

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

**N-ASETİL SİSTEİNİN ENDOMETRİYUM
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Biyolog Handan USTA

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2010

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

**N-ASETİL SİSTEİNİN ENDOMETRİYUM
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Biyolog Handan USTA

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. HÜCRE SİKLUSU.....	5
4.1.1. Hücre Siklusunun Kontrolü.....	7
4.2. ENDOMETRİYAL SİKLUS.....	9
4.3. ÖSTROJEN VE ENDOMETRİYUMDAKİ ETKİLERİ.....	10
4.4. N-ASETİL SİSTEİN.....	12
4.5. NF-KB SİNYAL İLETİ YOLU.....	13
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	14
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	15
5.2.1. Hücre Kültürü.....	15
5.2.2. İmmünohistokimya.....	15
5.2.2.1. BrdU İmmünohistokimyası.....	15
5.2.2.2. NF-KB İmmünohistokimyası.....	16
5.2.3. İstatistiksel İnceleme.....	16
6. BULGULAR.....	17
6.1. BROMODEOKSİÜRİDİN İŞARETLİ HÜCRE ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	17
6.2. İMMÜNOSİTOKİMYASAL NF-KB EKSPRESYONU.....	20
7. TARTIŞMA.....	21
8. SONUÇ.....	23
9. TEŞEKKÜR.....	24
10. KAYNAKLAR.....	25

SİMGE VE KISALTMALAR

AEC	: Aminoetilkarbazol
BrdU	: Bromodeoksiüridin
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	: Fetal sığır serumu
FSH	: Folikül stimulan hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	: Glutasyon
IL	: İnterlökin
LH	: Luteinizan hormon
MAPK	: Mitojenle aktive protein kinaz
NAS	: N-asetil sistein
NF- KB	: Nükleer faktör <i>KB</i>
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PCNA	: Prolifere hücre nükleer antijeni
ROS	: Serbest radikal türleri

Araştırma Projesi No : HE/0322008

1. ÖZET

Endometriyum, reproduktif yaşam süresince proliferasyon, diferansiyasyon ve dejenerasyon gibi periyodik olarak gerçekleşen siklusa uğrar. Regülasyonu östrojen ve progesteron steroid hormonlarının kontrolü altında gerçekleşen endometriyum, yenilenebilen bir dokudur. Östrojen, endometriyumun epitel ve stromal hücrelerinin proliferasyonunda önemli rol oynar. Proliferasyon evresinde en aktif olan östrojen 17- β -östradioldür. Progesteron ise proliferasyonu inhibe eder ve desidualizasyonun düzenlenmesinde görev alır.

Çalışmamızda in-vitro endometriyum modeli olarak Ishikawa hücreleri kullanıldı. Deney grupları kültür medyumu içerisinde büyütülen kontrol, 17- β -östradiol, 17- β -östradiol ile birlikte N-asetil sistein (NAS) uygulanan ve yalnızca NAS'ın farklı konsantrasyonlarda uygulandığı dört gruptan oluşmaktadır. Östradiolün proliferatif etkisi ve NAS'ın proliferasyon üzerindeki etkileri anti-bromodeoksiüridin (BrdU) antikoruyla immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. 17- β -östradiol uygulanan grupta kontrol grubuna göre S faz proliferasyon oranında anlamlı bir artış tespit edildi. NAS uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve/veya inhibe ettiği gözlemlendi. 20 mM ve 50 mM NAS uygulanan deney gruplarında anlamlı düzeyde proliferasyon inhibisyonu izlendi. Kontrol ve östradiol uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında NAS'ın, nükleus lokalizasyonlu nükleer faktör KB (NF-KB) ekspresyonunu artırdığı tespit edildi.

Bu bulgular doğrultusunda NAS'ın tanımlanmış olan antioksidan özelliğinin yanı sıra konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve NF-KB'nin ilişkili gen ekspresyon düzenlemesiyle NAS'ın hücresel etkinliğinde rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

2. SUMMARY

Endometrium undergoes a periodic menstrual cycle including proliferation, differentiation, and degeneration during the reproductive life cycle. Endometrium, regulated by the steroid hormones estrogen and progesterone, is a tissue that can regenerate. Estrogen plays an important role in the proliferation of the endometrial epithelium and stromal cells. During the proliferation phase, 17- β -estradiol is the most active estrogen. Progesterone inhibits the proliferation and helps in the regulation of decidualization.

In our study, Ishikawa cells were used as in-vitro endometrium model. The experimental groups consist of four different culture mediums; the control, 17- β -estradiol, N-acetyl cysteine (NAC) along with 17- β -estradiol, and different concentrations of NAC. Anti-BrdU antibody is used for immunocytochemical analysis of the proliferative effect of estrogen and the effects of NAC on proliferation. A significant increase in the S phase proliferation rate was in the group treated with 17- β -estradiol compared to the controls. The NAC treatment either decreased and/or inhibited the cell proliferation depending on the concentration. There was a significant inhibition of the proliferation in the experimental groups treated with 20 mM and 50 mM of NAC. When compared to the controls and estrogen treated groups, NAC has been found to increase the expression nuclear factor- *KB* (NF- *KB*) in nucleus.

With these findings, it has been concluded that besides having the previously identified antioxidant effects, NAC inhibits cell proliferation depending on the concentration and the NF- *KB* plays a role in the cellular activities of NAC by the regulation of related gene expression.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyum; bazal tabaka ve fonksiyonel tabaka olmak üzere iki işlevsel tabakadan oluşmaktadır. Fonksiyonel tabaka, endometriyal siklus boyunca büyük değişiklikler geçirirken, bazal tabaka hemen hemen hiç değişmeden kalır. Endometriyal siklus evrelerinin kontrolü östrojen ve progesteron hormonları tarafından gerçekleştirilir. Östrojen, endometriyum üzerine etki ederek hücre çoğalmasına yol açar. Uterusun damarlanmasını, kas kitlesinde artışı sağlayarak infantil uterusu erişkin tipe dönüştürür. Gebelikte uterustaki büyüme, öncelikle östrojene bağlıdır. Ayrıca östrojen, menstruasyon sırasında dökülen endometriyumun yeniden oluşmasını sağlar. Progesteron ise; endometriyal bezlerin salgı yapmasını sağlar ve endometriyumun, blastosist implantasyonu için hazırlanmasında görev alır. Yeterli miktardaki östrojen ve progesteron varlığında, embriyonun endometriyuma implantasyonu gerçekleşir (1, 2).

Hücre siklusunda, proliferasyon hızını göstermede kullanılan proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA); siklusun geç G₁ ve S fazlarında sentezlenen bir DNA replikasyon proteindir. BrdU ise timidin analogudur. Sadece S fazındaki hücreleri anti-BrdU antikoruyla işaretleyerek göstermede kullanılır (3, 4).

Hücre proliferasyonu, siklus boyunca kontrol edilir. Hücre siklusunun kontrolü, iki sınıf protein tarafından yapılmaktadır. Bunlar, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (cyclin-dependent kinases-CDK)'dir. Siklin bağımlı kinazlar siklus boyunca eksprese edilir ama inaktiflerdir. Siklinlere bağlanarak aktivite kazanırlar. Hücre siklusunun ilerlemesi, siklusun devamını sağlayan siklinlerin, katalitik partneri olan siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından kontrol edilmektedir (5).

NAS, sülfür içeren tiol grubu bir antioksidan olup asetaminofene bağlı oluşan hepatotoksisite tedavisinde, HIV tablosunda immün sistem modülasyonunda, kardiovasküler hastalıklarda, kanser oluşumunu önlemek amacıyla medikal olarak kullanılmaktadır. NAS'ın, prekürsör olarak glutatyon (GSH) oluşumunda rol aldığı ve bu yolla hücreler üzerine direkt antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. NAS'ın sitokin ekspresyon ve salınımını baskıladığı, NF- κ B ekspresyonunu inhibe ederek direkt antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar, NAS'ın antioksidan mekanizma üzerinden etkili olduğu kullanım alanlarının dışında, hücre siklusunu inhibe

edici özelliği olduğunu bildirmektedirler (6, 7).

Kullanmış olduğumuz, iyi diferansiye insan endometriyal adenokarsinoma hücreleri olan Ishikawa hücreleri, in-vitro endometriyum araştırmaları için tercih edilen bir modeldir. İnsan uterus epitel hücre dizisi olduğundan östrojen ve progesteron reseptörü taşımaktadır (8, 9).

Çalışmamızın amacı; NAS'ın, reproduktif yaşam süresince östrojen kontrolünde gerçekteşen proliferasyon evreleriyle düzenli olarak yenilenme gösteren endometriyum dokusu üzerine olası etkilerini ve ilişkili sinyal ileti mekanizmasını tanımlamaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. HÜCRE SIKLUSU

Ökaryotik canlılarda, iki yavru hücre meydana getirmek üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki süreç hücre siklusu olarak tanımlanır. Hücre siklusu koordine, ardışık ve senkronize gerçekleşen olaylar serisinin tümüdür. Her bir siklusta tek bir DNA sentezi gerçekleşir (10).

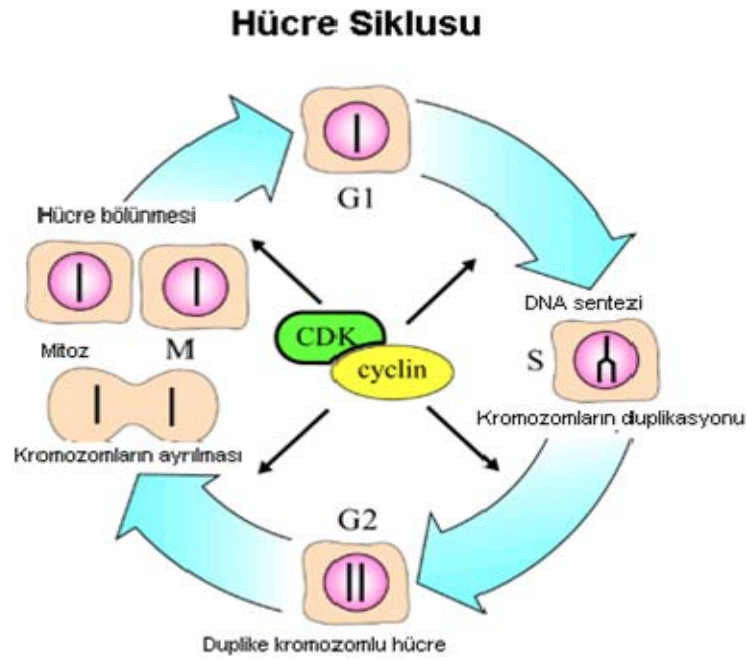
Hücre siklusu, geleneksel olarak G₁- S- G₂ fazlarını içeren, mitoz hazırlık evresi olan interfaz ve sitoplazmanın bölünmesi olarak bilinen sitokinezle sonuçlanan mitoz evresi olarak ikiye ayrılır (10, 11). G₀ fazı, dinlenme evresi olarak da bilinen G₁ aşamasındaki hücrelerin DNA çoğalması için S fazına geçmediği fakat metabolik faaliyetlerin devam ettiği evredir. Aktif olarak bölünmeyen hücreler, terminal farklılaşmaya uğramış olabilirler ve bu hücrelerin yeniden hücre döngüsüne girme yeteneği ortadan kalkabilir ya da geçici olarak duraklayabilir. Bu hücreler G₀ fazında beklerler. G₀ fazı hücre döngüsünde G₁ fazına girmeden hemen önce yer alan sessiz evredir. Hücreler bu şekilde günlerce, aylarca hatta yıllarca bölünmeden kalabilirler. Hücre dışından uygun bir sinyal gelmedikçe de bölünme yeteneklerini geri kazanamazlar (12).

Hücre siklusunu düzenleyen ve kontrol eden siklin ve siklin bağımlı kinaz (CDK) olarak adlandırılan, siklusun belli aşamalarında işlev gören ve birbirleri ile olan etkileşimleri yoluyla, pozitif ve/veya negatif düzenleyici etki göstererek, siklusun ilerlemesini ya da kısıtlanmasını sağlayan proteinlerdir (13).

G₁ ve G₂ evrelerinde, varsa DNA hasarlarının tespiti ve tamiri için bulunan kontrol noktaları vardır. Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçlarının bir fonksiyonudur. Azalmış hücre çoğalması veya artmış ölüm hızı herhangi bir aşırı artış önler (14).

G₁ Fazı: Spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve geç G₁ fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Bu proteinler arasında hücre siklusunu kontrol eden, mitozdan sonra yarıya düşen hücre hacmini normal büyüklüğüne ulaştıran proteinler de vardır. Ayrıca, bu fazda DNA sentezi için gereken birçok enzim de üretilir. Yaklaşık olarak 12

saat sürdüğü için siklusun en uzun fazı olarak kabul edilir. G₁'in sonuna doğru bir *kontrol noktası* S fazına girişi kontrol eder. Büyüme faktörlerinin bulunmayışı hücreyi G₀ fazına girmeye zorlar. Hücre S fazına girmeden önce varsa duplike olacak olan DNA'daki hasarın tamir edilmesi sağlanır. Eğer herhangi bir lezyon saptanırsa, hücreler ya hasarı onarır ya da apoptoze giderek ölürlür. Bu kontrol noktası p53 proteininin etki yerlerinden biri olarak kabul edilir (10, 14).



Şekil 1: Siklin ve siklin bağımlı kinazlar (CDK)'ın kontrolü altında gerçekleşen hücre siklusu G₁, S, G₂ ve M fazlarından oluşur (15).

S Fazı: Yaklaşık olarak 6-8 saat süren S (sentez) fazında replikasyon ile hücre içindeki DNA'nın miktarı iki katına çıkarılır (10, 14). Böylece mitoz fazına girmeden önce ikiye bölünecek olan hücrede iki katı kromozom elde edilmiş olur.

G₂ Fazı: Bu faz boyunca DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder. Mitotik iğlerin mikrotübüler prekürsörleri üretilir. Mitoz sırasında kullanılacak enerji biriktirilir ve histon olmayan proteinler sentezlenir. Burada da G₁ evresinde olduğu gibi hücreler mitoz

fazına girmeden hemen önce hatalı sentezlenmiş DNA'ların düzeltilmesini sağlayan bir *kontrol noktası* bulunur. Hücre siklusu inhibitörleri, hücreyi yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur. Bu faz yaklaşık 6 saat sürer (10, 14).

M Fazı: Yaklaşık 1-2 saat süren siklusun en kısa fazıdır. Mitoz, S fazında duplika olan kromozomların iki yavru hücreye eşit olarak paylaştırıldığı kompleks bir olaydır. Profaz-metafaz- anafaz- telofaz basamaklarına ayrılır ve sitokinezle sonuçlanır. Sonrasında G₁ fazı ile siklus devam eder (10, 11).

4.1.1. Hücre Siklusunun Kontrolü

Hücre proliferasyonu, siklus boyunca kontrol edilir. Hücre siklusunun kontrolü, iki sınıf protein tarafından yapılmaktadır. Birincisi, hücre siklusunda görev alan, siklin bağımlı kinazlar (cyclin-dependent kinases) olarak adlandırılan ve kısaca CDK ile gösterilen protein kinazlar olarak bilinen enzimlerdir ve bu enzimler hedef proteinleri seçip fosforile ederler. Fosforile olmamış durumdayken (sikline bağlı veya değil) CDK'nın kinaz aktivitesi yoktur. İkinci grup proteinler ise siklinlerdir. Siklin bağımlı kinazlar siklus boyunca eksprese edilir ama inaktiflerdir. Siklinlere bağlanarak aktivite kazanırlar. Hücre siklusunun ilerlemesi, siklusun devamını sağlayan siklinlerin, katalitik partneri olan CDK'lar tarafından kontrol edilmektedir. Siklinler, hücre siklusunun işlerliğini kontrol ederler. Ancak sikline bağlı olduklarında aktif hale geçebilen protein kinazlar (CDK), hedef protein yapısındaki serin ve threonin veya tirozin aminoasitlerine fosfat grubu bağlayarak aktivitesini değiştirir. Böylece siklin-CDK kompleksi hedef proteinleri fosforlayarak hücre siklusunun kontrolünü sağlamaktadır (5). CDK aktivasyonundan sonra siklin seviyeleri hızla düşer. DNA sentezinin öncesinde uyarılmaya başlarlar ve artış gösterirler. Hücrenin diğer faza geçmesini, hedef proteinleri fosforilize ederek gerçekleştirirler. Hücre içerisinde çok sayıda farklı siklin ve CDK olmasına karşın, bunlardan sadece birkaçının hücre siklusunun kontrolünde görev aldığı bilinmektedir.

Hücre siklusu dönemlerine göre farklı CDK'lar üretilmektedir. G₁ fazında salgılanan CDK'lar; siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4), siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) ve siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2)'dir. G₁ fazı siklinleri D ve E tipi siklinlerdir (Siklin D1, D2,

D3 ve siklin E). S fazı siklinleri siklin A ve E iken, mitotik fazı siklinleri A ve B'dir. Siklinlerle CDK'lar birbirine bağlanarak siklin-CDK kompleksini oluşturur. Siklin-CDK kompleksi; siklinlerin siklusun her aşamasında proteolizi ile inaktive edilir. Siklinlerin yıkımı "Ubikutin-bağımlı mekanizma" ile gerçekleşir (16, 17).

Hücre siklusunun inhibisyonu ise Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKI) yardımıyla gerçekleştirilir. 1993-1995 yıllarında tanımlanmış ve klonlanmışlardır. Siklusun negatif kontrolünden sorumludurlar. Hücre siklusunun ilerlemesi, siklusun devamını sağlayan siklinlerin, katalitik partneri olan CDK'lar tarafından kontrol edilmektedir. Düzenli olarak kontrol edilmeyen CDK aktivitesi, artmış hücre çoğalmasına ve genomik instabiliteye neden olmaktadır. Bu durum; hücrenin ölümsüzlük kazanması veya kanserleşmesi ile sonuçlanır. CDK'ların hücre siklusundaki işlevlerinin düzenlenmesi, CDKI'leri tarafından gerçekleştirilmektedir (13).

Yapılan araştırmalar sonucu daha pek çok yeni siklin ve siklin bağımlı kinaz üyesi tanımlanmaya devam etmektedir. Bu durum hücre siklusunun pek çok kontrol noktası olduğunu ya da bu siklin ve siklin bağımlı kinazların birden çok işleve sahip olduğunu göstermektedir. Hücre siklusu kontrolünün herhangi bir basamakta bozulmasını sağlayan mutasyonlar kansere neden olan genlerin çalışmasında önemlidir.

4.2. ENDOMETRİYAL SIKLUS

İnsan endometriyumunda, menstrual siklus boyunca önemli histolojik değişiklikler meydana gelir ve embriyonik implantasyon için hazırlık yapılır. Östrojen ve progesteron kontrolü altında her ay endometriyumda siklik değişiklikler gerçekleşir. Endometriyum, tek katlı silyalı prizmatik yüzey epiteli ile basit tübüler bezler içeren lamina propriadan oluşur (18,19). Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan oluşur; menstruasyon sırasında dökülen yüzeyel fonksiyonel tabaka ve menstruasyon sırasında dökülmeyen ve menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan bazal tabaka. Endometriyumu besleyen kan damarları bu tabakanın büyük bir bölümünün periyodik olarak dökülmesinde özel bir öneme sahiptir. Arkuat arterler endometriyumun alt kısmında bulunan miyometriyumun orta tabakalarında dairesel olarak yerleşmiştir. Bu damarlardan endometriyumu besleyen iki grup damar çıkar: Bazal tabakayı besleyen düz arterler ve fonksiyonel tabakaya kan taşıyan kıvrımlı (spiral) arterler.

Endometriyuma blastosist implantasyonu; başarılı bir gebelik için gerekli olan hücre farklılaşması, apoptoz, invazyon ve ekstrasellüler matriksinde model değişikliği gibi olaylar zincirinin ilk basamağıdır. Apoptoz hem implantasyon hem de desidualizasyonda rol oynar. İnsanda implantasyon sırasında, embriyonun epitele tutunmasını, endometriyal stromal hücreler tarafından gerçekleştirilen desidualizasyon takip eder (20). Endometriyumun bağ dokusu büyük değişiklikler geçirerek lamina proprianın fibroblastları genişler ve poligonal bir hal alarak protein sentezleyen hücrelerin özelliklerini gösterir. Bu hücreler artık desidua hücreleri olarak adlandırılır, endometriyumun bütünü de desidua adını alır. Stromal hücreler büyüyerek artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişikliklere desidual reaksiyon denir. Çünkü endometriyumun fonksiyonel tabakası doğum sırasında desidua olarak dökülür (1, 2).

Endometriyal siklus yaklaşık olarak 28 gün sürer ve menstrual, proliferatif ve sekretuar olmak üzere birbirini izleyen 3 evreye ayrılır:

1. Menstrual Faz: Siklusun başlangıcı olarak kabul edilen bu faz yaklaşık 4-5 gün sürer. Ovulasyondan yaklaşık 14 gün sonra oosit döllenenmesi gerçekleşmediyse kandaki östrojen ve progesteron düzeyleri hızla düşer. Bu düşüş, spiral arterlerde kasılmalara neden olur ve gelişen diğer olaylar sonucunda endometriyumun fonksiyonel tabakası dökülür.

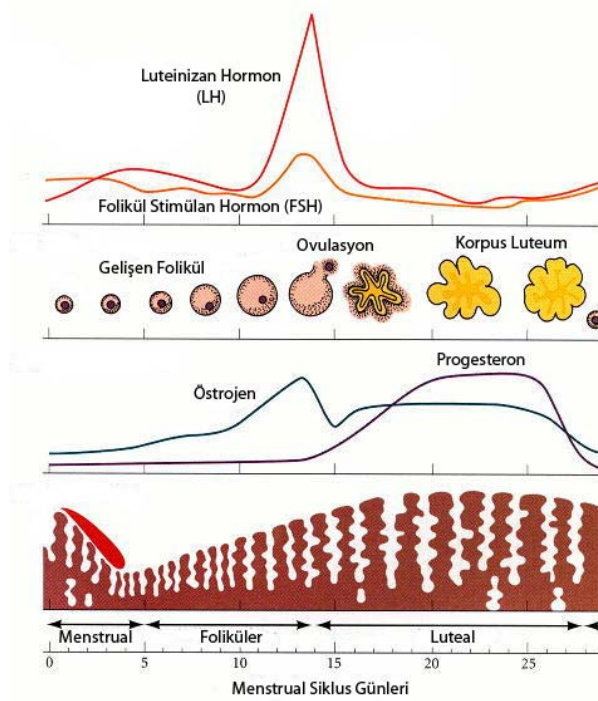
2. Proliferatif Faz: Yaklaşık olarak 9 gün süren bu evrede, olgunlaşan ovaryum foliküllerinde üretilen östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyum kalınlığı artar.

3. Sekretuar Faz: Korpus luteumda üretilen östrojen ve progesteron tarafından kontrol edilen bu evre, yaklaşık olarak 13 gün sürer. Uterus bezleri son derece kıvrımlı bir hale gelir. Endometriyum, salgıların birikmesi ve stromadaki ödem sonucu maksimum kalınlığa ulaşır. Uterus bezlerinin salgısının, implantasyondan önce embriyonun gereksinimleri için başlıca beslenme kaynağını oluşturduğu düşünülmektedir (1, 2).

4.3. ÖSTROJEN VE ENDOMETRİYUMDAKİ ETKİLERİ

Dişi üreme sisteminde, vücutta doğal olarak sentezlenen üç ana östrojen hormonu bulunur. Bunlar; östron (E1), östradiol (E2) ve östriol (E3)'dür. Menarştan menopoza kadar en çok bulunan ve en etkin olan ovaryum östrojeni 17- β -östradioldür; başlıca granüloza ve granüloza lutein hücrelerinde üretilir. Daha az etkin bir östrojen olan östriol, gebelik sırasında karaciğerde östrondan önemli miktarda üretilir. En az etkin östrojen olan östron ise, menopoz sırasında üretilir. Periferik dokularda, östradiol ya da androstenedionun dönüştürülmesiyle yapılır. Östrojen, endometriyumun gelişmesini sağlar. Endometriyal siklusun proliferasyon evresine, buradaki östrojenin aktivitesinden dolayı östrojenik evre de denir. Bu evre sırasında, olgunlaşan ovaryum foliküllerinde üretilen östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyumun kalınlığı artar. Hem epitelde ve hem lamina propriyadaki hücrelerde mitoz görülür. Tübül bezlerin epitel hücreleri yukarıya doğru göç eder, bez giderek daralır ve kıvrımlı bir şekil alır. Bunların yanında östrojen; uterusun damarlanmasını, kas kitlesinde artışı sağlayarak infantil uterusu erişkin tipe dönüştürür. Serviksin müsküler yapıda olmayan dokuları da östrojenden etkilenir ve servikte yumuşama ile birlikte, epitelden mukus salgılanır. Östrojen yokluğunda, endometriyum atrofikleşir. Östrojen endometriyumun gelişmesini sağlar, ancak sekresyonun gerçekleşmesi için progesterona gereksinim vardır. Menopoz sonrası, uterus boyutlarındaki azalma östrojen yokluğuna bağlıdır (1, 2).

Hipotalamus-hipofiz aksı endometriyal siklus ve ovulasyonun düzenlenmesi açısından önemlidir. Hipotalamustan pulsatil olarak salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipotalamo-hipofizer portal sistem aracılığıyla hipofiz ön lobuna taşınır. GnRH etkisiyle hipofizin bazofilik gonadotrop hücrelerinden glikoprotein yapısındaki gonadotropinler folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salgılanır. Östrojenin üretimini, hipofizin ön lobundan salgılanan FSH ve LH kontrol eder. LH, ovulasyonun gerçekleşmesini sağlar, granüloza tabakası ve teka internayı aktif olarak hormon sentezleyen bir bez olan korpus luteuma dönüştürür. Ovaryumda üretilen östrojen ve progesteron hipotalamus üzerine etki ederek GnRH salınımını uyarır ya da baskılar (21).



Şekil 2: Menstrual siklus süresince endometriyumda oluşan değişiklikler üç ayrı fazda incelenir ve yaklaşık olarak 14. gününde LH'nin pik yapmasıyla ovulasyon gerçekleşir (22).

Östradiolün uterus üzerine kronik uygulamalarında uterus dokusunda medyana gelen değişiklikler ve vücut uterus ağırlığı araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Miyometriyum östrojenin etkisinde çok gelişir. Bu gelişme hem kas hücrelerinin büyümesi hem de bölünüp çoğalmaları ile sağlanır. Östrojen kullanımına bağlı olarak, birçok düz kas

hücreleri protein sekreti yapan hücrelerin ultrastruktural özelliklerine sahip olur ve aktif olarak kollagen sentez ederler. Böylelikle uterus kollagen muhtevasının önemli derecede artışına sebep olur (23).

4.4. N-ASETİL SİSTEİN (NAS)

NAS, L-sistein amino asidinin asetillenmiş varyantıdır. Sülfidril gruplarının mükemmel bir kaynağı olmakla beraber, hücre içi GSH prekürsörü olarak, detoksifikasyon ve serbest radikalleri yakalama konusunda başrol oynamaktadır. GSH azalması ya da oksidatif stres gibi olaylarla karakterize edilen HIV enfeksiyonu, kanser, kalp hastalıkları ve sigara kullanımı gibi koşullarda yararlı etkileri görülmüştür. NAS'ın akut ağır metal zehirlenmelerinde tedavi edici ajan olarak kullanılması da diğer bir klinik kullanım alanıdır (7, 24).

NAS'ın hücre siklusunun ilerlemesi üzerindeki etkisi henüz tamamlanmamış olup, farklı hücre serilerinde G₁/S fazları geçişinde siklusu durdurduğu gözlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bir antioksidan olan NAS'ın, aynı zamanda protein kinaz aktivasyonunu ve mitojenik cevapla ilişkili gen ekspresyonunu bloke ettiğini göstermektedir (25). T lenfositleriyle yapılan bir çalışmada, NAS'ın interlökin (IL) 2 ve IL-12 ile uyarılmış T hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. NAS'ın, 2D6 (T hücre klonu) hücrelerinde IL-12 aracılı proliferasyona ket vurduğu gözlenmiştir (26). Pankreatik karsinoma hücre soylarıyla yapılan bir çalışmada ise, NAS'ın konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu suprese ettiği ve intraselüler glutatyon içeriğinde belirgin artış yarattığı bildirilmiştir. NAS uygulaması sonrasında G₁ fazındaki hücrelerin yüzdesi, kontrol grubunda görülen yüzdeden belirgin olarak daha yüksek bulunmuş, NAS ile muamele edilen karsinoma hücrelerinin siklin D1 ekspresyonu, NAS ile muamele edilmeyen hücrelere göre belirgin olarak azalmıştır (24).

Klomifene dayanıklı polikistik over sendromlu hastaların infertilite tedavisinde kullanılmakta olan NAS ile ilgili yapılmış ilk çalışmalar, kanser önleyici bir ilaç olabileceğini ve böbrek yetmezliği hastalarında gentamisine uyarılmış işitme kaybı profilaksisinde kullanılabileceğini önermiştir (27). NAS'ın antimutajenik ve antikarsinojenik özellikleri; antioksidan aktivitesi, intraselüler redükte edilmiş GSH prekürsörü gibi davranma özelliği, detoksifikasyon modülasyonu, DNA tamir işlemleri

gibi birden çok koruyucu mekanizmayla ilişkilendirilmektedir (28).

4.5. NÜKLEER FAKTÖR-KB (NF-KB) SİNYAL İLETİ YOLU

NF-KB, ilk kez B lenfositlerinde tanımlanmış bir transkripsiyon faktörü olup tüm hücrelerde bulunur. İmmün sistem, inflamatuvar yolak ve apoptoziste önemli rol oynamaktadır. NF-KB regülasyonunda bozulma; graft versus host hastalığı, kanser ve akut inflamatuvar hastalıklar gibi birçok patolojide rol oynar. NF-KB, rel mutajen ailesine bağlı bir transkripsiyon faktörüdür. Beş alt tipi tanımlanmış olup, hepsi rel-homoloji domain denen amino-terminal bir alan içerirler. Bu terminal alan; DNA bağlanma bölgesi, dimerizasyon alanı ve nükleer lokalizasyon sinyal bölgesi içerir (29).

Protein kinaz C ile stimüle edilen immün yanıtlarla ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan NF-KB proteini, sitoplazmada inhibitör bir alt ünite (I-KB) ile kompleks oluşturur. Uyarılan hücrede, I- KB kinaz ile inhibitör ünite fosforile olur, sonrasında inhibitör ünite 26S proteozom aracılığı ile yıkılır ve NF-KB sitoplazmada serbest kalır. Serbest NF-KB, nukleusa transloke olur ve transkripsiyon genlerini aktive eder (1, 30).

Sitoplazmada inaktif olarak bulunan NF-KB proteinleri, bakteriyel yapı taşları, oksidatif stres ve protein sentez inhibitörleri ile aktive olmaktadır. NF-KB, IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinleri, interselüler adhezyon moleküllerini, antijen sunucu hücreleri ve siklooksijenaz enzim genlerini kontrol eder (31).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

1. 17- β -Östradiol, Sigma
2. NaCl, Atabay AT091-950
3. Na₂HPO₄, Riedel-de Hæn 81890
4. NaH₂PO₄, Riedel-de Hæn 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-IC
10. Fetal Sığır Serumumu, Seromed S0115
11. Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
12. Anti-NF-KB antikoru, Santa Cruz, Sc-109
13. Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
14. Aminoetilkarbazol (AEC), Zymed -00-2007
15. Metanol, Riedel-de Hæn 24229
16. Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
17. DMSO, Sigma D 2650
18. Borik Asit, Sigma B0252
19. Sodyum tetra borat, Sigma B0127
20. N-asetil sistein, Bilim İlaç A.Ş.

5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Hücre Kültürü

Ishikawa hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotik (100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's/F12) medyumunda flasklar içerisinde 37°C'de %5CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde büyütüldü. Çalışmada dört deney grubu oluşturuldu; kontrol grubu, östrojen uygulanan grup, NAS ve östrojen grubu ve yalnızca NAS uygulanan grup.

Deneyleerde, kontrol grubu hücreler normal medyumları içerisinde tutuldu. Östrojenin etkilerini belirlemek amacıyla oluşturulan deney grubunda medyum içerisine 17-β-östradiol (2,5 µM) eklendi. NAS; 10, 20, 50 mM konsantrasyonlarda uygulandı. Hücre proliferasyonunun değerlendirileceği gruplarda belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyon yapıldı. NF-KB sinyal yoluyla ilişkisini incelemek üzere 24 saatlik inkübasyonu takiben anti-NF-KB primer antikoru uygulanarak immünositokimyasal olarak ekspresyon düzeyleri incelendi.

5.2.2. İmmünositokimya

5.2.2.1. BrdU İmmünositokimyası

Düzenlenen deney gruplarına ait hücreler fiksasyon öncesi BrdU (1mM) ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Metanolle fiksasyon sonrası hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C'de 30 dakika denatüre edildi ve takiben borat tampon (pH:8) ile nötralize edildi. PBS ile yıkandıktan sonra spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için non-immün serumla 20 dakika bloklama işleminin ardından anti-BrdU primer antikoru (NeoMarkers) ile 0.5/100 dilüsyonda, oda ısısında 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkamalar sonrası sırasıyla; biyotin-bağlı ve streptavidin peroksidaz sekonder antikoları (Histostain Plus Kit, Zymed) 20'şer dakika süreyle uygulandı. Spesifik renk reaksiyonunu görüntülemek amacıyla AEC kromojeni uygulandı. Son olarak kapatma işleminden önce zıt boya olarak hematoksilen boyaması yapıldı.

5.2.2.2. NF-KB İmmünohistokimyası

Yapılan konsantrasyon çalışmalarında en etkin doz belirlendi ve 50 mM NAS uygulanan gruplarda NF-KB sinyal yolu aktivasyonu değerlendirildi. Lameller üzerine ekilmiş olan hücreler -20°C'de metanol ile fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaların engellenebilmesi için non-immün serumla (Histostain Plus Kit, Zymed) 20 dakika süreyle bloklama işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında anti-NF-KB monoklonal primer antikorla inkübe edildi. Takiben biyotinle işaretli sekonder antikor uygulandı. PBS yıkamalarını takiben streptavidin enzim konjugatıyla 20 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar edilen PBS yıkamalarının ardından AEC kromojeni uygulandı. Kromojen aşamasında, invert mikroskopta yapılan incelemede spesifik renk reaksiyonu izlendikten sonra reaksiyon durduruldu. Su bazlı kapatma solüsyonuyla örnekler kapatıldı.

5.2.2.3. İstatistiksel İnceleme

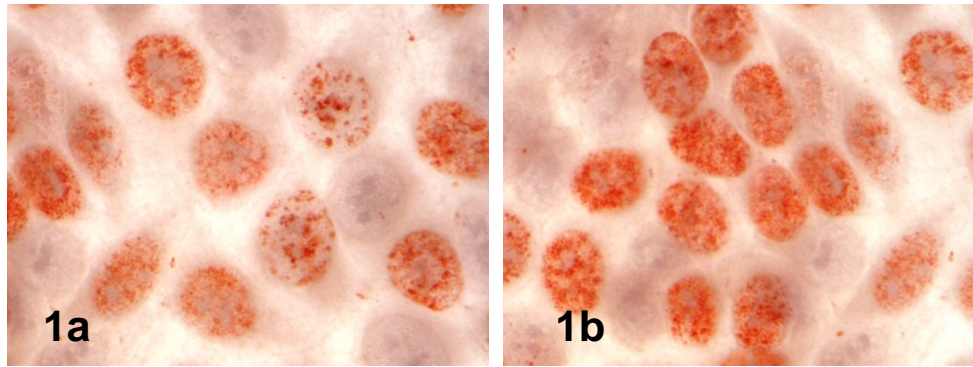
BrdU işaretli S fazındaki hücreler üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının değerlendirilmesiyle hesaplandı. Proliferasyon indeksi, mikroskop alanındaki pozitif işaretli hücrelerin/toplam hücre sayısına oranı alınarak bulundu.

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 kabul edildi.

6. BULGULAR

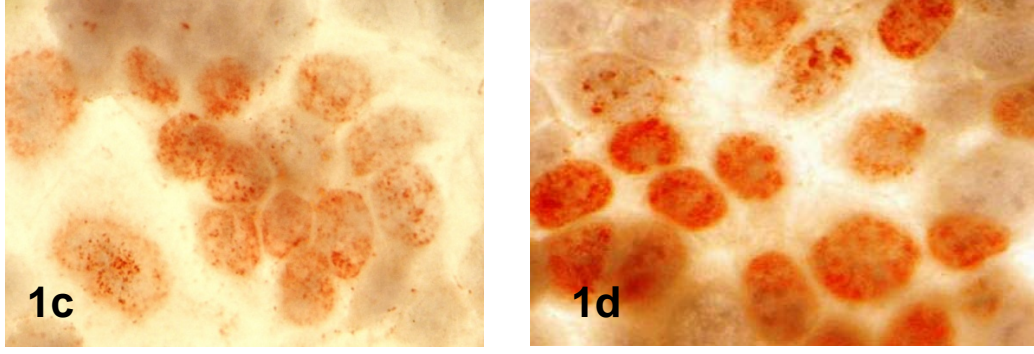
6.1. BROMODEOKSİÜRİDİN İŞARETLİ HÜCRE ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm deney gruplarında S fazındaki hücreler anti-BrdU antikoruyla işaretlendi, immünpozitif hücrelerin yüzdesi hesaplanarak S faz hücre oranları belirlendi (Şekil 3). Kontrol grubu Ishikawa hücrelerinin S faz hücre oranıyla (50.15 ± 4.35) (Resim 1a) 17- β -östradiol uygulanan hücre oranı (56.82 ± 6.22) (Resim 1b) karşılaştırıldığında bu oranın istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$).



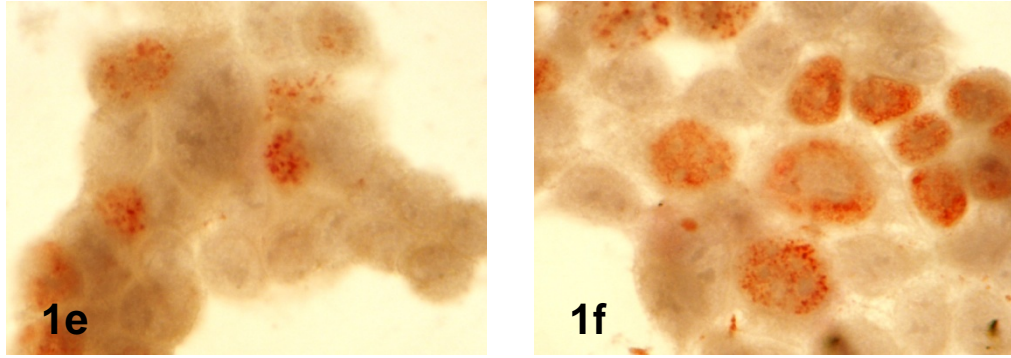
Resim 1a,b: Kontrol grubu Ishikawa hücrelerinde BrdU işaretli S fazı hücreleri (a), 17- β -östradiol uygulanan hücrelerde artmış BrdU inkorporasyonu ve hücre proliferasyonu (b). Hematoksilen-X600

10 mM NAS uygulanan hücrelerdeki S faz hücre oranı (50.40 ± 6.38) (Resim 1c) ve 10 mM NAS ile birlikte 17- β -östradiol uygulanan gruba ait S faz hücre oranı (54.28 ± 7.25) (Resim 1d) kontrol grubu değeriyle karşılaştırıldığında istatistiksel bir fark izlenmemiştir ($p > 0.05$).



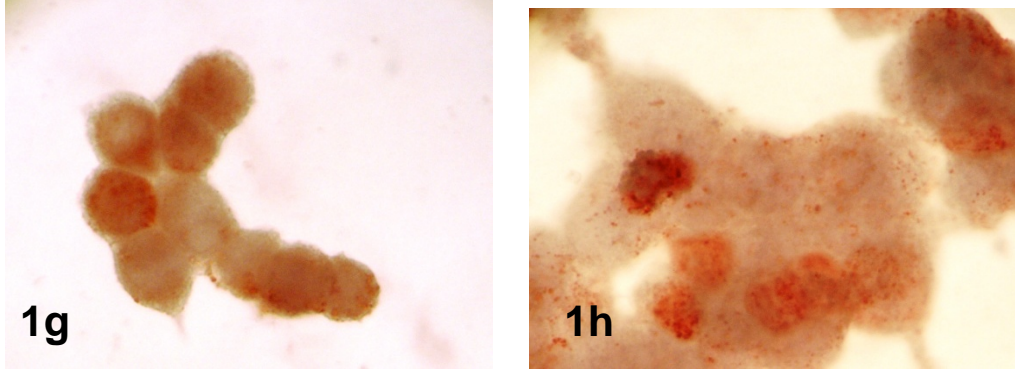
Resim 1c,d: Yalnızca NAS (c) ve 17- β -östradiol ile NAS (10 mM)'ın birlikte uygulandığı (d) deney gruplarında hücre proliferasyonu. Hematoksilen-X600

Yalnızca 20 mM NAS uygulanan Ishikawa hücrelerinde S faz hücre oranı (42.08 ± 8.68) (Resim 1e) kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$). 20 mM NAS ile birlikte 17- β -östradiol uygulanan gruba ait S faz hücre (46.16 ± 8.87) (Resim 1f) oranının ise azaldığı ancak kontrol grubu değeriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği saptandı ($p > 0.05$).

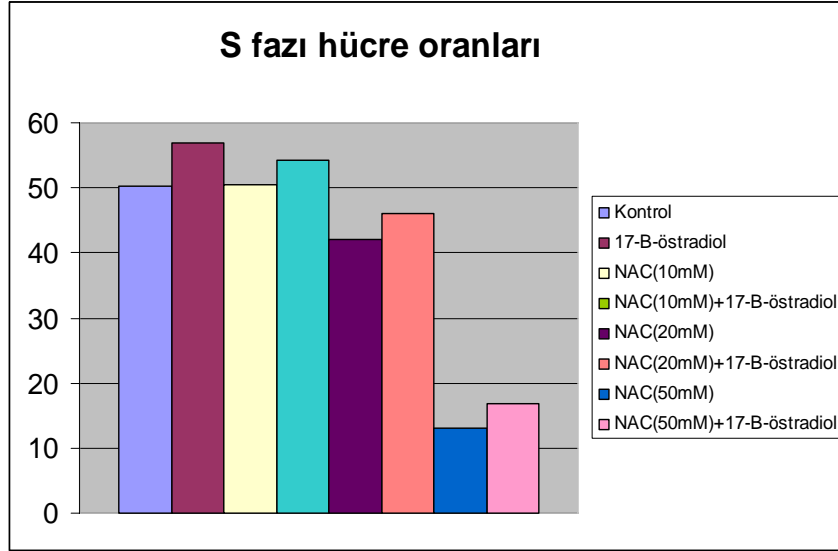


Resim 1e,f: 20 mM NAS uygulanan Ishikawa hücrelerinde (e) ve 17- β -östradiol ile birlikte 20 mM NAS uygulanan deney grubunda S faz hücre oranı (f). Hematoksilen-X600

50 mM NAS uygulanan Ishikawa hücrelerinde BrdU işaretli S faz hücre oranı (13.06 ± 3.57) (Resim 1g) ve 50 mM NAS ile birlikte 17- β -östradiol uygulanan deney grubundaki S faz hücre oranı (16.72 ± 4.74) (Resim 1h) kontrol grubu değeriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$).



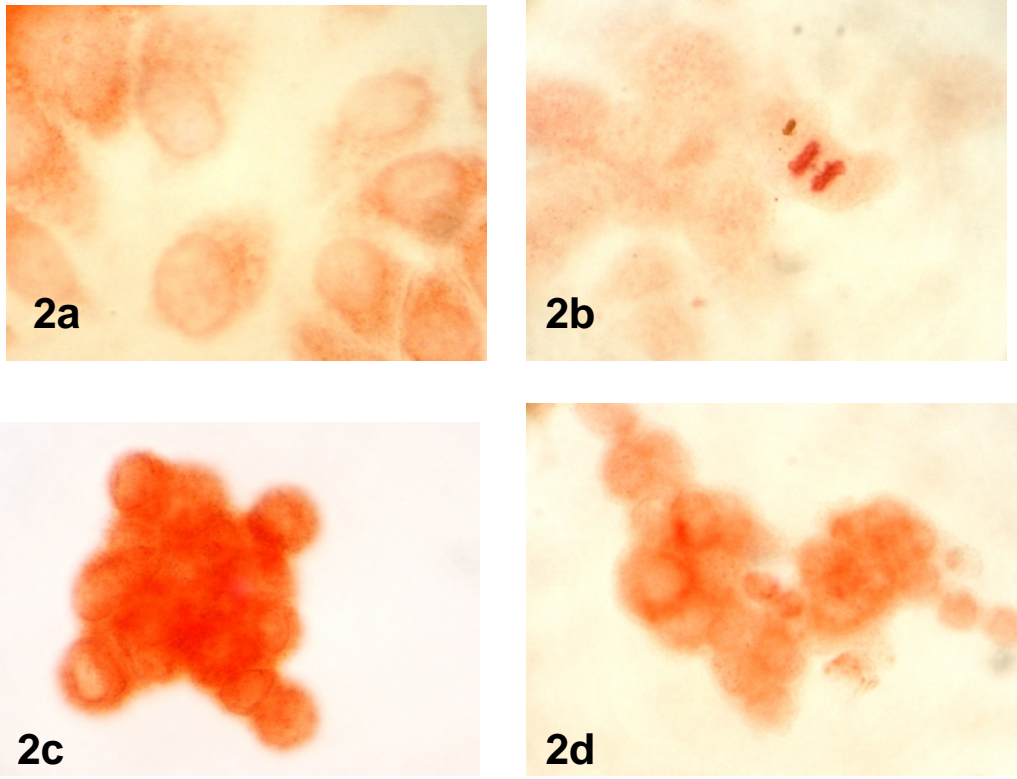
Resim 1g,h: 50 mM NAS uygulanan (g) ve 17- β -östradiol ile birlikte 50 mM NAS uygulanan (h) deney gruplarında azalmış S faz hücre oranları. Hematoksilen-X600



Şekil 3: Tüm Deney Gruplarına Ait BrdU Pozitif S Faz Hücre Oranları Yüzdesi.

6.2. İMMÜNOSİTOKİMYASAL NF- KB EKSPRESYONU

Yapılan konsantrasyon çalışmaları sonrasında NAS'ın proliferasyonda maksimum inhibisyon oluşturan 50 mM dozu en etkin konsantrasyon oranı olarak kabul edildi. Bu konsantrasyon kullanılarak oluşturulan deney gruplarında NF-KB sinyal yolu aktivasyonu değerlendirildi. Kontrol (Resim 2a), 17- β -östradiol (Resim 2b) uygulanan gruplarda benzer NF-KB ekspresyonu izlendi. Ancak 50 mM NAS uygulanan grupta (Resim 2c) sitoplazmik NF-KB'nin nukleusa transfer olduğu gözlemlendi. NAS ve 17- β -östradiolün birlikte uygulandığı grupta ise NAS'ın nukleus ekspresyonunun azaldığı ve kontrole yakın bir immünreaktivite gösterdiği saptandı.



Resim 2a-d: NF-KB ekspresyon düzeyleri. Kontrol grubu (2a), 17- β -östradiol (2b), 50 mM NAS (2c) ve NAS ile 17- β -östradiol uygulanan (2d) deney grupları. Hematoksilen-X600

7. TARTIŞMA

İnsan endometriyumunun regülasyonu östrojen ve progesteron hormonları tarafından gerçekleştirilir. Endometriyumun proliferasyonu başlıca östrojen, özellikle de 17- β -östradiol tarafından kontrol edilmektedir. Progesteron ise östrojenin etkilerini antagonize eder. Progesteron etkisini, hedef hücrede östrojen tarafından indüklenmiş progesteron reseptörü aracılığıyla gösterir. Bu etki üç ana mekanizma ile gerçekleşmektedir; östrojen reseptör sentezini inhibe ederek, östradiolü daha az potent östrojen olan östrona çeviren östradiol dehidrogenaz enzim aktivitesini arttırarak, östrojeni sulfürlasyon ile inaktive ederek (32, 33).

Embriyo implantasyonu için gerekli endometriyal değişiklikler östrojen ve progesteron hormonlarının kontrolü altında gerçekleşir. Blastosist implantasyonu için gerçekleşen ilk olay desidualizasyondur. Bu süreç, stromal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması sonucunda desidual hücelere dönüşmesi ile karakterizedir (2). Proliferasyonun gerçekleşebilmesi için hücre belirli siklulardan geçerek çoğalmaya gider. Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması (replikasyonu) hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilirler. Hücre siklusunu oluşturan G₁, S, G₂, M fazlarından G₁-S ve G₂-M fazlarında bulunan kontrol noktaları sayesinde siklus sıkıca denetlenmektedir (14). Hücre döngüsünün denetim noktalarını oluşturan sistemler, kromozomların doğru düzenlenme-ayrılmalarından ve genomun bütünlüğünün sürdürülmesinden sorumlu olduğundan bu sistemlerdeki hatalar kanser hücrelerindeki aneuploidilerin ve genomik kararsızlığın asıl nedeni olabilmektedir. Bu nedenle de tedavide ilaç hedefleri arasında yer almaktadır (34). Menstrual kanama sonrasında ovulasyondan önceki LH pikine kadar olan dönem proliferatif evredir ve bu evrede en aktif olan hormon deney gruplarımızda uyguladığımız 17- β -östradioldür (35).

NAS'ın endometriyal hücre proliferasyonu üzerine etkilerini araştırdığımız çalışmamızda kullanmış olduğumuz, iyi diferansiye insan endometriyal adenokarsinoma hücreleri olan Ishikawa hücreleri, östrojen ve progesteron reseptörü pozitif olup in-vitro endometriyum araştırmaları için tercih edilen bir modeldir (36).

Fibroblastlarda yapılan bir çalışmada, NAS'ın hücreleri G₁ fazında bloke ettiği bildirilmiştir. NAS'ın bu etkisini siklin D1 protein düzeylerini azaltarak gerçekleştirdiği saptanmıştır. NAS 5, 10 ve 20 mMol/L konsantrasyonlarda uygulanmış ve NAS'ın artan doza paralel olarak siklin D1 protein düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (37). Biz de çalışmamızda doza bağlı olarak S faz hücre oranlarının azaldığını ve istatistiksel olarak anlamlı azalmanın 20 mMol/L konsantrasyonda gerçekleştiğini tespit ettik. Ancak 17- β -östradiol eklediğimiz grupta östrojenin NAS'ın bu etkisini kısmen bloke ettiğini ve hücre proliferasyonundaki azalmanın yalnızca NAS uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu izlendi. Östrojen uygulanan gruplarda, NAS'ın proliferasyon inhibisyonu üzerindeki etkisinin sadece NAS uygulanan gruba göre azalmış olması endometriyumdaki etkilerini farklı hücre ve organlarda yapılmış mevcut çalışmalardan ayırmaktadır. Bu sonucumuzun literatüre yeni bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Ayrıca NAS'ın etkilerinin zamanla ilişkili olarak farklılık gösterdiği ileri sürülmüştür. 24 saatlik bir süreçte antioksidan etkisinin ön planda olduğu ve yine zamana bağlı olarak belli dozlarda NF-KB ve MAPK sinyal yolları üzerinden etki gösterdiği ancak ilk 1 saatlik süreçte saptanan etkisinin prooksidan özellikte olduğu ileri sürülmüştür (38).

Tümör, hücre siklusu, apoptoz ve inflamasyon gibi süreçlerde rol oynayan sinyal yolu son yıllarda pek çok araştırmaya konu olmuştur (39, 40). Yapılan çalışmalar sitokinler ve kemokinler gibi proinflamatuvar mediatörlerin gen ekspresyonunda NF-KB'nin rol oynadığını göstermektedir. TNF- α ve IL-1 gibi prooksidan sitokinler spesifik I κ B-kinase kompleksini aktive ederek I κ B'nin fosforile olmasına yol açmakta ve ubiquinasyonunu takiben I κ B'nin proteozom aracılı yıkımına yol açmaktadır. I κ B'nin yıkımıyla sitoplazmada serbest kalan NF-KB nukleusa transfer olmakta ve ilişkili DNA bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlemektedir (41). Antioksidan özellikteki NAS'ın doğal bir NF-KB inhibitörü olarak nukleus translokasyonunu engellediği bildirilmiştir (42). Ancak çalışmamızda maksimum hücre proliferasyon inhibisyonu sağlayan yüksek konsantrasyonda 50 mMol/L NAS'ın bir antioksidan gibi davranmadığını NF-KB'nin nukleusa transferine yol açtığını gördük. NAS'ın NF-KB inhibisyonuna yol açtığını kabul eden genel görüşün yanı sıra çalışmamızda tanımladığımız NF-KB aktivasyonunun daha önce konsantrasyona ve zamana bağlı olarak bildirilen farklı prooksidan etkileriyle paralel gelişen bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz.

8. SONUÇ

- Çalışmamızda, endometriyum epitel hücreleri için model teşkil eden Ishikawa hücrelerinde 17- β -östradiol, NAS ve her ikisinin birlikte endometriyum hücreleri üzerine olan etkisi ve bu etkinin NF-KB sinyal yoluyla ilişkisi değerlendirildi.
- 17- β -östradiolün endometriyum epitel hücrelerinde kontrol grubuna göre, hücre proliferasyonunu anlamlı olarak artırdığı görüldü.
- Ishikawa hücrelerine 10-50 mM arası değişen konsantrasyonlarda uygulanan NAS'ın, hücre proliferasyonu üzerine en belirgin etkilerinin 20 mM ve üzeri konsantrasyonda gerçekleştiği izlendi.
- 17- β -östradiol ile birlikte uygulanan 20 mM NAS'ın, S faz hücre sayısında anlamlı olmayan bir azalmaya, NAS'ın tek başına uygulandığı deney grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığı görüldü.
- Hücrelerde en fazla S faz inhibisyon oranının 50 mM konsantrasyon grubunda olduğu tespit edildi.
- En yüksek proliferasyon inhibisyonunun tespit edildiği 50 mM NAS konsantrasyonunda NF-KB'nin nukleusa transloke olduğu gözlemlendi. 17- β -östradiol ve NAS'ın birlikte uygulandığı deney grubunda nükleer NF-KB ekspresyonunun azaldığı ve kontrol immünpozitifliğine yakın düzeyde eksprese olduğu izlendi.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her türlü destek ve yardımlarını benden esirgemeyen, her zaman yanımda olup bana yol gösteren ve bu çalışmanın ortaya çıkarılmasında büyük emeği geçen tez danışmanım değerli hocam sayın Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e,

Bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan sayın Prof. Dr. Vildan KARPUZ'a, deneysel çalışmaların gerçekleşmesinde emeği geçen ve büyük yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Melike ERSÖZ'e ve Türkan SARIOĞLU'na, sadece tezin ortaya çıkması için gerekli koşulları sağlamada değil arkadaş olarak da manen verdiği destek için İlknur KARAOSMANOĞLU'na, Yüksek Lisans eğitimim boyunca beraber çalıştığım ve birçok şeyi paylaştığım sevgili dönem arkadaşlarıma,

Ayrıca hayatımın her aşamasında karşılıksız olarak sağladıkları maddi ve manevi imkanlarla bana destek olup hep güvenen canım aileme, gösterdiği sabır ve anlayış için sevgili eşime,

EN İÇTEN TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Handan USTA

10. KAYNAKLAR

1. Abraham L, Kierszenbaum MD, PhD. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
2. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006.
3. Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. Molecular cloning of Cdna coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Embo J.* 1987, 6: 637-642.
4. Hegele-Hartung C, Mootz U, Beier HM. Luteal control of endometrial receptivity and its modification by progesterone antagonists. *Endocrinology.* 1992, 131:2446-2460.
5. Sherr CJ and Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev.* 2004, 18: 2699-2711.
6. Kim KY, Rhim TY, Choi I, Kim SS. N-Acetyl cysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing activity. *J Biol Chem.* 2001, 276: 40591-40598.
7. Kelly GS. Clinical applications of N-acetyl cysteine. *Altern Med Rev.* 1998, 3(2):114-27.
8. Henweeer C, Schmidt M, Denker HW, Thie M. Molecular mechanisms in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in human uterine Ishikawa cells. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2005, 2: 4.
9. Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell.* 2002, 15: 104-117.
10. Shankland SJ, Wolf G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: Role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000, 278(4):515-529.
11. Morgan DO. The cell cycle: principles of control. USA, New Science Press, 2007.
12. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996, 274;1672-1677.
13. Ay ME, Terzioğlu O, Terzi C, İzci Ay Ö. Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi.* 2006, 5 (1): 20-25.
14. Yang J, Kornbluth S. All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol.* 1999, 9: 207-210.
15. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/cellcycle_eng.jpg.
16. Durmaz R, Vural M. Primer ve sekonder glioblastoma multiforme genetiği. *Türk Nöroşirürji Dergisi.* 2007, 17: 80-90.

17. Dönmez M. Larinksin yassı epitel hücreli karsinomlarında p16 ekspresyonu ve HPV ile ilişkisi. *İstanbul İl Sağlık Müdürlüğü Derg.* 2005, 10(12): 62-65.
18. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinol.* 2006, 147:1097–1121.
19. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod.* 2004, 10(12):879–893.
20. Selam B, Kayışlı ÜA, Mülayim N, Arıcı A. Regulation of fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Of Reprod.* 2001, 65: 979–985.
21. Ulusal aile planlaması hizmet rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü Yayını. Ankara, 2000.
22. <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/images/Menstrual%20&%20ovarian%20cycles.jpg>.
23. Saruhan BG, Ketani MA. Ovaryektomi yapılan sıçanlara ekzojen verilen östrojenin uterus bağ ve kas dokularına etkilerinin araştırılması. *Dicle Tıp Dergisi.* 2005, 32:2, 52-56.
24. Kusano C, Takao S, Noma H, Yoh H, Aikou T, Okumura H, Akiyama S, Kawamura M, Makino M, Baba M. N-acetyl cysteine inhibits cell cycle progression in pancreatic carcinoma cells. *Hum Cell.* 2000, 13(4):213-220.
25. Sekharam M, Trotti A, Cunnick JM, Wu J. Suppression of fibroblast cell cycle progression in G1 phase by N-Acetyl cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998, 149: 210–216.
26. Park CS, Park WR, Sugimoto N, Nakahira M, Ahn HJ, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H. Differential effects of N-Acetyl-l-cysteine on IL-2 vs IL-12 driven proliferation of a T cell clone: implications for distinct signalling pathways. *Cytokine.* 2000, 12: 1419-1422.
27. Millea PJ. N-acetyl cysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician.* 2009, 80(3):265-269.
28. Van Zandwijk N. N-acetyl cysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1995, 22: 24-32.

29. Tripathi P, Aggrawal A. NF-KB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Sci.* 2006, 90: 519-531.
30. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8(1):49-62.
31. Durusoy Ç, Ulusal BG. Herbal therapy in dermatology-phytotherapy. *Turkish Journal of Dermatology.* 2007, 1: 47-50.
32. Bergqvist A, Fernö M. Endometriosis: Oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison of different cycle phases and ages. *Hum Reprod.* 1993, 8: 2211 - 2217.
33. Kartal A, Saygılı H, Özgüven Ö, Akhan SE, Baysoy A, Jamal H, Turfanda A. Endometrial hiperplazi saptanan ve saptanmayan, normal premenopozal kadınlar arasında endometrial histopatoloji, endometrial kalınlık, telomeraz aktivitesi ve VKİ ilişkisi. *İstanbul Tıp Dergisi.* 2004, 3: 1-7.
34. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal.* 2008, 21(3):282-295.
35. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular clues to implantation. *Endocr Rev.* 2004, 25 (3): 341-373.
36. Castelbaum AJ, Ying L, Somkuti SG, Sun J, Ilesanmi AO, Lessey BA. Characterization of integrin expression in a well differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82: 136-142.
37. Menon SG, Sarsour EH, Kalen AL, Venkataraman S, Hitchler MJ, Domann FE, Oberley LW, Goswami PC. Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G₁ arrest: Regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 2007, 67: 6392-6399.
38. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997, 336:1066-1071.
39. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996. 87: 13-20.
40. Lindström TM, Bennett PR. The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction.* 2005, 130: 569 - 581.
41. D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): An emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv.* 2002, 2: 22-35.

42. Oka S, Kamata H, Kamata K, Yagisawa H, Hirata H. N-acetyl cysteine suppresses TNF induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaB kinases. *FEBS Lett.* 2000, 472(2-3): 196-202.