

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

**HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ VALPROİK ASİDİN  
ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Biyolog Nurcan TOLUN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2009**

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

**HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ VALPROİK ASİDİN  
ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Biyolog Nurcan TOLUN**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2009**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	5
4.1. MENSTRUAL SIKLUS.....	5
4.1.1. Östrojen ve Endometriyum .....	8
4.2. HÜCRE SIKLUSU .....	9
4.2.1. Hücre Siklusu Düzenleyicileri: p21 ve p53 Proteinleri .....	11
4.2.2. Apoptoz ve Kaspazlar.....	13
4.2.3. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri.....	14
4.2.3.1 BrdU ile İşaretleme.....	14
4.3. HİSTON MODİFİKASYONU VE GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ. 15	
4.3.1. Histon Deasetilaz Enzimleri (HDACs).....	17
4.3.2. Histon Deasetilaz İnhibitörleri .....	18
4.4. VALPROİK ASİT (VAP).....	19
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	20
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER .....	21
5.2.1. Hücre Kültürü.....	21
5.2.2. İmmünohistokimya.....	21
5.2.2.1. BrdU İmmünohistokimyası.....	21
5.2.2.2. p21, p53 ve Kaspaz-3 İmmünohistokimyası.....	22
5.2.3. Hücre Canlılığının Ölçülmesi.....	22
5.2.4. Mikroskopik Değerlendirme .....	22
5.2.5. İstatistiksel İnceleme .....	22
6. BULGULAR .....	24
6.1. PROLİFERASYON ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	24
6.2. p21 PROTEİN EKSPRESYONU .....	27
6.3. p53 PROTEİN EKSPRESYONU .....	29

6.4. KASPAZ-3 EKSPRESYONU .....	30
7. TARTIŞMA.....	32
8. SONUÇ .....	37
9. TEŞEKKÜR .....	38
10. KAYNAKLAR .....	39

## **SİMGE VE KISALTMALAR**

<b>AEC</b>	: Aminoetilkarbazol
<b>BrdU</b>	: 5-bromo2'-deoksi-üridin
<b>CDK</b>	: Siklin bağımlı kinaz
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>FSH</b>	: Folikül stimulan hormon
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>HAT</b>	: Histon asetiltransferaz
<b>HCG</b>	: İnsan koryonik gonadotropin hormonu
<b>HDAC</b>	: Histon deasetilaz
<b>LH</b>	: Luteinizan hormon
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon solüsyonu
<b>PCNA</b>	: Prolifere hücre nükleer antijeni
<b>VAP</b>	: Valproik asit

**Araştırma Projesi No** : HE/0332008

## 1. ÖZET

Bu çalışmada in-vitro endometriyum hücre modeli kullanılarak, histon deasetilaz inhibitörü valproik asidin (VAP), menstrual siklusun östrojen tarafından stimüle edilen proliferasyon evresindeki olası etkileri immünohistokimyasal olarak incelendi.

VAP'ın hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla ilaç, tek başına ya da 17- $\beta$ -östradiol ile kombine edilerek çeşitli dozlarda deney gruplarına uygulandı. Hücre canlılığı tripan mavisi kullanılarak değerlendirildi. Konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre yüzdesinin azaldığı izlendi. S fazındaki Ishikawa hücreleri, anti-BrdU antikoruyla işaretlendi. Deney gruplarında, hücre siklusunun önemli düzenleyicileri olan p21 ve p53 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi. 17- $\beta$ -östradiolün hücre proliferasyonunu artırdığı gözlemlendi. Konsantrasyona bağlı olarak VAP uygulamasının hücre proliferasyonunu azalttığı ve/veya inhibe ettiği gözlemlendi. 20 mM VAP uygulanan deney gruplarında proliferasyon inhibisyonu, p21 ve p53 ekspresyonları üzerinden gerçekleşti. Hücrelerde apoptotik hücre ölümüne özgü morfolojik değişiklikler ve kaspaz-3 ekspresyonu izlendi. 50 mM VAP uygulanan deney gruplarında ise hücre proliferasyonunun inhibe olduğu; ancak p21 ve p53 protein ekspresyonlarının gerçekleşmediği gözlemlendi. Yüksek dozda, morfolojik apoptotik değişiklikler ve kaspaz-3 aktivasyonu izlenmedi.

Yaptığımız çalışmalarda histon deasetilaz inhibitörü VAP'ın, endometriyum hücre proliferasyonunu engellediği ve hücre ölümüne yol açtığı gösterildi. Elde edilen bulgular doğrultusunda VAP'ın, endometriyal kanserler ve endometriozis gibi endometriyum-kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyeline sahip terapötik bir ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

## 2. SUMMARY

In this research, we investigated the possible effects of histone deacetylase inhibitor valproic acid (VAP) during the proliferative phase of the menstrual cycle that is stimulated by estrogen, on an in-vitro endometrium model, by using immunocytochemistry method.

In order to observe the effects of VAP on cell proliferation, we treated the cells with different concentrations of VAP alone, or in combination with 17- $\beta$ -estradiol. Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion. A decrease in cell viability percentage was determined that it was due to different concentrations. The S-phased Ishikawa cells were visualized by staining with anti-Bromodeoxyuridine (BrdU) antibody. Significant cell cycle regulatory proteins p21 and p53 expressions were analyzed. It was observed that 17- $\beta$ -estradiol increased the cell proliferation. VAP treatment decreased and/or inhibited the proliferation rates of the cells in a dose-dependent manner. 20 mM VAP treatment inhibited the cell proliferation and induced p21 and p53 protein expressions. The characteristic morphological changes and caspase-3 expression of apoptotic cell death were also observed at this concentration. It was determined that 50 mM VAP treatment inhibited the cell proliferation but p21 and p53 protein expressions did not occur. In addition, no morphological features of apoptosis or caspase-3 expression were observed at high dose.

The present data has shown us that HDAC inhibitor VAP can inhibit the endometrial cell proliferation and induce cell death. In the light of these findings, the identification of VAP suggests a potential role to be used as a therapeutic agent in the treatment of endometrium-derived diseases; such as endometrial neoplasms or endometriosis.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyum, olası bir embriyo implantasyonunu kabul edebilme özelliklerini kazanana kadar, östrojen ve progesteron kontrolü altında her ay birçok morfolojik değişikliğe uğrar. Östrojen, proliferatif fazın dominant hormonuyken progesteron, stromal desidualizasyonun gerçekleştiği sekretuar fazın belirleyici hormonudur (1).

Stromal hücreler, endometriyumun önemli yapısal unsuru olmalarına rağmen; bir diğer temel yapı olan luminal ve glandular epitel hücreleri, endometriyumun en önünde bulunmaları; dolayısıyla embriyo ile doğrudan temas kurmaları, implantasyon ve plasenta oluşumu için önemli birçok bioaktif maddeyi üretmeleri nedeniyle önemlidir. Bunun yanında birçok endometriyal neoplazmlar epitelin luminal ve glandular yüzeyinden köken alırlar. İnsan iyi diferansiye adenokarsinom hücre soyu olan Ishikawa hücreleri, östrojen ve progesteron reseptörü içerirler. Dolayısıyla Ishikawalar, insan normal endometriyal glandular hücrelerin ve iyi diferansiye endometriyal adenokarsinom hücrelerinin fizyolojik ve fizyopatolojik değerlendirilmesinde oldukça sık kullanılırlar (2).

Transkripsiyonel olarak aktif olmayan kromatin materyali, NH<sub>2</sub>-terminal kuyruk bölgelerindeki lizin rezidülerinde düşük asetilasyon düzeyine sahip histonlar içeren nükleozomlardan oluşur. Histon proteinlerinin asetilasyonu, lizin rezidülerindeki pozitif yükü nötralize ederek nükleozom yapısının bozulmasına neden olur. Böylece DNA çözülerek, gelen transkripsiyon faktörlerinin geçişine ve gen ekspresyonundaki değişikliklere izin verir. Histon deasetilaz enzimleri (HDACs), lizin rezidülerindeki asetil gruplarının ayrılmasını katalizler ve bu aktivite genellikle transkripsiyonel baskılanma ile sonuçlanır (3). HDAC inhibitörleri, histon asetilasyonunda artışa yol açarak transkripsiyonu ve kromatin yapısını düzenleyen yeni bir sınıfın üyeleridir (4). HDAC inhibitörlerinin değişik transforme hücre soylarında farklılaşma, apoptoz ve hücre proliferasyonunun durdurulması üzerine etkilerinin olduğu gösterildi. Bu etkileri, HDAC inhibitörlerinin kromatine açık bir yapı kazandırarak; p21 gibi tümör hücre proliferasyonunu engelleyen genlerin transkripsiyonunu tetiklemesi özelliğine bağlanmaktadır. Tüm bu nitelikler, HDAC inhibitörlerini kemoterapötik müdahaleler için umut verici hale getirmektedir (5).



Uzun süredir epilepsi hastalarında antikonvülsan olarak kullanılan valproik asit (VAP), son zamanlarda histon deasetilaz inhibitörü olarak da keşfedilişi ile oldukça dikkat çekmiş ve üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır. VAP, H3 ve H4 histonların hiperasetilasyonuna yol açarak hem Tip I hem de Tip II HDAC enzimlerini inhibe edebilir (6). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, VAP'ın birçok transforme hücre soyunda proliferasyonu inhibe ettiği, diferansiyasyonu düzenlediği; ayrıca tümör yayılımı ve anjiyojenez üzerine etkileri olduğu sonucuna varılmıştır (7). Ancak, VAP'ın HDAC inhibitörü olarak endometriyal hücreler üzerine etkileri henüz tam olarak açıklık kazanamamış ve bu konu hakkında yapılan çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır.

Çalışmamızda, bir HDAC inhibitörü olan VAP'ın reprodaktif dönemde, hormonlar kontrolünde siklik olarak hücre proliferasyonu ve hücre ölümü biyolojik olaylarının geliştiği endometriyum üzerine olası etkilerinin in-vitro hücre modelinde incelenmesi amaçlanmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. MENSTRUAL SIKLUS

Oositin olgunlaştığı, uterin tüplere atıldığı ve fertilizasyonun gerçekleşmemesi durumunda dejenere olduğu dönemi kapsayan menstrual siklus, olası bir gebeliğe karşı endometriyumun hazırlanmasını sağlar (8, 9). Uterusun en iç tabakası olan endometriyum, menstrual siklus sırasında yoğun bir hormon kontrolü içindedir. 17- $\beta$ -östradiol tarafından stimule edilen proliferasyon, ovulasyon sırasında maksimum dereceye çıkar. Progesteron ise ovulasyon sonrası 17- $\beta$ -östradiol kontrolündeki endometriyal epitelin proliferasyonunu inhibe ederek sekretuar hücrelerin diferansiyasyonu engeller (10).

Endometriyum genel olarak şu yapılardan oluşur: prizmatik bir yüzey epiteli, uterin bezler, özelleşmiş bir bağ doku olan stroma ve bazal tabakadan endometriyum yüzeyine doğru uzanan spiral arterler. Tüm bu yapılar implantasyona ve embriyo gelişimine katılırlar. Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan oluşur: her menstrual periyot ya da doğumdan sonra dökülen bir fonksiyonel tabaka ve dökülmeden kalan bazal tabaka (11). Endometriyumu kanlandıran arkuat arterlerin düz segmenti bazal tabakayı; kıvrımlı segmenti ise fonksiyonel tabakayı kanlandırır (12). Her siklusta, spiral arterlerin kanlandığı fonksiyonel tabakadaki hücreler, menstrual kanama ile bazal tabakadan ayrılır. Bazal tabaka ise menstruasyon sırasında bütünüyle miyometriyuma yapışık halde kalır ve endometriyal rejenerasyona temel oluşturur (13).

Puberteden (11-13 yaş) menapoza kadar (45-50 yaş) endometriyum yaklaşık her 28 günde bir, overlerin hormonal kontrolü altında periyodik değişiklikler gösterir. Menstrual siklus sırasında endometriyum üç evreden geçer: foliküler veya proliferatif evre, sekretuar veya progestasyonel evre ve menstrual evre (14).

**1. Proliferatif Evre (Östrojenik, Foliküler Evre):** Uterusun proliferatif evresi, menstruasyon bitiminden oositin overlerden atıldığı ovulasyon olayına kadar yaklaşık 9 gün sürer ve endometriyum duvarı kalınlaşmaya başlar. Menstrual periyot sırasında ve hemen öncesinde, ön hipofiz bezinden salgılanan folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH)'larına cevap olarak bir grup ikincil ovaryan folikülü olgunlaşmaya

ve 17- $\beta$ -östradiol salgılamaya başlar. Tüm bu foliküller ovulasyon ile birlikte, bir tanesi haricinde atreziye uğrar. Proliferatif periyodun sonuna doğru, gelişmekte olan ovaryan folikülden salgılanan östrojenin seviyesindeki belirgin artış, hipotalamo-hipofiziyal sistemi etkiler. Bu da, hipotalamus tarafından gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salımında ani bir yükseliş yaratarak ön hipofizinin GnRH salımına karşı cevabını artırmasına sebep olur. Bundan yaklaşık 24 saat sonra, kandaki 17- $\beta$ -östradiol seviyesi doruk yapar ve ovulasyon öncesi hipofizden bir LH ve FSH dalgası kana verilir (11, 12). LH hormonunun doruk yapması üzerine oosit, overlerden uterus tüplerine doğru atılır. Endometriyumun proliferatif faz boyunca en belirgin özelliği; hücrelerin aktif proliferasyonu, apoptotik faktörlerin baskılanması ve yeni oluşan dokunun beslenmesini sağlayacak olan anjiyojenez olayıdır. Siklusun bu fazındaki yeterli endometriyal gelişim, sekretuar fazda olgunlaşmış bir endometriyumun implantasyon sırasında eşzamanlı olarak sağlanabilmesi bakımından çok önemlidir (1).

**2. Sekretuar Evre (Progestasyonel, Luteal Evre):** Ovulasyonun gerçekleştiği 14. günden sonra endometriyum, yaklaşık 13 gün sürecek olan sekresyon evresine girer (12). Ovulasyondan sonra, folikülden geriye kalan teka interna ve granüloza hücreleri, büyük fiziksel ve kimyasal değişiklikler geçirerek “korpus luteum” adı verilen geçici bir endokrin organ haline dönüşürler. Korpus luteumun başlıca görevi progesteron hormonu üretmektir. Uterusun sekretuar fazı sırasında salgılanan progesteron, endometriyum hücrelerinin daha da gelişimini sağlar. Progesteron ayrıca, uterustaki bezleri uyararak endometriyumun devamını sağlar ve dökülmesini engeller. Kandaki östojen ve progesteron seviyeleri, hipofiz bezinden FSH ve LH salımını baskılar (15, 16).

Proliferatif faz boyunca östrojenin etkisi altında kalınlaşmış olan endometriyum, sekretuar evrede ileri değişikliğe uğrar. Uterin bezler daha da kıvrılmaya, epitel ise glikojen ve diğer salgı ürünlerini biriktirmeye başlar. Spiral arterler endometriyum yüzeyine doğru daha fazla büyürken endometriyal epitel hücrelerinde mitotik aktivite azalır. Bu evrede uterus endometriyumu, blastosisti kabul edecek kadar iyi hazırlanmış duruma gelmiştir (11, 12). Yeniden şekillenen endometriyum, sadece kısa bir süre için olası bir blastosisti “kabul edici endometriyum” halini alır. “İmplantasyon penceresi” adı verilen bu süre, ovulasyondan 6-8 gün sonra oluşur ve yaklaşık dört gün daha (menstrual siklusun 20-24. günleri arası) açık durumda kalır (13).

Oositin bir sperm tarafından fertilize olmasını takiben gelişen blastosist, endometriyuma implante olmaya başlar. Koryondaki sinsityotrofoblastlardan koryonik gonadotropin hormonu (HCG) salgılanmaya başlar. HCG, overdeki korpus luteumun dejenere olmasını engelleyerek progesteron üretiminin devam etmesini sağlar. Gebelik sırasında salgılanan HCG hormonu, kandaki progesteron seviyelerinin yüksek kalmasına neden olur ve endometriyumu plasentanın oluşumuna katılacak şekilde kalınlaştırmaya devam eder. Endometriyum lamina propriasındaki stromal hücreler büyür ve artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipit ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişikliklere “desidual reaksiyon” denir. Desidual hücreler, gelişmekte olan embriyoya besin sağlarlar. Fertilizasyon gerçekleşmez ise korpus luteum dejenere olur, kandaki progesteron seviyesi düşmeye başlar ve menstruasyon gerçekleşir (12, 9).

**3. Menstrual Evre:** Menstruasyon, seks hormonlarının konsantrasyonuna bağlı olarak, spiral arterlerin kontraksiyonu sonucu gelişen; endometriyumun fonksiyonel tabakasının iskemik nekrozu şeklinde tanımlanabilir (17). Gebelik oluşmaz ise, bir sonraki siklusun başlamasından yaklaşık dört gün önce (24. gün) korpus luteum dejenere olmaya başlar ve geride kalan skar dokusu “korpus albicans” adını alır. Bu zamana kadar endometriyumu destekleyen progesteron hormonunun kandaki seviyesi ciddi ölçüde düşer. Korpus luteumun gerilemesinin yarattığı en belirgin sonuçlar; endometriyal stromaya lökositlerin infiltrasyonu, interstisyel sıvıda artma, spiral arterlerin çökmesi ve lokal iskemidir. İskemi, hemorajiye ve endometriyum bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Tüm bu değişiklikler menstruasyonun başlamasına neden olur (1-5. günler). Menstrual periyodun bitişiyle, geride sadece endometriyumun bazal tabakası kalmıştır. Bazal tabaka endometriyumun iyileşmesini ve bir sonraki proliferasyon evresinde tekrar yapılanmasını sağlar (11, 12, 16).

Endometriyal siklusun her fazı, endokrin, parakrin ve otokrin faktörler tarafından düzenlenen birçok bilinen ve bilinmeyen gen tarafından kontrol edilir. Ovaryan steroid hormonların koordine ve düzenli bir şekilde üretimi endometriyumun siklik değişiklikleri için gerekirken; bu hormonların anormal, yanlış bir biçimde üretimi endometriyal kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına zemin hazırlar (1, 2).

#### 4.1.1. Östrojen ve Endometriyum

Östrojen hormonu, sekonder seks karakterlerinin kazanılması, endometriyumun kalınlaşması ve menstrual siklusun düzenlenmesi gibi çok önemli görevler üstlenir. Kadınlarda doğal olarak üç temel tip östrojen üretilir: östron (E1), östradiol (E2) ve östriol (E3). Menarştan menapoza kadar primer olarak üretilen, en çok bulunan ve en etkin olan ovaryum östrojeni 17- $\beta$ -östradioldür. Daha az etkin bir östrojen olan östriol ise gebelik sırasında üretilen primer östrojendir. Östron, üç östrojenin en az etkin olanıdır ve menopoz sırasında üretilir. Östrojen primer olarak ovaryumda gelişmekte olan foliküllerde, korpus luteum ve plasentada üretilir. Östrojenler karaciğerde metabolize edilirler ve bir bölümü safrayla, bir bölümü de idrarla vücut dışına atılır.

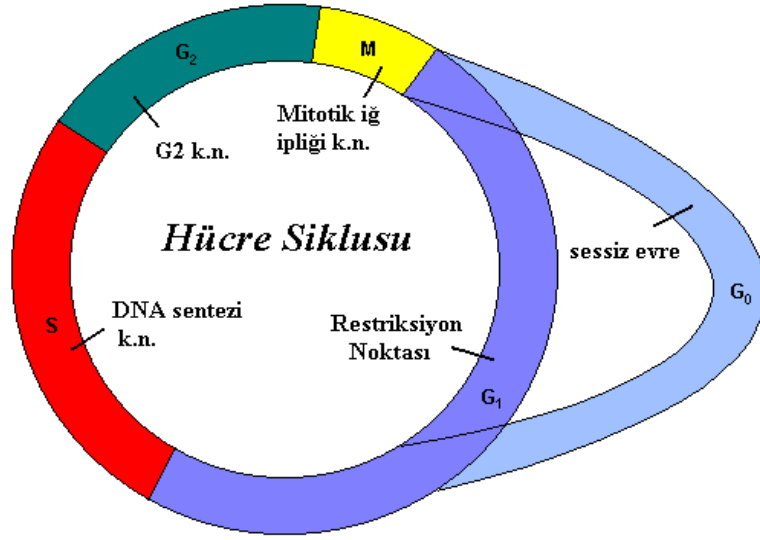
Östrojenler kimyasal yapı olarak steroid türevleridir ve ön maddeleri asetat ile kolesteroldür. FSH ve LH, östrojenin ovaryumlarda üretimini kontrol eder. Kandaki ön hipofiz hormonlarının seviyesine yanıt olarak; ovaryumda bulunan teka interna hücrelerinde, kolestrolen androstenedion sentezlenmesi ile östrojen sentezi başlar. Sentezlenen androstenedion, ovaryan foliküllerin granüloza hücrelerine geçer ve burada östrona ya da testosteron üzerinden östradiole çevrilir. Androjenlerden (testosteron ve androstenedion) östronun ve ondan 10 kat daha güçlü olan 17- $\beta$ -östradiolün sentezlenmesi, aromataz enzimi tarafından katalizlenir (12, 18).

Östrojenler işlevlerini hedef hücre nükleusunda bulunan spesifik nükleer reseptörler aracılığı ile gerçekleştirirler. Östrojenler, progesteron ve östrojen reseptörlerini uyarırlar. Memelilerde eksprese edilen iki farklı östrojen reseptörü (ER) vardır: ER $\alpha$  ve ER $\beta$ . Bu reseptörler, ovaryumda farklı dağılım alanları gösterirler: ER $\alpha$ , teka hücreleri, interstisyel bezler, stromal hücreler ve germinal epitelde bulunurken; ER $\beta$ , granüloza hücrelerinde bulunur (19, 20).

Östrojenler, tuba uterinayı örten silyalı epitel hücrelerinin silya hareketlerini çoğaltır ve buradaki kas kontraksiyonlarını artırarak oosit ve spermin birleşme olasılığını artırır. Östrojenlerin vücudun ovulasyona hazırlanması, endometriyumun kalınlaştırılması, menstruasyon sonrası endometriyum fonksiyonel tabakasının yeniden yapılandırılması gibi çok önemli görevleri vardır (11).

## 4.2. HÜCRE SIKLUSU

Çoğu ökaryotik hücre, genetik materyalini dublike ederek mitoz sırasında iki yavru hücreye paylaştığı ve bir dizi ardışık fazdan oluşan içsel bir biyolojik saate göre yaşar. Hücre siklusu olarak bilinen bu olaylar serisi;  $G_1$ , S ve  $G_2$  fazlarını kapsayan bir İ (interfaz) evresi ile M (mitoz) evresini kapsayan çok önemli bir süreçtir (21).



**Şekil 1:** Hücre siklusu ve kontrol noktalarının şematiği görünümü; k.n: kontrol noktası (22).

Normal doku homeostazisi için siklusun ilerleyişi sırasında yapılan sıkı kontroller, hücre için büyük önem taşır. Bunu sağlamak için hücre, siklusun önemli fazlarında, bir sonraki faza geçişi sağlayan kontrol mekanizmaları geliştirmiştir (23). DNA'nın radyasyon ve çeşitli kimyasallar gibi nedenlerle herhangi bir hasar ile karşılaşması durumunda, hücre siklusu durdurma noktaları aktive edilir ve hücre siklusunun ilerlemesi değişik fazlarda geciktirilerek veya durdurularak DNA'nın kendini tamir etmesi için hücreye zaman tanınır. Genellikle, programlı hücre ölümü olan apoptozis mekanizmaları da, tamir edilemeyecek olan anormal hücrelerin elimine edilmesi için bu mekanizmalara paralel olarak aktive edilir (24, 25).

**G<sub>1</sub> fazı:** Hücre'nin DNA replikasyonu için hazırlandığı, büyüdüğü ve geliştiği evre olan G<sub>1</sub> fazında yoğun bir şekilde protein ve RNA sentezi olur. Tipik bir ökaryotik hücrede bu faz yaklaşık 12 saat sürer ve siklusun en uzun fazıdır. Bu evrede, restriksiyon (R, sınırlama) noktası olarak da bilinen önemli bir kontrol noktası bulunur. G<sub>1</sub>/S kontrol noktası, hücrede DNA hasarı olup olmadığını kontrol eder. G<sub>1</sub> fazında DNA hasarı gerçekleşirse; bu kontrol noktası hücre proliferasyonunu geciktirir veya hücreyi apoptoza sürükler. Bu noktadaki durdurmanın, çoğunlukla p53 geni üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir.

**S fazı:** DNA sentezinin gerçekleştiği fazdır. Yaklaşık olarak 6-8 saat sürer. Hücre genomunun doğru olarak replike edildiğinden emin olmak için bu fazda da bir kontrol noktası bulunur.

**G<sub>2</sub> fazı:** G<sub>2</sub> fazında hücre, mitoz için hazırlanır. Mitozda kullanılacak enerji için ATP depolanır ve mitoz mekiği için tubulin yapımı olur. G<sub>2</sub> fazı genellikle 3-6 saat sürer. DNA hasarı gibi bir genotoksik stres ile karşılaşma durumunda replikasyonun ilerlemesini engelleyen veya geciktiren bir kontrol noktası bulunur. G<sub>2</sub>/M kontrol noktası, hücre siklusunun ilerleyişini p53-bağımlı ve bağımsız yollar ile engelleyebilir.

**M fazı:** Replike olmuş kromozomların iki hücreye eşit bir biçimde paylaştırıldığı fazdır. Mitoz sonunda hücreler, G<sub>1</sub> fazı ile hücre siklusuna devam eder. En kısa faz olan mitoz fazı yaklaşık 30 dakika içinde tamamlanır. Bu fazdaki durdurma noktası “iğ ipliği durdurma noktası” olarak da bilinir ve metafaz ile anafaz arasında tüm kardeş kromatidlerin iğ ipliklerine doğru bir biçimde paylaştırılıp paylaştırılmadıkları ve iğ ipliği mikrotübül yapısı kontrol edilir (26, 27). Mitoz ve sitokinezi tamamlayan hücre, interfaz evresine girerek yaşamını devam ettirir (28).

Hücre siklusunun süresi hücre tipine göre farklılıklar gösterebilir; bir çok memeli hücresinde siklus, 10-30 saat arasında bir süreyi kapsar. Nöronlar veya çizgili kas hücreleri gibi bazı hücreler, hücre siklusunu G<sub>1</sub> fazında terk ederek; günler, haftalar hatta bazı durumlarda tüm yaşamları boyunca daha fazla proliferasyon olmazlar. G<sub>0</sub> (sessizlik, dinlenme) olarak bilinen bu evredeki hücreler, metabolik olarak aktif olmalarına karşın; hücre dışından uygun bir sinyal almadıkları sürece bölünme yeteneklerini kaybetmişlerdir (12, 21, 29).

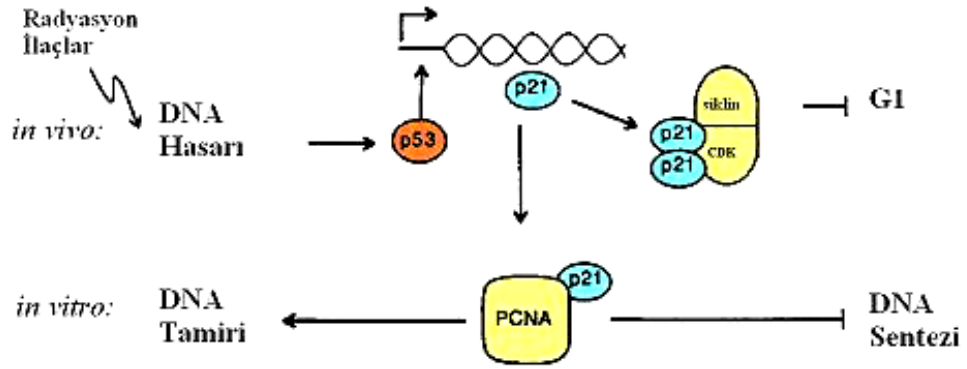
#### 4.2.1. Hücre Siklusu Düzenleyicileri: p21 ve p53 Proteinleri

Hücre siklusunun ilerleyişi, hücre siklusu regülatörleri olan siklin-bağımlı kinazların (CDKs) aktivasyonu ya da inhibisyonu aracılığı ile düzenlenir (30). p21<sup>Cip1/Waf1</sup> proteini, CDK-2, -3, -4, -6 kinaz komplekslerini inhibe edebilir ve hücre siklusu, apoptoz ve farklılaşmada önemli rol oynar (31). p21, hücre siklusunu G<sub>1</sub>, S ve/veya G<sub>2</sub>/M fazlarında bloke edebilir (27). p21 aktivitesi, p53-bağımlı (hücre siklusu ve durdurulması) veya p53-bağımsız (hücre farklılaşması) mekanizmalar ile düzenlenir (32).

53 kDa'luk bir nükleer fosfoprotein olan p53 ise bir tümör süpresör olarak hücre siklusunun düzenlenmesinde çok önemli görevler üstlenir. İnsanlarda görülen tümörlerin yaklaşık %50'sinde p53 gen mutasyonu gözlemlenmesi ile bu genin, kanser oluşumunu engellemede kritik bir rol üstlendiği sonucuna varılmış ve p53, "genomun bekçisi" olarak adlandırılmıştır. p53; DNA hasarı ve onkogenik uyarılar gibi çeşitli stres sinyallerine cevap olarak bazı genlerin transkripsiyonunu uyarır, hücre siklusunu durdurur ve gerekli durumlarda hücreyi apoptoza sürükler (29, 33). p53-bağımlı gelişen apoptoz mekanizmaları henüz tam olarak açıklık kazanmış değildir; ancak bu proteine bağlı olarak gelişen hücre siklusu inhibisyonunun temel olarak CDK inhibitörü p21 tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Herhangi bir DNA hasarına yanıt olarak hücrenin, siklusu durdurma ya da apoptoza gitme yollarından hangisini seçeceğine nasıl karar verdiği henüz tam olarak açıklık kazanmış olmasada; p21'in yüksek miktarlardaki transkripsiyonunun, p53-bağımlı apoptozu inhibe ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (34).

Hücrenin bir DNA hasarı ile karşılaşması durumunda p53 proteini, transkripsiyon faktörü olarak aktive edilir ve hücre içinde artmaya başlar. p53 proteini, p21 gen promotörünün taşıdığı p53-bağlayıcı bölgesine bağlanarak p21 geninin transkripsiyonel olarak aktive olmasını sağlar. p21 proteininin iki ana fonksiyonel parçası vardır: C-terminal parçası, DNA replikasyonu ve onarımında rol alan bir protein olan PCNA (prolifere hücre nükleer antijeni) ile ilişkiye girerken; N-terminal parçası, CDK-siklin kompleksi ile bağlantı kurar. p21, hücre siklusunu, çeşitli siklin kompleksleriyle veya PCNA ile bağlantı kurarak durdurur (26, 35).





**Şekil 2:** DNA uyarıcı ajanlara yanıt olarak artan p53 seviyesi, p21 genini uyararak ve hücre siklusunu durdurarak DNA replikasyonunu inhibe eder. p21, siklin-CDK'lar ile bağımsız kompleksler kurarak aktivitelerini inhibe eder ve PCNA ile birlikte DNA sentezini in-vitro olarak durdurur. Buna karşın p21, PCNA'nın hücre onarımındaki görevini inhibe etmez (36).

Hücre siklusunun önemli komponentleri olan p21 ve p53 proteinlerinin, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde çok önemli görevleri vardır. Normal bölünmekte olan hücrelerde, p21 düşük seviyede eksprese edilir. p21 transkripsiyonu p53-bağımlı ya da p53-bağımsız yollar ile uyarılabilir. p53 proteininin hücre siklusu kontrolündeki kritik rolü genelde p21 tarafından düzenlense de p21, birçok sinyal yolu ve transkripsiyon faktörleri aracılığı ile p53'den bağımsız bir şekilde de aktive edilebilir (37).

#### 4.2.2. Apoptoz ve Kaspazlar

Apoptozis, gereksinim duyulmayan veya fonksiyonu bozulmuş hücrelerin organizmaya zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan “programlanmış hücre ölümü”dür. Apoptoza giden hücrede birçok morfolojik değişiklik gözlenir: plazma membranında blepler oluşur, sitoplazma büzülür ve hacim kaybeder, DNA kondensasyonu ve fragmantasyonu meydana gelir. Apoptozis ilerledikçe oluşan sitoplazmik blepler, ölmekte olan hücreden ayrılarak apoptotik cisimleri meydana getirirler. Apoptoz sırasında hücredeki intraselüler maddeler dışarı salınmaz ve inflamatuvar yanıt oluşmaz. Apoptozis, hücrenin gelişiminde, hücresel homeostasisin sağlanmasında ve immün sistemde çok önemli görevler üstlenen bir hücre ölüm şeklidir. Apoptozun düzenlenmesinde meydana gelecek bir bozukluk; kanserden otoimmün ve nörodejeneratif bozukluklara kadar birçok hastalığın gelişmesini tetikleyebilir. Apoptoz, hücre içinden veya dışından gelen uyarıların alınması ile tetiklenir ve proteazlar (kaspazlar) aktif hale getirilir. Aktifleşen kaspazlar ile hedef proteinler yıkılır ve oluşan apoptotik cisimler fagositoz yolu ile ortadan kaldırılırlar (38, 39).

Kaspazlar; sistein proteazlardır ve apoptozun düzenlenmesinde oldukça önemlidirler. Kaspazlar, üç ana parçadan oluşan proenzimler (30-50 kDa) olarak ekspres edilirler: NH<sub>2</sub>-terminal parça, büyük parça (~20 kDa) ve küçük parça (~10 kDa). İnaktif olan prokürsör enzimler, apoptoza gidecek olan hücrede aktif forma dönüşürler. Kaspaz aktivasyonu, kendi proteolizisleri sonucu veya başka kaspazların veya düzenleyici proteinlerin uyarımı sonucu gelişir. Günümüze kadar insanlarda, apoptotik yol üzerinde 14 farklı kaspaz türü tanımlanmıştır. Kaspazlar üç gruba ayrılabilir: Başlatıcı Kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9, 10), Efektör Kaspazlar (kaspaz-3, 6, 7), İnflamatuvar Kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 11-14). Tüm bunların içinde kaspaz-3, en etkin proteazdır. Kaspazlar hem proapoptotik sinyaller uyarımıyla apoptozun başlatılmasında (başlatıcılar) hem de hücrenin parçalanmasında (efektörler) görev alırlar (40, 41, 42).

Başlatıcı ve efektör kaspazlar, hücrelerdeki apoptozis belirlenmesinde sıklıkla kullanılan hedeflerdir. Spesifik antikörler veya floresan ile konjuge edilmiş antikörlerle kaspazların aktif formları belirlenebilmektedir.

### 4.2.3. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri

#### 4.2.3.1. BrdU ile İşaretleme

Hücre siklusunun özellikle S fazında, basit mikroskopik gözlemlenele ile hücrelerin, siklusun hangi aşamasında olduklarını belirlemek zordur. S fazındaki hücreleri belirleyebilmenin bir yolu; yeni sentezlenmiş olan DNA'nın yapısına katılabilen ve gözlemlenebilen moleküller ile DNA'yı desteklemektir. <sup>3</sup>H-timidin ile işaretlenmiş hücre nükleusu otoradyografi ile görünür hale getirilebilirken; yapay bir timidin analogu olan bromo-deoksiuridin (BrdU) ile işaretlenmiş olanlar, anti-BrdU monoklonal antikorları ile görünür hale getirilir (43).

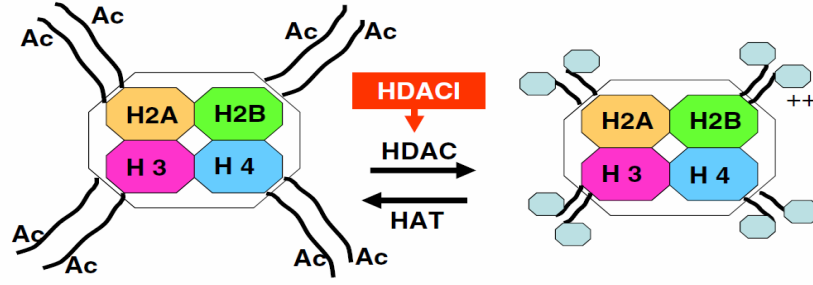
İmmünositokimyasal yöntemlerde sıklıkla kullanılan bir işaretleyici olan BrdU, yeni hücreler ortaya çıkartmak üzere hücrenin girdiği siklusun replikasyon fazında, DNA'nın yapısına katılan bir timidin analogudur (44). S fazındaki hücrelerin BrdU ile bütünleşmesi, anti-BrdU spesifik antikorları ile membran permeabilizasyonu sonrası kolayca belirlenebilir. BrdU pozitif hücreler, daha sonra flow sitometre veya immünositokimya gibi rutin hücre analizinde kullanılan metodlar ile tespit edilebilir.

BrdU ile immünositokimyasal işaretlemenin, <sup>3</sup>H-timidin ile işaretleme ve takiben yapılan otoradyografi metoduna göre bir avantajı, daha az zamanda daha yüksek çözünürlük sağlamasıdır. BrdU ile immünositokimyasal işaretleme, normal ve kanserojen dokularda hücre popülasyonlarının işaretlenme indekslerini ölçerek; proliferasyon seviyeleri ve hücre siklusu kinetiğini belirlemede kullanılır (45).

### 4.3. HİSTON MODİFİKASYONU VE GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ

Nükleozomlar, ökaryotik kromatini meydana getiren temel tekrarlayan birimlerdir. Tipik bir nükleozom; özdek histonlar olan H2A, H2B, H3 ve H4'den birer çift olmak üzere sekiz histon molekülünden oluşan bir oktomer ve bunların etrafına sarılmış yaklaşık 146 DNA baz çiftinden oluşmuştur (46). Kromatinin yeniden şekillenmesi ve DNA'nın nükleozomal paketlenmesindeki dinamik değişiklikler, gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki anahtar basamaklar olup; hücre fonksiyonunun düzgün işleyişini, diferansiyasyonu ve proliferasyonu etkiler (3). Normal koşullarda, nükleozomda pozitif yüklü ve düşük asetilasyon seviyesine sahip histonlar, DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgasına sıkıca bağlanmışlardır. Bu bağlanma transkripsiyon faktörlerinin, transkripsiyon düzenleyici komplekslerin ve RNA polimerazların DNA'ya geçişlerini engelleyerek transkripsiyonel olarak aktif olmayan bir kromatin oluşmasını sağlar (47).

Asetilasyon, özdek histonların N-terminal kuyruk bölgeleri arasındaki lizin rezidülerinde oluşur. Histon asetiltransferazlar (HATs), asetil gruplarını ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), asetil koenzim A (acetyl-CoA)'dan özdek histonlar arasında korunmakta olan lizin rezidülerinin  $\epsilon$ -amino grupları üzerine transfer ederler. Asetilasyon, histonların pozitif yükünü nötralize ederek; DNA'nın negatif yüklü yapısı ile olan ilişkilerini kopartır. Böylece, aktif gen transkripsiyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasına izin veren daha "açık" bir kromatin yapısı oluşmasını sağlar. Tam tersine, histon deasetilaz enzimleri (HDACs) ile katalize edilen özdek histonların amino-terminal uçlarının tekrar pozitif yük kazanmaları, histonlar ile DNA'nın etkileşimini artırır. Böylece, promotör üzerindeki bağlantı bölgeleri bloke edilerek gen transkripsiyonu inhibe edilir. Normal fizyolojik koşullarda, kromatin asetilasyonunun durumu, HAT ve HDAC enzimleri arasındaki denge ile sağlanır. Aralarındaki denge, normal hücre çoğalması için oldukça önem taşırken; bu dengenin bozulması karsinogeneze yol açabilir. Genom ağırlıklı bir çok kanser türünün, histon asetilasyon seviyesinin düşmesinden kaynaklandığı keşfedilmiştir (48, 49).



**Şekil 3:** HDAC inhibitörleri etki mekanizmalarının şematik gösterimi. HAT enzimleri asetil gruplarını lizin rezidülerine aktararak açık ve transkripsiyonel olarak aktif bir kromatin yapısı meydana getirirler. Sağda, transkripsiyonel olarak aktif olmayan histon yapısı görülmektedir (50).

Epigenetik değişiklikler; fenotipte meydana gelen, geri dönüşümlü, genlerin nükleotid dizilimindeki değişikliklerden kaynaklanmayan ve hücre bölünmesi sırasında değişmeden kalan farklılaşmalardır. Epigenetik değişiklikler, transkripsiyon düzenlenmesinde rolü olan DNA ve/veya ilgili proteinlerin modifikasyonlarıdır ve transkripsiyonu etkilediği en iyi bilinen değişiklikler DNA'nın metilasyonu ve histonların deasetilasyonlarıdır (46). Hücrenin fizyolojik durumu, çevresel sinyaller gibi hücrenin içinde bulunduğu çevre, histon kodlarının geçici olarak değişmesine neden olur. Kalıtsal bir histon kodu “epigenetik kod” olarak ifade edilir (51).

Endometriozis, endometriyum-benzeri dokuların uterus dışındaki ektopik bölgelerde bulunması ile karakterize, östrojen-bağımlı yaygın bir jinekolojik hastalıktır. Endometriozise bağlı ağrıları tedavi etmeye yönelik uygulanan terapilerin en büyük etki şekli; implantlardaki proliferasyonu baskılama ve adezyon formasyonunu düşürmekten geçer. Bu nedenle endometriozis tedavisine yönelik in-vivo ya da in-vitro araştırmalarda, proliferasyon inhibisyonuna yönelik yeni terapötik ajanlar incelenmektedir. Endometriozisin epigenetik bir hastalık olduğu ve bu nedenle de HDAC'lara yönelik tedavilerle iyileştirilebileceğine dair kanıtlar artmaktadır (52).

Östrojen hormonlarının hedef dokulardaki histon asetilasyon seviyesini etkilediği rapor edilmiştir. Histon asetilasyonu, proliferasyon ve hücre farklılaşması gibi östrojen tarafından regüle edilen oluşumlara katılır (53).

Histonların yanı sıra histon-olmayan proteinler de HATs/HDACs tarafından düzenlenen asetilasyon/deasetilasyona katılırlar (54). HAT'lar DNA üzerine direkt olarak bağlanmazlar; promotör bölgelerde transkripsiyon faktörlerince desteklenirler. Transkripsiyon faktörleri, hücre siklusu regülatörleri ve proapoptotik proteinler; HDAC ve HAT'ların substratlarıdır (55).

#### **4.3.1. Histon Deasetilaz Enzimleri (HDACs)**

HDAC enzimleri, genellikle transkripsiyonel baskılamada görev alarak kromatinin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynayan enzimlerdir. Memelilerde histon deasetilazlar, *Saccharomyces cerevisiae* mayası'nın HDAC enzimleri (Rpd3, Hda1 ve Sir2) ile gösterdikleri primer homolojiye göre üç sınıfa ayrılırlar ve 18 genden oluşan bir aileyi kapsarlar. Bu ailenin 11 üyesini bulunduran Tip I ve Tip II HDAC'lar "klasik HDAC'lar" olarak adlandırılırken; kalan 7 üyeyi içeren Tip III HDAC'lar "sirtuinler" olarak bilinmektedir (5, 56) (Tablo 1 ).

Tip I deasetilazlar, HDAC-1, -2, -3, -8, -11 gruplarını içerirler ve maya transkripsiyon düzenleyici geni Rpd3 ile homoloji gösterirler. Bu enzimler genellikle nükleusta bulunurlar, çoğu hücre tipinde eksprese edilebilirler ve hücre siklusu progresyonunun düzenlenmesine katılırlar.

Tip II HDAC'lar, HDAC-4, -5, -6, -7, -9, -10 gruplarını içerirler ve maya Hda1 geninin homologlarıdır. Tip II HDAC'lar sitoplazma ve nükleus arasında gidip gelirler ve daha sınırlı bir dağılım alanları vardır. Hücre proliferasyonunun yanı sıra özel olarak hücre farklılaşmasına katılarak ikinci tip deasetilazlar sınıfına girerler (23, 47, 57).

Tip III HDAC'lar sirtuinlerdir. Yapısal olarak insan Tip I ve Tip II HDAC enzimleri ile bir ilişkisi olmayıp maya Sir2 proteinleri'nin homologlarını taşırlar. Sirtuinler, deasetilaz aktivitesi için Tip I ve Tip II HDAC'lar tarafından kullanılan Zn-bağımlı mekanizmanın aksine; nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kullanırlar. Tip I ve Tip II HDAC enzimleri kısa zincirli yağ asitleri ve hidroksumid asitler ile inhibe edilebilirken; Tip III HDAC enzimleri bu tür ajanlar ile inhibe edilemezler (4, 47).

Tip	Enzim	Homoloji	Katalitik Parça	Deasetilaz Aktivasyon Mekanizması	Lokalizasyonu
I	HDAC 1, 2, 8	RPD3	1	Zn-bağımlı	Nükleus
	HDAC 3		1	Zn-bağımlı	Nükleo-sitoplazmik
	HDAC 11		1	Zn-bağımsız	Nükleo-sitoplazmik
II	HDAC 4, 5, 7, 9, 10	HDA1	1	Zn-bağımlı	Nükleo-sitoplazmik
	HDAC 6		2	Zn-bağımlı	Sitoplazma
III	SIRT 1-7	SIR2	1	NAD-bağımlı	Sitoplazma

**Tablo 1:** HDAC enzimleri.

#### 4.3.2. Histon Deasetilaz İnhibitörleri

HDAC inhibitörleri, histon ve histon-olmayan proteinlerin fonksiyonlarını ve dolayısıyla gen transkripsiyonunu düzenleyerek histon asetilasyonunu artırır ve kromatin yapısının daha açık bir form kazanmasına neden olurlar (6, 58).

HDAC inhibitörleri'nin yapısal farklılıkları dolayısıyla bloke edici potansiyelleri birbirinden farklıdır (55). Günümüzde bir çok HDAC inhibitörü tanımlanmıştır. Bunlar:

**Kısa-Zincirli Yağ Asitleri:** Butirat, fenilbutirat ve valproik asit

**Hidroksamik Asitler:** TSA, SAHA, Oksamflatin, ABHA, Skriptaid (SB-556629), Piroksiamid, Propenamidler, Aroyl pyrrolyl hidroksiamidler

**Amidler:** MS-275 (MS-27-275), MethylGene, CI-994

**Epoksiketon-Taşıyan Siklik Tetrapeptidler:** Trapoksinler, HC-toksin, Chlamydocin, Diheteropeptid, WF-3161, Cyl-1 ve Cyl-2

**Epoksiketon-Taşımayan Siklik Tetrapeptidler:** FR901228, CHAPs ve diğer yapılar olan Depudecin, Tubacin, Organosülfür bileşikler (59).

HDAC inhibitörleri, bir çok transforme ya da kanser hücre tipinde apoptozu ve differensiyasyonu tetikleyerek hücre siklusunun G<sub>1</sub> veya G<sub>2</sub> fazında durmasına neden olurlar ve proliferasyonu inhibe ederler (49). HDAC inhibitörlerinin antitümör aktivitesinde ilginç bir yapı da, histon asetilasyonunun sadece belli genlerin

transkripsiyonunu (eksprese edilmiş genlerin ~ %2'si) aktive etmesi ve ekspresyonun tümör büyümesini inhibe etmesidir. En çok uyarılmış genlerden biri hücre siklusu kinaz inhibitörü olan p21<sup>WAF1</sup> genidir (60). HDAC inhibitörleri ile muamele sonrası p21 promotör bölgesindeki H3 ve H4 histonların asetilasyonu sonucu p21 geninin ekspresyonu artar (55, 61). Normal hücreler, DNA hasarı veya DNA tamir hataları gibi apoptotik sinyallere karşı duyarlıdırlar. HDAC inhibitörleri, kanserde bloke edilmiş veya suprese edilmiş apoptotik yolların tekrar kazanılmasını sağlayabilirler (72).

#### **4.4. VALPROİK ASİT (VAP)**

Valproik asit (VAP; 2-propyl-pentanoic acid), antikonvülsan olarak keşfedilişinin ardından ilk olarak 1964 yılında Fransa'da klinik kullanıma geçirilmiş ve tüm epilepsi nöbet tiplerine karşı geniş spektrumlu etkisiyle dünyada en çok kullanılan anti-epileptik ilaçlar (AEDs) arasına girmeyi başarmıştır (63). Daha sonraki yıllarda, HDAC'ları inhibe edebildiği anlaşılan VAP, bu özelliği ile oldukça ilgi çekmiş ve farklı alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır.

Kısa zincirli bir yağ asidi olan VAP; hem tip I hem de tip II (HDAC-6 ve HDAC-10 hariç) HDAC'ları inhibe eder ve histonların (H3 ve H4) hiperasetilasyonuna neden olur. VAP'ın çeşitli kanser türlerinde güçlü antiproliferatif etkisi olduğu, in-vitro ve in-vivo olarak gösterilmiştir (52). Servikal kanserler ve lösemi için faz I aşamasında epigenetik bir ilaç olan VAP üzerinde yapılan hücre siklusu analizleri, VAP'ın antitümöral aktivitesinin p21 proteini aktivasyonu ile birlikte gerçekleştiğini ve G<sub>1</sub> fazında durmaya yol açtığını ortaya koymuştur (64, 65).



## 5. MATERYAL VE YÖNTEM

### 5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

1. 17- $\beta$ -Östradiol, Sigma
2. Valproik Asit, Gerot PharmazeutikaGmbH
3. NaCl, Atabay AT091-950
4. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Riedel-de Häen 81890
5. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Riedel-de Häen 8210A
6. HCl, Merck K23226314 632
7. DMEM, Sigma D5546
8. Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
9. L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
10. Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-IC
11. Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
12. Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
13. Anti-p53 antikoru, Santa Cruz, sc-126
14. Anti-p21 antikoru, Santa Cruz, sc-393
15. Anti-Kaspaz-3 antikoru, NeoMarkers, RB-1197-P
16. Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
17. Aminoetilkarbazol (AEC), Zymed -00-2007
18. Metanol, Riedel-de Häen 24229
19. Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
20. DMSO, Sigma D 2650
21. Borik Asit, Sigma B0252
22. Sodyum tetra borat, Sigma B0127
23. Tripan mavisi, Sigma T8154

## **5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER**

### **5.2.1. Hücre Kültürü**

Ishikawa hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotik (100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/F12) medyumunda, flasklar içerisine ekildi. Kültüre edilen hücreler, 37°C de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren inkübatörde büyütüldü. Deneyleerde, kontrol grubu hücreler normal medyumları içerisinde tutuldu. Östrojenin etkilerini belirlemek amacıyla oluşturulan deney grubunda medyum içerisine 17-β-östradiol (0.5 µm) eklendi. VAP'ın farklı konsantrasyonlardaki etkilerinin gözlemleneceği gruplara ise sırasıyla 2, 5, 10, 20, 50 mM VAP eklenerek 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Siklusun östrojen kontrolünde gerçekleşen proliferasyon evresinde, VAP'ın olası etkileri ise 17-β-östradiol içeren deney gruplarında test edildi.

### **5.2.2. İmmünositokimya**

#### **5.2.2.1. BrdU İmmünositokimyası**

Düzenlenen deney gruplarına ait hücrelerin proliferasyon indekslerinin belirlenebilmesi için hücrelere; hücre siklusunun S fazına özgü bir işaretleyici olan BrdU (1mM) eklenerek 37°C de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra, metanol ile fikse edilen hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C de 30 dakika boyunca inkübe edildi ve takiben borat tampon ile (pH:8) nötrale edildi. PBS ile yapılan yıkamalar sonrası, spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için non-immün serumla 20 dakika bloklama işlemi uygulandı. Hücreler, anti-BrdU primer antikor (NeoMarkers) ile 0.5/100 dilüsyonda, oda ısısında 1 saat boyunca bekletildi. Ardından PBS ile yıkanan hücrelere, sırasıyla; biyotin-bağlı ve streptavidin peroksidaz sekonder antikorları (Histostain Plus Kit, Zymed) 20'şer dakika süreyle uygulandı. Spesifik renk reaksiyonunu görüntüleyebilmek amacıyla AEC kromojeni uygulandı. Kapatma işleminden önce zıt boya olarak hematoksilin boyaması yapıldı.

#### **5.2.2.2. p21, p53 ve Kaspaz-3 İmmünotokimyası**

İmmünotokimyasal olarak p21, p53 ve kaspaz-3 ekspresyon düzeylerinin incelenebilmesi amacıyla lameller üzerine ekili olan hücreler, -20°C de, metanol ile fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaların engellenebilmesi için non-immün serum (Histostain Plus Kit, Zymed) hücrelere 20 dakika boyunca uygulandı. Bloklama işlemi sonrası anti-p53, anti-p21 (Santa Cruz) ve anti-kaspaz-3 (NeoMarkers) primer antikoları ile 3 µm/ml dilüsyonda oda ısısında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben biyotin işaretli sekonder antikor 20 dakika uygulandı. PBS yıkamalarının ardından streptavidin enzim konjugatı kullanılarak 20 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar yapılan PBS yıkamalarının ardından AEC kromojeni uygulandı. Kromojen aşamasında, invert mikroskopta incelenen hücrelerde spesifik renk reaksiyonu gözlemlendikten sonra reaksiyon durdurularak su bazlı kapatma solüsyonu ile örnekler kapatıldı.

#### **5.2.3. Hücre Canlılığının Ölçülmesi**

Ishikawa hücrelerinin yüzdesel canlılık oranı tayini için tripan mavisi boyama yöntemi kullanıldı. Hücreler tripsinize edildikten sonra PBS (9.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 150 mM NaCl, pH 7.4) içinde % 0.04 tripan mavisi içeren solüsyonda inkübe edildi.

#### **5.2.4. Mikroskopik Değerlendirme**

Çalışmalarda, kültüre edilen hücrelerin inceleme ve değerlendirmeleri Olympus X70 invert mikroskopta gerçekleştirildi. İmmünotokimyasal olarak boyanan hücrelerin inceleme, değerlendirme ve fotoğraflandırma işlemleri ise Olympus BX 50 ışık mikroskobu yardımıyla gerçekleştirildi.

#### **5.2.5. İstatistiksel İnceleme**

BrdU işaretli S fazındaki hücreler üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının

değerlendirilmesiyle hesaplandı. Proliferasyon indeksi, pozitif işaretli hücrelerin/toplam hücre sayısına oranı alınarak bulundu.

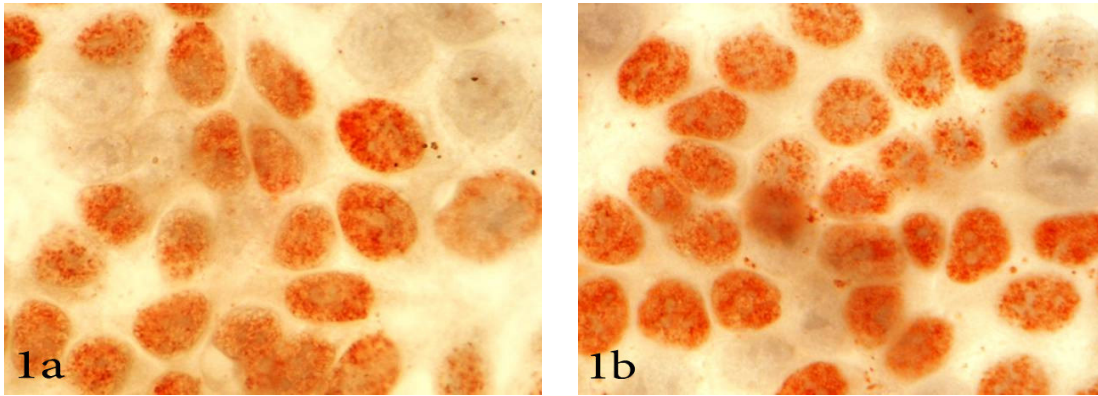
İstatistiksel inceleme, SPSS 10.0 ile çoklu grup karşılaştırmaları için Krusker Wallis, ikili grup karşılaştırmaları için Mann Whitney-U testleri uygulanarak değerlendirildi.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel anlamlılık sınırı kabul edildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. PROLİFERASYON ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

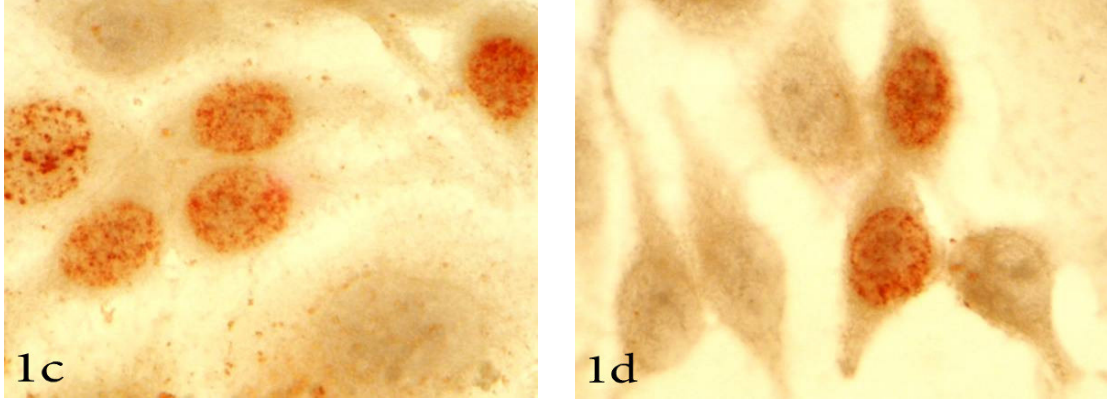
Deney grupları arasında BrdU ile işaretlenmiş S fazı hücrelerin proliferasyon oranları karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu.

BrdU ile işaretlenen kontrol grubu Ishikawa hücrelerinin S fazındaki hücre oranıyla ( $51,50 \pm 4,03$ ) (Resim 1a), 17- $\beta$ -östradiol uygulandıktan sonraki hücre oranı ( $64,83 \pm 5,70$ ) (Resim 1b) karşılaştırıldığında bu oranın istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi.



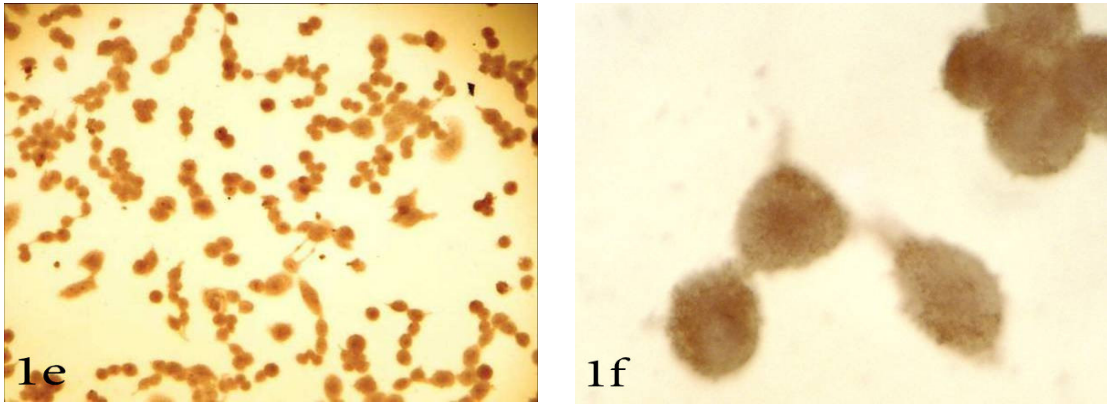
**Resim 1a, b:** Kontrol grubu S faz Ishikawa hücreleri (a) ve 17- $\beta$ -östradiol uygulanan Ishikawa hücrelerinde artmış BrdU inkorporasyonu ve hücre proliferasyonu (b). Hematoksilen-X600

2 ve 5 mM VAP konsantrasyonlarında proliferasyon oranlarında anlamlı bir azalma izlenmedi. 17- $\beta$ -östradiol ile 10 mM VAP'ın birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinde proliferasyon oranının ( $27,58 \pm 5,35$ ) (Resim 1c), sadece 17- $\beta$ -östradiol uygulanan gruba göre azaldığı tespit edildi ( $p < 0,005$ ). Yalnızca VAP (10 mM) uygulanan grupta BrdU ile işaretli S faz hücre oranı ( $16,58 \pm 3,57$ ) (Resim 1d), 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulanan gruba (Resim 1c) göre anlamlı derecede azaldı ( $p < 0,005$ ).



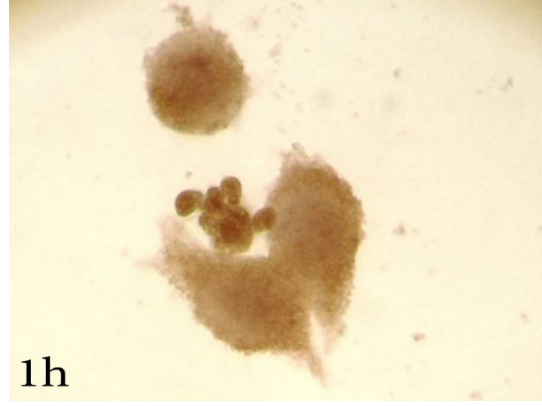
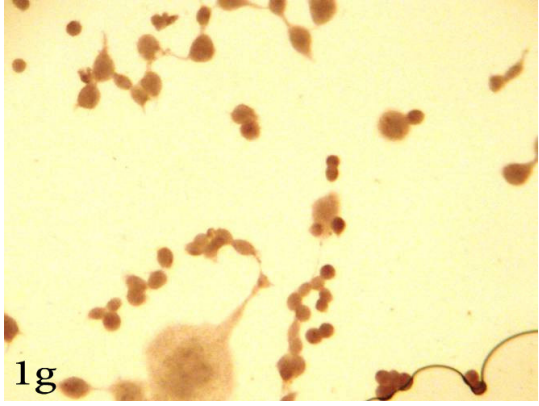
**Resim 1c, d:** 17-β-östradiol ile VAP (10 mM)'in birlikte uygulandığı (c) ve yalnızca VAP uygulanan (d) Ishikawa hücrelerinde azalmış hücre proliferasyonu. Hematoksilen-X600

17-β-östradiol ile birlikte 20 mM VAP uygulanan Ishikawa hücrelerinde, S fazı hücrelerin tamamen inhibe olduğu izlendi. Total hücre sayısında belirgin bir azalma izlendi.



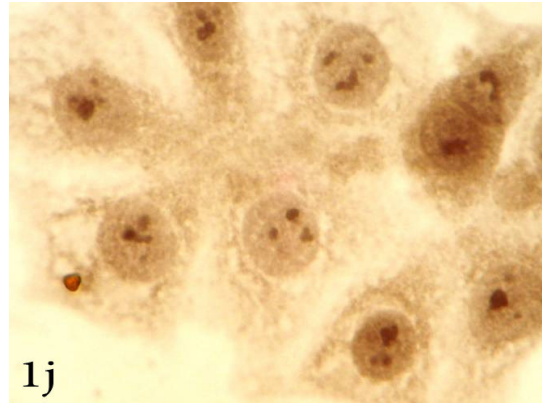
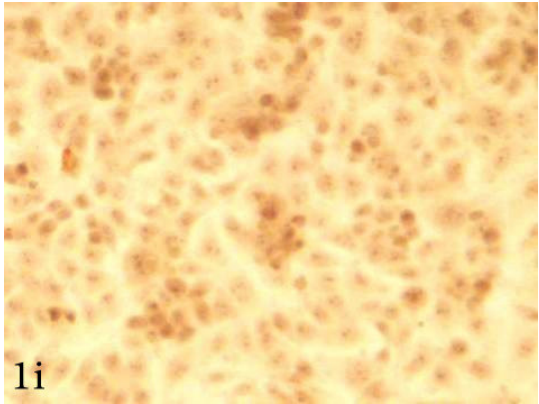
**Resim 1e, f:** 17-β-östradiol ile VAP (20 mM)'in birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinde azalmış hücre sayısı ve inhibe olmuş hücre proliferasyonu. Hematoksilen-X100 (e), X600 (f)

Yalnızca VAP (20 mM) uygulanan deney grubunda BrdU işaretli S fazında hücre izlenmedi. Proliferasyon inhibisyonunun yanı sıra ışık mikroskopik olarak apoptotik hücre ölümü morfolojisinin karakteristik bulguları izlendi.



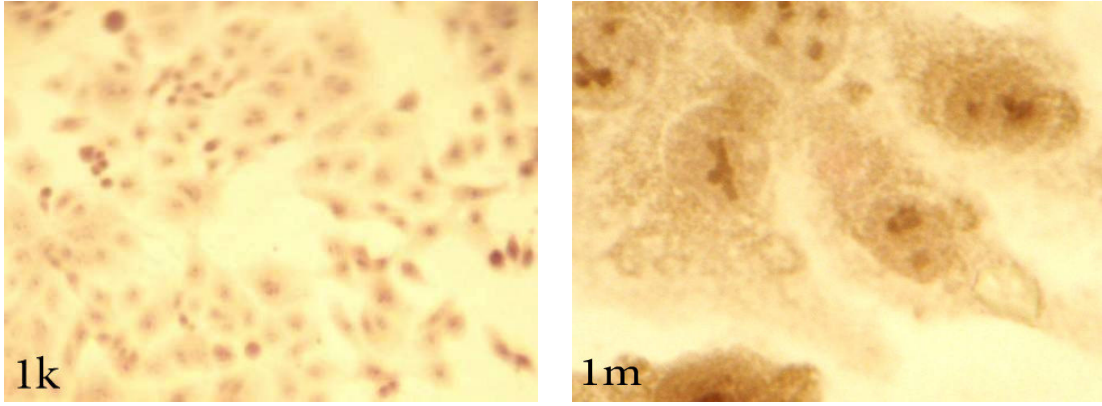
**Resim 1g, h:** 20 mM VAP uygulanan Ishikawa hücrelerinde azalmış hücre sayısı ve apoptotik değişiklikler. Hematoksilen-X100 (g), X600 (h)

17- $\beta$ -östradiol ile birlikte 50 mM VAP uygulanan deney grubunda S faz hücrelerinin tamamen inhibe olduğu, total hücre sayısının 20 mM VAP+östradiol uygulanan gruba göre daha yüksek gözlemlendiği; ancak tripan mavisi ile test edildiğinde tüm hücrelerin boyandığı ve canlılığın korunmadığı izlendi.



**Resim 1i, j:** 17- $\beta$ -östradiol ile VAP (50 mM)'ın birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinde inhibe edilmiş proliferasyon. Hematoksilen-X100 (i), X600 (j)

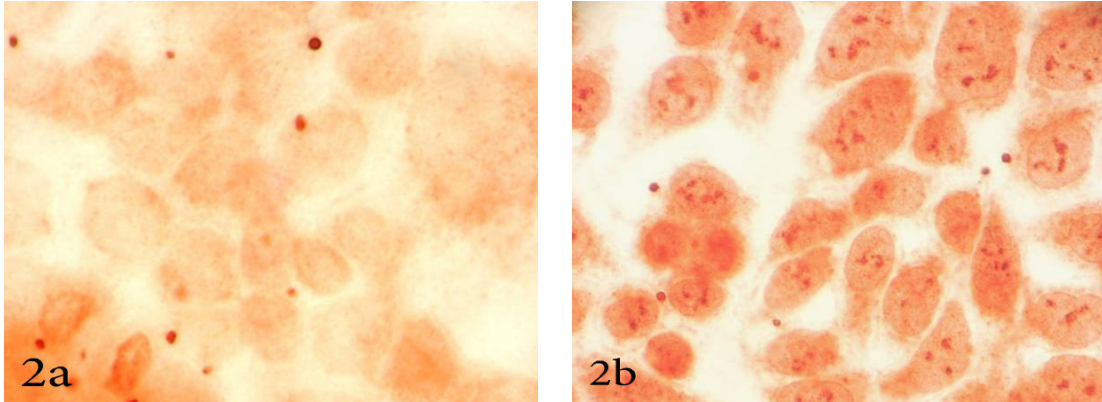




**Resim 1k, m:** 50 mM VAP uygulanmış deney grubunda proliferasyon izlenmedi ve hücre morfolojisinde apoptozdan farklı değişiklikler izlendi. Hematoksilen-X100 (k) ve X600 (m)

## 6.2. p21 PROTEİN EKSPRESYONU

17- $\beta$ -östradiol inkübasyonu uygulanmış Ishikawa hücrelerinde kontrol grubuna göre nükleer p21 protein ekspresyonunda hafif bir artış izlendi (Resim 2a, b).

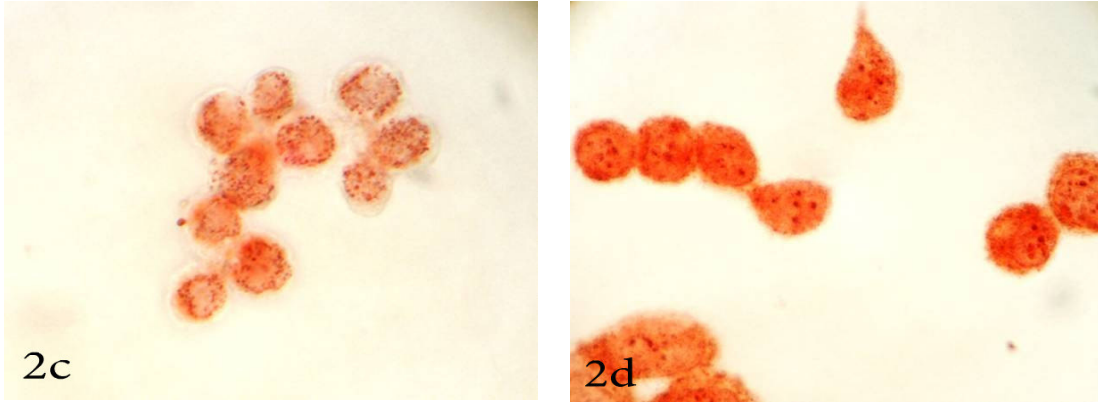


**Resim 2a, b:** Kontrol grubu (a) ve 17- $\beta$ -östradiol (b) uygulanan Ishikawa hücrelerinde p21 protein ekspresyonu. X600

20 mM VAP ile birlikte 17- $\beta$ -östradiol uygulanan deney grubunda VAP uygulamasının p21 protein ekspresyonunda belirgin bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi

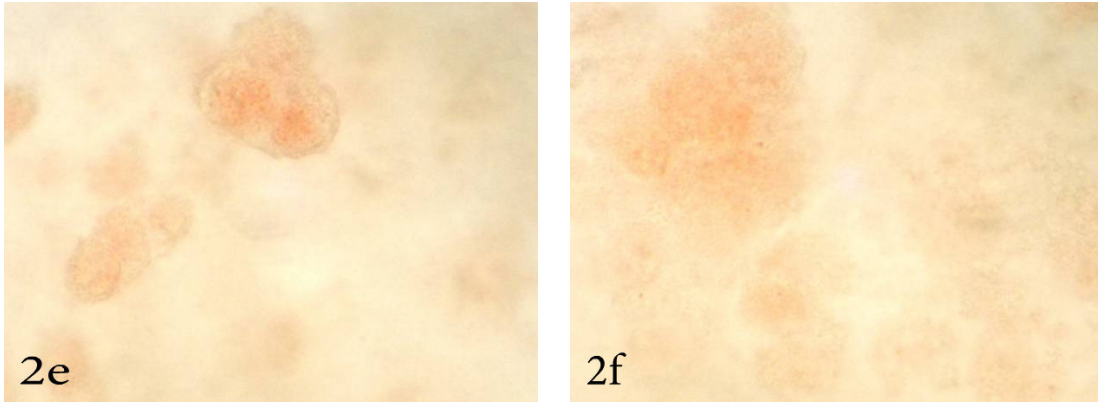


(Resim 2c). Tek başına 20 mM VAP uygulanan grupta ise p21 ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı izlendi (Resim 2d).



**Resim 2c, d:** 20 mM VAP ile birlikte 17- $\beta$ -östradiol (c) ve sadece VAP (20 mM) (d) uygulanan hücrelerde p21 protein ekspresyonları. X600

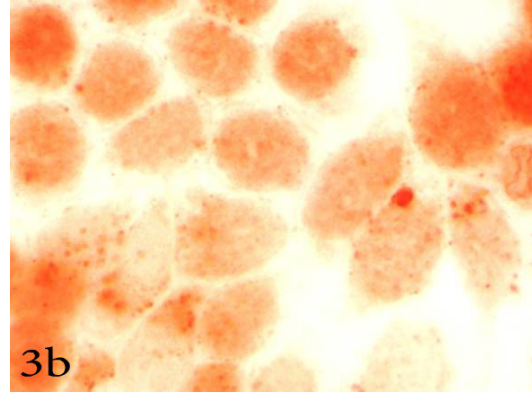
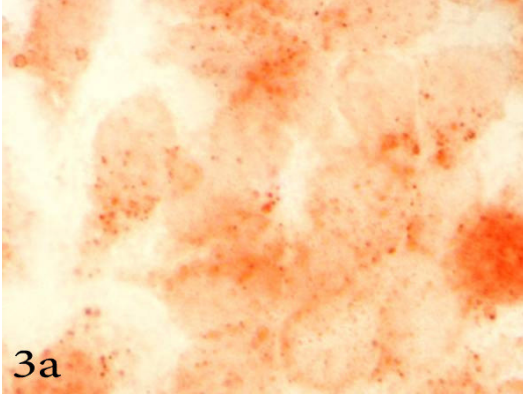
50 mM VAP ve 17- $\beta$ -östradiol ile inkübe edilen Ishikawa hücrelerinde proliferasyon azalmış ancak p21 protein ekspresyonuna rastlanmamıştır (Resim 2e, f).



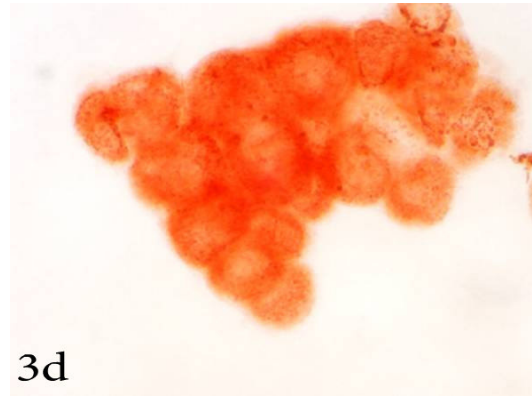
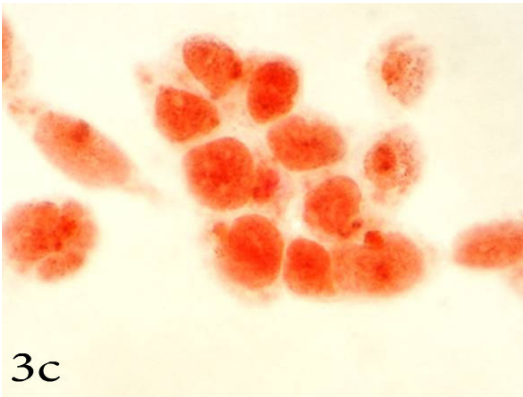
**Resim 2e, f:** VAP (50 mM) ve 17- $\beta$ -östradiol ile inkübe edilen (e) ve sadece 50 mM VAP (f) uygulanan Ishikawa hücrelerinde p21'den bağımsız olarak gerçekleşen proliferasyon inhibisyonu. X600

### 6.3. p53 PROTEİN EKSPRESYONU

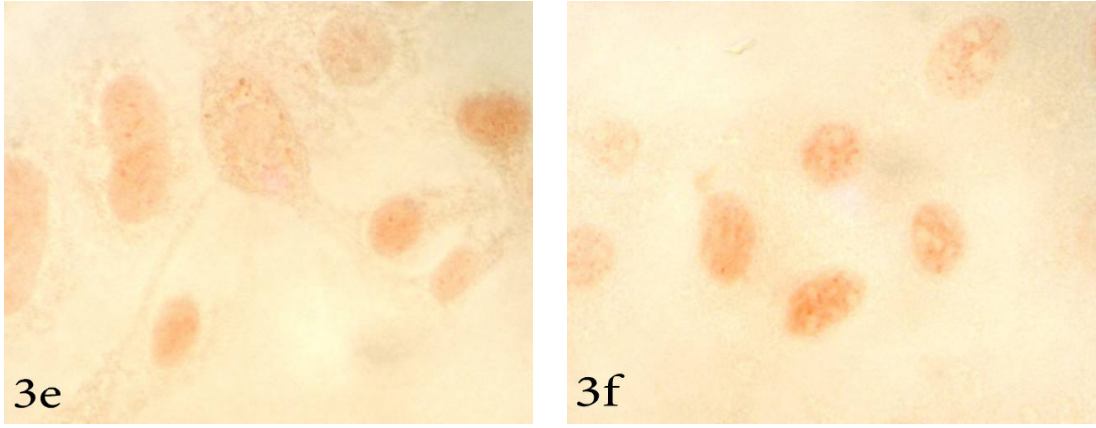
17- $\beta$ -östradiol ile birlikte ve sadece 20 mM VAP uygulanan hücrelerde, kontrol ve östradiol grubu hücelere göre p53 protein ekspresyonunda artış izlendi (Resim 3a-d). Ancak 50 mM VAP uygulanan deney gruplarında p53 ekspresyonu gözlenmedi (Resim 3e, f).



**Resim 3a, b:** Kontrol grubu (a) ve 17- $\beta$ -östradiol uygulanan (b) Ishikawa hücrelerinde p53 ekspresyonu. X600



**Resim 3c, d:** 17- $\beta$ -östradiol ve 20 mM VAP uygulanmış (c) ve sadece 20 mM VAP uygulanmış (d) Ishikawa hücrelerinde p53 ekspresyon düzeyleri. X600

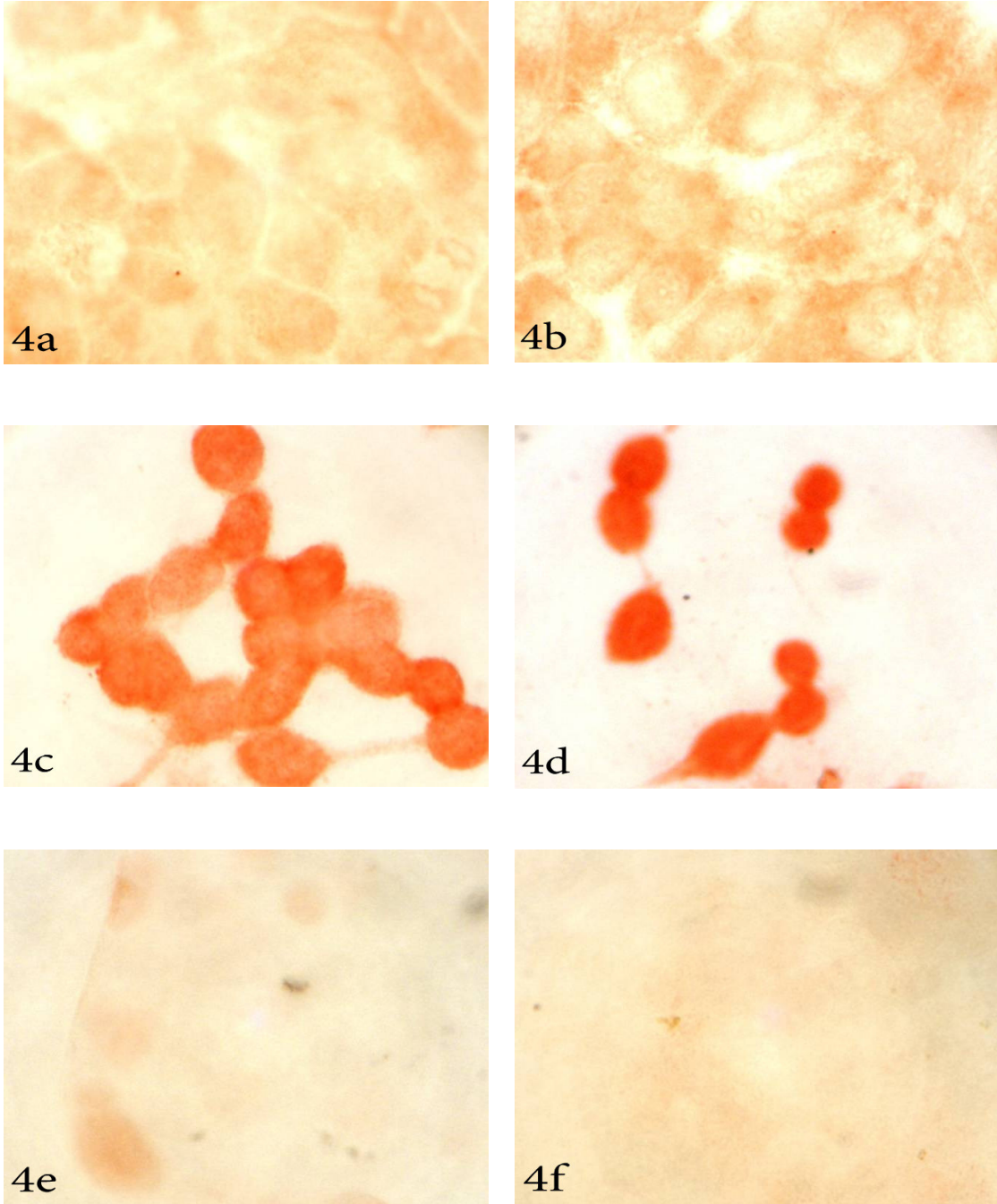


**Resim 3e, f:** 17- $\beta$ -östradiol ve 50 mM VAP uygulanmış (e) ve yalnızca VAP uygulanmış (f) Ishikawa hücrelerinde p53 ekspresyonu. X600

#### **6.4. KASPAZ-3 EKSPRESYONU**

Ishikawa hücrelerinde, HDAC inhibitörü VAP'ın yüksek konsantrasyonlarda ölüme yol açtığı görüldü. 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte ya da tek başına uygulanan 20 mM VAP'ın, ışık mikroskopik olarak morfolojik apoptoz bulguları oluşturduğu izlendi. Hücre volümünün azaldığı, apoptotik cisimciklerin oluştuğu izlendi (Resim 4). Apoptotik hücre ölümü ile kaspaz-3 aktivasyonu ilişkisi immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu ve 17- $\beta$ -östradiol uygulanan Ishikawa hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonuna rastlanmadı (Resim 4a, b). 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte ya da tek başına 20 mM konsantrasyonda VAP'ın kaspaz-3 ekspresyonuna yol açtığı izlendi (Resim 4c, d). Ancak 50 mM VAP uygulanan deney gruplarında kaspaz-3 aktivasyonu görülmedi (Resim 4e, f).



**Resim 4 a, f:** Kontrol grubu (a) ve 17-β-östradiol uygulanmış (b) hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonu. 17-β-östradiol ile VAP (20 mM)'in birlikte uygulandığı (c) ve yalnızca VAP (20 mM) uygulanan hücreler (d), 17-β-östradiol ile VAP (50 mM)'in birlikte uygulandığı (e) ve yalnızca VAP (50 mM) uygulanan (f) Ishikawa hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu. X600

## 7. TARTIŞMA

Kadınlarda reprodüktif organlar, menarştan menapoza kadar olan süreçte; hipotalamus, hipofiz ve ovaryumların koordine bir şekilde etkileşime girmesiyle ortalama 28 günde bir, bir dizi değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerin gerçekleştiği dönem “menstrual siklus” olarak adlandırılır. Menstrual siklus sırasında başta östrojen ve progesteron olmak üzere steroid hormonlar görev alır ve endometriyum histolojisinde birçok değişiklik gerçekleşir (66). Menstrual siklusun proliferatif fazı sırasında endometriyum epiteli tekrar oluşturulur ve hücreler hızla bölünmeye başlarlar. Proliferasyon, başlıca ovaryum kaynaklı steroid bir hormon olan 17- $\beta$ -östradiol tarafından sağlanır. Ovaryum foliküllerinde granüloza hücreleri tarafından salgılanan östradiol, hücrelerdeki mitotik aktiviteyi uyarak DNA sentezini artırır ve endometriyumun kalınlaşmasını sağlar (67, 68). Günümüzde birçok endometriyal kanser hücre soyu tanımlanmış olsa da; insan adenokarsinom hücreleri olan Ishikawa hücre soyu, içerdiği östrojen ve progesteron reseptörleri ile insan endometriyumunu oldukça iyi temsil etmektedir ve endometriyumla ilgili olan araştırmalarda kullanılmaktadır (69). Çalışmamızda tercih ettiğimiz Ishikawa hücre soyunda, 17- $\beta$ -östradiolün hücre proliferasyon oranlarını artırdığını BrdU inkorporasyonu ile gözlemledik.

Moleküler genetiğin yeni teknolojileri; özellikle de gençip teknolojisi (microarray), menstrual siklus sırasında çok sayıda genin eksprese edildiğini göstermektedir (1). Nükleozomal histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Asetilasyonda rol oynayan iki temel enzim vardır: HAT ve HDAC. HDAC, histonların amino kuyruk bölgelerinde bulunan lizin rezidülerindeki  $\epsilon$ -amino gruplarından asetil gruplarını kopardığı zaman, lizin rezidüleri pozitif yük ile yüklenerek DNA’ya sıkıca bağlanır ve nükleozom yapısı yoğunlaşır. Hipoasetile durumdaki nükleozomlara transkripsiyon faktörleri, düzenleyici kompleksler ve RNA polimeraz bağlanamadığı için transkripsiyon gerçekleşmez. Histon asetilasyonu ile nükleozomlardaki yük nötralize olur. Böylece DNA’nın transkripsiyonu gerçekleşir (70). HDAC inhibitörleri, HDAC enzimlerini inhibe ederek histon asetilasyonunu sağlarlar. HDAC inhibitörlerinin histon modifikasyonu ile gen regülasyonunu sağlama özelliği son yıllarda oldukça dikkat çekmiş ve antikanser ajanlar içinde yerini almaya başlamıştır. HDAC inhibitörleri in vitro transforme hücrelerinde diferansiyasyonu,

büyümenin durdurulmasını ve apoptozu tetikler ve in vivo da tümör büyümesini inhibe eder (60). Bazı HDAC inhibitörlerinin in vivo olarak zor elde edilmeleri, yarı ömürlerinin kısa oluşu ve ciddi yan etkiler oluşturması nedeniyle klinik kullanımları sınırlıdır.

Çalışmalarımız sırasında uzun süredir anti-epileptik özelliği ile tanınan ve sonradan bir HDAC inhibitörü olduğu anlaşılan VAP'ı kullandık. Ishikawa hücrelerine değişik konsantrasyonlarda (2, 5, 10, 20, 50 mM) VAP tek başına ve/veya 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulandı. Proliferasyon oranındaki en belirgin değişiklikler, 10 mM VAP ve üzeri konsantrasyonlarda gözlemlendi. 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulanan 10 mM VAP, Ishikawa hücrelerinde proliferasyon oranının azalmasına neden oldu. Hücrelere tek başına uygulanan 10 mM VAP ise proliferasyon oranının, östradiol ile birlikte uygulanan gruba göre daha da düşmesinde sebep oldu. Yalnızca VAP uygulanan deney gruplarında proliferasyon oranı ve hücre sayısındaki düşüş, östradiolün VAP ile birlikte uygulandığı deney gruplarına kıyasla daha yüksekti. Östradiol uygulamasının premenopozal, östradiolden yoksun ortamın ise postmenopozal endometriyum yapısını temsil ettiğini düşünürsek; VAP kullanan postmenopozal kadınlarda endometriyum üzerindeki ilaç etkinliğinin, premenopozal kadınlara kıyasla daha yüksek olabileceği söylenebilir.

20 mM VAP uygulanan deney gruplarında S fazındaki hücrelerin tamamının inhibe olduğu görüldü. Bu durum; Ishikawa hücrelerinde hücre siklusunun, G<sub>1</sub> veya G<sub>2</sub> fazında durdurulmuş olduğunu düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, 20 mM VAP'ın apoptotik hücre ölümüne yol açtığı, hücre morfolojisinde izlenen değişiklikler ve kaspaz-3 ekspresyonundaki artış ile tespit edilmiştir. VAP konsantrasyonu 50 mM'a çıkartıldığında; hücrelerin tamamında yine S faz inhibisyonunun gerçekleştiği ancak tüm hücrelerin canlılıklarını yitirdikleri görüldü. Bu konsantrasyonda ise apoptoz özgül ışık mikroskopik bulgular ve kaspaz-3 ekspresyonu izlenmedi. Ishikawa hücrelerinde daha önce yapılmış olan bir çalışmada, 2 mM'a kadar olan düşük konsantrasyonlarda VAP'ın anlamlı düzeyde bir proliferasyon inhibisyonu oluşturmadığı bildirilmiştir (71). Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda VAP'ın, Ishikawa hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak, çeşitli hücre soylarında proliferasyon inhibisyonu ve apoptoz oluşturduğu söylenebilir.

Hücrenin DNA hasarı veya herhangi bir genotoksik stres ile karşılaşması durumunda; hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli role sahip olan p53 geninin hücre içindeki sayısı artar ve p21 proteininin ekspresyonu uyarılır (36). p21 proteini, hücre siklusunun negatif regülatörüdür ve birçok protein ile etkileşime girebilir. p21, CDK'lara



ve PCNA'ya bağlanarak hücre siklusunu inhibe edebilir. Hücrede p21 ekspresyonunun artması, hücre siklusunun G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ya da S fazında durmasına neden olur. Proliferasyonu engelleyici etkilerinin yanısıra p21 proteini, apoptozu da tetikleyebilir (72). 20 mM VAP uygulanan Ishikawa hücrelerinde hücre proliferasyonu durmuş, apoptotik hücre ölümü gerçekleşmiş ayrıca p21 ve p53 ekspresyonlarında belirgin bir artış izlenmiştir. VAP'ın servikal epitel kaynaklı HeLa, SiHa ve CaSki karsinom hücre soylarında proliferasyonu inhibe ettiği, p53 ekspresyonu ve apoptozu tetiklediği son yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (73, 74). Sonuçlar VAP'ın konsantrasyona bağlı olarak, epitel kaynaklı Ishikawa hücrelerinde de benzer etki gösterdiği; histonların hiperasetilasyonu sonucunda p21 ve p53 ekspresyonlarını tetikleyerek hücrelerde proliferasyon inhibisyonu ve apoptozu neden olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, 50 mM VAP uygulanan hücrelerde p21 ve p53 ekspresyonu izlenmemesi; VAP'ın bir HDAC inhibitörü olarak etkilerinin doza-bağlı bir biçimde değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Günümüzde, iki farklı programlı hücre ölümü tanımlanmıştır: otofajik hücre ölümü ve apoptotik hücre ölümü. Apoptotik hücre ölümünde morfolojik olarak nükleer yoğunlaşma ve fragmantasyon gerçekleşirken; sitoplazmik organellerde büyük yapısal değişiklikler olmamaktadır. Otofajik hücre ölümünde ise; sitoplazmik organellerde çift zar yapısı ve sitoplazmada otofajik vakuoller izlenmektedir (75). HDAC inhibitörlerinin, kaspaz-bağımlı apoptozu ve kaspazdan bağımsız olarak gelişen otofajik ölümü tetikleyebildikleri çeşitli hücre soylarında yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (76). Hücrenin apoptotik ya da otofajik ölüm yollarından hangisini tercih edeceğini ve bunu nasıl belirlediği hala merak konusu olmakla birlikte; sitotoksik ilaçlara maruz bırakılan tümör hücre soylarında otofajinin, apoptoz ve G<sub>1</sub> fazındaki durdurmayı engellediği gösterilmiştir (77). Apoptozun tersine nekroz; pasif bir hücre ölümüdür ve genellikle fiziksel veya toksik etkiler sonucu hücrenin hasar görmesi sonucu gerçekleşir. Nekrozda sitoplazmik vakuolizasyon, plazma zarının yıkılması ve genellikle ölen hücre içeriğinin dışarı çıkması sonucu inflamasyon gözlemlenir. Apoptozda gözlemlenen kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmantasyonları nekrotik hücrede görülmez. Son birkaç yıldır yapılan çalışmalar, hücrenin apoptoz dışındaki diğer programlı hücre ölümü mekanizmalarına ivme kazandırdı ve programlı nekroz ve otofaji terimleri sınıflandırmaya dahil edildi. "Programlı nekroz" da hücreden gelen iç sinyaller nekrozu başlatır ve burada nekroz bir "kaza" sonucu oluşmaz. Programlı nekroz ile otofajik ölüm morfolojik olarak

çok benzemekle birlikte otofaji; genellikle ortamdaki besin stresi sonucu oluşur ve hücreler katabolik bir metabolizma programı içine girerler. Programlı nekroz sadece apoptozun kimyasal ya da genetik olarak baskılanması sonucu oluşur. Özellikle DNA hasarı oluşan ve proliferasyon yapan hücrelerde apoptoz baskılandığında; proliferasyon yapan hücrelerin eliminasyonu için programlı nekroz geliştiği tanımlanmıştır (78, 79). 50 mM VAP uygulanan Ishikawa hücrelerinde vakuolizasyon benzeri değişiklikler ve volümlerinde artış gözlemlendi ve kaspaz-3 aktivitesi izlenmedi. HDAC inhibitörlerinin çeşitli hücre soylarında apoptozu ve otofajiyi tetikleyebildikleri bilinmektedir (80). Hücre morfolojisinde gözlemediğimiz bu değişikliklerin otofaji mi yoksa programlı nekroz mu olduğunu mevcut imkanlar dahilinde tanımlamamız mümkün olmadı. Ancak bu değişikliklerin apoptotik hücre ölümünü göstermediğini söyleyebiliriz.

HDAC inhibitörleri, antikanser ilaçlar arasına girmiş ve klinik kullanımı gitgide genişletilerek bu anlamda oldukça umut verici hale gelmiştir. Hem sentetik hem doğal yollardan elde edilebilen HDAC inhibitörleri, birbirlerinden yapısal olarak farklı olmalarına rağmen; apoptozu ve hücre diferansiyasyonunu tetiklemeleri ve tümör hücrelerinde büyümeyi durdurmaları ile ortak bir payda da buluşurlar (3). Anti-epileptik olarak geniş bir kullanım alanı bulunan VAP; kolay elde edilmesi, klinik olarak kolay çalışılabilen yapısı ve uzun bir yarı ömre sahip olması nedeniyle diğer HDAC inhibitörleri arasında avantajlı bir konuma sahiptir. VAP, insanlarda iyi tolere edilmesine rağmen, birtakım teratojenik etkileride gözönünde tutulmalıdır. Gebeliğin ilk trimesterinde VAP kullanan kadınların çocuklarının %1-2'sinde, spina bifida aperta ve diğer nöral tüp kapanma defektleri meydana geldiği bildirilmiştir (53, 81). Isojärvi ve arkadaşlarına göre; uzun süre VAP ile tedavi edilen epilepsi hastası kadınlarda, menstrual düzensizlikler, polikistik overler ve hiperandrojenizm gibi endokrin bozukluklar daha sık görülmektedir (82). Erkeklerde kullanılan yüksek dozlarda VAP'ın ise semene geçerek sperm sayısında düşüşe yol açtığı ancak ilacın bırakılmasıyla değerlerin tekrar normale döndüğü bildirilmiştir (83). Tüm bu yan etkiler, uzun süre VAP kullanan kadın ve erkeklerde infertilite sorunlarına yol açabilir. HDAC inhibitörü olarak keşfedilişinin ardından klinik kullanımı yaygınlaşmaya başlayan VAP üzerinde yapılan çalışmaların daha ileri götürülerek, daha uzun zaman da daha çok hasta sayısı ile tekrarlanması, epilepsi hastalarında ve gebelerde oluşabilecek yan etkilerin açıklık kazanmasına katkı sağlayacaktır.



HDAC inhibitörleri, histon deasetilazları inhibe ederek kromatinin yeniden şekillenmesinde ve gen regülasyonunda görev alırlar. Endometriyal kanser hücrelerinde HDAC inhibitörleri ile yapılan tedaviden sonra p21 ve p27 protein seviyelerinde artış gözlenmesi, HDAC inhibitörleri'nin endometriyal kanser hücrelerinin büyümesini durduğu görüşüne destek sağlamaktadır (3). Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarda, retinoik asidin HDAC inhibitörlerinin tümör hücrelerinde antiproliferatif etkisini artırdığı gösterilmiştir (84). Retinoik asit ve HDAC inhibitörü VAP'ın birlikte kullanıldığında gösterdiği sinerjik etkiler araştırılmalıdır. VAP'ın apoptoz, anjiyojenez, metastaz, farklılaşma ve hücre siklusunu durdurma gibi hücresel yolları yeniden şekillendirmesiyle gerçekleştirdiği antitümoral etkiler, birçok in vivo ve in vitro sistem üzerinde gözlemlenmiştir.

Ishikawa hücrelerinde etkilerini araştırdığımız VAP, konsantrasyona bağlı olarak 17- $\beta$ -östradiol tarafından gerçekleştirilen proliferasyonu inhibe etmiş ve apoptozu tetiklemiştir. Bu anlamda VAP, steroidler ile uyarılmış endometriyal hücrelerin diferansiyasyonu altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasında ve endometriyal kanserler ile endometriozis gibi endometriyum-kaynaklı hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik olarak önem taşımaktadır.

## 8. SONUÇ

- HDAC inhibitörleri, histon asetilasyonunu artırarak gen transkripsiyonunun yeniden düzenlenmesini sağlarlar. Hücrelerde apoptozu tetiklerler, hücre siklusunu ve proliferasyonu durdururlar.
- Çalışmamızda, HDAC inhibitörü VAP'ın, endometriyal kanser hücre soyu olan Ishikawa hücrelerinde proliferasyon üzerine gösterdiği etkiler değerlendirildi.
- Ishikawa hücrelerine 2-50 mM arası değişen konsantrasyonlarda uygulanan VAP'ın, hücre proliferasyonu üzerine en belirgin etkileri 10 mM ve üzeri konsantrasyonlarda gerçekleşti.
- Ishikawa hücrelerine 17- $\beta$ -östradiol ile birlikte uygulanan 10 mM VAP, hücrelerde proliferasyon oranının ve hücre sayısının düşmesine sebep oldu. VAP'ın tek başına uygulandığı deney gruplarında ise proliferasyon oranının daha da düştüğü gözlemlendi.
- 20 mM VAP uygulanan deney gruplarında S faz hücrelerin tamamen inhibe oldukları, total hücre sayısının azaldığı ve hücrelerin canlılıklarını yitirdikleri görüldü. Apoptotik hücre ölümünün yol açtığı apoptotik cisimcikler ve hücre volümündeki azalma ışık mikroskopik olarak gözlemlendi ayrıca hücrelerde kaspaz-3 ekspresyonu izlendi. Hücre proliferasyonundaki durdurma p21 ve p53 ekspresyonları üzerinden gerçekleşti.
- 50 mM VAP uygulanması, S fazındaki Ishikawa hücrelerinin tamamen inhibe olmasına neden oldu. Ayrıca hücrelerin tripan mavisi ile boyandıkları ve canlılıklarını yitirdikleri görüldü. Proliferasyon inhibisyonu p21 ve p53'den bağımsız gerçekleşti. Hücrelerde apoptoza dair bulgular ve kaspaz-3 ekspresyonu izlenmedi.
- Bulgularımız doğrultusunda, HDAC inhibitörü olarak çeşitli hücre soylarında terapötik olabilecek etkileri gösterilen VAP'ın, endometriyal hücre soyları üzerinde de benzer etkiler gösterdiğini; ancak potansiyel klinik kullanımının yapılacak daha ileri çalışmalarla mümkün olabileceği sonucuna varıldı.

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca kişiliği, deneyimi, bilgi birikimi ile daima yanımda olan ve bu çalışmanın ortaya çıkarılmasında büyük emeği geçen tez danışmanım değerli hocam sayın Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e,

Bilimsel gelişim sürecinde bana değerli desteğini sunmaktan kaçınmayan sayın Prof. Dr. Vildan KARPUZ'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında özverili ve sabırlı davranışlarıyla yardımlarını benden esirgemeyen Melike ERSÖZ'e ve Türkan SARIOĞLU'na,

Bu tezin ortaya çıkması için gerekli koşulları oluşturan ve destekleriyle her zaman yanımda olan İlknur KARAOSMANOĞLU başta olmak üzere tüm İstanbul Bilim Üniversitesi ailesi'ne,

Deney çalışmalarında kullandığımız Ishikawa hücre soyunu hediye ederek nezaket gösteren sayın Doç. Dr. Ümit A. KAYIŞLI'ya,

Eğitimim boyunca yardımlarını ve hoşgörülerini benden esirgemeyen, birçok şeyi paylaştığım ve bundan sonra da her zaman yanımda olacaklarına inandığım sevgili dönem arkadaşlarıma,

Bu günlere ulaşmamı sağlayan, maddi manevi her türlü destekle yanımda olan ve bana hep güvenen canım aileme,

EN İÇTEN TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

## 10. KAYNAKLAR

1. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update*. 2006, 12(5):617–30.
2. Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada A, Yoshimura Y. Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodeclin. *Endocrinology*. 2005, 146(12):5365-73.
3. Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004, 10(3):1141–9.
4. Richon VM, O'Brien JP. Histone Deacetylase Inhibitors: A new class of potential therapeutic agents for cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2002, 8(3):718-728.
5. Chittur SV, Sangster-Guity N, McCormick PJ. Histone deacetylase inhibitors: A new mode for inhibition of cholesterol metabolism. *BMC Genomics*. 2008, 9:507.
6. Li XN, Shu Q, Su JMF, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther*. 2005, 4(12):1912–22.
7. Xia Q, Sung J, Chowdhury W, Chen CL, Höti N, Shabbeer S, Carducci M, Rodriguez R. Chronic administration of valproic acid inhibits prostate cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2006, 66(14):7237-44.
8. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod*. 2004, 10(12):879–893.
9. Moore LK, Persaud TVN. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
10. Dahmoun M, Boman K, Cajander S, Westin P , Bäckström T. Apoptosis, proliferation, and sex hormone receptors in superficial parts of human endometrium at the end of the secretory phase. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999, 84(5):1737-43.
11. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. China, Mosby Elsevier, 2009.
12. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.

13. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G, EVAR Workshop Group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 2007, 3(4):365–77.
14. Sadler TW. Langman’s Medikal Embriyoloji. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005.
15. Mary Kay Mitchell. Nutrition across the life span. Philadelphia, Elsevier Health Sciences, 2002.
16. William F. Ganong. Review of medical physiology. Cambridge, McGraw-Hill Professional, 2005.
17. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2004, 10(1):29-38.
18. Wen L, Chen LH, Li HY, Chang SP, Liao CY, Tsui KH, Sung YJ, Chao KC. Roles of estrogen and progesterone in endometrial hemodynamics and vascular endothelial growth factor production. *J Chin Med Assoc*. 2009, 72(4):188-93.
19. Oettel M, Schillinger E. Estrogens and Antiestrogens I. Germany, Springer, 1999.
20. Salvetti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol*. 2007, 44(3):373-8.
21. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology. USA, Freeman, 2000.
22. [http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/s\\_liu/Html/Introduction.htm](http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/s_liu/Html/Introduction.htm)
23. Papeleu P, Vanhaecke T, Elaut G, Vinken M, Henkens T, Snykers S, Rogiers V. Differential effects of histone deacetylase inhibitors in tumor and normal cells-what is the toxicological relevance? *Crit Rev Toxicol*. 2005, 35(4):363-78.
24. Sturgeon CM, Knight ZA, Shokat KM, Roberge M. Effect of combined DNA repair inhibition and G2 checkpoint inhibition on cell cycle progression after DNA damage. *Mol Cancer Ther*. 2006, 5(4):885-92.
25. Marc J, Bellé R, Morales J, Cormier P, Mulner-Lorillon O. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol Sci*. 2004, 82(2):436-42.
26. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999, 39:295-312.

27. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect.* 1999, 107:5-24.
28. Morgan DO. The cell cycle: principles of control. UK, New Science Press, 2007.
29. Kumar V, Abbas AK, Robbins SL, Fausto N, Cotran RS. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. USA, Elsevier Saunders, 2005.
30. Niculescu AB 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* 1998, 18(1):629-43.
31. Medema RH, Klompaker R, Smits VA, Rijksen G. p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene.* 1998, 16(4):431-41.
32. Baccini V, Roy L, Vitrat N, Chagraoui H, Sabri S, Le Couedic JP, Debili N, Wendling F, Vainchenker W. Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood.* 2001, 98(12):3274-82.
33. McPherson RA, Bluth MH, Henry JB, Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 21st ed. USA, Saunders Elsevier, 2007.
34. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002, 1(8):639-49.
35. Fang L, Igarashi M, Leung J, Sugrue MM, Lee SW, Aaronson SA. p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene.* 1999, 18(18):2789-97.
36. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995, 9(10):1149-63.
37. Hirsch CL, Bonham K. Histone deacetylase inhibitors regulate p21WAF1 gene expression at the post-transcriptional level in HepG2 cells. *FEBS Lett.* 2004, 570(13):37-40.
38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007, 35(4):495-516.
39. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998, 82(11):1111-29.

40. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2004, 1:39-51.
41. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000, 64(4):821-46.
42. Payne TM, Molestina RE, Sinai AP. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci*. 2003, 116:4345-58.
43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4.section.3169>
44. Cervelló I, Martínez-Conejero J, Horcajadas J, Pellicer A, Simón C. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum Reprod*. 2006, 22(1):45–51.
45. BD Pharmingen™, BrdU In-Situ Detection Kit Instruction Manual. 2003, Cat No. 550803 ([wwwbdbiosciences.com](http://wwwbdbiosciences.com))
46. Conley BA, Wright JJ, Kummar S. Targeting epigenetic abnormalities with histone deacetylase inhibitors. *Cancer*. 2006, 107:832–40.
47. Vigushin DM, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs*. 2002, 13(1):1-13.
48. Pan L, Lu J, Huang B. HDAC Inhibitors: A potential new category of anti-tumor agents. *Cell Mol Immunol*. 2007, 4(5):337-43.
49. Hrzanjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, Denk H. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006, 5(9):2203-10.
50. Batty N, Malouf GG, Issa JP. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Lett*. 2009, 280(2):192-200.
51. Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta*. 2009, [Epub ahead of print]
52. Wu Y, Guo SW. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid induce cell cycle arrest and p21 expression in immortalized human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008, 137:198–203.

53. Gunin AG, Kapitova IN, Suslonova NV. Effects of histone deacetylase inhibitors on estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the mouse uterus. *J Endocrinol.* 2005, 185:539–49.
54. Botrugno OA, Santoro F, Minucci S. Histone deacetylase inhibitors as a new weapon in the arsenal of differentiation therapies of cancer. *Cancer Lett.* 2009, [Epub ahead of print]
55. Mehnert JM, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action. *Cancer J.* 2007, No.13(1):23-9.
56. Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* 2009, 277(1):8-21.
57. Dashwood HR, Myzak MC, Ho E. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis.* 2006, 27(2): 344–9.
58. Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett.* 2009. [Epub ahead of print]
59. [https://www.leaddiscovery.co.uk/reports/796/Histone\\_deacetylase\\_inhibitors](https://www.leaddiscovery.co.uk/reports/796/Histone_deacetylase_inhibitors)
60. Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 99(18): 11700-5.
61. Lagger G, Doetzelhofer A, Schuettengruber B, Haidweger E, Simboeck E, Tischler J, Chiocca S, Suske G, Rotheneder H, Wintersberger E, Seiser C. The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol.* 2003, 23(8):2669-79.
62. Jiang S, Dowdy SC, Meng XW, Wang Z, Jones MB, Podratz KC, Jiang SW. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in both Type I and Type II endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2007, 105(2):493-500.
63. Hoffmann K, Czapp M, Löscher W. Increase in antiepileptic efficacy during prolonged treatment with valproic acid: role of inhibition of histone deacetylases? *Epilepsy Res.* 2008, 81(2-3):107-13.
64. Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008, 68(1):1-11.



65. Santini V, Gozzini A, Ferrari G. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. *Curr Drug Metab.* 2007, 8(4):383-93.
66. Rebar RW, Erickson GF. Cecil Medicine, 23<sup>rd</sup> edition. 2007, Elsevier, USA.
67. Niklaus AL, Aubuchon M, Zapantis G, Li P, Qian H, Isaac B, Kim MY, Adel G, Pollard JW, Santoro NF. Assessment of the proliferative status of epithelial cell types in the endometrium of young and menopausal transition women. *Hum Reprod.* 2007, 22(6):1778-88.
68. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. Williams Textbook of Endocrinology. 2007, Elsevier, USA.
69. Castelbaum AJ, Ying L, Somkuti SG, Sun J, Ilesanmi AO, Lessey BA. Characterization of integrin expression in a well differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82(1):136-42.
70. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000, 92(15):1210-6.
71. Graziani G, Tentori L, Portarena I, Vergati M, Navarra P. Valproic acid increases the stimulatory effect of estrogens on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells. *Endocrinology.* 2003, 144(7):2822-8.
72. Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* 2003, 6(4):183-95.
73. Szalmás A, Kónya J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009, 19(3):144-52.
74. De la Cruz-Hernández E, Pérez-Cárdenas E, Contreras-Paredes A, Cantú D, Mohar A, Lizano M, Dueñas-González A. The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. *Virol J.* 2007, 4:18.
75. González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquère S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci.* 2005, 118:3091-102.

76. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101(52):18030-5.
77. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasmir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology*. 2008, 54(2):92-9.
78. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004, 16(6):663-9.
79. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006, 10(1):51-64.
80. Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Costantino L, Poli R, Bosco O, Boccuzzi G. Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, 90(3):1383-9.
81. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 2001, 276(39):36734-41.
82. Isojarvi JI, Tapanainen JS. Valproate, hyperandrogenism, and polycystic ovaries: a report of 3 cases. *Arch Neurol*. 2000, 57(7):1064-8.
83. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol*. 2009, 28(1):1-10.
84. Epping MT, Wang L, Plumb JA, Lieb M, Gronemeyer H, Brown R, Bernards R. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104(45):17777-82.