



**BİYOAKTİF BESİN BİLEŞENİ PİPERLONGUMİN'İN
HİSTON DEASETİLAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SÜMEYYE BORA
1188210104**

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Tez No: 2021 / 111**

DANIŞMAN: PROF. DR. TÜRKER BİLGEN

2021- TEKİRDAĞ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOAKTİF BESİN BİLEŞENİ PİPERLONGUMİN'İN HISTON
DEASETİLAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sümeyye BORA

1188210104

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Türker BİLGİN

Tez No: 2021 / 111

2021– TEKİRDAĞ

KABUL VE ONAY

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde Prof. Dr. Türker BİLGİN danışmanlığında

yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

...../...../.....

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Sümeyye BORA'nın "Biyoaktif Besin Bileşeni Piperlongumin'in Histon Deasetilaz Enzim İnhibitörü Etkisinin Araştırılması" başlıklı tezi günü saat 'da Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilda TURGUT

Enstitü Müdür

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam boyunca akademik bilgilerini, katkılarını ve tecrübelerini esirgemeyen, besinler ile genlerin karşılıklı etkileşimleri konusunda ayrıntılı bilgi sahibi olmamı sağlayarak ufkumu açan, kendileri ile çalışabilme şansını etmekten onur duyduğum sayın danışman hocam Prof. Dr. Türker BİLGEN' e,

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN' e, Doktora öğrencisi Hande AKALAN' a ve Öğr. Gör. Duygu KORUCU ERDEM' e,

Lisansüstü eğitimim süresince akademik bilgileri ve tecrübelerinden faydalandığım, kendilerinden ders alabilme fırsatı elde ettiğim, meslek hayatımın şekillenmesinde destek olan sayın Dr. Öğr. Üy. Çağlar DOĞRUER' e, Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN' a, Dr. Öğr. Üy. Çiğdem BOZKIR' a, Dr. Öğr. Üyesi Nazan TOKATLI DEMİROK' a, tez çalışmam dışında farklı çalışmalarda yer almamı sağlayan, bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan sayın Öğr. Gör. Dr. Ayşel ŞAHİN KAYA' ya ve T. N. K. Ü. Beslenme ve Diyetetik Bölümü mensuplarına,

Çalışmam boyunca yardım ve destekleri ile yanımda olan değerli sınıf arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan, bana her daim inanan ve yanımda olan değerli dedem, annem, babam ve kardeşim başta olmak üzere yakınlarıma ve arkadaşlarıma,

Teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bora S. Biyoaktif Besin Bileşeni Piperlongumin'in Histon Deasetilaz Enzim İnhibitörü Etkisinin Araştırılması, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2021. Beslenme ve Diyetetik alanında önemli bir yeri olan besin- gen etkileşimlerinin araştırılmasıyla besinlerin organizma üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması hedeflenmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalarla çeşitli besinlerdeki çok sayıda biyoaktif bileşen Histon Deasetilaz Enzimi İnhibitörü (HDACi) olarak tanımlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında, biyoaktif bir besin bileşeni olarak bilinen Piperlongumin'in (PL) HeLa ve HEK293T hücre soylarındaki HDACi etkisi deneysel olarak araştırılmıştır. PL'in HeLa ve HEK293T hücre soylarındaki HDACi etkisini tespit etmek için, öncelikle uygulanması planlanan LD50 dozları MTT ve AO/PI boyama yöntemleriyle tespit edilmiştir. NETN lizis yöntemi ile hazırlanan hücresel lizatlarda protein miktar tayini Bradford yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yürütülen deneysel çalışmalar ile; HDAC enzim aktivitesinin, 24 ve 48 saat PL uygulanması sonrasında HeLa hücrelerinde azaldığı, HEK293T hücrelerinde ise arttığı tespit edilmiştir. Normal koşullarda çoğaltılan HeLa ve HEK293T hücrelerinden hazırlanan lizatlar HDAC aktivite tayininden hemen önce PL ile doğrudan muamele edildiğinde ise, HDAC enzim aktivitesinin HeLa hücrelerinde istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı, HEK293T hücrelerinde ise azaldığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız PL'in HEK293T normal ve HeLa kanser hücre soylarında HDAC enzim aktivitesi üzerine farklı yönde etkisinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca sonuçlarımız HEK293T ve HeLa hücre soyları, hücre kültürü ortamında PL ile 24 ila 48 saat sürelerle muamele edildiğinde veya PL hücresel lizatlarla doğrudan muamele edildiğinde yine zıt yönde etkiler oluşabileceğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar PL ile HDAC enzimleri arasında doğrudan bir etkileşim olabileceği gibi PL' in HDAC enzim aktivitesi üzerinde dolaylı mekanizmalarla da etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: HDACi, Nutrigenetik, Epigenetik, Piperlongumin, Piplartin.

ABSTRACT

Bora S. Investigation of Histone Deacetylase Enzyme Inhibitory Effect of a Nutritional Bioactive Compound Piperlongumine, Tekirdağ Namık Kemal University, Institute of Health Science, Department of Nutrition and Dietetic, Postgraduate Thesis, Tekirdağ, 2021. It is aimed to better understand the effects of nutrients on the organism by investigating the nutrient-gene interactions that have an important place in the field of Nutrition and Dietetics. In recent studies, many bioactive components in various foods have been identified as Histone Deacetylase Enzyme Inhibitor (HDACi). In this thesis, HDACi effect of Piperlongumine (PL), known as a bioactive nutrient component, on HeLa and HEK293T cell lines was experimentally investigated. In order to determine the effect of PL on HDAC activity in HeLa and HEK293T cell lines, the LD50 doses planned to be applied were firstly determined by MTT and AO/PI staining methods. Protein quantification in cellular lysates prepared by the NETN lysis method was carried out by the Bradford assay. With the experimental studies carried out in this study, it was determined that HDAC enzyme activity decreased in HeLa cell lines and increased in HEK293T cell lines after 24 and 48 hours of PL applied. When lysates prepared from HeLa and HEK293T cells grown under normal conditions were treated directly with PL just before HDAC activity assay, it was determined that HDAC enzyme activity increased statistically significantly in HeLa cells and decreased in HEK293T cells. Our results showed that PL has a different effect on HDAC enzyme activity in HEK293T normal and HeLa cancer cell lines. In addition, our results demonstrated that the opposite effects can also occur when HEK293T and HeLa cell lines are applied with PL for 24 to 48 hours in cell culture medium or when cellular lysates applied directly with the PL. The results obtained show that there may be a direct interaction between PL and HDAC enzymes, also PL can be effective with indirectly mechanisms on HDAC enzyme activity.

Key words: HDACi, Nutrigenetic, Epigenetic, Piperlongumine, Piplartine.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nutrigenomik-Nutrigenetik.....	3
2.2. Epigenetik	6
2.2.1 DNA Metilasyonu	8
2.2.2. Histon Modifikasyonları.....	9
2.2.3. Kodlamayan RNA (ncRNA)	10
2.3. Histonların Asetilasyonu ve Deasetilasyonu	11
2.3.1. HDAC Enzimleri	11
2.3.2. HDAC Enzimi İnhibitörleri (HDACi).....	12
2.3.3. Histon Asetilasyonu ve Kansere İlişkisi	13
2.3.4. Histon Asetilasyonu ve Diğer Hastalıklar	14
2.3.5. Histonların Asetilasyonunu Etkileyen Besin Bileşenleri	17
2.4. Biyoaktif Besin Bileşeni Piperlongumin (Piplartin, PL).....	18
2.4.1. Piperlonguminin Kansere Üzerindeki Etkisi.....	18
2.4.2. Piperlonguminin Diğer Hastalıklar Üzerindeki Etkisi	20

3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Hücre Kültürü.....	22
3.2. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	23
3.3. Hücre Sayımı.....	23
3.4. HeLa ve HEK293T Hücrelerinde PL' in LD50 Dozlarının Tespit Edilmesi	24
3.4.1. MTT Deneyi.....	25
3.4.2. Akridin Oranj/Propidium İyodür (AO/PI) ile Hücre Canlılığı Testi	27
3.5. Hücre Lizatı Hazırlama ve Protein Miktar Tayini	27
3.5.1. Hücre Lizatı Hazırlama	28
3.5.2. Protein Miktar Tayini	30
3.6. HDAC (Histon Deasetilaz Enzimi) Aktivitesinin Tayini.....	32
3.7. İstatiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. PL LD50 Dozlarının Belirlenmesi	34
4.2. PL LD50 Dozları ile Muamele Edilmiş HeLa ve HEK293T Hücre Lizatlarında Protein Miktar Tayini.....	35
4.3.HDAC Aktivitesi Tayini	36
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AO/PI	Akridin Oranj/ Propidyum İyodür
BSA	Bovine Serum Albümin
CDKs	Sikline Bağımlı Kinazlar
COX2	Siklooksijenaz-2
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dH ₂ O	Distile Su
DMEM	Dulbescco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNMT	DNA Metil Transferaz
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
HAT	Histon Asetil Transferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HDACi	Histon Deasetilaz İnhibitörü
HEK293T	İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Soyu
HeLa	İnsan Servikal Kanseri Hücre Soyu
HGPS	Hutchinson- Gilford Progeria Sendromu
IL	Interlökin
IMQ	İmikimod

ISNN	Uluslararası Nutrigenetik/ Nutrigenomik Derneği
KCl	Potasyum Klorür
kg	Kilogram
LD50	Letal Doz (50)
μ L	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
m	Metre
μ m	Mikrometre
MTT	3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
NaCl	Sodyum Klorür
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum Fosfat
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
ncRNA	Kodlanmayan RNA
NF- κ B	Nükleer Faktör- Kappa B
nm	Nanometre
NP- 40	Tergitol
OD	Optik Dansite
PBS	Fosfat Salin Tamponu

pH	Bir Sıvının Asit veya Bazlık Derecesi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SAHA	Suberanilohidroksamik Asit
STAT	Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü
TAC	Tacrolimus
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Tris- HCl	Tris Hidroklorür
TSA	Trikostatin A
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Zn	Çinko
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

4.1	PL' in HEK293T hücrelerindeki 24 saat için geçerli LD50 dozunun MTT yöntemi ile tespit edilmesi.....	34
4.2	HEK293T hücrelerinde çeşitli dozlarda PL uygulamalarının Işık ve Floresan mikroskopundaki görüntüsü.....	35
4.3	Protein Standart Grafiği	36
4.4	Protein Standart Grafiği İçin Hazırlanan Bradford Deneyi Plaka Görünümü.	36
4.5	Kolorimetrik HDAC Testi Sonrası 96 Kuyucuklu Plakanın Görünümü	37
4.6	HeLa Hücrelerinde HDAC Aktivitesini Gösteren OD Değerlerinin Karşılaştırılması.....	38
4.7	HEK293T Hücrelerinde HDAC Aktivitesini Gösteren OD Değerlerinin Karşılaştırılması.....	41

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
2.1	HDAC Enzimlerinin Sınıflandırılması.....	12
2.2	HDACi Etkisi Olduğu Belirlenen Besin Öğeleri/Bileşenleri.....	17
3.1	NETN Lizis Tamponu.....	29
3.2	NETN Lizis Tamponu İnhibitörleri.....	29
3.3	PBS Tamponu.....	29
3.4	Stok BSA Standart Çözeltilisinden seri dilüsyonla hazırlanan protein çözeltileri ve OD değerleri.....	31
4.1	HeLa Hücrelerinde HDAC Aktivitesi Ortalama OD Değerleri.....	39
4.2	Hela Hücrelerinde PL Uygulamaları Sonrası HDAC Aktivitesi OD Değerlerinin İstatiksel Olarak Karşılaştırılması.....	39
4.3	HEK293T Hücrelerinde HDAC Aktivitesi Ortalama OD Değerleri.....	42
4.4	HEK293T Hücrelerinde PL Uygulamaları Sonrası HDAC Aktivitesi OD Değerlerinin İstatiksel Olarak Karşılaştırılması.....	42

1. GİRİŞ

Optimal beslenmenin, insan sağlığının sürdürülmesi ve çeşitli hastalıkların önlenmesindeki rolü yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Romani ve Banelli 2019; Nasir ve diğ. 2019). Diğer yandan insan genom projesi; besinler, genler ve hastalıklar arasındaki karşılıklı ilişkilerin belirlenmesine imkân sağlamıştır (Nasir ve diğ. 2019; Prasad ve diğ. 2011). Beslenme ve yaşam tarzının çeşitli epigenetik değişikliklere sebep olarak fizyolojik ve patolojik süreçleri etkileyebileceği tespit edilmiştir (Hardy ve Trygve 2011; Singh ve diğ. 2018; Zam ve Khadour 2017). Epigenetik değişikliklerden biri olan histon proteinlerinin asetilasyonu, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri tarafından düzenlenmektedir (Orlikova ve diğ. 2012; Vahid ve diğ. 2015; West ve Johnstone 2014). HDAC enzimleri üzerinde etkili olan Histon Deasetilaz Enzim İnhibitörleri (HDACi) doğal veya sentetik olarak elde edilen bileşikler olup; anormal HDAC fonksiyonu ile ilişkili çeşitli hastalıklarda terapötik olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Falkenberg ve Johnstone, 2014). Günümüzde HDAC inhibitörleri olan Vorinostat, Romidepsin, Panobinostat ve Belinostat lenfoma ve multipl miyelom tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca HDAC inhibisyonunun çeşitli nörodejeneratif hastalıklar, inflamasyon kaynaklı hastalıklar ve kardiyovasküler hastalık türlerinde de faydalı etkileri bulunmaktadır (Yoon ve Eom, 2016). Kanser üzerinde terapötik etkileri olan HDAC inhibitör ilaçlara ek olarak, HDAC inhibitör aktivitesine sahip olan besin bileşenleri de tespit edilmiştir (Rajendran ve diğ. 2011). Dolayısıyla histon asetilasyonunu değiştirebilen diyet bileşenlerinin çeşitli hastalıkların önlenmesi, geciktirilmesi veya tedavi edilmesinde yeni stratejiler sunması söz konusudur (Bassett ve Barnett, 2014).

Piperlongumin (PL), başlıca *Piper longum L.* bitkisinden elde edilen biyolojik olarak aktif bir bileşen olup, piplartin olarak da bilinmektedir (Bezerra ve diğ. 2013). PL' in antikanser etkisi başta olmak üzere antiinflamatuvar, antiaterosklerotik, antinosiseptif, anksiyolitik, antidepresan, nöroprotektif, antiarteriosklerotik, antimikrobiyal özellikler gibi biyolojik aktiviteler sergilediği bildirilmiştir (Henrique ve diğ. 2020; Huang ve diğ. 2020; Piska ve diğ. 2018). Literatür taramalarımız

PL'nin HDAC enzimleri üzerine etkisini araştıran yalnızca bir makale bulunduğunu göstermiştir (Thatikonda ve diğ. 2020).

Bu nedenlerle tez çalışmamızda, çeşitli hastalıklar üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilen PL biyoaktif besin bileşeninin HDACi aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nutrigenomik-Nutrigenetik

Sağlıklı yaşamın sürdürülmesinde beslenmenin önemi çok eski yıllardan beri bilinmektedir. Optimal beslenme, daha güvenli gebelik ve doğum, daha iyi gelişmiş bebek, çocuk ve anne sağlığı, daha güçlü bağışıklık sistemi, daha düşük bulaşıcı olmayan hastalık riski (diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar vb.), sağlıklı yaşlanmanın sağlanması ve uzun ömür ile ilişkilendirilmiştir. Fakat diyetin hücreleri moleküler düzeyde nasıl etkilediği tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir (Meiliana ve Wijaya 2020; Molina Serrano ve diğ. 2019; [<https://www.who.int/health-topics/nutrition>]). Ancak günümüzde teknoloji ve araştırma alanındaki ilerlemeler, besinlerin ve biyoaktif besin bileşenlerinin vücudumuzda hangi reaksiyonlara girdiğinin keşfedilmesine imkân sağlamaktadır (Nasir ve diğ. 2019). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2019 yılında yayınlanan Temel Beslenme Eylemleri raporuna göre; her bir bireyin hayatının her aşamasında optimum beslenmenin sağlanmasına sağlık hizmetlerinin daha fazla odaklanması gerektiği ve doğru beslenme yatırımlarının yapılması halinde 2025 yılına kadar 3,7 milyon hayat kurtarabileceği tahmin edilmektedir (WHO, 2019).

Günümüzde toplumun yeterli ve dengeli beslenmesini, beslenme ile ilgili hedeflerine ulaşmasını, sağlıklı yaşam biçimini geliştirmesini sağlamak amacıyla geleneksel beslenme alışkanlıkları göz önünde bulundurularak “Beslenme Rehberleri” oluşturulmaktadır. Bu rehberler ile kısa ve öz, bilimsel kanıtlara dayalı bilgiler sunulmaktadır (Camp ve Trujillo, 2014; Meiliana ve Wijaya, 2020; T.C. Sağlık Bakanlığı, 2016). Ayrıca Ulusal Bilimler Akademisi Tıp Enstitüsü (IOM- *Institute of Medicine*) Gıda ve Beslenme Kurulu (FNB- *Food and Nutrition Board*) tüm dünyadaki bireyler için besin enerji ve besin öğeleri referans değerleri (DRI- *Dietary Reference Intakes*) önermekte, bu doğrultuda toplumlara özgü referans değerleri oluşturulmaktadır [https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/Dietary_Reference_Intakes.aspx].

20. yüzyılın sonlarında gerçekleşen İnsan Genom Projesi ile besinler, genler ve çeşitli hastalıklar arasında karşılıklı ilişkilerin olduğunun keşfedilmesiyle nutrigenomik alanında ilerlemeler kaydedilmiştir (Meiliana ve Wijaya 2020; Nasir ve diğ. 2019). Metabolik, çevresel, sosyal ve genetik faktörlerin, besin intoleransları, besin alerjileri ve besin tercihleri dâhil olmak üzere biyolojik ve kültürel varyasyonlarla etkileşimlerinin; besinlere olan bireysel yanıt üzerinde etkili olması söz konusudur. Halk sağlığını iyileştirmek için önemli bir potansiyel olarak görülen genom analizleriyle bireysel yanıtlara uygun diyet müdahaleleri ve tedaviler yapılabilir. Bu bağlamda beslenme ile nutrigenomik alanlarının entegre çalışması gündemdedir. Uluslararası Nutrigenetik/Nutrigenomik Derneği (ISNN), beslenme kılavuzlarıyla, bireylerin fenotipik güncel beslenme durumlarıyla (örneğin; antropometrik, biyokimyasal ve metabolik analizleri, fiziksel aktivite düzeyi vb.) ve genotipe (nadir veya yaygın gen varyasyonlarına göre) göre kişiselleştirilmiş beslenmenin uygulanabileceğini önermektedir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019; Meiliana ve Wijaya, 2020). Gen-besin etkileşimleri çalışmalarının, beslenme alanındaki çalışmaların geleceği olacağı ön görülmektedir. Bununla birlikte bir bireyin tüm genom dizilemesini fayda sağlayacak tedavilere dönüştürmek; biyolojik ve tıbbi veriyi işleme stratejileri, klinik olarak anlamlı sonuçları belirleme becerisi, daha az zaman alması ve düşük maliyetle birlikte mümkündür (Camp ve Trujillo, 2014). Diyet-gen etkileşimlerinin anlaşılmasının kişiselleştirilmiş diyet tavsiyeleri üzerinde faydalı olmasının yanı sıra halk sağlığı tavsiyelerini ve bilimsel araştırmaları da iyileştireceği öngörülmektedir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019).

Günümüzde diyetisyenlerle işbirliği içerisinde, genetik test sonuçlarına göre kişiselleştirilmiş beslenme önerileri sunan şirketler bulunmaktadır [<https://www.nutrigenomix.com>] (Vallée Marcotte ve diğ. 2019). Diğer yandan Beslenme ve Diyetetik bölümü müfredatlarının çoğunda omik teknolojisi, genetik varyasyon bilgilerinin yorumlanması gibi alanlar dâhil olmak üzere ileri insan genetiğine dair eğitimler bulunmamaktadır. Amerikan Beslenme ve Diyetetik Akademisi, beslenme uzmanlarının beslenme genomiksini anlamak için genetik alanında ileri düzeyde bilgi ve beceriye sahip olunması gerektiğini belirtmiştir. Bu bağlamda diyetisyenlerin, nutrigenetik bilimi pratik diyetetikle birleştirmesi ve uygulaması, eleştirel bir şekilde incelemesi ve topluma uygun şekilde tercüme etmesi gerekmektedir. Diyetisyenlerin

ancak gerekli bilimsel çerçeveyi elde ederek bu bilgileri doğru bir şekilde klinik uygulamaya aktarabileceği ve beslenme uzmanı statüsünü koruyabileceği görüşü ileri sürülmüştür (Kaufman-shriqui ve diğ. 2020).

Beslenme genomiği veya nutrigenomik, besin öğeleri ve biyoaktif besin bileşikleri ile genom arasındaki her türlü etkileşimi inceleyen bilim dalıdır (Nasir ve diğ. 2019). Nutrigenetik veya kişiselleştirilmiş beslenme ise bireyler arasındaki genetik farklılıkların besin bileşenleri ile nasıl etkileşime girdiğini ve bu tür etkileşimlerden hangi sonuçların ortaya çıktığını anlamayı amaçlayan bilim dalıdır (Bordoni ve Gabbianelli, 2019; Meiliana ve Wijaya, 2020).

Kişiselleştirilmiş diyet tavsiyelerinin uyarlanması genotipik bilginin kullanılması, modern nutrigenomik çağının başlangıcından beri temel bir amaç olmuştur. Günümüzde, transkriptomikler (transkriptom çalışması, genom tarafından herhangi bir zamanda üretilen RNA transkriptlerinin tamamı), proteomikler (protein ekspresyonu ve işlevi çalışması) ve metabolomikler (hücrelerde ve biyolojik sistemlerde bulunan düşük molekül ağırlıklı moleküllerin incelenmesi), besin genom etkileşimlerinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Camp ve Trujillo 2014; Nasir ve diğ. 2019). Besinler; hücrel sensör sistemleri tarafından algılanan, gen ve protein ekspresyonunu ve dolayısıyla metabolit üretimini etkileyebilen diyet sinyalleri olarak ifade edilebilir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019). Bu bağlamda bireylere ait ayrıntılı beslenme bilgileri, yaşam tarzı, fiziksel aktivite ve mikrobiyomla birlikte entegre omik yaklaşımlarla kişiselleştirilmiş diyet tavsiyelerinin oluşturulması söz konusudur (Meiliana ve Wijaya 2020; Stols-Gonçalves ve diğ. 2019). Örneğin yapılan randomize kontrollü bir çalışma olarak 6 ay boyunca yürütülen *Food4Me* projesiyle, genotipe dayalı kişiselleştirilmiş diyet tavsiyelerinin, genel diyet tavsiyesine göre daha iyi anlaşıldığı ve beslenme planına uyumu artırdığı ayrıca Akdeniz diyeti gibi spesifik sağlıklı diyetlere bağlılığın, antropometrik parametreler üzerinde olumsuz bir genetik yükün üstesinden gelmek için yararlı etkileri olabileceği gösterilmiştir (Livingstone ve diğ. 2020).

Günlük beslenmede tüketilen besinler sadece bizim için önemli değil, aynı zamanda gelecek nesillerin sağlığını da etkileyebilir. Bu bağlamda en çok alıntı yapılan örneklerden biri olan *Agouti* fare modelinde, annenin diyetine göre

yavrularının gelişimin erken evrelerinde tüy rengi varyasyonu ve sağlıklı/sağlıksız fenotip farklılıkları gözlenmiştir. Başka bir örnek ise, proteinden yetersiz beslenen hamile farelerin yavrularında farklı gen ekspresyonları ve farklı DNA metilasyon modelleri belirlenmiştir. Ayrıca nesiller arası kalıtımı doğrulayan çalışmalar da mevcuttur. Bu bağlamda Hollanda kıtlığı çalışmasıyla, bir nesil boyunca açlık çeken bireylerin çocuklarında glikoz intoleransı ve metabolik bozukluk riskinin olduğu kaydedilmiştir. *Kalix* popülasyonu üzerinde yürütülen bir başka önemli çalışmada, aşırı yemek yiyen bireylerin torunlarında kardiyovasküler hastalıklar veya diyabet için artmış riski tetiklediği ortaya koyulmuştur (Kaspar ve diğ., 2020).

Umut verici kanıtlar olmasına rağmen; insan sağlığının korunmasında nutrigenetik, nutrigenomik ve epigenetik önemi olan diyetin etkili hale gelebilmesi için daha geniş çapta çalışmalara ihtiyaç vardır (Franzago ve diğ. 2020). Aynı zamanda beslenme üzerine yürütülen çalışmaların çoğunun gözlemsel ve epidemiyolojik çalışmalar olması sebebiyle besin-gen etkileşimine uygun hazırlanan beslenme planlarının kanıt düzeyinin geleneksel beslenme önerileri için kullanılan standartlara göre değerlendirilip değerlendirilemeyeceği tartışılmaktadır. Dahası, besinlerde bulunan binlerce bileşikten yalnızca bir kaçının nesiller arası epigenetik etkiler için test edildiği göz önüne alındığında, bu alanda daha fazla araştırma yapılması halk sağlığının geliştirmesi ve bir kamu politikası oluşturulması için gereklidir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019).

2.2. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisinin bağımsız olarak, gen ifadesinin kontrolünde önemli bir rol oynayan, geri dönüşümlü ve dokuya özgü kalıtsal değişikliklerdir (Ramos-Lopez ve diğ. 2017). Epigenetik mekanizmalar, normal büyüme ve gelişmeye dâhil olan genlerin ifadesinin düzenlenmesi ve hücre fonksiyonunun sürdürülmesi için gereklidir (Choi ve Friso, 2010). Epigenetik düzensizlikler ise embriyonik gelişim ve yaşlanma sürecinde etkili olmasının yanı sıra kanser, obezite, insülin direnci, diyabet, nörodejenerasyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi bulaşıcı olmayan metabolik hastalıkların gelişiminde rol oynadığı üzerine kanıtlar mevcuttur (Barrea ve diğ. 2020). Bu sebeple bu mekanizmaların klinik müdahale için

bir hedef olarak kabul edilmesi söz konusudur (Romani ve Banelli 2019; Russo ve Ungaro 2019; Wei ve diğ. 2016). Yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalarla; kimyasal, sosyal veya fiziksel faktörlere maruz kalmanın kardiyovasküler hastalık, diyabet ve kanser gibi çeşitli patolojilerle ilişkisi araştırılmaktadır. Diğer yandan biyolojik yapının karmaşıklığı ve hastalık oluşumunda etkili birçok faktörün olması sebebiyle, gen-çevre etkileşimleri ve epigenetik değişikliklerin göz önünde bulundurulması, çeşitli hastalıkların etiyojisinin tespit edilmesine katkı sunması söz konusudur. Herhangi bir hastalığın insidansı ve ilerlemesinde hem çevresel hem de genetik faktörlerin etkili olmasının yanı sıra genetik ve epigenetik katkılar arasındaki dengenin yaşam boyunca değiştiği düşünülmektedir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019).

Epigenetik, genlerin nasıl ve ne zaman susturulup etkinleştirileceğini düzenleyen bir süreçtir; epigenomik, bir hücredeki epigenetik değişikliklerin analizini ifade eder (Camp ve Trujillo, 2014). Epigenom, yaşamın erken dönemlerinde (prenatal, neonatal ve pubertal dönemlerde), beslenmeden toksik maddelere kadar çok sayıda çevresel faktörlere karşı daha duyarlı görünmekle birlikte, yetişkinlerde yaşlanma ve çeşitli hastalık süreçlerinde de etkili olabilmektedir. Ayrıca, germ hattı aktarımı olarak tanımlanan, nesiller arası kalıtımdaki rolü de gösterilmiştir (Bordoni ve Gabbianelli 2019; Molina Serrano ve diğ. 2019).

Besinler ve beslenme alışkanlıkları, bağırsak mikrobiyotası, sigara, alkol tüketimi, UV ışığı ve oksidatif stres çeşitli epigenetik değişikliklere sebep olabilmektedir (Cheng ve Deming, 2011; Romani ve Banelli, 2019). Ek olarak pestisitlerinde(kalıcı organik kirleticiler, arsenik, endokrin bozucular, çeşitli herbisitler ve böcek öldürücüler) epigenetik değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019).

Epigenetik olarak aktif olan besinlerin terapötik etkileri olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu besinler ve biyoaktif besin bileşenleri, fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alan genlerin ifadesini etkilemektedir (Russo ve Ungaro, 2019). Bu süreçlerin diyet veya belirli besinler yoluyla modüle edilmesi hastalıkların önlenmesinde ve sağlığın korunmasında etkili olabilir. Genistein, kurkumin, epigallocateşin-3-gallat ve resveratrol antiinflamatuvar etki gösteren ve metabolik

sendromla ilişkili bazı semptomları iyileştiren besin bileşenlerinden bazılarıdır ve bu yararlı etkilerin epigenetik süreçler yoluyla sağlandığı varsayılmaktadır. Fakat günümüzde epigenetik etkisinin olup olmadığı tanımlanmamış birçok besin bileşeni bulunmaktadır (Bordoni ve Gabbianelli, 2019). Besinler veya biyoaktif besin bileşenlerinin genler, diğer besin/besin bileşenleri ve yaşam tarzı faktörleriyle etkileşime girmesi sebebiyle her bir epigenetik modülasyon üzerindeki kesin etkisini ve bunların vücudumuzdaki fizyolojik ve patolojik süreçlerle olan ilişkilerini kesin olarak tanımlamak zorlu bir süreçtir. Dahası, her bir epigenetik fenomen bir diğerleriyle etkileşime girerek sistemin karmaşıklığına katkıda bulunmaktadır (Choi ve Friso, 2010). Bazı besin bileşikleri yalnız bir, bazıları ise birden fazla epigenetik değişiklik üzerinde etkili olabilmektedir. Örneğin; Folat, B12 vitamini, metiyonin, kolin ve betain tek karbon metabolizmasını değiştirerek hem DNA metilasyonunu hem de histon metilasyonunu etkileyebilir. Ek olarak, örneğin kuersetin gibi bazı besin bileşiklerinin birçok besin kaynağı bulunabilirken, bazı besin bileşenleri belirli bir besin türüne özgü olabilmektedir. Epigenetik bileşiklerin etkinliği yalnızca hedefledikleri yollara değil, aynı zamanda tüketim miktarına ve biyoyararlanımına da bağlı olmaktadır. Besinlerin epigenetiği modüle ettiği mekanizmalar hakkında nispeten az bilgi bulunmaktadır (Wei ve diğ. 2016).

Çeşitli hastalıkların oluşumu ve gelişiminde etkili kritik genlerin ifadesini değiştirmekten sorumlu olan epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve ncRNA'lar olmak üzere 3 ana başlık altına toplanmaktadır (Canani ve diğ. 2012; Choi ve Friso 2010).

2.2.1 DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu genlerin belirli bölgelerinde metil gruplarının bulunma veya bulunmama durumlarını ifade eder. Genel olarak hipometilasyon, gen ifadesinin aktive olmasına izin verirken; hipermetilasyon, gen ifadesini engeller (Camp ve Trujillo 2014; Wei ve diğ. 2016). DNA metilasyonu DNA metil transferaz (DNMT) enzimi tarafından katalize edilir. DNMT' ler ayrıca diğer epigenetik mekanizmaları katalize eden enzimlerle birlikte çalışır ve bu enzimlerin aktivitesindeki değişiklikler, çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynayabilir. Besinler ve biyoaktif besin

bileşenleri, DNMT' ları etkileyerek, DNA metilasyonunu ve ayrıca gen ifadesi ile yakından ilişkili olan, gene özgü promotor DNA dizilerinin metilasyonunu değiştirebilir (Choi ve Friso, 2010).

Metiyonin, kolin, betain, serin, B12, B6, B2, B9 vitaminleri, çinko, retinoik asit ve selenyum DNA metilasyonu üzerinde etkileri olduğu gösterilen besin bileşenlerinden bazılarıdır. Ek olarak biyoflavonoidler, çay kateşinleri ve kahve polifenolleri gibi bazı polifenoller, DNA metilasyonu ve DNMT aktiviteleri üzerinde önemli inhibitör etkiler gösterir (Bordoni ve Gabbianelli 2019; Link ve diğ. 2010; Pradhan ve diğ. 2019).

2.2.2. Histon Modifikasyonları

Toplam uzunluğu yaklaşık 2 m olan insan DNA'sı, histon proteinleri (her birinden 2 şer tane; histon 2A, histon 2B, histon 3 ve histon 4) ile paketlenerek nükleozom yapısını oluşturmakta ve 6 µm çapında olan hücre çekirdeğinde lokalize edilmektedir (Hałasa ve diğ. 2019). Nükleozom, DNA ve histonların modifikasyonları yoluyla transkripsiyonel süreçleri düzenleyebilen kromatinin yapı taşıdır (Molina Serrano ve diğ. ,2019; Nasir ve diğ. 2019). Kromatin yapı, gen ifadesinde önemli bir rol oynar ve genetik bilginin çekirdek içinde depolanmasından sorumludur. Kromatin, transkripsiyonel baskılanmaya yol açacak şekilde yoğunlaştırılabilir (heterokromatin) veya aktif transkripsiyonla sonuçlanan açık ve erişilebilir (ökromatin) olabilir. Metabolik olaylar sırasında kromatinin yapısı değişebilir (Nasir ve diğ. 2019).

Histonlar kromozomlara yapısal destek sağlar. Histon proteinleri, oktamer olarak adlandırılan sekiz proteinden oluşan bir kompleksle nükleozomları oluşturur. Nükleozom yapısındaki histon oktameri, her biri H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarını içeren iki parçadan oluşur. Histon H1 ise komşu histonları birbirine bağlamaktadır. Histonlar DNA paketlemesinin yanı sıra DNA metilasyonu ile birlikte gen ifadesinin düzenlenmesinde de rol alır (Bassett ve Barnett 2014; Molina Serrano ve diğ. 2019).

Histon proteinleri, bir küresel alan ve bir amino kuyruk alanı içerir. Histonların amino kuyruklarında bir dizi enzim tarafından asetilasyon, metilasyon,

ubikitinasyon, biyotininilasyon, sumoilasyon, ADP-ribosilasyon ve fosforilasyon gibi çeşitli geri dönüşümlü post-translasyonel modifikasyonlar meydana gelir. Histonların modifiye edilmesinden sorumlu enzimlerin çoğu, aynı zamanda, transkripsiyon faktörleri gibi bir dizi histon olmayan substrata da sahiptir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019; Choi ve Friso, 2010; Movafagh ve Munson, 2019).

Yüksek yağlı diyet, düşük proteinli diyet, kalori kısıtlaması ve bazı besin bileşenlerinin histon modifikasyonlarına neden olabileceği gösterilmiştir (Molina Serrano ve diğ. 2019).

Histon asetilasyonu, en kapsamlı incelenen histon modifikasyonlarından birisidir (Masumeh ve Fraidoon, 2019). Bu çalışma kapsamında '2.3. Histon Asetilasyonu ve Deasetilasyonu' başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Histonların metilasyonu, histon metiltransferazlar (HMT) ve histon demetilazlar (HDM) enzimleri tarafından gerçekleşir (Wei ve diğ. 2016). Tek karbon metabolizmasının koenzimleri olan B grubu vitaminler, DNA ve histon metilasyonu için metil grupları sağlamaktadır. Folat ve metionin eksikliği olması durumunda histon metilasyonunun azaldığı, gen ekspresyonunda değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Friso ve diğ. 2020).

Histon biyotininilasyonu, suda çözünür temel bir B vitamini olan biyotinin, biyotinidaz ve holokarboksilaz sentaz enzimleri tarafından katalize edilen spesifik lizin amino asitlerine biyotinin kovalent bağlanması yoluyla gerçekleşmektedir (Choi ve Friso, 2010).

Histonlarda asetilasyon, metilasyon ve biyotininilasyonun yanı sıra ubikitinasyon, sumoilasyon, ADP- ribosilasyon ve fosforilasyon da gerçekleşmektedir (Bordoni ve Gabbianelli, 2019; Choi ve Friso, 2010; Movafagh ve Munson, 2019).

2.2.3. Kodlamayan RNA (ncRNA)

Kodlamayan RNA'lar protein kodlamayan, fonksiyonel moleküller olarak tanımlanmıştır (Chen ve Xue, 2016;). ncRNA'lar sınıfında yer alan lncRNA'ların,

kromatinin yeniden şekillenmesiyle ilişkili olduğu, DNA metilasyonunu veya histonların durumunu değiştirerek epigenetik değişikliklerde rol aldığı gösterilmiştir (Zhao ve diğ. 2015).

2.3. Histonların Asetilasyonu ve Deasetilasyonu

Histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri histon asetilasyon dengesini düzenler (Masumeh & Fraidoon, 2019). HAT' lar, histonlara asetil grubunun eklenmesini (histonların asetilasyonu), HDAC' lar ise asetil gruplarının çıkarılmasını (histonların deasetilasyonu) sağlar. Hem HAT' lar hem de HDAC' lar, NF- κ B, STAT1-3 gibi transkripsiyon faktörleri, şaperon proteinleri, sinyal transdüksiyon medyatörleri, yapısal proteinler ve inflamasyon medyatörleri gibi aktivitesi asetilasyon durumuna bağlı olan çok sayıda histon olmayan proteinleri de modifiye edebilir. Histonların asetilasyon dengesinin bozulması çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Bassett ve Barnett 2014; Wei ve diğ. 2016).

2.3.1. HDAC Enzimleri

HDAC enzimlerinin histonların ve histon olmayan bazı proteinlerin deasetilasyonuna neden olması sonucu, transkripsiyonel baskılanma meydana gelir. HDAC' ler hücre döngüsünün ilerlemesi, hayatta kalması ve proliferasyon dâhil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonları düzenleyebilir. Günümüzde insanlarda dört sınıfa ayrılan 18 adet HDAC enzimi tanımlanmıştır: sınıf I HDAC' ler (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8) esas olarak çekirdekte lokalizedir, sınıf II HDAC' ler (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 ve HDAC10) belirli dokularla sınırlıdır ve hem nüklear hem de sitoplazmik bölümlerde mevcut olabilir, sınıf III HDAC' ler NAD bağımlı sirtuinlerdir (SIRT1–7), sınıf IV' e ise HDAC11 dâhil edilmiştir. Sirtuin olmayan HDAC' ler çinkoya bağımlı enzimlerdir HDAC enzimlerinin sınıflandırılması ve her bir enzimin kofaktörü Tablo 2.1'de gösterilmektedir (Dashwood ve Rajendran 2017; Seidel ve diğ. 2012; Singh ve diğ. 2018).

Tablo 2.1 HDAC Enzimlerinin Sınıflandırılması.

Sınıfı	Üyeleri	Kofaktörü
I	HDAC1	Zn ⁺²
	HDAC2	Zn ⁺²
	HDAC3	Zn ⁺²
	HDAC8	Zn ⁺²
IIa	HDAC4	Zn ⁺²
	HDAC5	Zn ⁺²
	HDAC7	Zn ⁺²
	HDAC9	Zn ⁺²
IIb	HDAC6	Zn ⁺²
	HDAC10	Zn ⁺²
III	SIRT1	NAD ⁺
	SIRT2	NAD ⁺
	SIRT3	NAD ⁺
	SIRT4	NAD ⁺
	SIRT5	NAD ⁺
	SIRT6	NAD ⁺
	SIRT7	NAD ⁺
IV	HDAC11	Zn ⁺²

2.3.2. HDAC Enzimi İnhibitörleri (HDACi)

HDAC enzimleri üzerinde etkili olan HDACi'ler doğal veya sentetik olarak elde edilen bileşiklerdir (Falkenberg ve Johnstone, 2014; West ve Johnstone, 2014). HDACi'ler, HDAC enzimlerini inhibe ederek, histonların asetilasyonuna neden olur. Histonların asetilasyonu ile kromatin yapısı gevşer ve böylece çeşitli genlerin ifadesi gerçekleşir. HDACi'ler ayrıca transkripsiyonel aktiviteye, hücre içi sinyal transdüksiyonuna ve DNA onarımına dahil olan histon olmayan proteinlerin asetilasyonunu sağlar. HDACi aktivitesi yoluyla ekspresyonu artan genler arasında, hepsi doğası gereği antineoplastik olan, hücre döngüsünün durmasını, apoptozu, DNA onarımını, immünojenliği ve azalmış anjiyogenezi teşvik edenler vardır

(Movafagh ve Munson, 2019; Penna ve Costelli, 2019). HDACi'ler anormal HDAC fonksiyonu ile ilişkili çeşitli hastalıklarda terapötik olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Falkenberg ve Johnstone, 2014).

Sentetik HDACi'lerin yanı sıra çeşitli sebze ve meyvelerin, tam tahılların, diyet lifinin, bazı mikro besin öğeleri ve yağ asitlerinin, HDAC aktivitesini inhibe ederek, çeşitli kanser türlerinde ve diğer hastalıklara karşı koruduğuna dair güçlü kanıtlar ortaya çıkmıştır (Bassett ve Barnett 2014; Singhal ve diğ. 2020). Diyetle alınan HDAC inhibitörlerinin, olası yan etkiler olmaksızın farmakolojik HDAC inhibitörleri ile benzer bir düzenleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla histon asetilasyonunu değiştirebilen diyet bileşiklerinin çeşitli hastalıkların önlenmesi, geciktirilmesi veya tedavi edilmesi için basit beslenme seçenekleri ile yeni stratejiler sunması söz konusudur. Örneğin; enflamatuar barsak hastalıkları durumunda belirli besin bileşenleri, histon asetilasyonunu modüle ederek enflamasyonu azaltması ve sonuçta kolon kanseri riskini azaltması söz konusu olabilir (Bassett ve Barnett, 2014).

2.3.3. Histon Asetilasyonu ve Kanser İlişkisi

HDACi'leri kanserin başlangıcı ve gelişimindeki çeşitli hücrel ve fizyolojik süreçlerde de etkin bir role sahiptir (Li ve Seto, 2016). HDACi'lerin, kolonik enflamasyonu azalttığı, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptozu uyardığı ve umut verici anti-kanser ilaçlar olarak geliştirildiği bilinmektedir. Vorinostat (SAHA), romidepsin, panobinostat, belinostat lenfomada ve multipl miyelom tedavisi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan sentetik HDAC inhibitörlerindedir (Gatla ve diğ. 2019; Park ve Kim 2020). Çevrimiçi klinik web sitesi olan www.clinicaltrials.gov adresinde, monoterapi veya kombinasyon tedavisi olarak HDAC inhibitörlerinin kullanılmış olduğu çok sayıda klinik çalışma bulunmaktadır (Losson ve diğ. 2016; Movafagh ve Munson 2019; Singh ve diğ. 2018). Diğer yandan sebzelerin, meyvelerin, tam tahılların, diyet lifi, belirli mikro besinlerin ve spesifik yağ asitlerinin bazı kanser türlerine ve diğer hastalıklara karşı koruduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. HDAC enzimini inhibe ettiği bilinen sülfurafan, diallil sülfid gibi bazı biyoaktif besin bileşenlerinin kanser hücrelerinde

epigenetik olarak susturulmuş genlerin ekspresyonunu etkilediği kaydedilmiştir. Besin kaynaklı ve sentetik HDAC inhibitörlerinin kanser kemoprevansiyonunda umut vaat ettiği bildirilmektedir (Losson ve diğ. 2016; Movafagh ve Munson 2019).

2.3.4. Histon Asetilasyonu ve Diğer Hastalıklar

Çeşitli kanser türlerinde, viral enfeksiyonlarda, kardiyovasküler komplikasyonlarda, otoimmün hastalıklarda ve böbrek hastalıkları da dâhil olmak üzere birçok hastalık durumunda anormal HDAC aktivitesi rapor edilmiştir. HDAC inhibitörleri, HDAC'lerin habis aktivitesini bloke etmek için tasarlanmış küçük moleküller olarak görülmektedir (Gatla ve diğ. 2019).

Yaşlanma sürecinde histonların asetilasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. HDAC inhibitörlerinin yaşam süresini uzatabilmesi dolayısıyla yaşlanmaya bağlı olarak oluşan hastalıkların önlenmesi üzerine çeşitli teoriler bulunmaktadır (Molina Serrano ve diğ. 2019). Olası bir senaryo, HDACi'lerin, ilerleyen yaşa bağlı olarak azalan histon deasetilasyonunu tersine çevirmesidir. HDACi'lerin ikinci olası mekanizması, uzun ömürle ilişkilendirilen genlerin transkripsiyonunu doğrudan aktive edebileceği yönündedir. HDAC inhibitörlerine ilişkin üçüncü bir olası mekanizmada HDAC inhibitörlerinin, ilgili genlerin aktivasyonu ile bozulmuş homeostaz dengesini yeniden kazandırabileceğidir. Dördüncü bir olasılık olarak HDAC inhibitörlerinin, histon olmayan proteinlerin asetilasyon durumunu değiştirerek, histon modifikasyonlarından bağımsız olarak uzun ömürü destekleyen sinyal kaskadlarını etkinleştirerek yaşam süresini düzenleyebilmesidir. Son olarak en olası senaryo, HDAC inhibitörlerinin çalışmalarda yer alan doza, hücre tipine ve ilaca bağlı olarak bu mekanizmaların kombinasyonları yoluyla hareket etmesidir. Mekanizma henüz tam olarak çözülmüş olmasa da, moleküler ve klinik öncesi seviyelerde yaşlanma sürecine faydaları açıktır (McIntyre ve diğ. 2019).

HDAC'ların beyin fonksiyonlarını, nörolojik gelişimi ve bozulmayı düzenlemede etkileri olduğu tespit edilmiştir (Falkenberg ve Johnstone, 2014). HDAC sınıf I için seçici inhibitör olan Merck60 ile tedavi edilen farelerin, anksiyete davranışının değiştirebileceği gözlenmiştir. Parkinson hastalığını tedavi etmek için fenilbütirat kullanılan bir klinik çalışma mevcuttur (McIntyre ve diğ. 2019). HDAC

inhibitörleri olan sodyum bütirat, SAHA ve Trikostatın A' nın Huntington Hastalığı üzerinde olumlu sonuçları elde edilmiştir (Bassi ve diğ. 2017). HDAC ve benzer epigenetik tedavilerin şizofreni için potansiyel terapötik seçenekler olduğu belirlenmiştir (Pang ve diğ. 2016).

HDAC inhibitörlerinin, glomeruloskleroz, tubulointerstisyel fibroz, lupus nefrit, polikistik böbrek hastalığı, böbrek hasarı ve diyabetik nefropati dahil olmak üzere birçok böbrek hastalığının prelinik modellerinde patogenezini azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (Gatla ve diğ. 2019).

Bütiratın, artmış insülin direnci, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkili inflamasyonun önlenmesi ve tedavisinde HDAC inhibitörü olmasının etkin olduğu öne sürülmektedir (Canani ve diğ. 2012). Diyabetik farelerle yürütülen bir çalışmada, sodyum bütirat ile tedavinin, miyokardiyal fonksiyonu iyileştirdiği ve kalp hipertrofini azalttığı belirlenmiştir. Yüksek yağlı diyetle beslenen başka bir çalışmada ise farelerin sodyum bütirat ile tedavisi, iyileştirilmiş adaptif termojenez ve yağ asidi oksidasyonu ile ilişkilendirilmiş, gelişmiş mitokondriyal fonksiyona bağlı olarak obezite ve insülin direnci üzerinde etkili olabileceği ortaya konmuştur. Farelerde yapılan bu çalışmalarla, yaşla birlikte işlevi azalan kardiyometabolik sistemin HDAC inhibisyonundan fayda sağladığını göstermektedir (McIntyre ve diğ. 2019). İnsülin direncinin iyileştirilmesinde, enflamatuar hasarının ve diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının önlenmesinde HDAC inhibitörlerinin olumlu sonuçları kaydedilmiştir (Christensen ve diğ. 2011).

Ateroskleroz üzerinde yürütülen çalışmalarda kullanılan HDAC inhibitörü konsantrasyonunun hastalık üzerinde farklı etkilere sahip olabileceği belirlenmiştir. Düşük dozda uygulanan HDACi' nin antiinflamatuvar özellikleri gözlenmişken, yüksek dozda HDACi uygulanması durumunda, proinflamatuvar fenotipe katkıda bulunduğu kaydedilmiştir (Gatla ve diğ. 2019).

Yapılan prelinik çalışmalar sonucu elde edilen bulgular; karaciğer yaşlanmasının artmış bir HDAC aktivitesi ile sonuçlandığını ve HDAC inhibitörlerinin epigenomu daha genç bir duruma geri döndürdüğü, steatozu önlediği ve rejeneratif potansiyeli geliştirdiği yönündedir (McIntyre ve diğ. 2019).

HDAC' lerin otoimmün hastalıklarda STAT3 ve NF- κ B yollarını etkilediği ve proinflamatuvar genlerin aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. HDAC inhibitörlerinin, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, multipl skleroz, sistemik skleroz, sedef hastalığı ve ülseratif kolit gibi otoimmün hastalıkların klinik öncesi modellerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Gatla ve diğ. 2019).

HDAC inhibitörlerinin, antiinflamatuvar etkisi bulunmaktadır. HDAC1, artrit hastalarının sinovyumunda yüksek oranda ifade edilir ve bu durum inflamasyon belirteçleriyle ilişkilendirilir. Hem fare hem de sıçanlarla yapılan kollajen kaynaklı artrit modellerinde HDAC inhibitörleri olan vorinostat ve MS-275' in kemik erozyonuna karşı koruyucu aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir. Böylece HDAC inhibisyonunun ilgili hastalıkları önlemenin yanı sıra tedavi edici olabileceği öne sürülmüştür (McIntyre ve diğ. 2019).

HDAC inhibitörü etkisi olan bütiratın antiinflamatuvar etkilerinin olduğu ve ülseratif kolitli hastalarda semptomlarda iyileşmeler sağladığı öne sürülmüştür (Canani ve diğ. 2012).

Hutchinson-Gilford Progeria Sendromu (HGPS), LMNA genindeki mutasyonların neden olduğu ve mutasyona uğramış bir lamin A öncüsü (progerin) birikimi, nüklear dismorfizm ve kromatin düzensizliği ile karakterizedir. Hem hücre hatlarında hem de HGPS hastalarından alınan hücrelerde, valproik asit ve TSA'nın progerin seviyelerini düşürdüğü, heterokromatin yapının, transkriptlerin yeniden düzenlendiği kaydedilmiştir. Erken yaşlanmanın bir başka kalıtsal formu olan Cockayne sendromu, nükleotid eksizyon DNA onarımında yer alan proteinleri kodlayan, UV radyasyonuna aşırı duyarlılığa ve deri altı yağ kaybına neden olan beş farklı gendeki mutasyonlardan kaynaklanır. CSB geninde mutasyon olan bireylerin fibroblastlarında, *Caenorhabditis elegans*'da ve farelerde, SAHA müdahalesinin, alfa-tübülün asetilasyonunu artırdığı, otofajik işlevi iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu bulgular HDAC inhibitörlerinin erken yaşlanma hastalıkları için tedavi sağlayabileceğinin yanı sıra geroprotektör olabileceğini de düşündürmektedir (McIntyre ve diğ. 2019).

2.3.5. Histonların Asetilasyonunu Etkileyen Besin Bileşenleri

HDAC inhibitörü etkisi olduğu belirlenen besin ögeleri ve bileşenleri Tablo 2.2' de yer almakla birlikte HDACi etkisi tespit edilmemiş birçok besin bileşeni bulunmaktadır (Bassett ve Barnett 2014; Busch ve diğ. 2013; Dashwood ve Rajendran 2017; Link ve diğ. 2010; Losson ve diğ. 2016; Myzak ve Dashwood 2006; Seidel ve diğ. 2012; Singh ve diğ. 2018; Singhal ve diğ. 2020).

Tablo 2.2 HDACi Etkisi Olduğu Belirlenen Besin Ögeleri/Bileşenleri.

Bileşiğin Kaynağı	Bileşiğin Adı
Sarımsak	Allil merkaptan
Sarımsak	Allisin
Sarımsak	Dialil disülfür
Diyet lifi (fermantasyonu ile)	Sodyum bütirat
Diyet lifi (fermantasyonu ile)	Sodyum propiyonat
Brokoli	Sülfarofan
Turpgiller	3, 3'- Diindolilmetan
Polifenollerin Metaboliti	Kafeik asit
Yeşil Çay	Kateşinler
Tarçın	Kummerik/ hidroksisinnamik asit
Zerdeçal	Kurkumin
Soya	Equol, genistein
Meyve ve Sebzeler	Flavonoidler, örneğin; apigenin
Meyveler, sebzeler, zeytinyağı ve kırmızı şarap	Chrysin
Acı Kavun	MCP30
Fewerfew	Partenolid
Osage Portakal	Pomiferin
Narenciye, elma, çilek	Kuarsetin
Üzüm, şarap, okaliptüs	Resveratrol
Brezilya fındığı	Selenyum bileşikleri
Zingiber zerumbet	Seskiterpenoidler
Fesleğen	Ursolik asit

2.4.Biyoaktif Besin Bileşeni Piperlongumin (Piplartin, PL)

Piperlongumin (PL), başlıca *Piper longum L.* bitkisinden elde edilen biyolojik olarak aktif bir bileşen olup, Piplartin olarak da bilinmektedir (Bezerra ve diğ. 2013). -20° C' de 2 yıla kadar saklanabilir (Tripathi ve Biswal, 2020). *Piper longum L.* bitkisi; piperlonguminin ve piperinin yanı sıra kateşin, epikateşin, mirisetin, apigenin ve luteolin gibi flavonoidlerinde içerir. PL, Hindistan ve diğer Güney Asya ülkelerinde çeşitli hastalıklar üzerinde (gastrointestinal şikayetler, solunum hastalıkları ve sıtma gibi bulaşıcı hastalıklar) geleneksel olarak kullanılmaktadır (Huang ve diğ. 2020; Liang ve diğ. 2020; Yadav ve diğ. 2020). PL, ilk kez 1961' de izole edilmiş, moleküler yapısı ise 1984' te belirlenmiştir (Piska ve diğ. 2018). PL' in kimyasal formülü $C_{17}H_{19}NO_5$ ' tir (Tripathi ve Biswal, 2020). Günümüzden yaklaşık 50- 60 yıl önce keşfedilmiş olan PL'in farmakolojik özellikleri yoğun bir şekilde araştırılmamış olmakla birlikte, bu molekülün başta antikanser etkisi olmak üzere antiinflamatuvar, antiaterosklerotik, antinosiseptif, anksiyolitik, antidepresan, nöroprotektif, antiarteriosklerotik, antimikrobiyal özellikler gibi biyolojik aktiviteler sergilediği tespit edilmiştir (Henrique ve diğ. 2020; Huang ve diğ. 2020; Piska ve diğ. 2018). PL' in çeşitli hastalıklar üzerindeki etkileri aşağıda özetlenmiştir.

2.4.1. Piperlonguminin Kanser Üzerindeki Etkisi

PL' in bilinen biyolojik aktiviteleri arasından antikanser etkisi farklı araştırma grupları tarafından daha kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarla PL' in sitotoksik, genotoksik, antitümör, antianjiyojenik, antimetastatik etkilerinin tespit edilmesiyle kanser üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Nan ve diğ. 2019; Piska ve diğ. 2018). Anabilim Dalı'mızda daha önce tamamlanan bir çalışmada PL' in serviks kanseri hücre dizisi olan HeLa hücreleri üzerinde apoptozu indükleyerek anti-kanser etki gösterdiği gözlenmiştir (Seber ve diğ. 2019). PL' in kanser hücrelerini seçici olarak inhibe ettiği, normal hücreler üzerinde bu etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Nan ve diğ. 2019; Rawat ve diğ. 2020). Ayrıca kronik inflamasyonun tümör oluşumu için uygun bir mikro ortam sağladığı dikkate alındığında, PL' in kanserin önlenmesi ve ilerlemesinde terapötik bir immünomodülatör potansiyeli olması söz konusudur (Henrique ve diğ. 2020). PL' in, 5- fluorourasil, cisplatin, doksorubisin,

paklitaksel ve kurkuminin gibi kemoterapötiklerin aktivitesi arttırdığı da belirlenmiştir (Piska ve diğ. 2018).

Bu bağlamda 2000 ve 2007 yıllarında Brezilya' da *Federal Ceará Üniversitesi Laboratório Nacional de Oncologia Experimental*' da 5166 örnek üzerinde gerçekleştirilen antikanser bileşiklerin keşfi ve geliştirilmesi için yapılan tarama programında PL, antikanser bileşiklerin geliştirilmesinde daha ileri çalışmalar için seçilen moleküllerden biri olarak belirlenmiştir (Piska ve diğ. 2018). Antikanser etkisi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda ise, PL ve/veya analogları kullanılarak kanser tedavisi için yöntemler sağlayan bir patent yayınlanmıştır (Bureau 2009; Liang ve diğ. 2020).

Çeşitli kanser hücre hatlarında ve hayvan modellerinde yapılmış prelinik çalışmalarla PL' in, inflamasyon, proliferasyon (örneğin; IL- 6, TNF- α ve COX2), hücre döngüsü regülasyonu (örneğin; siklin A, siklin D1, CDKs, p21 ve p53), anti- anjiyogenez, anti-invazif ve anti-metastaz yolları (örneğin; VEGF, NF- κ B ve STAT) ve hücrelerin hayatta kalmasında rol oynayan çeşitli moleküler mekanizmaları (örneğin, Bcl-2, survivin) etkilediği gösterilmiştir. Yapılan ileri çalışmalarla, PL'in kanser hücrelerinde, glutatyon S- transferaz π (GST π) ve karbonil redüktaz 1 (CBR1) inhibisyonu, ardından redoks homeostazının bozulması ve kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu arttıran prooksidatif bir bileşik olarak belirlenmiştir (Liang ve diğ. 2020; Mu ve diğ. 2020; Tripathi ve Biswal 2020).

Geçtiğimiz yıl yayınlanan bir sistematik derleme ile PL' in angiogenesis, migrasyon, proliferasyon, invazyon ve metastaz gibi çeşitli proliferasyon aktivitelerinin inhibisyonu yoluyla antikanser aktivitesi dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olmasının yanı sıra esas olarak ROS birikimi, DNA hasarı ve onkojenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin anormal ekspresyonunun modülasyonu yoluyla pro-apoptotik aktivite gösterdiğine değinilmiştir (Tripathi ve Biswal, 2020).

Yapılan literatür taraması sonucu PL' in etkili olduğu/olabileceği düşünülen bu moleküler mekanizmalar arasında HDAC enzimi üzerindeki etkisini araştıran sadece bir çalışma bulunmaktadır (Thatikonda ve diğ. 2020).

2.4.2. Piperlonguminin Diğer Hastalıklar Üzerindeki Etkisi

PL, antikanser etkilerinin araştırılmasının yanı sıra diğer alanlarda da incelenmiştir (Bezerra ve diğ. 2013).

In vivo ortamda ateroskleroz plak oluşumunu baskılamasının yanı sıra proliferasyon ve nükleer faktör-kappa B (NF-κB) aktivasyonunu önemli ölçüde azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (Bezerra ve diğ. 2013; Son ve diğ. 2012). Buna ek olarak PL, hem kardiyoprotektif hemde kardiyak hipertrofi ve fibrozun tedavisi için umut verici bir terapötik aday olabileceği öne sürülmüştür (J. Gu ve diğ. 2021; Wu ve diğ. 2018).

PL' in *in vitro* ortamda antidiyabetik potansiyeli değerlendirilmiş ve glikozun sorbitole dönüşümü ile ilişkili polyol yolundaki hız sınırlayıcı bir enzim olan rekombinant insan aldoz redüktazını inhibe etmesi sonucu diyabetik komplikasyonlarının azaltılmasında yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (Bezerra ve diğ. 2013).

PL, farelerde yapılan bir dizi deney sonucu önemli anksiyolitik ve antidepresan aktiviteler gösterdiği kaydedilmiştir (Bezerra ve diğ. 2013). Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, PL' in hipokampustaki nöronal inflamasyonun inhibisyonuna aracılık ederek antidepresan benzeri etkiler sergilediğini gösterilmiştir (Zhang ve diğ. 2019).

PL' in safra kanalı ligasyonunun neden olduğu karaciğer fibrozu tedavisinde etkili bir terapötik ajan olabileceği, güçlü hepatoprotektif ve antifibrotik aktiviteler sergilediği gösterilmiştir (Chilvery ve diğ. 2020).

Yaşlanmış hücrelerin yaşa bağlı birçok hastalıkta önemli bir rol oynadığını düşünülmektedir. Bu hücreleri seçici olarak öldüren senolitik ajanlar yeni bir terapötik yaklaşım olarak görülmektedir. PL' in de senolitik ajan olma potansiyeli ortaya konmuştur (Wang ve diğ. 2016). Yapılan bir hayvan çalışmada ise PL tedavisinin yaşa bağlı bilişsel bozukluk ve hipokampal değişikliklerin tedavisinde potansiyel yeni bir yaklaşım olabileceğini belirtilmiştir (Go ve diğ. 2018). PL' in immünomodülasyonda, otoimmün hastalıklarda ve inflamasyonla ilişkili nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceği gösterilmiştir

(Bezerra ve diğ. 2013; Kim ve diğ. 2018). PL' in, kolinesteraz seviyelerini düşürerek, nöroinflamasyonu azaltarak ve amiloid plak oluşumunu engelleyerek Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Ji ve diğ. 2020). Bir başka çalışmada PL' in NF- κ B sinyalleşmesini inhibe ederek amiloidogenez ve nöroinflamasyonu azaltarak Alzheimer hastalığının tedavisi için etkili olabileceği gösterilmiştir (S. M. Gu ve diğ. 2018). Parkinson hastalığı patogenezinde apoptoz ve makrotofaji/otofajinin kilit rol oynadığı dikkate alınarak yapılan bir çalışmada, PL' in apoptoz ve otofaji arasındaki dengeyi yeniden sağlayarak terapötik etkiler gösterdiği ortaya konmuştur (Liu ve diğ. 2018).

PL' in insan T hücrelerinde, redoks dengesini prooksidatif bir ortama doğru değiştirerek otoimmün bozuklukları kontrol etmek için yeni bir seçeneği olabileceği öne sürülmüştür (Liang ve diğ. 2020). PL' in deneysel bir otoimmün ensefalomiyeliti (EAE) üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışma ile, NF- κ B sinyal yolunu inhibe ederek miyelin oligodendrosit glikoprotein ile indüklenen EAE semptomlarını, makrofajların ve T hücrelerinin aktivasyonunu hafifleterek Multipl skleroz tedavisi için faydalı olabileceği öne sürülmüştür (S. M. Gu ve diğ. 2017). PL' in fibroblast benzeri sinoviyositlerin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu inhibe ederek romatoid artrit tedavisi için terapötik potansiyele sahip olabileceğini gösterilmiştir (Xu ve diğ. 2018).

Fareler üzerinde ovalbumin ile astımın indüklendiği bir çalışmada PL'in NF- κ B sinyalini inhibe etmesi yoluyla astımlı farelerde hava yolu inflamasyonunu azaltabildiğini gösterilmiştir (C. Lu ve diğ. 2019).

PL' in insan beyni mikrovasküler endotel hücrelerinde, Vero hücrelerinde ve insan umbilikal ven endotel hücrelerinde Zika virüsü replikasyonunu inhibe ettiğini bulmuştur (W. Lu ve diğ. 2020). PL' in paraziter bir enfeksiyon olan Şistozomiyaza üzerinde etkili bir bileşik olabileceği belirtilmiştir (Mengarda ve diğ. 2020).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma kapsamında öncelikle PL'in HeLa ve HEK293T hücreleri üzerindeki 24 saat için geçerli yaklaşık LD50 dozları MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Belirlenen LD50 dozlarının geçerliliği faz kontrast ışık mikroskobu ve AO/PI boyama sonrası floresan mikroskopta görüntüleme yöntemi ile desteklenmiştir. Tespit edilen LD50 dozlarının HeLa ve HEK293T hücrelerinde HDAC aktivitesi üzerindeki etkileri ise kolorimetrik HDAC aktivite tayin yöntemi ile belirlenmiştir. HDAC aktivite tayini öncesinde hücre lizatları NETN Lizis yöntemi ile elde edilmiş ve ayrıca hücresel lizatlardaki protein miktar tayini ise Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın hücre kültürü ve PL uygulama basamaklarını içeren deneysel çalışmaları Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü laboratuvarında; MTT, protein miktar tayini, floresan mikroskop analizleri ve kolorimetrik HDAC aktivite tayini ise Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (NABİLTEM) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada daha önce *American Type Culture Collection* (ATCC) hücre kültürü bankasından satın alınarak daha önce deneylerde kullanılmış ve çoğaltarak -86° C' de derin dondurucuda dondurularak saklanmış insan servikal kanseri hücre soyu olan HeLa ve insan embriyonik böbrek hücre soyu olan HEK293T hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan HeLa hücreleri, ilk olarak 1951 yılında servikal kanseri olan *Henrietta Lack* isimli hastanın kanser dokularının laboratuvarında kültürü ile elde edilmiştir (Akçali, 2010). HEK293T hücre hattı ise 1973 yılında normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin Adenovirüs-5 ile transforme edilmesiyle üretilmiştir (Abdulvahid Kalkan ve diğ. 2018). Dondurulmuş olan bu hücreler oda sıcaklığında tutularak çözülmüştür. Çözünen hücre süspansiyonu % 10 serum içeren besiyerine aktarılarak 37° C' de, % 5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında hücreler *Dulbescco's Modified Eagle' s Medium* (DMEM) besiyerinde

rutin olarak haftada 2 kez hücre yoğunluğu % 80-90 olana kadar inverted mikroskop ile takip edilmiş ve hücre kültürünün devamlılığı sağlanmıştır.

3.2. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin *in vitro* ortamda normal metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli ideal kültür ortamı besiyerleri ile sağlanır. DMEM yaygın olarak kullanılan besiyerlerinden birisidir. Besiyerlerine hücre çoğalmasını ve tutunması sağlayan ve çok sayıda büyüme faktörü, mineral, lipit ve hormonları içeren çeşitli serumlar ve hücrelerin gelişimini desteklemek amacıyla glukozu ek olarak glutamin de gerekmektedir. Fizyolojik pH' yı ve osmotik basıncı sağlamak amacıyla ise dengeli tuz çözeltisi kullanılır. Ek olarak oluşabilecek kontaminasyonları önlemek için antibiyotikler kullanılmaktadır (Koçaklı ve diğ. 2015).

Her iki hücre hattının normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi laboratuvar ortamında sağlayan DMEM besiyeri için ilk aşamada +4 °C'de 10 g toz DMEM, 900 ml distile suda çözülerek +4 °C 3, 7 g sodyum bikarbonat eklenmiş ve pH 7, 2- 7, 6 olarak ayarlanmıştır. Sonrasında filtre yerleştirilen bir steril şişeye 2, 5 ml *amphotericine*, 150 ml Fetal Sığır Serum (FBS), 10 ml *peniciline/streptomycin*, 10 ml L- glutamin eklenmiş ve üzeri distile su ile 1 litreye tamamlanarak tamamı filtre edilmiştir. Hazırlanan bu besiyeri +4 °C' de saklanmıştır.

Besiyeri hazırlığı için gerekli olan FBS -20 °C' de saklanmış ve taşınması soğuk zincirle yapılmıştır. Stok serum kullanılmadan önce 56 °C'de 1 saat ısı ile inaktive edilmiştir. *Peniciline/streptomycin* kullanıma hazır halde satın alınmış ve – 20 °C' de saklanmıştır. Fosfat tamponu ticari olarak tablet halinde kullanıma hazır biçimde temin edilmiştir. +4 °C' de saklanmıştır. Kullanılmadan önce bidistile su içerisinde çözülmüştür. Kullanılan Tripsin-EDTA ticari olarak kullanıma hazır biçimde temin edilmiştir. Kullanımdan önce 0,22 µm' lık milipor filtreden süzülerek steril hale getirilmiş ve – 20 °C' de saklanmıştır.

3.3. Hücre Sayımı

Hücrelerin sayısı Hematositometre ile belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında hücre sayısının tespit edilmesi ile hücrelerin aktivitesi ve deney

koşullarının hücre üzerindeki etkisi belirlenmektedir (Koçaklı ve diğ. 2015). Hematositometre, üzerinde kareler olan hücre sayımına imkan veren bir araçtır (Crowley ve diğ. 2016).

MTT ve AO/PI boyama hücre canlılığı deneylerine başlamadan önce HEK293T hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hematositometre ve ışık mikroskobu kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla tripsinizasyon işlemi sonrası toplanan hücre süspansiyonu homojen hale getirilerek 10 µl' si Hematositometre' ye koyulmuş ve hücre sayımları mikroskopta yapılmıştır.

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam hücre sayısı/ml} = \text{Hematositometre sayım sonucu} \times 10.000$$

3.4. HeLa ve HEK293T Hücrelerinde PL' in LD50 Dozlarının Tespit Edilmesi

Kimyasal ve biyolojik maddeler ya da fiziksel etkenler, hücreleri değişik derecelerde etkileyerek sitotoksositeye yol açabilirler. Bir maddenin biyolojik davranışının anlaşılabilmesi için hücreler üzerindeki toksik etkisinin belirlenmesi gereklidir (Toruk ve Aksoy, 2017).

Sitotoksitenin belirlenmesinde LD50 dozundan faydalanılmaktadır. LD öldürücü doz (*Lethal Dose*) anlamına gelmektedir. LD50 dozu, hücrelerin % 50' sinin (yarısının) ölümüne neden olan konsantrasyondur.

Farklı mekanizmalara ve hassasiyetlere sahip çok sayıda sitotoksosite testi bulunmaktadır. Bu çalışmada sitotoksosite yöntemlerinden MTT ve ayrıca ilave olarak canlı/ölu hücre ayırımına görsel olarak imkân veren AO/PI floresan boyama yöntemleri ile HEK293T hücrelerinde PL için LD50 dozu tespit ve teyit edilmiştir. HeLa hücrelerinde 24 saat için geçerli olan LD50 dozu ise daha önceki çalışmalarımızla belirlenmiştir (Seber ve diğ. 2019). Bu nedenle tez çalışmaları kapsamında yalnızca HEK293T hücreleri için LD50 dozu belirlenmiştir.

MTT deneyine 3×10^4 HEK293T hücresi ile başlanmıştır. HEK293T hücrelerine PL için yapılan MTT deneyinde kullanılması planlanan konsantrasyonlar literatür bilgisinden yola çıkılarak belirlenmiştir. PL, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 2500 μM 'lık ana stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra ana stoktan DMSO ile dilüsyon yapılarak 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM , 120 μM , 160 μM , 200 μM , 240 μM , 360 μM PL son konsantrasyonları olacak şekilde uygulama dozları kullanılmıştır.

3.4.1. MTT Deneyi

Sarı renkli olan MTT ([3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]) bileşiği, hücre ortamına eklendiğinde canlı hücreler tarafından tutulur ve mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Bu olay mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi tarafından gerçekleştirilir ve bu enzimin aktivitesi değerlendirilerek hücre canlılığı kolorimetrik ve kantitatif olarak tespit edilir (Kumar ve diğ. 2018).

Kullanılan Malzemeler

1. MTT Kiti (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay, Thermo Fisher Scientific)
2. 6' lı kültür kaplarında *in vitro* hücre kültürü ortamında çoğaltılan HEK293T hücreleri
3. DMEM Besiyeri
4. 96 kuyucuklu ELISA plakası
5. ELISA plaka okuyucu (Termofisher)
6. Pipet uçları (10 μl ve 100 μl)

Yapılan İşlemler

Bu ölçüm için 96 kuyucuklu mikroparka kullanılmıştır. HEK293T hücrelerinin 24 saat süre ile mikroparkalarda tutunması beklendikten sonra hücreler

her kuyucuğa 100 µl besiyeri içerisinde 3 x 10⁴ hücre olacak şekilde ve her doz için 3 tekrar olacak şekilde aktarılmıştır.

Çalışmada kullanılan HEK293T hücrelerinde MTT testi (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay, Thermo Fisher Scientific) için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

1. Besiyeri tamamen boşaltılarak 100 µL taze besi yeri ile değiştirilmiştir.
2. Her bir kuyucuğa daha önce 12 mM konsantrasyonda hazırlanan MTT stok çözeltisinden 10 µL eklenmiştir. (Yalnızca 100 µL besi yerine ilave edilen 10 µL MTT stok çözeltisi negatif kontrol kuyucuğudur.) (MTT solüsyonu 5 mg/ml olacak şekilde fosfat tamponlu salin (PBS) içinde çözülüp steril filtrasyon ile bir şişeye transfer edilerek hazırlanmıştır.)
3. Mikroplakalar 4 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir.
4. Her bir kuyuya 100 µL SDS- HCl (Sodyum Dodesil Sülfat- Hidroklorik Asit) çözeltisi ilave edilmiş ve pipetaj yapılarak iyice karıştırılmıştır.
5. Mikroplaka 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat inkübasyon sonunda MTT solüsyonu kuyucuklardan çekilmiş ve kuyucukların üzerine MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 200 µL DMSO eklenmiştir.
6. Bir pipet kullanarak her örnek tekrar karıştırılmış, optik dansite (OD) değerleri 570 nm’ de ELISA okuyucuda okunmuş ve elde edilen OD değerlerine göre sitotoksisite düzeyi belirlenmiştir. Sitotoksisite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$1 - (\text{Test kuyucuğunun absorbansı} / \text{kontrol kuyucuğunun absorbansı}) \times 100$$

PL için HEK293T hücrelerinde geçerli olan LD50 dozu kontrol gruplarının absorbans değerlerinin deney grubu ile karşılaştırılmasıyla tespit edilmiştir (Kontrol grubunun OD oranları, hücre canlılığı için % 100 olarak kabul edildi). Test edilen konsantrasyonlar ve OD değerleri Sigma Plot 10.0 programı ile değerlendirilerek hazırlanan grafik yardımıyla HEK293T hücrelerinin % 50’ sini öldüren LD50 doz değerleri belirlenmiştir.

3.4.2. Akridin Oranj/Propidium İyodür (AO/PI) ile Hücre Canlılığı Testi

Nükleik asit bağlayıcı boyalar olan Akridin Oranj (AO) ve Propidyum İyodür (PI) ile hücrelerin canlılığı tespit edilebilir. Akridin Oranj, hem canlı hem de ölü hücrelere nüfuz edebilen bir boyadır ve canlı hücrelerin yeşil renk almasını sağlar. Diğer yandan PI yalnızca zayıf membran bütünlüğüne sahip ölü hücrelere girebilir ve kırmızı renge boyar. Böylece canlı ve ölü hücreler tespit edilir.

Kullanılan Malzemeler

1. Akridin Oranj/Propidium İyodür boyası.
2. HEK293T hücre soyu.
3. Floresan Ataçmanlı Işık Mikroskobu (Leica-DM 2500).
4. PL.

Yapılan İşlemler

MTT deneyine paralel olarak, belirtilen konsantrasyon ve sürelerde PL'e maruz bırakılan HEK293T hücreleri, besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 5 µL AO/PI boyası ile 10 dakika karanlıkta bekletilerek boyanmıştır. AO/PI ile boyanan hücreler Floresan Ataçmanlı Işık Mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

3.5. Hücre Lizatı Hazırlama ve Protein Miktar Tayini

HDAC Aktivite Test Kiti ile HEK293T ve HeLa hücrelerinin HDAC aktivitesini belirlemeden önceki bu aşamada hücre lizatları elde edilmiş ve elde edilen hücre lizatlarında protein miktarları belirlenmiştir. Hücre lizatları NETN Lizis yöntemi ile, protein miktarları ise Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir.

3.5.1. Hücre Lizatı Hazırlama

Organlarda, dokularda ve hücre içerisinde bulunan proteinlerin analiz edilebilmesi için önce hücrenin dışına, bir sıvı içerisinde çıkarılmalıdır. Bu sıvı genellikle proteinlerin fizyolojik özelliklerini koruyabilecekleri bir tampondur. Bu tampon içerisinde hücre zarını parçalayacak ajanlar, pH' ı uygun seviyede tutacak tamponlar, proteaz inhibitörleri ve proteinlerin maksimum miktarda elde edilebilmesini sağlayan maddeler bulunmalıdır. Organ, doku ya da hücreler özelliklerine bağlı olarak bistüri, bıçak, makas, havan, sonikatör, grender ve blender gibi araçlar kullanılarak lizat haline getirilirler. Proteinleri hücre içerisinde tutan hücre zarının kırılmasından sonra oluşan protein ve nükleik asit çözeltisine hücreden arındırılmış lizat (*cell-free lysate*, CFL) adı verilir. CFL' lerdeki nükleik asit ve diğer protein dışı maddeler genellikle santrifüj kullanılarak uzaklaştırılır.

Çalışmamızda öncelikle hücre lizatlarının tayini için en uygun yöntemi bulmak amacıyla literatürde daha önce benzer amaçlarla kullanıldığı bildirilmiş olan TritonX-100, NETN ve dondurup-çözme yöntemleri ile hazırlanan hücresel lizatlar test edilmiştir. Ön çalışmamız neticesinde üç yöntem içerisinde HDAC Aktivite Test Kiti ile en iyi sonucu veren yöntemin NETN yöntemi olduğu tespit edilmiş ve sonraki basamaklarda hücre lizatı hazırlamak için NETN lizis yöntemi kullanılmıştır.

Kullanılan Malzemeler

1. 6'lı kültür kaplarında *in vitro* hücre kültürü ortamında çoğaltılan HeLa ve HEK293T hücreleri
2. NETN Lizis Tamponu
3. Halt Proteaz ve Fosfataz İnhibitörü Tek Kullanımlık Kokteyl (100X) (*Thermo Scientific # 78442*)
4. PBS
5. Buz
6. Soğutmalı santrifüj
7. Plastik santrifüj tüpü (1, 5 ve 15 ml)

Solüsyonların Hazırlanması

Deneylerde kullanılan NETN Lizis tamponun Tablo 3.1’de, NETN Lizis tamponu inhibitörlerinin Tablo 3.2’ de ve PBS tamponunun Tablo 3.3’de içerikleri yer almaktadır:

Tablo 3.1 NETN Lizis Tamponu.

Stok	Kullanılan Miktar	Final Konsantrasyon
5 M NaCl	5 ml	250 mM
0.5 M EDTA, pH 8,0	1 ml	5 mM
1 M Tris- HCl, pH 8,0	5 ml	50 mM
NP- 40 (IGEPAL CA- 630)	0,5 ml	% 0,5
dH2O	88,5 ml	

Tablo 3.2 NETN Lizis Tamponu İnhibitörleri.

Stok	Hacim	Final Konsantrasyon
Ice cold NETN Lysis Buffer	10 ml	
100X Halt Protease Phosphatase Inhibitor CockTail	0,1 ml	1X

Tablo 3.3 PBS Tamponu.

İçerikler	Kullanılan Miktar	Final Konsantrasyon
NaCl	8,0 g	137 mM
KCl	0,20 g	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄	0,23 g	1,9 mM
Na ₂ HPO ₄	0,12 g	0,8 mM
dH2O	1L	

Yapılan İşlemler

1. log fazında ve sağlıklı olan HeLa ve HEK293T hücreleri 6' lı polistiren hücre kültür kaplarının % 80'ini kapladığında deney başlatılmıştır.
2. Ortam aspire edilmiş ve deneyin tüm aşamalarında kültür kapları buz üzerinde tutulmuştur.
3. 10 ml soğuk PBS ile bir kez hafifçe hücre tabakası yıkanmış, fazla PBS aspire edilmiştir.
4. Her plakaya İnhibitörlü 200 ila 400 µl NETN Lizis Tamponu eklenmiş ve tamponu dağıtmak için karıştırılmıştır.
5. Hücre kazıyıcı ile hücreler kazınmış ve hücre lizatları 1 ml pipet ve uç kullanarak 15 ml' lik konik dipli plastik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
6. Hücre Lizatları 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
7. 4° C' de 5 dakika boyunca 13.000 g hızda santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatantı yeni 1, 5ml lik plastik tüplere toplanmıştır.
9. Lizat deneyin sonraki aşamalarına kadar -20° C' de saklanmıştır.

3.5.2. Protein Miktar Tayini

Tüm deney gruplarından NETN lizis yöntemiyle hazırlanan HeLa ve HEK293T hücreli lizatlarında protein miktar tayini Bradford yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Protein miktar tayini için ticari bir protein test kiti (Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit) kullanılmıştır. Elde edilen hücreli lizatlarda protein miktar tayinleri Bovine Serum Albümin (BSA) ile yapılan ölçümler ve Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

Bradford yöntemi, bir tür boya olan Commasie Brilliant Blue G- 250'in farklı konsantrasyonlarındaki protein çözeltilerinde farklı derecelerde mavi renk oluşturmasına dayanmaktadır. Boyanın proteine bağlanmasıyla birlikte kırmızı renkten mavi rene

dönüşüm gözlenmektedir (Bradford, 1976). Protein tayini yapılabilmesi için standart grafik oluşturulması gerekmektedir.

Bu çalışmada kapsamında BSA' dan 100 mg tartılmış ve 200 mL distile su ile çözülerek konsantrasyonu 0,5 mg/mL olan stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra ½ oranında seri dilüsyonla 9 adet standart çözelti hazırlanmıştır. Spektrofotometre' de ölçülerek standart grafiği oluşturulmuştur.

Çalışmada kullanılan dilüsyon oranları ve karşılık gelen BSA konsantrasyonları Tablo 3.4' de yer almaktadır.

Tablo 3.4 Stok BSA Standart Çözeltisinden seri dilüsyonla hazırlanan protein çözeltileri ve OD değerleri.

Standartlar	Dilüsyon Oranı	Konsantrasyon (mg/mL)	OD Değerleri
1	1	500	0,4815
2	½	250	0,4435
3	¼	125	0,3285
4	1/8	62,25	0,2270
5	1/16	31,125	0,1110
6	1/32	15,4625	0,0545
7	1/64	7,8125	0,0285
8	1/128	3,89	0,0120
9	1/256	1,94	0,0085

Kullanılan Malzemeler

1. HeLa ve HEK293T hücresel lizatları
2. Bradford protein assay kit (Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit)
3. Plastik satrifüj tüpleri (1,5 ml)
4. 96 kuyucuklu ELISA plakası
5. Spektrofotometre
6. BSA

Yapılan İşlemler

1. 1 µl hücre lizatı ile 1 ml Bradford protein assay solüsyonu; 1,5 ml lik plastik santrifüj tüpü içinde karıştırılarak 5 dk karanlıkta inkübe edilmiştir.
2. Her örnekten 100 µl ve her örnek için 3 tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu ELISA plakasına aktarılmıştır.
3. Süre sonunda 96 kuyucuklu ELISA plakası 595 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutularak OD değerleri elde edilmiştir.
4. Standart eğri üzerinden yapılan hesaplamalar ile her örnek için protein miktarları hesaplanmıştır.

3.6. HDAC (Histon Deasetilaz Enzimi) Aktivitesinin Tayini

PL'in HDAC aktivitesini belirlemek amacıyla yürütülen ön deneyler sonrasında (MTT, AO/PI, NETN Lizis, Bradford) hücre kültürlerinden elde edilmiş hücre lizatlarında (HeLa ve HEK293T) kolorimetrik HDAC Aktivite Test Kiti (BioVision, HDAC Activity Colorimetric Assay Kit, Catalog no: K331) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda HDAC aktivitesi belirlenmiştir.

Kullanılan Malzemeler

1. 96'lı ELISA plakası
2. Termofisher ELISA plaka okuyucu
3. Pipet uçları (10µl ve 100µl)
4. HDAC Assay kit (BioVision, HDAC Activity Colorimetric Assay Kit)
5. dH₂O
6. Hüresel lizat (4 mg)

Yapılan İşlemler

1. Öncelikle yapılan ön çalışmayla protein miktar tayini yapılan hücre lizatlarından test başına 3-4 mg protein kullanılması gerekliliği saptanmıştır. Her örnekten eşit miktarda lizat kullanılması karşılaştırma açısından kolaylık

sağlayacağı için her lizat için ayrı ayrı gerekli hesaplamalar yapılmış ve hangi hacimde lizat kullanılması gerektiği tespit edilmiştir.

2. Her örnek için kullanılması gereken miktarlar belirlendikten sonra toplam hacim 85 µl olacak şekilde üzerine distile su ilave edilmiştir.
3. Ardından üzerine 10 µl 10X HDAC Assay Buffer eklenmiştir.
4. Üzerine de 5 µl HDAC kolorimetrik substrat eklenmiştir.
5. 2 saat süre ile 37° C' de inkübasyona bırakılmıştır.
6. Ardından kuyuların üzerine reaksiyonu durdurmak için 10 µl Lysine Developer eklenmiş ve 37° C' de 30 dk inkübe edilmiştir.
7. 96' lı ELISA plakası süre sonunda 405 nm' de okunmuş ve OD değerleri belirlenmiştir.

3.7. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler SPSS 20.0 istatistik programı ile % 95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Deney grupları arasında fark olup olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi ANOVA kullanılmıştır. Farklılık olması halinde, grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları belirlenmesinde post-hoc Dunnett' s testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

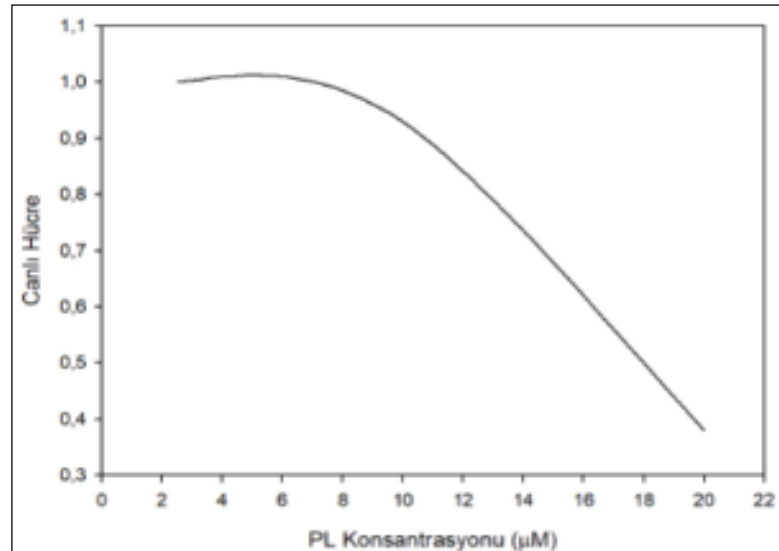
4. BULGULAR

4.1. PL LD50 Dozlarının Belirlenmesi

PL'in HeLa hücrelerinde 24 saat için geçerli olan LD50 dozu tarafımızdan tamamlanan önceki bir çalışmada 171 μM olarak belirlenmiştir (Seber vd., 2019). Bu nedenle mevcut tez çalışması kapsamında HEK293T hücrelerinin PL' in LD50 dozu MTT yöntemi ile tespit edilerek AO/PI boyası ile floresan mikroskopta görüntüleme yöntemi ile teyit edilmiştir.

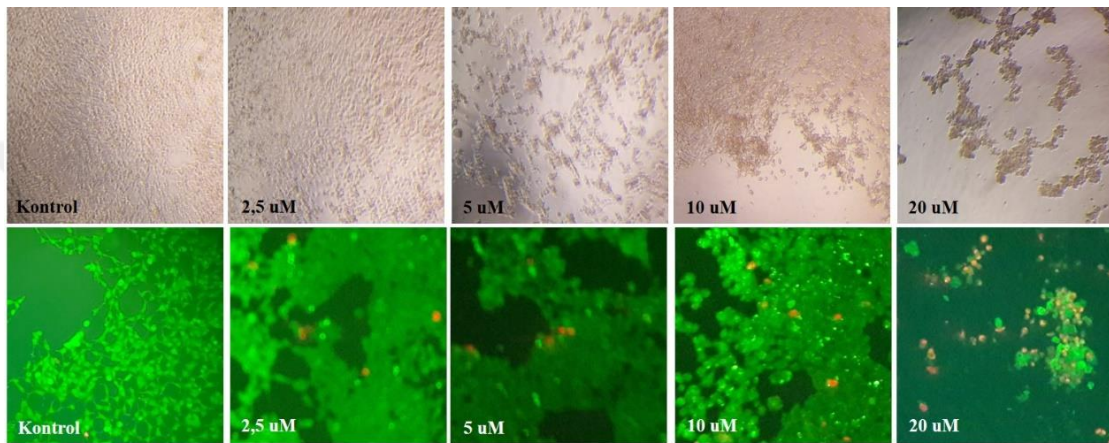
HEK293T hücrelerinde 24 saat için geçerli PL LD50 dozlarının MTT yöntemi ile belirlenmesi için PL; 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM , 120 μM , 160 μM , 200 μM , 240 μM , 360 μM son konsantrasyon olacak şekilde ve kontrol olarak DMSO kullanılarak HEK293T hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır.

Gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen veriler Sigma Plot 10.0 programı ile değerlendirilerek HEK293T hücrelerinin % 50'sini öldüren PL' in 24 saatlik LD50 dozu 18 μM olarak bulunmuştur. PL' in farklı konsantrasyonlarının HEK293T hücrelerindeki etkilerinin araştırıldığı MTT deneyi sonuçları Şekil 4.1'de yer almaktadır.



Şekil 4.1 PL' in HEK293T hücrelerindeki 24 saat için geçerli LD50 dozunun MTT yöntemi ile tespit edilmesi. Canlı hücre oranını yarıya düşüren konsantrasyon, LD50 dozu olarak tespit edilmektedir.

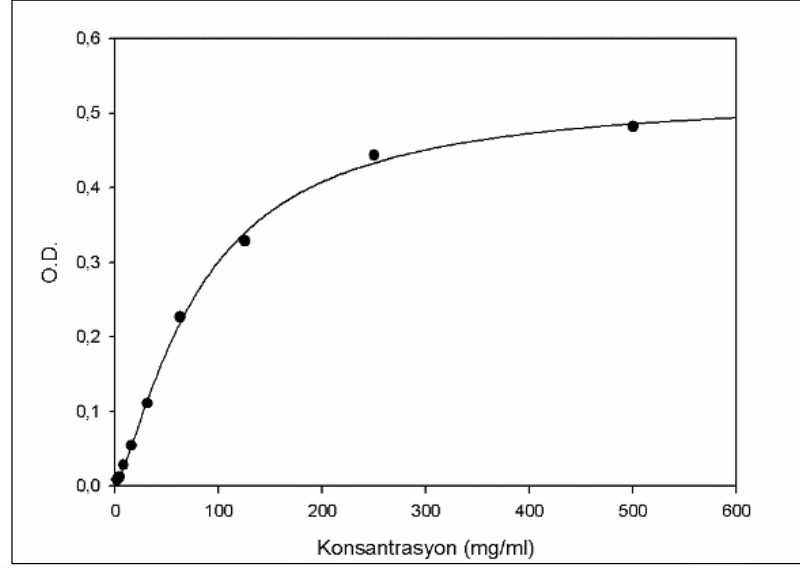
5 μ L AO/PI ile boyanan ve 10 dakika karanlıkta bekletilen 2,5-5-10-20 μ M PL konsantrasyonlarına maruz bırakılmış HEK293T hücreleri Floresan Ataçmanlı Işık Mikroskobu (Leica- DM 2500) ile değerlendirilmiş ve LD50 dozunun 20 μ M' in altında olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.2). Artan PL konsantrasyonlarıyla birlikte hücre yoğunluğundaki azalma ve hücre morfolojilerindeki bozulma LD50 dozunun 20 μ M' in altında olduğunu desteklemektedir.



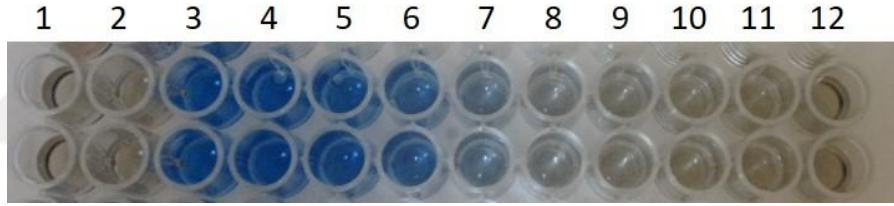
Şekil 4.2 HEK293T hücrelerinde çeşitli dozlarda PL uygulamalarının Işık ve Floresan mikroskobundaki görüntüsü. Kontrol; DMSO, 2,5-5-10-20 μ M PL uygulamaları. Kırmızı renk: ölü hücreler, yeşil renk: canlı hücreler (40X büyütme).

4.2. PL LD50 Dozları ile Muamele Edilmiş HeLa ve HEK293T Hücre Lizatlarında Protein Miktar Tayini

Tüm deney gruplarından NETN lizis yöntemiyle hazırlanan HeLa ve HEK293T hücresel lizatlarında protein miktar tayini Bradford yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücresel lizatlarda protein miktar tayinleri BSA ile yapılan ölçümler ve Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Protein miktar tayini için yapılan Bradford deneyinin plaka görünümü Şekil 4.4' de yer almaktadır.



Şekil 4.3 Protein Standart Grafiği. X eksenini=BSA konsantrasyonu (mg/mL), Y eksenini=OD değerleri.



Şekil 4.4 Protein Standart Grafiği İçin Hazırlanan Bradford Deneyi Plaka Görünümü. 1-2; Kontrol, 3; 500 µg/mL, 4; 250 µg/mL, 5; 125 µg/mL, 6; 62,25 µg/mL, 7; 31,12 µg/mL, 8; 15,46 µg/mL, 9; 7,81 µg/mL, 10; 3,89 µg/mL, 11; 1,94 µg/mL. 12; Boş.

4.3.HDAC Aktivitesi Tayini

Kolorimetrik HDAC testi sonrası 96 kuyucuklu plakanın görüntüsü Şekil 4.5' de gösterilmiştir. Sarı-Yeşil renklenme ve koyuluk HDAC aktivitesi hakkında bilgi vermektedir.

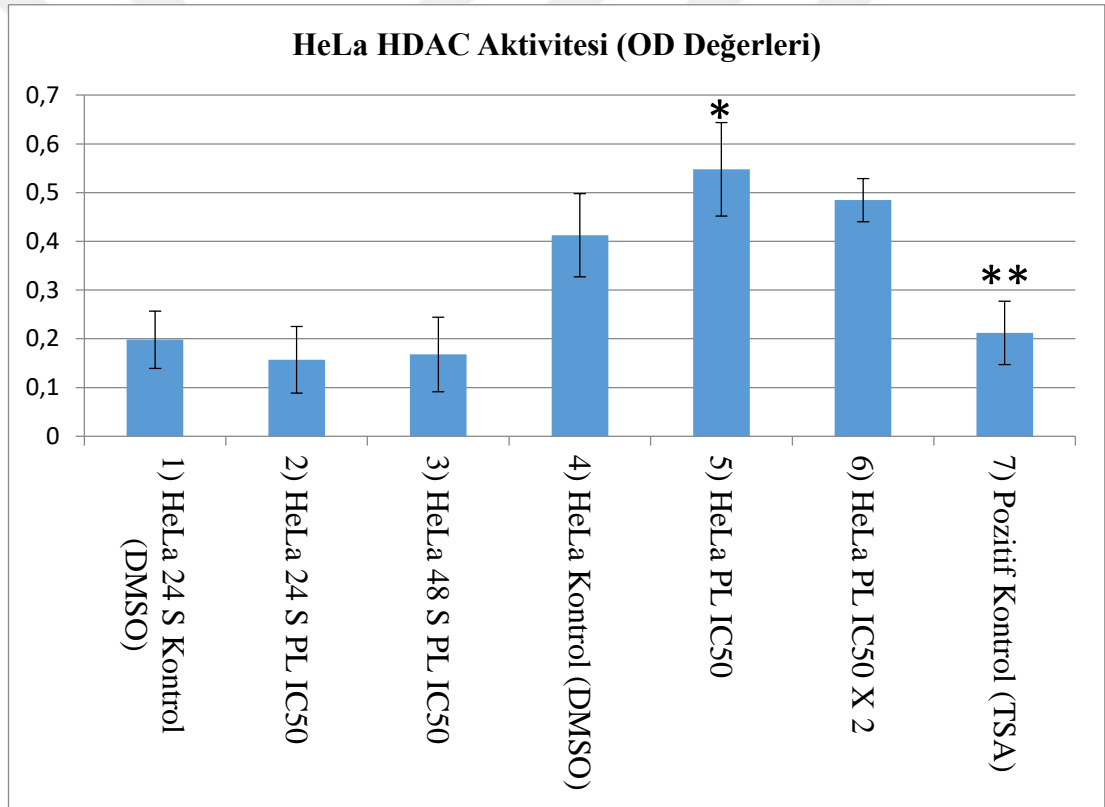


Şekil 4.5 Kolorimetrik HDAC Testi Sonrası 96 Kuyucuklu Plakanın Görünümü.

HeLa hücrelerinden elde edilen hücresel lizatlardaki HDAC aktivitesini yansıtan OD değerlerinin karşılaştırmaları Şekil 4.6, Tablo 4.1, ve Tablo 4.2’de verilmiştir. HeLa hücreleri için geçerli LD50 dozu olan 171 μM konsantrasyonda PL ile 24 ve 48 saat süre ile muamele edilen deney gruplarının ve 24 saat süreyle DMSO ile muamele edilen kontrol grubunun (örnek no 1) HDAC aktivite tayinine ilişkin sonuçları Şekil 4.6 ve Tablo 4.1’de, istatistiksel değerlendirilmeleri ise Tablo 4.2’ de verilmiştir. Ortalama OD değerleri yüzde (%) değişim olarak karşılaştırıldığında HDAC enzim aktivitesinde kontrole (örnek no 1) kıyasla 24 saat PL LD50 dozu uygulaması (örnek no 2) ile %21 ($p= 0,249$) ve 48 saat PL LD50 dozu uygulaması (örnek no 3) ile ise %15 ($p= 0,524$) oranında azalma saptanmıştır. Ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p= 0,31$) (Tablo 4.2).

Herhangi bir kimyasal ajanla muamele edilmeden normal koşullarda çoğaltılan HeLa hücrelerinden elde edilen hücresel lizatların; DMSO ile (örnek no 4), LD50 doz 171 μM (örnek no 5) ve LD50 dozun iki katı olan 342 μM (örnek no 6) konsantrasyonunda PL ile HDAC aktivitesi tayin deneyi esnasında doğrudan muamele edilerek, kültür ortamında bekletme olmaksızın yapılan HDAC aktivite

tainine ilişkin sonuçlar Şekil 4.6 ve Tablo 4.1’de, istatistiksel olarak değerlendirilmeleri ise Tablo 4.2’ de verilmiştir. HeLa hücrelerinden elde edilen lizatların TSA gibi iyi bilinen bir HDAC inhibitörü ile muamelesi (örnek no 7) ile elde edilen sonuç Şekil 4.6, Tablo 4.1, ve Tablo 4.2’ de verilmektedir. Ortalama OD değerlerindeki değişim yüzde olarak karşılaştırıldığında HDAC enzim aktivitesinde kontrole (örnek no 4) kıyasla PL LD50 dozu uygulaması (örnek no 5) ile %32 oranında istatistiksel olarak da anlamlı bir artış ($p=0,003$) ve PL’in LD50 dozunun 2 katı uygulanması (örnek no 6) ile %17 oranında istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir artış saptanmıştır ($p=0,159$) (Tablo 4.2).



Şekil 4.6 HeLa Hücrelerinde HDAC Aktivitesini Gösteren OD Değerlerinin Karşılaştırılması. 1) HeLa 24 S Kontrol (DMSO), 2) HeLa 24 S PL LD50, 3) HeLa 48 S PL LD50, 4) HeLa Kontrol (DMSO), 5) HeLa PL LD50, 6) HeLa PL LD50 X2, 7) Pozitif Kontrol (TSA). (Örnek no 1,2,3 ile örnek no 4,5,6,7 farklı 2 deney düzeneği olup; kendi içinde değerlendirilmiştir). *; 4 nolu kontrole kıyasla 5 nolu örnekte

istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,003$), **; 4 nolu kontrole kıyasla 7 nolu örnekte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,001$).

Tablo 4.1 HeLa Hücrelerinde HDAC Aktivitesi Ortalama OD Değerleri.

Örnek No	Uygulama Adı	Ortalama OD	SS
1	Hela Kontrol (DMSO) 24 Saat	0,1980	0,0587
2	HeLa PL LD50 24 Saat	0,1569	0,0684
3	HeLa PL LD50 48 Saat	0,1677	0,0763
4	HeLa Kontrol (DMSO)	0,4124	0,0855
5	HeLa PL LD50	0,5480	0,0960
6	HeLa PL LD50x2	0,4845	0,0446
7	Pozitif Kontrol (TSA)	0,2119	0,0650

SS; Standart Sapma.

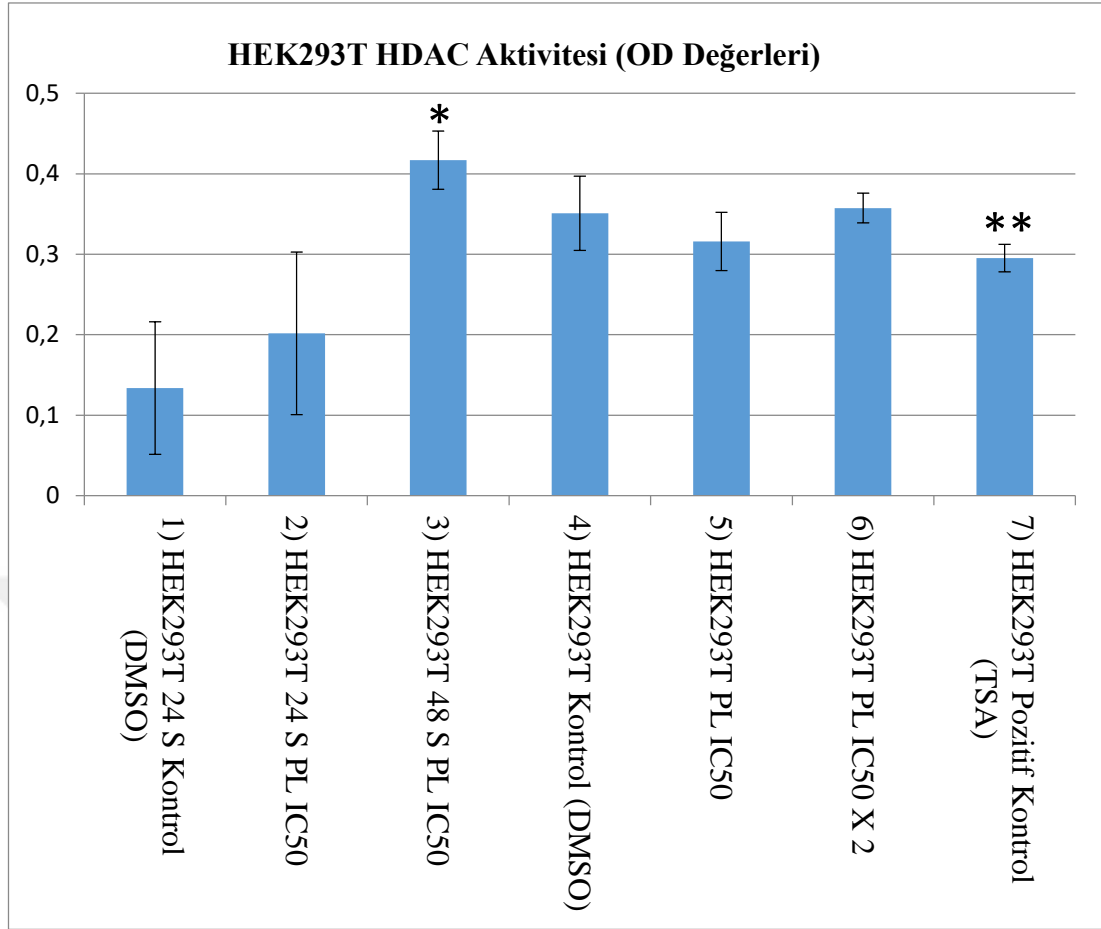
Tablo 4.2 Hela Hücrelerinde PL Uygulamaları Sonrası HDAC Aktivitesi OD Değerlerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması.

Karşılaştırılan Gruplar	p değeri
Hela Kontrol (DMSO) 24 Saat- HeLa PL LD50 24 Saat (Örnek no 1- Örnek no 2)	0,249
Hela Kontrol (DMSO) 24 Saat- HeLa PL LD50 48 Saat (Örnek no 1- Örnek no 3)	0,524
Hela Kontrol (DMSO)- HeLa PL LD50 (Örnek no 4- Örnek no 5)	0,003*
Hela Kontrol (DMSO)- HeLa PL LD50x2 (Örnek no 4- Örnek no 6)	0,159
Hela Kontrol (DMSO)-Pozitif Kontrol (TSA) (Örnek no 4- Örnek no 7)	<0,001*

* $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

HEK293T hücrelerinden elde edilen hücresel lizatlardaki HDAC aktivitesini yansıtan OD değerlerinin karşılaştırmaları Şekil 4.8, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te gösterilmiştir. HEK293T hücreleri için geçerli LD50 dozu olan 18 µM konsantrasyonunda PL ile 24 saat (Örnek no 2) ve 48 saat (Örnek no 3) süre ile muamele edilen deney gruplarının ve DMSO ile 24 saat süre ile muamele edilen kontrol grubunun (örnek no 1) HDAC aktivite tayinine ilişkin sonuçları Şekil 4.8, Tablo 4.3'de, istatistiksel değerlendirmeleri ise Tablo 4.4'de verilmiştir. Ortalama OD değerleri yüzde (%) değişim olarak karşılaştırıldığında HDAC enzim aktivitesinde kontrole (örnek no 1) kıyasla 24 saat PL LD50 dozu uygulanması (örnek no 2) ile %151 oranında istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış saptanırken ($p=0,096$); 48 saat PL LD50 dozu uygulaması (örnek no 3) sonucunda ise %312 oranında ve istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,001$) (Tablo 4.4).

Herhangi bir kimyasal ajanla muamele edilmeden normal koşullarda çoğaltılan HEK293T hücrelerinden elde edilen hücresel lizatların; DMSO ile (örnek no 4), LD50 dozu 18 µM (örnek no 5) ve LD50 dozun iki katı olan 36 µM (örnek no 6) konsantrasyonlarda PL ile HDAC aktivitesi tayin deneyi esnasında doğrudan muamele edilerek, kültür ortamında bekletme olmaksızın yapılan HDAC aktivite tayinine ilişkin sonuçlar Şekil 4.7 ve Tablo 4.3' de, istatistiksel değerlendirmeleri ise Tablo 4.4' de verilmiştir. HEK293T hücrelerinden elde edilen hücresel lizatlar TSA gibi iyi bilinen bir HDAC inhibitörü ile muamele edilmesi ile elde edilen sonuçlar (örnek no 7) verilmiştir (Şekil 4.7, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). OD değerleri yüzde değişim olarak karşılaştırıldığında HDAC enzim aktivitesinde kontrole (örnek no 4) kıyasla PL LD50 dozu (örnek no 5) uygulaması ile %10 oranında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma ($p=0,124$) ve PL LD50 dozunun 2 katı (örnek 6) konsantrasyonları ile muamele edildiğinde ise yine istatistiksel olarak anlamlı olmayan %1,8 oranında artış ($p=0,962$) saptanmıştır (Tablo 4.4).



Şekil 4.7 HEK293T Hücrelerinde HDAC Aktivitesini Gösteren OD Değerlerinin Karşılaştırılması. 1) HEK293T 24 S Kontrol (DMSO), 2) HEK293T 24 S PL LD50, 3) HEK293T 48 S PL LD50, 4) HEK293T Kontrol (DMSO), 5) HEK293T PL LD50, 6) HEK293T PL LD50 X2, 7) Pozitif Kontrol (TSA). (Örnek no 1,2,3 ile örnek no 4,5,6,7 farklı 2 deney düzeneği olup; kendi içinde değerlendirilmiştir). *; 1 nolu kontrole kıyasla 3 nolu örnekte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0,001$), **; 4 nolu kontrole kıyasla 7 nolu örnekte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmıştır ($p = 0,034$).

Tablo 4.3 HEK293T Hücrelerinde HDAC Aktivitesi Ortalama OD Değerleri.

Örnek No	Uygulama Adı	Ortalama OD	SS
1	HEK293T Kontrol (DMSO) 24 Saat	0,1337	0,0824
2	HEK293T PL LD50 24 Saat	0,2015	0,1010
3	HEK293T PL LD50 48 Saat	0,4171	0,0362
4	HEK293T Kontrol (DMSO)	0,3508	0,0461
5	HEK293T PL LD50	0,3158	0,0363
6	HEK293T PL LD50x2	0,3575	0,0186
7	HEK293T Pozitif Kontrol (TSA)	0,2953	0,0170

SS; Standart Sapma.

Tablo 4.4 HEK293T Hücrelerinde PL Uygulamaları Sonrası HDAC Aktivitesi OD Değerlerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması.

Karşılaştırılan Gruplar	p değeri
HEK293T Kontrol (DMSO) 24 Saat- HEK293T PL LD50 24 Saat (Örnek no 1- Örnek no 2)	0,096
HEK293T Kontrol (DMSO) 24 Saat- HEK293T PL LD50 48 Saat (Örnek no 1- Örnek no 3)	<0,001*
HEK293T Kontrol (DMSO)- HEK293T PL LD50 (Örnek no 4- Örnek no 5)	0,124
HEK293T Kontrol (DMSO)- HEK293T PL LD50X2 (Örnek no 4- Örnek no 6)	0,962
HEK293T Kontrol (DMSO)-Pozitif Kontrol (TSA) (Örnek no 4- Örnek no 7)	0,034**

* p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, normal bir hücre soyu olan insan embriyonik böbrek hücresi HEK293T ve bir kanser hücre soyu olan insan servikal kanseri hücresi HeLa hücrelerinde, PL'in total hücresele HDAC enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla deneysel çalışmalar yürütülmüştür.

Bir servikal kanser hücresi olan HeLa hücrelerinden elde edilen hücresele lizatlar PL'in LD50 dozu ile 24 saat süreyle muamele edildiğinde, HDAC enzim aktivitesinde kontrole kıyasla %21 oranında azalma ($p=0,249$) saptanmıştır. PL LD50 dozu uygulaması 48 saat sürdüğünde ise HDAC enzim aktivitesinde kontrole kıyasla %15 oranında azalma ($p=0,524$) saptanmıştır. Ancak her iki bulgu da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen bulgular ışığında PL' in 24 ve 48 saatlik maruziyetinin HeLa hücreleri üzerinde HDAC enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bir azalmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer yandan, HeLa hücrelerinden elde edilen hücresele lizatlar HDAC aktivite tayini deneyinden hemen önce PL LD50 dozu ile doğrudan muamele edildiğinde; HDAC enzim aktivitesinde kontrole kıyasla %32'lik istatistiksel olarak da anlamlı bir artış ($p=0,003$), PL LD50 dozunun 2 katı konsantrasyonu uygulandığında ise; kontrole kıyasla %17' lik bir artış ($p=0,159$) saptanmıştır. HeLa hücrelerinden elde edilen hücresele lizatlara doğrudan PL uygulanması ile HDAC enzim aktivitesinde artışlar gözlenmesi PL ile HDAC enzimleri arasında doğrudan bir etkileşim olabileceğini ve hücresele total HDAC aktivitesini artırabileceği görüşünü desteklemektedir. Doğrudan PL muamelesi ile HDAC aktivitesinde artış görülürken, 24 ve 48 saatlik PL uygulamaları sonrası azalış gözlenmesi, PL'in süreli uygulamalarında HeLa hücrelerinde HDAC aktivitesinde azalma ile sonuçlanan dolaylı hücresele mekanizmaların rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Normal bir hücre soyu olan HEK293T hücrelerinden elde edilen hücresele lizatlar PL'in LD50 dozunun 24 saat uygulaması ile HDAC enzim aktivitesinde kontrole kıyasla sırasıyla %151 oranında artış ($p=0,096$) saptanmıştır. PL LD50 dozu uygulaması 48 saat sürdüğünde ise HDAC enzim aktivitesinde kontrole kıyasla %312 oranında istatistiksel olarak da anlamlı bir artış ($p<0,001$) saptanmıştır. Elde

edilen bulgular ışığında PL' in *in vitro* koşullardaki süreli uygulamalarının normal hücreler üzerinde HEK293T hücre soyu modelinde HDAC enzim aktivitesinin artışına neden olduğu belirlenmiştir. PL'in LD50 dozu HDAC aktivite tayininden hemen önce uygulandığında, HDAC enzim aktivitesinde kontrole kıyasla %10 oranında azalma ($p=0,124$), PL LD50 dozunun 2 katı konsantrasyonu uygulandığında ise kontrole kıyasla %1,8 oranında bir artış ($p=0,962$) saptanmıştır. Her iki bulgu da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Farklı deneysel koşullar birlikte değerlendirildiğinde, PL uygulamalarının HEK293T hücrelerinin HDAC enzim aktivitesinde doğrudan etkileşimler yerine dolaylı mekanizmalar ile bir artışına neden olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmamız kapsamında elde edilen veriler değerlendirildiğinde, HeLa hücrelerinin PL'in LD50 dozu ile doğrudan muamele edildiği ve HEK293T hücrelerinin PL ile 48 saat süreyle muamele edildiği deney gruplarından elde edilen bulgular istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu durum göz önüne alındığında PL'in HeLa ve HEK293T hücrelerinde total hücre HDAC enzim aktivitesini farklı mekanizmalarla artırdığı sonucuna varılmıştır.

Konuya ilişkin yapılan literatür taramaları sonucunda PL'nin HDACi etkinliğinin yalnızca bir yayında araştırılmış olduğu görülmüştür. Thatikonda ve diğ. (2020)'nin sedef hastalığında PL'nin meydana getirdiği epigenetik değişiklikleri ve ilişkili sinyal mekanizmaları inceledikleri çalışmada, PL'in epigenetik modülasyonu düzenlediği ve hiperproliferasyon ve inflamasyonun inhibisyonu yoluyla sedef benzeri deri lezyonlarını hafiflettiği gösterilmiştir. İlgili çalışmada öncelikle BALB/c farelerine cilt lezyonlarına sebep olan, proinflamatuvar sitokinleri arttıran, splengomegaliye sebep olan ve inflamasyonu indükleyen imikimod (IMQ) kremi 6 gün boyunca sürülerek sedef hastalığı oluşturulmuştur. Sonrasında fareler 4 gruba ayrılarak sırasıyla ilk gruba 10 mg/kg PL topikal olarak, ikinci gruba 30 mg/kg PL topikal olarak; üçüncü gruba 1 mg/kg PL subkutan olarak, dördüncü gruba ise 20 mg/kg sedef hastalığı tedavisi için kullanılan Tacrolimus (TAC) krem topikal olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak, PL'in BALB/c farelerinde IMQ kaynaklı sedef hastalığının şiddetini azalttığı ve artmış immün aktivite ve hiperplaziden kaynaklı dalak büyümesini önlediği gözlenmiştir. Ayrıca PL'in HDAC ifadesini azalttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, HeLa hücre lizatı PL' in dört farklı

konsantrasyonu (0.05, 0.1, 1 ve 2.5 μM) ile muamele edilmiş ve HDAC inhibe edici aktivitesi, 2.5 μM konsantrasyonunda muamele edilen TSA ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak TSA uygulanan grupta HDAC seviyelerinin $0,52 \pm 0,02 \mu\text{M}$, 0.05 μM PL uygulanan grupta $0.44 \pm 0.06 \mu\text{M}$, 0.1 μM PL uygulanan grupta $0.49 \pm 0.13, 1 \mu\text{M}$ PL uygulanan grupta $0.26 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ve 2.5 μM PL uygulanan grupta $0.24 \pm 0.01 \mu\text{M}$ olduğu, PL uygulaması ile HDAC seviyesinin doz bağımlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığı (inhibe ettiği) gösterilmiştir. Bu çalışma, HDAC aktivitesi tayininde kullanılan yöntemin florometrik olması ve çalışmamıza kıyasla oldukça düşük dozlarda PL kullanılmış olması yönüyle çalışmamızdan farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda hücresel lizatlardaki total HDAC aktivitesi kolorimetrik HDAC Aktivite Test Kiti ile belirlenmiştir. Her iki çalışmada HDAC aktivitesi tayini için kullanılan florometrik ve kolorimetrik yöntemler metodolojik olarak büyük ölçüde benzerdir. Tez çalışmamızda PL'in LD50 dozuna (171 μM) hücre kültürü koşullarında 24 ve 48 saat sürelerle maruz kalan HeLa hücreleri ve PL ile doğrudan muamele edilen HeLa hücre lizatlarındaki HDAC aktivitesi araştırılmıştır. Literatürdeki kıyaslanan çalışmada ise sadece HeLa hücresel lizatlarının 0.05, 0.1, 1 ve 2.5 μM PL konsantrasyonlarıyla muamele edildiği anlaşılmaktadır. Bu yönüyle çalışmamız literatürdeki çalışma ile kısmen örtüşmektedir. Literatürdeki çalışmada kıyasla düşük olan konsantrasyonların niçin seçildiğine dair bir açıklama getirilmemiş olmakla birlikte, çalışmanın *in vivo* bir çalışmanın devamı olması nedeniyle oldukça düşük dozların test edildiği akla yatkın bir fikir olarak gelmektedir. Çalışmamızda HDAC aktivitesi üzerine etkinin araştırılmasında LD50 dozunun tercih edilmesinde, hücrelere uygulanabilecek yüksek dozların denenmesi ve hücresel lizatların hazırlanması için gereken hücre sayılarının öngörülebilir olması önemli bir etken olmuştur. Her iki çalışmada da kontrol olarak iyi bilinen bir HDAC inhibitörü olan TSA kullanılmış ve TSA'nın HDAC inhibisyonu gösterilmiştir. Diğer yandan PL' in HDAC aktivitesi üzerine etkisine dair elde edilen bulgular çelişmektedir. Bu çelişkinin nedeninin kullanılan PL konsantrasyonlarının çok farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatür taramalarımıza ve güncel bilgilerimize göre, çeşitli hastalıklar üzerinde olumlu etkileri olan PL biyoaktif besin bileşeninin normal ve kanser hücre soyları kullanılarak total hücresel HDAC enzim aktivitesi üzerine etkisi ilk kez bu

tez çalışması kapsamında deneysel olarak LD50 dozları referans alınarak ve kolorimetrik HDAC aktivite test kiti kullanılarak araştırılmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyoaktif besin bileşeni PL'in HDACi etkisinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bu çalışmaya ilişkin sonuçlar ve öneriler aşağıda yer almaktadır;

PL'in LD50 dozu HEK293T hücreleri için 18 μ M, HeLa hücreleri için 171 μ M olarak belirlenmiştir. Bu sonuç normal hücrelerin kanser hücrelerine göre PL' e daha hassas olduğunu göstermektedir. Bu durum PL'nin kanseri hedefleyen tedavilerde kullanılmasını güçleştirebilir.

HeLa hücreli lizatlarına 24 ve 48 saat PL (LD50 konsantrasyonda) uygulanması sonrasında kontrol grubuna kıyasla HDAC enzim aktivitesinin bir miktar inhibe olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir. Hücreli lizatlar LD50 ve LD50 X2 konsantrasyonlarında PL ile doğrudan muamele edildiğinde ise kontrole kıyasla bir artış saptanmış olup, LD50 dozu ile muamele edilen HeLa hücre lizatlarındaki HDAC aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

HEK293T hücreli lizatlarına 24 ve 48 saat PL (LD50 konsantrasyonda) uygulanması sonrasında kontrol grubuna kıyasla HDAC enzim aktivitesinin arttığı 48 saatlik uygulama sonrası elde edilen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Hücreli lizatlar LD50 ve LD50 X2 konsantrasyonlarında PL ile doğrudan muamele edildiğinde ise kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalış saptanmıştır.

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular göz önüne alındığında, PL'in epigenetik değişikliklere aracılık eden HDAC aktivitesini doğrudan ve/veya dolaylı hücreli mekanizmalar yoluyla arttırdığı, ancak, bu bulguların *in vivo* ve klinik çalışmalarla da desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

PL' nin birçok hastalıkta tedavi edici potansiyeli olduğu öne sürülmektedir ve son yıllarda literatürde klinik etkilerini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. PL'in çeşitli hastalıklar üzerine etkisini ortak bir mekanizma yerine farklı mekanizmalarla göstermesi mümkün görünmektedir.

Günümüzde yürütülen epidemiyolojik ve klinik çalışmalarla bireylerin beslenme özelliklerinin kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi çeşitli

patolojilere etkileri araştırılmaktadır. Diğer yandan besin ögelerinin fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alan genlerin ifadesini etkilemesi sebebiyle, beslenme ilişkili hastalıkların patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması için epigenetik değişikliklerin de göz önünde bulundurulması önem arz etmektedir. Potansiyel epigenetik regülatörler olan besin bileşenlerinin HDAC aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması hastalıkların önlenmesi, geciktirilmesi, tedavi edilmesi için diyet müdahaleleri geliştirilmesinde yeni stratejiler sunabilir. Bu nedenle diğer besin bileşenleri gibi biyoaktif bir besin bileşeni olarak bilinen PL'nin de moleküler ve hücresel düzeyde detaylı araştırılmasına gereksinim vardır.



KAYNAKLAR

- AKÇALI, A. (2010). Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi *Türk Onkoloji Dergisi* (C. 25, Sayı 3).
- BARREA, L., ANNUNZIATA, G., BORDONİ, L., MUSCOGIURI, G., COLAO, A., & SAVASTANO, S. (2020). Nutrigenetics—personalized nutrition in obesity and cardiovascular diseases. *International Journal of Obesity Supplements*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41367-020-0014-4>
- BASSETT, S. A., BARNETT, M. P. G. (2014). *The Role of Dietary Histone Deacetylases (HDACs) Inhibitors in Health and Disease*. 4273–4301. <https://doi.org/10.3390/nu6104273>
- BASSİ, S., TRİPATHİ, T., MONZİANİ, A., Dİ LEVA, F., & BİAGİOLİ, M. (2017). Epigenetics of huntington's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (C. 978, ss. 277–299). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1_15
- BERNİ CANANİ, R., Dİ COSTANZO, M., LEONE, L. (2012). The epigenetic effects of butyrate: Potential therapeutic implications for clinical practice. *Clinical Epigenetics* (C. 4, Sayı 1, ss. 1–7). <https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-4>
- BEZERRA, D. P., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., SAKER-NETO, N., SİLVEİRA, E. R., COSTA-LOTUFO, L. V. (2013). Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (C. 48, Sayı 3, ss. 453–463). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.003>
- BORDONİ, L., GABBIANELLİ, R. (2019). Primers on nutrigenetics and nutri(epi)genomics: Origins and development of precision nutrition. *Biochimie*, 160, 156–171. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.006>
- BRADFORD, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* (C. 72).
- CAMP, K. M., TRUJILLO, E. (2014). Position of the academy of nutrition and dietetics: Nutritional genomics. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(2), 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.12.001>

Chapter IV. Guidelines for Toxicity Tests IV C 2. Acute Oral Toxicity Tests. (y.y.).

- CHEN, J., XUE, Y. (2016). Emerging roles of non-coding RNAs in epigenetic regulation. *Science China Life Sciences*, 59(3), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5010-0>
- CHENG, J., DEMING, T. J. (2011). synthesis of polypeptides by ROP of NCAs. *Peptide-Based Materials*, 310(June 2011), 1–26. <https://doi.org/10.1007/128>
- CHILVERY, S., BANSOD, S., SAIFI, M. A., GODUGU, C. (2020). Piperlongumine attenuates bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice via inhibition of TGF- β 1/Smad and EMT pathways. *International Immunopharmacology*, 88, 106909. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106909>
- CHOI, S. W., FRISO, S. (2010). Epigenetics: A new bridge between nutrition and health. *Advances in Nutrition* (C. 1, Sayı 1, ss. 8–16). <https://doi.org/10.3945/an.110.1004>
- CHRISTENSEN, D. P., DAHLLÖF, M., LUNDH, M., RASMUSSEN, D. N., NIELSEN, M. D., BILLESTRUP, N., GRUNNET, L. G., MANDRUP-POULSEN, T. (2011). Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Molecular Medicine*, 17(5–6), 378–390. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00021>
- CROWLEY, L. C., MARFELL, B. J., CHRISTENSEN, M. E., WATERHOUSE, N. J. (2016). Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7), 643–646. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087155>
- FALKENBERG, K. J., JOHNSTONE, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 673–691. <https://doi.org/10.1038/nrd4360>
- FRANZAGO, M., SANTURBANO, D., VITACOLONNA, E., STUPPIA, L. (2020). Genes and diet in the prevention of chronic diseases in future generations. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072633>
- FRISO, S., DE SANTIS, D., PIZZOLO, F., UDALI, S. (2019). Vitamins and epigenetics. *Molecular Nutrition: Vitamins* (ss. 633–650). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811907-5.00033-6>
- GATLA, H. R., MUNIRAJ, N., THEVKAR, P., YAVVARI, S., SUKHAVASI, S., MAKENA, M. R. (2019). Regulation of chemokines and cytokines by histone deacetylases and an update

on histone decetylase inhibitors in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms20051110>

GO, J., PARK, T. S., HAN, G. H., PARK, H. Y., RYU, Y. K., KIM, Y. H., HWANG, J. H., CHOI, D. H., NOH, J. R., HWANG, D. Y., KIM, S., OH, W. K., LEE, C. H., KIM, K. S. (2018). Piperlongumine decreases cognitive impairment and improves hippocampal function in aged mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(4), 1875–1884. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3782>

GU, J., QIU, M., LU, Y., JI, Y., QIAN, Z., SUN, W. (2021). Piperlongumine attenuates angiotensin-II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by inhibiting Akt-FoxO1 signalling. *Phytomedicine*, 82, 153461. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153461>

GU, S. M., LEE, H. P., HAM, Y. W., SON, D. J., KIM, H. Y., OH, K. W., HAN, S. B., YUN, J., HONG, J. T. (2018). Piperlongumine Improves Lipopolysaccharide-Induced Amyloidogenesis by Suppressing NF-KappaB Pathway. *NeuroMolecular Medicine*, 20(3), 312–327. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8495-9>

GU, S. M., YUN, J., SON, D. J., KIM, H. Y., NAM, K. T., KIM, H. D., CHOI, M. G., CHOI, J. S., KIM, Y. M., HAN, S. B., HONG, J. T. (2017). Piperlongumine attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibition of NF-kappaB activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 103, 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.027>

HAŁASA, M., WAWRUSZAK, A., PRZYBYSZEWSKA, A., JARUGA, A., GUZ, M., KAŁAFUT, J., STEPULAK, A., CYBULSKI, M. (2019). H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. *Cells*, 8(5), 485. <https://doi.org/10.3390/cells8050485>

HARDY, T. M., TRYGVE, O. (2011). *Epigenetic diet : impact on the epigenome and cancer R eview*. 3, 503–518.

HENRIQUE, T., ZANON, C. DE F., GIROL, A. P., STEFANINI, A. C. B., CONTESSOTO, N. S. D. A., DA SILVEIRA, N. J. F., BEZERRA, D. P., SILVEIRA, E. R., BARBOSA-FILHO, J. M., CORNELIO, M. L., OLIANI, S. M., TAJARA, E. H. (2020). Biological and physical approaches on the role of piplartine (piperlongumine) in cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78220-6>

HUANG, J.-R., WANG, S.-T., WEI, M.-N., LIU, K., FU, J.-W., XING, Z.-H., SHI, Z. (2020).

Piperlongumine Alleviates Mouse Colitis and Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1747. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.586885>

Ji, L., QU, L., WANG, C., PENG, W., Li, S., YANG, H., LUO, H., YIN, F., LU, D., LIU, X., KONG, L., WANG, X. (2020). Identification and optimization of piperlongumine analogues as potential antioxidant and anti-inflammatory agents via activation of Nrf2. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112965. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112965>

KALKAN A.M., VURAL, B., KÖMÜRCÜ BAYRAK (2018). The Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Activator-Tunicamycin on HEK293 Cells. *Experimed*, 8(3), 71–79. <https://doi.org/10.26650/experimed.2018>

KASPAR, D., HASTREITER, S., IRMLER, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., BECKERS, J. (2020). Nutrition and its role in epigenetic inheritance of obesity and diabetes across generations. *Mammalian Genome*, 31(5–6), 119–133. <https://doi.org/10.1007/s00335-020-09839-z>

KAUFMAN-SHRİQUİ, V., SALEM, H., BOAZ, M., BİRK, R. (2020). Knowledge and attitudes towards nutrigenetics: Findings from the 2018 unified forces preventive nutrition conference (UFPN). *Nutrients*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/nu12020335>

KİM, E., H. BISSON, W., V. LÖHR, C., E. WILLIAMS, D., HO, E., H. DASHWOOD, R., RAJENDRAN, P. (2015). Histone and Non-Histone Targets of Dietary Deacetylase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(7), 714–731. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150825125857>

KİM, N., DO, J., BAE, J. SUNG, JIN, H. K., KİM, J. H., INN, K. S., OH, M. S., LEE, J. K. (2018). Piperlongumine inhibits neuroinflammation via regulating NF- κ B signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.06.004>

KOÇAKLI, Z. G., AKILLIOĞLU, K., DOĞAN, A. (2015). *Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü*. 24(3), 390–401.

KUMAR, P., NAGARAJAN, A., UCHİL, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

- LEE, S. W., MANDINOVA, A. (2009). Piperlongumine and piperlongumine analogs for use in the treatment of cancer. <https://www.google.com.co/patents/WO2009114126A1?cl=en&dq=piper+tuberculatum&hl=es&sa=X&ei=fB6BUjBH43LkQe82YDwDQ&ved=0CG4Q6AEwBg>
- LI, Y., SETO, E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>
- LIANG, J., ZIEGLER, J. D., JAHRAUS, B., ORLIK, C., BLATNIK, R., BLANK, N., NIESLER, B., WABNITZ, G., RUPPERT, T., HÜBNER, K., BALTA, E., SAMSTAG, Y. (2020). Piperlongumine Acts as an Immunosuppressant by Exerting Prooxidative Effects in Human T Cells Resulting in Diminished TH17 but Enhanced Treg Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 11, 1172. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01172>
- LINK, A., BALAGUER, F., GOEL, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols : Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1771–1792. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.036>
- LIU, J., LIU, W., LU, Y., TIAN, H., DUAN, C., LU, L., GAO, G., WU, X., WANG, X., YANG, H. (2018). Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models. *Autophagy*, 14(5), 845–861. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1390636>
- LIVINGSTONE, K. M., CELIS-MORALES, C., NAVAS-CARRETERO, S., SAN-CRISTOBAL, R., FORSTER, H., WOOLHEAD, C., O'DONOVAN, C. B., MOSCHONIS, G., MANIOS, Y., TRACZYK, I., GUNDERSEN, T. E., DREVON, C. A., MARSAUX, C. F. M., FALLAIZE, R., MACREADY, A. L., DANIEL, H., SARIS, W. H. M., LOVEGROVE, J. A., GIBNEY, M., GIBNEY, E. R., WALSH, M., BRENNAN, L., MARTÍNEZ, J. A., MATHERS, J. C. (2020). Characteristics of participants who benefit most from personalised nutrition: findings from the pan-European Food4Me randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 123(12), 1396–1405. <https://doi.org/10.1017/S0007114520000653>
- LOSSON, H., SCHNEKENBURGER, M., DICATO, M., DIEDERICH, M. (2016). Natural compound histone deacetylase inhibitors (HDACi): Synergy with inflammatory signaling pathway modulators and clinical applications in cancer. *Molecules*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/molecules21111608>
- LU, C., ZHANG, B., XU, T., ZHANG, W., BAI, B., XIAO, Z., WU, L., LIANG, G., ZHANG, Y.,

- DAI, Y. (2019). Piperlongumine reduces ovalbumin-induced asthma and airway inflammation by regulating nuclear factor- κ B activation. *International Journal of Molecular Medicine*, 44(5), 1855–1865. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4322>
- LU, W., SHI, L., GAO, J., ZHU, H., HUA, Y., CAI, J., WU, X., WAN, C., ZHAO, W., ZHANG, B. (2020). Piperlongumine Inhibits Zika Virus Replication In vitro and Promotes Up-Regulation of HO-1 Expression, Suggesting An Implication of Oxidative Stress. *Virologica Sinica*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00310-6>
- MASUMEH, S., FRAIDON, K. (2019). Histone Deacetylases and Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action in Various Cancers. *Advanced Biomedical Research*, 6(105), 1–13. <https://doi.org/10.4103/abr.abr>
- MCINTYRE, R. L., DANIELS, E. G., MOLENAARS, M., HOUTKOOPER, R. H., JANSSENS, G. E. (2019). From molecular promise to preclinical results: HDAC inhibitors in the race for healthy aging drugs. *EMBO Molecular Medicine*, 11(9), 1–11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809854>
- MEILIANA, A., WIJAYA, A. (2020). Nutrigenetics, Nutrigenomics and Precision Nutrition. *The Indonesian Biomedical Journal*, 12(3), 189–200. <https://doi.org/10.18585/inabj.v12i3.1158>
- MENGARDA, A. C., MENDONÇA, P. S., MORAIS, C. S., COGO, R. M., MAZLOUM, S. F., SALVADORI, M. C., TEIXEIRA, F. S., MORAIS, T. R., ANTAR, G. M., LAGO, J. H. G., MORAES, J. (2020). Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. *Acta Tropica*, 205, 105350. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105350>
- MOLINASERRANO, DÍ., KYRIAKOU, DÍ., KIRMIZIS, A. (2019). Histone modifications as an intersection between diet and longevity. *Frontiers in Genetics* (C. 10, Sayı MAR, s. 192). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00192>
- MOVAFAGH, S., MUNSON, A. (2019). Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Prevention and Therapy. *Epigenetics of Cancer Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812494-9.00004-4>
- MU, W.-W., LI, P.-X., LIU, Y., YANG, J., LIU, G.-Y. (2020). The potential role of the 5,6-dihydropyridin-2(1 H)-one unit of piperlongumine on the anticancer activity . *RSC Advances*, 10(69), 42128–42136. <https://doi.org/10.1039/d0ra08778e>

- MYZAK, M. C., DASHWOOD, R. H. (2006). Histone Deacetylases as Targets for Dietary Cancer Preventive Agents: Lessons Learned with Butyrate, Diallyl Disulfide, and Sulforaphane. 443–452.
- NAN, X.-W., GONG, L.-H., CHEN, X., ZHOU, H.-H., YE, P.-P., YANG, Y., XING, Z.-H., WEI, M.-N., LI, Y., WANG, S.-T., LIU, K., SHI, Z., YAN, X.-J. (2019). Survivin Promotes Piperlongumine Resistance in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, 1345. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01345>
- NASİR, A., BULLO, M. M. H., AHMED, Z., IMTIAZ, A., JADOON, M., AHMED, H., AFREEN, A., YAQOUB, S., NASİR, A., HASSAN, M. M., AHMED, Z., IMTIAZ, A., YAQOUB, E., JADOON, M. (2019). Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1571480>
- Nutrient Recommendations: Dietary Reference Intakes (DRI)*. (y.y.). (Erişim Tarihi: 09 Kasım 2020). https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/Dietary_Reference_Intakes.aspx
- Nutrition*. (Erişim Tarihi: 05 Şubat 2021). <https://www.who.int/health-topics/nutrition>
- ORLÍKOVA, B., SCHNEKENBURGER, M., ZLOH, M., GOLAIŠ, F., DIEDERİCH, M., TASDEMİR, D., WEST, A. C., JOHNSTONE, R. W., SEIDEL, C., SCHNEKENBURGER, M., DICATO, M., DIEDERİCH, M. (2012). *Natural chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF- κ B*. 124(1), 797–805. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1870>
- PANG, B., WANG, J., ZHANG, W., GAO, Y., ZHANG, J., SU, Y., KOU, C. (2016). Increased histone deacetylase activity in peripheral blood mononuclear cells of patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 245, 105–107. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.07.060>
- PARK, S. Y., KIM, J. S. (2020). A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Experimental and Molecular Medicine* (C. 52, Sayı 2, ss. 204–212). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4>
- PENNA, F., COSTELLI, P. (2019). New developments in investigational HDAC inhibitors for the potential multimodal treatment of cachexia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(2), 179–189. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1557634>

- PISKA, K., GUNIA-KRZYŻAK, A., KOCZURKIEWICZ, P., WÓJCİK-PSZCZOŁA, K., PEKALA, E. (2018). Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents – Synthesis and properties of analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.057>
- PRADHAN, N., KAR, S., PARBİN, S., SENGUPTA, D., DEB, M., & DAS, L. (2019). Epigenetic Dietary Interventions for Prevention of Cancer. *Epigenetics of Cancer Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812494-9.00002-0>
- PRASAD, C., IMRHAN, V., REW, M. (2011). Introducing nutritional genomics teaching in undergraduate dietetic curricula. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 4(3), 165–172. <https://doi.org/10.1159/000330237>
- RAJENDRAN, P., HO, E., WILLIAMS, D. E., DASHWOOD, R. H. (2011). Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clinical Epigenetics*, 3(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-3-4>
- RAMOS-LOPEZ, O., MÍLAGRO, F. I., ALLAYEE, H., CHMURZYNSKA, A., CHOI, M. S., CURI, R., DE CATERINA, R., FERGUSON, L. R., GONÍ, L., KANG, J. X., KOHLMEIER, M., MARTÍ, A., MORENO, L. A., PÉRUSSE, L., PRASAD, C., QI, L., REIFEN, R., RIEZU-BOJ, J. I., SAN-CRISTOBAL, R., SANTOS, J. L., ALFREDO MARTÍNEZ, J. (2017). Guide for Current Nutrigenetic, Nutrigenomic, and Nutriepigenetic Approaches for Precision Nutrition Involving the Prevention and Management of Chronic Diseases Associated with Obesity. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 10, 43–62. <https://doi.org/10.1159/000477729>
- RAWAT, L., HEGDE, H., HOTI, S. L., NAYAK, V. (2020). Piperlongumine induces ROS mediated cell death and synergizes paclitaxel in human intestinal cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128, 110243. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110243>
- ROMANI, M., BANELLI, B. (2019). Chapter 18 - Epigenetics, Public Health, Lifestyle, Chemoprevention. *Epigenetics of Cancer Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812494-9.00018-4>
- RUSSO, G. L., UNGARO, P. (2019). Epigenetic Mechanisms of Quercetin and Other Flavonoids in Cancer Therapy and Prevention. *Epigenetics of Cancer Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812494-9.00009-3>

- SEBER, S., SIRİN, D., YETİSYİĞİT, T., BİLGİN, T. (2019). Piperlongumine Increases the Apoptotic Effect of Doxorubicin and Paclitaxel for an Uncommon Neurosurgical Emergency in a Developing Country. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 22, 1070–1077. <https://doi.org/10.4103/njcp.njcp>
- SEIDEL, C., SCHNEKENBURGER, M., DICATO, M., DIEDERICH, M. (2012). *Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature*. 357–367. <https://doi.org/10.1007/s12263-012-0283-9>
- SİNGH, A. K., BİSHAYEE, A., PANDEY, A. K. (2018). Targeting histone deacetylases with natural and synthetic agents: An emerging anticancer strategy. *Nutrients* (C. 10, Sayı 6). <https://doi.org/10.3390/nu10060731>
- SİNGHAL, S., PATHAK, M., AGRAWALA, P. K., OJHA, H. (2020). Design and in silico screening of aryl allyl mercaptan analogs as potential histone deacetylases (HDAC) inhibitors. *Heliyon*, 6(5), e03517. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03517>
- SON, D. J., KİM, S. Y., HAN, S. S., KİM, C. W., KUMAR, S., PARK, B. S., LEE, S. E., YUN, Y. P., JO, H., PARK, Y. H. (2012). Piperlongumine inhibits atherosclerotic plaque formation and vascular smooth muscle cell proliferation by suppressing PDGF receptor signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(2), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.061>
- STOLS-GONÇALVES, D., TRISTÃO, L. S., HENNEMAN, P., NIEUWDORP, M. (2019). Epigenetic Markers and Microbiota/Metabolite-Induced Epigenetic Modifications in the Pathogenesis of Obesity, Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Current Diabetes Reports*, 19(6), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1151-4>
- T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI. (2016). TÜRKİYE BESLENME REHBERİ 2015 (TÜBER). <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/10915,tuber-turkiye-beslenme-rehberipdf.pdf> (Erişim Tarihi: 24 Mayıs 2021).
- THATİKONDA, S., POOLADANDA, V., SİGALAPALLİ, D. K., GODUGU, C. (2020). Piperlongumine regulates epigenetic modulation and alleviates psoriasis-like skin inflammation via inhibition of hyperproliferation and inflammation. *Cell Death and Disease*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2212-y>
- TORUK, O., AKSOY, A. (2017). In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner*

Fakültesi Dergisi, 6(1), 112–118. <https://doi.org/10.31196/huvfd.325794>

- TRIPATHI, S. K., BISWAL, B. K. (2020). Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent. *Pharmacological Research* (C. 156, s. 104772). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104772>
- VAHID, F., ZAND, H., MIRSHEKARLOU, E. N., NAJAFI, R., GHASEMLOU, M., HEKMATDOOST, A. (2015). The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A Review. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.045>
- VALLÉE MARCOTTE, B., CORMIER, H., GARNEAU, V., ROBÎTAILLE, J., DESROCHES, S., VOHL, M. C. (2019). Current knowledge and interest of French Canadians regarding nutrigenetics. *Genes and Nutrition*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0629-7>
- VENTURELLI, S., BERGER, A., BÖCKER, A., BUSCH, C., WEILAND, T., NOOR, S., LEISCHNER, C., SCHLEICHER, S., MAYER, M., WEISS, T. S., BISCHOFF, S. C., LAUER, U. M., BITZER, M. (2013). Resveratrol as a Pan-HDAC Inhibitor Alters the Acetylation Status of Histone Proteins in Human-Derived Hepatoblastoma Cells. *PLoS ONE*, 8(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073097>
- WANG, Y., CHANG, J., LIU, X., ZHANG, X., ZHANG, S., ZHANG, X., ZHOU, D., ZHENG, G. (2016). Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging*, 8(11), 2915–2926. <https://doi.org/10.18632/aging.101100>
- WEI, W., SUN, W., YU, S., YANG, Y., AI, L. (2016). Butyrate production from high-fiber diet protects against lymphoma tumor. *Leukemia & Lymphoma*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812494-9.00003-2>
- WEST, A. C., JOHNSTONE, R. W. (2014). *Review series New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment*. 124(1). <https://doi.org/10.1172/JCI69738.30>
- WHO. (2019). *Essential Nutrition Actions*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515856> (Erişim Tarihi: 24 Mayıs 2021).
- WU, X., LIU, Y., AN, J., LI, J., LV, W., GENG, S., ZHANG, Y. (2018). Piperlongumine inhibits

angiotensin II-induced extracellular matrix expression in cardiac fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 10358–10364. <https://doi.org/10.1002/jcb.27379>

XU, S., XIAO, Y., ZENG, S., ZOU, Y., QIU, Q., HUANG, M., ZHAN, Z., LIANG, L., YANG, X., XU, H. (2018). Piperlongumine inhibits the proliferation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Inflammation Research*, 67(3), 233–243. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1112-9>

YADAV, V., KRISHNAN, A., VOHORA, D. (2020). A systematic review on Piper longum L.: Bridging traditional knowledge and pharmacological evidence for future translational research. *Journal of Ethnopharmacology*, 247, 112255. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112255>

YOON, S., EOM, G. H. (2016). HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1), 1. <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.1>

ZAM, W., KHADOUR, A. (2017). Impact of Phytochemicals and Dietary Patterns on Epigenome and Cancer. *Nutrition and Cancer*, 0(0), 1–17. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1263746>

ZHANG, L., LIU, C., YUAN, M., HUANG, C., CHEN, L., SU, T., LIAO, Z., GAN, L. (2019). Piperlongumine produces antidepressant-like effects in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behavioural Pharmacology*, 30(8), 721–728. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000498>

ZHAO, X. Y., LIN, J. D. (2015). Long Noncoding RNAs: A New Regulatory Code in Metabolic Control. *Trends in Biochemical Sciences* (C. 40, Sayı 10, ss. 586–596). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.002>

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Sümeyye Bora

E-Posta:

Uzmanlık Alanı:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Yakın Doğu Üniversitesi	2013-2015
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Nuh Naci Yazgan Üniversitesi	2015-2018
Y. Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi	2018-

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör.	Haliç Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Fakültesi- Beslenme ve Diyetetik Bölümü	2019-