

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOMETRİYAL ENDOTEL HÜCRELERİNDE
İN VİVO BİP EKSPRESYONU VE BİP'İN
İNFLAMATUAR SİTOKİNLER TNF-ALFA VE
İNTERLÖKİN 1 (IL-1) BETA TARAFINDAN
İN VİTRO DÜZENLENMESİ**

NEHİR ŞERİFE OCAK

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEU. HSI.Msc.2007970179

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOMETRİYAL ENDOTEL HÜCRELERİNDE
İN VİVO BİP EKSPRESYONU VE BİP'İN
İNFLAMATUAR SİTOKİNLER TNF-ALFA VE
İNERLÖKİN 1 (IL-1) BETA TARAFINDAN
İN VİTRO DÜZENLENMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

NEHİR ŞERİFE OCAK

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYELERİ:

1-Doç. Dr. Hüsnü Alper BAĞRIYANIK

2-Doç. Dr. Ümit Ali KAYIŞLI

**(Bu araştırma Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Reprodüktif Endokrinoloji Bölümü
tarafından desteklenmiştir.)**

TEZ KODU: DEU. HSI. Msc.2007970179

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans programı öğrencisi Nehir Şerife
OCAK' ın ENDOMETRİYAL ENDOTEL HÜCRELERİNDE İN VİVO BİP
EKSPRESYONU VE BİP'İN İNFLAMATUAR SİTOKİNLER TNF-ALFA VE
İNTERLÖKİN 1 (IL-1) BETA TARAFINDAN
İN VİTRO DÜZENLENMESİ Konu u yüksek lisans tez 26.05.2011 tarihinde
tarafım zdan değerlendirilerek başarılı/ başarılı bulunmuştur.

Doç. Dr. Hüsnü Alper BAĞRIYANIK

BAŞKAN

Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

ÜYE

Doç. Dr. Çetin PEKÇETİN

ÜYE

Doç. Dr. Esra ERDAL

ÜYE

Doç. Dr. Bekir UĞUR ERGÜR

ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	xi
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Uterus.....	8
2.1.1. Miyometriyum.....	8
2.1.2. Endometriyum.....	9
2.1.3. Uterus ve Hormon Etkileşmesi.....	11
2.1.4. Hormonların Siklik Regülasyonları.....	12
2.2. Sitokinler.....	13
2.2.1. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β).....	14
2.2.2. Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α).....	15
2.3. Endotel Hücreleri.....	17
2.4. Anjiyogenez.....	17
2.4.1. Endometriyum Anjiyogenezi.....	18
2.5. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz) ve Nekroz Tanımı.....	19
2.5.1. Apoptoz Saptama Yöntemleri.....	21
2.5.2. Endometriyumda Apoptoz.....	22
2.6. Endoplazmik Retikulum (ER).....	23
2.6.1. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	23
2.6.2. Tunikamisin.....	24
2.6.3. Tunikamisinin Apoptotik Etkisi.....	24
2.6.4. Tauroursodeoxycholicacid (TUDCA).....	24
2.7. Katlanamayan Protein Cevabı (UPR=Unfolding Protein Response)	25
2.7.1. UPR Mekanizması.....	25

2.7.2. Protein Kinaz Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (PERK).....	26
2.7.3. İnositol Requiring Transmembran Endonükleaz (IRE1).....	26
2.7.4. Aktive Transkripsiyon Faktörü-6 (ATF6).....	26
2.7.5. Glukoz-Regulated Protein 78 kDa (GRP78/BİP).....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Araştırmanın tipi.....	28
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı.....	28
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme/çalışma grupları.....	28
3.4. Çalışma Materyali.....	30
3.5. Araştırmanın değişkenleri.....	30
3.6. Veri toplama araçları.....	30
3.6.1. Araştırmada kullanılan demirbaş malzemeler.....	30
3.6.2. Araştırmada kullanılan yöntemler.....	31
3.6.2.1. Endometriyum Endotel Hücrelerinin İzolasyonu.....	31
3.6.2.2. Işık Mikroskopik Doku Takibi, İmmunohistokimya İmmunositokimya.....	31
3.6.2.3. Hücre Proliferasyon Deneyi (MTS)	32
3.6.2.4. Microbead-bağlanmış-anti-CD105 kaplı Petri Kaplarının Hazırlanması	33
3.6.2.5. İn Vitro Endotel Hücre Deneyleri.....	33
3.6.2.6. Total Proteinlerin Elde Edilmesi.....	34
3.6.2.7. Western Blot.....	34
3.6.2.8. ELİSA Yöntemi.....	35
3.6.2.9. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling) Boyaması.....	36
3.7. Araştırma planı ve takvimi.....	37
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	38
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	38
3.10. Etik Kurul Onayı.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Menstrual siklus ve erken gebelik boyunca insan endometriyum endotel hücrelerinde (HEEC) in vivo BİP ekspresyonu.....	39

4.2. HEEC proliferasyonu üzerine Tunikamisin, TUDCA ve inflamatuvar sitokinlerin etkisi.....	40
4.3. HEEClerde TUNEL ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi.....	42
4.4. HEECde IL-8 sekresyonunun inflamatuvar sitokinler, Tunikamisin ve TUDCA ile düzenlenmesi.....	44
4.5. HEEClerde BİP ve eIF-2 α proteininin ovaryum hormonları ve sitokinler tarafından düzenlenmesi.....	45
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR.....	58
8. EKLER.....	68

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Dişi üreme organları (3).....	8
Şekil 2. Endometriyum damarlanma (22).....	10
Şekil 3. Uterinal ve ovaryal siklus boyunca hormonal değişimler (22).....	11
Şekil 4. TNF ve IL-1 etkileri (35).....	15
Şekil 5. TNF'nin hücrelerle ilişkisi (38).....	16
Şekil 6. Anjiyogenez basamakları şematize edilmiştir (46 nolu kaynaktan değiştirilerek çizilmiştir).....	19
Şekil 7. Hücre içi ve dışı yollarla uyarılan apoptozun biyokimyası (51).....	21
Şekil 8. Memelilerde UPR yolağının şematik gösterilmesi (78).....	25
Şekil 9. Kullanılan antikörlerin metalik kaplanmış özelliğine dayanarak, mıknatısla güçlendirilmiş petri kabında manyetik alan oluşturulması. Böylece metalik parçalarla kaplanmış antikör manyetik alan oluşturulmamışlara göre çok daha hızlı ve sağlam bir şekilde petri tabaklara bağlanmaktadır. (Ümit Ali Kayışlı'nın doktora tezinden izni dahilinde alınmıştır.).....	33
Şekil 10 A-G. Menstrual siklus endometriyal dokularında (A-D) ve birinci trimester desidual doku (E,F) endotel hücrelerinde BİP immunoreaktivitesi. A, erken proliferasyon; B, geç proliferasyon; C, orta sekresyon; D, geç sekresyon; E-F, birinci trimester. (Ok; İnsan endometriyal endotel hücrelerini göstermektedir. Ok başı; Spiral arter endotel hücrelerini göstermektedir).....	39
Şekil 11. Menstrual siklus boyunca endometriyal doku ve erken gebeliğe ait desidual doku endotel hücrelerinde BİP immunoreaktivitesinin HSCORE değerlendirilmesi. (EP: Erken proliferasyon; MP: Orta proliferasyon; LP: Geç proliferasyon; ES: Erken sekresyon; MS: Orta sekresyon; LS: Geç sekresyon) * $p<0,05$ geç sekresyon fazına kıyasla erken gebelik, orta sekresyon ve geç proliferasyon fazlarındaki anlamlı azalımı.....	40
Şekil 12 A, B. Tunikamisine uyarılan HEEClerde hücre proliferasyonu. Tunikamisine 24 saat (A), ve 48 saat (B) sonunda HEECler üzerindeki antiproliferatif etkisi izlenmekte. Barlar her grup için 12 farklı değerlerin ortalama $\pm$ SEM değerlerini göstermektedir. Kontrole kıyasla tunikamisinde anlamlı azalma doz bağımlı olarak saptandı. * $p<0.05$	41

Şekil 13 A-B. TUDCA, TNF- α ve IL-1 β ya cevap olarak HEECLerde hücre proliferasyonu. Hücreler TNF- α ve IL-1 β , Tnf- α ve IL-1 β nın TUDCA'lı kombinasyonu ile 24 saat (A), ve 48 saat (B) uyarıldılar. Kontrole kıyasla TUDCA sitokinlerle birlikte verildiğinde sitokinlerin etkisini anlamlı olarak azalttı. Barlar her grup için 12 farklı değerin ortalama $\pm$ SEM değerlerini göstermektedir. *p<0.05.....	42
Şekil 14 A-D. İnflamatuvar sitokinlerle 48 saat kültüre edilen HEECLerde TUNEL işaretlenmesi. A, Kontrol; B, TNF- α ; C, IL-1 β ; D, Negatif. Kırmızı renkli hücre çekirdekleri apoptoza giden TUNEL pozitif hücreleri, mavi renkli hücre çekirdekleri ise hematoksilenle boyanmış TUNEL negatif hücreleri temsil etmektedir.....	43
Şekil 15. HEECLerin TNF- α (10 ng) ve IL-1 β (10 ng) ile 48 saat uyarılması sonunda TUNEL(+) HEECLerin toplam HEECLere oranı.*p<0,05.....	43
Şekil 16 A,B. HEECLerde IL-8 sekresyonunun ELİSA ile gösterilmesi. Hücreler TNF- α ve IL-1 β ile TUDCA'nın bu sitokinlerle kombinasyonu ile(A), doz bağımlı olarak tunikamisin ve tunikamisinin TUDCA'lı kombinasyonu ile (B) 48 saat uyarıldılar. Barlar IL-8 seviyesini pg/ml olarak göstermektedir.*p<0.05.....	45
Şekil 17. BİP protein seviyesinin ovaryum steroidleri östrojen ve progesteron tarafından regülasyonu. C, kontrol; E, östrojen (10 ⁻⁸ M); P, progesteron (10 ⁻⁷ M); E+P, östrojen (10 ⁻⁸ M) + progesteron (10 ⁻⁷ M).....	46
Şekil 18. eIF-2 α protein seviyesinin östrojen ve progesteron tarafından regülasyonu. C, kontrol; E, östrojen (10 ⁻⁸ M); P, progesteron (10 ⁻⁷ M); E+P, östrojen (10 ⁻⁸ M) + progesteron (10 ⁻⁷ M). *p<0.05 progesteron uyarılmış HEECLer, kontrol, östrojen ve östrojen+progesteron ile uyarılmış HEECLer ile kıyaslandığında.....	47
Şekil 19. HEECLerde BİP varlığının inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenmesi. HEECLerin TNF- α ve IL-1 β ile 24 saat ve 48 saat uyarılması sonunda BİP ekspresyonu.....	48
Şekil 20. A-G. TNF- α ve IL-1 β uyarılmış HEECLerde BİP immunoreaktivitesi. (A-D) 24 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEECLerde BİP pozitifliği izlenmekte A, Kontrol; B, TNF- α ; C, IL-1 β ; D, Negatif; (E-H) 48 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEECLerde BİP pozitifliği izlenmekte. E, Kontrol; F, TNF- α ; G, IL-1 β ; H, Negatif.....	49
Şekil 21. HEECLerde fosfo eIF-2 α varlığının inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenmesi. HEECLerin TNF- α ve IL-1 β ile 45 dakika ve 8 saat uyarılması sonunda fosfo eIF-2 α ekspresyonu. M, Marker; C, Kontrol; TNF, TNF- α ; p-eIF-2 α , Fosfo eIF-2 α , 45 min, 45 dakika; 8h,8 saat.....	50

Şekil 22 A-G. HEECLerin TNF- α ve IL-1 β ile 8 saat uyarılması sonunda fosfo- ve total-eIF-2 α immunoreaktivitesi. (A-D) 8 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEECLerde fosfo-eIF-2 α pozitifliği izlenmekte. A, Kontrol; B, TNF- α ; C, IL-1 β ; D, Negatif; (E-F) 8 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEECLerde eIF-2 α pozitifliği izlenmekte. E, Kontrol; F, TNF- α ; G, IL-1 β ; H, Negatif.....51

KISALTMALAR

ABC	: Avidin-Biyotin Kompleksi
AEC	: Amino-Etil-Karbazol
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APO-1	: Fas Ligandı
ATF6	: Aktive Transkripsiyon Faktörü-6
BCL-2	: B-Hücre Lenfoma-2
BID	: BCL-2 Etkileşim Domeyni
BİP	: Bağlanabilen İmmünoglobulin Protein (Binding immunoglobulin protein)
BSA	: Bovin Serum Albumini (Bovine serum albumin)
bZIP	: Temel Bölge Lösün Fermuarı
CD95	: Hücre Ölümü-95
DAPI	: 4,6-diamidino-2-phenylindole
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMEM	: Dulbecco'nun Minimal Temel Medyumu
ECL	: Enzimatik Kemiluminisans
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Asit
EGDA	: Ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EGM	: Endotelial Hücre Büyüme Medyumu
eIF-2α	: Ökaryotik Başlangıç Faktörü (Eukaryotic Initiation Factor)
ER	: Endoplazmik Retikulum
ER-α	: Östrojen Reseptör Alfa
ER-β	: Östrojen Reseptör Beta
ERAD	: Endoplazmik Retikulum İlişkili Protein Degradasyonu
FADD	: Ölüm Domeyni Bağlı Fas İlişkili Protein (Flavin Adenin Dinucleotid)
FaSL	: Fas Ligandı
FBS	: Fetal Bovin Serumu
FITC	: Flouroseinotiyosiyanat
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon (Folikül Stimüle Hormon)
GnRH	: Gonadotropin Salgılayıcı Faktör (Gonadotropin Releasing Hormon)

GRP-78	: Glukoz Regüle Protein-78 (Glucose-regulated protein)
HEEC	: İnsan Endometriyal Endotelyal Hücresi
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
HSP90B1	: Isı Şok Proteini 90-B1 (Heat Shock Protein)
HSPA-5	: Isı Şok Proteini A-5 (Heat Shock Protein)
ICAM-1	: Hücre İçi Adezyon Molekülü
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IRE1	: İnositol Requiring Transmembran Endonükleaz
LH	: Luteinleştirici Hormon (Luteinizing hormon)
MCP-1	: Monosit Kemotaktik Protein-1
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MMP	: Matriks Metallo Proteinaz
MTS	: 3-4,5-dimetylthiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)2-(4-sulfophenyl)
NaCl	: Sodyum Klorür
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Solusyonu (Potasyum Fosfat Buffer)
PDI	: Protein Disülfid İzomeraz
PERK	: Protein Kinaz Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz
PMSF	: Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride
PR-A	: Progesteron Reseptör-A
PR-B	: Progesteron Reseptör-B
TACE	: TNF-Alfa Dönüştürücü Enzim
TBS-T	: Tween-20'li Tris Tamponlu Tuz Solusyonu
TGF-β	: Tümör Büyüme Faktörü (Transforming growth factor beta)
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör (Tumor necrosis factor alpha)
TNFR-1,2	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TRAIL	: Tümör Nekrozis Faktör İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
TRAIL-R	: Tümör Nekrozis Faktör İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand Reseptörü
TUDCA	: Tauroursodeoksikolik Asit 2H-tetrazolium, Inner Salt

TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase [Tdt]- Mediated dUTP- Biotin Nick-End Labeling (Terminal d-UTP Nick End İşaretleme)

UDCA : Ursodeoksikolik Asit

UPR : Katlanamayan Protein Cevabı (Unfolded protein response)

XBP-1 : X-Box Bağlanan Protein (X-box binding protein)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde bilgilerini, sabırlarını, desteklerini benden esirgemeyen sayın danışmanlarım Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK ve Doç. Dr. Ümit A. KAYIŞLI ve ailesine, üzerimde çok emeği olan Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL' a; sevgili Histoloji-Embriyoloji kürsüsü öğretim üyelerine; her zaman beni destekleyen dostlarıma; bu dünyadan erken ayrıldığını düşündüğüm, hep yüreğimde taşıdığım babam Ali OCAK, dedem Mustafa OCAK ve hayatım boyunca hem yanımda hem de arkamda duran sevgili annem Zeynep OCAK' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nehir Şerife OCAK

ENDOMETRİYAL ENDOTEL HÜCRELERİNDE İN VİVO BİP EKSPRESYONU VE BİP'İN İNFLAMATUAR SİTOKİNLER TNF-ALFA VE İNTERLÖKİN 1 (İL-1) BETA TARAFINDAN İN VİTRO DÜZENLENMESİ

Nehir Şerife Ocak

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir.

ÖZET

Amaç:

Bu tezde insan endometriyal endotel hücre (HEEC) lerinde inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle meydana gelen endoplazmik retikulum (ER) stresine bağlı katlanamayan protein cevabın (UPR) düzenlenmesinin incelenmesi hedeflendi.

Yöntem:

Çalışmada *in vivo* menstrual siklusun ve erken gebeliğin farklı dönemlerine ait 35 doku örneğinde BİP ile immunohistokimya boyamaları yapıldı. *İn vitro* olarak ise HEEC izolasyonu ve kültürü yapıldı. Kültürdeki HEEClere pasajlandıktan sonra 4 gözlü lamlara ve 96 gözlü mikroplytlere ekildi. 4 gözlü lamlara ekilen HEEClere inflamatuvar sitokinlerle 24 ve 48 saat uyarıldı. Deney sonunda fikse edilen HEEClere BİP, fosfo- ve total-eIF-2 α immunositokimya ve TUNEL tekniği uygulandı. Doksan altı gözlü mikroplytlere ekilen HEEClere ise, 24 ve 48 saat inflamatuvar sitokinler, UPR inhibitörü TUDCA ve UPR uyarıcı tunicamisinle uyarılarak MTS ve ELİSA teknikleri ile analiz edildi. Ayrıca inflamatuvar sitokinler ve ovaryan hormonlarla stimüle edilen HEEClere BİP ve eIF-2 α 'nın seviyesi ve eIF-2 α 'nın fosforilasyon düzeyi Western blot tekniği ile belirlendi.

Bulgular:

İn vivo endometriyal doku ve erken gebeliğe ait desidual doku endotel hücrelerinde, BİP immunoreaktivitesinin HSCORE değerlendirilmesi ile normal menstrual siklus boyunca geç sekresyon fazında en yüksek; erken gebelikte ve orta sekresyon fazında ise en düşük BİP immunoreaktivitesi saptandı.

In vitro koşullarda tunikamisine uyarılan HEEClerde kontrole kıyasla, MTS sonucunda ortaya çıkan hücre sayısındaki anlamlı azalmanın, doz bağımlı olduğu izlendi. Ayrıca, IL-1 β 'nın kontrole göre hücre sayısındaki arttırıcı etkisi TUDCA ile birlikte verildiğinde, ortadan kalktı.

TUNEL tekniğı kullanılarak TNF- α ile uyarılmış HEEClerde kontrole kıyasla daha fazla apoptoza uğramış hücre görüldü.

HEEClerin tunikamisin ile doz bağımlı olarak ve TNF- α ile uyarıldığında IL-8 sekresyonunu anlamlı olarak arttırdığı saptandı. Tunikamisinin bu etkisinin, TUDCA ile birlikte uygulandığında anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. TUDCA, TNF- α 'nın da anlamlı etkisini ortadan kaldırdı.

Ovaryum steroidleri ile uyarılmış HEEClerde BİP ve eIF-2 α protein seviyesi, kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermedi, fakat eIF-2 α 'nın fosforilasyon seviyesi incelendiğinde progesteronun; kontrol, östrojen ve östrojen+progesteron gruplarına kıyasla anlamlı olarak azaltıcı etkisi saptandı. Ayrıca, HEEClerin inflamatuvar sitokinlerle uyarılması sonucunda BİP seviyesinin ve eIF-2 α proteininin fosforilasyon seviyesi kontrole göre anlamlı olarak artış gösterdi. Aynı deneyin immunositokimyasal analizleri de bu Western blot sonuçlarımızla paraleldi.

Sonuç:

Bulgularımıza dayanarak UPR sinyal yolağının insan endometriyumunda endotel hücre proliferasyonun ve apoptozunun moleküler kontrolünde rol aldığını ve bu sürecin menstrual siklus bağımlı olarak kontrol edildiğı söylenebilir. Ayrıca bulgularımız inflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-1 β 'nın HEEClerde UPR sinyalinin aktivasyonundan sorumlu moleküllerden iki tanesi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler:

Endometriyal endotel hücreler, inflamatuvar sitokinler, ER stresi, UPR, BİP

**IN VIVO BIP EXPRESSION IN HUMAN ENDOMETRIAL ENDOTHELIAL CELLS
AND IN VITRO MODULATION OF BIP BY THE INFLAMMATORY CYTOKINES
TNF-ALPHA AND INTERLEUKIN 1 (IL-1) BETA**

Nehir Şerife Ocak

**Department of Histology and Embryology, Dokuz Eylul University Medical Faculty,
Balcova, Izmir.**

ABSTRACT

Purpose:

In this thesis the effects of TNF- α and IL-1 β on unfolding protein response (UPR) related with endoplasmic reticulum (ER) stress in human endometrial endothelial cells (HEECs) was investigated.

Materials and Methods:

In vivo 28 endometrial tissues from women with different menstrual cycle stages and 7 decidual tissues from early pregnancy were examined for BIP expression using immunohistochemistry. In *in vitro*: HEECs were treated for 24 and 48 hours with TNF- α and IL-1 β and evaluated for BIP, total (total-) and phosphorylation (phospho-) eIF-2 α expressions by using immunocytochemistry and for apoptosis using TUNEL technique. HEECs also were treated with TUDCA and tunicamycin to analyze for cell proliferation by MTS assay and IL-8 secretion by ELISA. Furthermore, expression of BIP, phospho- and total- eIF-2 α in HEECs stimulated by TNF- α , IL-1 β and sex hormones estrogen and progesterone were also evaluated by Western blot analysis.

Results:

In vivo: BIP immunostaining was detected at the highest level in HEEC during the late-secretory phase of the menstrual cycle and the lowest in HEEC from the mid-secretory phase and early pregnancy samples. *In vitro*: Tunicamycin decreased HEECs proliferation compared with control in a dose dependent manner. IL-1 β increased proliferation of HEECs, while TUDCA decreased this proliferative effect of IL-1 β . Furthermore, tunicamycin increased IL-8 secretion in HEECs in a dose-dependent manner which was blunted by TUDCA. Similarly, TNF- α increased IL-8 secretion in HEECs and combination of TUDCA

eliminated this effect of TNF- α . TUNEL analysis demonstrated that TNF- α increased the apoptotic cell number in HEECs. Western blot results revealed that BIP protein level was increased by TNF- α and IL-1 β while ovarian hormones unchanged the BIP protein level compared with control. Phospho-eIF-2 α protein expressions were increased by TNF- α and IL-1 β , but decreased by progesterone while estrogen had no effect. According to immunocytochemical analysis BIP and phospho-eIF-2 α expression in cytokine-stimulated HEECs were increased compared to control.

Conclusion:

Our results suggest that UPR signaling pathway is involved in molecular control of endometrial endothelial cell proliferation and apoptosis, and that process is controlled in a menstrual cycle-dependent manner. Furthermore, our findings reveal that the inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β are one of the factors responsible from activation of UPR signaling in HEEC.

Key words:

Endometrial endothelial cells, inflammatory cytokines, ER stress, UPR, BIP

1. GİRİŞ VE AMAC

Uterus geçirdiği değişiklikler açısından insan vücudundaki en dinamik dokulardan birisidir. Endometriyum yaklaşık her 28 günde bir döngüsel olarak üç ana faza ait değişimler geçirir. Bunlar;

1) menstruasyon, 2) proliferasyon, ve 3) sekresyon fazlarıdır.

Menstruasyon ile endometriyumun fonksiyonel tabakası tamamen dökülür ve geriye sadece endometriyumun bazal tabakası kalır. Proliferasyon fazı boyunca epitelyal ve stromal hücrelerde yoğun bir doku rejenerasyonu ve proliferasyonu görülür. Bu dönem anjiyogenezin de sık olduğu bir dönemdir. Sekresyon fazında ise daha ziyade hücresel farklılaşma, sentez ve sekresyon işlemleri sürdürülür. Bu dönemde endometriyum, implante olacak embriyo için uygun bir modellenmeye gider. Gebelik ile birlikte endometriyumda; gerek fetomaternal etkileşimler açısından, gerekse maternal hücrelerin kendi aralarındaki etkileşimleri açısından tetiklenmesi halen anlaşılamayan, son derece kompleks birçok mekanizma devreye girer (1).

Endometriyumda meydana gelen olaylarının gerçekleşmesi sırasında endotel hücrelerinin rolü de stroma ve bez epiteli hücreleri kadar önemlidir. Gerek kan hücrelerinin endometriyuma geçmesinde bir kapı görevi olması, gerekse de gebelik sırasında interstisiyal trofoblastların hedef hücreleri olması endotel hücrelerine farklı bir önem kazandırmaktadır. Aynı zamanda uterusun birçok patofizyolojik olayında endotel aktivitesindeki değişimler, bu hücrelerin incelenmesini daha cazip kılmaktadır. Bu açılarından bakıldığında endometriyal endotel hücrelerinin izolasyonu ve bu hücrelerin fonksiyonel olarak düzenlenme mekanizmalarının incelenmesi temel hedeflerimizden bir tanesini oluşturmaktadır.

Fizyolojik veya endometrioz gibi patolojik durumlarda lökositlerin dokuya geçişinde ilk iletişim kurduğu hücre tipi endoteldir (2). Bu açıdan endotel hücreleri endometriyal inflamatuvar cevabın kontrolünde son derece önemli bir role sahiptir. Ayrıca bu hücrelerin damar duvarını geçişlerinde hücre yüzey-reseptör etkileşiminin önemli olduğu gösterilmiştir (3). Uterusa lökositlerin geçişi menstruasyon, implantasyon penceresi ve erken gebelik dönemlerinde sadece endometriyumda gerçekleşmektedir. Bu süreç boyunca endotel hücreleri bir anlamda inflamasyonu kontrol altında tutarak fizyolojik boyutlarda kalmasını sağlar.

Sitokinler; lenfositler, monositler, iltihabi hücreler ve endotelyal hücreler gibi immün sistem hücreleri arasındaki etkileşimleri düzenleyerek aktivitelerini yönlendiren polipeptid yapısında kısa etkili ve çözünür moleküllerdir (4).

Sitokinler konusunda son 15 yılda büyük gelişmeler sağlanmıştır. Sitokinlerin etkileri ve işlevleri hakkındaki bilgiler her geçen gün farklı bir boyut kazanmaktadır. Yapılan çalışmalar çok sayıda hastalığın patogenezi veya tedavisinde sitokinlerin rolü bulunduğunu ortaya koymaktadır. Sitokinlerin kontrol dışı veya aşırı üretimi ile de çok sayıda klinik rahatsızlığa neden olduğu bilinmektedir. IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 gibi bazı sitokinler immün reaksiyonların yanı sıra inflamasyonun başlamasında da önemli rol üstlenmektedir (5-7).

Dokudaki mevcut damarlardan yeni damarların ortaya çıkmasına kadar geçen moleküler ve hücreyel olaylar serisi “anjyogenezi” olarak adlandırılmıştır. Anjyogenezin hücre öncüleri embriyonel dönemde gözlenen vaskülogenezden farklı olarak olgun damarların endotelial hücreleridir. Anjyogenezi prenatal dönemde fizyolojik olarak gözlenirken postnatal dönemde hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda gözlenir. Prenatal dönemde plasental ve embriyonel gelişimin tamamlanması için son derece önemlidir. Diğer taraftan postnatal hayatta üreme sisteminde, vasküler malformasyonlar, kanser ve kronik inflamasyonlarda gözlenir (8).

İnsan vücudunda postnatal hayatta fizyolojik anjyogenezin incelenebileceği iki temel organ mevcuttur: uterus ve ovaryum. Her iki organda da anjyogenezin belli bir alan ile sınırlı olması oldukça ilginçtir. Bu alanlar uterusunda endometriyum (uterus mukozası) ve ovaryumunda ise korpus luteumdur (9). Her menstrual siklus sonunda kendini yenileme kapasitesine sahip olan endometriyumda menstruasyonu takiben yoğun bir anjyogenik modellenme gerçekleşir. Endometriyum anjyogenezi proliferatif ve sekresyon fazında olmak üzere iki döneme ayrılabilir. Proliferasyon boyunca gerçekleşen anjyogenezi daha çok endometriyumun doku tamiri ve yenilenmesi için gerekli iken, sekresyon fazında gözlenen anjyogenezi endometrial dokunun implante olacak blastosiste uygun hale getirilmesi ile ilgilidir.

Embriyonik dönemde doku modellenmesi ve organ gelişiminde birçok fizyolojik olayda aktif olarak izlenen apoptoz, postnatal hayatta da hem fizyolojik hem de patolojik olayların düzenlenmesinde çok önemli rollere sahiptir. Çok hücreli organizmalar; postnatal hayatta zarar gören, istenmeyen, enfekte olan hücreleri apoptoz ile ortadan kaldırır. Böylece apoptoz doku homeostazisinin en önemli düzenleyicilerinden bir tanesi olarak kabul edilmektedir (10).

Endoplazmik retikulum, hücrenin hayatta kalmasında ve fonksiyonlarını yerine getirmesinde gerekli bir organdır. ER hücre içi kalsiyum dengesini ayarlamakta, protein sentezi ve homeostazı düzenlemekte ve lipid biyosentezini sağlamaktadır (11). Hücredeki

protein sentezi ve transportundaki rolünden dolayı, 78 kDa GRP78 (HSPA 5 diye bilinen), 94 kDa GRP94 (HSP90B1 diye bilinen) ve Calnexin gibi kalsiyum bağımlı moleküler şaperonlardan zengindir. Bu şaperonlar protein katlanmasını sağlayan aracı molekülleri stabilize eder. Bunlara ilaveten ER lümeni hücre yüzeyinde eksprese edilen veya salgılanan proteinlerin doğru katlanmasını sağlamaktan ve disulfid bağlarını oluşturan protein disulfid izomeraz (PDI) içeren oksidatif mikroçevreyi oluşturmaktan sorumludur. Ayrıca ER hücre membran lipidlerinin biyosentezinde ve kolesterol üretiminin kontrolünde hayati rol oynar (12).

Birçok faktör katlanamayan proteinlerin ER lümeninde yığılmasına sebep olabilir. Bu katlanamayan proteinlerin ER lümeninde birikmesi evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş olan UPR (Unfolding Protein Response, katlanamayan protein cevabı) olarak adlandırılan ER bağımlı bir hücrel cevabı tetikler (13). Hücrede ER stresine tetiklenen UPR'ın etkileri 3 grupta toplanır: *Adaptasyon*, *Uyari*, *Apoptoz*. Hipoksi ve oksidatif ajanların neden olduğu hücrel redoks yolunun bozulması ER lümenindeki disulfid bağlarının ortadan kalkmasına ve proteinlerin katlanamamasına ya da yanlış katlanmasına neden olur (14).

ER lümeninde en çok bulunan ve en iyi bilinen şaperon GRP78/BİP ve GRP94'dir. BİP ER'da protein kalite kontrolünde merkezi rol oynar (15). Stres olmadığı koşullarda BİP; PERK, IRE1 ve ATF6'nın luminal domeinlerine bağlıdır. Stres durumunda, bu domeinlerden ayrılarak proteinlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (16). BİP geninin baskılanması veya eIF2α'nın fosforilasyonunun durdurulması üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki her iki durumda da hücre ER stresine çok duyarlı hale gelmiştir (17-19).

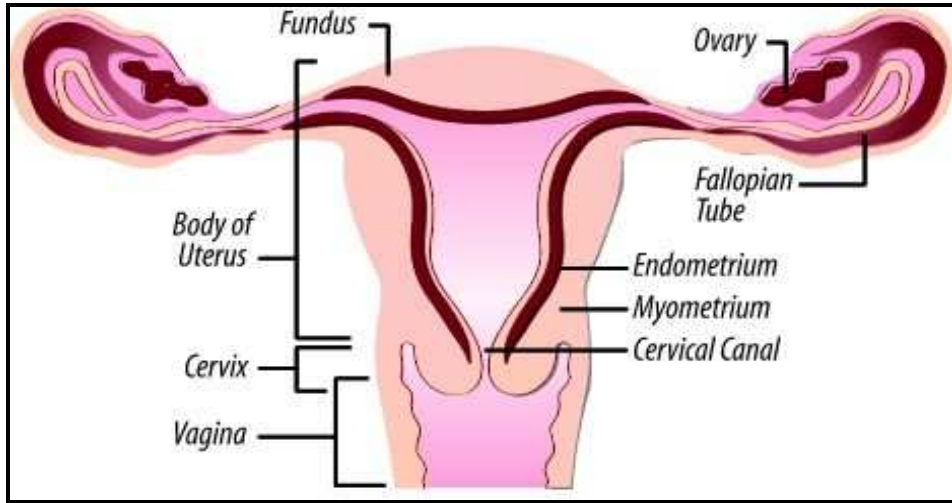
Bu bilgiler ışığında bu çalışmada; endometriyal endotel hücrelerinde inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle meydana gelen ER stresine bağlı UPR'nin düzenlenmesi incelenecektir. Böylece fizyolojik ve patolojik olarak endometriyumda meydana gelen inflamasyonla ilişkili durumların meydana geliş mekanizmasına açıklık getirmeyi amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus

Uterus, rektum ve mesane arasında yerleşmiş, round ve utero-overyan ligamentlerle desteklenen ve pelvik periton ile çevrili bir organdır. Uterus, fundus, korpus ve istmus bölümlerinden oluşur. Reprodüktif çağda, uterusun boyutu ve ağırlığı doğum sayısına göre değişmektedir. Hiç doğum yapmamış bayanlarda ortalama 8 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde ve 2,5 cm kalınlığında; 40–100 gr ağırlığındadır. Multigravidlerde bu değerler artmaktadır (20). Embriyolojik olarak mezodermal orijinli olup 8.-9. haftalarda mülleriyen duktusların füzyonuna sekonder gelişir. 20. haftaya kadar endometriyum tek katlı silindirik epitel altında kalın fibroblastik stromadan oluşur. 20. haftadan sonra yüzey epiteli stromaya invajinasyon göstererek glandüler yapıları oluşturur (21).

Uterus, dıştan içe doğru, bağ doku ve mezotelyumdan oluşan perimetrium, düz kas ve zengin damar ağından oluşan myometriyum ile bağ ve epitel dokusundan oluşan endometriyum olmak üzere 3 temel tabakadan oluşur (22) (Şekil 1, 2).



Şekil 1:Dişi üreme organları (3).

2.1.1. Miyometriyum

Uterusun en kalın tabakasını oluşturan miyometriyumda düz kas demetleri bağ dokusu ile birbirinden ayrılmıştır. Çok belirgin olmamakla birlikte düz kas demetlerinin 4 farklı tabakası izlenebilir. En içteki ve dış tabakalar organın uzun eksenine paralel olarak seyrederken, orta tabakalar farklı yönlerde seyreden düz kas demetlerini ve büyük kan damarlarını içermektedir. Uterus gerek menstrual siklus boyunca geçirdiği değişikliklerle her

siklusta yenilenebilme yeteneği açısından, gerekse gebelik boyunca gelişen semi-allojenik embriyoyu kabullenip onun gelişimi için gittiği gerekli değişiklikler açısından insan vücudundaki en dinamik dokulardan birisidir. Miyometriyumda gözlenen en belirgin değişimler gebelik esnasında gerçekleşir. Düz kas hücreleri protein sentez eden hücrelerin morfolojik özelliklerini kazanarak ileri derecede kollajen sentezi yaparlar. Miyometriyum gebelik esnasında hiperplazi ve hipertrofiye giderek büyür ve gebelik sonrası ise hemen hemen gebelik öncesindeki boyutuna geriler (23-24).

2.1.2. Endometriyum

Endometriyum uterusun lümene bakan tabakasıdır. Tek katlı silli, silindirik epitel ile döşelidir. Epitel hücreleri, tübüler endometriyal bezlerin epiteli ile devam eder. Bu hücrelerin altında lamina propiia bulunmaktadır (25). Endometriyum işlevsel olarak değerlendirildiğinde iki tabakadan oluşmaktadır. İlk tabaka fonksiyonel tabaka olarak adlandırılır ve endometriyumun üst 2/3'lük kısmını oluşturur. Embriyo implantasyonunda önemli bir yere sahip bu tabaka ayrıca endometriyal siklus içerisinde proliferasyon, sekresyon ve dejenerasyonun görüldüğü yerdir. İkinci tabaka bazal tabakadır ve endometriyumun 1/3'lük alt kısmını oluşturur. Endometriyal siklusta fonksiyonel tabakanın kaybı sonrası endometriyum bazal tabaka tarafından yeniden yapılandırılır. Endometriyum yaklaşık her 28 günde bir sıklık olarak 3 ana faza ait değişimler geçirir.

Bunlar;

- 1) Menstruasyon (1-4. günler)
- 2) Proliferasyon (4-14. günler)
- 3) Sekresyon fazlarıdır (14-28. günler).

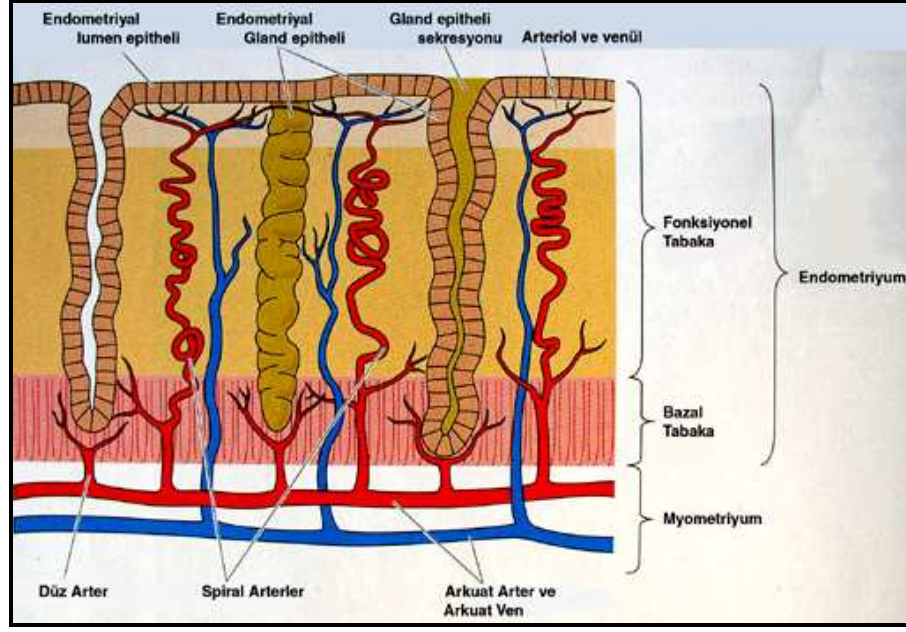
Ayrıca proliferasyon ve sekresyon fazları da kendi içinde 3'e ayrılır.

Proliferasyon fazı

- 1-Erken proliferasyon fazı (5-8.günler)
- 2-Orta proliferasyon fazı (8-10. günler)
- 3-Geç proliferasyon fazı (11-13. günler)

Sekresyon fazı

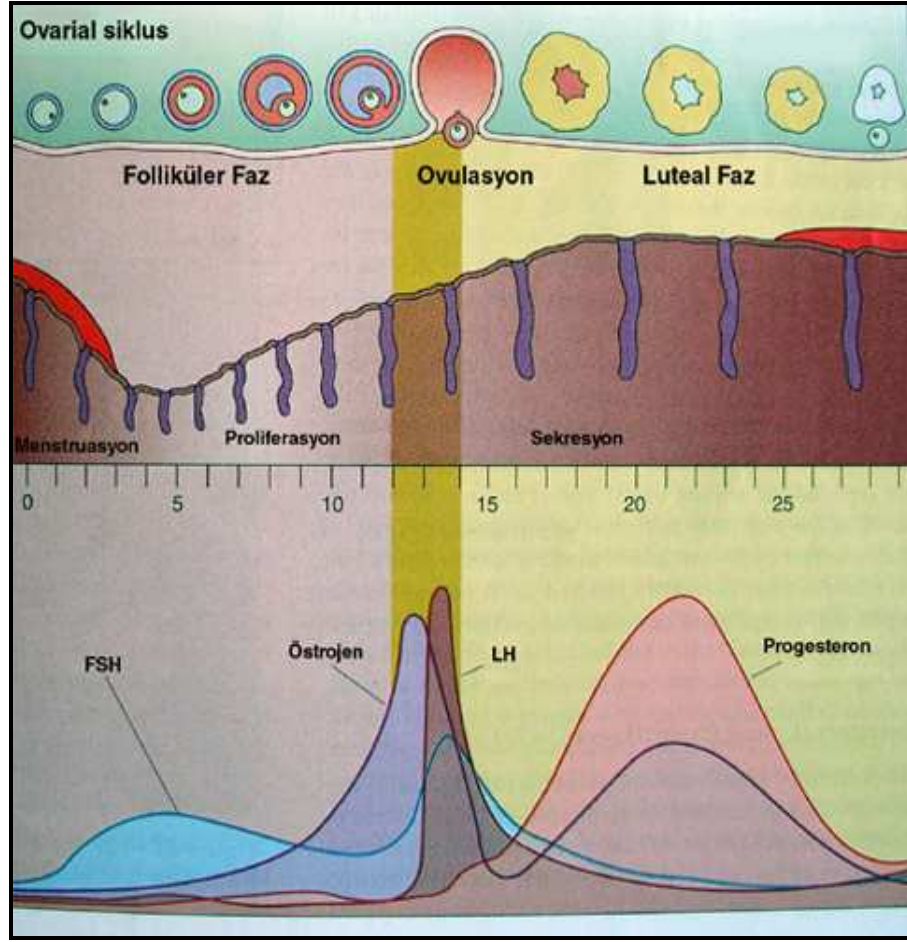
- 1-Erken sekresyon fazı (14-17. günler)
- 2-Orta sekresyon fazı (implantasyon penceresi,18-24. günler)
- 3-Geç sekresyon fazı (25-28. günler) (26).



Şekil 2. Endometriyum damarlanma (22).

Menstruasyon ile endometriyumun fonksiyonel tabakası tamamen dökülüp sadece bazal kısmı kalır. Proliferasyon fazı boyunca endometriyum (epitelyum ve stroma) hücreleri açısından doku onarımı ve proliferasyonu gözlenir. Bu dönem anjiyogenezin en sık olduğu dönemdir. Sekresyon fazında hücresel farklılaşma, sentez ve salgılama sürdürülür. Bu dönemde endometriyumda implante olacak embriyo için uygun bir modellenme başlar. (23-24). Gebelik ile birlikte endometriyumda gerek fetomaternal etkileşimler açısından gerekse maternal hücrelerin kendi aralarındaki etkileşimleri açısından karmaşık birçok mekanizma devreye girer.

Tüm bu olaylar steroid hormonların kontrolü altında gerçekleşir. Özellikle östrojen ve progesteron uterinal siklusun kontrolü için en önemli iki steroid hormondur. Bu iki hormonun siklik değişimleri şekil 3’de şematize edilmiştir.



Şekil 3. Uterinal ve ovarial siklus boyunca hormonal değişimler (22).

Östrojenin kontrolündeki proliferatif fazı ovulasyon öncesi ani LH artışı sonrasında ve akabinde progesteron ve östrojen kontrollü sekresyon fazı izliyor. Normal siklus seks steroidlerinin bazal düzeye düşmesi sonrasında ve akabinde menstruasyon ile tamamlanması (22).

2.1.3. Uterus ve Hormon Etkileşmesi

Menstrual siklus süresince başlıca değişiklikler endometriyumda gözlenir. Endometriyum stroma, bez epiteli ve damarlardan oluşur. Endometriyumun yüzeyi, tek katlı silindirik epitel ile döşelidir. Endometriyum östrojen ve progesteron etkisi altında, histolojik değişiklikler gösterir. Siklus sonunda östrojen ve progesteronun bazal değerlere düşmesi ile endometriyumun bazal tabakasındaki damarlarda obliterasyon meydana gelir. Bu obliterasyonun nedeni bilinmemekle birlikte, östrojen ve progesteron değerlerinin düşmesi sonucu oluşmaktadır. Bu obliterasyon sonucu, beslenme bozukluğuna bağlı olarak nekroz oluşur. Nekrozu takiben 2 gün içinde de endometriyumda kanama meydana gelir ve endometriyumun fonksiyonel tabakası kanama şeklinde dışarı atılır. Bu olaya “menstruasyon”

denir. Fonksiyonel tabakadaki bu dökülmeye ayrıca “deskuamasyon” da (dökülme) denir (24-27). Bir önceki siklusun son 2 ile 3 gününde östrojen ve progesteronun bazal değerler altına düşmesi ile “negatif feed back” etkiden kurtulan FSH ve LH’da salgılanmaya başlar. Salgılanan gonadotropinler overleri stimüle ederek östrojen salgılanmasına neden olur. Bu östrojen salgısı ise, nekroz ve deskuame olan fonksiyonel tabaka altındaki bazal tabakaya etki ederek, fonksiyonel tabakanın yeniden oluşmasını sağlar. Bu olaya “rejenerasyon” (onarım) denir. Rejenerasyon tamamlanınca, menstrual kanama tamamen kesilir.

Endometriyum bir taraftan deskuame olurken, aynı anda rejenere de olmaktadır. Başka bir ifade ile, menstruasyon içinde hem deskuamasyon hem de rejenerasyon birlikte. Ovaryumdan salgılanan östrojen miktarı artıkça, buna bağlı olarak endometriyumda kalınlaşma meydana gelir. Stromada damar sayısı artar. Bez epitelinin sayılarında artma ve boylarında uzama meydana gelir. Rejenerasyonun tamamlanmasından ovulasyona kadar devam eden bu döneme “proliferatif faz” denir. Süresi yaklaşık 10 gün kadardır. Menstruasyonla birlikte hesap edilirse, yaklaşık 14 gün sürmektedir.

Ovulasyon ile birlikte yeni bir hormon, progesteron, salgılanmaya başlar. Bu hormonun etkisiyle de endometriyum yeni bir histolojik görünüm alır ve yeni bir faz ortaya çıkar. Bu faza “sekretuar faz” denir. Sekretuar faz ovulasyondan menstruasyona kadar yaklaşık 14 gündür. Proliferatif faz değişiklik gösterebildiği halde, sekretuar fazın süresi değişmez 14 günle sabit kalır. Östrojenin hücresel düzeydeki moleküler etkisi genomik ve agenomik olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Genomik etki östrojen reseptörleri ER α ve ER β ’nın nükleusdaki ilgili DNA dizisine bağlanması ile gerçekleşir. Genomik etki ER α ve ER β ’nın homodimer veya heterodimer yapısı ile farklı genomik etkinin ortaya çıkması ile sonuçlanır (28). Diğer taraftan, agenomik etki hücre sitoplazmasında hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu veya inhibisyonu ile gerçekleşir. Benzer olarak progesteron içinde progesteron reseptör A ve B (PRA, PRB) olmak üzere iki reseptör tanımlanmıştır. Yine bu iki reseptörün homodimer veya heterodimer yapısı farklı genomik cevabın ortaya çıkmasına yol açmaktadır (29-30)

2.1.4. Hormonların Siklik Regülasyonu

Hipotalamustan salgılanan Gonatotrofin serbestleştirici hormon (GnRH) portal sistem ile hipofize gelerek gonadotropinlerin, özellikle de LH’ın salgılanmasını sağlar. FSH, GnRH’ın etkisi ile salgılanırsa da, daha bağımsız olarak salgılanmaktadır. FSH ve LH değerleri 3-17 U/ml arasındadır. Fizyolojik değerler arasında kalmak şartıyla, FSH siklus

başında yüksek olarak salgılanır. Foliküldeki granüloza hücre reseptörlerine tutunarak, bir yandan LH reseptörlerin sayısını ve duyarlılığını artırır, diğer yandan da aromatzasyonu başlatır.

Siklus ortasına doğru FSH salgılanmasında bir miktar düşme olur. Ancak bu düşme, folikül büyümesini ve östrojen salgılanmasını etkilemez. 10 mm çapı geçen folikül FSH stimülasyonu olmadan doğal olarak büyümesine devam eder. Siklusun ikinci yarısında, FSH değerleri, foliküler fazdakine oranla daha düşüktür. Siklusun 25-26. günlerinde, plazma östrojen ve progesteronun bazal değerlere düşmesi ya da, başka bir ifade ile, beklenen menstruasyona bir kaç gün kala, FSH yeniden yükselmeye başlar. foliküler fazdaki LH değerleri FSH değerlerine eşit veya biraz daha düşük seyrederek. Ovulasyon öncesi dönemde, artan östrojenlerin pozitif feed-back etkisi ile LH pik yaparak ovulasyonun olmasına katkıda bulunur. Daha sonra, foliküler fazdaki değerlere düşerek, siklus boyunca FSH değerlerine eşlik eder.

Östrojen düzeyi siklus başında düşük olup yaklaşık 50 pg/ml dir. Folikülün büyümesine paralel olarak östrojen miktarında artma olur ve siklusun yaklaşık 11-12 inci günlerinde pik yaparak 300-400 pg/ml'ye ulaşır. Östrojen pik yaptıktan yaklaşık 36 saat sonra, LH pikine neden olur. Östrojen miktarında ovulasyonu takiben geçici bir azalma olur. Luteal fazda ise, hiç bir zaman pre-ovulatuvar pik değeri geçmemek üzere, 50-400 pg/ml arasında değişen değerlerde tespit edilir. Normal siklusun 25-26'ıncı günlerinde yani menstruasyona bir kaç gün kala 50 pg/ml değere düşer.

Progesteron foliküler fazda salgılanmaz, sadece 0,6 ng/ml değerindedir. Preovulatuvar dönemde salgılanması hafifçe artar ve bu artış LH pikini de etkilemektedir. Progesteron tam olarak, ovulasyonu takiben meydana gelen korpus luteum tarafından salgılanmaktadır. Ovulasyonla birlikte miktarında artma olur ve "midluteal" fazda en yüksek seviyeye erişir. Daha sonra tekrar azalmaya başlar ve normal sikluslarda, siklusun 25-26. günlerinde foliküler fazdaki seviyesine iner. Luteal faz boyunca 5-15 ng/ml arasında değişiklik gösterir. Midluteal fazda 8 ng/ml nin altında tespit edildiğinde, progesteron azlığından ya da luteal yetmezlikten bahsedilir (27-31).

2.2. Sitokinler

Sitokinler hücrelerel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Polipeptit yapısında kısa etkili ve çözünür moleküllerdir. Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize

edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

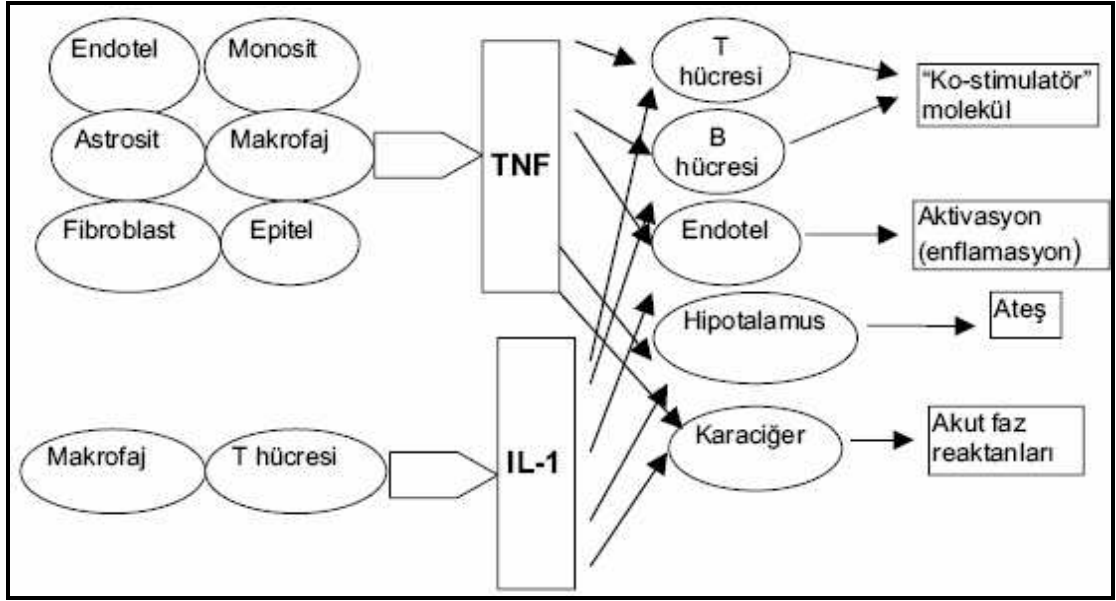
1. Büyüme faktörleri
2. Lenfokinler (interlökin-1 alfa ve beta, interlökin 2,3,4...)
3. Koloni stimüle eden faktörler
4. Transforme edici büyüme faktörleri
5. Tümör nekroz faktörleri (TNF-alfa ve beta)
6. İnterferonlar (32).

IL-1 ve TNF gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol oynarlar.

2.2.1. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β)

IL-1 monositler, lenfositler, endotel hücreleri ve mikrogialar gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden salınır. İnflamasyon, sepsis, diabet, otoimmün hastalıklar ve osteoporoz oluşumunda etkisi olduğu düşünülmektedir (33).

Kilo kaybı, uykunun düzenlenmesi, endokrin sistem, immün sistem ve sinir sistemi fonksiyonlarını değiştirme, nöronal iletim, epilepsi, sinir hücre ölümü dahil IL-1'in endojen ve ekzojen bir çok etkisi gösterilmiştir. IL-1 klasik olarak IL-1 alfa ve beta olmak üzere 2 subtipte tanımlanır. Her ikisinde benzer etkiye sahiptir. Üçüncü tanımlanan protein IL-1 ra (IL-1 reseptör antagonisti) olup, IL-1'in bilinen tüm etkilerini kompetitif antagonize eder ama diğer etkileri tam bilinmemektedir (34). Tüm IL-1 molekülleri prekürsör olarak salınır. Bunlardan pro-IL-alfa ve pro-IL-1 ra biyolojik olarak aktif iken, pro-IL-1 beta inaktiftir. Ama caspase-1 enzimi tarafından aktif formuna dönüşür. IL-1 alfa ve beta'nın etkilerini gösterebilmesi için tek bir reseptöre (IL 1RI) bağlandığına inanılır. Endotelial hücreler IL-1 salınım kapasitesine sahiptir. Şekil 4 (35).



Şekil 4. TNF ve IL-1 etkileri (35).

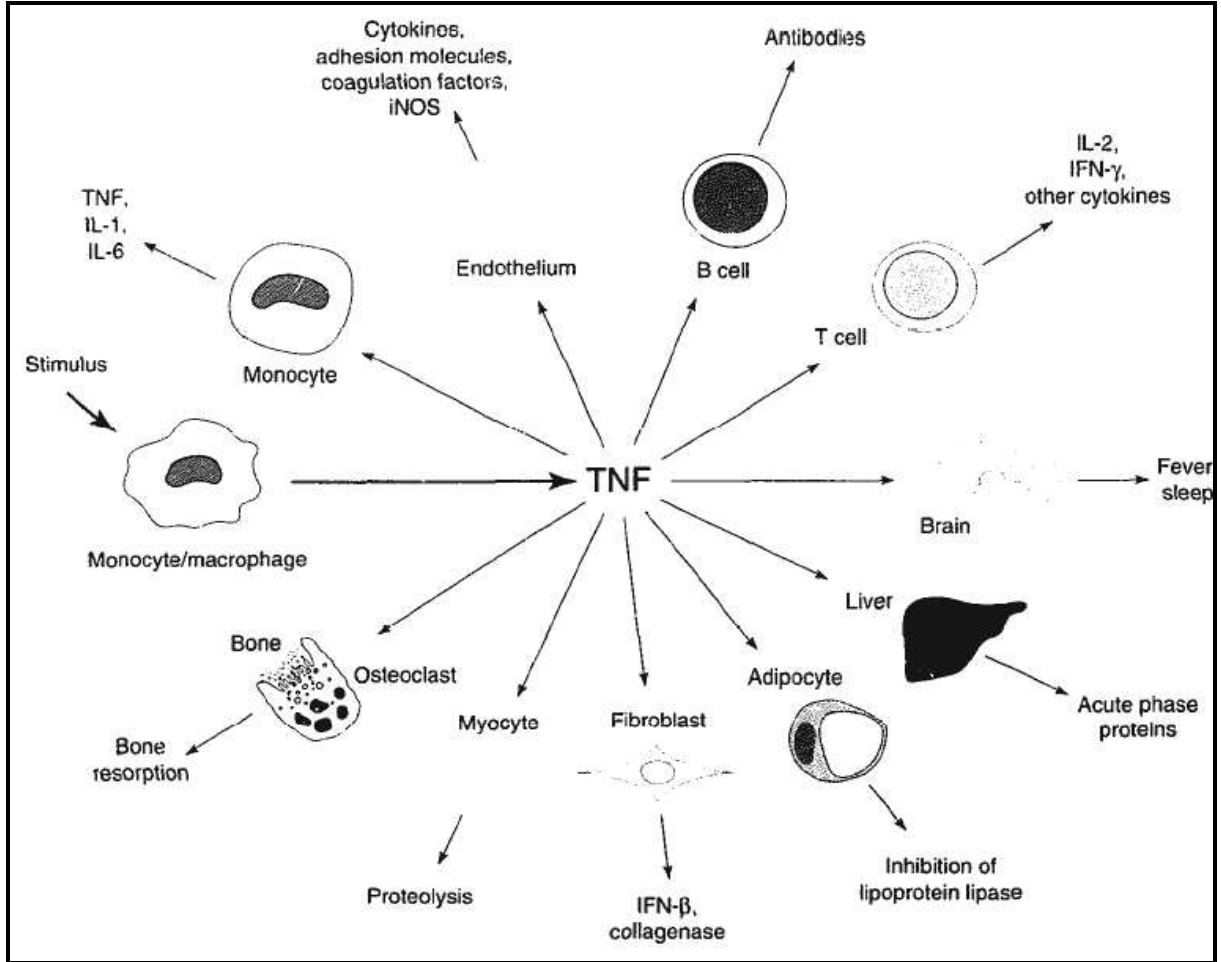
2.2.2. Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α)

TNF-alfa birçok inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların patogeneğinde önemli role sahiptir. TNF alfa'nın major kaynağı aktive olmuş monosit ve makrofajlardır. TNF 233 aminoasit ve 26 kDa ağırlığında proproteinden köken alır. Proprotein spesifik metalloproteaz (TNF-alfa konverting enzim-TACE) tarafından 17 kDa, 157 aminoasitten oluşan monomerik formuna bölünür. TNF etkisini membran bağımlı reseptör molekülleri TNF reseptör I (TNFRI, p55) ve TNFRII (p75) aracılığıyla gösterir (36). TNF reseptörleri çözülebilir yapıda olup TNF'yi bağlama yeteneğindedir. Böylece TNF'nin akut etkilerini sınırlayabilmektedir.

TNF'nin temel fonksiyonlarından bazıları:

1. Lökositler için vasküler endotelial hücre adezyonunun indüksiyonu
2. Fagositlerin stimülasyonu ve IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin ürünlenmesi, antiinflamatuvar sitokinleri (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-beta) uyarması, ayrıca doğal sitokin inhibitörleri olan IL 1ra ve solubl TNF reseptörlerinin üretimini arttırması (Böylece aşırı sitokin yanıtı dengelenir)
3. MHC-Class I molekül indüksiyonu
4. Lökosit aktivasyonu
5. Uzun süre uygulaması sonucu kaşeksi ve kas erimesi
6. Gram negatif sepsiste septik şok nedeni olması
7. Endotelial hücreler ve astrositler üzerinde ICAM-1 ekspresyonu artışı

8.Schwartzman reaksiyonu sonucu tümör nekrozu, endojen pirojen etki, akut faz reaktanlarında artış (37).



Şekil 5. TNF'nin hücrelerle ilişkisi (38).

TNF sentezi, birçok farklı eksojen maddeler (lipopolisakkaridler, betaglukanlar)veya endojen mediatörler (IL-1) aracılığıyla monosit ve makrofajlarda uyarılır. Plazmada artmış konsantrasyonu çeşitli infeksiyöz ve inflamatuvar hastalıklarda gösterilmiştir (sepsis, bakteriyel menenjit, serebral malarya, adult espiratuvar distres sendromu, romatoid artrit). Anti TNF ajanlar 3 grup içinde sınıflandırılabilir. Birincisi; TNF'nin sentezi fosfodiesteraz inhibitörleri, prostanoidler, adenosin, kortikosteroidler, IL-10 tarafından inhibe edilebilir. İkincisi; TNF pro-protein, TNF metalloproteaz spesifik inhibitörleri tarafından inhibe edilebilir. Üçüncüsü; salınmış TNF proteinin etkileri TNF reseptörleri veya anti-TNF antikorları tarafından antagonize edilebilir (38).

2.3. Endotel Hücreleri

Kan damarının iç kısmını kaplayan endotel hücreler, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan, yaklaşık $(1-6) \times 10^{13}$ hücreden oluşan büyük bir endokrin organdır (39). Damar duvarı ile kan arasında seçici bir bariyer gibi davranan endotel hücreler, kritik basal ve birçok metabolik fonksiyonları olan multifonksiyonel hücrelerdir (40).

Endotel hücrelerinin fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir;

1. Dolaşım ve damar duvarı arasında seçici geçirgen bir bariyer oluştururlar.
2. Çeşitli vazoaaktif maddeler üreterek damar tonusunun kontrolünde rol oynarlar.
3. Damar düz kas hücresinin proliferasyon ve migrasyonunu düzenlerler.
4. Koagülasyon ve fibrinolitik olaylarda modülatör olarak rol oynarlar.
5. İnflamatuvar ve immünolojik olaylarda yer alırlar (41).

Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve bulundukları yer dolayısı ile vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının elemanları arasında (trombosit, monosit, enzimler, hormonlar v.s) selektif geçici bir bariyer oluşturur (42-43).

Endotel hücreler çeşitli büyüme faktörleri salgılayarak büyüme düzenlenmesi, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin üretimi gibi birçok olayda yer alır. Anjiyogenez ve vaskülogenezde önemli bir role sahiptirler. Kısacası endotel hücreler çeşitli fiziksel ve kimyasal uyarıcılara cevap verip hemostaz, vazomotor tonus, immün ve inflamatuvar cevapları regüle eder (44).

2.4. Anjiyogenez

Dokudaki mevcut damarlardan yeni damarların ortaya çıkmasına kadar geçen moleküler ve hücrel olaylar serisi “anjiyogenez” olarak adlandırılmıştır. Anjiyogenezin hücre öncüleri embriyonal dönemde gözlenen vaskülogenezden farklı olarak olgun damarların endoteliyal hücreleridir. Prenatal dönemde fizyolojik olarak ve postnatal dönemde ise hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda gözlenir. Prenatal dönemde plasental ve embriyonal gelişim tamamlanması için son derece önemlidir. Diğer taraftan postnatal hayatta üreme sisteminde ve vasküler malformasyonlar ile kanser ve kronik inflamasyonlarda gözlenir (45)

Angjiyogenez mevcut (ebebeyn) damarlardan yeni damarlar gelişinceye kadar geçen süre ve moleküler mekanizmalar serisi şu aşamaları kapsayabilir (Şekil 6) (46).

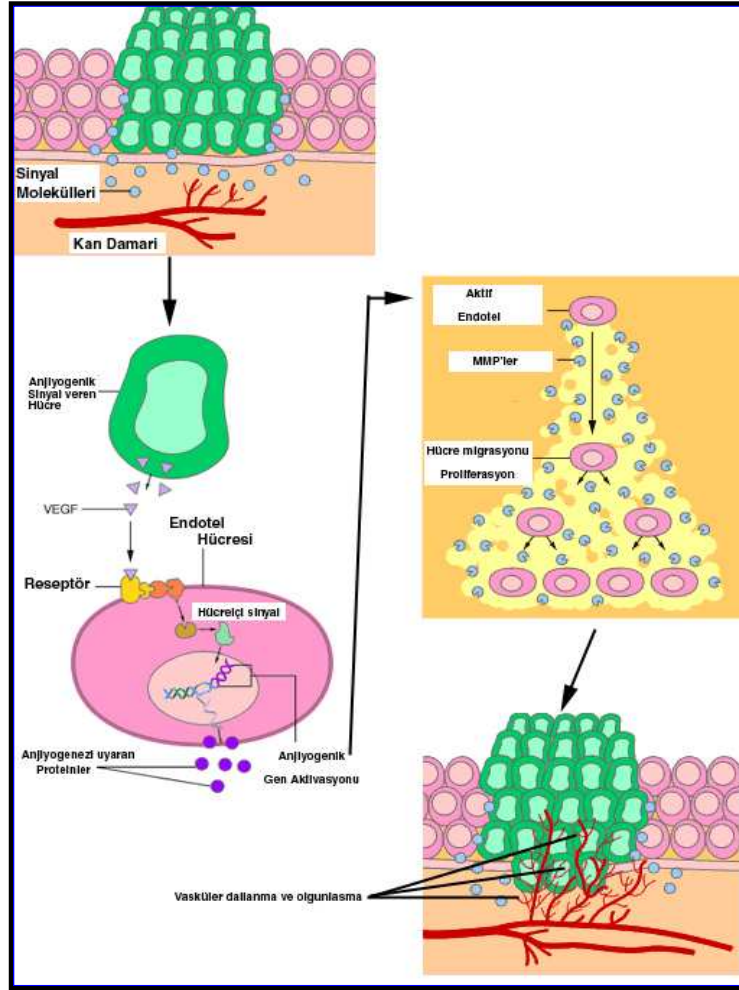
1-Anjiyogenik uyarı (fizyolojik veya patolojik olabilir): Hücre içi anjiyogenik sinyal yolunun aktivasyonuna yol açarak farklılaşmayı indükler,

- 2-Farklılaşma: Hücreler gerek proliferasyon gerekse migrasyon yapabilecek yönde farklılaşırlar,
- 3-Anjiyogenik olarak uyarılan aktif endotelden Matriks Metallo Proteinaz (MMP) salgılanması yapılır,
- 4-Bazal membranın yıkımı ve böylece anjiyogenezin yönünün belirlenmesi,
- 5-Endotelial hücrelerin anjiyogenik uyarı yöndeki migrasyonu (kemokinler),
- 6-Proliferasyon,
- 7-Migrasyon ve modellenme
- 8-Vaskular tüp yönünde farklılaşma,
- 9-Kapiller ve vasküler ağ oluşumu
- 10-Vasküler olgunlaşma

2.4.1. Endometriyum Anjiyogenezi

İnsan vücudunda postnatal hayatta fizyolojik anjiyogenezin incelenebileceği iki temel organ mevcuttur. Uterus ve ovaryum. Her iki organda da anjiyogenezin belli bir alan ile sınırlı olması oldukça ilginçtir. Bu alanlar uterusda endometriyum (uterus mukozası) ve ovaryumda ise korpus luteumdur.

Her menstrual siklus sonunda kendini yenileme kapasitesine sahip olan endometriyumda menstruasyonu takiben yoğun bir anjiyogenik modellenme gerçekleşir. Endometriyum anjiyogenezi proliferatif ve sekresyon fazında olmak üzere iki döneme ayrılabilir. Proliferasyon boyunca gerçekleşen anjiyogeneze daha çok endometriyumun doku tamiri ve yenilenmesi için gerekli iken, sekresyon fazında gözlenen anjiyogeneze daha çok endometriyumun dokunun implante olacak blastosiste uygun hale getirilmesi ile ilgilidir (47).



Şekil 6. Anjiyogenez basamakları şematize edilmiştir (46 nolu kaynaktan değiştirilerek çizilmiştir).

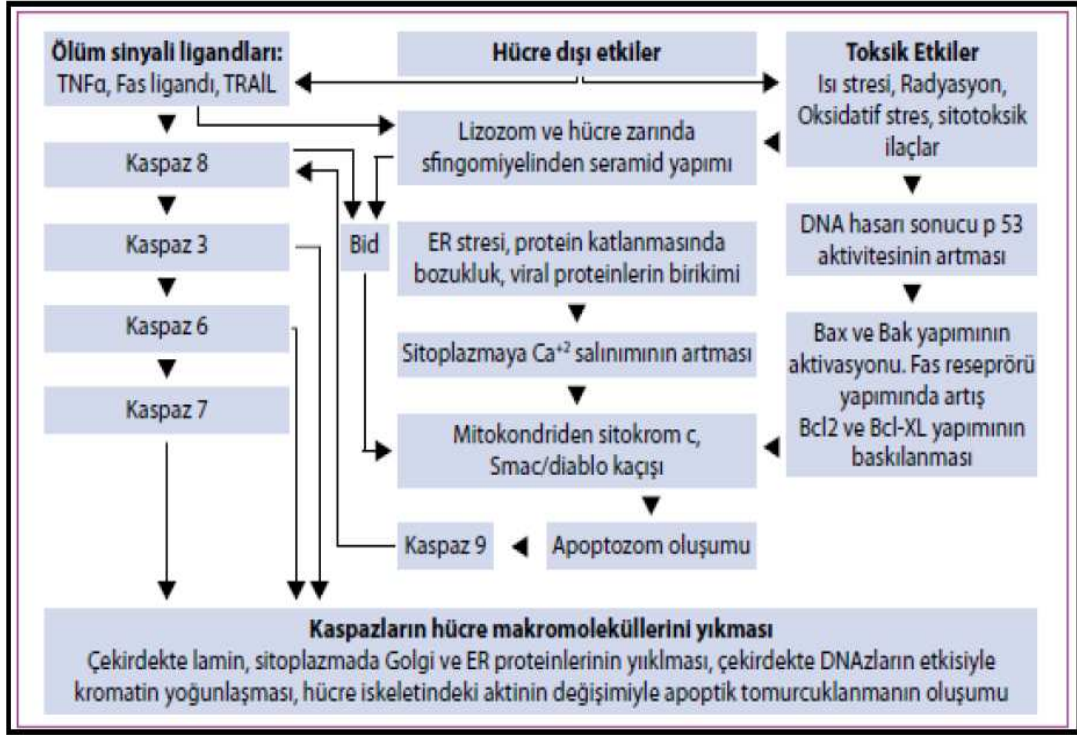
2.5. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz) ve Nekroz Tanımı

Yaşamakta olan hücreler başlıca iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozdur. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (48). Apoptoz aslında Latince ağaçların yapraklarının dökülmesini tanımlamak için kullanılan bir kelimedir. Apo, ayrı; ptosis, düşen anlamındadır. Embriyonik dönemde doku modellenmesi ve organ gelişiminde birçok fizyolojik olayda aktif olarak izlenen apoptoz ayrıca postnatal hayat için de gerek fizyolojik gerekse patolojik olayların düzenlenmesinde çok önemli rollere sahiptir. Çok hücreli organizmalar postnatal

hayatta zarar gören, istenmeyen, enfekte olan hücreleri Apoptoz ile ortadan kaldırırlar. İnflamasyonun çözülmesi, organ sistemlerinde hücre sayısının kontrolü, hasarlı ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması, organizmanın iç dengesinin devamlılığında ve daha birçok durumda Apoptoz önem kazanmaktadır. Bu sürecin bozulması organ işlevlerinde bozulma ve neoplaziye neden olur (49). Böylece apoptoz doku homeostasisinin en önemli düzenleyicilerinden bir tanesi olarak kabul edilmektedir

Hücrede apoptoz iki yolla tetiklenir. Bunlardan ilki ekstrinsik ya da hücre dışı sinyallerle tetiklenen, ikincisi ise intrinsik yani mitokondria aracılı tetiklenen yoldur. Ekstrinsik yolla uyarılan apoptozla ilgili olarak, birçok moleküler mekanizma ve sinyal yolu tanımlanmasına rağmen, üzerinde en çok çalışılanlar Fas ve tümör nekroz faktör (TNF) sinyal yollarıdır. Bu sinyal yollarının aktivasyonu için ilk olarak Fas (Apo-1, CD95) ligandının Fas reseptörüne, TNF ligandının da TRAILR (tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü)'ne bağlanarak reseptörlerin ayrı ayrı trimerizasyonu gerekmektedir (50). Bu reseptör-ligand etkileşimine bağlı reseptör trimerizasyonu ile başlayan aktivasyon reseptörlerin hücre içi bölümlerinde bulunan FADD (Fas-Bağımlı Ölüm Domain) ve sonrasında prokaspaz-8'e bağlanıp DISC (Ölüm-Uyarıcı Sinyal Kompleksi) oluşumuna neden olur. Bu olay prokaspazdan aktif kaspaz-8 oluşumuna yol açar. Aktif kaspaz-8, kaspaz şelalesini aktive eder ve son olarak sentral efektör kaspazlardan olan kaspaz-3 aktivasyonuna yol açarak apoptozu başlatır.

Hücrede apoptozu tetikleyen ikinci yol ise, mitokondiri-bağımlı uyarılma ile gerçekleşir. Bu uyarım, mitokondri zarından apoptotik BCL-2 ailesi proteini ve sitokrom c'nin salınımı ve sonrasında apoptotik proteaz aktive edici factor-1 (Apaf-1)'in sitokrom c, ATP ve procaspaz 9 ile birleşerek "apoptozom" kompleksini oluşturması ile devam eder. Bu kompleks kaspaz 9'un kesilerek aktive olmasını sağlar. Aktif kaspaz 9 kaspaz şelalesinin ve sonrasında efektör kaspaz olan kaspaz 3'un aktivasyonunu sağlar. Bu sinyalizasyon sırasında Smad/Diablo ve XIAP gibi apoptozu pozitif ve negatif etkileyen moleküllerde vardır. Yine, hücrede apoptozu sağlayan ekstrinsik ve intrinsik yol arasındaki bağlantıyı sağlayan diğer önemli molekülde BCL2 ailesi proteinlerinden olan BID'dir ve ekstrinsik yoldan gelen uyarı devamında mitokondriden cyt c salınımını tetikler. Apoptosom da kaspaz 8 gibi kaspaz 3 ve ayrıca kaspaz 6 ve kaspaz 7'yi de aktive ederek DNA fragmentasyonu ve hücre iskeleti proteinlerinin parçalanmasına yol açarak hücre ölümüne neden olur (51). Hücre içi ve dışı yollarla uyarılan apoptozun biyokimyası Şekil 7'de şematize edilmiştir.



Şekil 7. Hücre içi ve dışı yollarla uyarılan apoptozun biyokimyası (51).

2.5.1. Apoptoz Saptama Yöntemleri

Apoptoz hücre morfolojisi değişimlerini tanımlayan histokimyasal, DNA kırıklarını belirleyen biyokimyasal teknikler ve aktif apoptotik proteinleri belirleyen in situ boyama ya da western blot yöntemleri ile saptanabilir.

Hücre morfolojisi esas alınarak floresans maddelerin (Hoechst boyası, DAPI, propidium, iyodür) kullanılması ile yapılan boyalarla floresans mikroskobu ile inceleme yapılabildiği gibi, kültür ortamında üretilen hücreleri incelemek için faz kontrast mikroskobu da kullanılabilir. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepçikler izlenebilir. Hücreler henüz ortama yayılmış halde iseler hücrelerin sitoplazmalarında ortaya çıkan vakuoller gözlenebilir. Işık mikroskobu ile incelendiğinde apoptotik hücrelerin karakteristik özellikleri yoğunlaşmış ve büzüşmüş bir sitoplazma ile çekirdeksel değişikliklerdir. Kromatin kondenzasyonu ve kromatinin çekirdek zarının periferinde toplanması, çekirdeğin küçülmesi ve parçalara ayrılması en önemli morfolojik özelliklerdir. Apoptotik hücre karakterindeki çekirdek ve hücresel organeller düzeyindeki değişiklikler ise elektron mikroskobu ile gözlemlenebilir (52).

DNA fragmentasyonunun belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]- mediated dUTP- biotin nick-end labeling) yöntemi tek ya da çift iplikli

DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. Apoptotik hücelere ait DNA'lar hızlıca parçalanmakta olduklarından, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları, ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelir.

In situ hibridizasyon tekniği: Apoptozun belirlenmesi için işaretlenmiş poly (A) problemleri kullanılması esasına dayanır. Apoptotik DNA'nın denaturasyona duyarlılığı formalin ile tespit edilip parafine gömülmüş dokularda çalışılmaktadır.

Anneksin V yöntemi: Hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Bu fosfatidilserinler bir floresans madde (örn: FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilebilir. Bu belirleme flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılır ya da floresans mikroskobu ile incelenir.

Apoptoza özgü proteinlerin saptanması: Western blotting ya da immünohistokimya yöntemleri kullanılarak kaspazlar gibi sadece apoptotik hücrelerde aktif hale gelen ya da eksprese olan (örn: Bcl-2 vb.) bazı proteinlerin dokuda tespit edilmesi esasına dayanır (53).

2.5.2. Endometriyumda Apoptoz

Gerek menstrual siklus boyunca gerekse erken gebelik boyunca endometriyumda bir çok moleküler mekanizma işlemektedir. Apoptoz bu mekanizmaların en önemlilerinden bir tanesi olarak en çok çalışılan konulardan bir tanesini oluşturmaktadır. Apoptoz endometriyumun bir çok fizyolojik olayına aktif olarak katılmaktadır. Bunların başında menstruasyon, desidualizasyon, maternal immun tolerans gelişmesi, implantasyon, trophoblast invazyonu sayılabilir

Hem menstrual siklus boyunca hem de gebelik boyunca hormon seviyelerindeki değişimler apoptozla ve doku dengelerinin korunması ile direkt olarak ilişkilidir (54,55)

2.6. Endoplazmik Retikulum (ER)

Endoplazmik Retikulum (ER) dallı tübüller, yassılaştırmış keseler ve membranöz ağdan oluşan bir hücre organelidir. Bütün ökaryotik hücrelerde bulunur. Hücrenin hayatta kalabilmesi ve tüm yaşamsal fonksiyonları için önemli bir role sahiptir. Hücre içi kalsiyum (Ca) homeostazı, protein sekresyonu ve lipid biyosentezinden sorumludur (56,57). ER

lümeninde, protein katlanması ve sekresyondaki taşıma rolünden dolayı Ca bağlı moleküler şaperonlar bulunur. Bu moleküler şaperonlar protein yapısındadır. Diğer proteinlerin katlanmasına yardımcı olurlar. Heat shock protein 70 (HSP70) ailesi  yesi olan glukoz-regulated protein 78 kDa (GRP78), Heat shock protein 90 (HSP90) ailesi  yesi olan glukoz-regulated protein 94 kDa (GRP94) ve Kalretikulin, ER lümeninde bulunan ve protein katlanmasında stabilizasyona yardım eden moleküler şaperonlardır (58). ER, proteinlerin sadece sentez edildiği değil aynı zamanda proteinlerin doğru biçimlendirilmesini de sağlayan bir organeldir. Proteinler ER'a katlanmamış polipeptid zincirler şeklinde giriş yapar. Sentezlenmiş ve transmembran proteinler ER'da katlanır ve olgunlaşır. Bütün organizmalarda, proteinlerin görevlerini yerine getirebilmeleri için protein katlanması gerekli bir süreçtir. Ökaryotik hücrelerde salgı yolaklarına gidecek olan proteinler, golgiye geçmeden önce, katlanmak üzere ER'da toplanırlar. Proteinlerin kalite kontrolü olarak adlandırılan bu mekanizmanın amacı, sadece düzgün katlanan proteinlerin ER'den çıkmasına izin vererek diğer hücre içi organellere gitmesini sağlamaktır. ER lümenine giren, yeni sentezlenmiş polipeptid zincirleri amino uçlarından karbonhidrat yan zincirleri (3glukoz-2Mannoz-2N Asetilglukozamin) eklenerek translayon sonrası değişikliğe  ğarlar. Bu reaksiyon oligosakkarittransferaz enzimi (OST) tarafından katalizlenir. Daha sonra devreye Glikozidaz I ve II enzimleri girerek en uçtaki 2 glukoz molekülünü uzaklaştırarak tek bir glukoz molekülü içeren katlanmamış protein halini almasını sağlar. ER şaperon proteinlerinden Kalneksin ve Kalretikulin ile birlikte protein katlanmasını gerçekleştirir. Düzgün katlanmış proteinler kalneksin/ kalretikulin döngüsünden çıkarak golgiye geçerler (59).

2.6.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

ER'da depolanan proteinler hücre türleri arasında ve hücrenin yaşamı boyunca farklılık gösterir. Gelişim süreci, hücre siklus döngüsü ve çevresel ortam bunların hepsi ER'da depolanması gereken proteinlerin çeşidini ve miktarını etkileyebilir. Ancak bir stres uyaranı katlanan proteinlerin arasındaki reaksiyonu bozabilir ve bu da ER' un protein katlama yükü ve kapasitesi arasında uyumsuzluk yaratabilir. Bunun sonucunda ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler birikir. Bu durum **ER stresi olarak** adlandırılır (60,61).

2.6.2. Tunikamisin

Streptomyces lysosuperificus'tan izole edilen bir antibiyotik olan tunikamisin, UDP-N-asetilglukozamin'den dolikol monofosfata N asetilglukozamin-1-fosfatın transferini inhibe

ederek karbonhidrat ve protein arasındaki N-glikozidik tip bağlanmayı bloke eder (62-63). Normal hücre yüzey morfolojisi ve normal hücre adezyonunun korunması, sürdürülmesi, hücre yüzeyiyle ilişkili proteinlerin salgılanması (64) ve hücre içi transportu, virüslerin enfeksiyonu ve yayılması gibi çeşitli olaylardaki proteinlerin N-glikozidik bağlı oligosakkarit kısımlarının fonksiyonlarını araştırmada, gelişen fare embriyolarında (65), insan, fare ve sıçan myeloid lösemi hücrelerinin farklılaşmasında (66-67), memeli hücrelerinde mutasyona uğramış olan hücrelerin seleksiyonunda (68) spesifik olarak tunikamisin kullanılmaktadır. Tunikamisin; amino gruba bağlı bir yağ asidi, *tunikamisin* olarak adlandırılan 11-carbon aminodialdose, *N*-asetilglukozamin (GlcNAc) ve uracil içeren homolog antibiyotiklerin bir karışımıdır. Tunikamisinin birçok homoloğu vardır. Tunikamisin homologları, yağ asidi karbon zincirlerinin değişik uzunlukta olmasından dolayı farklılık göstermektedir (69). Homologlarından bir kısmı lipitlerin N-bağlı glikozilasyonunu inhibe etmek için 5 µg/ml' ye gerek duyarken diğer homologları için 1-2 µg/ml bu inhibisyon için yeterli olmaktadır (70). Protein sentezi üzerine genel bir etkisi olmaksızın protein glikozilasyonunu tamamen inhibe etme yeteneğine sahip olması nedeniyle tunikamisin *in vivo* da ve biyolojik deneylerde yoğun olarak kullanılmaktadır (71).

2.6.3. Tunikamisinin Apoptotik Etkisi

Tunikamisinin bitki ve memeli hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini uyarak programlanmış hücre ölümüne yol açar. Tunikamisin N- bağlı glikozilasyonu inhibe eder ve bu inhibisyon apoptozisi indükler (72).

2.6.4. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)

ER stres indikatörü olan tauroursodeoxycholic acid TUDCA toksik olmayan, hidrofilik bir safra asidi olan ursodeoxycholic acid (UDCA) türevidir (73). Kaspaz aktivasyonu ve sitokrom C'yi serbest bırakarak, mitokondriyal depolarizasyonu azaltıp apoptozu indükler. Kalsiyum homeostazında görevli olan TUDCA ER stresini süresince apoptozu indükler. ER stres sonucunda indüklenmiş apoptozda TUDCA apoptotik yolaktaki kaspaz-12 aktivasyonunu inhibe ederek hücreleri korur (74).

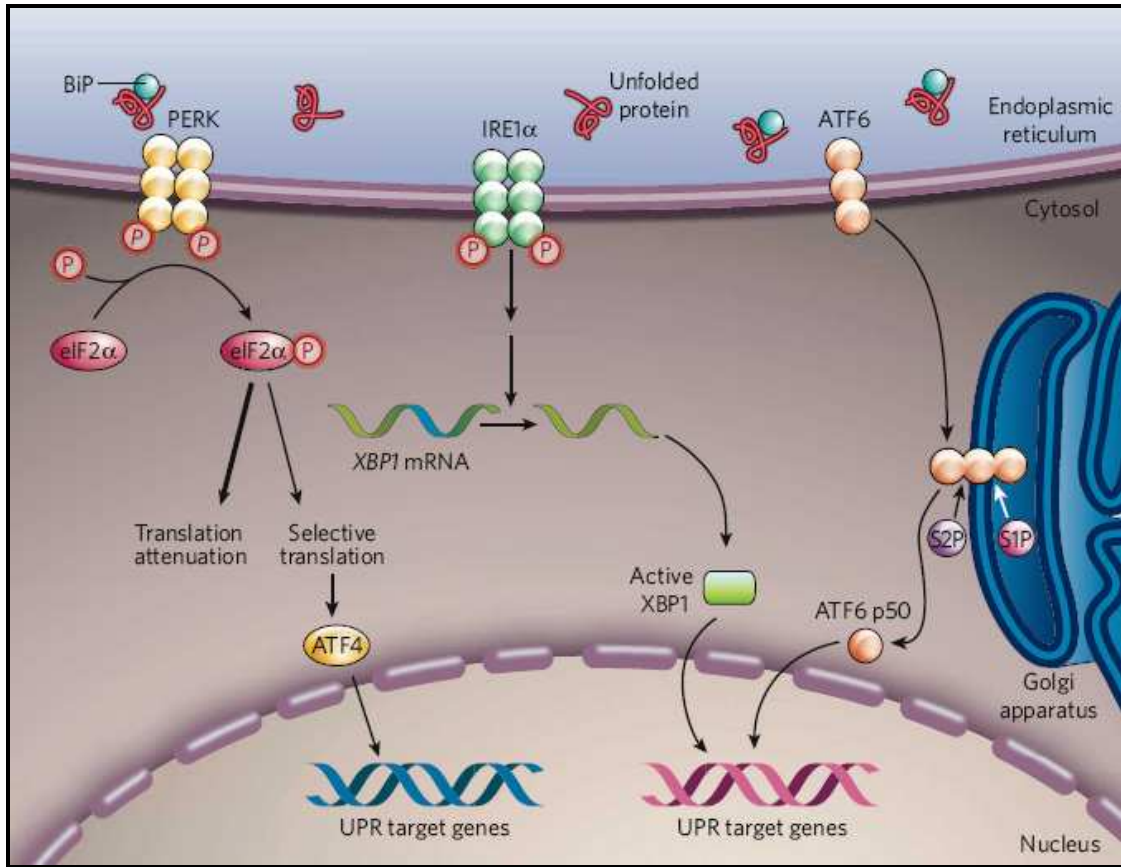
2.7. Katlanamayan Protein Cevabı (UPR=Unfolded Protein Response)

Proteinlerin katlanmasının devamlılığı ve katlanmamış ya da yanlış katlanan proteinlerin birikimini önlemesi için hücreler katlanamayan protein cevabı Unfolded Protein Response (UPR) olarak adlandırılan, ER bağımlı hücresel bir cevabı tetikler. UPR'ın ilk amacı normal ER fonksiyonu ve homeostazı yeniden sağlamaktır. Hücresel cevap

transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde gerçekleşir (75). 3 şekilde cevap oluşur: adaptasyon, uyarı ve apoptozis. İlk olarak protein sentezi ve ER translasyonunu azaltarak ER'ye gelen protein yükü azaltılır. İkincil olarak, ER katlanma mekanizmasında görevli genlerle UPR hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu sağlayarak ER kapasitesi azaltılır. ER başarılı olamadığı takdirde proteinler ubiquitinleşeceği ve 26S proteozomları tarafından degradasyonunun hedeflendiği ER associated degradation (ERAD) adı verilen süreç boyunca sitozole aktarılır. Üçüncü olarakta eğer homeostaz kurulamazsa hücre apoptoza gider (76).

2.7.1. UPR Sinyal Mekanizması

Katlanamayan protein ER'de birikmeye başlayınca UPR' dan sorumlu transmembran proteinleri harekete geçer. Bu UPR başlatıcı proteinler N terminali ile ER lümenini, C terminali ile sitozolu köprü gibi idare eden şaperonlardır (77). En önemli transmembran proteinleri: Protein Kinaz Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (PERK, PRKR-like ER kinase, EIF2AK3), İnositol Requiring Transmembran Endonükleaz-1 (IRE1, inositol-requiring kinase 1, ERN1), ve Aktive Transkripsiyon Faktörü-6 (ATF, Activating transcription factor 6) dır (Şekil 8).



Şekil 8. Memelilerde UPR yolağının şematik gösterilmesi (78).

2.7.2. Protein Kinaz Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (PERK)

Ser/Thr proteinkinaz katalitik bölgesi EIF2 α kinaz ailesi ile homoloji gösterir. ER membranındaki PERK oligomerizasyonu, otoposforilasyonu ve kinaz bölge aktivasyonunu artırır. PERK EIF2 α (Eukaryotic translation initiation factor 2 α , serine 51, 38 kDa)'nın fosforilasyonu ve inaktivasyonu ile mRNA translasyonunu ve ER'ye protein yüklenmesini azaltır. Böylece protein sentez etkinliği azalmış olur. Aynı zamanda seçici translasyonla ATF4 (39 kDa)'ü aktive eder. ATF4 UPR yolağında görevli ER şaperonları olan GRP78 ve GRP94'ü kodlayan hedef genlerin transkripsiyonlarını aktifleştirir. Bu genler glutamin biyosentezi, oksidatif stres rezistansı, aminoasit metabolizması, ve taşımada görevlidir (79).

2.7.3. İnositol Requiring Transmembran Endonükleaz (IRE1)

Tip 1 transmembran proteini olan IRE1 α 100 kDa molekül ağırlığına sahip, her iki Ser/Thr kinaz bölgesi ve endoribonükleaz bölgesi içerir. Endoribonükleaz bölgesi ER lümeninde katlanmamış protein birikimini algıladığı zaman bir stres reseptörü gibi davranır. Oligomerize olarak transfosforilasyona uğrayıp RNA az aktivasyonunu sağlar XBP1 (x-box-binding protein 1, 41 kDa) proteininin mRNA sekansının kesilmesi ile aktif XBP1 oluşumu başlatılır. XBP1 UPR hedef genlerini ve ERAD mekanizmasındaki genlerin transkripsiyonunu aktifleştirerek ER'de protein katlanma kapasitesini artırır (80).

2.7.4. Aktive Transkripsiyon Faktörü-6 (ATF6)

ATF6 α ve ATF6 β , ATF4 ile benzerlik gösteren, bZIP transkripsiyon faktör ailesine ait tip II transmembran proteindir. ER membranına hidrofobik sekansı ile bağlıdır. ER stres tetikleyicisi IRE1 ve PERK'ten farklı bir protein aktivasyon mekanizmasıdır. ER stresine bağlı olarak ATF6 ER'den golgiye S1 ve S2 proteazları ile taşınır. ATF6'dan kesilen sitozolik bölgeler membrandan salınır. ER şaperonları ve ERAD bağımlı genleri transkripsiyonel olarak indüklemek için nükleusa taşınır (81).

2.7.5. Glukoz-Regulated Protein 78 kDa (GRP78/ BİP)

BİP ER lümeninde en çok bulunan şaperondur. Proteinlerin kalite kontrolünde merkezi rol oynar. HSP70 ailesi üyesi olan bir ATP'azdır. Fakat bu HSP70 şaperon ailesi üyeleri gibi doğal polipeptitlerle etkileşime girmez. ER'ye transfer edilecek yeni sentezlenen protein geçici olarak, glikozillenme sürecinde olan hatalı katlanmış veya katlanamamış proteine kalıcı olarak bağlanır. Stresiz koşullarda PERK, IRE1, ATF6 şaperon protein GRP78/BİP'e bağlıdır. Böylece stressiz koşullarda bu üç proteini ER'de tutar. Stres koşullarında bu proteinleri serbest bırakarak kendi kendilerini fosforlayarak aktivasyonlarına

yol açar. Bu proteinlerden ayrılan BİPler ise katlanamamış proteinler tarafından tutulur. BİP'in katlanmamış proteine bağlanması o proteininin katlanmasına yardımcı olmaz ama proteini katlanmaya elverişli biçimde tutar (76-81).

Hipotezimiz, endometriyal endotel hücrelerinde BİP ve eIF-2 α ekspresyonunun, menstrual siklus ile erken gebelik boyunca zaman ve doz bağlamında değişime uğradığı ve bu protein ekspresyonunun TNF alfa (TNF- α) ve interlökin-1 beta (IL-1 β) gibi inflamatuvar sitokinler tarafından aktive edildiği ve buna bağlı olarak hücre içi mRNA translasyonunun kontrolü ve protein katlanma mekanizmasının dengelenmesini sağlayıp endotel hücrelerinin siklus bağımlı proliferasyon, anjiyogenez ve apoptotik değişimlerini düzenlediğidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın tipi

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı

Çalışmamız Yale Üniversitesi Kadın Doğum ve Üreme Bilimi Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma Eylül 2009 tarihinde başlamış Mart 2011 tarihinde sonlanmıştır.

3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme/çalışma grupları

Menstrual siklusun farklı fazlarından: erken proliferasyon için 5, orta proliferasyon için 6,geç proliferasyon için 7, erken sekresyon için 7, orta sekresyon için 4, geç sekresyon için 6 ve 6 erken gebeliğe ait kretaj materyali olmak üzere toplam 35 insan uterus doku örneğinde immünohistokimya boyaması yapıldı.

UPR sinyal yolağının in vitro insan endometriyal endotel hücreleri üzerine etkisini görmeyi hedeflediğimiz çalışmada oluşturulan gruplar:

MTS için, tunikamisin grupları:

I. grup Kontrol grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan HEEC deney grubudur.

II. grup Tunikamisin grubu: 0,5 µg/ml tunikamisinli medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

III. grup Tunikamisin grubu: 2,5 µg/ml tunikamisinli medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

IV. grup Tunikamisin grubu: 5 µg/ml tunikamisinli medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

ELİSA için, tunikamisin+TUDCA grupları:

I. grup Kontrol grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan HEEC deney grubudur.

II. grup Tunikamisin grubu: 0,5 µg/ml tunikamisinli medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

III. grup Tunikamisin grubu: 2,5 µg/ml tunikamisinli medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

IV. grup Tunikamisin grubu: 5 µg/ml tunikamisinli medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

V. grup Tunikamisin + TUDCA grubu: 0,5 µg/ml tunikamisinli ve 10^{-3} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

VI. grup Tunikamisin + TUDCA grubu: 2,5 µg/ml tunikamisinli ve 10^{-3} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

VII. grup Tunikamisin + TUDCA grubu: 5 µg/ml tunikamisinli ve 10^{-3} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

VIII. grup TUDCA grubu: 10^{-3} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

MTS ve ELİSA için, inflamatuvar sitokin grupları:

I. grup Kontrol grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan HEEC deney grubudur.

II. grup TNF- α grubu: 10 ng TNF- α ' lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

III. grup TNF- α + TUDCA grubu: 10 ng TNF- α ve 10^{-3} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

IV. grup IL-1 β grubu: 10 ng IL-1 β ' lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

V. grup IL-1 β + TUDCA grubu: 10 ng IL-1 β ve 10^{-3} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu

VI. grup TUDCA grubu: 10^{-3} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu

VII. grup TUDCA grubu: 10^{-4} M TUDCA'lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu

TUNEL için inflamatuvar sitokin grupları:

I. grup Kontrol grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan HEEC deney grubudur.

II. grup TNF- α grubu: 10 ng TNF- α ' lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

III. grup IL-1 β grubu: 10 ng IL-1 β ' lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

IV. grup Negatif grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan HEEC deney grubudur.

Western Blot için, hormon grupları:

I. grup Kontrol grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan HEEC deney grubudur.

II. grup östrojen grubu: 10^{-8} M östrojenli medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

III. grup progesteron grubu: 10^{-7} M progesteronlu medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

IV. grup östrojen + progesteron grubu: 10^{-8} M östrojen+ 10^{-7} M progesteronlu medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

Western Blot ve immunositokimya için, inflamatuvar sitokin grupları:

I. grup Kontrol grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan HEEC deney grubudur.

II. grup TNF- α grubu: 10 ng TNF- α ' lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

III. grup IL-1 β grubu: 10 ng IL-1 β ' lı medyumda inkübe edilen HEEC grubu.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışma materyali, kullanılan dokular Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Reprodüktif Endokrinoloji Bölümü tarafından sağlandı.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Araştırmada kontrol ve negatif gruplarına herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

MTS için HEEC: tunikamisin, inflamatuvar sitokinler ve TUDCA grupları 24 ve 48 saat uyarılmıştır.

TUNEL için HEEC: inflamatuvar sitokin grupları 48 saat uyarılmıştır.

ELİSA için HEEC: tunikamisin, inflamatuvar sitokinler ve TUDCA grupları 48 saat uyarılmıştır.

Western Blot için HEEC: hormon ve inflamatuvar sitokin grupları 45 dakika, 8, 24 ve 48 saat uyarılmıştır.

Immunositokimya için HEEC: inflamatuvar sitokin grupları 8, 24 ve 48 saat uyarılmıştır.

3.6. Veri toplama araçları

3.6.1. Araştırmada kullanılan demirbaş malzemeler

Araştırmada insan endometriyal endotel hücrelerin inkübasyonu için inkübatör, doku takibi için etüv, immünohistokimyasal incelemeler için nemli çember ve otomatik mikropipetler, MTS için multipipetör kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada kullanılan yöntemler

3.6.2.1. Endometriyum Endotel Hücrelerinin İzolasyonu

Stroma hücreleri flask yüzeyinde %60-70'lik bir yoğunluğa geldikleri zaman deneye alındılar. Hücreler önce PBS ile yıkandı ve hücrelerin üzerlerine akabinde Tripsin eklenerek hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları için 10 dakika 37⁰C'de inkübe edildi. Hücreler faz-kontrast mikroskobu altında kontrol edildikten sonra, tripsin aktivitesini yok etmek için üzerlerine 10 ml DMEM:F12 ortamı ilave edilerek ve 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve sonra kalan hücre pelleti üzerine 2 ml hücre dilusyon solüsyonu (PBS, %0,5 BSA, 2 mM EDTA) eklendi. Süspansiyon çok iyi karıştırıldıktan sonra oluşan hücre kümeleşmesini engellemek için (kümeleşmenin dezavantajı kültürde stromaya ait hücre kontaminasyonunun arttırması dolayısı ile) 30-mm naylon meshlerden (sadece bir hücre geçebilecek çapta, Miltenyi Biotec) filtre edildi. Filtre edilmiş

solüsyon, anti-CD-105 ile kaplanmış manyetik alan üzerine yerleştirilmiş petri kaplarına alındı. Hücrelerin bulundukları yüzeye yapışması için 7-10 dakika 8-10°C'de inkübe edildi. Hücre kaplarına bağlanmayan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa hücre dilüsyon solüsyonu ile yıkandı ve üzerlerine EGM MV- Microvascular Endothelial Cell Medyumu (BioWhittaker) eklendi. Ortamlar her iki günde bir değiştirildi ve hücreler % 80-90 yoğunluğa geldiklerinde tripsinize edildi. Endotelyal hücreleri tripsine çok daha hassas oldukları için hücreler önce EDTA solüsyonu ile yıkandı ve arkasından 1 ml Tripsin-EDTA (Cambrex Clonetics) eklendi ve 10 dakika inkübe edildikten sonra üzerlerine tripsin inhibitör solüsyonu eklendi ve 1800 rpm'de santrifüj edildi. Hücreler 1:4 oranında sulandırılarak 60 mm kültür kaplarına ve 4-gözlü lamlara alındı.

Amacımız kültürde saf endotelyal hücre elde etmek olduğu için hücreler ikinci pasajda iken endotelyal, bez epiteli ve lökosit spesifik antikorlar ile immunositokimyasal yöntemler ile boyandı ve karakterize edildi. İkinci pasajda, endometriyal endotelyal hücreler jelatin ile kaplanmış ve kaplanmamış 12-gözlü kültür kaplarına alındı ve görünüşleri her 12 saatte bir mikroskop altında kontrol edildi.

3.6.2.2. Işık Mikroskopik Doku Takibi, İmmünohistokimya ve immunositokimya

Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi.

%70□lik alkol (20 dk.)

%80□lik alkol (20 dk.)

%96□lık alkol (20 dk.)

%96□lık alkol (20 dk.)

Aseton 1 (20 dk.)

Aseton 2 (20 dk.)

Aseton 3 (20 dk.)

Aseton 4 (20 dk.)

Ksilol 1 (30 dk)

Ksilol 2 (30 dk)

Parafin 1 (1 saat)

Parafin 2 (1 saat)

Dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla dokulardan lizinli lamlara immunositokimya boyaması için 5-µm kalınlığında parafin kesitler alındı ve sırasıyla ksilol ve alkol serilerinde rutin deparafinizasyon ve dehidratasyonu takiben dokular PBS ile yıkandı ve

sitrik asit tamponunda 3 defa 5 dakika mikrodalgaya maruz bırakıldı. Sonrasında slaytlar PBS ile 3 defa yıkandı. Endometriyal endotel hücreleri 4-gözlü lamlarda istenilen uyaranlar ile (sitokinler) gerekli zaman sürelerinde uyarıldıktan sonra %4 paraformaldehitde 20 dakika +4°C fıkse edildi. Sonrasında kesitler PBS'le 2 defa yıkandı. Hem dokular hem hücreler bu aşamadan sonra hemen h aynı işlemde geçirildiler. Kesitler ve hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, PBS içerisinde hazırlanan 0,2% Tween 20 ile geçirgen hale getirildi. Endojenik peroksidaz aktivitesini yok etmek için hücreler 3% H₂O₂ (0,6 ml 30% H₂O₂ ve 2,7 ml methanol ve 2,7 ml H₂O) ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkama işlemlerinden sonra, non-spesifik bağlanımı bloke etmek için kullanılan primer antikorlar ile uygun 5%'lik normal keçi serumu ile oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, örnekler üzerine uygun primer antikorlar rabbit monoklonal BİP, (Cell signalling), eklenerek oda ısısında 1 saat veya +4°C'de gece boyu inkübe edildiler. Yıkama aşamalarını takiben, biotinylated goat anti-rabbit IgG ile 30 dakika inkubasyondan sonra streptavidin-peroksidaz kompleksi Vectastain ABC Elite kit (Vector Lab) kullanıldı. Bu aşamaları takiben, kromojenik reaksiyon 3-amino 9-ethyl carbazole (AEC, Vector Lab) ile gerçekleştirildi ve reaksiyon çeşme suyu ile durduruldu. Örnekler hematoksilen ile boyandıktan sonra kapatıldı ve ışık mikroskobu altında incelendi.

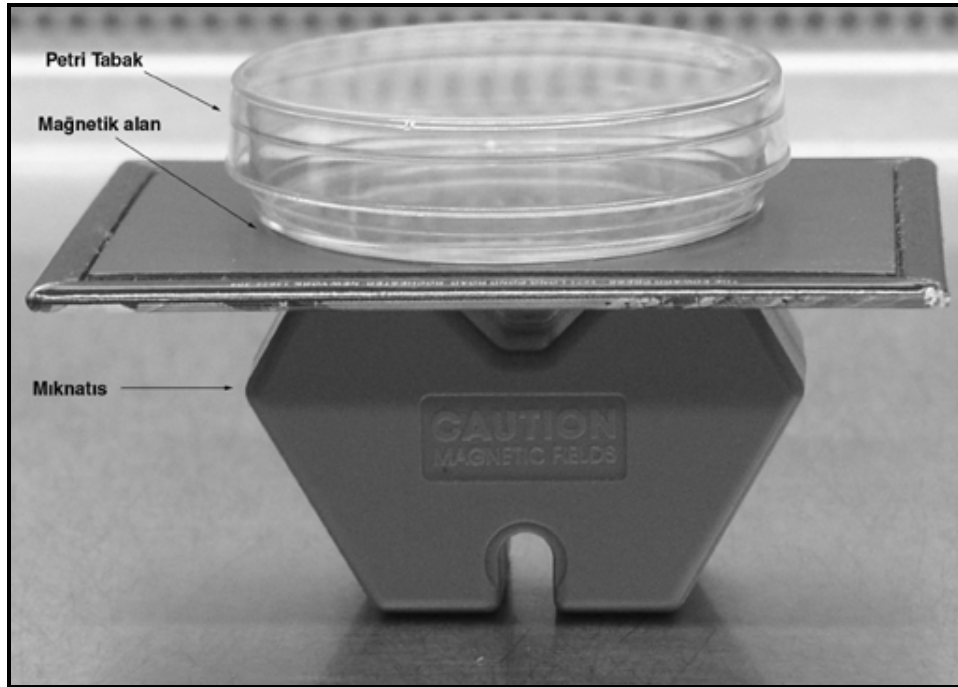
3.6.2.3. Hücre Proliferasyon Deneyi (MTS)

İnsan endometriyum endotel hücre proliferasyonu 96-well kültür kaplarında Cell Titer 96 Aqueous radyoaktif olmayan hücre proliferasyon kiti (Promega) kullanılarak gerçekleştirildi. İn vitro hücre proliferasyonu için sitokinler 10 ng, tunikamisin 0,5-2,5-5µg/ml ve TUDCA 10⁻³ M ile 10⁻⁴ M konsantrasyonlarında kullanıldı. Kitin en önemli özelliği non-radyoaktif olarak (kalorimetrik) olarak canlı hücre sayısını vermesidir. Kit tetrazolium karışım 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) 2H-tetrazolium, inner salt, MTS) içermektedir. Temel olarak formazan absorpsiyonunun 490 nm dalga boyunda okunabilir özelliği kullanılmaktadır. Eriyebilir formazan metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrogenaz enzimleri tarafından oluşturulur. 96- welldeki ilk kolona hiç hücre ekilmedi ve bu kolon bazal kontrol olarak okundu. Her welle eşit sayıda hücre ekildikten sonra kolonlar Tunikamisin, TNF-α, IL-1β ve TUDCA'lı kombinasyonları ile indüklendi. Kontrol hücrelerine ise sadece serum free medya eklendi. 24 ve 48 saat sonra hücre proliferasyonu ölçüldü. Deney sonlanmadan 4 saat önce 100 ml medya içerisine 10 ml

MTS solüsyonu eklendi ve hücreler 37⁰C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikrokuyular 490 nm dalga boyunda okundu ve optik yoğunluk birimi ortalaması hesaplandı.

3.6.2.4. Microbead-bağlanmış-anti-CD105 kaplı Petri Kaplarının Hazırlanması

20 µgr/ml Microbead-bağlanmış-anti-CD105 antikorları, 50 mM Tris-HCl (pH: 9,5) solüsyonu içerisinde hazırlandı. Antikor solüsyonu petri kaplarına eklenmeden önce petri kapları manyetik alan üzerine yerleştirildi böylelikle antikorların petriye bağlanma afinitesi manyetik olarak arttırılmış oldu (Şekil 9). 60 mm çaplı petri kapları için 3 ml antikor solüsyonu eklendi ve 2 saat 37⁰C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası antikor solüsyonu uzaklaştırıldı. Kaplar 0.15 M NaCl ile 3 defa yıkandı. Non-spesifik bağlanmayı engellemek için petri kapları öncelikle 0,1% bovine serum albümin (BSA) ile oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Bu basamak başladığında endometriyum stroma ve endotel hücreleri tripsinizasyon işlemine tabi tutuldular. Her iki işlem de eş zamanlı olarak tamamlandı.



Şekil 9. Kullanılan antikorların metalik kaplanmış özelliğine dayanarak, mıknatısla güçlendirilmiş petri kabında manyetik alan oluşturulması. Böylece metalik parçalarla kaplanmış antikor manyetik alan oluşturulmamışlara göre çok daha hızlı ve sağlam bir şekilde petri tabaklara bağlanmaktadır. (Ümit Ali Kayışlı’nın doktora tezinden izni dahilinde alınmıştır.)

3.6.2.5. İn Vitro Endotel Hücre Deneyleri

Endotel hücreleri % 80-90 yoğunluğa geldiklerinde aktif karbon ile muamele edilmiş % 2’lik FBS içeren dinlendirme medyumuna alındılar ve 24 saat bekletildiler. Bu medyumun amacı hücreleri uyaranlara maksimum cevap verebilecek düzeye getirmektir. Böylece

serumdaki steroidlerin etkisini ortadan kaldırdığı için deneylerde elde edilen steroidlerin etkisi oldukça saf ve daha güvenilirdir. 24 saat sonra hücreler PBS ile iki defa yıkanıp daha sonra deney medyası olarak %2 FBS içeren fenol red-free DMEM kullanıldı. Seks steroidlerin için zaman ve konsantrasyon bağımlı etkisi 10^{-8} M'dan 10^{-7} M'a kadar ve 24 ile 48 saat arasında, TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinler için zaman ve doz bağımlı etkileri 10 ng/ml ile 5,15,45 dakika, 8, 24 ve 48 saat arasındaki etkileri araştırıldı.

3.6.2.6. Total Proteinlerin Elde Edilmesi

Endometriyum endotel hücreleri medya içinde uygun steroid ve sitokinler ile muamele edildikten sonra, hücreler iki defa soğuk PBS ile yıkandı ve santrifugasyon sonrası hemen -80°C 'ye konuldu. Kültür kapları -80°C 'den alınıp buz üzerine konuldu ve üzerlerine proteaz inhibitörü içeren liziz buffer (50 mM HEPES, pH:7.4: 150 mM NaCl: 10% gliserol: 1% Triton X-100: 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EGDA, 100 mM NaF, 10 mM sodyum pyrophosphate ve proteaz inhibitörleri, (1 mM Na_3VO_4 , 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin, 4 mM PMSF) eklendi (Pierce). Hücre süspansiyonu mikrosantrifüj tüplerine alınarak buz üzerinde 20 dakika inkübe edildikten sonra, 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernanat temiz mikrosantrifüj tüplerine alınarak, protein miktarları Bradford assay temeline dayalı olarak kantifiye edildi.

3.6.2.7. Western Blot

Total protein, T-PER liziz tamponu (50 mM HEPES, pH:7,4: 150 mM NaCl: 10% gliserol: 1% Triton X-100: 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EGDA, 100 mM NaF, 10 mM sodyum pyrophosphate ve proteaz inhibitörleri, (1 mM Na_3VO_4 , 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin, 4 mM PMSF) kullanılarak ikinci ve üçüncü pasajdaki insan endometriyum endotel hücrelerinden elde edildi. Protein konsantrasyonları belirlendikten sonra, her kuyucuğa 12 mikrogram protein yüklendi. Örnekler %7,5'luk TGX precast jelde (BIO-RAD) 80 V'da 1 x yürüme tamponu içerisinde yaklaşık 1 saat elektroforetik olarak ayrılması sağlandı. Jel plakalardan ayrıldıktan sonra transfer tamponu içerisinde 80 V'da $+4^{\circ}\text{C}$ de 1 buçuk saat nitroselüloz membrana transfer edildi. Membran TBS-T buffer (0.05% Tween-20 in TBS) içerisinde hazırlanan 5% yağsı kuru süt tozu ile 1 saat 25°C de inkübe edildi. Bloking aşamasından sonra primer antikolar ile 1 saat oda ısısında veya 1 gece $+4^{\circ}\text{C}$ inkübe edildi ve arkasından 4 defa 10 dakika TBS-T ile yıkandı. Yıkama aşamalarından sonra, 1 saat peroksidaz labeled keçi anti-tavşan antikoları ile inkübe edildi ve 4 defa TBS-T ile 10 dakika yıkandı. Immunotespit için ECL (GE-Healthcare) ile 1 dakika inkübe edildikten sonra

BioMax filme maruz bırakıldı. Aynı membran stripping solüsyonu ile 50⁰C de su banyosunda 20 dakika strip edildi. (Protein bağlarının koparılıp, bağlanan antikorlar membrandan temizlendi.) 4 defa TBS-T ile 10 dakika yıkandı. Bloking aşamasından itibaren yeni antikorla membran tekrardan primerle ve sekonderle inkübe edildi. Aralarda yıkama işlemi yapıldı. Immunotespit için ECL (GE-Healthcare) ile 1 dakika inkübe edildikten sonra BioMax filme maruz bırakıldı. Bu şekilde aynı membran 2 kez strip edilip; BİP (Cell Signalling, 78 kDa) eIF2 α (Ser 51, Cell Signalling, 38 kDa)'nın total ve fosfo formlarına ve de içerdikleri total protein için β -Actin (Santa Cruz, 42 kDa)'e bakıldı.

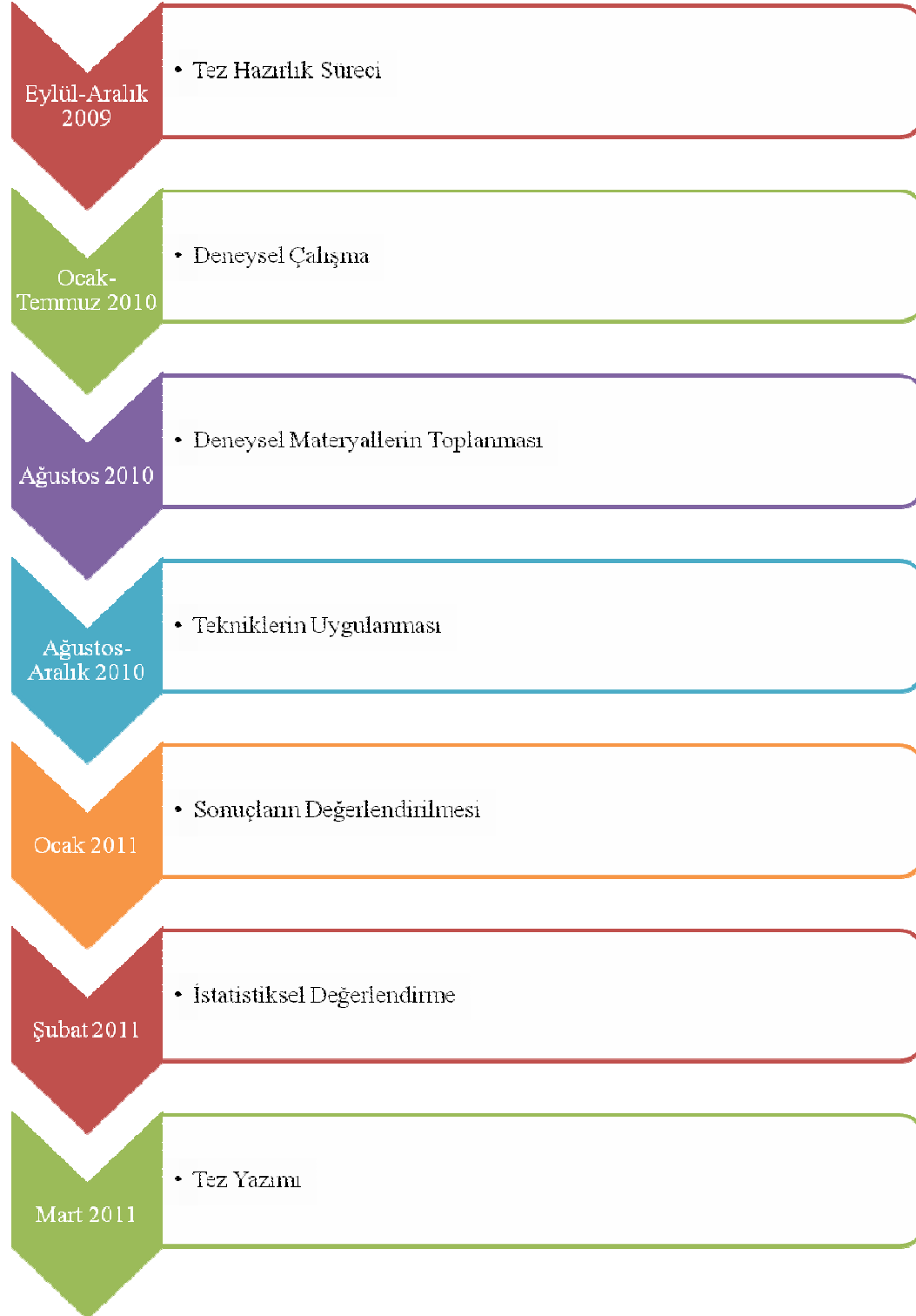
3.6.2.8. ELİSA Yöntemi

İnsan endometriyal endotel hücrelerinde konsantrasyon bağımlı olarak TUDCA (10⁻³-10⁻⁴ M), doz bağımlı olarak tunikamisin (0,5-2,5-5 μ g), TNF- α (10ng) ve IL-1 β (10ng) ile 48 saat uyarılarak kültür medyalarında R&D Systems IL-8 kiti kullanılarak IL-8 seviyesi araştırıldı. Kitin içeriğinde bulunan ve mikrokuyucuklara bağlanmayı sağlayan (*capture ab*) antikor ile, medyalar yüklenmeden önce 1/180 oranında sulandırılarak her göze 100'er μ l yüklenerek, 1 saat inkübe edildi ve medyalar için hazır hale getirildi. Kite ait 96 gözlü mikropleytlerin 1. ve 2. kolonlarına kitin içeriğinde bulunan standartlar artan dilüsyonlarda yüklendi. Diğer kolanlara ise (3-12) oda ısısına getirdiğimiz kültür ortamlarından her gruba ait 2 şerli olacak şekilde 100'er μ l yüklendi. Kuyular 90 dakika saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 400 μ l yıkama solüsyonu (PBS) ile 3 kez yıkandı. Yıkamalar sonunda kuyuların tamamen boşaltılması amacıyla hafifçe kurutma kağıdı üzerine vurularak kurulandı. Her göze 1/180 oranında sulandırılmış (*detection ab*) tespit solüsyonundan 100'er μ l koyularak tekrar bir buçuk saat inkübasyona bırakıldı. Tekrar 3 kez yıkama işleminden sonra 1/200 oranında Streptavidin-HRP eklenip 20 dakika alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda avidin kompleksinin epitoplara bağlanması sağlandı. Son defa 3 kez yıkanarak renk reaksiyonu sağlayan A ve B (*color reagent*) solüsyonları eşit oranda karıştırılarak her göze 100'er μ l eklendi. Kitin kullanım protokolüne uygun olarak 15 dakika sonunda 0,1M HCl (reaksiyon durdurma solüsyonu) ile her göze 50 μ l eklenerek spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu. Tüm işlemler sırasında her kuyuya eşit solüsyon veren mikropipetör kullanılarak deney yapıldı. Sonuçlar Sigma Plot istatistiksel analiz programında analiz edildi.

3.6.2.9. TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling*) Boyaması

İnsan endometriyal endotel hücreleri 4-gözlü kültür kaplarında 24 ve 48 saat TNF- α (10 ng) ve IL-1 β (10 ng) ile tedavi edildi. Kontrole ve negatife sadece serum free medya verildi. Deney sonunda buz üzerinde %4 paraformaldehitte 30 dakika +4⁰C de hücreler fikse edilip 3 kez PBS ile yıkandı. Enzimatik alkalın fosfataz işaretlemesi kullanılarak DNA kırıkları TUNEL kiti (Roche, Mannheim, Almanya) ile belirlendi. Hücreler permeabilizasyon solüsyonu (0.1% tritonX-100 içeren 0.1% sodyum sitrat solüsyonu) ile 2 dakika +4⁰C'de inkübe edildi. Akabinde slaytlar PBS ile 2 defa yıkandı ve TUNEL solüsyonu (DNA-kırık uçları işaretli TUNEL probları) ile 1 saat 37⁰C'ta inkübe edildi. Negatif kontrol için yukarıda anlatılan şekilde negatif olarak belirlenen göze enzimsiz TUNEL solüsyonu konuldu. Daha sonra hücreler tekrar PBS yıkamalarından geçirilerek 30 dakika streptavidin-alkaline fosfataz enziminde bekletildi. Yıkama işleminin ardından, hücreler sonraki basamakta TUNEL pozitif hücreleri görüntülemek amacıyla Fast-Red substratı ile 5 dakika mikroskop altında inkübe edildi. Hematoksilen ile zemin boyaması yapıp kapatıldı. Mikroskop altında her slaytta 10 ayrı alanda TUNEL pozitif ve negatif hücre sayıları tespit edilerek her tedavi grubu için apoptotik hücre yüzdeleri tespit edildi.

3.7. Araştırma planı ve takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Hücre proliferasyon, Western blot sonuçları Komogorov-Smirnov testine göre oluşturuldu. Deney grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar One way ANOVA ve Tukey testleri ile analiz edildi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi. Tüm istatistik hesaplamalar SigmaPlot ile gerçekleştirildi (versiyon 11.0).

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

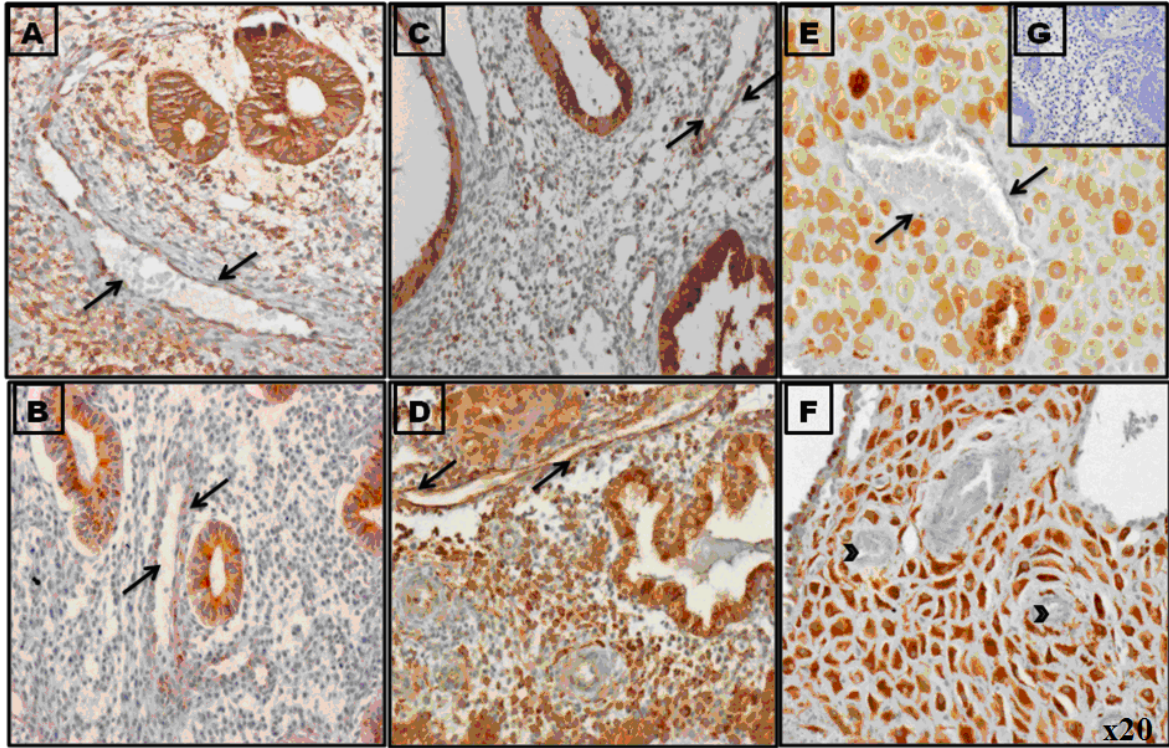
Çalışmamız süresince Yale Üniversitesi 11.08.2009 tarihli (HIC) protokol numarası; 9306006685 olan Etik Kurul kararlarına uyuldu.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Menstrual siklus ve erken gebelik boyunca insan endometriyum endotel hücrelerinde (HEEC) endojen BİP ekspresyonu

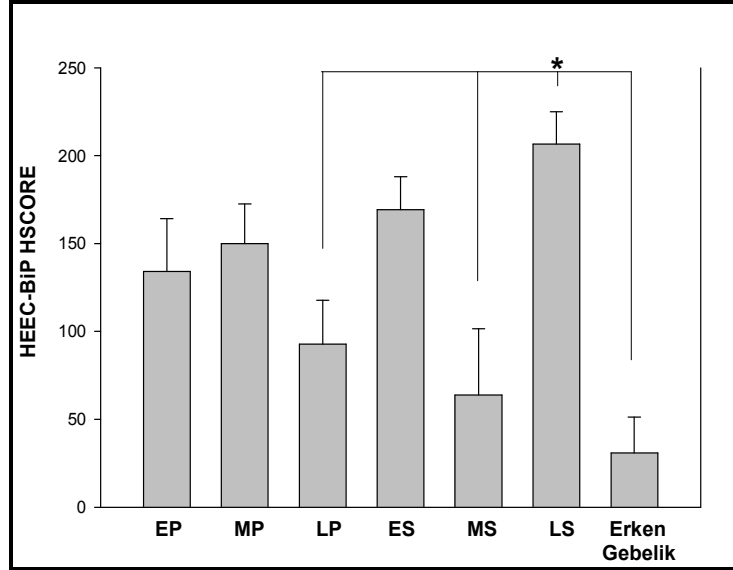
Menstrual siklus boyunca farklı fazlara ait endometriyum dokuların endotel hücrelerinde protein düzeyinde BİP ekspresyonu immünohistokimya tekniği kullanılarak analiz edildi. Erken proliferasyon boyunca HEEClere kuvvetli bir pozitiflik sergilememesine rağmen, bu pozitiflik geç proliferasyona doğru ilerledikçe de belirgin olarak azaldı. İlginç olarak BİP ekspresyonu erken sekresyona ait HEEClere kuvvetli iken, implantasyon penceresine (orta sekresyon) ait endometriyum dokularındaki endotel hücrelerinde çok belirgin olarak azaldı. Geç sekresyon endometriyumuna ait HEEClere ise menstrual siklus boyunca izlenen en kuvvetli BİP ekspresyonuna sahip oldukları saptandı. (Şekil 1, 2; $p<0,05$)



Şekil 10 A-G. Menstrual siklus endometriyal dokularında (A-D) ve birinci trimester desidual doku (E,F) endotel hücrelerinde BİP ekspresyonu. A, erken proliferasyon; B, geç proliferasyon; C, orta sekresyon; D, geç sekresyon; E-F, birinci trimester. (Ok; İnsan endometriyal endotel hücrelerini göstermektedir. Ok başı; Spiral arter endotel hücrelerini göstermektedir.)

Erken gebelik dönemine ait desidual doku endotel hücrelerinde BİP immunoreaktivitesi implantasyon penceresindeki gibi oldukça zayıf olarak izlendi. Bu

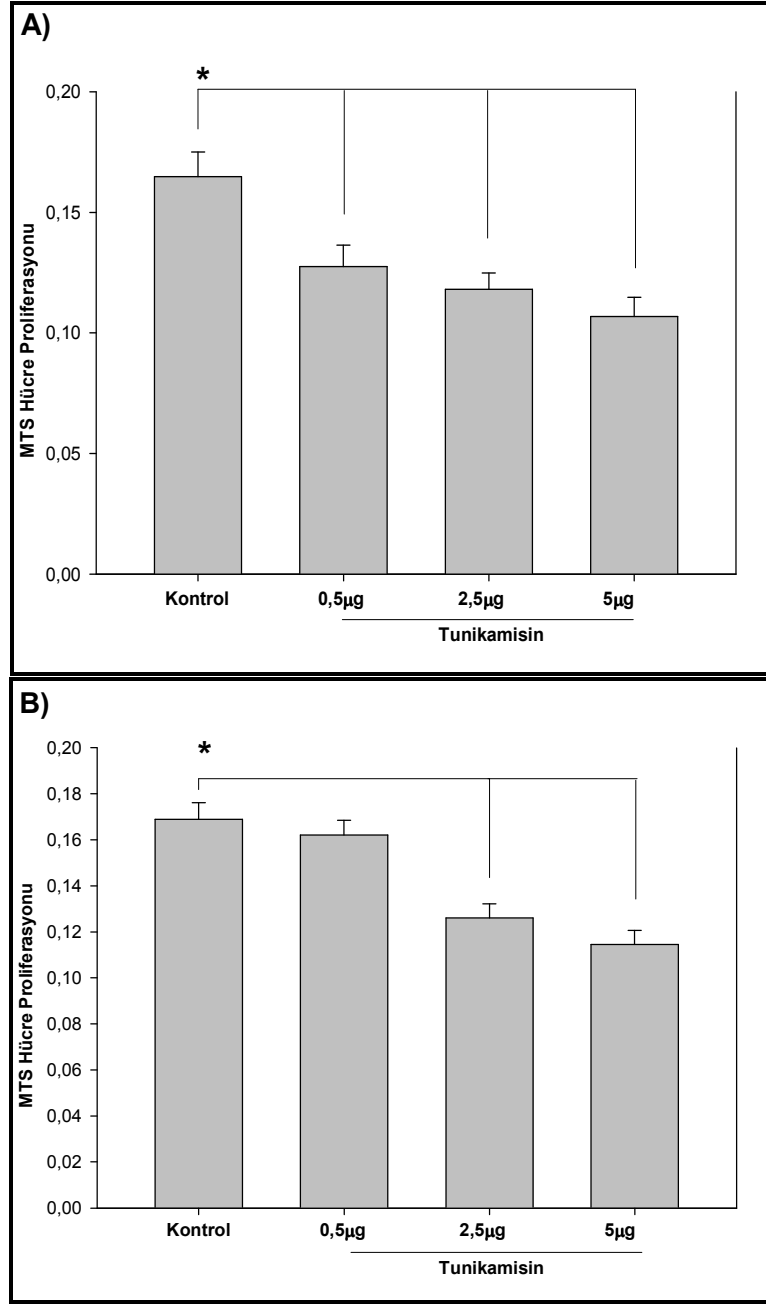
dönemde izlenen BİP immunoreaktivitesi geç sekresyon fazına göre anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 10; D ve F).



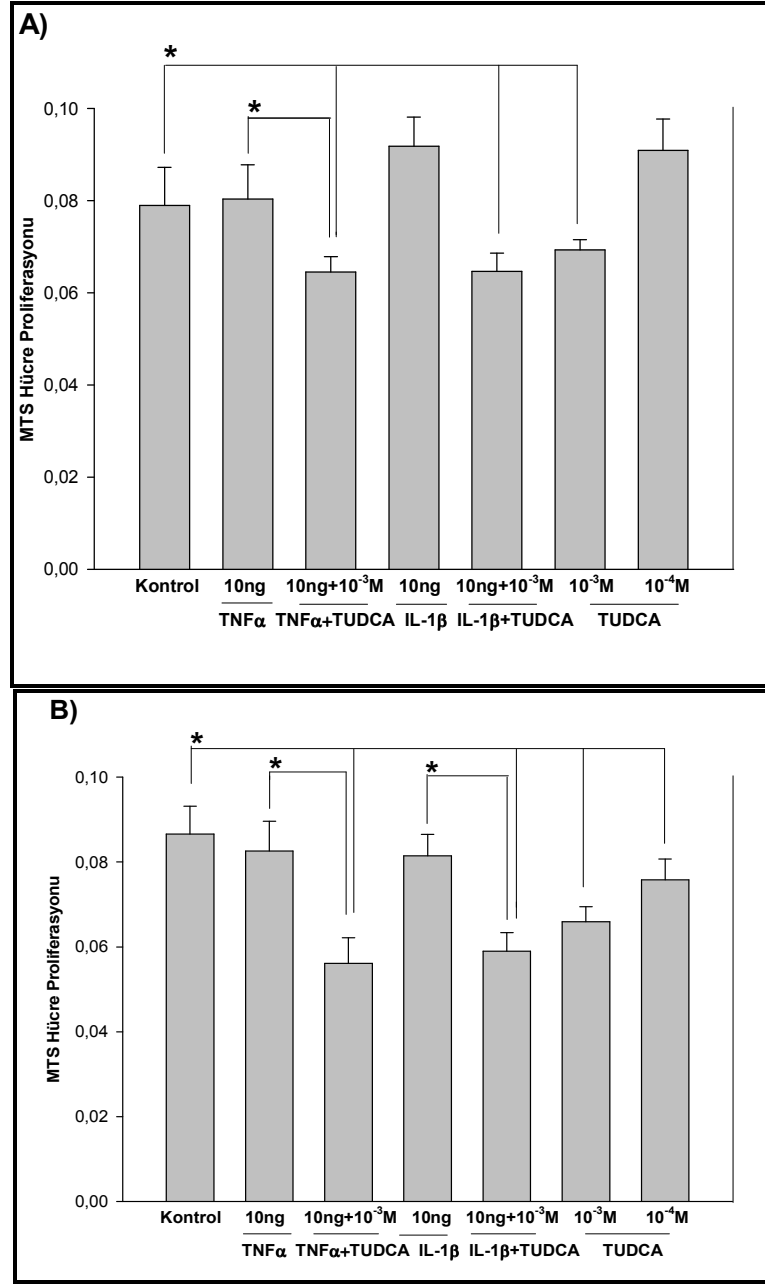
Şekil 11. Menstrual siklus boyunca endometriyal doku ve erken gebeliğe ait desidual doku endotel hücrelerinde BİP immunoreaktivitesinin HSCORE değerlendirilmesi. (EP: Erken proliferasyon; MP: Orta proliferasyon; LP: Geç proliferasyon; ES: Erken sekresyon; MS: Orta sekresyon; LS: Geç sekresyon) * $p < 0,05$ geç sekresyon fazına kıyasla erken gebelik, orta sekresyon ve geç proliferasyon fazlarındaki anlamlı azalımı.

4.2. HEEC proliferasyonu üzerine Tunikamisin, TUDCA ve inflamatuvar sitokinlerin etkisi

Doz bağımlı olarak tunikamisin (0,5-2,5-5 μ g), TUDCA (10^{-3} - 10^{-4} M), TNF- α (10ng) ve IL-1 β (10ng) nın HEEC proliferasyonu üzerine etkisi MTS kolorimetrik hücre proliferasyonu kiti kullanılarak araştırıldı. HEEC tunikamisin, TUDCA ve inflamatuvar sitokinlerle 24 ve 48 saat inkübe edildi. Tunikamisin 24 ve 48 saat sonunda doz bağımlı olarak HEEC proliferasyonunu azalttı (Şekil 12 A, B). IL-1 β kontrole göre artış gösterirken TUDCA ile birlikte verildiğinde, TUDCA IL-1 β 'nin proliferatif etkisini ortadan kaldırdı (Şekil 12 A). Diğer taraftan TNF- α 'nın HEEC proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi yoktu.



Şekil 12 A, B. Tunikamisinle uyarılan HEEClere hücre proliferasyonu. Tunikamisin 24 saat (**A**), ve 48 saat (**B**) sonunda HEEClere üzerindeki antiproliferatif etkisi izlenmekte. Barlar her grup için 12 farklı değerin ortalama $\pm$ SEM değerlerini göstermektedir. Kontrole kıyasla tunikamisinde anlamlı azalma doz bağımlı olarak saptandı. * $p < 0.05$

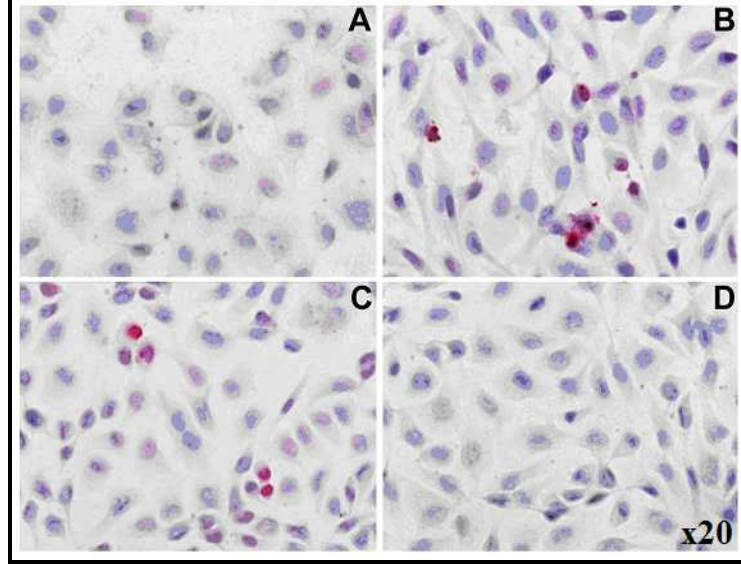


Şekil 13 A-B. TUDCA, TNF- α ve IL-1 β ya cevap olarak HEEClerde hücre proliferasyonu. Hücreler TNF- α ve IL-1 β , Tnf- α ve IL-1 β nın TUDCA'lı kombinasyonu ile 24 saat (A), ve 48 saat (B) uyarıldılar. Kontrole kıyasla TUDCA sitokinlerle birlikte verildiğinde sitokinlerin etkisini anlamlı olarak azalttı. Barlar her grup için 12 farklı değerin ortalama $\pm$ SEM değerlerini göstermektedir. *p<0.05

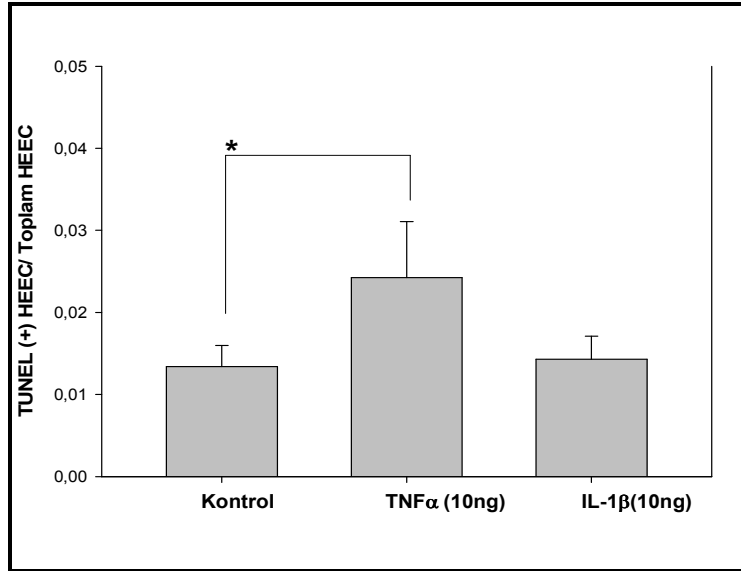
4.3. HEEC'lerde TUNEL ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi

İnflamatuvar sitokinlerin HEEClerde apoptoza yol açıp açmadığını araştırmak için TUNEL tekniği kullanıldı. HEECler daha önceki hücre kültürü deneylerimize paralel olarak 48 saat boyunca TNF- α ve IL-1 β ile uyarıldılar. 48 saat sonunda %4'lük paraformaldahit ile fiks edilen hücreler akabinde. 48 saat boyunca TNF- α uygulaması HEEClerde apoptotik

hücre oranını kontrole kıyasla anlamlı olarak 2-kattan daha fazla arttırdı. Buna karşın 48 saat IL-1 β ile uyarılmış HEECLer ile kontrol grubu arasında apoptotik hücre oranı açısından anlamlı fark bulunamadı (Şekil 14 ve 15).



Şekil 14 A-D. İnflamatuvar sitokinlerle 48 saat kültüre edilen HEECLerde TUNEL işaretlenmesi. A, Kontrol; B, TNF- α ; C, IL-1 β ; D, Negatif. Kırmızı renkli hücre çekirdekleri apoptoza giden TUNEL pozitif hücreleri, mavi renkli hücre çekirdekleri ise hematoksilenle boyanmış TUNEL negatif hücreleri temsil etmektedir.

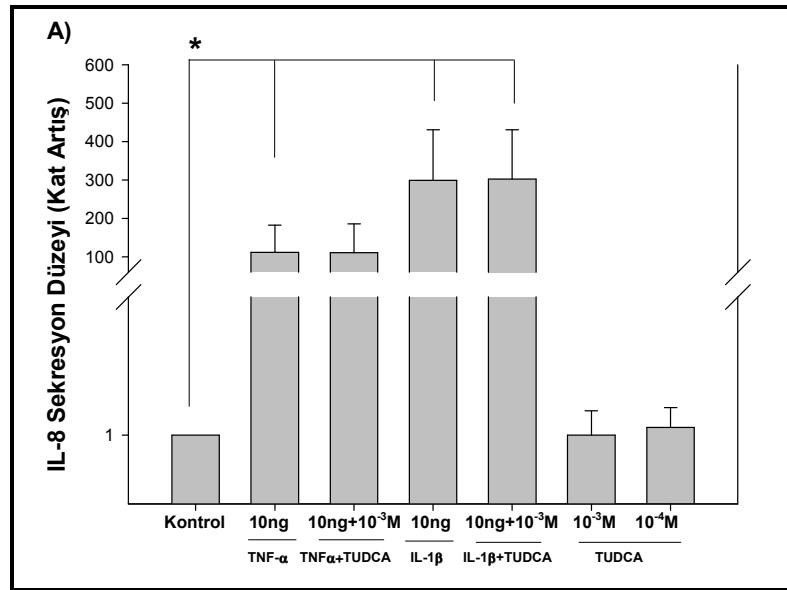


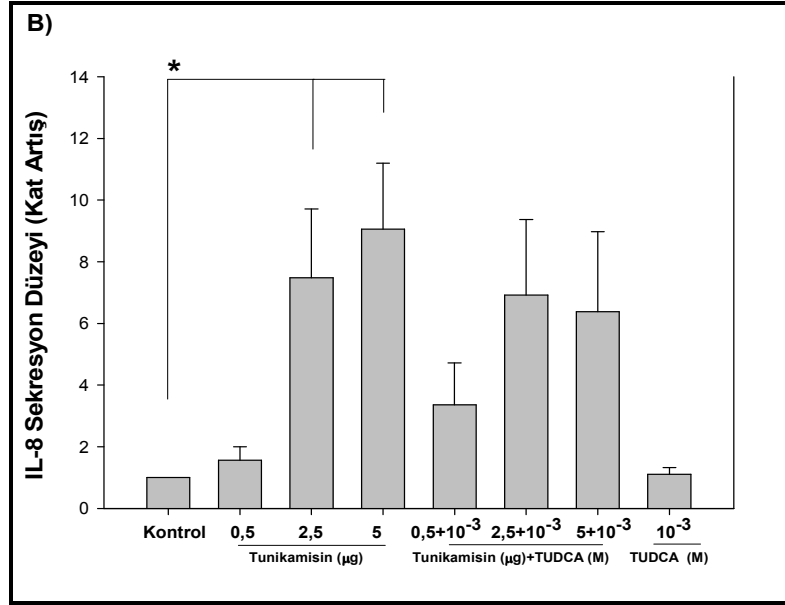
Şekil 15. HEECLerin TNF- α (10 ng) ve IL-1 β (10 ng) ile 48 saat uyarılması sonunda TUNEL(+) HEECLerin toplam HEECLere oranı. *p<0,05

4.4. HEEC’de IL-8 sekresyonunun inflamatuvar sitokinler, Tunikamisin ve TUDCA ile düzenlenmesi

HEEClerin yüksek BİP seviyesinde inflamatuvar cevabını araştırmak için, bu hücrelerden kültür ortamında salgılanan IL-8 seviyesi ELİSA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Konsantrasyon bağımlı olarak TUDCA (10^{-3} - 10^{-4} M), doz bağımlı olarak tunikamisin (0,5-2,5-5 μ g), TNF- α (10ng) ve IL-1 β (10ng) ile 48 saat uyarılan HEEClerin kültür ortamlarında IL-8 seviyesi araştırıldı. TNF- α ve IL-1 β uygulamaları IL-8 seviyesini anlamlı olarak arttırırken TUDCA’nın TNF- α ile kombinasyonu, TNF- α nın IL-8 seviyesini arttırıcı etkisini anlamlı düzeyde baskıladı. Ayrıca IL-1 β ile olan TUDCA kombinasyonu IL-1 β nın IL-8 seviyesini arttırıcı etkisi üzerinde ilave bir artış veya azalış sağlamadı. TUDCA tek başına verildiğinde ise kontrole kıyasla IL-8 seviyesine etkisi görülmedi (Şekil 16 A).

HEEClerin tunikamisin ile 48 saat boyunca uyarılması sonunda doz bağımlı olarak IL-8 sekresyonunu anlamlı olarak arttırdığı saptandı. Ayrıca HEEClerin tunikamisin ve TUDCA ile birlikte uyarılması sonucunda, tunikamisinin HEEClerdeki IL-8 sekresyonunu arttırıcı etkisinin anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. TUDCA yalnız başına verildiğinde ise IL-8 seviyesinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 16 B).

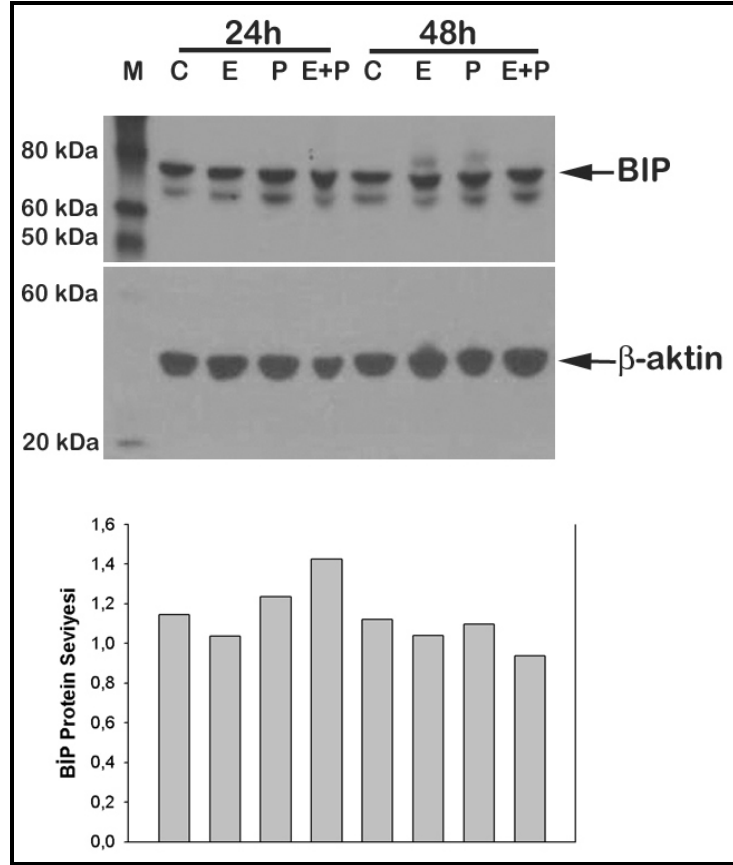




Şekil 16 A,B. HEEClerde IL-8 sekresyonunun ELİSA ile gösterilmesi. Hücreler TNF- α ve IL-1 β ile TUDCA'nın bu sitokinlerle kombinasyonu ile (A), doz bağımlı olarak tunikamisin ve tunikamisin TUDCA'lı kombinasyonu ile (B) 48 saat uyarıldılar. Barlar IL-8 seviyesini pg/ml olarak göstermektedir. *p<0.05

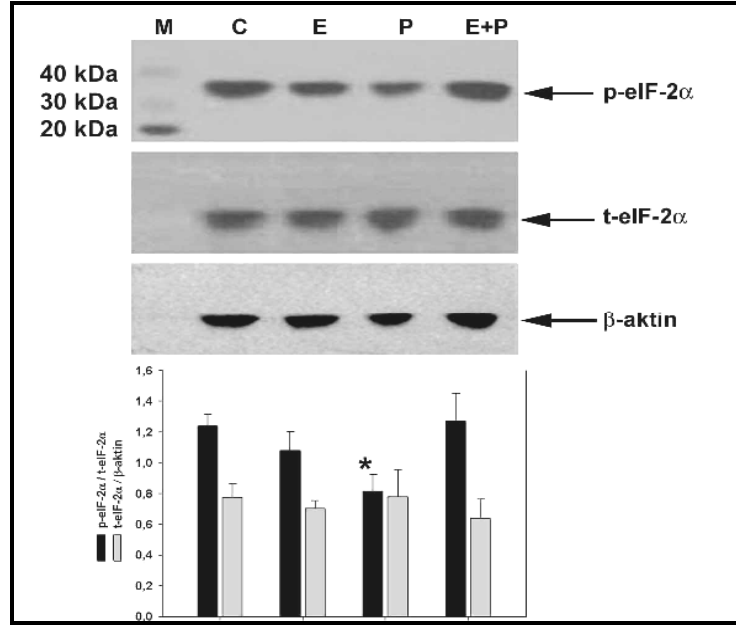
4.5. HEEC'lerde BİP ve eIF-2 α proteininin ovaryum hormonları ve sitokinler tarafından düzenlenmesi

In vivo bulgularımızla ortaya çıkardığımız endotel hücrelerindeki BİP ekspresyonundaki değişimlerin menstrual siklusun temel düzenleyici hormonları östrojen ve progesteronun etkisine bağımlı olup olmadığını anlamak için insan endometriyumundan izole ettiğimiz endotel hücrelerinde BİP'in protein seviyesine ovaryum steroidlerinin etkisini Western blot tekniği kullanılarak araştırıldı. HEEClerin 24 saat ve 48 saat östradiol ve progesteron ile tek başlarına veya birlikte uygulanması, HEEClerin BİP seviyesinde kontrole kıyasla anlamlı düzeyde değişim ortaya çıkarmadı (Şekil 17).



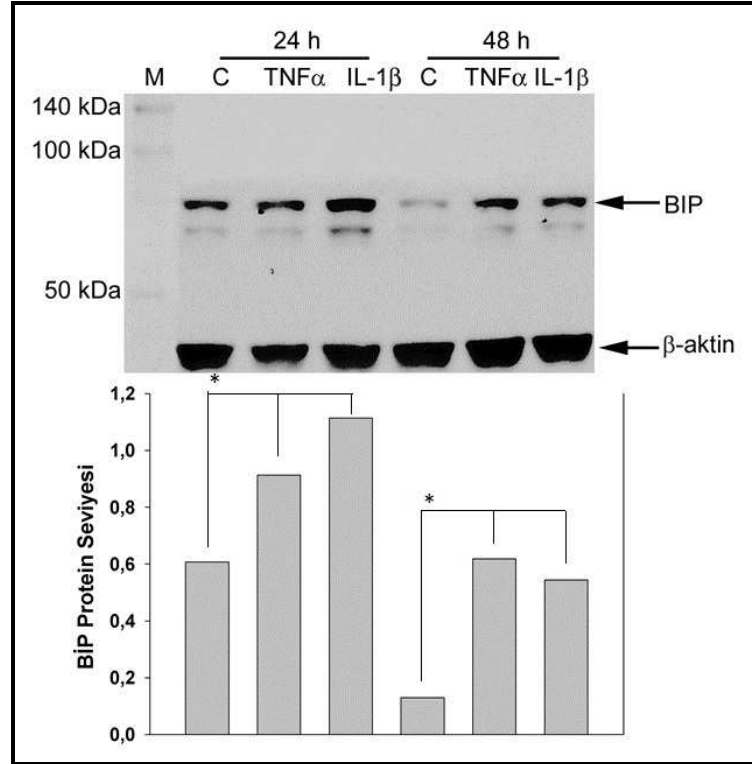
Şekil 17. BİP protein seviyesinin ovaryum steroidleri östrojen ve progesteron tarafından regülasyonu. C, kontrol; E, östrojen (10^{-8} M); P, progesteron (10^{-7} M); E+P, östrojen (10^{-8} M) + progesteron (10^{-7} M).

Endotel hücrelerindeki eIF-2 α ekspresyon ve fosforilasyon seviyesindeki değişimlerin menstrual siklusun temel düzenleyici hormonları östrojen ve progesteronun etkisine bağımlı olup olmadığını anlamak için insan endometriyumundan izole ettiğimiz endotel hücrelerinde eIF-2 α 'nın protein seviyesine ve fosforilasyonuna etkileri Western blot tekniği kullanılarak araştırıldı. HEECLerin 24 saat östrojen ile tek başına veya progesteron ile birlikte uygulanması, HEECLerde eIF-2 α seviyesinde ve fosforilasyon düzeyinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişim ortaya çıkarmadı (Şekil 18). Buna karşın, tek başına progesteron uygulaması HEECLerde eIF-2 α seviyesini değiştirmez iken, eIF-2 α 'nın fosforilasyon seviyesini anlamlı düzeyde azalttı (Şekil 18).



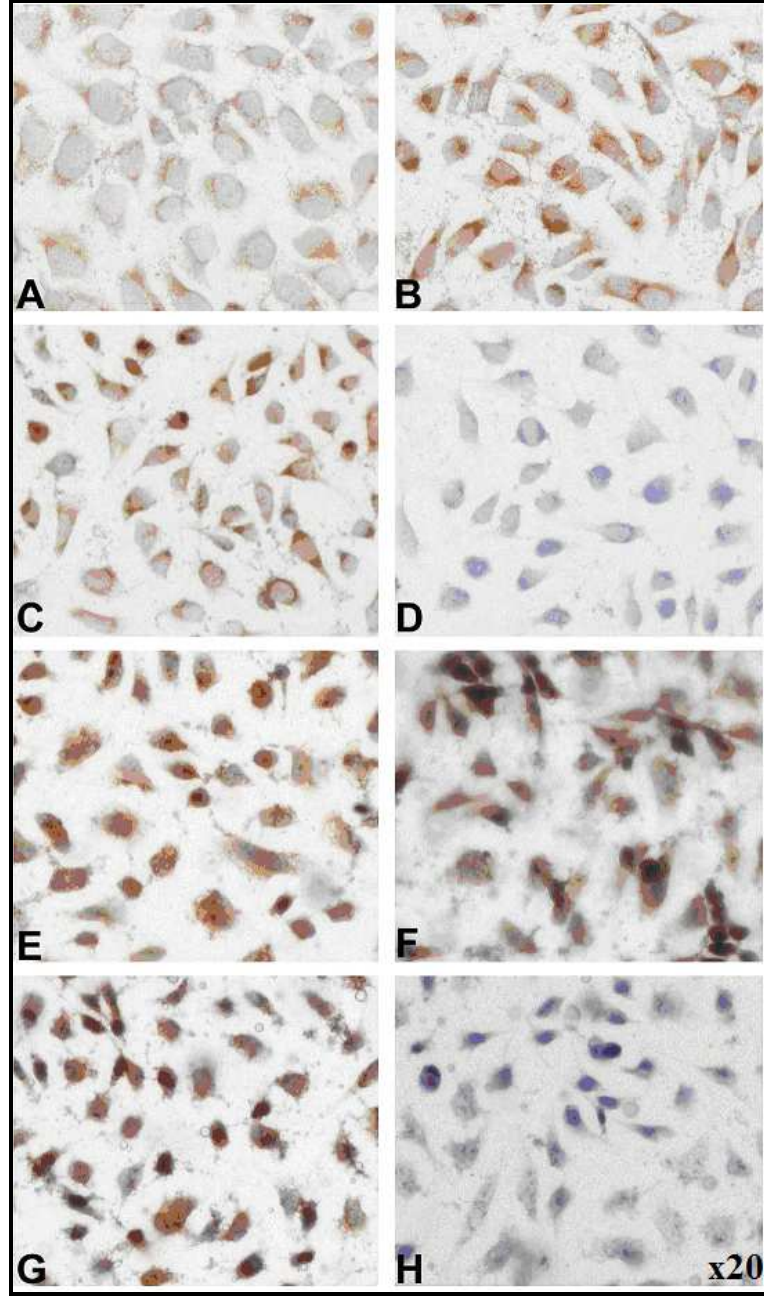
Şekil 18. eIF-2α protein seviyesinin östrojen ve progesteron tarafından regülasyonu. C, kontrol; E, östrojen (10^{-8} M); P, progesteron (10^{-7} M); E+P, östrojen (10^{-8} M) + progesteron (10^{-7} M). * $p < 0.05$ progesteron ile uyarılmış HEECler, kontrol, östrojen ve östrojen+progesteron ile uyarılmış HEECler ile kıyaslandığında.

Sitokinlerin insan endometriyal endotel hücrelerinde BİP protein seviyesi üzerinde etkisini araştırmak için izole ettiğimiz endotel hücreleri kültürde çoğaltıldı. HEEClerin TNF-α (10 ng) ile 24 ve 48 saat uyarılması sonunda BİP seviyesi kontrole göre artış gösterdi. Benzer olarak IL-1β (10 ng) ile 24 ve 48 saat uyarılmış HEEClerde BİP seviyesi kontrole göre anlamlı olarak artış gösterdi (Şekil 19).



Şekil 19. HEEClerde BİP varlığının inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenmesi. HEEClerin TNF α ve IL-1 β ile 24 saat ve 48 saat uyarılması sonunda BİP ekspresyonu. *p<0.05

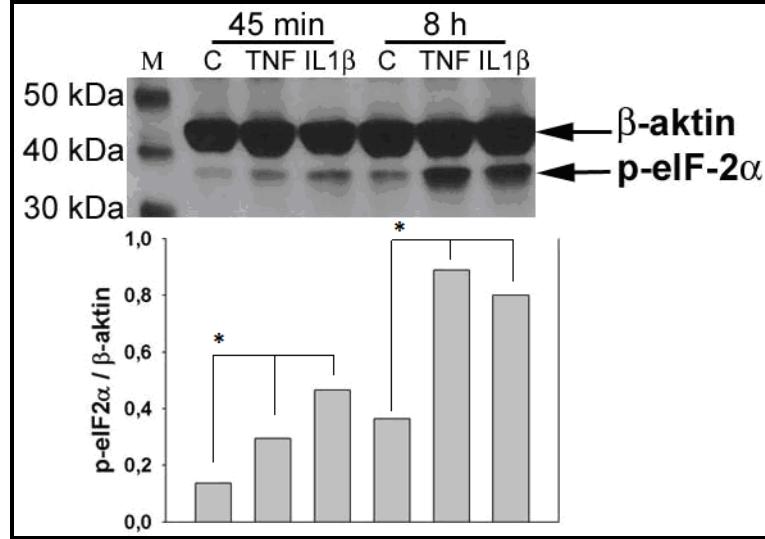
İnflamatuvar sitokinlerle *in vitro* uyarılan HEEClerde BİP immunositokimya tekniği ile boyanıp pozitiflik şiddetlerine göre değerlendirildi. 24 ve 48 saat boyunca TNF- α ve IL-1 β ile uyarılan HEEClerde sırasıyla hem BİP pozitif boyanma şiddeti hem de BİP pozitif hücre sayısını kontrole kıyasla arttırdığı gözlemlendi (Şekil 20. A-H).



Şekil 20. A-G. TNF- α ve IL-1 β uyarılmış HEEClerde BİP ekspresyonu. **(A-D)** 24 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEEClerde BİP immunoreaktivitesi izlenmekte **A**, Kontrol; **B**, TNF- α ; **C**, IL-1 β ; **D**, Negatif; **(E-H)** 48 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEEClerde BİP pozitifliği izlenmekte. **E**, Kontrol; **F**, TNF- α ; **G**, IL-1 β ; **H**, Negatif.

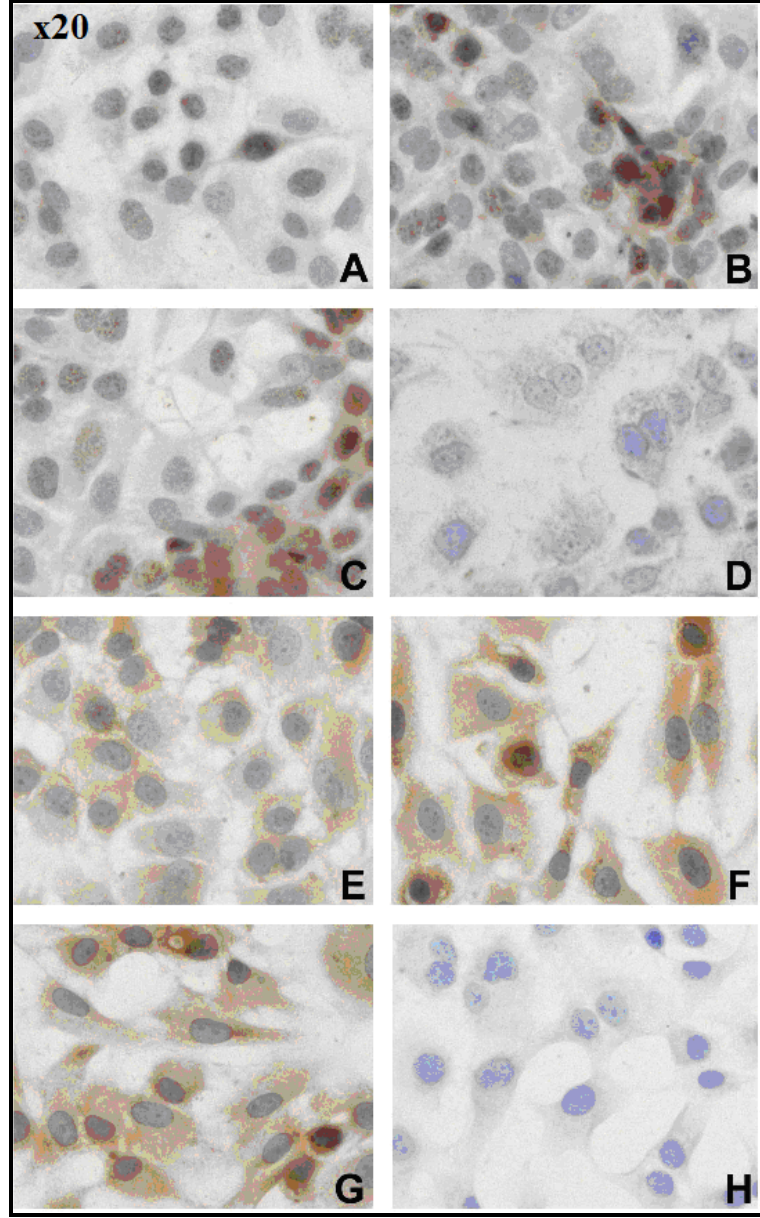
Sitokinlerin insan endometriyal endotel hücrelerinde fosfo eIF-2 α protein seviyesi üzerinde etkisini araştırmak için izole ettiğimiz endotel hücreleri kültürde çoğaltıldı. HEEClerin TNF- α (10 ng) ile 45dakika ve 8 saat uyarılması sonunda fosfo eIF-2 α seviyesi kontrole göre artış gösterdi.

Benzer olarak IL-1 β (10 ng) ile 45 dakika ve 8 saat uyarılmış HEEClerde de fosfo eIF-2 α seviyesi kontrole göre anlamlı olarak artış gösterdi (Şekil 21).



Şekil 21. HEEClerde fosfo eIF-2 α varlığının inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenmesi. HEEC'lerin TNF- α ve IL-1 β ile 45 dakika ve 8 saat uyarılması sonunda fosfo eIF-2 α ekspresyonu. M, Marker; C, Kontrol; TNF, TNF- α ; p-eIF-2 α , Fosfo eIF-2 α , 45 min, 45 dakika; 8h, 8 saat. *p<0,05

İnflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEEClerde fosfo- ve total-eIF-2 α seviyesindeki değişimler immunositokimya tekniği kullanılarak değerlendirildi. HEECler daha önceki hücre kültürü deneylerimize paralel olarak 8 saat boyunca TNF- α ve IL-1 β ile uyarıldılar. İmmunositokimya boyamalarında, TNF- α ve IL-1 β ile uyarılan HEEClerde hem eIF-2 α 'nın fosforilasyon seviyesinin hem de fosfo-eIF-2 α pozitif hücre sayısının kontrole kıyasla arttığı gözlemlendi (Şekil 22. A-D). Diğer taraftan, total- eIF-2 α 'nın immunoreaktivitesinde gruplar arasında belirgin bir fark yoktu (Şekil 22. E-H).



Şekil 22 A-G. HEEClerin $\text{TNF}\alpha$ ve $\text{IL-1}\beta$ ile 8 saat uyarılması sonunda fosfo- ve total-eIF-2 α pozitifliği. **(A-D)** 8 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEEClerde fosfo-eIF-2 α pozitifliği izlenmekte. **A**, Kontrol; **B**, $\text{TNF-}\alpha$; **C**, $\text{IL-1}\beta$; **D**, Negatif; **(E-F)** 8 saat inflamatuvar sitokinlerle uyarılan HEEClerde eIF-2 α pozitifliği izlenmekte. **E**, Kontrol; **F**, $\text{TNF-}\alpha$; **G**, $\text{IL-1}\beta$; **H**, Negatif.

5. TARTIŞMA

Menstrual siklus ve gebelik boyunca uterusun uğradığı hücresel ve moleküler değişiklikler, insan vücudundaki fizyolojik ve patolojik birçok olayın anlaşılması açısından önemli bir role sahiptir. Endometriyum, her siklusta yenilenmesi ve gebelik durumunda semi-allojenik embriyoyu kabullenip ona yataklık yapabilmesi için geçirdiği değişiklikler açısından insan vücudunun en dinamik dokularından birisidir. İnsan endometriyumu menstrual siklus süresince proliferasyon, anjiyogenez, anjiostaz ve apoptoz gibi temel hücresel mekanizmaları kullanarak her 28 günde bir tekrarlayan doku yenilenmesi ve büyümesi ve gerilemesini gerçekleştiren tek dokudur. İnsan endometriyumunda bu temel hücresel mekanizmalar gerçekleşirken temel olarak iki ana steroid hormon östrojen ve progesteron tarafından yönlendirilir. Her iki hormon ovaryumda granuloza hücreleri ve korpus luteum tarafından üretilir. Bu iki hormon dışında, endometriyum lokal büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler, anjiyogenik moleküller ve lökosit trafiğini kontrol eden kemokinler (IL-8, MCP-1 gibi) tarafından da direkt olarak veya indirekt olarak düzenlenmektedir (83).

İnsan endometriyumu doku yenilenmesi süresince endotelial hücrelerin yeniden yapılanmasına bağlı olarak anjiyogeneze ve mestruasyon süresince gelişen endometriyal inflamasyonun kontrolü altında bir anjiostaza ihtiyaç duyar. Anjiostaz spiral arter kasılması sonucunda avaskularizasyon ve yetersiz doku oksijenlenmesine bağlı olarak doku dökülmesine yol açar. Temel amacımız insan endometriyal endotel hücrelerinde her siklus boyunca meydana gelen fizyolojik anjiyogenez ve inflamasyon bağımlı anjiostaz sürecinde endoplazmik retikulumda regüle edilen protein sentez ve olgunlaştırıcı sinyal yollarının (UPR) rolünü araştırmaktır. Strese neden olan bir çok farklı faktör ve fizyolojik şartlar ER’da katlanmamış protein birikimine neden olabilir ve UPR yolağındaki ER yerleşimli transmembran proteinleri indükleyebilir (84, 85). Son günlerde ER stresinin nörodejenaratif hastalıklar (86, 87), bipolar bozukluk (88, 89), diabetes mellitus (90, 91), inflamasyon (92, 93) ve iskemi (94, 95) gibi bir çok hastalıkta rol aldığı iyi bilinmektedir. Bu anlamda tezimizde endometriyumda, ER stresine bağlı UPR sinyalinin temel proteini BİP’in değişiklikleri incelendi.

BİP ER lümeninde yer alan Ca^{2+} -bağımlı bir şaperon proteindir. BİP ER lümeninde uygun protein katlanması, katlanmış proteinlerin bu aşamada kalması ve katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin proteozomal degradasyonun gerçekleşmesinden sorumludur (96). ER

protein sentez ihtiyacı, sekresyon artışı ile paralel olarak artmaktadır. Bununla birlikte, BİP ER lümeninde Ca^{2+} depolanmasında ve dolayısıyla hücre içi Ca^{2+} homeostazında da görev almaktadır (97). Hücre içi kalsiyum sinyali birçok hücrel olayın önemli düzenleyicisi ve BİP ile düzenlenmesinde birçok hücrel süreci etkilemektedir. İnsan endometriyumunda BİP'in spesifik fonksiyonu bilinmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda tespit ettiğimiz BİP ekspresyonunun, menstrual siklus boyunca endotel hücrelerdeki varlığı ve siklus bağımlı değişimler geçirmesi, endotelyal hücrelerde protein katlanmasının kontrolü, intraselüler Ca^{2+} dengelenmesi ve katlanamamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı vasıtasıyla endometriyal anjiyogenez ve anjiostazın ER ilişkili moleküler mekanizmalarında rol aldığı düşüncemizi desteklemektedir. BİP aracılı UPR aktivasyonunun fizyolojik kontrolü sonucu hücrel stresi engellemektedir, beraberinde de anjiyogenez ve yeni damar yapılanmasına bağlı olarak endometriyal doku büyümesini ve homeostaz devamlılığının sağlanmasına katkıda bulunduğu söylenebilir.

İn vivo bulgularımızda saptadığımız insan endometriyal endotel hücrelerinde BİP seviyesi menstrual siklus boyunca siklus bağımlı değişimleri hücre kültürü deneylerimizin sonuçlarına dayanarak östrojen ve progesteronun direkt olarak etkisi altında olmadığını önermektedir. Burada bir diğer konu ise uzun süre östrojen ve progesteron ile uyarılmış endometriyal hücrelerin daha sonra bu hormonların ortamdaki uzaklaştırılması sonucunda BİP seviyesinin nasıl değişeceğinin ve UPR sinyal yolağının aktive olup olmayacağını araştırılmasıdır.

Endometriyum fizyolojisi ve patolojisinde endotel hücreleri son yıllardaki araştırmalarda oldukça önem kazanmaktadır (98). Endotel hücrelerinin fonksiyonları ile ilgili detaylı çalışmalar *in vitro* kültür tekniklerinin gelişmesiyle mümkün olmuştur. Kan ve damar duvarı arasında bulunan endotel hücrelerinin birçok önemli fonksiyonu vardır (99). Bu anlamda endometriyal dokuya siklus boyunca değişen tip ve oranlarda lökosit geçişinin kontrol eden endotel hücreleri seçici bir bariyer olarak kabul edilebilir. Ayrıca küçük moleküllerin sıvıların ve çözünmüş maddelerin kontrollü olarak pinozitik veziküller içinde dokulara geçmesinde seçici geçirgen bir bariyer olarak görev alırlar (100). İmmün cevabın düzenlenmesinde de görevli olan endotel hücreleri IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinleri ve MHC moleküllerini sentezler (101). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki inflamatuvar sitokinlerin en yüksek olduğu faz geç sekretuar fazıdır. Bu fazda TNF- α IL-1 β IL-8 gibi inflamatuvar ve kemotaktik sitokinlerin ekspresyonu anlamlı derecede artmaktadır. Bizde bu bilgi paralelinde çalışmamızda menstrual siklusun farklı

fazlarından alınan insan endometriyal doku kesitlerinde endojen BİP ekspresyonun siklus bağımlı değişimini tespit etmek için endotel hücreleri immunohistokimya boyamaları takiben HSCORE analizi ile değerlendirildi. HSCORE analizlerimiz sonucunda ortaya çıkan BİP ekspresyonunun geç sekresyon fazında olması yine bu dönemde oldukça yüksek olan endometriyal doku inflamasyonundan ve artmış olan inflamatuvar sitokinlerin etkisinden kaynaklanabilir. Ayrıca BİP ekspresyonunun bu fazda yüksek olması UPR aracılı sinyal yolağının bu dönemde en yüksek seviyede olduğunu düşündürmektedir. Bu bir anlamda kontrol edilemeyen endometriyal endotel hücrelerinde ki UPR sinyal yolağının endotel hücre apoptozunu tetikleyebileceğini desteklemektedir. Daha önceki çalışmalarda (102,103) bu faza ait endometriyal endotelyal hücrelerinde apoptozun arttığının gösterilmiş olması, endotel hücrelerinde UPR sinyalinin sürekli aktivasyonu ile artan apoptoz ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Orta sekresyon fazı implantasyon penceresini içeren; anjiyogenez ve vaskülogenezin yüksek oranda gerçekleştiği faz olması nedeniyle bu fazda BİP ekspresyonunu en düşük seviyede görmekteyiz. Bu faz ayrıca endometriyumun gelişmekte olan embriyoya yataklık edebilecek kapasitayı kazandığı faz olması nedeniyle önemlidir. Orta sekresyon fazı HEEClerinde BİP seviyesinin en düşük seviyede olması UPR sinyalinin fizyolojik olarak implantasyon fazında baskılandığını ve bunun da endometriyal dokunun reseptif özelliğini kazanabilmesi için gerekli olduğunu önermektedir. Buna paralel olarak, erken gebelik desidual dokularında yapılan HEEClerdeki BİP seviyesinin de orta sekresyon fazındaki gibi oldukça düşük seviyede olması bu yaklaşımımızı desteklemektedir.

Daha önce yayınlanan birçok immunohistokimyasal çalışmada heat shock (HSP70) ailesine ait proteinlerin insan endometriyumundaki siklus bağımlı olarak değiştiği gösterilmiştir (104,105). HSP70 protein ailesinin bir üyesi olduğu dikkate alındığında endometriyal dokudaki dağılımına paralel olarak hücre yaşamını devam ettirebilir ve böylece vasküler yapının devamlılığına katkıda bulunur.

Protein sentezi üzerine genel bir etkisi olmaksızın protein glikozilasyonunu tamamen inhibe etme yeteneğine sahip olması nedeniyle tunikamisin *in vivo* da ve biyolojik deneylerde yoğun olarak kullanılan hücre döngüsü üzerine de etkin bir antibiyotiktir (106). Hücre kültürü proliferasyon deneylerimizde insan endometriyal endotel hücrelerinin UPR sinyalinin tetikleyici olarak kullandığımız tunikamisinle 24 ve 48 saat uyarılması sonucunda, doz bağımlı olarak hücre

sayısının azalması, tunikamisinle aktive olan UPR sinyalinin HEEClerde proliferasyonun yavaşlamasına bağlı olabileceğini veya alternatif olarak HEEClerde artan apoptozun sonucunda olabileceğini düşündürmektedir. UPRnin apoptozu tetiklediği yönündeki bulgular daha önceki çalışmalarda yayınlanmıştır. ER’de hatalı katlanmış veya katlanmamış protein birikimine ERAD ve UPR yolları ile yanıt verilmeye çalışılsa da hatalı katlanmış protein miktarının çok fazla olması durumunda strese karşı verilen yanıtlar yetersiz kılabilmektedir. Böyle bir durumda ER stresi apoptozu tetiklemektedir. ER stresi sonunda oluşan apoptoz hem mitokondri-bağımlı hem de bağımsız yollardan uyarılabildiği bildirilmiştir (107).

İnflamatuvar sitokinler ve UPR inhibitörü olması aynı zamanda da hücre ölümünü engelleme özelliğinden dolayı TUDCA (108) ile 24 ve 48 saat uyardığımız insan endometriyal endotel hücrelerinde proliferasyon deneylerimiz sonucunda TUDCA’nın inflamatuvar sitokinlerin etkisini, UPR yolağının inaktivasyonunu sağlayarak anlamlı olarak azalttığını gördük. Özcan ve arkadaşları TUDCA’nın UPR’ı düzenleyici etkisini çalışmalarında göstermiştir (106). İnden ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada kimyasal şaperon ailesinden olan TUDCA’nın beyinde ER stresini azalttığını göstermiştir (109).

ER lümeninde katlanamamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimine sebep olan inflamatuvar sitokinler gibi bir takım patolojik koşullar ER stresine neden olur ve stres koşulları ile başa çıkabilmesi için UPR’ı tetikler. Daha önceki çalışmalar göstermektedir ki TNF- α ve IL-1 β apoptoz tetikleyerek kaspaz-3’ün aktif hale gelmesini, mitokondriyal porların açılmasını, Ca akımı ve sitokrom C’nin sitozole yeniden dağıtımını sağlayarak hücreleri apoptozla götürür (110). Bizim TUNEL sonuçlarımızda inflamatuvar sitokinlerle uyarılmış HEEClerde apoptotik hücre sayısının kontrole kıyasla artması, *in vivo* datalarımızda geç sekresyon fazında gördüğümüz yüksek UPR aktivitesinin artmış apoptozla olan ilişkisinin *in vitro* kanıtı olarak söyleyebiliriz.

Sitokinler immün sistemi, inflamasyonu ve hematopoezi regüle etmek için salınan proteinlerin genel adıdır. Daha önceleri, lökositler tarafından üretilen sitokinlerin (interlökinler olarak ta adlandırılmışlardır) şimdilerde vücudumuzdaki birçok hücre tarafından üretildiği bilinmektedir. Sitokinler bir immün stimulasyona cevap amacıyla her defasında yeniden üretilmek zorundadır ve etkilerini hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler (111). Dokuda inflamasyon durumlarında belirgin olarak artan IL-1 β ve TNF- α inflamatuvar sitokinler olarak anılmaktadırlar. Ayrıca IL-1 β ve TNF- α endotel hücrelerindeki

polimorfonükleer lökositlerin yapışmasını sağlayacak molekülleri regüle eder. IL-8 ise polimorfonükleer lökositler için kemotaktiktir. Çalışmamızda TNF- α ve IL-1 β 'nın endotel hücrelerinden salgılanan IL-8 sekresyonu anlamlı olarak arttırması, gerek endometriyal bez hücrelerinden, gerekse endometriyal stromal hücreler ve endometriyal lökositlerden salgılanan inflamatuvar sitokinlerin parakrin etkisi ile veya endotel hücrelerinin otokrin etkisi ile de endometriyal inflamasyona katılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan UPR sinyal yolağının inhibitörü olan TUDCA ile birlikte verildiğinde TNF- α aracılı artan IL-8 sekresyonun kontrole göre istatistiksel anlamlılığını ortadan kaldırmış olması bize endometriyal endotel hücrelerinde IL-8 sekresyonunun UPR ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan HEEClerde artan IL-1 β aracılı IL-8 sekresyonunun TUDCA ile herhangi bir değişikliğe uğramaması IL-1 β aracılı IL-8 artışı ile UPR sinyal yolağı arasında direkt bir moleküler etkileşim olmadığını önermektedir.

UPR sinyal yolağının PERK aracılı aktivasyonunun alt basamağında rol oynayan ökaryotik başlatıcı faktör-2 α (eIF-2 α)'nın endometriyal endotel hücrelerindeki düzenlenmesi de bu çalışmada araştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre eIF-2 α 'nın total seviyesi gerek ovaryum steroidleri gerekse inflamatuvar sitokinler tarafından etkilenmemektedir. Bu sonuçlarımız hem Western blot tekniği hem de immunositokimya teknikleri ile desteklenmiştir. Diğer taraftan bu proteinin fosforilasyon seviyesinin TNF- α ve IL-1 β ile belirgin olarak arttırdığı bulunmuştur. Bu bulgumuz BİP aracılı UPR sinyal yolağındaki aktivasyonlardan birinin PERK üzerinden eIF-2 α fosforilasyonu ile gerçekleştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak insan endometriyal endotel hücrelerindeki endoplazmik retikulumdaki UPR sinyal yolağından sorumlu ana protein BİP'in seviyesi menstrual siklus boyunca istatistiksel olarak anlamlı değişimler geçirmektedir. İn vivo BİP seviyesindeki bu siklik değişimlerin östrojen ve progesteronun direkt olarak etkisi altında olmadığı gösterilmiştir. Buna ilaveten UPR sinyal yolağının aktive edilmesine bağlı olarak endotel hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı ve apoptozun arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, inflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-1 β 'nın HEEClerde BİP seviyesini ve eIF-2 α fosforilasyonunu arttırarak UPR sinyal yolağına katıldığı ve IL-8 sekresyonun düzenlenmesinde rol aldığını söyleyebiliriz. Bu tezin sonuçlarına dayanarak UPR yolağının endometriyozis gibi endometriyal hastalıklarının patogenezindeki rollerinin belirlenmesinin birçok endometriyal hastalığın yeni tedavi yöntemleriyle tedavi edilmesine katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez boyunca endometriyum dokusunda ve insan endometriyal endotel hücrelerinde elde edilen sonuçları maddeler halinde özetlemek gerekirse;

1. İn vivo BİP immünreaktivitesinin menstrual siklusun geç sekresyon fazında en yüksek seviyede, orta sekresyon fazında ve erken gebelik döneminde ise en düşük seviyede olduğu,
2. İnsan endometriyum endotel hücre proliferasyonunun UPR uyarılması ile doz bağımlı azaldığı,
3. İnsan endometriyum endotel hücrelerinde TNF- α 'nın apoptotik etkisinin UPR sinyal yolağı ile ilişkili olduğu,
4. UPR aktivasyonunun IL-8 sekresyonunu arttırdığını ve UPR sinyalinin TUDCA ile inhibisyonuna bağlı olarak TNF- α aracılı bu etkinin ortadan kalktığı,
5. Hem TNF- α hem de IL-1 β HEECLerde BİP ve fosfo-eIF-2 α protein seviyesini arttırdığı,
6. TNF- α ve IL-1 β ile uyarılan HEECLerde hem BİP immünreaktivitesinin şiddetinin hem de BİP pozitif hücre sayısının kontrolle kıyasla arttığı,
7. Ovaryan steroidler BİP ve eIF-2 α protein seviyesinde bir değişikliğe neden olmazken eIF-2 α 'nın fosforilasyon seviyesinin progesteronla kontrole, östrojene ve östrojen+progesterona kıyasla azaldığı sonuçları çıkarılabilir.

Bu sonuçlar, endotel hücrelerinde UPR'ın daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacağını ve ileriki çalışmalarda bu bulguların gerek endometriyal anjiyogenez ve anjiostaz mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına, gerekse endotel hücrelerinin UPR ile ilişkili olarak endometriyozis ve endometriyal kanserde gözlenen patofizyolojik anjiyogenez mekanizmalarının aydınlatılmasına önemli katkıları olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Bruce RC: The normal Menstrual Cycle; The Text Book of Reproductive Medicine, New York, Plenum Press 1996, Chapter 12
2. Kamat B, Isaacs P: The immunohistochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. Am J of Pathol 1987;127:66-73
3. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. American heart journal 1996;131:379-84.
4. Luster A.D. (1998) Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med. 338, 436-445.
5. Roig E, Orus J, Pare C, Azqueta M, Filella X, Perez-Villa F *et al.* Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. The American journal of cardiology 1998;82:688-90, A8.
6. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994;91:4854-8.
7. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M *et al.* Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. Circulation 2002;106:2067-72.
8. Isner J.M., Asahara T. (1999) Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. J Clin Invest. 103, 1231-1236
9. Senturk L.M., Seli E., Gutierrez L.S., Mor G., Zeyneloglu H.B., Arici A. (1999) Monocyte chemotactic protein-1 expression in human corpus luteum. Mol Hum Reprod. 5, 697-702
10. Nai-Kang KBS, Passaro E. Apoptosis: Programmed cell death. Arch Surg 1998;133:773-5
11. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes & development 1999;13:1211-33.

12. Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W *et al.* Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer cell* 2004;6:275-84.
13. Lee AS. Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Current opinion in cell biology* 1992;4:267-73.
14. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* 2000;2:326-32.
15. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92:1564-72.
16. Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *The EMBO journal* 1992;11:1563-71.
17. Lu, P. D., Harding, H. P. & Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* **167**, 27–33 (2004).
18. Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897–904 (2000)
19. Scheuner, D. *et al.* Translational control is required for the unfolded protein response and *in vivo* glucose homeostasis. *Mol. Cell* **7**, 1165–1176 (2001).
20. Staebler A, Sherman ME, Zaino RJ, Ronnett BM. Hormone receptor immunohistochemistry and human papillomavirus in situ hybridization are useful for distinguishing endocervical and endometrial adenocarcinomas. *The American journal of surgical pathology* 2002;26:998-1006.
21. Sadler TW. Ürogenital Sistem. Editör: Başaklar AC. Medikal Embriyoloji. 6. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1990: 246-280.
22. Gartner L.P. and Hiatt J.L. Female reproductive system. In *Color Textbook of Histology*, Gartner L.P. and Hiatt J.L. (eds), W.B. Saunders Press, Philadelphia, 1997, pp. 390-398.
23. Junquiera L.C., Carneiro J., Kelley O.R. The female reproductive system. In *Basic Histology*, Junquiera L.C., Carneiro J., and Kelley O.R. (eds), Appleton and Lange Press, Connecticut, 1998, pp. 430-439

24. Kierszenbaum A.B. Follicle development and menstrual cycle. In Histology and Cell Biology, Kierszenbaum A.B. (ed) Mosby Press, Philadelphia, 2002, pp.570-583.
25. Abraham L. Kierszenbaum, MD, PhD, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
26. Irene Papageorgiou, Peter K Nicholls, Fang Wang, Martin Lackmann. Expression of nodal signaling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. Reproductive Biology and Endocrinology. 2009, 7:122 doi:10.1186/1477-7827-7-122
27. Carr B.R. The normal menstrual cycle. In The Textbook of Reproductive Medicine, Carr B.R., Blackwell R.E. (eds), Plenum Press, New York, 1996, Chapter 12
28. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G *et al.* Mechanisms of estrogen action. Physiological reviews 2001;81:1535-65.
29. DeMayo FJ, Zhao B, Takamoto N, Tsai SY. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. Annals of the New York Academy of Sciences 2002;955:48-59; discussion 86-8, 396-406.
30. Burger K, Fahrenholz F, Gimpl G. Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. FEBS letters 1999;464:25-9.
31. Carr B. Endocrine changes of pregnancy. In Endocrinology, Wilson J.D., Foster D.W. Kronenberg H.M. and Larsen P.R. (eds), W.B. Saunders Press, Philadelphia, 1998, pp.769-774.
32. Clemens, M.J., Cytokines, Oxford, 1991 Bios Scientific Publishers Ltd., 57-75.
33. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. Advances in immunology 1993;54:1-78.
34. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. International reviews of immunology 1998;16:457-99.
35. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2003; 46: 299-307
36. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. The New England journal of medicine 1996;334:1717-25.
37. Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. The Journal of biological chemistry 1989;264:11974-80.

38. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunology today* 1997;18:487-92.
39. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2002;34:1508-12.
40. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England journal of medicine* 1990;323:27-36.
41. Edip Torun, Fahri Bayram. (2002). Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 26 (3) 126-131
42. Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. *The New England journal of medicine* 1995;333:251-3.
43. Luscher TF, Wenzel RR. Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications. *Agents and actions* 1995;45:237-53.
44. K.K. Griedling, R.W. Alexander. (1998). Cellular biology of blood vessels, in: R.W. Alexander, R.C. Schlant, V. Fuster, et al. (Eds.), *Hurst's the Heart, Arteries and Veins*, 9th Edition, McGraw-Hill, New York, pp. 125–141
45. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *The Journal of clinical investigation* 1999;103:1231-6.
46. NIH'a ait <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/angiogenesis/angio00.htm> web sayfası kaynak olarak kullanılmıştır.
47. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 1992;267:10931-4.
48. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annual review of medicine* 1997;48:267-81.
49. Ulukaya, E. «Apoptozis Ders Notları.» 11 4 2003. 24 4 2011 <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf>.
50. Suh Y. Cell signaling in aging and apoptosis. *Mechanisms of ageing and development* 2002;123:881-90.
51. Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Molecular cancer* 2003;2:6.
52. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helveticae* 2000;74:281-6.

53. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and autoimmunity. In: Koopman WJ, editor. A textbook of rheumatology: Arthritis and allied conditions. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2001
54. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol* 2002;47:213-21.
55. Selam B, Kayisli UA, Mulayim N, Arici A. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biology of reproduction* 2001;65:979-85.
56. Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *The EMBO journal* 2008;27:315-27.
57. Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of chemical neuroanatomy* 2004;28:51-65.
58. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research* 2005;569:29-63.
59. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell death and differentiation* 2004;11:372-80.
60. Yoshida H. ER stress and diseases. *The FEBS journal* 2007;274:630-58.
61. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews* 2007;8:519-29.
62. Aigami K, Inamoto Y, Takaishi N, Hattori K, Takatsuki A. Biologically active polycycloalkanes. 1. Antiviral adamantane derivatives. *Journal of medicinal chemistry* 1975;18:713-21.
63. Tkacz JS, Lampen O. Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. *Biochemical and biophysical research communications* 1975;65:248-57.
64. Hickman S, Kornfeld S. Effect of tunicamycin on IgM, IgA, and IgG secretion by mouse plasmacytoma cells. *J Immunol* 1978;121:990-6.
65. Samols E, Solomon A, Berson--a brief biography. *Seminars in nuclear medicine* 1979;9:173-7.

66. Nakayasu H, Irie H, Takahashi K, Hori T, Kato S. [Intracranial multiple granuloma preceded by rheumatic disease--a case report]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* 1990;30:771-3.
67. Takeuchi T, Nakayasu M, Hirohashi S, Kameya T, Kaneko M, Yokomori K *et al.* Human endodermal sinus tumour in nude mice and its markers for diagnosis and management. *Journal of clinical pathology* 1979;32:693-9.
68. Sudo T, Onodera K. Isolation and characterization of tunicamycin resistant mutants from Chinese hamster ovary cells. *Journal of cellular physiology* 1979;101:149-56.
69. Mahoney WC, Duksin D. Separation of tunicamycin homologues by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 1980;198:506-10.
70. Duksin D, Seiberg M, Mahoney WC. Inhibition of protein glycosylation and selective cytotoxicity toward virally transformed fibroblasts caused by B3-tunicamycin. *European journal of biochemistry / FEBS* 1982;129:77-80.
71. Duksin D, Mahoney WC. Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. *The Journal of biological chemistry* 1982;257:3105-9.
72. Yoshimi M, Sekiguchi T, Hara N, Nishimoto T. Inhibition of N-linked glycosylation causes apoptosis in hamster BHK21 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;276:965-9.
73. Shekels LL, Beste JE, Ho SB. Tauroursodeoxycholic acid protects in vitro models of human colonic cancer cells from cytotoxic effects of hydrophobic bile acids. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1996;127:57-66.
74. Baumgartner U, Scholmerich J, Sellinger M, Reinhardt M, Ruf G, Farthmann EH. Different protective effects of tauroursodeoxycholate, ursodeoxycholate, and 23-methyl-ursodeoxycholate against tauroolithocholate-induced cholestasis. *Digestive diseases and sciences* 1996;41:250-5.
75. Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in cell & developmental biology* 2007;18:716-31.
76. Inokuchi, Y., Y. Nakajima, et al. "Effect of an inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death." *Investigative ophthalmology & visual science* (2009). 50(1): 334-344

77. Hansen PA, Waheed A, Corbett JA. Chemically chaperoning the actions of insulin. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2007;18:1-3.
78. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008;454:455-62.
79. Harding, H. P. *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**, 619–633 (2003)
80. Rao, R. V. & Bredesen, D. E. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr. opin. Cell Biol.* **16**, 653–662 (2004).
81. Ye, J. *et al.* ER stress induces cleavage of membrane bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355–1364 (2000).
82. Kayisli UA, Doktora tezinden izni dahilinde alınmıştır.
83. Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A. Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004;1034:50-63.
84. Ellgaard, L. and A. Helenius "Quality control in the endoplasmic reticulum." *Nature reviews. Molecular cell biology* (2003). 4(3): 181-191.
85. Gething, M. J. and J. Sambrook "Protein folding in the cell." *Nature* (1992). 355(6355): 33-45.
86. Lindholm, D., H. Wootz, et al. "ER stress and neurodegenerative diseases." *Cell death and differentiation* (2006). 13(3): 385-392.
87. Zhao, L., C. Longo-Guess, et al. "Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP." *Nature genetics* (2005). 37(9): 974-979.
88. Kakiuchi, C., M. Ishiwata, et al. "Functional polymorphisms of HSPA5: possible association with bipolar disorder." *Biochemical and biophysical research communications* (2005). 336(4): 1136-1143.
89. Kusumi I, Masui T, Kakiuchi C, Suzuki K, Akimoto T, Hashimoto R et al. Relationship between XBP1 genotype and personality traits assessed by TCI and NEO-FFI. *Neurosci Lett* 2005;391:7-10.
90. Araki E, Oyadomari S, Mori M. Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 2003;42:7-14.

91. Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 2002;51 Suppl 3:S455-61.
92. Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 1999;144:427-34.
93. Yamazaki T, Muramoto M, Oe T, Morikawa N, Okitsu O, Nagashima T et al. Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, suppresses apoptosis induced by endoplasmic reticulum stresses by inhibiting caspase signaling. *Neuropharmacology* 2006;50:558-67.
94. Martindale JJ, Fernandez R, Thuermer D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA et al. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res* 2006;98:1186-93.
95. Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 2004;11:403-15.
96. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005;35:373-381
97. Lievreumont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem* 1997;272:30873-30879
98. Schatz F, Soderland C, Hendricks-Munoz KD, Gerrets RP, Lockwood CJ. Human endometrial endothelial cells: isolation, characterization, and inflammatory-mediated expression of tissue factor and type 1 plasminogen activator inhibitor. *Biology of reproduction* 2000;62:691-7.
99. Kayisli UA, Luk J, Guzeloglu-Kayisli O, Seval Y, Demir R, Arici A. Regulation of angiogenic activity of human endometrial endothelial cells in culture by ovarian steroids. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004;89:5794-802.
100. Ross M.H, Kaye G.I, Pawlina W. (2003). *Histology* 4th Ed. Chapter: 4 and 12. p.:96-111, 326-355.

101. Ganong W.F. (1999). Tıbbi Fizyoloji.19. Baskı. İstanbul. Bölüm: 30-31 s:612, 627-642.
102. Koshiyama M, Konishi I, Nanbu K, Nanbu Y, Mandai M, Komatsu T, Yamamoto S, Mori T, Fujii S. Immunohistochemical localization of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in the human endometrium: correlation with sex steroid receptors and Ki-67 antigen expression. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:1106-1112
103. Tabibzadeh S, Kong QF, Satyaswaroop PG, Babaknia A. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. Hum Reprod 1996;11:633-640
104. Guzel E, Basar M, Ocak N, Arici A, Kayisli UA. Bi-Directional Interaction Between Unfolded Protein-Response Key Protein HSPA5 and Estrogen Signaling in Human Endometrium.BOR Papers in Press. Published on March 9, 2011 as DOI:10.1095/biolreprod.110.089532
105. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. Trends Endocrinol Metab 2009;20:477-482.
106. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO *et al.* Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. Science (New York, NY 2006;313:1137-40)
107. Cox, D. J., N. Strudwick, et al. "Measuring signaling by the unfolded protein response." Methods in enzymology (2011). 491: 261-292.
108. Perez-Capote K, Serratos J, Sola C. Excitotoxic and apoptotic neuronal death induce different patterns of glial activation in vitro. Journal of neurochemistry 2005;94:226-37.
109. Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y *et al.* Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. Journal of neurochemistry 2007;101:1491-504.
110. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual review of cell and developmental biology 1999;15:269-90.

111. Hessle CC, Andersson B, Wold AE. Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes. *Cytokine* 2005;30:311-8

8. EKLER

Ek-1, Etik Kurul Onayı

Ek-2. Özgeçmiş.

Yale University

*Human Investigation Committee
School of Medicine
47 College Street, Suite 204
P.O. Box 208010
New Haven CT, 06520*

*Telephone: 203-785-4688
Fax: 203-785-2847
<http://info.med.yale.edu/hic>*

To: Aydin Arici, M.D.
From: Amy Blakeslee, CIP, HIC Coordinator 
Date: 08/11/2009
HIC Protocol #: 9306006685
Study Title: Modulation of Cytokines in Reproductive Tissues
Committee Action: **Renewal**
HIC Action Date: 08/11/2009

Expiration Date: 08/08/2010
Submission Type: Response to Previous IRB Notification

This protocol was Reapproved following an expedited review by the Human Investigation Committee. Please be advised that the protocol is due to be reapproved by the expiration date noted above.

Review Comments:

- This protocol was approved on August 11, 2009, after the clarifications and changes requested by the HIC on July 30, 2009 were incorporated. These revisions were received on August 11, 2009.
- The protocol continues to have benefits which outweigh the risks, deemed minimal by the HIC.

It is the investigator's responsibility to apply for reapproval prior to the Expiration Date noted above. Please allow two months for reapproval. If you require institutional certification of this protocol for a funding agency, please send me:

1. The form (if any) on which it is to be provided, and
2. HIC form #10 (completed).

Thank you for your cooperation.



ÖZGEÇMİŞ

NEHİR ŞERİFE OCAK

TC Kimlik No / Pasaport No:	29257054352
Doğum Yılı:	1984
Yazışma Adresi :	80 Clark St. 06511 New Haven/ABD
Telefon :	0012038438161
e-posta :	nehircak@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Süleyman Demirel Üniversitesi	FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2007

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kurulu	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
YALE University	ABD	New Haven	LABORATUVAR	Araştırma Görevlisi	2009-2011

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Anatomik Embryoloji, Sitoloji, Histoloji
UPR, Endometriyum, BiP, FKBP 51, Tibolon, Oosit

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
---	--

Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
-------------------	-------------------------	-------------

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer yayınlar

--

Düzenleme Tarihi :27/04/2011