



**HeLa Hücre Hattına Uygulanan Doksorubisin ve  
Piperlongumin'in MMP9, PTEN ve NOTCH1  
İfadelerine Etkisinin Araştırılması**

**Gonca GÜZELEL**

**Yüksek Lisans**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN  
2021**

**T.C.**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HELA HÜCRE HATTINA UYGULANAN DOKSORUBİSİN VE  
PİPERLONGUMİN'İN MMP9, PTEN VE NOTCH1 İFADELERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gonca GÜZELEL**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN**

**TEKİRDAĞ-2021**

**Her hakkı saklıdır.**



Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.01.YL.20.267 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HELA HÜCRE HATTINA UYGULANAN DOKSORUBİSİN VE PİPERLONGUMİNİN  
MMP9, PTEN VE NOTCH1 İFADELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Gonca GÜZELEL

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Kanser, bulunduğumuz çağın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Görülme sıklığı ve ölüm oranının yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Değişen yaşam ve beslenme şartları, yüksek radyasyon ve en büyük payı olan genetik yatkınlık kanser vakalarının nedenlerinden bazılarıdır. Kemoterapi, kanser tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Tümörün ilaçla tedavi edilmesi anlamına gelir ve kemoterapi; sınırsız bölünme yeteneği olan kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önleyerek onları hasara uğratar. Adriamisin ticari adı altında satılan Doksorubisin bir kemoterapötiktir. Bir antrasiklin türevi antibiyotik olan doksorubisin; etkisini diğer tüm antrasiklinler gibi DNA içine enterkalasyon yaparak gösterir. Doksorubisin'in tam etki mekanizması hâlâ tamamen anlaşılmamış olmakla beraber DNA ile enterkalasyonun replikasyonu durdurduğu bilinmektedir. DNA replikasyonu sırasında DNA çift sarmalının açılmasını sağlayan topoizomerez II DNA kompleksini stabilize ederek replikasyonu inhibe eder. Doksorubisin hematolojik kanserler, çeşitli karsinoma tipleri ve yumuşak doku sarkomaları gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Piperlongumin, Piperlongum Linn bitki türlerinde bulunan ve kanserli hücre hatlarında ve hayvan modellerinde anti tümorojenik aktivite gösteren alkaloid yapıda doğal bir üründür. Yapılan birçok çalışma piperlonguminin kemopreventif bir ajan olabileceğini ileri sürmektedir. Anti-kanser etkisini GSTP1 ve/veya GSTO1 genlerini susturarak gerçekleştirdiğini ileri süren çalışmalar yanı sıra kanser hücre migrasyonu, dolayısı ile metastazı engellediğini öne süren çalışmalarda bulunmaktadır. Tamamlanan bu Yüksek Lisans Tez çalışması kapsamında doksorubisin ve piperlonguminin serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerine etkileri MMP9, PTEN ve NOTCH1 gibi metastaz ve tümorogenez ile bağlantılı genlerin karşılaştırmalı ifade düzeyleri Gerçek Zamanlı PCR ve bu genlerin kodladığı proteinlerin ifadeleri Western-Blot yöntemi ile değerlendirilerek araştırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** HeLa, Doksorubisin, Piperlongumin, MMP9, PTEN ve NOTCH1

2021, 57 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DOXRUBICINE AND PIPERLONGUMINE, WHICH ARE APPLIED TO HELA CELL LINE, ON MMP9, PTEN AND NOTCH1 EXPRESSION

Gonca GÜZELEL

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Doç.Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Cancer is one of the most important health problems of our era. It is also a public health problem due to its high incidence and high mortality rate. Changing living and nutritional conditions, high radiation and most importantly genetic predisposition are some of the causes of cancer cases. Chemotherapy is a method used in cancer treatment. It means treating the tumor with medication and chemotherapy; damages cancer cells, prevents from the growth and proliferation of cancer cells, which are capable of unlimited division. Doxorubicin, sold under the trade name Adriamycin, is a chemotherapeutic. Doxorubicin, an anthracycline derivative antibiotic; shows its effect by intercalating into DNA like all other anthracyclines. Although the exact mechanism of action of doxorubicin is still not fully understood, it is known that intercalation with DNA stops replication. Doxorubisin stabilizes the DNA Topoisomerase II complex, which enables the DNA double helix to open during DNA replication, and inhibits replication. Doxorubicin is frequently used in the treatment of various cancers such as hematological cancers, various types of carcinoma, and soft tissue sarcomas. Piperlongumin is an alkaloid natural product found in Piperlongum Linn plant species and showing anti-tumorigenic activity in cancerous cell lines and animal models. Many studies suggest that piperlongum may be a chemopreventive agent. In addition to studies suggesting that it achieves its anti-cancer effect by silencing the GSTP1 and / or GSTO1 genes, there are studies suggesting that it prevents cancer cell migration and therefore metastasis. Within the scope of this completed Master's Thesis, the comparative expression levels of genes associated with metastasis and tumorigenesis such as MMP9, PTEN and NOTCH1 in the cervical cancer cell line HeLa cell line of doxorubicin and piperlongumin were evaluated by Real Time PCR and the expressions of the proteins encoded by these genes by Western- Blot method. Within the scope of this completed Master's Thesis, the comparative expression levels of genes related to metastasis and tumorigenesis such as MMP9, PTEN and NOTCH1 in the cervical cancer cell line HeLa administered doxorubicin and piperlongumin were evaluated using Real Time PCR and the expressions of the proteins encoded by these genes by Western- Blot method.

**Key words:** HeLa, Doxorubicin, Piperlongumine, MMP9, PTEN and NOTCH1

2021, 57 pages

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Serviksin yapısı.....	3
2.2. Kanser .....	4
2.2.1. Serviks Kanseri.....	5
2.2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi.....	5
2.3. HeLa Hücre Hattı.....	6
2.4. Piperlongumin ve etki mekanizması.....	6
2.5. Doksorubisin ve etki mekanizması.....	8
2.6. GEN BÖLGELERİ.....	9
2.6.1. PTEN GENİ.....	9
2.6.2. MMP9.....	10
2.6.3. NOTCH1.....	11
<b>3. MATERYAL METOD</b> .....	<b>13</b>
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	13
3.2. Kullanılan kimyasal maddeler .....	13
3.3. Kullanılan kitler .....	14
3.3.1. Hücreden RNA izolasyon kiti.....	14
3.3.2. cDNA reverse transkripsiyon kiti.....	14
3.3.3. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon kiti.....	14
3.4. Kullanılan Besiyeri .....	15
3.4.1. DMEM ( Sigma, ABD) .....	15
3.5. Kullanılan Solüsyonlar .....	15
3.5.1. %70 Etanol.....	15
3.6. Yöntemler .....	15

3.6.1. Hücre Kültürü .....	15
3.7. İlaç Uygulanması .....	16
3.8. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] hücre canlılık analizi	16
3.9. AO (Acridine Orange) /PI (Propidium Iodide) Boyama .....	17
3.10.Hücre Sayımı .....	17
3.11.Hücreden RNA İzolasyonu (Pure Link, Ambion Kit) .....	17
3.12.RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi .....	18
3.13.Western Blot .....	19
3.13.1. Elektroforez .....	19
3.13.2. Kullanılan Solüsyonlar .....	19
3.13.2.1. Ayrıştırma Jeli Tamponu .....	19
3.13.2.2. Yükleme Jeli Tamponu.....	19
3.13.2.3. 10X Elektroforez Tamponu .....	19
3.13.2.4. 2X Yükleme Tamponu .....	19
3.13.2.5. Akrilamid.....	19
3.13.2.6. %10 SDS .....	20
3.13.2.7. %10 APS ( Amonyumpersülfat).....	20
3.13.3. Jel Hazırlığı.....	20
3.13.3.1. %7'lik Ayrıştırma Jeli .....	20
3.13.3.2. %6'luk Yükleme Jeli .....	20
3.13.4. Örneklerin Hazırlığı.....	21
3.13.4.1. İşlemler .....	21
3.14.Membrana Transfer .....	21
3.14.1. Kullanılan Solüsyonlar .....	21
3.14.1.1. 1X Protein Transfer Tamponu .....	21
3.14.1.2. İşlemler .....	21
3.15.Antikorla İşaretleme .....	22
3.15.1. Kullanılan Solüsyonlar .....	22
3.15.1.1. Blocking Solüsyon.....	22
3.15.1.2. Primer Antibody Dilüent .....	22
3.15.1.3. İşlemler .....	22
3.16.Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	23
3.17.Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	24
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>26</b>

4.1. MTT hücre canlılık analizi .....	26
4.2. Akridin Oranj/Propidium iyodit boyama sonuçları .....	28
4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR analizi sonuçları .....	31
4.4. Western-Blot Analizi Sonuçları.....	34
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>37</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>47</b>





## ÇİZELGE DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> IC50 dozlarının belirlenmesi amacı ile kullanılan piperlongumin ve doksorubisin dozları .....	16
<b>Çizelge 3.2.</b> Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli reaksiyon karışımı ..	24
<b>Çizelge 3.3.</b> Termal Sıcaklık Döngü Cihazı Uygun Sıcaklıkları .....	24
<b>Çizelge 3.4.</b> Gerçek zamanlı PCR bileşenleri ve miktarları .....	25
<b>Çizelge 3.5.</b> Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli sıcaklık ve zaman .....	25
<b>Çizelge 4.1.</b> Piperlongumin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeyleri .....	26
<b>Çizelge 4.2.</b> Doksorubisin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeyleri .....	27
<b>Çizelge 4.3.</b> Deney grupları, uygulama süresi, yapılan uygulama ve uygulanan piperlongumin ve doksorubisin miktarları .....	31
<b>Çizelge 4.4.</b> Gerçek Zamanlı PCR sonucu elde edilen $\beta$ -Aktin, MMP9, Notch1 ve PTEN gen ifadelerine ait RQ değerleri .....	33
<b>Çizelge 4.5.</b> Protein standart oluşturulmasında kullanılan BSA konsantrasyonları ve spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen OD değerleri .....	35

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Kadın üreme organlarının şematik çizimi, serviksin konumu .....	4
Şekil 2.2. Dünya çapında 2020'de kadınlarda tahmini yeni vaka sayısı .....	5
Şekil 2.3. Piperlonguminin yapısı .....	8
Şekil 2.4. Doksorubisinin moleküler yapısı .....	9
Şekil 4.1. Piperlongumin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeylerine ait grafik ....	27
Şekil 4.2. Doksorubisin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeylerine ait grafik .....	28
Şekil 4.3. Artan dozlarda piperlongumin ve doksorubisin uygulanan hücre kültürlerine ait AO/PI boyama .....	29
Şekil 4.4. Kontrol, 100 µM piperlongumin, 1000nM doksorubisin ve 100 µM piperlongumin + 1000nM doksorubisin kombine olarak yapılan uygulamalara ait AO/PI boyamaları .....	30
Şekil 4.5. PTEN genine ait amplifikasyon eğrisi. x: döngü sayısı, y: Rn değeri .....	32
Şekil 4.6. β-aktin genine ait amplifikasyon eğrisi. x: döngü sayısı, y: Rn değeri .....	32
Şekil 4.7. BSA Standart grafik .....	35
Şekil 4.8. Western-blot sonuçları .....	36

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
$\infty$	: Sonsuz İşareti
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AO	: Akridin Orange
APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Sığır Serum Albümin
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
$\text{CO}_2$	: Karbondioksit
ddH <sub>2</sub> O	: İki kez distile edilmiş su
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Dinükleotittrifosfatlar
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EtOH	: Etanol
FAMTM	: Karboksifloresan
FN2	: Fibronektin
g	: Gram
GSTP1	: Glutasyon S-transferaz Pi 1
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
IARCH	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
KD	: Kilo Dalton
L	: Litre
mA	: Miliamper
mL	: Mililitre
MMP	: Matriks Metalloproteinaz

MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
°C	: Santigrat Derece
OD	: Optik Densite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI	: Propidyum İyodür
PL	: Piperlongumin
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolođu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: N’N’N’N’-Tetrametiletilendiamine
TIMP	: Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri
TOPIIB	: DNA Topoizomeraz 2 Beta
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
XPO1/ CRM1	: Eksportin 1
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\beta$ -ME	: Beta Merkптоetanol

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesi ve yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, hoşgörü, sevgi ve sabrını eksik etmeyen sevgili danışmanım Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e; Kendisi ile çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Türker BİLGİN'e;

Araştırmanın en başından itibaren karşılaşılan güçlüklerde umut aşıl原因, hem akademik hem de dost olarak yanımda olan Hande AKALAN'a;

Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan değerli hocalarıma;

Bu süreçte desteklerini esirgemeyen annem Leyla TURANLI, babam Erol TURANLI ve kardeşim Emirhan TURANLI'ya;

Manevi tüm yükümü sırtlayan sevgili eşim Görkem GÜZELEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2021

Gonca GÜZELEL  
Ziraat Mühendisi

## 1. GİRİŞ

Kanser, bulunduğumuz çağın en önemli sağlık sorunlarından biridir ve yeni tedavi yöntemleri veya kemoterapötikler günümüzde en çok araştırılan konulardandır. Raj ve arkadaşları piperlongumini tanımlanmış kanser hücreleri soylarını seçici bir şekilde öldürüldüğünü göstermişlerdir (Raj vd., 2018).

Serviks kanser hücrelerinden elde edilen HeLa hücre hattı ile yaptığımız bu çalışmada doksorubisin ve piperlonguminin MMP-9, PTEN ve NOTCH1 ifadesi ve hücre proliferasyonu/göçü üzerine etkileri araştırılmıştır. Tüm hücre tiplerinde ifade edilen ve bir hücre iskeleti elamanı olan Aktin geni ve proteini çalışmada internal kontrol olarak kullanılmıştır. MMP-9, PTEN ve NOTCH1 gen ve protein ifadesindeki değişimler internal kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -Aktin ifadesi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir

Piplartin olarak da isimlendirilen Piperlongumin (PL), Hint alternatif tıbbında öksürük, solunum yolu enfeksiyonları, mide ağrısı ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılır. Yapılan çalışmalarda Piperlonguminin, hematolojik, gastrointestinal, merkezi sinir sistemi üzerindeki pozitif etkileri belirlenmiş, bununla birlikte, bu molekülün çeşitli biyolojik aktiviteleri keşfedilmiştir. Piperlonguminin antiplatelet, antinosiseptif, anksiyolitik, antiarteriosklerotik, antimikrobiyal özellikleri de tanımlanmıştır. Katı tümörler dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde potansiyel sitotoksik ve antitümör özelliktedir (Gong vd., 2014).

Hem protein fosfataz hem de lipid fosfataz aktivitesine sahip olan bir çift özgülüklü 403 aminoasitlik, 55 kD bir fosfataz olan ve 10q23.3 kromozomunda bulunan gen olan PTEN, insan kanserinde en çok değişime uğramış tümör baskılayıcı genlerdendir (Yaşar, 2003). PTEN geni, endometriyal kanserde ve endometroid tipi yumurtalık kanserinde sıklıkla mutasyona uğradığı bilinmektedir. Rahim ağzı kanserinde ise PTEN geninin seyrek mutasyonları bildirilmiştir.

MMP-9 da çeşitli kanser türleri için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmalarda MMP-9 ekspresyonunun rahim ağzı kanserinde yüksek olduğu belirlenmiş ve rahim ağzı kanserinde MMP-9 ekspresyonunun hastalığın seyrini belirlemede önemli bir faktör olduğundan bahsedilmektedir (Huang, 2018).

Bir diğer gen bölgesi olan ve hücre gelişim ve farklılaşmasını düzenleyen bir yolak olan NOTCH sinyal yolunun son çalışmalarda hücre farklılaşması ve proliferasyonunun yanı sıra

apoptotik olaylarda da rol oynadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda NOTCH1 sinyal yolunun, spesifik MMP'leri aktive ederek endotel hücrelerinin morfogenezini düzenlediği belirlenmiştir (Zhao vd., 2017).

Çalışmamızda HeLa hücre hattına, doksorubisin ve piperlongumin 24 ve 48 saat süreyle belirlenen dozda uygulanarak MMP9, PTEN, NOTCH1 ve  $\beta$ -Aktin genleri üzerindeki etkisi moleküler olarak araştırılmıştır. 24 ve 48 saat sonunda HeLa hücrelerindeki canlılığın tayini için MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testi yapılmıştır. Belirlenen iki farklı saat periyodu için RNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve cDNA reaksiyonu kurulduktan sonra belirlenen genlerin ekspresyon miktarını saptamak için kantitatif Gerçek Zamanlı PCR yöntemi uygulanmıştır. Aynı zamanda 24 ve 48 saat periyotlarının sonunda ilaç uygulamalarının ardından protein analizi yapılmış, MMP9, PTEN, NOTCH1 ve  $\beta$ -Aktin genlerinin protein ifadesi için Western-Blot yöntemi kullanılmıştır. Bu şekilde doksorubisin ve piperlonguminin metastaz ve tümorogenez ile bağlantılı genlerin ifade düzeyleri karşılaştırılmış ve doğal bir ürün olan piperlonguminin serviks kanseri tedavisindeki olası yeri irdelenmiştir.

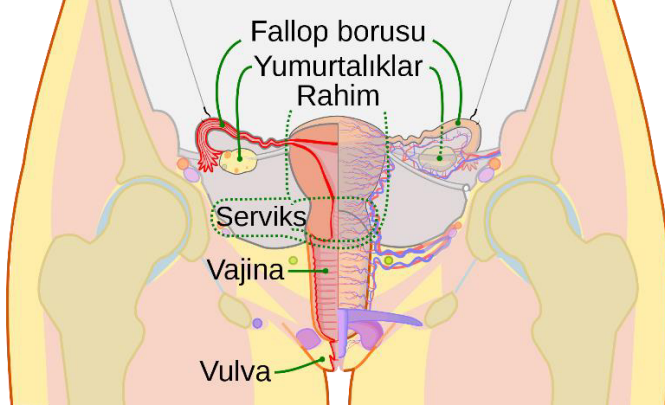
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Serviksin Yapısı

Serviksin boyutu ve şekli kadının yaşına ve hormonal durumuna göre değişiklik gösterir. Doğum yapmış kadınlarda bu kısım hantaldır ve dış delik (eksternal os) geniş, aralıklıdır. Enine bir yarık olarak görünür. Hiç doğum yapmamış kadınlarda eksternal os, serviksin merkezindedir. Küçük dairesel bir açıklığı andırır. Supravajinal kısım, internal servikal os'da uterusun kas gövdesi ile buluşur. Dış os'un dışında kalan serviksin bu bölümüne ekstoserviks denir. Bu kısım vajinal spekulum sırasında görülebilen kısımdır. Dış os'a yakın kısma endoserviks denilir. Serviksin bu kısmını görüntülemek için gerilmesi veya genişletilmesi gereklidir.

Endoserviksten geçen endoservikal kanal, rahim boşluğunu vajina ile birleştirir ve vajinaya açıldığı iç kısımdan dış osa uzanır. Kadının yaşına ve hormonal durumuna göre uzunluk ve genişlik bakımından değişiklik gösterir. Üreme çağındaki kadınlarda 6-8 mm genişliğinde olabilir. Rahim ağzını çevreleyen boşluk vajinal forniks olarak isimlendirilir. Forniksin serviks ile lateral vajinal duvarlar arasındaki kısmına lateral forniks denir. Vajinanın ön ve arka duvarları ile serviksin arasındaki kısımlar sırasıyla ön ve arka forniks olarak isimlendirilir (Sellors. ve Sankaranarayanan, 2003).



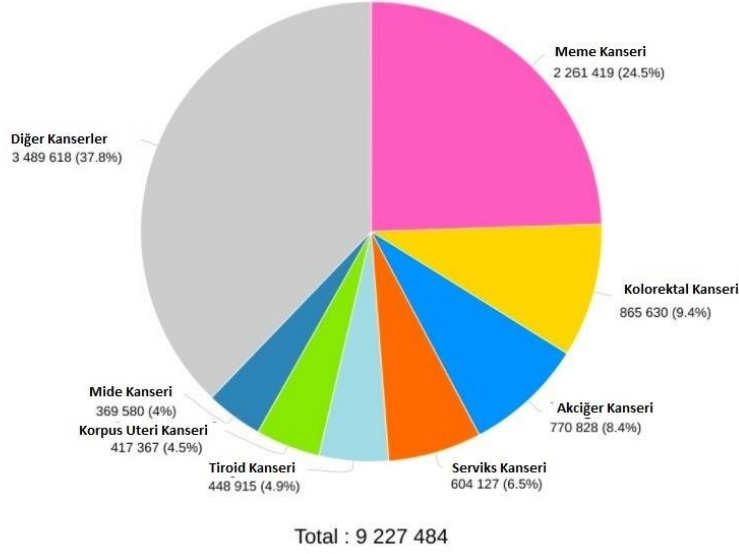


Şekil 2.1. Kadın üreme organlarının şematik çizimi, serviksin konumu (Serviksin kadın üreme organları içindeki konumu, 2021).

## 2.2. Kanser

Kanser, bulunduğumuz çağın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Görülme sıklığı ve ölüm oranının yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Kanser, hücre bölünmesi üzerindeki kontrol noktalarından kurtulduğunda ve kontrolsüz proliferasyonunu takiben başlar. Bu hücrelerin tümü de uygunsuz çoğalma gösterir. Bu anormal hücrelerden oluşan bir tümör veya hücre kümesi, kaynaklandığı doku içinde kalabilir. Bu durum in sitü kanser olarak isimlendirilir. Yakındaki dokuları istila etmeye başlayan kanser ise invaziv kanserdir. İstilacı bir tümörün iyi huylu olmadığı söylenir ve kötü huylu bir tümörden kan veya lenf içine dökülen hücreler metastaz yaparak yeni tümörler oluştururlar (National Institutes of Health [NIH], 2007).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), 14 Aralık 2020'de küresel kanser durumuna ilişkin yeni veriler yayınlamıştır. 185 ülkede kanser insidansı ve mortalite sağlayan bir veritabanı olan Globocan 2020'de 19,3 milyon yeni vaka olduğunu bildirmiştir. Yaş, cinsiyet farketmeksizin 10 milyon kişi ise hayatını kanser yüzünden kaybetmiştir (Union for International Cancer Control [UICC], 2020).



Şekil 2.2. Dünya çapında 2020'de kadınlarda tahmini yeni vaka sayısı (Union For International Cancer Control [UICC], 2020).

## 2.2.1. Serviks Kanseri

### 2.2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

2020 Küresel kanser verilerine göre yılında dünya çapında 19,3 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 18,1 milyon) tanılanmış ve yaklaşık 10,0 milyon kanser hastasının ölümü ile sonuçlanmıştır. Dünyanın her yerinden ve her yaşta kadınlardan 604,127 (%6,5) kişi 2020 yılında serviks kanserine yakalanmıştır (Union for International Cancer Control [UICC], 2020).

Rahim ağzı kanseri, dünya çapında her yıl çok fazla kadının hastalığa yakalanmasıyla ciddi bir sağlık sorunudur. Vakaların çoğu, etkili tarama sistemlerinin bulunmadığı daha az gelişmiş ülkelerde ortaya çıkar. Serviks kanserinin gelişimi ile ilişkili diğer faktörler arasında, genç yaşta (<16 yaş) başlayan cinsel aktivite, birden çok cinsel partnerler, genital siğiller, HIV ve HPV pozitifliği bulunmaktadır. Sigara içimi (ve belki de çevresel tütün dumanına maruz kalma), önemli servikal displazi ve invazif rahim ağzı kanseri için bağımsız bir risk faktörüdür. Sigara içenlerin servikal mukusunda veya epitelinde tütüne özgü kanserojenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar tanımlanmıştır bunlar hücresel DNA'ya zarar verir ve kötü huylu tümör üretmek için HPV ile beraber görev yapabilirler (Waggoner, 2003).

İnsan papilloma virüsleri (HPV) enfeksiyonu rahim ağzı kanserinin gelişiminde merkezi bir rol oynamaktadır. Hem konakçı hem de viral genetik faktörlerin, enfekte bireyler arasında HPV ilerlemesi riskinin önemli belirleyicisidir.

HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 ve 73 olmak üzere 14 tip yüksek riskli HPV vardır. HPV tip 16 ve 18 pek çok yerde olduğu gibi Türkiye'de servikal kanserlerle ilişkili en sık görülen tiplerdir (Jain ve Limaiem, 2021).

### **2.3. HeLa Hücre Hattı**

HeLa hücre dizisi, Henrietta Lacks adlı bir rahim ağzı kanseri hastasının tümöründen elde edilen ölümsüzleştirilmiş ilk insan hücre hattıdır. Henrietta Lacks 1951'de kanserden ölmesine rağmen, HeLa hücre hattı kültürde sürekli olarak çoğaltılmış ve biyomedikal araştırmalarda en yaygın kullanılan insan hücre dizilerinden biri haline gelmiştir (Landry vd., 2013).

Bu hücreler, diğer kanser hücrelerine kıyasla bile anormal derecede hızlı çoğalırlar. Diğer birçok kanser hücresi gibi, HeLa hücreleride telomeraz enziminin aktif bir versiyonuna sahiptir. Telomerler sürekli kopyalanmaktadır ve bu yaşlanmaya ve hücre ölümüne neden olan telomerlerin giderek kısalmasını önler. Böylelikle sınırsız hücre bölünmesi ve ölümsüzlüğe sahip bir hücre hattı meydana gelir. HeLa hücreleri karyotipik olarak yüksek derecede anormal ( $4n = 82$ ) ve sitolojik olarak farklı markör kromozomları taşır. Fenotipik olarak epitel görünümündedirler. Hızla büyür ve temas inhibisyonu eksikliği gösterir.

HeLa hücreleri çocuk felci aşısının geliştirilmesi, HPV ve rahim ağzı kanseri arasındaki ilişkinin belirlenmesi, telomerazın rolü gibi birçok çalışmaya konu olmuştur.

### **2.4. Piperlongumin ve Etki Mekanizması**

Piperlongumin, aynı zamanda pipartin olarak da isimlendirilir. Piperlongumin (PL), Hint alternatif tıbbında öksürük, solunum yolu enfeksiyonları, mide ağrısı ve diğer hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bir bitkidir. Uzun biberden (*Piper longum* Linn) izole edilen aktif bir alkaloiddir ve PL'nin kimyasal yapısı iyi karakterize edilmiştir. Keşif tarihi çok uzun bir süre önce olmamasına rağmen, farmakolojik özellikleri son yıllarda ortaya çıkarılmıştır (Piska, Gunia-Krzyżak, Koczurkiewicz, Wójcik-Pszczola ve Pękala, 2018).

Yakın zamanda PL, hematolojik, gastrointestinal, merkezi sinir sistemi üzerindeki pozitif etkileri gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bu molekülün çeşitli biyolojik aktiviteleri keşfedilmiş ve antiplatelet, antinosiseptif, anksiyolitik, antiarteriosklerotik, antimikrobiyal özellikleri de tanımlanmıştır. Katı tümörler dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde potansiyel sitotoksik ve antitümör özelliktedir (Gong vd., 2014).

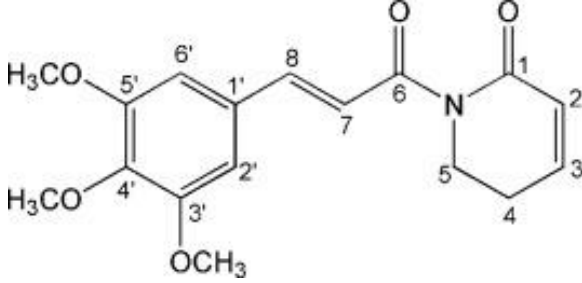
Piperloguminin tümör hücresinin büyümesini ve gelişmesini engelleyen aktiviteleri, kolon, akciğer, meme, pankreas, böbrek ve prostat dahil olmak üzere bir dizi kanser hücre dizisine karşı sitotoksik ve sitostatik özellikler gösteren birkaç kanser modelinde araştırılmış ve çeşitli hayvan modellerinde antitümör aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Piperlongumin'in hem kaspaz bağımlı apoptozla hem de nekroz ve otofaji yoluyla hücre ölümünü tetiklediği bulunmuştur (Guamán, Orellana ve Ratovitski, 2017).

Sitotoksitesi, tümör hücrelerinde mikromolar aralıkta gözlenmiştir. Ancak normal hücrelerde gözlenmemiştir. Kantitatif proteomik yaklaşımlar, redoks ve ROS homeostazını modüle ederek oksidatif stresi düzenlediği bilinen iki güçlü PL bağlayıcı proteini tanımlanmıştır. Bunlar Glutatyon S-transferaz Pi 1 (GSTP1) ve karbonil redüktaz 1'dir. PL, GSTP1 ile etkileşime girdiğinde, protein glutatyonilasyonu hücrel toksisite ile ilişkili bir süreç olarak tanımlanmıştır. PL, G1 veya G2 / M fazında hücre döngüsünün durmasını ve ardından mitokondriyal bağımlı apoptozu tetikler. PL ayrıca otofajiyi teşvik ederek, çeşitli kanser hücre dizilerinde hücre ölümüne aracılık eder (Gong vd., 2014).

Eksojen ROS üretim tedavisi ile oksidatif stresin indüksiyonu artık etkili bir kanser tedavisi olarak kabul edilebilir. Çünkü bu yaklaşım, normal hücreleri etkilemeden kanser hücrelerini seçici olarak öldürür. Piperlongumine (PL), antikanser tedavisinde bir ROS indükleyicisi olarak işlev görür. Piperlunguminin ROS düzeylerini artırdığı ve normal hücrelerde değil, birkaç kanser hücre tipinde seçici hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Raj vd., 2011). PL aktive ROS birikimi, JNK / ERK yolağının aktivasyonu yoluyla kanserli hücrenin apoptozuna yol açar (Kumar ve Agnihotri, 2019).

Niu ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlarda, piperlonguminin, HeLa hücrelerinde eksportin 1 (XPO1) olarak da bilinen kromozomal bakım 1 (CRM1) ile etkileşimlerini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Tümör baskılayıcı proteinlerin çekirdek içinde birikmesine neden olduğunu ve piperlonguminin kendisinin CRM1'de korunan Cys528 ile doğrudan etkileşime girdiğini göstermişlerdir. Yazarlar, CRM1 mutant HeLa hücreleri üzerindeki etkisini

incelemişlerdir. CRM1 mutant HeLa hücrelerinin piperlongumine dirençli olduğunu ve bu nedenle tümör baskılayıcı proteinlerin nükleer dışı aktarımının piperlongumin aracılı inhibisyonu, rahim ağzı kanseri dahil kanserleri tedavi stratejiler geliştirmek için kullanılabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir (Niu vd., 2015).



Şekil 2.3. Piperlonguminin kimyasal yapısı (Piska vd., 2018).

## 2.5. Doksorubisin ve Etki Mekanizması

Adriamisin ticari adı altında satılan Doksorubisin (DOX) bir kemoterapi ilacıdır. DNA replikasyonu sırasında topoizomeraz II'yi inhibe eder ve daha sonra çift iplik kopması sonrasında nükleotit zincirinin bağlanmasını önler (Momparker, Karon, Siegel, ve Avila, 1976).

Doksorubisinin antitümör etkileri, mikromolekül sentezinin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun, DNA bağlanmasının, çapraz bağlanmanın, topoizomeraz IIb'nin (TOPIIb) baskılanması ve apoptozun indüksiyonu ile DNA hasarının önlenmesine neden olan DNA'ya interkalasyonunu içeren mekanizmalardır. TOPIIb, replikasyon, transkripsiyon veya rekombinasyon sırasında DNA ipliklerini ayırır. Doksorubisin, DNA zincir aralarına girerek DNA sentezini önleyen bir engelleyici olarak bilinir. Doksorubisin hem kanser hem de normal hücreler için toksik olmasına rağmen, her iki hücrede de hücre ölümü mekanizması benzer olmayabilir (Takemura ve Fujiwara, 2007). Aynı zamanda DOX hücre membranına bağlanır ve membranın fiziksel özelliklerini değiştirir böylece hücrenin membran fonksiyonunu bozar (Alves vd., 2017).



homoloji bölgesi ve bir konsensüs PDZ bağlama bölgesi (Thr / Ser-x-Val-COOH) içerir (Maehama,, Taylor ve Dixon, 2001).

PTEN'in tümör baskılayıcı aktivitesi, PI3K-AKT-mTOR yolunu negatif olarak düzenleyen lipit fosfataza bağlıdır. Bu yoldaki birinci olay Fosfoinositid 3 kinazın (PI3K) aktivasyonudur. Bu, PDGFR, EGFR, FGFR, IGF-1R, VEGFR, IL-R, interferon reseptörleri (IF-Rs), integrin reseptörleri ve Ras yolu gibi çeşitli büyüme faktörü reseptörlerinden (GFR'ler) meydana gelebilir ve PI3K'nın ana rolü, fosfatidilinositol (4,5) P (PIP2) 'nin fosfatidilinositol (3,4,5) P (PIP3)' e fosforilasyonudur. PIP3, Akt'yi hücre zarının yakınında bağlar. Yer değiştirir ve burada fosfatidilinositol (3,4,5) P'ye bağımlı kinaz 1 (PDK1) ve fosfatidilinositol (3,4,5) P'ye bağımlı kinaz 2 (PDK2) tarafından fosforile edilebilir. Böylece aktive edilebilir. Akt, hücre hayatta kalmasını ve büyümesini teşvik etme kabiliyetine sahiptir. Bunu aşağı regülasyon ile sağlar. Daha sonra, birçok insan kanserinde PI3K / Akt yolağının aktivasyonu gözlemlenir ve PTEN, PIP3'ü PIP2'ye defosforile ettiği için PI3K'nın antagonistidir. PTEN mutasyonunun neden olduğu bu PI3K / PTEN dengesizliği daha sonra insan kanserine neden olur (Romano ve Schepis, 2012; Xu, Yang, Zhou ve Lu, 2014).

## 2.6.2. MMP9

Biyobelirteçler, kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir. Kanser biyobelirteçleri, kanser hastalığının teşhisi ve tedavisi, tedavinin etkinliğini izlemesi gibi birçok alanda önemlidir. MMP9'da çeşitli kanser türleri için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir.

Huang Hao, immünokimya testleri kullanılarak 225 vakadan alınan servikal kanser örneklerinde MMP9 ekspresyonunu araştırmıştır. MMP9 ekspresyonunun rahim ağzı kanserinde yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışma, rahim ağzı kanserinde MMP9 ekspresyonunun hastalığın seyrini belirlemede önemli bir faktör olduğundan bahsetmektedir.

Bugüne kadar, 20'den fazla MMP tanımlanmıştır. Tümör hücresinin kan damarlarına göçünü kolaylaştıran temel membran ECM protein bozulmasından sorumludur. MMPler çinkoya bağımlı bir endopeptidaz ailesidir. İnsan MMP9 geni, 20q13.12 kromozomunda bulunur ve bu gen 13 ekson ve 12 intron içerir.

İnsan MMP9 proteini, hemopeksin benzeri alan, katalitik alan, sinyal peptidi, menteşe bölgesi ve propeptit bölgesi MMP9'un katalitik alanı, fibronektin tip II (FN2) alanları, aktif

bölge ve çinko bağlama bölgesinden oluşur. Bu protein, iki çinko iyonu ve beş kalsiyum iyonu içerir. MMP-9, çinkoya bağımlı endopeptidazdır ve katalitik aktivitesi için çinko iyonuna ihtiyaç duyar.

Matriks metaloproteinaz 9, yaygın olarak vasküler endotelyumu etkiler. Böylelikle önemli büyüme ve hayatta kalma faktörlerinden biri olarak kabul edilen vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi yeni damar oluşumunu uyaran güçlü bir faktör olarak kabul edilir.

MMP'lerin aktiviteleri, metaloproteinazların (TIMP'ler) doku inhibitörleri tarafından *in vivo* kontrol edilir. TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olarak adlandırılan 4 bilinen inhibitör vardır. Metaloproteinaz 1 doku inhibitörleri MMP9'u yüksek afinite ile inhibe eder ve MMP-TIMP dengesinin bozulmasının bir sonucu olarak, tümör istilasası, metastaz, anjiyogenez ve yara iyileşmesi gibi bir dizi patojenik süreç meydana gelir (Huang, 2018).

### 2.6.3. NOTCH1

Hücre gelişim ve farklılaşmasını düzenleyen bir yolak olan NOTCH sinyal yolu, çoğu çok hücreli organizmada mevcut olan yüksek oranda korunmuş bir hücre sinyal sistemidir. Memelilerde Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 olarak adlandırılan dört farklı Notch reseptörü NOTCH geni tarafından kodlanmaktadır. NOTCH reseptörleri transmembran protein ailesinin üyeleri olarak epidermal büyüme faktörü benzeri (EGF) tekrarlarından oluşan hücre dışı bir alan ve farklı alan türlerinden oluşan bir hücre içi alan dahil olmak üzere yapısal özellikleri paylaşır. NOTCH sinyal yolağında, NOTCH reseptörünün komşu hücreye bağlanması ile hedef hücre ile arasında sinyal alışverişini sağlanmaktadır. NOTCH aktivitesi organ oluşumu ve morfogenezde rol oynayarak farklılaşma, çoğalma ve apoptozu etkilemektedir (Yağcı ve Güneş, 2017).

Son çalışmalar NOTCH sinyalinin hücre farklılaşması ve proliferasyonu yanı sıra apoptotik olaylarda da rol oynadığını göstermiştir (Pagie, Gérard ve Charreau, 2018; Bae, Kim ve Lee, 2017).

NOTCH yolağı ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de tanımlanmış ve beyin gelişimi ile ilişkili bir gen olduğu için NOTCH fonksiyonu insandan daha çok özellikle model organizmalarda yoğun olarak çalışılmıştır (Shen, ve Sun, 2017). Notch reseptörlerinin ligandları trans-Golgi ağında kesilmekte ve hücre yüzeyine bir heterodimer olarak sunulmaktadır.



NOTCH sinyal yollarındaki bozulmanın birçok kanser tipi ile ilişkisi belirlenmiş ayrıca Alzheimer hastalığı gibi birçok hastalıkla ilişkili bir faktör olduğu ileri sürülmektedir (Hu vd., 2016). NOTCH1 ifadesinin baskılanmasının servikal kanser hücrelerinin invazyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle servikal kanser gelişiminin baskılanması için hedef genler arasında görülmektedir (Pang vd., 2010).

NOTCH1 sinyal yolunun, spesifik MMP'leri aktive ederek endotel hücrelerinin morfogenezini düzenlediği belirlenmiştir (Zhao vd., 2017).



### **3. MATERYAL METOD**

Çalışmanın tamamı HeLa hücre hatları kullanılarak yürütülmüştür. HeLa hücrelerine öncelikle hücrelerin %50'sini öldürebilecek (IC50) dozların belirlenebilmesi için doksorubisin ve piperlungumin 0, 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. IC50 değerleri belirlendikten sonra MTT analizleri, AO/PI boyamalar, Gerçek Zamanlı PCR ve western-blot analizleri uygulama yapılan kültürler ve hiç ilaç uygulanmayan kontrol gruplarında 0, 24 ve 48. saatlerde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. Kullanılan Cihazlar**

Biyogüvenlik kabini (Class II), Nüve, Türkiye  
Buzdolabı, Profilo, Türkiye  
CO<sub>2</sub> etüv, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)  
Çalkalayıcılı su banyosu, Nüve, Türkiye  
Derin dondurucu -200C, Vestel, Türkiye  
Distile su cihazı, GFL, Almanya  
Gerçek zamanlı PCR sistemi, Applied biosystems fast 7500, ABD  
Isısal döngüleme cihazı, Techne TC5000, İngiltere  
İnvert mikroskop, Olympus, Almanya  
Kırık buz makinasi, Fiocchetti, İtalya  
Mini mikrosantrifüj, Cleaver, Güney Kore  
Neubauer lamı, Marienfeld, Almanya  
Otoklav, Hirayama, Japonya  
Otomatik pipet seti, Axygen axypet, Kanada  
Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye  
Vorteks, WiseMix, Kore

#### **3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Amfoterisin B, Multicell, Kanada  
Etanol, Sigma, ABD  
Fetal Sığır Serum (FBS), Multicell, Kanada  
L-glutamin, Multicell, Kanada  
Penisilin/Streptomisin, Sigma, ABD

DMEM , Sigma, ABD

Tripan mavisi, Fluka, ABD

Doksorubisin, Koçak Farma, TR

Piperlungumin,

### **3.3. Kullanılan Kitler**

#### **3.3.1. Hücreden RNA izolasyon kiti**

Kitte var olan yıkama solüsyonu II içerisine 60 ml %100 EtOH ilavesi, lizis solusyonu içerisine %1  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ -ME) ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Kit içerisindeki yıkama solüsyonu I olduğu gibi kullanıldı.

#### **3.3.2. cDNA reverse transkripsiyon kiti**

Kit içerisinde;

- 10x Ters transkriptaz solüsyonu 1 ml,
- Ters transkriptaz enzimi 100 $\mu$ l,
- dNTP 100 Mm,
- 10x Random primer 1 ml bulunmaktadır.

#### **3.3.3. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon kiti**

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kiti içerisinde;

2x Taq-Man gen ekspresyon master karışımı,

- AmpliTaq Gold DNA polimeraz,
- Urasil-DNA glikozilaz,
- dNTP,
- ROX pasif referans,
- Optimize edilmiş tampon bileşenleri,

20x Taq-Man gen ekspresyon tayin kiti,

- İki adet işaretli primer (1x primer final konsantrasyonu 900 nM ve 20x stok primer konsantrasyonu 18µM),
- Bir adet FAM TM boya ile işaretlenmiş Taq-Man prob MGB (1x final konsantrasyonu 250 nM, stok konsantrasyonu 5µM),
- Taq-Man gen ekspresyon assayleri 1 adet 6-VIC® boyası ile işaretlenmiş Taq-Man MGB prob (1x final konsantrasyonu 250 nM, 20x stok konsantrasyonu 5µM'dır) içermektedir.

### 3.4. Kullanılan Besiyeri

#### 3.4.1. DMEM ( Sigma, ABD)

- % 10 fetal sığır serum
- % 1 L-glutamin
- 100 µg/ml Penisilin – streptomisin
- 100 µg/ml Amfoterisin B

500 ml steril DMEM bulunan beher içerisine 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penisilin-streptomisin ve 5 ml amfoterisin B ilave edildi (Cherng ve ark. 1996).

### 3.5. Kullanılan Solüsyonlar

#### 3.5.1. %70 Etanol

70 ml etanol üzerine 30 ml distile su ile tamamlandı.

### 3.6. Yöntemler

#### 3.6.1. Hücre Kültürü

Serviks kanseri hücresi olan HeLa hücre hattı kullanıldı. -80 °C'de kriyotüp içerisinde bulunan HeLa hücreleri sıcak su banyosunda çözdürüldü. Çözülen hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek 1200 rpmde 1 dk santrifüj edildi.

Hücreler %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin streptomisin ve L glutamin eklediğimiz DMEM içerisinde kültüre edildi. Hücreleri kültüre etmek için 25 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip T-25 hücre kültürü kapları kullanıldı. Hücreler buldukları flasttaki çoğalma durumuna bakılarak pasajlandı. Pasajlama işleminde hücrelerimiz adherent özellikte oldukları için 2 ml tripsin ile muamele edildi. Flast yüzeyinden otomatik pipet ile toplanan hücreler santrifüj tüpü içerisine alındı. Tripsini inaktif etmek için 3 ml DMEM eklenerek 1300 rpmde 3 dk santrifüj edildi. Elde edilen pellet, 5ml DMEM besiyeri bulan yeni bir flast içerisinde inkübasyona bırakıldı.

### 3.7. İlaç Uygulanması

İki adet 60 mm petriye kontrol grubu için serviks kanseri hücresi olan HeLa hücre hattının ekimi yapıldı. Doksanaltı kuyucuklu hücre kültürü plakalarına AO/PI boyama ve MTT hücre canlılık analizi için  $3.2 \times 10^4$  hücre ekimi yapılarak bu kültürlere çizelge 3.1.'de verilen dozlarda piperlongumin ve doksorubisin uygulaması gerçekleştirildi. Uygulamalar üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. IC50 dozlarının belirlenmesi amacı ile kullanılan piperlongumin ve doksorubisin dozları.

<b>Piperlongumin (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Doksorubisin (nM)</b>
50 $\mu$ M	500 nM
75 $\mu$ M	750 nM
100 $\mu$ M	1000 Nm
125 $\mu$ M	1500 Nm
150 $\mu$ M	1750 Nm
175 $\mu$ M	2000 Nm

### 3.8. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] Hücre Canlılık Analizi

Bu yöntemde MTT formazana indirgenir. Bu sırada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarından canlı hücre sayısına ulaşılır. Doksorubisin ve

piperlonguminin belirlenen miktar aralığındaki morfolojik değişimleri gözlemlemek amacıyla MTT analizi gerçekleştirildi. Oluşturulan 24, 48 saatlik kültürler MTT analizi sonucu 570 nm dalga boyunda okundu, doksorubisin ve piperlongumin konsantrasyonlarının HeLa hücre hattı üzerindeki etkin doz miktarı değerlendirildi. Altı kuyucuklu hücre kültürü plakalarına RNA izolasyonu ve protein izolasyonu için ekimi yapılan hücrelere belirlenen etkin dozlarda ilaç uygulaması gerçekleştirildi.

### **3.9. AO (Acridine Orange) /PI (Propidium Iodide) Boyama**

Acridine orange canlı hücrelerin çekirdeklerini yeşil, cansız hücrelerin çekirdeklerini ise kırmızı renkli görünüm almasını sağlayan hücre canlılığı boyasıdır.

PI boyası cansız hücrelerin hücre duvarından geçerek nükleik asitlerini boyar ve floresan kırmızı bir görüntü almalarını sağlar. Hücre canlılığını değerlendirmede kullanılır.

### **3.10. Hücre Sayımı**

RNA izolasyon aşamasından önce kültürü yapılan hücrelerin sayımı yapıldı. HeLa hücrelerinin bulunduğu flask 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 1100 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Pellet üzerine 2 ml besiyeri eklendi. Süspand edilen hücrelerden steril eppendorf içerisine 100 µl aktarıldı ve üzerlerine 100'er µl tripan mavisi eklendi. Oluşan karışımdan 10 µl neubauer lamına alındı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. RNA izolasyonuna  $9.5 \times 10^5$  hücre sayısına sahip hücreler ile başlandı.

### **3.11. Hücreden RNA İzolasyonu (Pure Link, Ambion Kit)**

- Hücreden RNA izolasyonuna  $9.5 \times 10^5$  hücre ile başlandı.
- Flask içerisindeki hücreler 15 ml steril santrifüj tüpüne aktarıldı ve +4 °C 2000 g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı.
- Lizis solüsyonu içerisine 0,6 ml β-merkaptoetanol eklendi ve hücre pelleti dağılına kadar pipetaj yapıldı.
- Hücreler maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni steril eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine süpernatant miktarı kadar %70'lik EtOH eklendi ve vortekslendi.

- 700 µl örnek filtreli kolon bulunan koleksiyon tüpüne alındı.
- 12000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpünde biriken atık kısım döküldü.
- Ve örnek bitene kadar filtreli kolonda santrifüj işlemi tekrar edildi.
- Filtreli kolon üzerine yıkama solüsyonu I eklendi. 12000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Filtreli kolon yeni steril eppendorf tüpüne yerleştirildi.
- 500 µl EtOH eklenmiş yıkama solüsyonu II, filtreli kolon üzerine ilave edildi. 12000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında eppendorfta biriken atık boşaltıldı.
- Eppendorf tüp 12000 g hızda 1-2 dakika oda sıcaklığında boş olarak santrifüj edildi. Filtredeki atığın tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
- Filtreli kolon yeni steril eppendorf tüpe yerleştirildi.
- Filtreli kolon üzerine 50 µl RNA içermeyen steril distile su eklendi. Oda sıcaklığında 12000 g de 2 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli kolon eppendorf üzerinden uzaklaştırıldı.
- İzolasyon bitiminde eppendorf tüpte 50 µl miktarında total RNA elde edildi.

### **3.12. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi**

260 ve 280 nm dalga boylarında total RNA izolasyonun miktarının ve saflığının belirlenmesi için absorbans ölçümleri yapıldı. Örnek içerisindeki protein miktarı hesaplaması yapıldı. Standart grafikte örneğin verdiği absorbans değerine karşılık gelen µl/ml cinsinden Bovine Serum Albümin (BSA) miktarı örneğin içerisindeki protein miktarını vermektedir (Şekil 8.9.).

### **3.13. Western Blot**

#### **3.13.1. Elektroforez**

#### **3.13.2. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **3.13.2.1. Ayırıştırma Jeli Tamponu**

181,65 g Tris Baz tartılarak son konsantrasyon 1,5 M olacak şekilde 800 mL steril bi distile su ile içerisinde çözüldü. Tamponun pH'ı 1 M'lık asit ile pH'ı 8,8'e ayarlandı. Çözelti 1000 mL'ye steril bi distile su ile tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

##### **3.13.2.2. Yükleme Jeli Tamponu**

60,55 g Tris baz tartılarak son konsantrasyon 0,5 M olacak şekilde 800 mL steril bi distile içerisinde çözüldü. Tamponun pH'ı 1 M asit ile 6,8'e ayarlandı. Çözelti 1000 mL'ye steril bi distile su kullanılarak tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

##### **3.13.2.3. 10X Elektroforez Tamponu**

15 g Tris Baz ve 94 g Glisin tartılarak 500 mL steril bi distile su içerisinde çözüldü. 50 mL %10 SDS ( Sodyum Doedesil Sülfat) eklenerek çözeltinin son hacmi steril bi distile su ile 1000 mL'ye ayarlandı.

##### **3.13.2.4. 2X Yükleme Tamponu**

1 mL Gliserol, 3 mL %10 SDS, 20 uL Bromfenol mavisi ve 0,5 mL B-Mercaptoetanol; 15 mL'lik tüpe alındı. Enjektör yardımı ile 0,22 uM por büyüklüğünde filtreden geçirilerek partiküllerden arındırıldı ve aynı zamanda sterilize edildi. Küçük hacimlerde -20 °C'de muhafaza edildi.

##### **3.13.2.5. Akrilamid**

29 g Akrilamid ve 1 g N'N' bis 100 mL steril bi distile suda çözülerek hazırlandı. Işıktan muhafaza etmek için aliminyum folyoya sarılarak 4 °C'de saklandı.



### 3.13.2.6. %10 SDS

10 g SDS tartılarak steril bi distile su ile çözülerek pH 7,2'ye ayarlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

### 3.13.2.7. %10 APS ( Amonyumpersülfat)

10 g APS, 100 mL bi distile suda çözüldü. 4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.13.3. Jel Hazırlığı

Örnekler iki farklı yoğunluktaki ayrıştırıcı jel ve yükleme jeline elektroforetik olarak yürütüldü. Yükleme jeli ile örnek içindeki tüm proteinlerin aynı zamanda ayrıştırma jeline aktarılması sağlanarak örneklerin yükleme süreleri arasındaki fark en aza indirilir.

#### 3.13.3.1. %7'lik Ayrıştırma Jeli

- %9 ddH<sub>2</sub>O
- 3,73 mL %30 Akrilamid
- 4 mL 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 160 µL %10 SDS
- 160 µL %10 APS
- 16 µL TEMED (N'N'N'N'-Tetrametiletildiamine)
- Tüp içerisinde karıştırıldı. TEMED jelin donmasını çok hızlandırdığı için tüp içerisine jel dökülmeden hemen önce eklendi.

#### 3.13.3.2. %6'lık Yükleme Jeli

- 5,3 ddH<sub>2</sub>O
- 2 mL %30 Akrilamid
- 2,5 mL Tris (pH 6,8)
- 100 µL %10 SDS
- 100 µL %10 APS
- 10 µL TEMED
- Tüp içerisinde karıştırıldı.

TEMED en son çözelti içerisine eklendi.

### 3.13.4. Örneklerin Hazırlığı

-20 °C'de muhafaza edilen örnekler çözülerek vorteklendi. 6 µL örnek üzerine 10 µL boya ve 24 µL steril tüp su eklenerek 100 °C'de 10 dk protein yapısını bozmak için inkübe edildi.

#### 3.13.4.1. İşlemler

- Distile su ile temizlenen camlar platformda sıkıştırılarak, iki cam arasına sırası ile ayrıştırma jeli sonrasında yükleme jeli döküldü. Yükleme jeli üzerine örneklerin yükleneceği alanları belirlemek amacıyla tarak konularak jeller donduruldu.
- Jel platformu tanka yerleştirildi ve 1X Elektroforez Tamponu yükleme jelindeki kuyucukları geçene kadar tank içerisine eklendi.
- Daha önceden protein konsantrasyonu hesaplanmış örnekler kuyucuklara yüklendi.
- Örnekler, güç kaynağı 80 volt ve amper 45 mA olacak şekilde ayarlanarak yürütüldü.

### 3.14. Membrana Transfer

#### 3.14.1. Kullanılan Solüsyonlar

##### 3.14.1.1. 1X Protein Transfer Tamponu

3 g Glisin ve 5 g Tris tartılıp 800 mL steril distile suda çözdürüldü. Üzeri 1000 mL'ye Metanol ile tamamlandı.

##### 3.14.1.2. İşlemler

- Yürütme işleminden sonra proteinlerin jelden PVDF (Polivinildifluorid) membrana aktarım işlemi gerçekleştirilmesi için cam plakalar elektroforez tankından alınıp içerisinde 1X Protein transfer tamponu bulunan bir kaba alındı.
- Camlar dikkatlice ayrıldı.
- Kuyucukların bulunduğu yükleme jeli kesilerek atıldı ve kalan ayrıştırıcı jel filtre kağıdının üzerine alındı.

- Jel üzerine metanolle ıslatılmış mebran koyuldu.
- Jel ve membran arasında kalabilecek hava kabarcıkları analizi etkileyeceği için, jel yerleştirilirken hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.
- Membran üzerine tekrar filtre kağıdı yerleştirildi
- Transfer tamponu ile iyice emdirilmiş iki sünger arasına sıkıştırılarak sandviç modeli gerçekleştirildi.
- Sandviç transfer tankına jel kısmın tankın anot tarafına, membranın ise katot tarafına gelecek şekilde yerleştirildi. Tank içerisine transfer buffer eklendi.
- Bir gece süreyle 4 °C’de 40 volt, 60 mA’da transfer gerçekleştirildi.

### **3.15. Antikorla İşaretleme**

#### **3.15.1. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **3.15.1.1. Blocking Solüsyon**

Kit içerisinde bulunan;

- 5 mL ultra filtre su
- 2 mL Blocker / Dilüent ( Part A)
- 3 mL Blocker / Dilüent (Part B) kullanılarak hazırlandı.

##### **3.15.1.2. Primer Antibody Dilüent**

Kit içerisinde bulunan

- 7 mL Ultra filtre su
- 2 mL Blocker / Dilüent (Part A)
- 1 mL Blocker / Dilüent (Part B) kullanılarak hazırlandı.

##### **3.15.1.3. İşlemler**

- Membranlar dikkatlice temiz petrilere alındı.

- Membranın üzerini kaplayacak şekilde Blocking Solüsyonu koyularak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra distile su ile yıkanan membran üzerine hazırlanan Primer Antibody Dilüent içerisine Antibodyler eklendi ( $\beta$ -Aktin, PTEN, MMP9, NOTCH1). 2 saat membran çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Çalkalayıcıdan alınan membranlar distile su ile yıkandı.
- Yıkanan membranlar kittede bulunan Sekonder Antibody ile 2 saat muamele edildi.
- İnkübasyon sonrası membran ortamdaki zayıf bağlanan proteinlerin uzaklaşması amacıyla anti wash solution ile 15 dk yıkandı.
- Pens ile el değmeden alınan membran kurutma kağıdına konularak fazla suyu alındı.
- Kaset içerisine alınan Membran üzerine kemüliminisans eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Daha sonra üzerine film membran yerleştirildi, kaset sıkıca kapatıldı ve 1-8 dk sonunda film banyo edilerek sonuçlar görüntüledi.

### **3.16. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu; ilaç uygulanmamış ve belirli periyotlarda ilaca maruz kalan HeLa hücrelerinden elde edilen RNA'lar kullanıldı.

Kimyasallar kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den kullanılmak üzere buz içerisine alındı. Taq DNA polimeraz  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı halde bulunur ve Taq DNA polimerazın yapısı sıcaklıktan etkilenmektedir. Oda koşullarında eritilen PCR bileşenleri vortekslendi. Karışım işlemleri buz içerisinde gerçekleştirildi. Master karışımı oluşturan bileşenlerin miktarı çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Birinci basamak olarak buz içerisindeki steril eppendorflara  $\text{dH}_2\text{O}$  eklendi. Daha sonra karışıma en son Taq DNA polimeraz olmak üzere diğer bileşenler eklendi. Dokuz tane steril eppendorf içerisine 20'şer  $\mu\text{l}$  karışımdan konularak üzerlerine 20'şer  $\mu\text{l}$  kalıp RNA'lardan eklendi. İşlemden sonra eppendorf tüpler kısa süreliğine vortekslendi. Örnekler ısıl döngü cihazına yerleştirildi. Örnekler termal polimeraz zincir cihazında çizelge 3.3.'de gösterilen sıcaklık ve sürelerle tabii tutuldu.

Çizelge 3.2. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli reaksiyon karışımı.

	<b>RNaz ihhibitörü ile</b>	<b>RNaz ihhibitörü olmadan</b>
<b>10x Buffer</b>	2,0	2,0
<b>25 dNTP mix (100 mM)</b>	0,8	0,8
<b>Random Primer</b>	2,0	2,0
<b>Multiscribe Revers Transkriptaz</b>	1,0	1,0
<b>RNaz İnhibitör</b>	1,0	-
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,2	4,2
<b>Total reaksiyon hacmi</b>	10 µl	10 µl

Çizelge 3. 3. Termal Sıcaklık Döngü Cihazı Uygun Sıcaklıkları

	<b>Birinci Adım</b>	<b>2. Adım</b>	<b>3. Adım</b>	<b>4. Adım</b>
<b>Sıcaklık °C</b>	25	37	85	4
<b>Zaman</b>	10 dk	120 dk	5 dk	∞

### 3.17. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çalışma iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İlaç uygulaması yapılmayan HeLa hücre hattından elde edilen cDNA örnekleri çalışmanın kontrol grubu için kullanıldı. Kültüre ettiğimiz ilaç uygulanmamış HeLa hücrelerinden elde edilen cDNA örneklerinden 2'şer µl alınarak buz içerisindeki steril ependorflara eklendi. Farklı zaman periyotlarında ilaca maruz bırakılmış hücreler için de steril ependorflara 2'şer µl eklendi. Her bir gen bölgesine özgü kit kullanıldı. Çizelge 3.4' de gösterilen reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Öncelikle master karışım, gen spesifik kit, dH<sub>2</sub>O steril bir ependorf içerisine alındı. Çizelge 3.4.'de belirtilen miktarlarda karışım oluşturuldu. Oluşturulan karışımdan 18 µl 96 kuyucuklu mikropklara yerleştirildi. Üzerlerine ilgili cDNA örneklerinden 2'şer µl eklendi. Plakanın üzeri optik kaplayıcı ile kaplandı. Plaka maksimum hızda oda sıcaklığında 30 sn santrifüj edildi. Applied Biosystems Fast 7500 gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

cihazı içerisine plaka yerleştirildi ve çizelge 3.5.'de gösterilen uygun PCR koşullarında çalışıldı.

Çizelge 3.4. Gerçek zamanlı PCR bileşenleri ve miktarları.

<b>Reaksiyon İçeriği</b>	<b>Miktar (ul)</b>
<b>cDNA</b>	20
<b>Master mix</b>	100
<b>Gen Özgül Assay</b>	10
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	70
<b>Toplam</b>	200

Çizelge 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli sıcaklık ve zaman.

<b>Basamak</b>	<b>UDG inkübasyonu</b>	<b>Amplitaq Gold, UP enzim aktivasyonu</b>	<b>PZR</b>	
			<b>40 Döngü</b>	
			<b>Denatürasyon</b>	<b>Bağlanma</b>
<b>Zaman</b>	2 dk	10 dk	15 sn	1 dk
<b>Sıcaklık (°C)</b>	50	95	95	60

## 4. BULGULAR

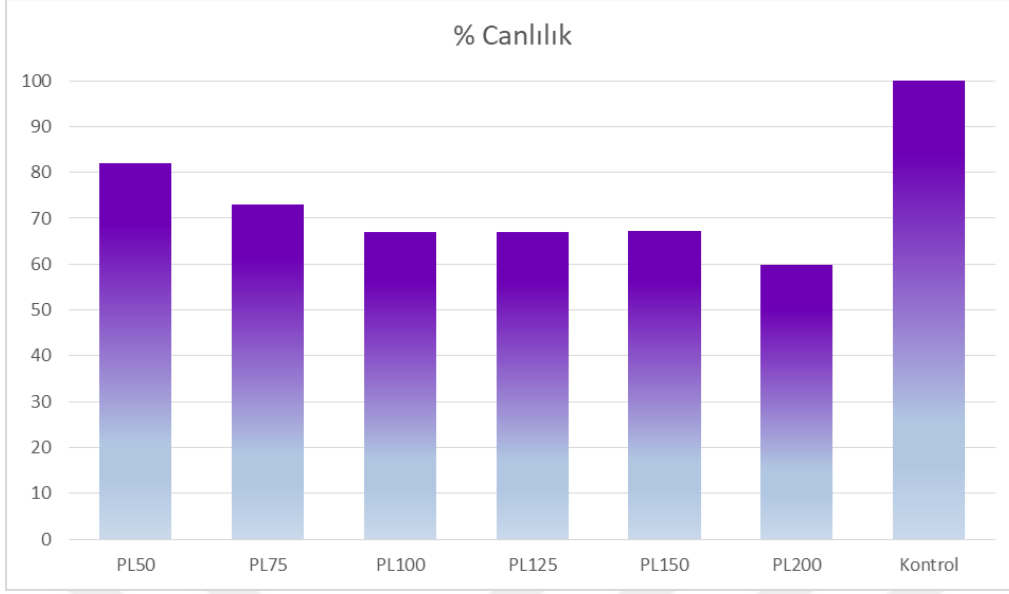
### 4.1. MTT Hücre Canlılık Analizi

T75 flasklarda çoğaltılan HeLa hücreleri %90 konfluent hale geldikten sonra tripsin ile muamele edilip kaldırılarak MTT analizlerini gerçekleştirmek üzere 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda piperlongumin ve doksorubisinin IC50 dozlarını belirleyebilmek amacı ile bu kültürlerle çizelge 3.1.'de verilen miktarlarda piperlongumin ve doksorubisinin uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Uygulamalar üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda kültürlerden ilaçlar pipetaj ile uzaklaştırılmış ve MTT solüsyonu eklenerek 4 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda oluşan tetrazolyum tuzlarının çözünmesi ve reaksiyonun durması için üzerlerine DMSO eklenerek ELİZA okuyucuda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu örneklerden elde edilen optik densite (OD) değeri %100 canlılık kabul edilerek tüm uygulama gruplarında % Canlılık=OD test grubuX100/OD kontrol grubu formülüne göre % canlılık hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de piperlongumin uygulaması sonucu elde edilen % canlılık düzeyleri ve şekil 4.1.'de bu verilere ait grafik verilmiştir. Çizelge 4.4.'te doksorubisin uygulaması sonucu elde edilen % canlılık düzeyleri ve şekil 4.2.'de bu verilere ait grafik verilmiştir.

Çizelge 4.1. Piperlongumin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeyleri

Uygulama	% Canlılık
PL50	81,9
PL75	73,0
PL100	66,9
PL125	67,1
PL150	67,2
PL175	59,9
Kontrol	100

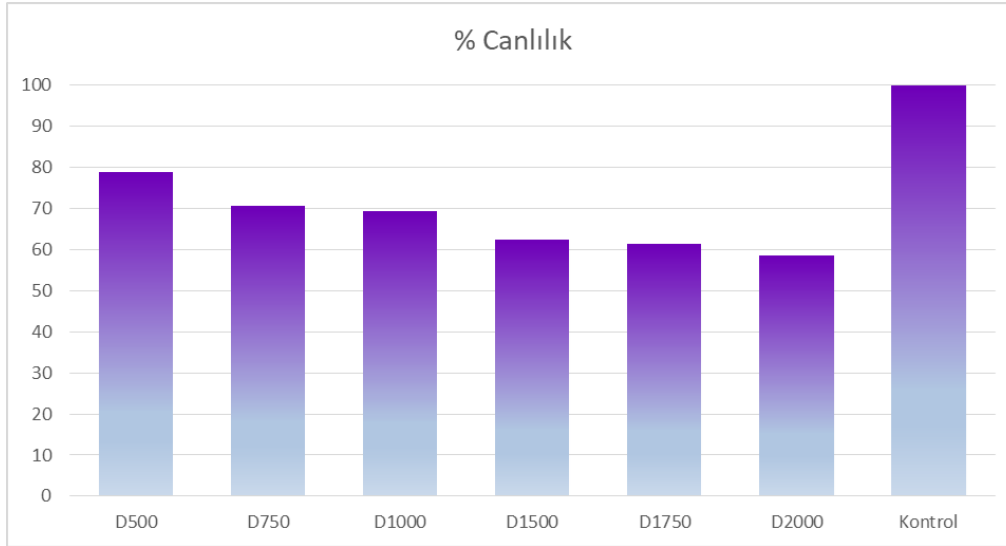


Şekil 4.1 Piperlongumin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeylerine ait grafik

Çizelge 4.2. Doksorubisin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeyleri

Uygulama	% Canlılık
D500	78,9
D750	70,7
D1000	69,4
D1500	62,4
D1750	61,4
D2000	58,4
Kontrol	100

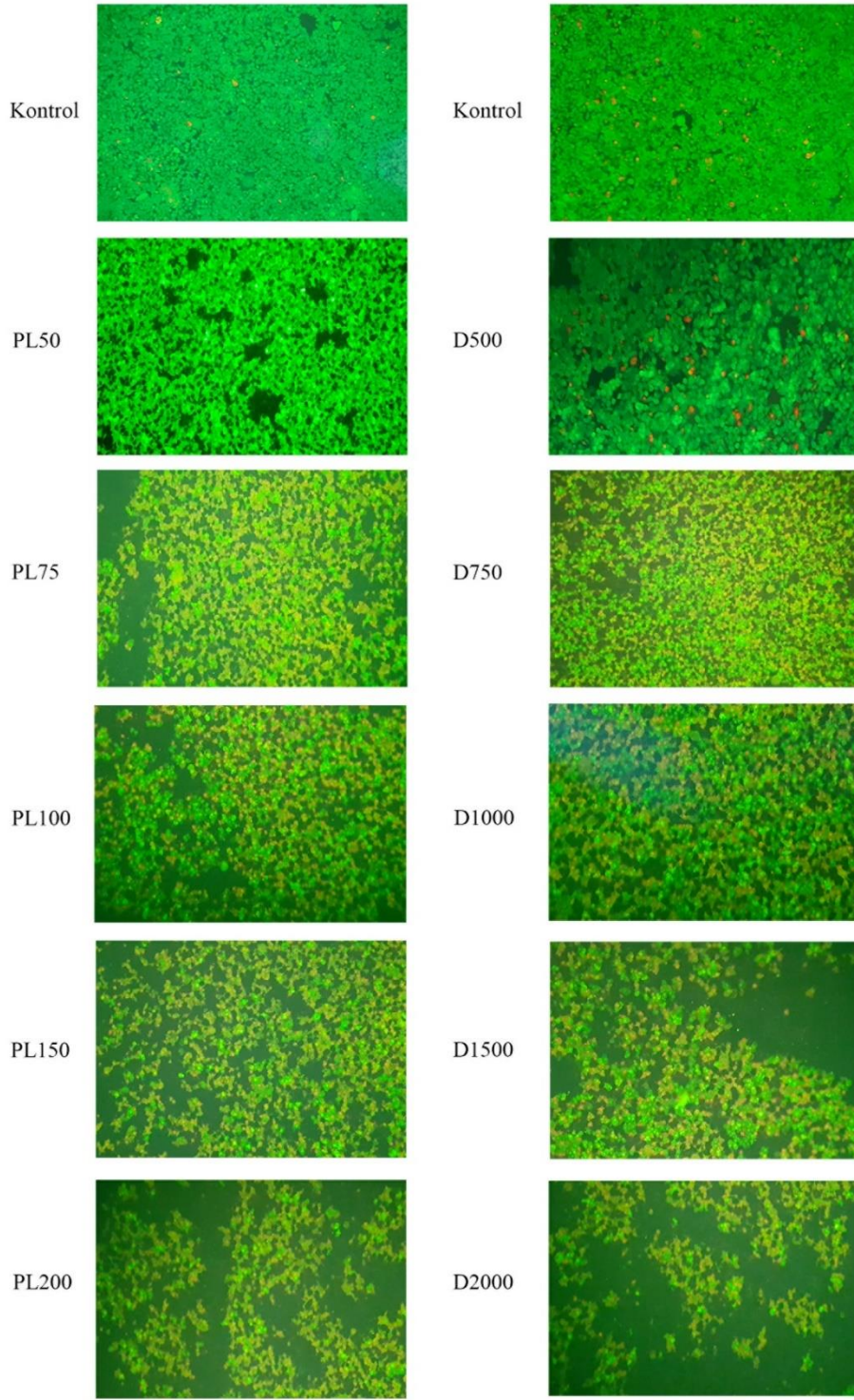




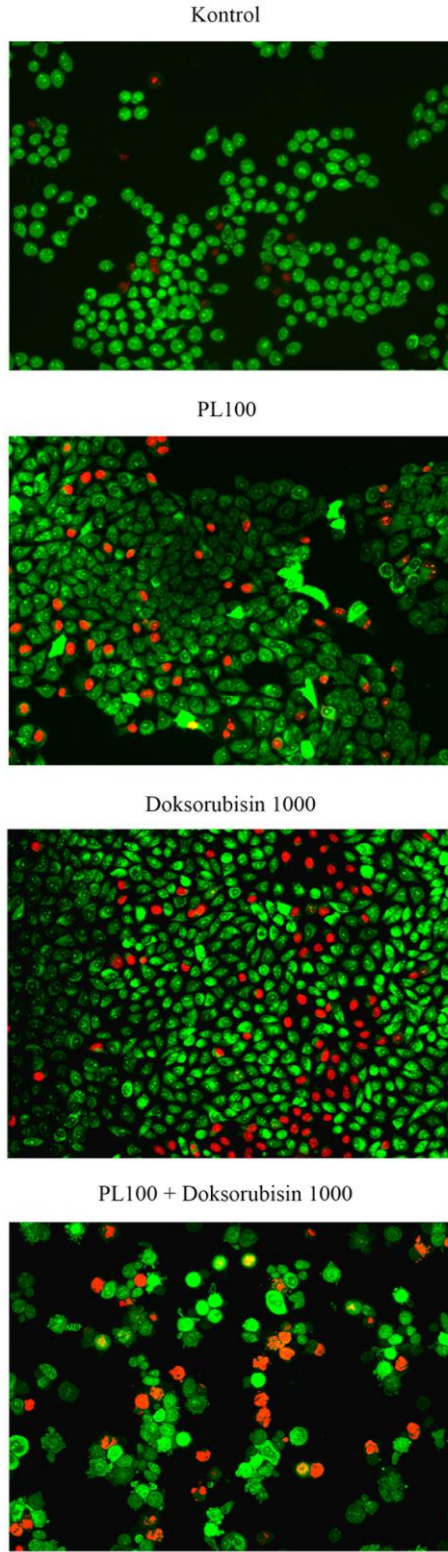
Şekil 4.2. Dokсорubisin uygulaması sonucu belirlenen % canlılık düzeylerine ait grafik

#### 4.2. Akridin Oranj/Propidium İyodit Boyama Sonuçları

Yapılan MTT analizi sonuçlarının teyiti ve saptanan hücre ölümlerinin apoptotik olup olmadığının belirlenmesi amacı ile piperlongumin ve dokсорubisin uygulanan tüm örneklerde AO/PI boyama yapılmıştır. Yapılan AO/PI boyamalara ait resim Şekil 4.3'te görülmektedir. Uygulama dozu arttıkça hem piperlongumin hem de dokсорubisin uygulanan örneklerde hücre ölümünün arttığı saptanmıştır. 100  $\mu$ M piperlongumin ve 1000 nM dokсорubisin uygulanan kültürlerde MTT analizi sonrasında hücre canlılığı sırası ile %66,9 ve %69,4 bulunmuştur. Ancak AO/PI boyamalarda bu dozların üzerinde hücre çoğalmasında baskılandığı ve dolayısı ile hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında 100  $\mu$ M piperlongumin, 1000nM dokсорubisin ve 100  $\mu$ M piperlongumin + 1000nM dokсорubisin kombine olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Şekil 4.4.'te kontrol grubu 100  $\mu$ M piperlongumin, 1000nM dokсорubisin ve 100  $\mu$ M piperlongumin + 1000nM dokсорubisin kombine olarak yapılan uygulamalara ait AO/PI boyamaları verilmiştir.



Şekil 4.3. Artan dozlarda piperlongumin ve doxorubisin uygulanan hücre kültürlerine ait AO/PI boyama. Yeşil boyanan canlı hücreleri, çekirdeği kırmızı boyanan hücreler ölmekte olan hücreleri göstermektedir.



Şekil 4.4. Kontrol, 100 µm piperlongumin, 1000nm doksorubisin ve 100 µm piperlongumin + 1000nm doksorubisin kombine olarak yapılan uygulamalara ait AO/PI boyamaları.

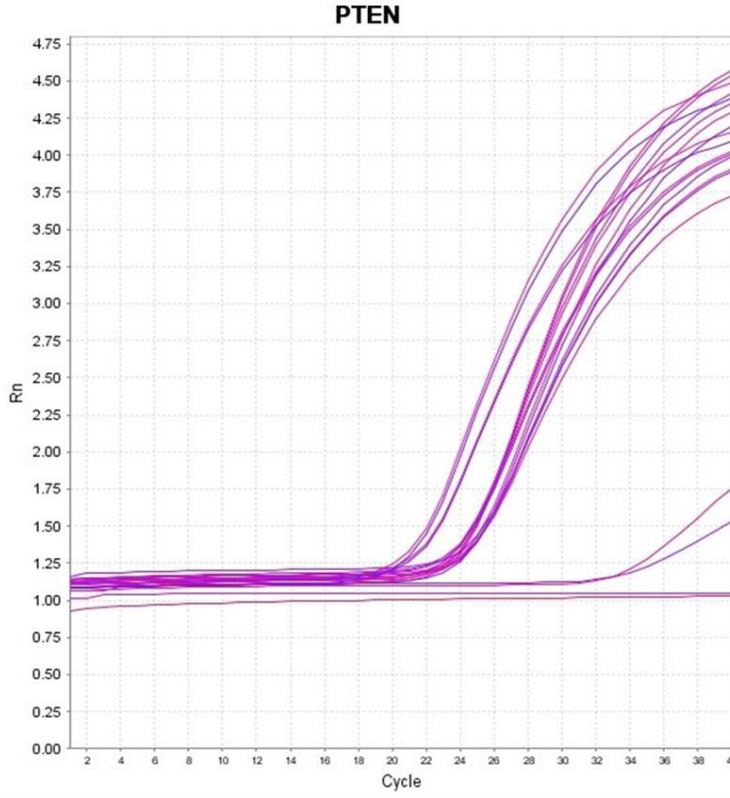
### 4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Analizi Sonuçları

Çalışmanın devamında Kantitatif Real Time PCR ve Western blot analizlerinde MTT analizleri ve AO/PI boyamalar ile belirlenen ve çizelge 4.3.'te gösterilen deney gruplarına 0, 24 ve 48 saat süreyle 100 µM piperlongumin, 1000 nM doksorubisin ve 100 µM piperlongumin + 1000nM doksorubisin kombine olarak uygulanmıştır.

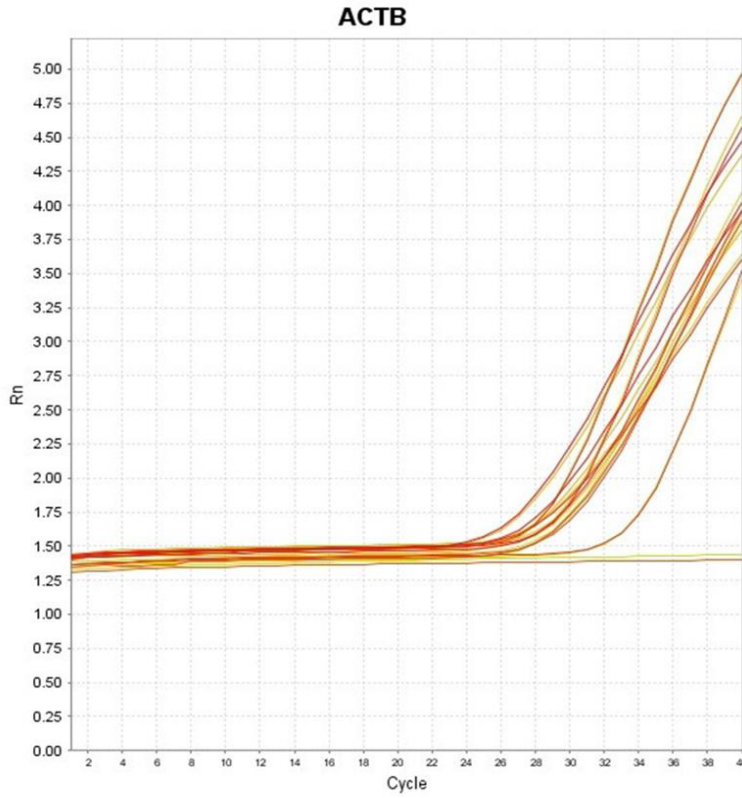
Çizelge 4.3. Deney grupları, uygulama süresi, yapılan uygulama ve uygulanan piperlongumin ve doksorubisin miktarları

Grup No	Uygulama Süresi	Uygulama	Uygulama Miktarı
1	0 Saat	Kontrol	-
2	24 Saat	Kontrol	-
3	24 Saat	Piperlongumin	100 µM
4	24 Saat	Doksorubisin	1000nM
5	24 Saat	Piperlongumin + Doksorubisin	100 µM + 1000nM
6	48 Saat	Kontrol	-
7	48 Saat	Piperlongumin	100 µM
8	48 Saat	Doksorubisin	1000nM
9	48 Saat	Piperlongumin + Doksorubisin	100 µM + 1000nM

Tüm deney gruplarında toplam 9 örnekte RT-qPCR deneyleri gerçekleştirilmiş; MMP-9, PTEN ve NOTCH1 gen ifadeleri aynı örneğe ait internal kontrol gen olarak kullanılan β-aktin ifadesine göre normalize edilmiştir. MMP-9 ve NOTCH1 gen ifadeleri saptanabilecek düzeyin altında kalmış ve amplifikasyon eğrileri oluşturulamamıştır. Şekil 4.5. ve 4.6.'da sırasıyla PTEN ve β-aktin genlerine ait amplifikasyon eğrileri x ekseninde döngü sayısı ve y ekseninde Rn değeri olacak şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.5. PTEN genine ait amplifikasyon eğrisi. X: döngü sayısı, Y: rn değeri



Şekil 4.6. B-aktin genine ait amplifikasyon eğrisi. X: döngü sayısı, y: rn değeri

Tüm örneklerde Rn değerleri belirlendikten sonra kontrol grubu (Grup 1) referans alınarak tüm örneklerdeki gen ifadesi düzeyi hesaplanmıştır ve göreceli miktar (relative quantity: RQ) değeri olarak tabloda verilmiştir (Çizelge 4.4.). Grup 1 referans örneklerinde RQ=1 yani gen ekspresyon düzeyi %100 (RQ=1) kabul edilerek deney gruplarına ait örneklerdeki gen ifadesi değişimi kat cinsinden belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Gerçek Zamanlı PCR sonucu elde edilen  $\beta$ -Aktin, MMP9, NOTCH1 ve PTEN gen ifadelerine ait RQ değerleri

Grup No	$\beta$ -Aktin	MMP9	NOTCH1	PTEN
1	1	1	1	1
2	1	1,1	1,1	1,5
3	1	*	*	0,5
4	1	*	*	0,4
5	1	*	*	0,5
6	1	1,2	1,1	1,2
7	1	*	*	0,01
8	1	*	*	0,64
9	1	*	*	0,68

Yapılan hesaplamalar sonucunda 24 saat kontrolü olan grup 2’de MMP-9 gen ifadesi %10 (RQ=1,1), NOTCH1 gen ifadesi %10 (RQ=1,1) artmış ve PTEN gen ifadesinin ise %50 (RQ=1,5) artmış olduğu belirlenmiştir. Sadece piperlonguminin 24 saat uygulandığı grup 3’de MMP-9 ve NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Bu grupta PTEN gen ifadesi ise (RQ=0,5) %50 oranında azalmıştır. Sadece doksorubisinin 24 saat uygulandığı grup 4’de MMP-9 ve NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Bu grupta PTEN gen ifadesi ise (RQ=0,42) %58 oranında azalmıştır. Piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 24 saat süreyle uygulandığı grup 5’te MMP-9 ve NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmış, PTEN gen ifadesi (RQ=0,47) ile %53 oranında

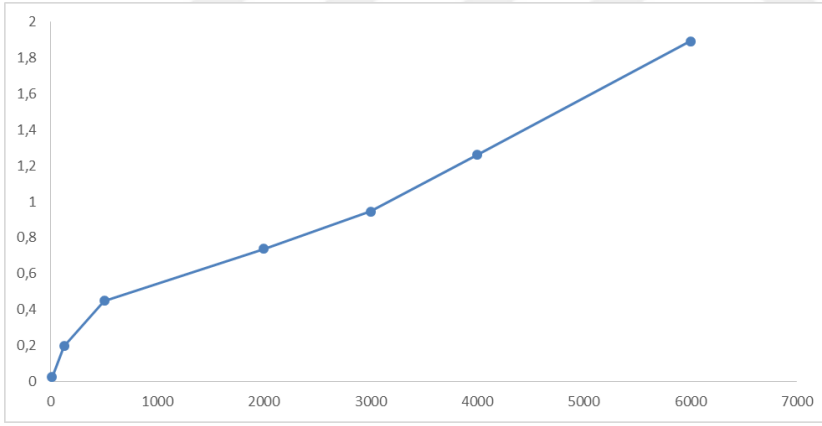
azalmıştır. 48 saat kontrolü olan grup 6'da MMP-9 gen ifadesi %20 (RQ=1,2), NOTCH1 gen ifadesi %10 (RQ=1,1) artmış ve PTEN gen ifadesinin ise %20 (RQ=1,2) artmış olduğu belirlenmiştir. Sadece piperlonguminin 48 saat uygulandığı grup 7'de MMP-9 ve NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Bu grupta PTEN gen ifadesi ise (RQ=0,01) %99 oranında azalmıştır. Sadece doksorubisinin 48 saat uygulandığı grup 8'de MMP-9 ve NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Bu grupta PTEN gen ifadesi ise (RQ=0,64) %36 oranında azalmıştır. Piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 48 saat süreyle uygulandığı grup 9'da MMP-9 ve NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmış, PTEN gen ifadesi (RQ=0,65) ile %35 oranında azalmıştır (Çizelge 4.4.).

#### **4.4. Western-Blot Analizi Sonuçları**

Tüm deney gruplarında toplam 9 örnekte western-blot deneyleri gerçekleştirilmiş; MMP-9, PTEN ve NOTCH1 proteinlerinin ifadeleri aynı örneğe ait internal kontrol gen olarak kullanılan  $\beta$ -aktin ifadesine göre normalize edilmiştir. Western-blot analizinde tüm deney gruplarından eşit miktarda protein ile analize başlamak amacıyla protein miktar tayini yapılmıştır. Protein miktar tayini BSA kullanılarak oluşturulan standart eğri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart eğri oluşturulmasında BSA seri olarak sulandırılmıştır (Çizelge 4.5. ). Elde edilen standart grafik şekil 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Protein standart oluşturulmasında kullanılan BSA konsantrasyonları ve spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen OD değerleri

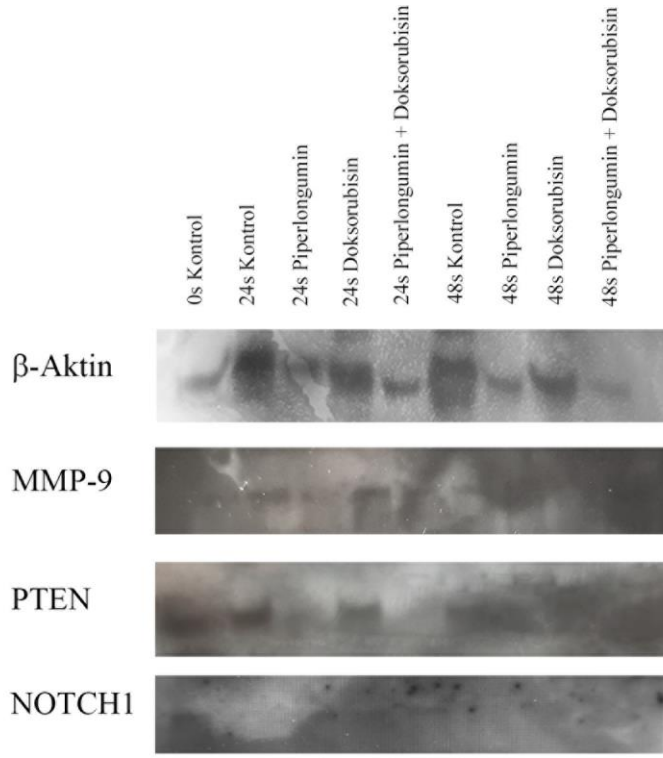
Protein (ng)	OD
10	0,023
125	0,196
500	0,449
2000	0,737
3000	0,946
4000	1,26
6000	1,892



Şekil 4.7. BSA standart grafik

Tüm örneklerde protein miktarı belirlendikten sonra 100mg/kuyucuk olacak şekilde jele yüklenen proteinler elektroforez sonrasında ilişkili antikorlar ile işaretlenerek görüntülenmiştir (Şekil 4.8).





Şekil 4.8. Western-blot sonuçları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, bulunduğumuz çağın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Görülme sıklığı ve ölüm oranının yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Değişen yaşam ve beslenme şartları, yüksek radyasyon ve en büyük payı olan genetik yatkınlık kanser vakalarının nedenlerinden bazılarıdır. Kemoterapi, kanser tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Tümörün ilaçla tedavi edilmesi anlamına gelir ve kemoterapi; sınırsız bölünme yeteneği olan kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önleyerek onları hasara uğratar. Adriamisin ticari adı altında satılan Doksorubisin de birçok kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötiktir. DNA replikasyonu sırasında topoizomerez II ve DNA kompleksinin stabilizasyonunu sağlayarak replikasyonu inhibe eder ve hücre bölünmesini önler (Momparler vd., 1976).

Piperlongumin, Piperlongum Linn bitki türlerinde bulunan ve kanserli hücre hatlarında ve hayvan modellerinde anti tümorojenik aktivite gösteren alkaloid yapıda doğal bir üründür. Yapılan birçok çalışma piperlonguminin kemopreventif bir ajan olabileceğini ileri sürmektedir (Karki, Hedrick, Kasiappan, Jin ve Safe, 2017; Chen, Kuo et al. 2018, Wang, Jiang et al. 2019). Gong, L. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; piperlonguminin hücre döngüsünün G2/M fazında durmasını sağlayarak hücrelerin apoptoza gitmesini sağladığı ayrıca doz ve zaman bağımlı olarak hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) akümülyasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Aynı çalışma düşük doz piperlongumin ile cisplatin veya paclitaxel kombine tedavisinin over kanseri hücrelerinde büyümeyi durduran sinerjistik etkisi olduğunu ileri sürmektedir (Gong vd., 2014). Benzer şekilde oral kanser hücrelerinde tümör oluşumu, hücre migrasyonu, invazyon, proliferasyon yeteneği, kemoterapötik ve radyoterapi hassasiyetinin değerlendirildiği bir çalışmada piperlonguminin anti-tümör etkisi vurgulanmaktadır (Chen vd., 2018).

Çalışmamızda hücre canlılığı ve çoğalmasının belirlenebilmesi amacı ile MTT analizi ve bu analiz sonuçlarının teyiti, ayrıca saptanan hücre ölümlerinin apoptotik olup olmadığının belirlenmesi amacı ile piperlongumin ve doksorubisin uygulanan tüm örneklerde AO/PI boyama yapılmıştır. Yapılan MTT analizi ve AO/PI boyamalarda uygulama dozu arttıkça hem piperlongumin hem de doksorubisin uygulanan örneklerde hücre ölümünün arttığı saptanmıştır. 100µM piperlongumin ve 1000nM doksorubisin uygulanan kültürlerde MTT analizi sonrasında hücre canlılığı sırası ile %66,9 ve %69,4 bulunmuştur. Ancak AO/PI boyamalarda bu dozların üzerinde hücre çoğalmasının da baskılandığı ve dolayısı ile hücre sayısının azaldığı tespit

edilmiştir. Bu veriler literatürle uyumlu bir şekilde piperlonguminin anti-tümör etkisini göstermiştir.

Matriks metalloproteinaz (MMP)'lar ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerini yıkıma uğratan,  $Zn^{++}$  ve  $Ca^{++}$ 'a bağımlı 28'den fazla enzim bulunduran proteaz kaynaklı bir nötral endopeptidaz ailesidir (REEL, 2006). Türlerine göre endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinositler, epitel hücreleri, mezanşimal hücreler, nötrofiller, trofoblastlar, osteoblastlar gibi oldukça çeşitli hücre tipi tarafından eksprese edilirler. Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi rol oynar (REEL, 2006; Karaarslan vd., 2016).

MMP ifadesi; genlere ait transkripsiyon mekanizmasını manipule edebilen faktörlerin etkisi ile çeşitli fizyolojik ve/veya patolojik şartlar altında, dokuların yeniden modellenmesi esnasında artabilmektedir. Buna bağlı olarak da MMP'lerin üretimi, MMP inhibitörleri olan TIMP'lerin üretiminden fazla olabilmektedir. Sonuçta MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge bozulabilmekte ve bozulan bu dengenin MMP'nin aktivitesi yönünde artması ile ESM kontrolsüz bir şekilde yıkılmaktadır (REEL, 2006; Wei vd., 2015; Iulita vd., 2019). MMP familyasına ait proteinlerin çoğu, hücre dışı proteinazlarla bölündüğünde aktive olan veya aktif olmayan proproteinler olarak salgılanan ve jelatinazlar sınıfında yer alan MMP-9, jelatinaz B (GELB); kolojenaz tip IV-B (CLG4B) ve Metafizel Anadysplasia -2 MANDP2 isimleri ile de bilinmektedir. Özellikle tümör invazyonun proteoliz basamağında çok büyük önem arz eden ve 92 kDa olan MMP-9, tip-4 kolajen bazal membranın yapısında en fazla olan kolajenlerden olup, tip-4 kolajeni parçalamaktadır. Bu nedenle migrasyon ve metastaz ile yakından ilişkilidir. Yaptığımız RT-qPCR analizi sonucunda 24 saat kontrolü olan grup 2'de MMP-9 gen ifadesi %10 (RQ=1,1) olarak belirlenmiştir. Sadece piperlonguminin 24 saat uygulandığı grup 3'de MMP-9 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Benzer şekilde sadece doksorubisinin 24 saat uygulandığı grup 4'de ve piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 24 saat süreyle uygulandığı grup 5'te MMP-9 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. 48 saat kontrolü olan grup 6'da MMP-9 gen ifadesi %20 (RQ=1,2) olarak saptanmış ve gen ifadesinin artmış olduğu belirlenmiştir. Ancak Sadece piperlonguminin 48 saat uygulandığı grup 7'de ve piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 48 saat süreyle uygulandığı grup 9'da MMP-9 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır (Çizelge 4.4.). Tüm gruplarda gen ifade değişimi saptanırken yapılan western-blot çalışması sonucunda MMP-9 protein ifadesinin devam ettiği görülmüştür. Bu durum daha uzun süreli piperlongumin ve doksorubisin uygulamalarında protein ifadesinin de değişeceğini düşündürmektedir.

Fosfotidilinositol 3-kinaz /protein kinaz B sinyal yolağı (PI3K/Akt sinyal yolu), hücre sağkalımı, çoğalması, farklılaşması, endositoz ve vezikül trafiğı, metabolizması ve konukçu enflamatuar tepkileri gibi çeşitli konak hücre sinyal transdüksiyonlarının ana düzenleyicilerinden biridir. Aktif Akt, çeşitli hücresele uyaranlarla PI3K'nın aşağı akışındaki (upregülasyonu) hücre sinyalleşmesinde merkezi bir rol oynar. Substratları olan Bad, kaspaz-9, glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), mTOR ve birçok transkripsiyon faktörünü kontrol etmektedir. Akt aktivitesinin bozulması, tip 2 diyabet ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patofizyolojik nedenleri arasındadır (Nakayama, Inoue, Naito, Nakayama ve Ohara, 2015). Kanser üzerine yapılan araştırmalara paralel olarak, diğer alanlardaki araştırmalarda, normal hücre fonksiyonunda PI3K sinyal yolağının katalitik ve düzenleyici rolleri ortaya çıkarılmıştır (Fruman vd., 2017).

PI3K, PTEN tarafından negatif yönde kontrol edilmektedir. Aktive olmuş PI3K, fosfotidilinositol 4,5-bifosfatı (PIP2) fosforile ederek fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) meydana getirir. Bu reaksiyon PTEN fosfatazı tarafından regüle edilmektedir. Akt fosforilasyonundaki artış, PTEN geninde mutasyon olduğunda da gözlenir. PTEN, pek çok protein üzerinde etkisi olan çift yönlü fosfataz enzimi olmakla birlikte, hücre için asıl işlevi PI3K'ın negatif düzenleyicisi gibi çalışarak, PIP3'ün PIP2'e defosforilasyonunu gerçekleştirmektir (Myers ve Tonks,1997; Tamura vd., 1998). PTEN gen ifadesindeki kaybın, Akt aktivitesinin artışıyla doğrudan ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (Stambolic vs., 1998). Yaptığımız RT-qPCR analizi sonucunda 24 saat kontrolü olan grup 2'de PTEN gen ifadesinin ise %50 (RQ=1,5) artmış olduğu belirlenmiştir. Sadece piperlonguminin 24 saat uygulandığı grup 3'de PTEN gen ifadesi (RQ=0,38) %62 oranında azalmıştır. Sadece doksorubisinin 24 saat uygulandığı grup 4'de PTEN gen ifadesi (RQ=0,42) %58 oranında azalmıştır. Piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 24 saat süreyle uygulandığı grup 5'te PTEN gen ifadesi (RQ=0,47) ile %53 oranında azalmıştır. 48 saat kontrolü olan grup 6'da PTEN gen ifadesinin %20 (RQ=1,2) artmış olduğu belirlenmiştir. Sadece piperlonguminin 48 saat uygulandığı grup 7'de ise PTEN gen ifadesi (RQ=0,01) %99 oranında azalmıştır. Sadece doksorubisinin 48 saat uygulandığı grup 8'de PTEN gen ifadesi (RQ=0,64) %36 oranında azalmıştır. Piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 48 saat süreyle uygulandığı grup 9'da PTEN gen ifadesi (RQ=0,65) ile %35 oranında azalmıştır (Çizelge 4.4). Tüm gruplarda gen ifade değişimi saptanırken yapılan western-blot çalışması sonucunda PTEN protein ifadesinin bazı deney gruplarında devam ettiği ancak sadece piperlongumin ve piperlongumin ve doksorubisinin kombine uygulandığı gruplarda tamamen durduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8.).

Bir kanser hücre hattı olan HeLa'da tümör baskılayıcı PTEN gen ve protein ifadesinin azalması beklenebilecek bir durumdur ancak tedavi sonrası gözlenen azalma tedavide istenen bir sonuç olmayacaktır. Piperlonguminin tedavi amaçlı kullanımında dikkat edilmesi gereken bir kimyasal olduğunu göstermektedir. Normal hücrelerde PTEN değişimine neden olup olmadığı teyit edilmelidir.

Hücre kaderini düzenleyen bir yolak olan Notch sinyal yolu, çoğu çok hücreli organizmada mevcut olan yüksek oranda korunmuş bir hücre sinyal sistemidir. Memeliler, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 ve NOTCH4 olarak adlandırılan dört farklı NOTCH reseptörüne sahiptir. Tek geçişli bir transmembran reseptör olan NOTCH reseptörü ile sinyalizasyon organ oluşumu ve morfogenezde rol oynayarak farklılaşma, çoğalma ve apoptozu etkilemektedir (Yağcı ve Güneş, 2017). Son çalışmalar NOTCH sinyalinin hücre farklılaşması ve proliferasyonu ile apoptotik olaylarda rol oynadığını kanıtlanmıştır (Pagie, Gérard ve Charreau, 2018; Bae, Kim ve Lee, 2017). NOTCH1 sinyal yolağındaki hataların birçok insan kanseri ile ilişkisi bildirilmiştir (Hu vd., 2016). Ayrıca NOTCH1 sinyal yolunun, spesifik MMP'leri aktive ederek endotel hücrelerinin morfogenezini düzenleyen vasküler endotel büyüme faktörü sinyalinin aşağısında etki ettiği gösterilmiştir (Zhao vd., 2017). Bizim yaptığımız çalışmada 24 saat kontrolü olan grup 2'de NOTCH1 gen ifadesi %10 (RQ=1,1) artmış olduğu belirlenmiştir. Sadece piperlonguminin 24 saat uygulandığı grup 3'de NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Sadece doksorubisinin 24 saat uygulandığı grup 4'de NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 24 saat süreyle uygulandığı grup 5'te NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. 48 saat kontrolü olan grup 6'da NOTCH1 gen ifadesi %10 (RQ=1,1) artmış olduğu belirlenmiştir. Sadece piperlonguminin 48 saat uygulandığı grup 7'de NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Sadece doksorubisinin 48 saat uygulandığı grup 8'de NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Piperlongumin ve doksorubisinin kombine olarak 48 saat süreyle uygulandığı grup 9'da NOTCH1 gen ifadesi saptanabilecek düzeyin altında kalmıştır. Tüm grupta gen ifade değişimi saptanırken yapılan western-blot çalışması sonucunda NOTCH1 protein ifadesinin kısmen devam ettiği görülmüştür. Bu durum daha uzun süreli piperlongumin ve doksorubisin uygulamalarında protein ifadesinin de değişeceğini düşündürmektedir.

Tamamlanan bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında bir serviks kanseri hücre hattı olan HeLa hücrelerinde piperlonguminin tek başına ve doksorubisin ile kombine

kullanıldığında hücre proliferasyonu ve canlılığına etkisi değerlendirilmiştir. Yaptığımız literatür taramalarında HeLa hücrelerinde piperlonguminin tek başına ve doksorubisin ile kombine kullanıldığında MMP-9, PTEN ve NOTCH1 gen/protein ifadesi üzerine etkisini bildiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız piperlonguminin hücre migrasyonu ve dolayısı ile metastaz üzerine ve anti-tümör etkisinin MMP-9, PTEN ve NOTCH1 gen ve protein ifadesi belirlenerek değerlendirildiği ilk çalışma olarak literatüre değerli bir katkı sağlamıştır.



## KAYNAKLAR

- Alves, A. C., Magarkar, A., Horta, M., Lima, J., Bunker, A., Nunes, C., & Reis, S. (2017). Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: insights from in vitro and in silico studies. *Scientific reports*, 7(1), 6343.
- Bae, J. S., Kim, S. M., & Lee, H. (2017). The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. *Oncotarget*, 8(9), 16084–16098.
- Chen, Y. J., Kuo, C. C., Ting, L. L., Lu, L. S., Lu, Y. C., Cheng, A. J., Lin, Y. T., Chen, C. H., Tsai, J. T., & Chiou, J. F. (2018). Piperlongumine inhibits cancer stem cell properties and regulates multiple malignant phenotypes in oral cancer. *Oncology letters*, 15(2), 1789–1798.
- Cherng, J. Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., & Hennink, W. E. (1996). Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 13(7), 1038–1042.
- Chu, E. C., & Tarnawski, A. S. (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 10(10), RA235–RA241.
- Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017). The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, 170(4), 605–635.
- Gong, L. H., Chen, X. X., Wang, H., Jiang, Q. W., Pan, S. S., Qiu, J. G., Mei, X. L., Xue, Y. Q., Qin, W. M., Zheng, F. Y., Shi, Z., & Yan, X. J. (2014). Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 906804.
- Guamán-Ortiz, L. M., Orellana, M. I., & Ratovitski, E. A. (2017). Natural Compounds As Modulators of Non-apoptotic Cell Death in Cancer Cells. *Current genomics*, 18(2), 132–155. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160803150639>
- Hu, C., Zeng, L., Li, T., Meyer, M. A., Cui, M. Z., & Xu, X. (2016). Nicastrin is required for amyloid precursor protein (APP) but not Notch processing, while anterior pharynx-defective 1 is dispensable for processing of both APP and Notch. *Journal of neurochemistry*, 136(6), 1246–1258.
- Huang H. (2018). Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(10), 3249.

- Iulita, M. F., Ganesh, A., Pentz, R., Flores Aguilar, L., Gubert, P., Ducatenzeiler, A., Christie, S., Wilcock, G. K., & Cuello, A. C. (2019). Identification and Preliminary Validation of a Plasma Profile Associated with Cognitive Decline in Dementia and At-Risk Individuals: A Retrospective Cohort Analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 67(1), 327–341.
- Jain MA, Limaiem F. Cervical Intraepithelial Squamous Cell Lesion. [Updated 2020 Oct 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559075/>
- Karaarslan, N., Gurbuz, M. S., Caliskan, T., Ayan, E., Aker, F. V., & Berkman, M. Z. (2016). The Effect of Matrix Metalloproteinase-3 on the Prognosis and Biological Behaviour of Meningiomas. *Turkish neurosurgery*, 26(5), 678–683.
- Karki, K., Hedrick, E., Kasiappan, R., Jin, U. H., & Safe, S. (2017). Piperlongumine Induces Reactive Oxygen Species (ROS)-Dependent Downregulation of Specificity Protein Transcription Factors. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 10(8), 467–477.
- Kumar, S., & Agnihotri, N. (2019). Piperlongumine, a piper alkaloid targets Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling axis to inhibit tumor cell growth and proliferation in DMH/DSS induced experimental colon cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 109, 1462–1477.
- Landry, J. J., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J. O., Huber, W., & Steinmetz, L. M. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(8), 1213–1224.
- Maehama, T., Taylor, G. S., & Dixon, J. E. (2001). PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annual review of biochemistry*, 70, 247–279.
- Momparker, R. L., Karon, M., Siegel, S. E., & Avila, F. (1976). Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer research*, 36(8), 2891–2895.
- Myers, M. P., & Tonks, N. K. (1997). PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. *American journal of human genetics*, 61(6), 1234–1238.
- Nakayama, M., Inoue, T., Naito, M., Nakayama, K., & Ohara, N. (2015). Attenuation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp. *The Journal of biological chemistry*, 290(8), 5190–5202.



- National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- Niu, M., Xu, X., Shen, Y., Yao, Y., Qiao, J., Zhu, F., Zeng, L., Liu, X., & Xu, K. (2015). Piperlongumine is a novel nuclear export inhibitor with potent anticancer activity. *Chemico-biological interactions*, 237, 66–72.
- Pagie, S., Gérard, N., & Charreau, B. (2018). Notch signaling triggered via the ligand DLL4 impedes M2 macrophage differentiation and promotes their apoptosis. *Cell communication and signaling : CCS*, 16(1), 4.
- Pang, R. T., Leung, C. O., Ye, T. M., Liu, W., Chiu, P. C., Lam, K. K., Lee, K. F., & Yeung, W. S. (2010). MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis*, 31(6), 1037–1044.
- Piska, K., Gunia-Krzyżak, A., Koczurkiewicz, P., Wójcik-Pszczola, K., & Pękala, E. (2018). Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents - Synthesis and properties of analogues: A mini-review. *European journal of medicinal chemistry*, 156, 13–20.
- Raj, L., Ide, T., Gurkar, A. U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N. J., Golub, T. R., Carr, S. A., Shamji, A. F., Stern, A. M., Mandinova, A., Schreiber, S. L., & Lee, S. W. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature*, 475(7355), 231–234. (Retraction published Nature. 2018 Sep;561(7723):420)
- Reel, B. (2006). "Matrix Metalloproteinases And Atherosclerosis: Review." *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 26: 527-537
- Romano, C., & Schepis, C. (2012). PTEN gene: a model for genetic diseases in dermatology. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 252457.
- S. Kumar and K. Agnihotri, " Piperlongumine, a piper alkaloid targets Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling axis to inhibit tumor cell growth and proliferation in DMH/DSS induced experimental colon cancer," *Blomed Pharmacother*, vol. 109, pp. 1462-1477, January 2019.
- Seber, S., Sirin, D. Y., Yetisyigit, T., & Bilgen, T. (2020). Piperlongumine increases the apoptotic effect of doxorubicin and paclitaxel in a cervical cancer cell line. *Nigerian journal of clinical practice*, 23(3), 386–391.

- Sellers. JW, Sankaranarayanan. R (2003). Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual. An introduction to the anatomy of the uterine cervix (4th ed.)(1-12). Lyon: International agency for research on cancer.
- Serviksin kadın üreme organları içindeki konumu (2021, Şubat 14). İçinde *Wikipedia*. [https://tr.wikipedia.org/wiki/Rahim\\_a%C4%9Fz%C4%B1#/media/Dosya:Scheme\\_female\\_reproductive\\_system-tr.svg](https://tr.wikipedia.org/wiki/Rahim_a%C4%9Fz%C4%B1#/media/Dosya:Scheme_female_reproductive_system-tr.svg)
- Shen, W., & Sun, J. (2017). Dynamic Notch Signaling Specifies Each Cell Fate in *Drosophila* Spermathecal Lineage. *G3 (Bethesda, Md.)*, 7(5), 1417–1427.
- Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, G. M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J. M. Penninger, D. P. Siderovski and T. W. Mak (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95(1): 29-39.
- Takemura, G., & Fujiwara, H. (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in cardiovascular diseases*, 49(5), 330–352.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., & Yamada, K. M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5369), 1614–1617.
- Union for International Cancer Control. (2020). *Global Cancer Data*. Erişim adresesi: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>
- Waggoner S. E. (2003). Cervical cancer. *Lancet (London, England)*, 361(9376), 2217–2225.
- Wang, H., Jiang, H., Corbet, C., de Mey, S., Law, K., Gevaert, T., Feron, O., & De Ridder, M. (2019). Piperlongumine increases sensitivity of colorectal cancer cells to radiation: Involvement of ROS production via dual inhibition of glutathione and thioredoxin systems. *Cancer letters*, 450, 42–52.
- Wei, H., Wang, S., Zhen, L., Yang, Q., Wu, Z., Lei, X., Lv, J., Xiong, L., & Xue, R. (2015). Resveratrol attenuates the blood-brain barrier dysfunction by regulation of the MMP-9/TIMP-1 balance after cerebral ischemia reperfusion in rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 55(4), 872–879.
- Xu, W., Yang, Z., Zhou, S. F., & Lu, N. (2014). Posttranslational regulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and its functional impact on cancer behaviors. *Drug design, development and therapy*, 8, 1745–1751.

Yağcı, E , Güneş, H . (2017). Notch Sinyal Yolağı ve Karsinogenez / Notch Signaling Pathway and Carcinogenesis . Osmangazi Tıp Dergisi , 39 (1) , 109-116 .

Yaşar, D. (2003) *Mesane Kanserinde PTEN Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi İle Gösterilmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya.

Zhao, Y., Qiao, X., Tan, T. K., Zhao, H., Zhang, Y., Liu, L., Zhang, J., Wang, L., Cao, Q., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y. M., Lee, V., Alexander, S. I., Harris, D., & Zheng, G. (2017). Matrix metalloproteinase 9-dependent Notch signaling contributes to kidney fibrosis through peritubular endothelial-mesenchymal transition. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 32(5), 781–791.

