

## 10. KAYNAKLAR

1. Polotsky AJ, Zhu L, Santoro N, Pollard JW. Lithium chloride treatment induces epithelial cell proliferation in xenografted human endometrium. *Hum Reprod.* 2009, 1(1):1-8.
2. Zhu L, Pollard JW. Estradiol-17 $\beta$  regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 104(40):15847-15851.
3. Moore LK, Persaud TVN. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
4. Hall G, Phillips TJ. Östrojen ve deri: Östrojen, menopoz ve hormon replasman tedavisinin deri üzerine etkileri. *J Am Acad Dermatol.* Türkçe Baskı. 2006, 3(1):1-14.
5. Nishina H, Teiji W, Toshiaki K. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem.* 2004, 136:123-126.
6. Şengül C, Şengül BC, Tuncer O, Dilbaz N. Ellinci yılında lityumun öyküsü. *Klin Psikofarmakol Bül.* 2004, 14:50-56.
7. Özdem S, Akbaş SH, Gültekin M. Yeni spektrofotometrik lityum ölçüm yönteminin uygulaması ve analitik değerlendirilmesi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi.* 2006, 4(3):101-106.
8. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
9. Carlos JL, Carneiro J. Temel histoloji. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.
10. Hassa H. İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları. Eskişehir, Osmangazi Üniversitesi Basım Evi, 2003.
11. Horne AW, White JO, Lalani EN. The endometrium and embryo implantation. *Br Med J.* 2000, 321:1301-1302.
12. Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın hastalıkları ve doğum bilgisi üreme fizyolojisi. Güneş Kitabevi, 2004.
13. Chen B, Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW. Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-Kinase→AKT→GSK-3 $\beta$ →Cyclin D1→pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 2005, 19(8): 1978-1990.
14. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol.* 2005, 19:1951-1959.

15. Sadler TW. Langman medikal embriyoloji. Başaklar AC. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005.
16. Reinhard H, Stoll CF. Kinderwunschzentrum Berlin.<http://www.kinderwunschzentrum.de/tr/ursachen.shtml>.
17. Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon indüksiyonu. İstanbul, *Esin Ofset*, 2000.
18. Bayçu C, Özatık O, Gürer F, İnalöz SS, Gürer D. Endometriyum reseptivitesi tuba epitelinin oosit ve embriyo ile otokrin ve parakrin ilişkisine mi bağlıdır? *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2009, 10(1):133-139.
19. Gökçimen A, Safiye ST. İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2004, 11(4):25-33.
20. Reproduction and development. *Lecture Outline Chapter (26)*. <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/024reproduction.htm>
21. Edwards RG. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reprod Biomed Online*. 2006, 13(6):887-904.
22. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996.
23. Lowitz BB, Casciato DA. Medical oncology & principles of cancer biology. <http://biyokimya.uludag.edu.tr/SiklusApoptozisKanser.pdf>
24. Cadabak H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2008, 9(3):51-61.
25. Morgan DO. Primers in biology the cell cycle principles of control. New Science Press, 2006.
26. Çoğulu Ö, Alpman A, Durmaz B, Özkınay F. Mitoz ve mayozun moleküler temelleri. Derlemeler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2007, 27(5): 725-737.
27. Crotty D. Cold spring harbor protocols, BrdU incorporation, 2008. <http://www.cshblogs.org/cshprotocols/>
28. Gallagher E, Enzler T, Matsuzawa A, Karin M. 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) and 7-amino-actinomycin (7-AAD) staining for cell proliferation assay. *Nat Immunol*. 2007, 39:10,1038.
29. Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell*. 2002, 15(3):104-17.
30. Sitaramayya A. Hormones in health and disease, Introduction to cellular signal transduction. Birkhäuser Boston, 1999.
31. Hidaka H, Nairn AC. Intracellular signal transduction. Academic Press, 1996.

32. Poyraz İ, Sözen E. MAPKlar, Sinyal iletimi, Bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2008, 1(1):07-16.
33. Plantanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 2003, 101:4667-79.
34. Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*. 2000, 351:289-305.
35. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1773:1358-75.
36. Mapk-pathways-new.jpg 03-Sep-2003, [www.bch.msu.edu/faculty/gallo.htm](http://www.bch.msu.edu/faculty/gallo.htm)
37. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000, 103, 239-252.
38. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*. 1996, 15:2760-2770.
39. Lamb JA. Role of the JNK Signal transduction pathway in cell survival. GSBS Dissertation, 2004. [http://escholarship.umassmed.edu/gsbs\\_diss/232/](http://escholarship.umassmed.edu/gsbs_diss/232/).
40. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinases. *Nature*. 1994, 369:156-160.
41. Derijard B, Hibi M, Wu IH, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994, 76:1025-1037.
42. Özcan E. Akut manide psikofarmakolojik tedavi yaklaşımları. *Klinik Psikiyatri*. 2000, 3:5-13.
43. Zengin M, Tamam L, Karakufl G. Duygudurum düzenleyicilerin kemik metabolizması üzerine etkileri. *Klin Psikofarmakol Bül*. 2009, 19:305-311.
44. Young W, Keck WM. Review of lithium effects on brain and blood. *Cell Transplant*. 2009, 2065.
45. Özpoyraz N, Tamam L. Duygudurum bozuklukları. <http://karacoban.meb.gov.tr/>
46. Akdeniz F. Valproatın kadın üreme endokrinolojisi üzerine etkileri. *Türk Psikiyatri Dergisi*. 2001, 12(4):301-307.
47. Morrell MJ. Effects of epilepsy on women's reproductive health. *Epilepsi*. 1998, 39(8): 32-37.

48. Neel BD, Lopez J, Chabadel A, Gillet G. Lithium suppresses motility and invasivity of v-src-transformed cells by glutathione-dependent activation of phosphotyrosine phosphatases. *Oncogene*. 2009, 28:3246-3260.
49. Wang JS, Wang CL, Wen JF, Wang YJ, Hu YB, Ren HZ. Lithium inhibits proliferation of human esophageal cancer cell line Eca-109 by inducing a G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. *World J Gastroenterol*. 2008, 7;14(25): 3982-3989.
50. Joffe H. Reproductive biology and psychotropic treatments in premenopausal women with bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2007, 68:10-15.
51. Gunin AG, Emelianov VU, Mironkin IU, Morozov MP, Tolmachev AS. Lithium treatment enhances estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the uterus of mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004, 114(1):83-9.
52. Smits Veronique AJ, Essers Marieke AG, Loomans Dominique SE, Klompmaker R, Rijksen G, Medema RH. Inhibition of cell proliferation by lithium is associated with interference in cdc2 activation. *FEBS Letters*. 1999, 457(1):23-27.
53. Chen W, Wu R, Wang X, Li Y, Hao T. Effect of lithium on cell cycle progression of pig airway epithelial cells. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004, 24(4):318-21.
54. Salinas PC, Hall AC. Lithium and synaptic plasticity. *Bipolar Disorder*. 1999, 1(2): 87-90.
55. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93:8455-8459.
56. Rao AS, Kremenevskaja N, Resch J, Brabant G. Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Eur J Endocrinol*. 2005, 153(6): 929-938.
57. Yuan P, Chen G, Manji H, K. Lithium activates the c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases in vitro and in the CNS in vivo. *JNC*. 1999, 73(6):2299-2309.
58. Nielsen J, Hoffert JD, Knepper MA, Agre P, Nielsen S, Fenton RA. Proteomic analysis of lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: mechanisms for aquaporin 2 down-regulation and cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105(9):3634-9.