

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

**İNSAN ENDOMETRİYAL KANSER HÜCRELERİNDE  
ÖSTROJENİN KONSANTRASYONA BAĞLI ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Biyolog Özhan Atvar**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2006**

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

**İNSAN ENDOMETRİYAL KANSER HÜCRELERİNDE  
ÖSTROJENİN KONSANTRASYONA BAĞLI ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Biyolog Özhan Atvar**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Nedret Altıok**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2006**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	4
4.1. HÜCRE PROLİFERASYONU .....	4
4.1.1. Hücre Siklusu .....	4
4.2. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN GÖSTERİLMESİ .....	4
4.2.1. PCNA Ekspresyonu .....	4
4.2.2. BrdU İnkorporasyonu .....	5
4.3. APOPİTOZ.....	5
4.3.1. Apoptotik Hücrelerin Morfolojik Özellikleri .....	6
4.3.2. Apoptozun Mekanizmaları.....	6
4.3.2.1. Mitokondri/Sitokrom –C Aracılı Apoptoz Oluşumu .....	7
4.3.2.2. Dış Sinyallerle Apoptoz Oluşumu .....	7
4.3.2.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz Oluşumu.....	7
4.4. APOPİTOZUN GÖSTERİLMESİ.....	7
4.4.1. TUNEL Yöntemi .....	7
4.4.2. DNA Ladder Yöntemi.....	8
4.5. ENDOMETRİYUM PROLİFERASYONUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER...8	
4.5.1. Endometriyum ve Hormonal Kontrolü .....	8
4.5.1.1. Östrojen Hormonu .....	9
4.5.1.2. Östrojen Reseptörleri ve Sinyal İleti Yolları .....	9
4.5.2. Endometriyum Kanseri .....	10
4.6. ISHIKAWA HÜCRE SOYLARI .....	10
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	11
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	12
5.2.1. Hücre Kültürü.....	12

5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Ölçülmesi.....	12
5.2.2.1.BrdU İmmünotokimyası .....	12
5.2.2.2. PCNA İmmünotokimyası.....	13
5.2.3. Apoptozun Ölçülmesi.....	13
5.2.4. Hücre Canlılığının Ölçülmesi.....	13
6. BULGULAR .....	14
6.1. ÖSTRADİOLÜN ISHIKAWA HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ .....	14
6.2. ÖSTRADİOLÜN ISHIKAWA HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ.....	15
6.3. ÖSTRADİOL ISHIKAWA HÜCRELERİNDE APOPİTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE YOL AÇTI .....	17
7. TARTIŞMA.....	19
8. SONUÇ .....	22
9. TEŞEKKÜR .....	23
10. KAYNAKLAR .....	24

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>Apaf-1</b>	: Apoptoz aktive edici faktör-1
<b>ATP</b>	: Adenozin tri fosfat
<b>BrdU</b>	: 5- bromo2'-deoksi-üridin
<b>Cdk</b>	: Siklin bağımlı kinaz
<b>ER</b>	: Östrojen reseptörü
<b>EREs</b>	: Östrojene duyarlı elementler
<b>ERK</b>	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>FSH</b>	: Folikül uyaran hormon
<b>G1</b>	: Hücre siklusu birinci büyüme fazı
<b>G2</b>	: Hücre siklusu ikinci büyüme fazı
<b>GnRH</b>	: Gonodotropin salgılatıcı hormon
<b>HRT</b>	: Hormon replasman tedavisi
<b>JNK</b>	: c-jun NH <sub>2</sub> -terminal kinaz
<b>M</b>	: Hücre siklusu mitoz fazı
<b>PCNA</b>	: Prolifere hücre nükleer antijeni
<b>PI3K</b>	: Fosfatidil inositol- 3 kinaz
<b>P</b>	: Progesteron reseptörü
<b>S</b>	: Hücre siklusu sentez fazı
<b>SHBG</b>	: Seks hormon bağlayan globulin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktör alfa
<b>TUNEL</b>	: Terminal deoksinükleotidil-transferaz-aracılı deoksiüridin trifosfat-digoksigenin in situ nick-end işaretleme

**Araştırma Projesi No** :HE/0212005

## 1. ÖZET

Östrojenin insan uterusunda endometriyal hücrelerin büyüme ve gelişmesini uyardığı bilinmektedir. Östrojenin endometriyal hücreler üzerindeki etkilerini karakterize etmek için iyi diferansiye insan endometriyal kanserinden üretilmiş Ishikawa hücre soyunu kullandık. Önce 17- $\beta$ -östradiol (östradiol)'ün hücre yaşamsallığı üzerine olan etkisini tripan mavisi alma deneyi ile test ettik. İlginç olarak, fizyolojik serum düzeyinin üstündeki östrojen konsantrasyonlarında, östradiol (1-25  $\mu$ M) düşük serum ortamında Ishikawa hücrelerinde konsantrasyona bağlı hücre ölümüne yol açtı. İmmünohistokimyasal boyama ile gösterilen proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA) ekspresyonu ve 5-bromo-2'-deoksiüridine (BrdU) inkorporasyon testleri benzer konsantrasyonlardaki östradiolün hücre büyümesini inhibe ettiğini ortaya koydu. Ayrıca, terminal deoksinukleotidil-transferaz- aracılı deoksiüridin trifosfat nick-end işaretleme (TUNEL) analizi ile östradiol tarafından uyarılan hücre ölümünün apoptozun karakteristik belirtileri olan sitoplazma çekilmesi, kromatin yoğunlaşması, ve DNA fragmentasyonu gösterdiğini ortaya koyduk.

Bulgularımıza göre, östradiolün yüksek konsantrasyonlarda, menopozdaki düşük östrojen içeren ortamı taklit eden düşük serum ortamında Ishikawa hücrelerinde apoptoza yol açması, yüksek konsantrasyonlarda östrojenin postmenopozal kadınlarda oluşan hormona bağlı endometriyum kanserinin gerilemesine neden olabileceğini ortaya koydu.

## 2. SUMMARY

Estrogen is known to stimulate growth and development of endometrial cells in uterus in humans. In order to characterize the effect of estrogen on endometrial cells we used the differentiated human endometrial cancer derived Ishikawa cell line. We first evaluated the effect of 17- $\beta$ -estradiol (estradiol) on cell viability as determined by trypan blue exclusion assay. Interestingly, at concentrations above physiological levels of estrogen in serum, estradiol (1-25  $\mu$ M) induced a concentration-dependent cell death in Ishikawa cells under low serum conditions. We found that similar concentrations of estradiol inhibited cell growth as shown by immunocytochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assays. We further determined by Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) analysis that the cell death induced by estradiol showed the characteristics of apoptosis, such as shrinkage of cytoplasm, chromatin condensation and DNA fragmentation.

Our data showing the apoptotic effect of high concentrations of estradiol in low serum conditions, which mimic the low estrogenic environment in menopause, suggest that high doses of estrogen can induce regression of hormone-dependent endometrial cancer in postmenopausal women.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyum, yapı ve fonksiyonlarında steroidlere bağılı siklik değişiklikler gösterir. Proliferatif ve sekretuvar fazlardan sonra steroid desteği kesilir ve uterus epiteli endometriyal hücrelerin apopitoza uğraması sonucu yıkılır. İnsan endometriyumunda apopitozun hızı ve oranı serumdaki östrojen ve projesteron düzeyi ile ilgilidir. Apopitoz, doku homeostazisini sağlamada kritik bir rol oynayan ve fonksiyonel olmayan hücrelerin elimine edilmesini sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır. Uterus, hormon değişikliklerine yanıt olarak endometriyal hücre çoğalması ve apopitozu içeren sürekli bir siklus içerisinde dir. Bu steroidlere bağılı siklus değişiklikleri uterusu gebeliğe hazırlar. Gebelik olmadığında proliferatif ve sekretuvar faz sonrası steroid desteği kalkar ve endometriyum yıkılır. Daha önce mensturasyonun endometriyum hücrelerindeki iskemik nekroza bağılı olduğu düşünülse de, yakın tarihteki çalışmalar endometriyumda apopitoz olduğunu göstermişlerdir (1). Genellikle bilinen östrojen ve projesteronun, östrojen reseptörü (ER) ve projesteron reseptörü (PR) eksprese eden hücrelerde proliferasyonu uyardığı ve hücre ölümünü engellediği yönündedir. İn vitro hücre kültür çalışmalarında da ortamdan östrojen ve/veya projesteron çekildiğinde hücre ölümü gerçekleştiği bilinmektedir. Östrojene bağılı hücre proliferasyonunun artması, özellikle hormon replasman tedavisi (HRT) uygulanan postmenapozal kadınlarda endometriyum kanserinin artmasına neden olmaktadır.

Benzer şekilde, ER-pozitif insan meme kanser hücreleri proliferasyon için östrojene gerek duyar ve östrojen yokluğunda apopitotik hücre ölümüne uğrarlar. Yakın zamanda yapılan bazı çalışmalar, yoğun olarak anti-hormonal tedavi sonrasında direnç gelişen meme kanser hücrelerinde östrojenin hücre ölümüne yol açtığını bildirilmektedir (2-6). Bu durum, postmenopozal kadınlarda var olan düşük östrojen düzeyinde tümör hücrelerinin östrojene hipersensitivite geliştirmeleri olarak açıklanmaktadır (7). Bu çalışmanın amacı, östrojenin endometriyumdaki konsantrasyona bağılı etkilerini görmek ve bu etkileri düzenleyen moleküler mekanizmaları ortaya çıkarmaktı. İn vitro model olarak iyi diferansiye olmuş insan endometriyal kanser hücre soyu olan Ishikawa hücrelerini kullandık.



## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1. HÜCRE PROLİFERASYONU**

#### **4.1.1. Hücre Siklusu**

Hücre proliferasyonu organizmanın büyüme, gelişme ve DNA replikasyonunu içeren sonunda ise genetik materyal bakımından benzer iki yeni hücrenin oluştuğu bir işlemdir. Bu işlem dört farklı evreye ayrılır. DNA replikasyonun gerçekleştiği sentez (S) fazı ve mitoz (M) evresi en önemlileri olarak kabul edilir. S evresi tamamlanmadıkça M evresine geçiş gerçekleşmez ve böylece organizmanın genom bütünlüğü korunmuş olur (8).

Birinci büyüme ( $G_1$ ) evresi: En uzun evredir. Bu evrede hücre, RNA ve protein sentezler DNA sentezi için hazırlık yapılır. S evresi: DNA sentezinin gerçekleştiği evre olup protein sentezi bu evrede de devam eder. İkinci büyüme ( $G_2$ ) evresi: DNA sentezi tamamlanmıştır. RNA ve protein sentezi sürmektedir. M evresi: Genetik içeriği aynı iki yeni hücrenin meydana geldiği evredir. Bir evreden bir diğerine geçiş hücre siklusu kontrol noktaları aracılığıyla gerçekleşir (8). Hücre siklusunun kontrolü 3 evrede yapılır bunlar;  $G_2$ ,  $G_1$  ve M evresi kontrol noktalarıdır. Bu noktalar  $G_1$  evresinde S evresine geçişten önce,  $G_2$  evresinde M evresine geçişten önce, M evresinde ise metafaz sona ermeden önceki süreçte rol almaktadır.

### **4.2. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN GÖSTERİLMESİ**

#### **4.2.1. PCNA Ekspresyonu**

PCNA evrim süreci boyunca iyi korunmuş 36 Kd ağırlığında asidik nükleer bir protein olup hücre replikasyonunda ve DNA onarımında rol alır (9,10). DNA polimeraz deltanın fonksiyon görmesi için gereklidir. PCNA genel olarak mitotik siklusun geç  $G_1$  ve

S fazında eksprese edilir (11). PCNA p21 proteinine bağlanarak hücre siklusunun kontrolünde de görev alır (12).

#### **4.2.2. BrdU İnkorporasyonu**

BrdU, DNA'ya inkorpore olan ve BrdU spesifik monoklonal antikolarıyla gösterilen bir proliferasyon belirteçidir. 1970'li yıllardan beri izole kromozomlarda, hücre ve dokularda DNA sentezinin gösterilmesinde kullanılmaktadır (13). BrdU'nun belirlenebilmesi için DNA'nın önce enzimlerle denatüre edilmesi gereklidir. Denatürasyon işleminden sonra BrdU DNA'ya inkorpore olur ve immünohistokimyasal olarak gösterilebilir (14).

### **4.3. APOPTOZ**

Programlanmış hücre ölümü, veya apoptoz, fizyolojik bir hücre yıkım işlemidir. Apoptoz çok hücreli organizmalarda gelişim, homeostazın devamlılığı ve immün savunmada önemli rol oynar. Bu sistemin bozulması kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif rahatsızlıklar ve iskemik hasarlara neden olur (15).

İki tip hücre ölümü vardır, apoptoz ve nekroz (15,16). Nekroza uğrayan hücreden çevreye yayılan kemotaktik maddeler sonucunda bir inflamatuvar cevap oluşur. Apoptozda ise kemotaktik madde salınımı olmaz dolayısıyla inflamatuvar cevap oluşmaz (15-17). Apoptoz dokularda tek tek hücre kaybına neden olur. Apoptoz ve mitoz hücrede bir denge halindedir. Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi için hücre sayısının azaltılmasında apoptoz gözlenir.

Fiziksel ve toksik etkilere maruz kalan dokularda da apoptoz gözlenebilmektedir. Apoptozun gözleendiği başlıca olaylar: fetusun implantasyonu, organogenesis ve metamorfozda (18), menstrual siklusta (19), tümör hücrelerinin ölümü, radyasyon, travma, hipoksi, anti kanser ilaçlar gibi dış etmenler (20).

### **4.3.1. Apoptotik Hücrelerin Morfolojik Özellikleri**

Apoptoza uğrayan hücrede yüzey farklılaşmaları ortadan kalkar ve komşu hücreler ile olan iletişimi kesilir. Apoptotik hücrelerin sitoplazması daha yoğun ve hücre boyutu komşu hücrelere göre daha küçüktür (17). Kromatin yoğunlaşır ve DNA apoptotik hücrelere özgü merdiven şeklinde bantlaşmalar gösterir. Hücrede yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bu tomurcuklar sitoplazmik parçalar içeren zarla sarılı apoptotik cisimcikleri meydana getirir (20). Apoptotik hücrelerde gözlenen bu değişimler esnasında fosfatidilserin açığa çıkar. Normal hücrelerde fosfatidilserin membranın iç yüzeyinde bulunur. Apoptotik hücrelerde ise membranın dış yüzünde yer alır ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (20, 21).

### **4.3.2. Apoptozun Mekanizmaları**

Apoptotik sinyal ağının elemanları genetik olarak kodlanır ve genel olarak nükleuslu hücrelerde yer alıp ölüm uyarılarını aktive etmek için hazır bulunur (21,22). Apoptoz hücre içi ve hücre dışı birçok çeşitli uyarı ile tetiklenebilir. Örneğin apoptotik aktivatörlerin hücre yüzey reseptörlerine bağlanması, DNA onarım mekanizmasındaki eksikliklerden kaynaklanan DNA hasarları, sitotoksik ilaç tedavileri, hatalı hücre siklus sinyalleri gibi.

Apoptoz hücre içi proteolitik kaskad tarafından regüle edilir. Bu kaskad sistemin proteazların kaspaz ailesidir ve hücre içi proteinleri etkiler. Bugüne kadar 14 adet memeli kaspaz tanımlanmış olup kaspaz 11 ve kaspaz 12 sadece farede belirlenmiş insandaki karşılığı bulunmamıştır (23).

Hücrede kaspazlar inaktif zimojen formda prokaspaz olarak sentez edilir ve yapısal olarak 3 alt ünitelerden meydana gelir. N terminal uç, büyük ve küçük alt ünitelerdir. Matürasyonda prokaspazlar büyük ve küçük üniteleri arasında proteolitik olarak işlenir ve sonrasında iki küçük, iki büyük ünite heterotetromerik aktif kaspaz formunu oluşturur.

Apoptozun oluşumunda 3 farklı yol vardır. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptoz, dış sinyaller yolu ile apoptoz, endoplazmik retikulum aracılı apoptoz.

#### **4.3.2.1. Mitokondri/Sitokrom –C Aracılı Apoptoz Oluşumu**

Mitokondri ATP sentezi için sitokrom – c içerir. Mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bu yolda etkilidir (24). Apoptotik uyaranlar ile mitokondriden salınan sitokrom-c kaspaz- 9'un aktive olmasında rol alır (25, 26). Ko-faktör nükleoid trifosfat (d-ATP ve ATP ) ile sitokrom- c ve 7 adet Apaf-1 molekülü birleşerek apoptozom yapısını oluşturur ve prokaspaz -9'u aktive eder. Aktive kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktive eder ve diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlayarak apoptozu başlatır.

#### **4.3.2.2. Dış Sinyallerle Apoptoz Oluşumu**

Ölüm aktivatörlerinin ( Fas-L) ve tümör nekroz faktör (TNF)'ün hücre yüzeyinde yer alan Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz -8'i aktive eden sinyaller gönderilir. Aktive kaspaz-8 de kaspaz kaskadını tetikleyerek apoptoz oluşturur (27,28).

#### **4.3.2.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz Oluşumu**

Endoplazmik retikulum, hücre içi kalsiyum deposu olarak görev alır (29). Kaspaz-12 ER membranında yer alır ve bu yolla oluşan apoptozda gerekli bir kaspazdır. Hücre içindeki artan kalsiyum seviyesi kaspaz-12'nin aktive olmasına neden olur ve kaspaz-9 ile etkileşerek kaspaz kaskadını aktive eder (30).

### **4.4. APOPTOZUN GÖSTERİLMESİ**

#### **4.4.1 TUNEL Yöntemi**

Apoptozun belirlenmesinde TUNEL kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem DNA kırıklarının in situ olarak belirlenmesini sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solusyon halindeki lamellere ekilmiş hücrelerde apoptozun belirlenmesinde kullanılır. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturur. Açığa

çıkan DNA kırıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksiuridin trifosfatlar (TdT), terminal deoksinükleotidil transferaz (TdTaz) aracılığıyla eklenir. Eklenen uçların uzunlukları dUTP konsantrasyonlarının miktarına göre değişebilir. DNA fragmanları digoksinin ile işaretlenir. İşaretlenmiş deoksinükleotidler anti-digoksinin-HRP (horseradish peroksidaz) konjugatı ile belirlenir. Konjugat diaminobenzidin ile reaksiyona girer ve çözünmeyen bir substrat oluşturur, apoptotik hücelere özgü görüntü ışık mikroskopuyla izlenir.

#### **4.4.2. DNA Ladder Yöntemi**

DNA ladder yöntemi apoptotik hücelerde gözlenen DNA fragmanlarının belirlenmesi amacıyla kullanılır. Apoptotik uyarılar ve hücre aracılı sitotoksik genomik DNA'nın fragmentasyonuna neden olur. DNA'daki bu fragmanların oluşumunda  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  bağımlı endonükleazlar aktivite gösterir. Apoptozda bu hücrel endonükleazlar DNA'yı internükleozomal bölgelerden kırar ve uzunlukları 180-200 baz çifti arasında değişen fragmanlar oluşturur. Apoptotik hücelerin DNA'ları izole edilip bu DNA'lar agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde merdiven görüntüsü ortaya çıkar. Bu merdiven görüntüsü apoptotik hücelerin en belirgin özelliği olup nekrozdan farklarından biridir.

### **4.5. ENDOMETRİYUM PROLİFERASYONUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER**

#### **4.5.1. Endometriyum ve Hormonal Kontrolü**

Uterus duvarı üç tabakadan oluşur: iç yüzeyi döşüyen endometriyum, kalın düz kas tabakasından oluşan myometriyum, en dıştaki tabaka ise perimetriyumdur. Endometriyum yüzeyi prizmatik tek katlı silli epitel ile astarlanmıştır. Epitel tabakasının altında uterus bezlerini içeren lamina propria yer alır. Endometriyumun üst 2/3'lük bölümü fonksiyonel tabaka alttaki 1/3'lük kısmı ise bazal tabaka adını alır. Menstrual siklusta dökülen fonksiyonel tabaka bazal tabaka tarafından yenilenir. Menstrual siklusta uterus endometriyumu proliferatif evre, sekrateuar evre ve menstrual evreden oluşan 3 aşamadan geçer. Proliferatif evrede östrojen sekrateuar evrede ise progesteron hormonu hakimdir.

Östrojen hormonunun etkisiyle endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde mitoz ve vaskülarite artar. Proliferasyon ile endometriyum kalınlığında artış ve hiperplazi gözlenir. Sekratuar evrede ise projesteron hormonuyla endometriyum hücreleri salgı yapabilme özelliğine sahip hücrelere dönüşür. Reprodüktif dönemdeki kadınlarda menstrual siklus süresince endometriyumda morfolojik değişiklikler gözlenir. Bu değişiklikler over seks steroid hormonlarınca kontrol edilen hücre proliferasyonu, sekresyon ve endometriyum hücrelerinin dökülmesidir (31).

#### **4.5.1.1. Östrojen Hormonu**

18 C'lu steroidlerdir. Üç tane östrojen hormonu bulunmaktadır. Etki derecesine göre östradiol (E2) > östron (E1) > östriol (E3)'dür. Premenopozal dönemde primer olarak over postmenopozal dönemde ise adrenal korteks önemli kaynaktır. Overlerde matür folikülünün granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. Plazmada seks hormon bağlayıcı globuline (SHBG) bağlı olarak taşınırlar. Karaciğerde sülfirik asit ve glukorinik asit ile inaktive edilirler. Endometriyumda mitozu, vaskülarizasyonu arttırır. Endometriyumun kalınlığı artar ve hiperplazi gelişir.

#### **4.5.1.2. Östrojen Reseptörleri ve Sinyal İleti Yolları**

Östrojen reseptörü alfa (ER- $\alpha$ ) ve östrojen reseptörü beta (ER- $\beta$ ) olmak üzere iki adet reseptör belirlenmiştir. Er- $\alpha$  ve Er- $\beta$  benzer büyüklük ve yapısal özelliklere sahiptir (32). Hormon-östrojen reseptör kompleksi, dimerize olduktan sonra ER-bağlı genlerin promotörlerindeki östrojene duyarlı elemente (EREs) bağlanır. Bu reseptörlerin biyolojik aktiviteleri dimerizasyonlarına bağlı olarak değişir. DNA bağlanmasından sonra koaktivatör moleküllerini bağlar ve bu moleküller hedef genlerin transkripsiyonunu arttırırlar (33). En iyi karakterize edilmiş ER koaktivatörleri p160, steroid reseptör koaktivatör ve p300/CBP ailesinin üyeleridir. Koaktivatörler hedef genin promotöründe kromatinin yapısını değiştirerek fonksiyon görebilirler. Transkripsiyonel yeterlilik kromozomal histon proteinlerinin N- terminal bölgelerinin asetillenmesiyle ilişkilidir. Sonuçta protein-DNA bağı destabilize olur ve kromatin dekompaksiyonu gerçekleşir (34). ER aktivitesi için koaktivatörler histon asetil transferaz gibi görev alırlar.

Bir diğerk yandan membran aracılı ER, büyüme faktörleri MEK/ERK ve PI3 –kinaz gibi sinyal ileti yollarını aktive edilebilir. Böylece genomik olmayan etkileri başlatılabilir (35, 36).

#### **4.5.2. ENDOMETRİYUM KANSERİ**

Ovaryum, endometriyum ve serviks kanserleri kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık % 13'ünü oluşturur (37). Endometriyum kanseri kadınlarda görülen en sık dördüncü kanserdir (38).

Endometriyum kanserinin ortaya çıkmasında iki farklı yol bilinmektedir. Birincisi, postmenopozal dönemde kullanılan östrojen başlangıçta hiperplaziye, sonra kompleks hiperplaziye ve atipik hiperplaziye dönüşerek endometriyum kanserini geliştirebilir (39). İkinci yol ise östrojene bağılı olmadan gelişen kanserlerdir (40). Östrojen bağımlı bir durum olması nedeniyle endometriyal hiperplazi için kabul edilen risk faktörleri, endometriyal kanser riskleriyle aynıdır. Endometriyum kanserlerinde en çok risk faktörü karşılıksız uzun süreli kullanılan östrojendir. Östrojen endometriyum hücrelerindeki mitotik aktiviteyi arttırarak kansere neden olur. Östrojenin endometriyum üzerindeki proliferatif etkisinin projesteronla bloke edilmesi mümkündür. Projesteron mitotik aktiviteyi azaltır. Endometriyumdaki östrojen reseptörü konsatrasyonunu azaltır. Östradiolün daha az etkili östrona metabolize olmasını tetikler (41).

#### **4.6. ISHIKAWA HÜCRE SOYLARI**

Ishikawa hücreleri iyi diferansiye olmuş endometriyal kanser hücreleridir. İlk endometriyum hücre serileri olan HEC-1 hücreleri 1968 yılında Kuramoto tarafından geliştirilmiştir (42). En iyi karakterize edilmiş endometriyal hücre serileri ise Ishikawa hücreleridir. ER ve PR taşırlar. Bu özellikleri ile insan endometriyum epitelinin hormonal düzenlenmesi çalışmaları için mükemmel bir model oluşturur. Aynı zamanda östrojene bağımlılık göstermemelerinden dolayı, östrojen içermeyen ortamlarda gelişimlerini sürdürebilirler.

## 5. MATERYAL VE YÖNTEM

### 5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) 17- $\beta$ -estradiol, Sigma
- 2) NaCl, Atabay AT091-950
- 3) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Riedel-de Häen 81890
- 4) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Riedel-de Häen 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, Zymed Laboratories
- 12) Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
- 13) Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
- 14) Aminoetilkarbazol (AEC), Lab Vision TA-060-HA
- 15) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 16) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
- 17) DMSO, Sigma D 2650
- 18) Borik Asit, Sigma B0252
- 19) Sodyum tetra borat, Sigma B0127
- 20) TUNEL kit, Chemicon
- 21) Tripan mavisi, Sigma



## **5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER**

### **5.2.1. Hücre Kültürü**

İyi diferansiye endometriyum tümöründen elde edilmiş hücre soyu olan Ishikawa hücreleri, ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotikler (100 unite/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 medium içinde 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütüldü. Düşük östrojen içeren %2 FBS'a sahip medyumda yapılan deneylerde hücreler 4 saat önce bu medyuma alındı ve östradiol ile her deney için belirtildiği sürede inkübasyona devam edildi.

### **5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Ölçülmesi**

#### **5.2.2.1. BrdU İmmünohistokimyası**

Hücreler lameller üzerinde ekildikten 2 gün sonra PBS ile yıkayıp metanol ile 5 dakika -20 °C'de fikse edildi. Proliferasyon indeksi tayini için S faza özgü BrdU işaretlemesi kullanıldı. Anti- BrdU monoklonal antikoruna ile immünohistokimyasal boyama yapılacak hücreler, fiksasyon öncesi BrdU (1mM) ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. PBS yıkamalarını takiben hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C'de 30 dakika denatüre edildi. Borat tampon ile (pH 8) nötralize edildikten sonra, PBS yıkamalarını takiben spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için bloking işlemi uygulandı (Histostain Plus Kit, Zymed). Anti-BrdU mouse monoklonal antikoruna (NeoMarkers) ile 1 saat oda ısısında (1.5/300) inkübe edildi. Sırasıyla streptavidin ve biyotin-HRP bağlı sekonder antikorlarla 20 dakika inkübasyon gerçekleştirildi (Histostain Plus Kit, Zymed). Aminoetilkarbazol (AEC) kromojeni uygulaması sonucu oluşan spesifik kırmızı renk reaksiyonu, Olympus BX 50 ışık mikroskopunda değerlendirildi.

### **5.2.2.2. PCNA İmmünohistokimyası**

PCNA immünohistokimyasal incelemesi için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler metanol ile fikse edildi. Bloking işleminden sonra anti-PCNA primer antikoru 1/300 dilüsyonda, oda sıcaklığında 1 saat uygulandı. Primer antikor uygulamasını takiben, BrdU immünohistokimyasında uygulanan aşamalar aynen tekrarlandı.

### **5.2.3. Apoptozun Ölçülmesi**

Apoptotik hücre ölümünün yol açtığı DNA fragmantasyonu in situ TUNEL yöntemi ile ölçüldü. Lameller üzerinde büyütülen hücreler metanol ile 5 dakika fikse edildi ve equilibrasyon tamponu 2 dakika oda ısısında hücrelere uygulandı. TdT enzimi reaksiyon tamponu ile karıştırıldı ve hücrelere 1 saat 37 °C'de uygulandı. Anti-digoksinin konjugatı lamellere oda ısısında 30 dakika uygulandı. PBS yıkamalarından sonra, DAB peroksidaz substratı eklendi ve hematoksin ile zıt boyama yapıldı. Hücrelerin fotoğrafı Olympus BX-50 ışık mikroskobu ile çekildi.

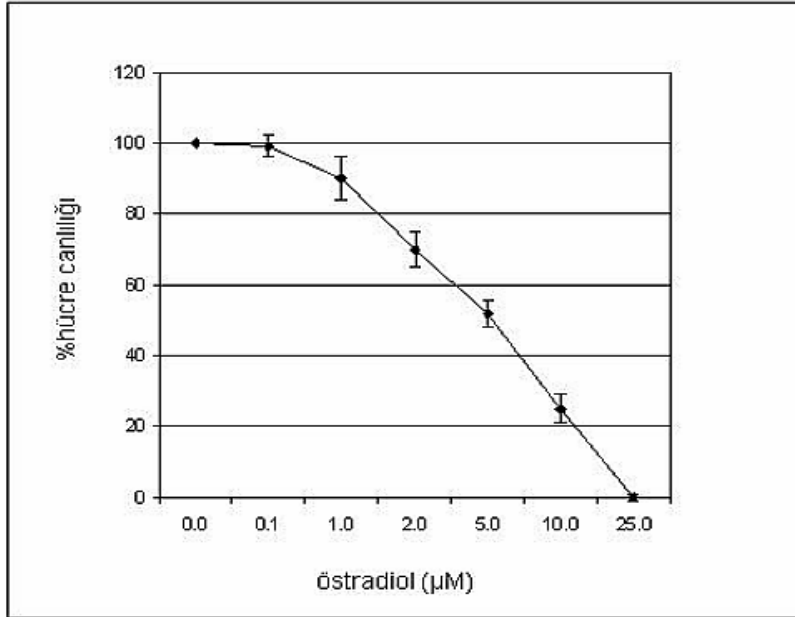
### **5.2.4. Hücre Canlılığının Ölçülmesi**

Hücre canlılığını ölçmek için Tripan mavisi boyama yöntemi kullanıldı. Hücreler tripsinize edildikten sonra PBS (9.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 150 mM NaCl, pH 7.4) içinde %0.04 tripan mavisi içeren solüsyonda inkübe edildi. Tripan mavisini içine almayan canlı hücreler ve içine alan ölü hücreler hemositometrede sayıldı.

## 6. BULGULAR

### 6.1. ÖSTRADIÖLÜN ISHIKAWA HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Endometriyum kaynaklı Ishikawa hücrelerinde östradiolün konsantrasyona bağlı etkilerini inceledik. Ishikawa hücrelerinde östradiolün konsantrasyona bağlı hücre canlılığı üzerine olan etkisi tripan mavisi uygulaması ile araştırıldı. Tripan mavisini içine almayan hücreler canlı olarak kabul edildi. Östradiol, düşük konsantrasyonda östrojen içeren %2 FBS içeren medyumda 0.1µM - 25 µM arası konsantrasyonlarda (IC50:5 µM) 24 saat içerisinde artan oranlarda hücre ölümüne yol açtı (Şekil 1).



**Şekil 1. Östradiol, Ishikawa hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne yol açtı.** Hücreler 24 saat artan konsantrasyonlarda östradiol ile inkübe edildi. Tripan mavisini içine almayan canlı hücreler mikroskop altında hemositometrede sayıldı. Her konsantrasyona karşılık gelen nokta üç ayrı deneyin ortalamasını göstermektedir.

%2 FBS içeren medyum kullanılmasının nedeni, FBS içerisindeki östrojen başta olmak üzere steroid konsantrasyonunu düşük tutmak, böylece postmenopozal kadınlardaki düşük östrojen düzeyine benzer bir ortam yaratmaktır. %10 FBS içeren medyumda ise hücre ölümü gerçekleşmedi. Böylece düşük östrojen içeren ortamda, düşük konsantrasyonlarda endometriyumda hücre büyümesini arttırdığı bilinen östrojenin, yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümüne yol açtığını gösterdik.

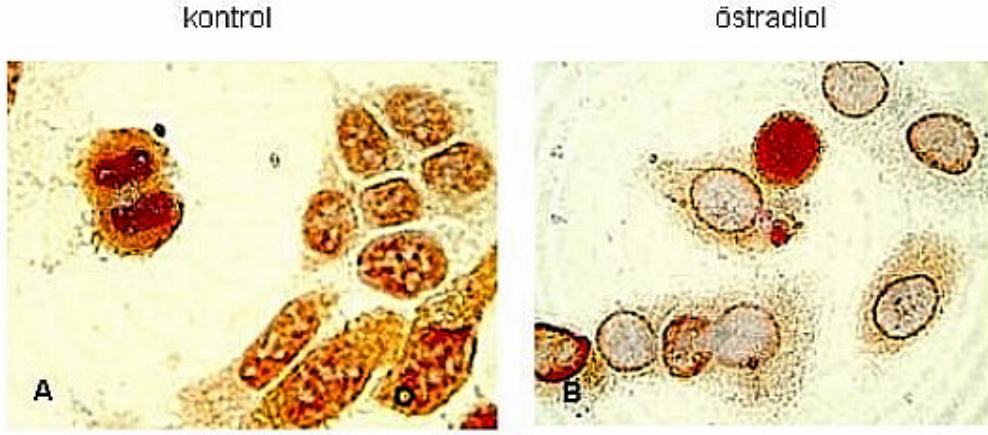
Bu bulgular, menopoz sonrası kadınlardaki düşük östrojen varlığında, yüksek dozda östrojen verilmesinin endometriyum kanserinin gerilemesine yol açabileceğini düşündürmektedir.

## **6.2. ÖSTRADIOLÜN ISHIKAWA HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

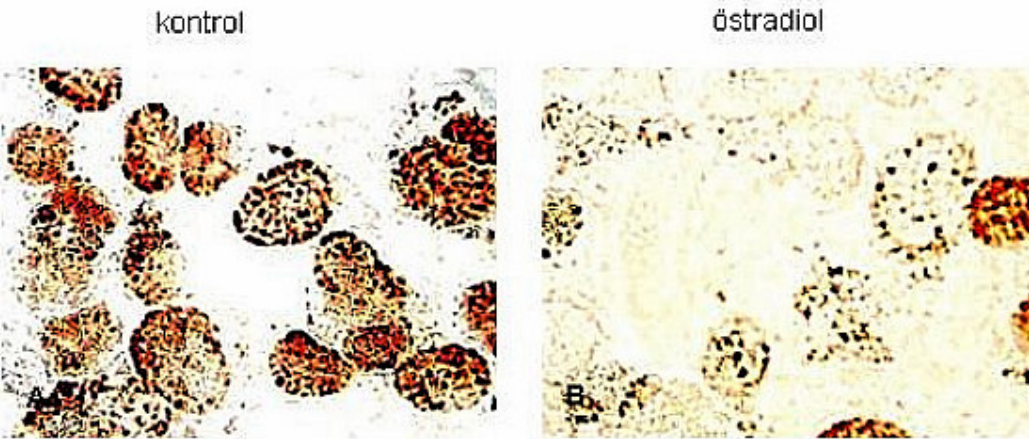
Ishikawa hücre ölümüne yol açan yüksek konsantrasyonlardaki östradiolün hücre proliferasyonu üzerine etkisi olup olmadığını araştırdık. Hücre proliferasyonunu, PCNA ekspresyonunun immünohistokimyasal metodla anti-PCNA antikoru kullanılarak incelenmesi ile araştırdık. PCNA ekspresyonu, nükleusda hücre siklusunun geç G<sub>1</sub> fazında artar ve S-fazında maksimum düzeye ulaşır. PCNA ekspresyon düzeyi hücre proliferasyon hızı ve DNA senteziyle doğru orantılıdır. PCNA, hücre proliferasyonunun başlatılmasında DNA-polimeraza kofaktör olarak kilit rol oynar (9,10). Düşük FBS (%2) içeren medyumda östradiol (20 µM) 18 saatte PCNA ekspresyonunu yaklaşık %90 oranında inhibe etti (Şekil 2a).

Ayrıca, östradiolün Ishikawa hücre proliferasyonunu hangi fazda bloke ettiğini saptamak için BrdU inkorporasyonu yöntemini kullandık. BrdU, DNA ya hücre siklusunun S-fazında inkorpore olur ve S-faz için belirleyicidir. Düşük FBS (%2) içeren medyumda östradiol (20 µM) Ishikawa hücrelerinde BrdU inkorporasyonunu 18 saat içinde yaklaşık %90 oranında inhibe etti (Şekil 2b). BrdU inkorporasyonundaki bu azalma, G<sub>1</sub>/S fazında hücre siklusunun bloke olduğunu düşündürmektedir.

a)



b)

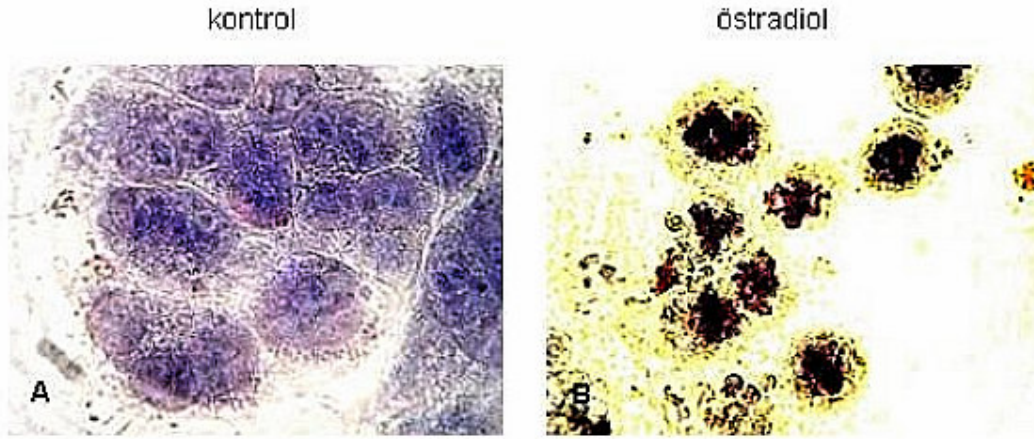


**Şekil 2. Östradiol, Ishikawa hücrelerinde proliferasyonu durdurdu.** Hücreler 18 saat (A) etanol (kontrol) ya da (B) 20  $\mu$ M östradiol ile inkübe edildi ve immünohistokimyasal boyama ile **a)** PCNA ekspresyonu **b)** BrdU inkorporasyonu gösterildi.

PCNA ekspresyonunda ve BrdU inkorporasyonundaki azalma, yüksek konsantrasyonlardaki östradiolün hücre proliferasyonunu inhibe ederek onu izleyen hücre ölümüne yol açtığını gösterdi.

### **6.3. ÖSTRADIOL ISHIKAWA HÜCRELERİNDE APOPİTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE YOL AÇTI**

Östradiolün Ishikawa hücrelerinde neden olduğu hücre ölümünün nekrotik veya apoptotik özellikler taşıyıp taşımadığını araştırdık. Bu nedenle TUNEL metodunu uyguladık. TUNEL metodu ile apoptotik hücre ölümüne giden hücrelerde karakteristik olarak görülen DNA fragmentasyonu saptanmaktadır (47).



**Şekil 3. Östradiol, Ishikawa hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne neden oldu.** Hücreler 24 saat (A) etanol (kontrol) yada (B) 20  $\mu$ M östradiol ile inkübe edildi ve TUNEL ile boyandı. Aynı preparatta hematoksilin ile nükleuslar görüntülendi. TUNEL-pozitif hücrelerde koyu kahverengi kromatin yoğunlaşması görülmektedir.

Şekil 3B’te görüldüğü gibi 24 saatlik östradiol (20 µM) uygulaması sonucu TUNEL-pozitif hücrelerin oranı zamana bağlı olarak arttı. Bu da östradiole bağlı apoptotik hücre ölümünü göstermektedir. Apoptotik hücrelerin içerisindeki kromozom yoğunlaşması koyu kahverengi olarak gözükmektedir. Kontrol hücrelerinde ise hematoxilen ile boyanmış mavi renkli nukleuslar sağlıklı olarak görülmektedir (Şekil 3A).

## 7. TARTIŞMA

İnsan endometriyumunun glandular ve stromal komponentleri hormonal kontrol altındadır. Menstruel siklus sırasında östradiol tarafından uyarılan proliferasyon, ovulasyon sırasında maksimum seviyeye ulaşır (44). Ovulasyondan sonra progesteron, östradiolün uyardığı endometriyal epitelin hücre proliferasyonunu inhibe eder ve hücrelerin sekretuar hücreler olarak diferansiyasyonunu sağlar (45). İmplantasyon yokluğunda, steroid hormonların düzeyinin azalması menstrasyon olarak bilinen, endometriyal epitelin hücre ölümü ile yıkımına yol açar (46).

Vücuttaki doğal östrojenler: Östron, östradiol ve östrioldür. Premenopozal kadınlarda serum östradiol düzeyi 200 pg/ml iken postmenopozal kadınlarda 10-15 pg/ml dir (47). Östrojen doğrudan ya da büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığı ile apoptotik yolları inhibe ederek endometriyum hücrelerinin yaşaması ve çoğalmasını sağlar. Progesteron ise, uterusu embriyo implantasyonuna hazırlar. Önceleri menstrasyon, endometriyumun fonksiyonel tabakasının iskemik nekrozu olarak düşünülürdü. Fakat yeni elektron mikroskopik çalışmalarda, geç sekretuar fazda insan endometriyal epitel hücreleri içerisinde apoptotik cisimler görüntülenmiştir (48). Diğer bir çalışmada ise östrojen ve progesteronun hücre kültür ortamında aniden azalmasının proapoptotik bir protein olan FasL reseptörünün membran lokalizasyonunu ve apoptozu uyardığı gösterildi (1). Hormonların bu etkileri hücre çoğalma ve diferansiyasyonu sırasında hücre yaşamsallığı ile apoptoza neden olan sinyal ileti yolları arasında sıkı bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Endometriyumun içinde bulunduğu hormonal ortamın bunda belirleyici olduğu düşünülmektedir. Menstruel siklusun geç foliküler fazında olduğu gibi östrojen ve progesteronun birden azalması endometriyal hücrelerin apoptozuna yol açmaktadır.

Asemptomatik postmenopozal kadınların yarısından fazlası difüz veya lokal şekilde zayıf proliferatif endometriyuma sahiptir. Bu durum, ER'lerinin var olduğuna ve sürekli düşük dozda östrojen uyarısı varlığında tümör gelişme olasılığı olduğuna işaretler. Atrofik endometriyumdan gelişen iyi diferansiye endometriyal karsinomların, bu tür zayıf proliferatif endometriyal salgı bezlerinden geliştiği düşünülmektedir. Geri kalan asemptomatik postmenopozal endometriyum atrofik ve inaktiftir, proliferatif veya sekretuar aktivite göstermez. Endometriyal adenokarsinomların, ya hiperplastik endometriyumda olduğu gibi aşırı, ya da zayıf proliferatif endometriyal salgı bezlerinde



olduğu gibi düşük ve uzun süreli östrojenik uyarı varlığında gelişebileceği varsayılmaktadır (49).

Endometriyal kanser kadın üreme organlarının en sık karşılaşılan kanserlerinden biridir ve kadınlarda görülen dördüncü sıradaki kanserdir (50). Endometriyal kanser oluşmasında östrojenin en önemli risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Östrojen uterus için potent bir mitojendir ve hormon replasman tedavisi (HRT) gibi uzun süreli düşük dozda östrojen tedavisinin kanser riskini arttırdığı bilinmektedir (51).

Bu çalışmamızda iyi diferansiye olmuş endometriyal kanser hücre soyu olan Ishikawa hücrelerinde yüksek konsantrasyondaki östradiole bağlı hücre ölümü karakterize edildi. ER ve PR içeren bu hücrelerde yüksek konsantrasyonda östradiolün düşük serum ve östrojen içeren ortamda hücre ölümüne yol açtığı ve bunun apopitotik özellikler gösteren bir hücre ölüm tipi olduğu gösterildi. Bu çalışmanın sonuçları, yüksek doz östrojenin menapoz sonrası azalan hormonların aşırı hassas hale getirdiği endometriyumdaki ER'leri aracılığı ile apopitoza yol açabileceğini veya postmenopozal kadınlarda ortaya çıkan anti-hormonal tedaviye dirençli endometriyal tümörleri geriletebileceğini düşündürmektedir. Östrojenin beklenmedik şekilde apopitoza yol açtığı meme kanserlerinde bildirilmişti (2-4), ve bu etkinin mekanizmasının meme kanserlerinde c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinaz (JNK) aktivasyonu aracılı sinyal ileti yolu aracılığı ile olduğu bildirilmiştir (5).

Apopitoz, ya da programlanmış hücre ölümü, organların gelişme ve homeostazisinde önemli, gen düzeyinde oluşan aktif bir hücre intiharı mekanizmasıdır. İnsan kanserlerinin apopitoza duyarlılığını arttıracak tedavi yöntemleri üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Antihormonal tedaviler, tamoksifen gibi, meme kanser tedavisinde kullanıldığında endometriyum kanser riskini arttırmaktadır (52). Bu nedenle, hem meme, hem de endometriyum kanserlerine karşı aynı antikanser etkiyi gösteren terapötik yaklaşımların bulunması önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, endometriyal kanser kaynaklı Ishikawa hücrelerinin yüksek konsantrasyonda östrojen verildiğinde hızla apopitotik hücre ölümüne gittiğini gördük. Yukarıda da değindiğimiz gibi, yüksek doz östrojen meme kanserlerinde de antiproliferatif ve apopitotik etkiye sahiptir. Bu açıdan, yüksek konsantrasyonda östrojenin hem meme, hem de endometriyum kanserlerinde aynı antikanser etkiyi göstermesi önemlidir. Yüksek konsantrasyonda östrojenin apopitotik ve antiproliferatif etkisinin moleküler mekanizmalarını açığa çıkarmak, meme ve endometriyum kanser tedavisinde yeni terapötik hedeflerin bulunmasına yol açabilecektir.

Çalışmamızda gösterdiğimiz bu bulgular, postmenapozal kadınlarda yüksek dozda östrojen tedavisinin meme kanserinde olduğu gibi (2-6) endometriyum kanserlerini de önleyebileceğini akla getirmektedir. Meme kanseri olan postmenapozal kadınlarda Diethylstilbestrol (DES) veya ethinyl östradiol ile yapılan hormon tedavisinin tümör gerilemesine yol açtığı bilinmektedir (2-6). Bu durum, uzun süre östrojen yokluğunda, tümör hücrelerinin yüksek doz östradiolün proapoptotik etkisine duyarlı hale gelmesi ile açıklanmıştır.

Östrojen pek çok hücrel fonksiyonu etkileyen steroid bir hormondur. Östrojenin uyardığı klasik genomik sinyal ileti yolu, östrojenin ER'ne bağlanıp dimerize olması ve östrojenin etkilediği genlerin promoter bölgesindeki östrojene cevap veren elemente bağlanmasıdır (53). Östrojen ayrıca, hızlı ve genomik olmayan olayları çeşitli membrana bağlı sinyal ileti yollarını aktive ederek regüle edebilir (54). Bizim çalışmamızdaki östrojene bağlı uzun sürede oluşan etkiler daha çok östrojenin uyardığı klasik genomik yolu düşündürmektedir. Yine de, östradiolün bazı metabolitlerinin uzun süre inkübasyon boyunca birikerek ER'ne bağlı olmadan bu sitotoksik etkiye yol açtığı düşünülebilir. Östradiolün bir endojen metaboliti olan 2-methoxyestradiol (2-ME)'ün bazı kanser türlerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkisi olduğu bildirilmiştir (55). Östrojenin doğal metaboliti olmasına rağmen 2-ME, ER'ne çok zayıf olarak bağlanır, bu nedenle 2-ME'nin antikanser etkilerinin ER'ne bağlı olmadığı düşünülmektedir (56). Bu çalışmamız, meme kanserinde daha önce gösterildiği gibi (5), yüksek doz östrojenin endometriyumdaki etkilerinin ER'ne bağlı olduğunu düşündürse de, östrojenin endometriyumda yarattığı bu etkilerin moleküler mekanizmalarının daha ileri araştırılması gerekecektir.

## 8. SONUÇ

- Endometriyum, kadınların reproduktif hayatları boyunca sürekli değişen ve yoğun proliferatif aktiviteye sahip bir dokudur.
- Menapozdan sonra endometriyum dokusu overlerin fonksiyonunun azalması sonucu atrofiye uğrar. Bu durumda, fonksiyonel tabaka kaybolur, endometriyal salgı bezleri kistik bir şekil alır, proliferatif ve salgı fonksiyonlarını kaybederler ve sonuçta endometriyal stroma fibröz dokuya dönüşür.
- Paradoksal olarak, endometriyal adenokarsinomların çoğu bu atrofik zeminde gelişir, %20 gibi az bir bölümü ise hiperplastik endometriyumda gelişir. Bu durum, postmenopozal endometriyumun, atrofik olmasına rağmen, düşük dozdaki östrojenik uyarıya zayıf bir proliferatif aktivite ile cevap verdiğini göstermektedir.
- HRT ile verilen düşük doz östrojenin de postmenopozal kadınlarda uterus karsinoma riskini arttırdığı bilinmektedir.
- Bu çalışmamızda, iyi diferansiye olmuş endometriyal kanser hücre soyu olan Ishikawa hücrelerinde östradiolün konsantrasyona bağlı olarak hücre yaşamsallığı ve proliferasyonu üzerine olan etkileri incelendi.
- ER ve PR içeren bu hücrelerde, yüksek konsantrasyonda östradiolün postmenopozal kadınlarda olduğu gibi düşük östrojen içeren ortamda, hücre proliferasyonunun azalmasına ve hücre ölümüne yol açtığı ve bunun apoptotik özellikler gösteren bir hücre ölüm tipi olduğunu gösterdik.
- Hücresel düzeyde endometriyum kaynaklı hücrelerde ilk olarak gösterdiğimiz bu etki, postmenopozal kadınlarda yüksek doz östrojenin meme kanserinde olduğu gibi endometriyum kanserlerini de geriletebileceğini düşündürmektedir.

## 9. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde ve Yüksek Lisans tezimin oluşturulmasında büyük bir özveriyle bana yardımcı olan, yol gösteren ve zaman ayıran danışmanım sayın Doç. Dr. Nedret Altıok'a; eğitimim süresince bana kazandırmış olduğu bilgilerden ve yardımlarından dolayı hocam Doç. Dr. Meral Koyutürk'e, deney çalışmaları esnasında büyük yardımını gördüğüm bitmek bilmeyen sorularıma büyük sabırla cevaplayan laboratuvarında görevli arkadaşım Melike Ersöz'e, her fırsatta yardımına koşan Enstitü Sekreterimiz İlknur Karaosmanoğlu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürem boyunca benim yanımda olan ve bir an olsun desteğinin eksikliğini hissetmediğim aileme teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmam süresince sabır ve desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

## 10. KAYNAKLAR

1. Song J, Rutherford T, Naftolin F, Brown S, Mor G. Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod.* 2002, 8(5):447-55.
2. Jordan VC, Lewis JS, Osipo C, Cheng D. The apoptotic action of estrogen following exhaustive antihormonal therapy: a new clinical treatment strategy. *Breast.* 2005, 14: 624-630.
3. Song RX, Santen RJ. Apoptotic action of estrogen. *Apoptosis.* 2003, 8:55-60.
4. Peethambaram PP, Ingle JN, Suman VJ, Hartmann LC, Loprinzi CL. Randomized trial of diethylstilbestrol vs. tamoxifen in postmenopausal women with metastatic breast cancer. An updated analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 1999, 54:117–122.
5. Altıok N, Koyuturk M, Altıok S. JNK pathway regulates estradiol-induced apoptosis in hormone-dependent human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* (2006 Kasım, baskıda).
6. Agrawal A, Robertson JF, Cheung K. Efficacy and tolerability of high dose ethinylestradiol in post-menopausal advanced breast cancer patients heavily pre-treated with endocrine agents. *World J Surg Oncol.* 2006, 4:44.
7. Santen RJ, Lobenhofer EK, Afshari CA, Bao Y, Song RX. Adaptation of estrogen-regulated genes in long-term estradiol deprived MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2005, 94:213-223.
8. Michelle D. Garrett. Cell cycle control and cancer. *Current Science.* 2001, 81:515-522.
9. Shivji MKK, Kenny MK, Woods RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell.* 1992, 69:367-374.
10. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Waseem NH, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol.* 1990, 162:285-294.
11. Kurki P, Ogata K, Tan EM. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1988, 109:49-59.
12. Waga S, Hannon GJ, Beach D, and Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent

- kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994, 369:574-578.
13. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine : Part I. Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J*. 1994, 102:339-369.
  14. Dover R, Patel K. Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry*. 1994, 102:383-387.
  15. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995, 267:1456-1462.
  16. Ameisen JS. The origin of programmed cell death. *Science*. 1996, 272:1278.
  17. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*. 1995, 146:3-15.
  18. Levison DA, Hopvwood D. Atrophy amd apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol*. 1976, 159-166.
  19. Cohen JJ. Apoptosis. The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*. 1993, 15:35-43.
  20. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis, the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 1993, 14:133-144.
  21. Ishizaki Y, Cheng L, Mudge AW and Raff MC. Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts and cancer cells. *Mol Bio Cell*. 1995, 6(11):1443-1458.
  22. Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD and Raff MC. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol*. 1996, 133(5):1053-1059.
  23. Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev*. 2002, 102(12):4489-4500.
  24. Hu YM, Benedict MA, Ding LY. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*. 1999, 18:3586-3595.
  25. Krajewski S, Krajewska M, Ellby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci*. 1999, USA 96:5752-5757.
  26. Salvesen GS, and Renatus M. Apoptosome: the seven –spoked death machine. *Dev Cell*. 2002, 2(3):256-257.

27. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Nueropathol Exp Neurol*. 2001, 60:422-429.
28. Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1998, 36:683-690.
29. Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Gopin IS, Opas M, Bleackly CR, Green RD, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol*. 2000, 150:731-740.
30. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 2001, 276:869-874.
31. Ferenczy A. Anatomy and histology of the uterine corpus..In Kurman, R.J. Ed: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Springer-Verlag, New York, pp.327-336,1994.
32. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-Å. Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chorosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997, 82:4258.
33. Glass CK and Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional function of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000, 14:121-141.
34. Orphanides G and Reinberg D. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature*. 2000, 407:471-475.
35. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL & Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors exist and function as dimers. *Molecular Endocrinology*. 2004, 18: 2854-2865.
36. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular Endocrinology*. 2005, 19:1951-1959.
37. Press MF. Gynecologic Cancers. *Cancer*. 1998, 83:1751-1756.
38. Wingo PA, Ries LAG, Giovino GA, Mille DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ and Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer,1973-1996. *J Natl Cancer Inst*. 1999, 91:675-690.

39. Bengisu E, Ermiş H: Endometrial Hiperplazi. In: Jinekolojik Onkoloji. Ed: Atasü T, Aydınlı K. İstanbul, Logos yayıncılık, 1999.
40. Atasü T, Şahmay S: Uterusun malign hastalıkları. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2001.
41. Katzenellenbogen BS, Frasor J. Therapeutic targeting in the estrogen receptor hormonal pathway. *Semin Oncol* . 2004, 31:28-38.
42. Kuramoto H, Tamura SYN. Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol*. 1972, 114:1012-1019.
43. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000, 407: 771-776.
44. Ferenzy, A and Guralnic, M. Endometrial microstructure: structure–function relationship throughout the menstrual cycle. *Semin Reprod Endocrinol*. 1983, 1:205–219.
45. Clarke, CL and Sutherland, RL. Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev*. 1990, 11:266–301.
46. Noyes RW, Hertig A T and Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975, 122:262–263.
47. Jiang NS, Ryan RJ, Albert A. Radioimmunoassay of serum estrogen. *Clin Chem*. 1973, 19: 740-747.
48. Kokawa, K, Shikone, T and Nakano, R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996, 81: 4144–4147.
49. Sivridis E, Giatromanolaki A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004, 57(8):840-844.
50. Burke TW, Fowler WC. Jr and Morrow CP. Clinical aspects of risk in women with endometrial carcinoma. *J Cell Biochem*. 1995, 23:131–136.
51. Hulka BS, and Brinton LA. Hormones and breast and endometrial cancers: preventive strategies and future research. *Environ Health Perspect*. 1995, 103:185–189.
52. Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, Perlman JA, Ford L. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 1999, 6;91(19):1654-1662.



53. Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson E R, Warner M, Gustafsson J A. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett.* 2003, 546:17–24.
54. Sak K, Everaus H. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol--diversity of membrane binding sites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004, 88:323-335.
55. Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP and Schweigerer L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature.* 1994, 368:237–239.
56. Han GZ, Liu ZJ, Shimoi K, Zhu BT. Synergism between the anticancer actions of 2-methoxyestradiol and microtubule-disrupting agents in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005, 65:387-393.