

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

**HORMONLARIN ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE
HÜCRE PROLİFERASYONUNU DÜZENLEYEN MEKANİZMALAR
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Biyolog Canan ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2008

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

**HORMONLARIN ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE
HÜCRE PROLİFERASYONUNU DÜZENLEYEN MEKANİZMALAR
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Biyolog Canan ASLAN

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. HÜCRE SIKLUSU	5
4.1.1. Hücre Siklusunun Kontrolü.....	6
4.1.1.1. p53 Proteini	7
4.1.1.2. p21 Proteini	8
4.1.2. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri	9
4.1.2.1. BrdU İnkorporasyonu	9
4.1.2.2. PCNA Ekspresyonu	9
4.2. ENDOMETRİYAL SIKLUS	9
4.3. HORMONLAR VE ENDOMETRİYUMDAKİ ETKİLERİ	11
4.3.1. Östrojen.....	11
4.3.2. Progesteron	12
4.3.3. HCG.....	12
4.4. ISHIKAWA HÜCRE SOYU	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. PCNA İmmünohistokimyası	15
5.2.2.2. BrdU İmmünohistokimyası	15
5.2.2.3. p53 ve p21 İmmünohistokimyası.....	16
5.2.3. Mikroskopik Değerlendirme.....	16
5.2.4. İstatistiksel İnceleme	17
6. BULGULAR	18
6.1. PCNA İŞARETLİ HÜCRE ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	18
6.2. BrdU İŞARETLİ HÜCRE ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	18

6.3. p53 PROTEİN EKSPRESYONU.....	20
6.4. p21 PROTEİN EKSPRESYONU.....	21
7. TARTIŞMA.....	22
8. SONUÇ.....	26
9. TEŞEKKÜR.....	27
10. KAYNAKLAR.....	28

SİMGE VE KISALTMALAR

AEC	: Aminoetilkarbazol
BrdU	: 5- bromo2'-deoksi-üridin
Cdk / CdkI	: Siklin bağımlı kinaz / Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
FBS	: Fetal sığır serumu
HCG	: İnsan koryonik gonadotropin hormonu
İSK	: İmmünotokimya
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PCNA	: Prolifere hücre nükleer antijeni
SHBG	: Seks hormonu bağlayan globulin

Araştırma Projesi No : HE/0232007

1. ÖZET

Endometriyum steroid hormonların kontrolünde, reproduktif yaşam süresince aylık siklus dönemlerinde dejenerasyon, proliferasyon ve diferansiyasyona uğrayan bir dokudur. Endometriyum hücrelerinin uğradığı bu biyolojik değişiklikler başlıca östrojen ve progesteron steroid hormonları tarafından düzenlenir. Gerçekleşen implantasyonu takiben ise insan koryonik gonadotropin hormonu (HCG) progesteronun devamlılığını sağlayarak gebelik sürecinde önemli bir rol üstlenir. Östrojen, endometriyumun epitel ve stromal hücrelerinin proliferasyonunda önemli rol oynar. Progesteron ise proliferasyonun inhibisyonu ve desidualizasyon olaylarının düzenlenmesinde görev alır.

Çalışmamızda Ishikawa endometriyum epitel hücrelerinde 17- β -östradiol, progesteron ve HCG'nin hücre proliferasyonu ve hücre siklusunun düzenlenmesinde rol oynayan p53 ile p21 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine olan etkileri incelendi. Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) nin immünohistokimyasal (İSK) boyaması ile hücre siklusunun G₁, S, G₂ ve M fazlarında olan hücreler işaretlendi. Ayrıca 5- bromo2'-deoksi-üridin (BrdU) işaretleme yöntemi ile S faz hücre oranları değerlendirildi. 17- β -östradiol uygulanan grupta PCNA işaretli hücreler ile kontrol grubu arasında bir fark izlenmedi ancak S faz proliferasyon oranında anlamlı bir artış tespit edildi. Proliferasyon oranında izlenen artış ile p53 ve p21 protein ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında bir ilişki gözlenmedi. Progesteron ve HCG uygulanan hücre gruplarının proliferasyon oranları ve p53, p21 protein ekspresyon düzeyleri ise kontrol grubuna çok yakın değerlerde tespit edildi.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, 17- β -östradiol, progesteron ve HCG hormonlarının deneyde uygulanan konsantrasyon ve sürelerde Ishikawa hücrelerinin proliferasyonunun düzenlenmesinde p53 ve p21 protein ekspresyon düzeylerini etkilemedikleri sonucuna varılmıştır.

2. SUMMARY

The endometrium is a tissue that can develop degeneration, proliferation and differentiation during monthly cycle periods during the entire duration of reproductive life, under control of steroid hormones. Oestrogen and progesterone steroid hormones primarily regulate the biological changes of endometrium cells. On the other hand, following the completion implantation, the human chorionic gonadotropine hormone (HCG) plays an important role in pregnancy by ensuring the continuation of progesterone. Oestrogen plays a major role in the proliferation of endometrium epithelium and stromal cells. On the other hand, progesterone regulates the proliferation inhibition and desidualisation processes.

The study examined the effect of 17- β -oestradiole, progesterone and HCG on cell proliferation and the effect of cell cycles regulating p53 and p21 protein on expression levels of Ishikawa endometrium epithelium cells. Cells in the G₁, S, G₂ and M phases of cellular cycle were marked with immunohistochemical (ISK) marking of proliferated cell nuclear antigen (PCNA). S phase cell rates were also assessed using 5- bromo 2-deoxy-uridine (BrdU) marking method. No difference was observed between the PCNA marked cells and control group subject to 17- β -oestradiole however, a significant increase was recorded in the rate of S-phase proliferation. No relation was identified in the comparison of increase in proliferation rate and p53 and p21 protein expression levels. The proliferation rates of cells subject to progesterone and HCG and p53 and p21 protein expression levels were identified to have very close values to control group.

In light of the findings, it has been concluded that the 17- β -oestradiole, progesterone and HCG hormones at concentrations and durations of experiment, do not effect the p53 and p21 protein expression levels during the proliferation regulation of Ishikawa cells.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar, fonksiyonel ve bazal tabaka olarak adlandırılır (1). Endometriyal siklus evrelerinin kontrolü östrojen ve progesteron hormonlarının kontrolünde gerçekleşir (2). Östrojenler 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, menstürasyon sırasında kaybedilen endometriyumun yeniden oluşmasını sağlar (1). Progesteron östrojenin etkilerini antagonize etmektedir (3). Ayrıca endometriyal bezlerin salgı yapmasına ve blastosistin implantasyonu için endometriyumun hazırlanmasına neden olur (4). Embriyonun endometriyuma implantasyonu uygun miktardaki östrojen ve progesteron ile sağlanır. İmplantasyonu takiben embriyonun trofoektoderm tabakasından farklılaşan sinsitiyotrofoblastlarca HCG sentezlenir. HCG ise plasenta görevi üstlenene kadar korpus luteumdan progesteron salınımını uyarır (1).

Hücre siklusunda geç G_1 ve S fazlarında sentezlenen ve DNA replikasyon proteini olan PCNA, anti-PCNA monoklonal antikörlerin varlığı ile proliferasyon hızını göstermede kullanılan bir proteindir. BrdU ise timidin analogu olup sadece S fazına özgü bir işaretleyici olarak kullanılır (5,6).

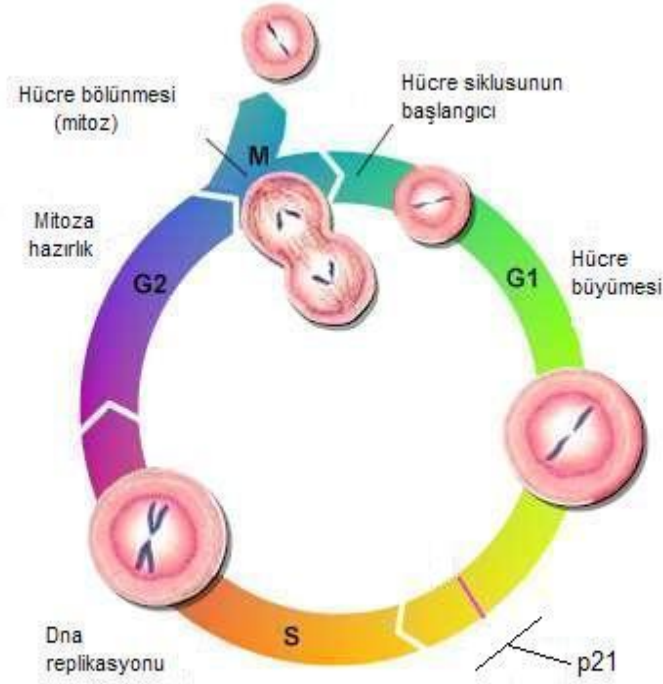
Hücre büyümesinin aktivasyonu siklin, siklin bağımlı kinazlar (Cdk)'lar aracılığı ile büyümenin inhibisyonu ise siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CdkI) proteinler aracılığı ile olmaktadır. p21, hücre siklusunu siklin-Cdk kompleksine bağlanarak regüle eden ve CdkI protein ailesinin bir üyesidir. Hücre siklusunun G_1 fazında durmasını sağlayarak negatif düzenleyici olarak işlev görür (7,8). Benzer şekilde hücre siklusunda önemli göreve sahip, tümör supressör genlerin en önemlilerden biri ve insan tümörlerinde genetik değişimin en sık hedefi olan p53, G_1 ve G_2 kontrol noktalarında siklusun durdurulmasında, G_2 fazının başlatılmasında ve devamlılığının sağlanmasında işlev görmektedir. Ayrıca DNA sentezi, onarımı ve programlı hücre ölümünün kontrolünde rol alır. p53'ün inaktivasyonu; hücrenin G_1 fazındaki kontrolünün değişmesi ve hücrenin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanmaktadır (9,10).

Çalışmamız da, endometriyum hücrelerinin in-vitro incelemeleri için uygun bir model olduğu kabul edilen Ishikawa hücre soyunda endometriyum fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alan östrojen, progesteron ve HCG'nin proliferasyon ve proliferasyonu düzenleyen p53 ve p21 protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu sürekli olarak bölünen bir hücrede birbirini izleyen iki mitoz arasındaki süreci kapsar ve dört fazdan oluşur. G₁- S- G₂ fazları üç basamaklı interfaz evresidir ve bu fazı izleyen dördüncü ve son basamak M fazıdır. G₀ fazı, vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğunun bulunduğu dinlenme evresi olarak isimlendirilen evredir. Uygun uyarılar olduğunda hücreler G₁ evresine geçerek döngüye katılırlar (Şekil 1).



Şekil 1: Hücre siklusunun şematik görünümü (11).

G₁ fazı: RNA ve protein sentezinin yapıldığı ve hücre siklusunun en uzun süren evresi olan G₁ fazının süresi, hücre tipine, hücrenin organizmadaki rolüne ve çevresel koşullara göre farklılık gösterebilir.

S fazı: 7-8 saat süren bu fazda DNA sentezi başlatılır. RNA ve protein sentezi de devam eder.

G₂ fazı: Bu faz boyunca hücrelerde DNA tamiri yapılır ve hücre mitozu hazırlanır. Eğer replike olmamış veya hasarlı DNA saptanırsa, G₂ fazında gecikme meydana gelerek bu hasar onarılmaya çalışılır. Bu kontrol noktasındaki enzimlerde oluşabilecek defektler kansere neden olabilir. Bu fazın süresi 1-6 saattir.

M fazı: 1-2 saat süren mitozun olduğu fazdır. Mitoz, hücrenin çekirdek ve sitoplazmasının bölünmesini içeren kısa bir zaman dilimidir ve iki hücre oluşmasıyla sonlanır. Profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere beş farklı fazdan oluşur (12-16).

4.1.1. Hücre Siklusunun Kontrolü

Çok hücreli organizmaların gelişimi için hücre proliferasyonunun düzenli olarak kontrol edilmesi gerekmektedir. Hücre siklusu düzenlenmesi Cdk ve çeşitli düzenleyici proteinler aracılığı ile sağlanır. Siklinler, hücre siklusunun sistematik biçimde işlevini sürdürmesini sağlayan proteinlerdir. DNA sentezinin öncesinde uyarılmaya başlarlar ve artış gösterirler. Aktif Cdk kompleksinin sentezi ve inhibisyonu CdkI ile de düzenlenir. Cdk aktivitesi düzenli olarak kontrol edilmez ise bu durum artmış hücre çoğalmasına ve genomik instabiliteye neden olur ve bu da hücrenin ölümsüzlük kazanması veya kanserleşmesi ile sonuçlanır. Hücre siklusunda Cdk'ların aktivitesini düzenleyen ve negatif kontrolünden sorumlu olan CdkI'leri 1993-1995 yıllarında tanımlanmışlardır. CdkI'lar; INK4 ve Cip/Kip olmak üzere iki alt sınıfa ayrılırlar. Her bir sınıf üyesinin inhibisyon hedefleri farklıdır. INK4 sınıf üyeleri p15, p16, p18 ve p19, Cip/Kip protein ailesi ise p21cip, p27 kip ve p57 kip2'den oluşur (10,17,18). DNA hasarı sonucu, Cdk inhibitörü p21' in transkripsiyonunu aktive eden p53 uyarılır. p21, siklin-Cdk komplekslerinin genel bir inhibitörüdür ve PCNA'ya bağlanarak DNA replikasyonunu inhibe eder. Böylece hücre siklusu durdurularak, hasarlı DNA'nın replike olmadan önce onarılması için gerekli zaman sağlanır (8).

4.1.1.1. p53 Proteini

p53 proteini 53 kd'luk bir protein olup, p53 geni tarafından kodlanır. p53 geni ilk defa David Lane tarafından 1979'da tarif edilmiştir (19) bu genin ilk yıllarda sadece onkogen görevine sahip olduğu düşünülmüştür fakat daha sonraları normal p53 geninin tümör oluşumunu baskıladığı, yalnızca mutant formunun anormal hücre büyümesinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Tümör supressör genlerin en önemlilerden biri ve insan tümörlerinde genetik değişimin en sık hedefi olan p53, 17. kromozomun kısa kolunda yerleşik (10), 20kb uzunluğunda olan, üzerinde İSK'sal yöntemler yanında sitogenetik ve moleküler düzeyde en fazla çalışma yapılmış olan gendir (19-23).

Normalde düşük seviyelerde bulunan p53 proteininin, hücreler DNA hasarına maruz kaldığında veya anormal bir şekilde bölünmeye başladığında miktarı artar (19,24).

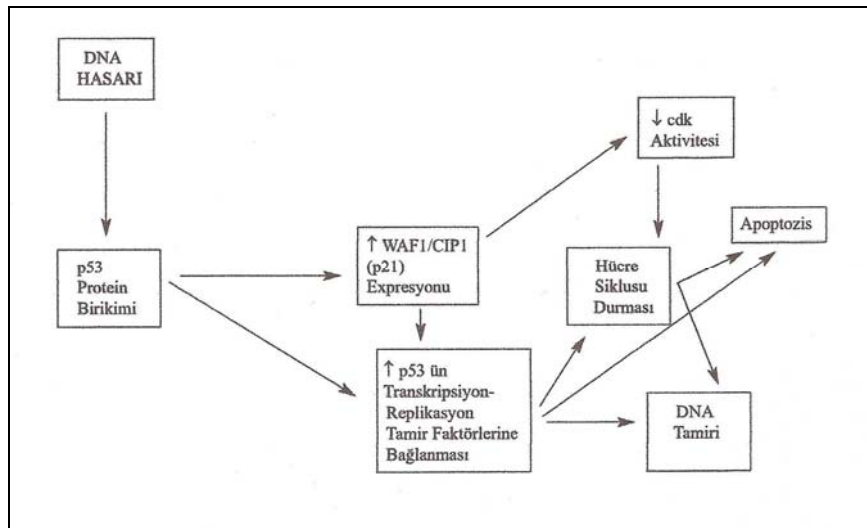
p53, hücre çoğalmasını kontrol etmektedir. DNA sentezi, onarımı, apoptozun kontrolünde rol alır, nukleusta etkilidir, hücre siklusunu inhibe eder. DNA hasarı oluştuğu zaman, p53'ün hücre içinde miktarı artarak hücre siklusunu G₁ fazında durdurur. Bu duraklama DNA hasarının tamir edilmesi için gerekli olan zamanı sağlar. p53 bu görevini p21 olarak bilinen CdkI'nü aktive ederek gerçekleştirir. Hasarlı DNA onarırsa hücre siklusu kaldığı yerden devam eder. Eğer DNA hasarı düzeltilemez ise hücre bölünmesine devam etmez ve apoptoza yönlendirilir (Şekil 2). Onarılmayan DNA hasarları kansere neden olabilecek mutasyonların oluşumuna neden olabilmektedir. p53, G₂ fazının başlatılmasında ve devamlılığının sağlanmasında işlev görmektedir. Mitozdan önce meydana gelen G₂ fazı ile DNA çift iplik yapısındaki kırık bölgelerin onarılması sağlanmaktadır (20-24).

Dünya genelinde her yıl yaklaşık olarak 6.5 milyon yeni kanser olgusu görülmektedir. Bu olguların yaklaşık 2.4 milyonunda ise p53 mutasyonlarının varlığından söz edilebilir (25).

İnsan ve hayvan kanserlerinde en sık rastlanılan moleküler olaylardan biri p53 genindeki anormalliklerdir ve p53 gen mutasyonu tüm insan kanserlerinin %30-70'sinde saptanmıştır. Bu gen, insan tümörlerinde en sık mutasyona uğrayan gen olarak bilinmektedir (26,27).

4.1.1.2. p21 Proteini

p21 proteini, CdkI adı verilen, hücre siklusunu siklin-Cdk kompleksine bağlanarak kontrol eden protein ailesinin bir üyesidir. Hücre büyümesinin aktivasyonu siklin ve Cdk'lar aracılığı ile büyümenin inhibisyonu ise CdkI proteinler aracılığı ile olmaktadır. p21, G₀ hücrelerde ya hiç eksprese edilmemekte ya da düşük miktarlarda eksprese edilmektedir. Hücre siklusunda p21, negatif düzenleyici olarak işlev görür ve temel işlevi hücre siklusunda Cdk'nın inaktivasyonudur. p21 bu işlevi ile siklin-Cdk komplekslerini inhibe ederek hücre siklusunun durmasına neden olur ve aynı zamanda apoptozda da önemli role sahiptir. DNA hasarının oluşması hücredeki p53 proteininin artmasına neden olur. p53 proteini ile aktive olan p21, Cdk'lara bağlanır ve hücre siklusunun G₁ fazında durmasına neden olur. Ayrıca p21, PCNA'ya bağlanarak hasarlı hücrede DNA replikasyonunu durdurur ve hasarın tamirine olanak tanır. p21, diğer bazı proteinler ile de etkileşime girerek, hücre siklusunda kontrolü dışında hücre yaşlanma, diferansiyasyon, apoptoz ve karsinogeneze de görev alır (Şekil 2) (7,8,18,19).



Şekil 2: DNA hasarı p53 birikimine neden olur. p53 birikimi, p21 gibi diğer genlerin ekspresyonlarını etkiler (24).

4.1.2. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri

4.1.2.1. BrdU İnkorporasyonu

Hücre proliferasyonu sırasında DNA sentezinin ölçülmesinde kullanılır. Bir nitrojen baz analogu olan BrdU, proliferasyondaki hücreleri işaretlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Timidin analogu olan BrdU, DNA replikasyonu esnasında timidinin yerini alarak DNA'nın yapısına girer ve İSK'sel yöntem ile görüntülenebilir (6,28).

4.1.2.2. PCNA Ekspresyonu

Prolifere olan hücreleri göstermek amacıyla kullanılan işaretleyicilerden biri olan PCNA, DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak fonksiyon gören, 36 kilodalton molekül ağırlığında, hücre proliferasyonu ile ilişkili nükleer nonhiston bir proteindir. İlk defa 1978 yılında Miyachi, sistemik lupus eritematozlu hastaların serumunda proliferere olan hücre antijenleriyle reaksiyon veren otoantikörlerin varlığını bildirmiştir. Mathews ve arkadaşları PCNA ile siklinin aynı protein olduğunu ortaya koymuşlardır. Prolifere olan hücrelerde PCNA seviyeleri G₁ fazının ortasında yükselmeye başlayarak S fazı boyunca yüksek kalır, G₂ ve M fazda tekrar azalmaya başlayarak G₁ fazındaki seviyeye düşer. PCNA'nın aynı zamanda polimeraz deltadan bağımsız olarak DNA tamir sentezinde görev aldığı bildirilmektedir (5,29,30).

4.2. ENDOMETRİYAL SİKLUS

Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar, menstruasyon sırasında dökülen fonksiyonel tabaka ve menstruasyon sırasında dökülmeyen, menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan bazal tabakadır.

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

1. Menstrual Faz: Bu evre siklusun başlangıcı olarak bilinir. Menstruasyon süresince endometriyumun yüzey ve orta tabakası dökülür, bazal tabaka sağlam kalır.

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

3. Sekretuar Faz: Ovulasyonun olduğu bu evre yaklaşık 13 gün sürer. Bu evre sırasında endometriyal bezler salgılamaya başlar. Bu dönemde korpus luteum büyür, gelişir ve işlevsel hale gelir. Bu evre, korpus luteumda üretilen östrojen ve progesteron tarafından kontrol edilir.

Eğer oosit fertilize olmazsa, ovulasyondan 10-12 gün sonra korpus luteumda gerileme ve dejenerasyon gözlenir. Östrojen ve progesteron düzeyleri düşmeye başlar, endometriyumda sekretuar fazın son günü gelişen iskemiye takiben menstrasyon başlar.

Eğer oosit fertilize olursa, endometriyum lamina propriyasındaki stromal hücreler artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar ve bu endometriyal değişiklikler desidual reaksiyon olarak adlandırılır. Desidual reaksiyon sonucunda endometriyal stromal hücreler büyür. Blastosistin implantasyonu, hormonal olarak hazırlanmış endometriyuma, desidual hücrelerle çevrilmiş ve salgılamaya yapan endometriyal bezlere bağlıdır. Ayrıca progesteron düzeyinin yüksek olması miyometriyumun oldukça hareketsiz kalmasını sağlar (1,4).

İnsan gelişimi fertilizasyon ile başlar. Fertilizasyon, birbiri ile ilişkili karmaşık olaylar dizisidir ve spermle oositin birleşmesiyle başlar. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra mitozun oluşturduğu yarıklanma ile oluşan 12 veya daha fazla blastomerli morula uterusu yol alır. Morulanın uterusu girmesinden kısa bir süre sonra morula içinde sıvıyla dolu bir boşluk gelişir ve böylece blastosist oluşur. Blastosist; iç hücre kitlesi, blastosist boşluğu ve trofoblast tabakasından oluşur (4).

İnsan embriyo implantasyonu; blastosistin duyarlı uterus endometriyumuna yapışması ile başlayan sıralı kompleks bir olaydır. Yapışmayı sağlamak için uterus epitel hücreleri trofoblastın apikal uçlarına bağlanma amacıyla gelişirler. Uterus hücrelerinin bu duyarlı durumu, azalmış glikokaliks kalınlığı ve apikal plazma membranındaki değişmiş protein ve glikoprotein kompozisyonu ile sağlanır (31).

Fertilizasyondan yaklaşık 6 gün sonra blastosist genellikle iç hücre kitlesine yakın bölgeden endometriyum epiteline tutunur ve hemen bunun ardından trofoblast tabakası iki farklı tabakaya ayrılır. Bu tabakalar sitotrofoblastlardan oluşan iç tabaka ve sinsitiyotrofoblastlardan oluşan dış tabakadır. Sinsitiyotrofoblastlar endometriyal epitel ve altındaki bağ dokusu içinde ilerlemeye başlar (4). Gelişen embriyodaki trofoblast hücreleri,

anneden fetusa oksijen ve besinlerin taşınması yanında implantasyon süreci esnasında blastosistin endometriyuma tutunmasından başlayarak gebeliğin başından sonuna kadar diğer işlevlerin yerine getirilmesinde de görevli hücrelerdir. Gebeliğin devamını sağlayan bu işlevler; uterus dokusuna düzenli invazyon, çoğalma, farklılaşma ve immuno-endokrin fonksiyonlardır (32). Koryondaki sinsitiotrofoblastlardan HCG üretilmeye başlar, bu hormon korpus luteumdan östrojen ve progesteron salgılanmasını devam ettirir. Yaklaşık 1 hafta sonra blastosist endometriyuma yüzeysel olarak implante olmuştur (4).

4.3. HORMONLAR VE ENDOMETRİYUMDAKİ ETKİLERİ

4.3.1. Östrojen

Doğal olarak vücutta sentezlenen östrojenler; östradiol, östriol ve östron'dur Etki gücü en yüksek olan östradioldür. Premenopozal dönemde östrojenin %75'i over kaynaklıdır. Postmenopozal dönemde ise adrenal korteks en önemli kaynaktır. Adrenal bezde sentezlenen androstenedion periferde östrojenlere dönüştürülür. Overlerde ise folikülün granüloza hücrelerinden sentezlenir, folikülün serbest kalmasıyla beraber korpus luteumdan östrojen üretilir (33).

Östradiol, α -2 globülin yapısındaki seks hormonu bağlayan globülin (SHBG) ve albüminle birlikte taşınır (34).

Östrojen endometriyumun gelişmesini sağlar. Uterusun damarlanmasını, kas kitlesinde artışı sağlayarak infantil uterusu erişkin tipe dönüştürür. Gebelikte uterustaki büyüme, öncelikle östrojene bağlıdır. Östrojenler endometriyum üzerine etki ederek hücre çoğalmasına yol açar ve mensturasyon sırasında kaybedilen endometriyumun yeniden oluşmasını sağlar. Östrojen üreme sisteminin diğer bölümleri üzerine etki ederek, örneğin oviduktun epitel hücrelerinde silya üretimini sağlar (1).

Oral kontraseptifler gibi östrojen düzeyini düşüren veya progesteron düzeylerini yükselten faktörler ve doğum sayısının artmasının endometriyum kanserine karşı koruyucu etkileri vardır (35). Ovaryal sıklusa bağlı olarak ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteronun etkisinde endometriyum siklik değişikliklerle implantasyona en uygun dokuyu hazırlar.

Östrojenler müller kanalından gelişen organ ve dokular üzerinde neoplazma oluşmasına ve hücrel proliferasyona neden olur. Bunun aksine progestagenler ise östrojenlerin hedef organlar üzerine olan etkilerini inhibe ederler veya kontrolünü yaparlar (36).

4.3.2. Progesteron

Progesteron adrenal korteksten, ovülasyonu takiben korpus luteum'dan elde edilir. Gebelik olduğu taktirde bir süre daha korpus luteumdan progesteron salınır. Korpus luteumun dejenere olmasıyla beraber plasentadan üretilir. Progesteron, gebeliğin hemen tüm evrelerinde plasentadan elde edilebilir. Bu da gebeliğin sürdürülmesinde gerekli olduğunu göstermektedir (4).

Östrojen ve progesteron dişi üreme sisteminin organlarını kontrol ederler. Epitel hücrelerinin ve bağ dokusunun çoğalması ve farklılaşması bu hormonların etkisiyle gerçekleşir (1, 37).

Progesteron miyometriyumun düz kas hücrelerinde kasılmaları baskılar yoksa embriyonun implantasyonu tehlikeye girebilir.

Progesteron, uterus bezlerini daha geniş, daha kıvrımlı ve salgılama evresine göre daha fazla salgı üretebilir hale getirerek, endometriyal bezlerin salgı yapmasına ve blastosistin implantasyonu için endometriyumun hazırlanmasına neden olur (4) ve uterus mukozasının gebelik boyunca korunmasını sağlar (1).

Endometriyal kanserlerde östrojen ve progesteron reseptörlerinin kantitatif değerleri çeşitlilik gösterir. Ancak genellikle normal siklik endometriyumdan daha düşük düzeylerde bulunur. Hormon reseptörlerinin varlığının tümör derecesi ve prognozla ilişkili olduğunu bildiren çok sayıda çalışma vardır (38).

4.3.3. HCG

HCG, embriyonun trofoblastik tabakasındaki sinsitiotrofoblast hücreleri tarafından sentezlenir. HCG korpus luteumu uyaran sinyaller göndererek korpus luteumun aktivitesini devam ettirir ve gebelik süresince gerekli olan progesteronun ilk 3 ay boyunca korpus luteumdan salınmasını uyarır (39,40).

HCG gebelik testleri için temel oluşturur. İleri derecede duyarlı radioimmunoassay tekniği, HCG ve gebeliğin belirlenmesi için kullanılır. Bu testlerde kullanılan antikorlar hormonun alt ünitesi için spesifiktir. Kişi gebe olduğunun farkında olmasa bile, ikinci haftanın sonunda (+) bir gebelik testini gösterecek düzeyde HCG sinsitiyotrofoblastlar tarafından üretilir (4).

4.4. ISHIKAWA HÜCRE SOYU

Ishikawa hücreleri, insan uterus epitel hücre dizisidir ve insan embriyo transplantasyonundaki işlemler için alternatif bir model teşkil etmektedir (31). İyi diferansiye olmuş insan endometriyal adenokarsinoma hücreleri olan Ishikawa hücreleri östrojen ve progesteron reseptörü taşımaktadır. Bu yüzden implantasyon biyolojisi çalışmaları için uygun bir model olarak kullanılmaktadır (41).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) 17- β -estradiol, Sigma
- 2) NaCl, Atabay AT091-950
- 3) Na₂HPO₄, Riedel-de H en 81890
- 4) NaH₂PO₄, Riedel-de H en 8210A
- 5) HCl, Merck K23226314 632
- 6) DMEM, Sigma D5546
- 7) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 8) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 9) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 10) Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
- 11) Anti-PCNA antikoru, Santa Cruz, sc-56
- 12) Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
- 13) Anti-p53 antikoru, Santa Cruz, sc126
- 14) Anti-p21, Santa Cruz, sc393
- 15) Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
- 16) Aminoetilkarbazol (AEC), Zymed -00-2007
- 17) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 18) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
- 19) DMSO, Sigma D 2650
- 20) Borik Asit, Sigma B0252
- 21) Sodyum tetra borat, Sigma B0127

5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Hücre Kültürü

Ishikawa hücreleri, %10 fetal sıgır serumu ve antibiotik (100 U/ml penisilin G, 100 ug/ml streptomycin) içeren DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) medyumunda flasklar içerisinde 37°C de %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde büyütüldü. Deneylerde, kontrol grubu hücreler normal medyumları içerisinde tutuldu. Östrojenin etkilerini belirlemek amacıyla oluşturulan deney grubunda medyum içerisine 17-β-östradiol (0.4 µM) eklendi. Progesteronun etkilerinin inceleneceği gruba hidrokspirogesteron kaproat (1 µg/ml) uygulandı. HCG grubuna ise 20 ng/ml ilaç uygulandı. Hücre proliferasyonunun değerlendirileceği deney gruplarında belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyon yapıldı. p53 ve p21 protein ekspresyon düzeylerinin belirleneceği gruplarda ise aynı dozlarda 48 saatlik inkübasyon uygulandı.

5.2.2. İmmünohistokimya

5.2.2.1. PCNA İmmünohistokimyası

Flasklar içerisinde büyütülen hücreler yuvarlak lameller üzerine ekildi. PCNA'nın, İSK'sal incelemesi için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler önce -20⁰C'de metanol ile fikse edildi ve non-immün serumla bloklama işlemi uygulandı. Daha sonra anti-PCNA primer antikoru (Zymed) 1/300 dilüsyonda, oda sıcaklığında 1 saat uygulandı. Primer antikor uygulamasından sonra sırasıyla biyotin-bağlı ve streptavidin-peroksidaz sekonder antikorlarıyla (Histostain Plus Kit, Zymed) 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamayı takiben spesifik reaksiyonun tanımlanması amacıyla aminoetilkarbazol (AEC) kromojeni uygulandı.

5.2.2.2. BrdU İmmünohistokimyası

Proliferasyon indeksi tayini için uygulanan yöntemlerden biri siklusun S fazına özgü BrdU işaretleme yöntemiydi. Düzenlenen deney gruplarına ait hücreler fiksasyon öncesi

BrdU (1mM) ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Metanolle fiksasyonu takiben hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C'de 30 dakika denatüre edildi ve takiben borat tampon ile (pH:8) nötralize edildi. PBS ile yıkandıktan sonra spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için non-immün serumla 20 dakika bloklama işlemi uygulandı. Anti-BrdU primer antikoru (Mouse monoclonal- NeoMarkers) ile 0.5/100 dilüsyonda, oda ısısında, 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkamalar sonrasında sırasıyla biyotin-bağlı ve streptavidin-peroksidaz sekonder antikoları (Histostain Plus Kit, Zymed) 20'şer dakika uygulandı. Spesifik renk reaksiyonunu görüntülemek amacıyla AEC kromojeni uygulandı.

5.2.2.3. p53 ve p21 Protein İmmünohistokimyası

p53 ve p21 ekspresyon düzeylerinin İSK'sal incelemesi için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler -20⁰C de metanol ile 5 dakika fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaları engellemek için non-immün serumla (Histostain Plus Kit, Zymed) 20 dakika bloklama işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında anti-p53 ve anti-p21 monoklonal primer antikoları ile 3µl/ml dilüsyonda oda ısısında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben biyotin işaretli sekonder antikor 20 dakika uygulandı. PBS yıkamalarını takiben streptavidin enzim konjugatıyla 20 dakika inkübasyon yapıldı ve yıkamalar sonrasında AEC kromojeni uygulandı. Kromojen aşamasında invert mikroskopta yapılan incelemede spesifik renk reaksiyonu izlendikten sonra reaksiyon durduruldu. Su bazlı kapatma solüsyonuyla örnekler kapatıldı.

5.2.3. Mikroskopik Değerlendirme

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

5.2.4. İstatistiksel İnceleme

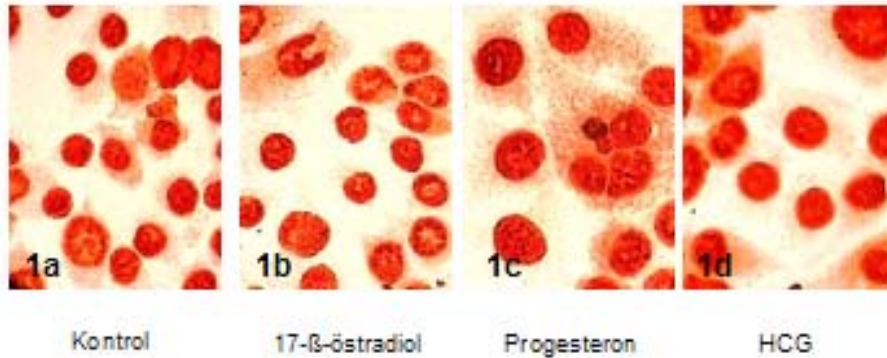
BrdU işaretli S fazındaki ve PCNA pozitif hücrelerin oranı üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının değerlendirilmesiyle hesaplandı. Proliferasyon indeksi, mikroskop alanındaki pozitif işaretli hücrelerin/toplam hücre sayısına oranı alınarak bulundu.

İstatistiksel inceleme, SPSS 10.0 ile çoklu grup karşılaştırmaları için Krusker Wallis, ikili grup karşılaştırmaları için Mann Whitney-U testleri uygulanarak değerlendirildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. PCNA İŞARETLİ HÜCRE ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Deney grupları arasında PCNA işaretli hücre oranlarına ait değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı fark bulunmadı. PCNA işaretli kontrol grubu Ishikawa hücrelerinin hücre oranıyla (90.33 ± 6.40) (Resim 1a) 17- β -östradiol uygulanan hücre oranı (92.00 ± 7.12) (Resim 1b), progesteron uygulanan hücrelerdeki hücre oranı (89.08 ± 7.36) (Resim 1c) ve HCG uygulan gruba ait hücre oranı (89.41 ± 6.81) (Resim 1d) arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır.

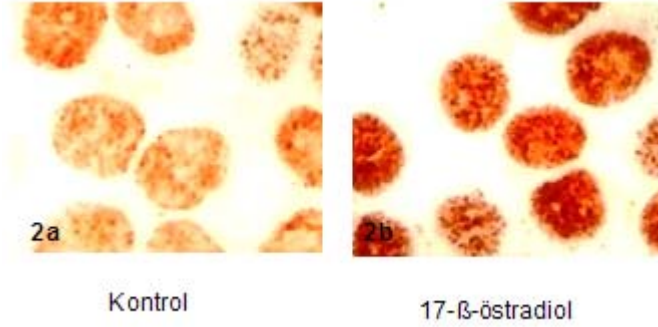


Resim 1: Kontrol grubu Ishikawa hücrelerinde PCNA işaretli hücreler (a), 17- β -östradiol (b), progesteron (c) ve HCG uygulanan hücrelerde (d) PCNA ekspresyonu. X 600

6.2. BrdU İŞARETLİ HÜCRE ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

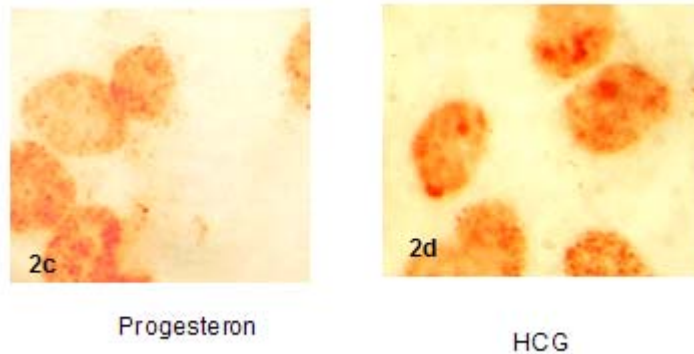
Deney grupları arasında BrdU işaretli S faz hücre oranlarına ait değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı fark bulundu. BrdU işaretli kontrol grubu Ishikawa hücrelerinin S faz hücre oranıyla (54.00 ± 6.43) (Resim 2a) 17- β -östradiol

uygulanan hücre oranı (63.91 ± 7.24) (Resim 2b) karşılaştırıldığında bu oranın istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).



Resim 2a,b: Kontrol grubu Ishikawa hücrelerinde BrdU işaretli S faz hücreleri (a), 17-β-östradiol (b) uygulanan hücrelerde artmış BrdU inkorporasyonu ve hücre oranı. X 600

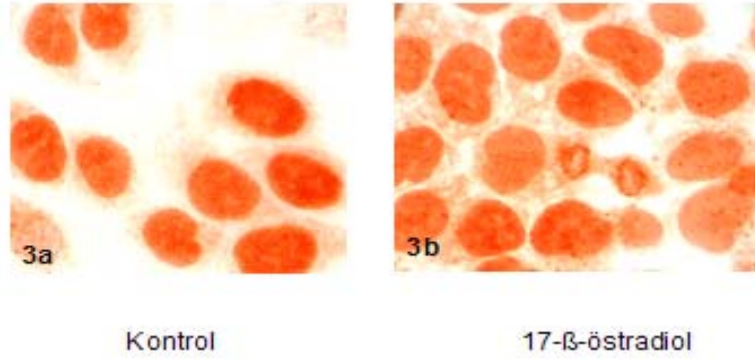
Diğer deney gruplarından progesteron uygulanan hücrelerdeki S faz hücre oranı ($52,58 \pm 6,88$) (Resim 2c) ve HCG uygulanan gruba ait S faz hücre oranı ($53,25 \pm 7,39$) (Resim 2d) kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel bir farklılık izlenmemiştir ($p > 0,05$).



Resim 2c,d: Ishikawa hücrelerinde progesteron (c) ve HCG (d) uygulanan hücrelerde BrdU inkorporasyonu ve S faz hücre oranı. X 600

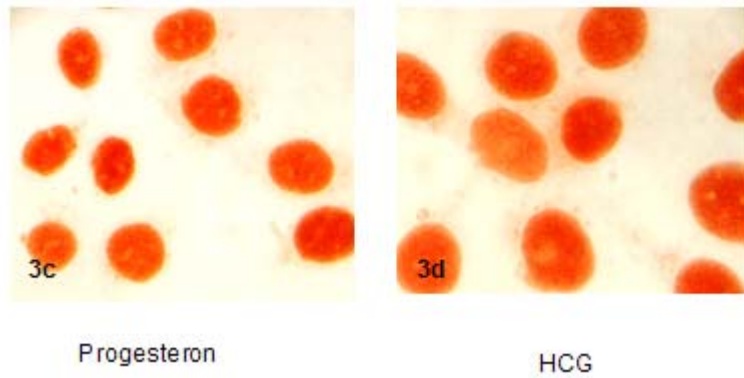
6.3. p53 PROTEİN EKSPRESYONU

Kontrol grubu Ishikawa hücrelerinde nükleer p53 protein ekspresyonu izlendi (Resim 3a). 48 saatlik 17- β -östradiol inkübasyonu uygulanan grupta p53 ekspresyonu lokalizasyonu ve yoğunluğunda (Resim 3b) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir farklılık izlenmedi.



Resim 3 a,b: Kontrol grubu Ishikawa hücrelerinde p53 protein ekspresyonu (a) 17- β -östradiol (b) uygulanmış hücrelerde p53 protein ekspresyonu. X 600

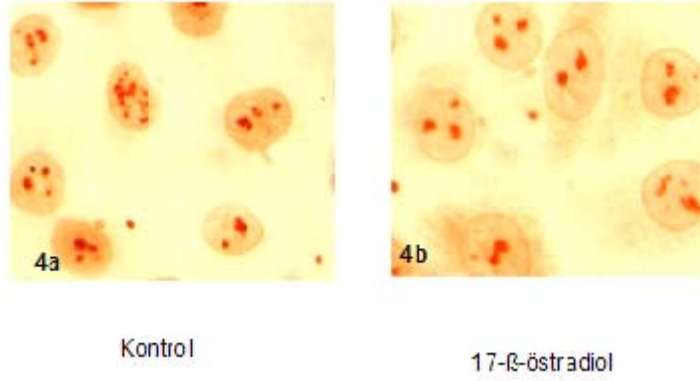
Östradiol ile aynı sürede uygulanan progesteron (Resim 3c) ve HCG (Resim 3d) inkübasyonlarının da Ishikawa endometriyum hücrelerinde ki p53 ekspresyonlarında değişiklik oluşturmadığı tespit edilmiştir.



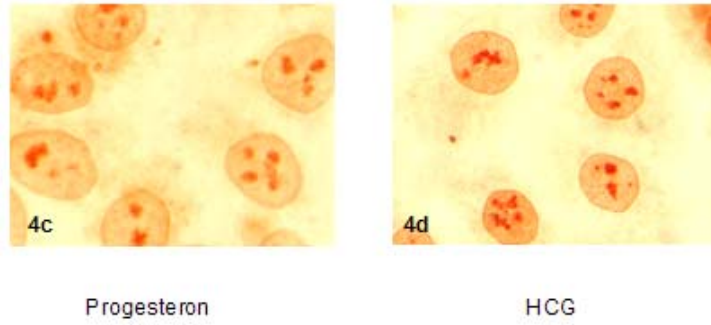
Resim 3 c,d: Progesteron (c) ve HCG (d) uygulanmış hücrelerde p53 ekspresyonu. X 600

6.4. p21 PROTEİN EKSPRESYONU

Ishikawa hücrelerinde, 17- β -östradiol (Resim 4b), progesteron (Resim 4c), ve HCG uygulanan grupta (Resim 4d) p21 ekspresyonu lokalizasyonu ve yoğunluğunda (Resim 3b), kontrol grubu (Resim 4a) ile karşılaştırıldığında bir farklılık bulunmadı.



Resim 4 a,b: Kontrol grubu Ishikawa hücrelerinde p21 ekspresyonu (a), 17- β -östradiol (b) uygulanmış Ishikawa hücrelerinde p21 ekspresyonu. X 600



Resim 4 c,d: Progesteron uygulanmış Ishikawa hücrelerinde p21 ekspresyonu (c), HCG (d) uygulanmış Ishikawa hücrelerinde p21 ekspresyonu. X 600

7. TARTIŞMA

İnsan endometriyumunun regülasyonu oldukça karmaşık biyolojik olaylar zincirinden oluşmaktadır. Endometriyumun proliferasyonu ovaryumdan salgılanan östrojen ile özellikle de biyoaktif formu olan 17 β -östradiol tarafından kontrol edilmektedir. Östrojen, hedef hücre nükleusunda ki α ve β reseptörleri üzerinden etki etmektedir. Östrojen reseptöre bağlanarak homodimer oluşturur, konformasyonel değişiklikler meydana gelir ve kromozomal DNA'nın proliferasyondan sorumlu genlerinin transkripsiyonu gerçekleşir (42,43). Embriyo implantasyonu için gerekli endometriyal değişiklikler östrojen ve progesteron hormonlarının etkisinde gerçekleşir. Endometriyum foliküler fazda gittikçe artan östradiol etkisi ile progresif olarak gelişir. Araştırmalar ayrıca östradiolün implantasyonda rol oynayan çeşitli faktörlerin sentezlenmesinde uyarıcı etki gösterdiğini bildirmektedir (44). Yapılan çalışmalar, östrojenin endometriyal siklusun proliferatif evresini düzenlemenin yanı sıra endometriyal hiperplazi, polip ve adenokarsinom gibi artmış proliferasyon izlenen patolojik tablolarda oynadığı rolün de aydınlatılmasını amaçlamaktadır (45,46). İnsan endometriyumunun in-vitro araştırmaları için deney modelleri geliştirilmiştir (47). Östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, iyi diferansiye adenokarsinom hücreleri olan Ishikawa hücreleri endometriyumun hormonal kontrol araştırmaları için tercih edilen bir modeldir (48). Ishikawa hücrelerinde östrodiolün proliferasyon üzerine olan etkisi araştırılmış, 24 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinde proliferasyonun arttığı ancak uzun süreli inkübasyonda daha yüksek bir artış olduğu bildirilmiştir (49). Çalışmamızda PCNA ekspresyonu pozitif hücrelerin kontrol grubunda çok yüksek olduğu ve 24 saatlik 17- β -östradiol inkübasyonu ile proliferasyon oranının değişmediği izlendi. PCNA ekspresyonu hücre siklusunun geç G₁ evresinde başlayıp G₂ evresinde azalarak devam etmektedir (5). PCNA immünohistokimyası ile siklusun tüm evrelerindeki hücreler işaretlenmektedir. PCNA verilerimizi ve Ishikawa hücrelerinin adenokarsinom orjinini dikkate alarak ikinci bir proliferasyon belirleyici yöntem olarak S faza özgü BrdU işaretlemesini uyguladık. PCNA, BrdU ve Ki-67 işaretleyicileri proliferasyon indeksi belirteçleri olarak kullanılmaya başlandıklarından bu yana farklı çalışmalarda karşılaştırılmış ve birbirlerine göre farklı noktalarda üstünlükleri ortaya konmuştur (50,51). Çalışmamızda Ishikawa hücrelerinde BrdU işaretleme yönteminin

PCNA yöntemine göre daha iyi bir proliferasyon belirteci olduğu ve 24 saatlik 17- β -östradiol inkübasyonu ile BrdU işaretli S faz hücre oranının anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Progesteron etkisini hedef hücrede progesteron reseptörü aracılığıyla gerçekleştirmektedir (42). Preimplantasyon sürecinde progesteron endometriyum embriyonun kabulü için hazırlar. Progesteron endometriyumun farklılaşması, proliferasyon ve salgı fonksiyonlarının kontrolünde önemli rol oynamaktadır (4). Progestinlerin, endometriyum hücrelerinde östrojenlerin etkisini antagonize ettiği bildirilmiştir (37). Ishikawa hücrelerinde ³H timidin işaretleme yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, östrojenin proliferatif etkisinin 48 ve 72 saatlik sürelerde uygulanan progesteron inkübasyonu ile inhibe edildiği gösterilmiştir (52). Postmenopozal kadınlarda uygulanan östrojen replasman tedavisinin proliferatif etkilerini dengelemek amacıyla sentetik bir progesteron türevi olan levonorgestrel salan intrauterin sistem kullanımının endometriyumda östrojenin etkilerini nötralize ettiği bildirilmiştir (53). Yapılan benzer bir çalışmada, levonorgestrel salan intrauterin sistemin apoptozu arttırdığı, buna bağlı olarak proliferasyonu durdurduğu ileri sürülmüştür (54). Ishikawa hücre soyunda ve primer endometriyum hücre kültüründe yapılmış olan ve yukarıda tartışılan mevcut birkaç araştırmada östrojen ve progesteron kombinasyonunun etkileri incelenmiş, sadece progesteron uygulamasının endometriyum hücrelerinde proliferasyon ve düzenleyen mekanizmalar üzerindeki etkisine ilişkin yeterli veri bulunamamıştır. Çalışmamızda timidinin analogu olan S fazına özgü anti-BrdU ve anti-PCNA işaretleme yöntemleri ile progesteronun hücre proliferasyonu üzerine etkisi ve p53, p21 proteinlerinin ekspresyonu ile ilişkisi incelenmiştir. Progesteronla inkübe edilen hücrelerin proliferasyon oranı her iki işaretleme yöntemiyle de uygulanan konsantrasyon ve 24 saatlik sürede kontrol grubuna yakın bir değerde bulunmuş, anlamlı bir proliferasyon inhibisyonu gözlenmemiştir. Progesteronun zamana bağlı olası etkilerinin yapılacak yeni çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir.

İmplantasyonu takiben üreilmeye başlanan gebeliğe özgü glikoprotein yapılı HCG'nin korpus luteumun devamlılığını sağlayarak progesteron salınımını uyardığı bilinmekle birlikte olası diğer etkileri yeterince bilinmemektedir. İmplantasyonu takiben sinsisyotrofoblastlarca salındığı bilinen HCG'nin belli bir düzeyde endometriyum hücreleri tarafından sekreteruar fazda da salındığı bildirilmiştir (55). HCG'nin uterus myometriyumunu

ve kan damarı endotel hücrelerinde proliferatif etki gösterdiğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (56,57). Ancak HCG'nin endometriyum hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini bildiren veriler mevcut değildir. Bununla birlikte gebelikte progesteron salınımıyla ilişkisi ve az düzeyde normal endometriyal siklusun sekretuar evresinde ki varlığı endometriyum proliferasyonu üzerine progesteron üzerinden olası bir indirekt etkiyi düşündürmektedir. HCG uygulanan deney grubu Ishikawa epitel hücrelerinde, PCNA ve BrdU işaretli epitel hücre oranlarının kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu ve istatistiksel bir fark bulunmadığı gösterildi.

p53 proteini hücre proliferasyonu ve hücre ölümü kontrol mekanizmasında önemli rol oynar. p53 proteini, hipoksi, ultraviyole, radyasyon ve ilaç gibi nedenlerle hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda p21, p14 ARF, MDM2 ve bax aktivasyonu yaparak G₁, G₂ kontrol noktalarında siklusun durdurularak nukleotid ve baz onarımının gerçekleşmesine ya da apoptoza neden olmaktadır (10,58). Endometriyal dokularda p53 ekspresyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, p53'ün östrojen etkisi altında gerçekleşen geç proliferasyon evresinde artış gösterdiği bildirilmiştir (2,59). Aynı çalışmada p53 ekspresyonunun progesteron etkisi altında anlamlı olmayan bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Östrojene bağlı olarak artan etkisinin mensturasyonda ya da olası implantasyonda gerçekleşecek apoptoz üzerinde etki ettiği düşünülse bile henüz endometriyal siklustaki rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir. HCG'nin endometriyum dokusunda proliferasyon ve p53 ekspresyonu üzerine olası etkisinin incelendiği bir çalışmaya ise mevcut veri tabanlarında rastlanmamıştır. Çalışmamızda, p53 ekspresyonu deney gruplarında bir artış ya da azalma göstermemiştir. Bu bulgular, in-vitro ortamda gerçekleştirdiğimiz östrojen ve progesteron inkübasyonu ile p53 ekspresyon mekanizmasının kısa sürelerde değişmediğini ortaya koymaktadır.

CdkI hücre siklusunun ilerlemesinde düzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir ve bu grubun tanımlanan ilk üyesi WAF1/CIP1 gen ürünü olan p21 proteindir (60). Hücre siklusunu G₁ evresinde durdurarak S evresine geçişi engellemektedir (8). P21 proteini stres, ultraviyole ve anoksi gibi uyarıların indüksiyonu sonucu p53 protein artışına bağlı olarak eksprese olur. Ancak doku gelişimi, serum stimülasyonu ve hücre diferansiyasyonu gibi durumlarda p21 ekspresyonunun p53'den bağımsız gerçekleştiği bildirilmiştir (61). p21, siklin, Cdk ve PCNA ile dörtlü bir kompleks oluşturarak DNA replikasyonunun kontrolünde rol oynamaktadır (62). Ancak p21'in hücre siklusunda oynadığı rolün

aktivitesinin hücre içindeki düzeyine bağlı olduğu, düşük konsantrasyonda dörtdü kompleks oluşturduğu, yüksek konsantrasyonda ise aktif inhibitör olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür (61). Çalışmamızda Ishikawa endometriyum epitel hücrelerinde 17-β-östradiol, progesteron ve HCG'nin hücre siklusu ve p21 ekspresyon düzeyi ilişkisi değerlendirilmiş, kontrol hücrelerinin p21 ekspresyonunun hormonlara bağlı olarak değişmediği gözlenmiştir.

8. SONUÇ

- Embriyonun endometriyuma implantasyonu, uygun miktardaki östrojen ve progesteron ile sağlanır. İmplantasyondan sonra, embriyonun trofoblast tabakasından salınan HCG ise, gebeliğin devamı için gerekli olan progesteronun salınımını sağlar.
- Çalışmamızda endometriyum epitel hücreleri için model teşkil eden Ishikawa hücrelerinde 17- β -östradiol, progesteron ve HCG'nun hücre proliferasyonuna olan etkisi incelendi.
- Ishikawa hücre soyunda PCNA ekspresyon düzeyleri 17- β -östradiol, progesteron ve HCG inkübasyonları ile kontrol grubuna benzer özellikte bulunmuştur.
- S fazına özgü BrdU işaretleme yöntemiyle, 17- β -östradiolün endometriyum epitel hücrelerinde, hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir.
- Progesteron ve HCG inkübasyonunun ise BrdU işaretli S faz hücre oranında bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir.
- Hücre siklusunun düzenlenmesinde rol oynayan p53 ve p21 proteinlerinin, 17- β -östradiol, progesteron ve HCG uygulanan hücrelerde ekspresyonlarının değişmediği izlenmiş, deneyde uygulanan konsantrasyon ve sürelerde hormonların p53 ve p21'den bağımsız etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni doğru bir şekilde yönlendiren, yol gösteren ve çalışmamın her aşamasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e, tez konumun seçilmesinde bana yardımcı olan ve tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesi için gerekli ortamı sağlayarak çalışmamın yürütülmesinde destek olan Prof. Dr. Nedret ALTIOK'a teşekkürlerimi sunar, Ishikawa hücre soyunu hediye eden Doç. Dr. Ümit A. KAYIŞLI'ya teşekkür ederim.

Tezimi hazırlarken büyük yardımlarını gördüğüm laboratuvar sorumlusu arkadaşlarım Melike ERSÖZ'e ve Türkan SARIOĞLU'na, yardımlarını benden hiç eksik etmeyen arkadaşım İknur KARAOSMANOĞLU'na, Yüksek Lisans eğitimim boyunca beraber çalıştığım ve sorumluluk paylaştığım bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve manevi desteklerini her zaman hissettiren, hayattaki en büyük hazinem saydığım anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. İstanbul, Nobel Kitap Evleri, 2006.
2. Maia H Jr, Maltez A, Studart E, Athayde C, Coutinho EM. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in endometriyal polyps and in the normal endometriyum during the menstrual cycle. *BJOG*. 2004, 111:1242-1247.
3. Ito K, Sasano H, Matsunaga G. Correlations Between p21 expression and clinicopathological findings, p53 gene and protein alterations, and survival in patients with endometriyal carcinoma. *J Pathol*. 1997, 183:318-324.
4. Moore K.L, Persaud T.V.N. İnsan Embriyolojisi. İstanbul, Nobel Kitap Evleri, 2002.
5. 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.
6. Hegele-Hartung C, Mootz U, Beier HM. Luteal control of endometriyal receptivity and its modification by progesterone antagonists. *Endocrinology*. 1992, 131:2446-2460.
7. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*. 1997, 11:847-862.
8. Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1471:43-56.
9. Kalo E, Buganim Y, Shapira KE, Besserglick H, Goldfinger N, Weisz L, Stambolsky P, Henis YI, Rotter V. Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II. *Mol Cell Biol*. 2007, 27:8228-8242.
10. Durmaz R, Vural M. Genetics in primary and secondary glioblastoma. *Türk Nöroşir Derg*. 2007, 17:80-90.
11. <http://herb4cancer.wordpress.com/2007/11/28/herbal-medicine-for-cancer-treatment/23>
12. Hall PA, Levison PA. Rewiev: Assesment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*. 1990, 43:184-192.
13. Sakr WA, Sarkar FM, Sreepathi P. Measurement of celluler proliferation in human prostate by AgNOR, PCNA, and SBF. *Prostate*. 1993, 22:147-154.

14. Carrol PR, Waldman FM, Rosenau W, et al. Cell proliferation in prostatic adenocarcinoma: in vitro measurement by 5 Bromodeoxyuridine incorporation and proliferating cell nuclear antigen expression. *J Urol.* 1993, 149:403-407.
15. Spires SE, Banks ER, Davey DD, et al. Proliferating cell nuclear antigen in prostatic adenocarcinoma: correlation with established prognostic indicators. *Urology.* 1994, 5:660-666.
16. Matthias P, Herskowitz I: Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell.* 1994, 79:181-184.
17. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996, 274: 1672-1677.
18. Ay M.E, Terziođlu O, Terzi C, İzci Ay Ö. Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi.* 2006, 5:20-25.
19. Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med.* 1999, 50:401-423.
20. Tulunay Ö. Larenks kanseri: büyüme, proliferasyon ve vasküler dansitenin prognostik değerleri metastaza etkili faktörler (ki-67, pcna, cb34, p53, bcl-2, bax, nm23) immunhistokimyasal çalışma. Ankara, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2001.
21. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994, 54:4855-4878.
22. Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y. Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity. *Mol Cell Biol.* 2000, 20:6147-6158.
23. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000, 60: 3689-3695.
24. Özdemir E. P53 as a key in the understanding of urethelial carcinogenesis. *T Klin Med Sci.* 1998, 18:277-284.
25. Offner S, Schmaus W, Witter K, Baretton GB, Schlimok G, Passlick B, Riethmüller G, Pantel K. p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *PNAS.* 1999, 96: 6942-6946.

26. Kein SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Privas C, Vogelstein B: Identification of p53 as a sequence-specific DNA binding protein. *Science*. 1991, 252: 1708-1711.
27. Yew PR, Berk AJ: Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early IB protein. *Nature*. 1992, 357:82-84.
28. Coşkun M, Coşkun M. Biological dosimeter and related developments. *Cerrahpaşa J Med*. 2003, 34:207-218.
29. Baserga R. Growth regulation of the PCNA gene. *J Cell Sci*. 1991, 98:433-4366.
30. Celis JE, Madsen P: Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett*. 1986, 209: 277-283.
31. Heneweer 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.
32. Gökçimen A, Temel S. İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *SDÜ Tıp Fak. Derg*. 2004, 11:25-33.
33. Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol*. 2001, 14:280-294.
34. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J*. 2000, 19:504-512.
35. Parazzini F, LaVecchia C, Bocciolone L, Franceschi S. The epidemioloji of endometriyal cancer. *Gynecol Oncol*. 1991, 41:1-16.
36. Saruhan BG, Nergiz Y. Overektomili sıçanlara östrojen ve antiöstrojen Uygulamasının uterus epiteli üzerine etkisi. *Dicle Tıp Dergisi*. 2002, 29:1-2.
37. Ito K, Utsunomiya H, Yaegashi N, Sasano H. Biological roles of estrogen and progesterone in human endometriyal carcinoma-new developments in potential endocrine therapy for endometriyal cancer. *Endocr J*. 2007, 54:667-679.
38. Ataç GG. Endometriyum karsinomlarında p53, cerbB-2 ekspresyonları, östrojen ve progesteron reseptörü düzeyleri ile anjiyogenezin prognostik önemi ve histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisi. İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, 1996.

39. Berndt S, Perrier d'Hauterive S, Blacher S, Péqueux C, Lorquet S, Munaut C, Applanat M, Hervé MA, Lamandé N, Corvol P, van den Brûle F, Frankenne F, Poutanen M, Huhtaniemi I, Geenen V, Noël A, Foidart JM. Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometriyum. *FASEB J.* 2006, 20:2630-2632.
40. Zimmermann G, Baier D, Majer J, Alexander H. Expression of beta hCG and alpha CG mRNA and hCG hormone in human decidual tissue in patients during tubal pregnancy. *Mol Hum Reprod.* 2003, 9:81-89.
41. Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell.* 2002, 15:104-117.
42. Kartal A, Saygılı H, Özgüven Ö, Akhan S.E, Jamal H, Turfanda A. Endometriyal hiperplazi saptanan ve normal semptomatik premenopozal kadınlar arasında endometriyal kalınlık, telomeraz aktivitesi ve vücut kitle indeksi ilişkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi.* 2004, 2:27-33.
43. Becker JL. Sythesis, secretion, and action of estrogen and progesterone. *Elsevier Inc.* 2007,1-5.
44. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004, 25:341-373.
45. Kurman RJ, Félix JC, Archer DF, Nanavati N, Arce JC, Moyer DL. Norethindrone acetate and estradiol-induced endometriyal hyperplasia. *Obstet Gynecol.* 2000, 96:373-379.
46. Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Uchikawa J, Itoh K, Konishi I. Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometriyum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88:871-878.
47. Somkuti SG, Yuan L, Fritz MA, Lessey BA. Epidermal growth factor and sex steroids dynamically regulate a marker of endometriyal receptivity in Ishikawa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82:2192-2197.
48. Croxtall JD, Elder MG, White JO. Hormonal control of proliferation in the Ishikawa endometriyal adenocarcinoma cell line. *J Steroid Biochem.* 1990, 35: 665– 669.
49. Kayisli UA, Aksu CA, Berkkanoglu M, Arici A. Estrogenicity of isoflavones on human endometriyal stromal and glandular cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87:5539-5544.
50. van Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ. Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal

- antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol.* 1991, 138:1165-72.
- 51.** Niklaus AL, Aubuchon M, Zapantis G, Li P, Qian H, Isaac B, Kim MY, Adel G, Pollard JW, Santoro NF. Assessment of the proliferative status of epithelial cell types in the endometrium of young and menopausal transition women. *Hum Reprod.* 2007, 22:1778-88.
- 52.** Shiozawa T, Horiuchi A, Kato K, Obinata M, Konishi I, Fujii S, Nikaido T. Up-regulation of p27Kip1 by progestins is involved in the growth suppression of the normal and malignant human endometrial glandular cells. *Endocrinology.* 2001, 142:4182-4188.
- 53.** Taşkın S, Özmen B, Ünlü C, Therapeutic use of the levonorgestrel releasing intrauterine system. *J Turkish German Gynecol Assoc.* 2006, 7:63-67.
- 54.** Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod.* 2001, 16:2103-2108.
- 55.** Wolkersdörfer GW, Bornstein SR, Hilbers U, Zimmermann G, Biesold C, Lehmann M, Alexander H. The presence of chorionic gonadotrophin beta subunit in normal cyclic human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4:179-184.
- 56.** Lei ZM, Reshef E, Rao V. The expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992, 75:651-659.
- 57.** Környei JL, Lei ZM, Rao CV. Human myometrial smooth muscle cells are novel targets of direct regulation by human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod.* 1993, 49:1149-1157.
- 58.** Smith ML, Seo YR. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis.* 2002, 17:149-156.
- 59.** Isaksson E, Cline JM, Skoog L, Söderqvist G, Wilking N, von Schoultz E, von Schoultz B. p53 expression in breast and endometrium during estrogen and tamoxifen treatment of surgically postmenopausal cynomolgus macaques. *Breast Cancer Res Treat.* 1999, 53:61-67.
- 60.** el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993, 75:817-825.

- 61.** Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* 1994, 8:1750-1758.
- 62.** Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 1995, 9:935-944.