



T.C.

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

HeLa HÜCRE HATLARINDA

***PRİMULA VULGARİS* EKSTRAKTI YÜKLÜ GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİN *BCL2*, *MDR1* VE *p53* GEN
EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

GAMZE DULKADİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR - OCAK / 2021



T.C.

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANA BİLİM DALI

HeLa HÜCRE HATLARINDA

***PRİMULA VULGARİS* EKSTRAKTI YÜKLÜ GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİN *BCL2*, *MDR1* VE *p53* GEN
EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

GAMZE DULKADİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Akın TEKCAN

KIRŞEHİR – OCAK / 2021

KABUL VE ONAY

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı yüksek lisans 171212009 numaralı öğrencimiz Gamze DULKADİR tarafından hazırlanan “HeLa Hücre Hatlarında *Primula Vulgaris* Ekstraktı Yüklü Gümüş Nanopartiküllerin *BCL2*, *MDR1* ve *p53* Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı tez çalışması 05.01.2021 tarihinde AYDEP (Ahi Yeterliliğe Dayalı Eğitim Projesi) uzaktan eğitim kapsamında yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Şengül TURAL

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tıp Fakültesi

(Başkan)

Doç. Dr. Akın TEKCAN

Amasya Üniversitesi

Tıp Fakültesi

(Danışman)

Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

(Üye)

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

GAMZE DULKADİR



ÖNSÖZ

Bu çalışmada HeLa hücre hatlarında *Primula Vulgaris* ekstraktı yüklü gümüş nanopartiküllerin *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisinin araştırılmıştır. Gümüş nanopartiküllerin ve bitki ekstraktlarının hazırlanmasında destek olan sayın Prof. Dr. Harun Çiftçi'ye ve Burcu Yazıcı'ya teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca HeLa hücrelerinin temininde yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Erkan Yurtçu'ya teşekkürlerimi borç bilirim. Çalışma süresince her zaman desteğini yanımda hissettiğim danışmanım sayın Doç. Dr. Akın TEKCAN'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yaptığım çalışmalarda her zaman yardımını ve desteğini eksik etmeyen, her koşulda yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2021

Gamze DULKADİR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Serviks Anatomisi	3
2.2. Serviks Kanseri	3
2.3. Serviks Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörü	4
2.4. Human Papillomavirus (HPV)	6
2.5. HPV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemleri	9
2.6. HeLa Serviks Adenokarsinoma Oluşum Süreci.....	9
2.7. Servikal Kanserin Moleküler Mekanizması.....	10
2.8. Serviks Kanseri Belirtileri	11
2.9. Serviks Kanseri Evreleri	12
2.10. Serviks Kanseri Tanı Yöntemleri	13
3. SERVİKS KANSERİ GENETİĞİ	14
3.1. Apoptoz	14
3.2. <i>BCL2</i> Gen Ailesi	15
3. 3. <i>MDR1</i>	17

3.4. <i>p53</i> Geni	18
3. 5. <i>Primula Vulgaris</i>	21
3.6. Sisplatin ve Serviks Kanseri Tedavisi	22
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
4.1. MATERYAL	24
4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	24
4.2. YÖNTEM	25
4.2.1. Hücre ve Özellikleri.....	25
4.2.2. Bitki Materyali ve Yeşil Sentez Yöntemiyle Sentezlenmiş <i>Primula Vulgaris</i> Yüklü Nanoparçacıkların Eldesi.....	25
4.2.3. <i>Primula Vulgaris</i> Yüklü Gümüş Nanopartiküllerin (PVLAgNPs) Sentezi.....	26
4.2.4. HeLa Hücre Hattı Kültürü.....	27
4.2.5. HeLa Hücre Hattının Pasajlanması.....	30
4.2.6. iCELLigence Sistemi ile Hücre Sayısının Optimizasyonu	31
4.2.7. iCELLigence Sisteminde HeLa Hücrelerine PVLAgNP'lerin Uygulanması.....	33
4.2.8. RNA İzolasyonu	35
4.2.8.1. RNA İzolasyonu Öncesi ve Sonrası Kullanılan Cihazlar	35
4.2.8.2. RNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
4.2.9. RNA'nın Kalitatif Tayini	36
4.2.10. Total RNA'dan cDNA Sentezi	36
4.2.10.1 Total RNA'dan cDNA Sentezi Öncesi ve Sonrası Kullanılan Kimyasallar	36
4.2.10.2.Total RNA'dan cDNA Sentezinde Uygulanan Protokol.....	37
4.2.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Analizi.....	37
4.3. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	40
5. BULGULAR	42
5.1. IC ₅₀ Doz Hesaplama	42

5.1.1. PVLA _g NP _(Ç) ’lerin HeLa Hücreleri Üzerinde IC ₅₀ Doz Belirleme Çalışması.....	43
5.1.2. PVLA _g NP _(Y) ’lerin HeLa Hücreleri Üzerinde IC ₅₀ Doz Belirleme Çalışması	45
5.2. LD ₅₀ Doz Hesaplama	47
5.3. qRT-PCR Sonuçları.....	47
5.3.1. <i>BCL2</i> Gen Ekspresyon Sonuçları	48
5.3.2. <i>MDR1</i> Gen Ekspresyon Sonuçları	48
5.3.3. <i>p53</i> Gen Ekspresyon Sonuçları	48
6. TARTIŞMA.....	50
7. SONUÇ	58
8. KAYNAKÇA.....	59
9.ÖZGEÇMİŞ.	70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Kadın üreme sistemi

Şekil 2.1: İnsan Papillomavirüs genetik yapısı

Şekil 2.2: Yaş aralığına göre HPV enfeksiyonlu kadınların yüzdelik dağılımı

Şekil 2.3: Servikal karsinogenez progresyonu

Şekil 2.4: HPV DNA genomu

Şekil 3.1: İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları

Şekil 3.2: *MDR1* gen lokasyonu

Şekil 3.3: *MDR1*'in rolünün gösterimi

Şekil 3.4: Siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve siklinler

Şekil 3.5: *p53*'ün hücre siklusundaki yeri

Şekil 3.6: DNA hasarı ile aktiveleşen *p53* geninin yanıt mekanizması

Şekil 3.7: Kansere tedavisinde cisplatinin moleküler mekanizmasının şeması

Şekil 4.1: *Primula vulgaris* bitkisinin toplandığı bölge

Şekil 4.2: PVLA_gNP'ler

Şekil 4.3: Hücre kültürü deneyinin yapıldığı kabin

Şekil 4.4: Besiyerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler

Şekil 4.5: Ekim işlemi sonrası hücrelerin inverted mikroskopta görüntüsü (x10)

Şekil 4.6: HeLa hücrelerinin invert mikroskopta görünümü (x40, 1.gün)

Şekil 4.7: HeLa hücrelerinin invert mikroskopta görünümü (x40, 2. gün)

Şekil 4.8: %100 doluluğa ulaşmış HeLa hücre hattının invert mikroskopta görüntüsü (x40, 4. gün)

Şekil 4.9: iCELLigence sisteminde hücre canlılığı takibi

Şekil 4.10: iCELLigence sistemine yüklenecek E-plate kuyucuklarına besin ve hücre ekimi

Şekil 4.11: iCELLigence sisteminde HeLa hücre canlılığı optimizasyonu

Şekil 4.12: E-plate dizaynı

Şekil 4.13: RosheLightCycler 480 II sistemi

Şekil 4.14: *BCL2* gen ekspresyon çalışması pik profillerinin gösterimi.

Şekil 4.15: *MDR1* gen ekspresyon çalışması pik profillerinin gösterimi.

Şekil 4.16: *p53* gen ekspresyon çalışması pik profillerinin gösterimi.

Şekil 5.1: iCELLigence sisteminde PVLA_{NP(C)} HeLa hücrelerinin IC₅₀ doz hesaplama çalışması.

Şekil 5.2: iCELLigence sisteminde PVLA_{NP(Y)} HeLa hücrelerinin IC₅₀ doz belirleme çalışması.

Şekil 5.3: iCELLigence sisteminde PVLA_{NP(C)} HeLa hücrelerinin hücre canlılığı optimizasyonu.

Şekil 5.4: iCELLigence sisteminde PVLA_{NP(Y)} HeLa hücrelerinin ve etken madde eklenmeyen HeLa hücrelerinin hücre canlılığı optimizasyonu

Şekil 5.5: LD₅₀ doz hesaplama

Şekil 5.6: Göreceli gen ekspresyon verilerinin log2 tabanında gösterimi

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: HPV pozitifliği (%) gösteren kanser tipleri

Tablo 2.2: Serviks kanseri için risk oluşturan faktörler

Tablo 3.1: *BCL2* gen ailesi ve hücre içi lokasyonları

Tablo 4.1: *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyon analizinde kullanılan primerlerin baz dizilimleri

Tablo 5.1: PVLA_gNP_(C) ve PVLA_gNP_(Y) madde ilavesinin 12. ve 24. saatlerinde hesaplanan IC₅₀ sonuçları.

Tablo 5.2: PVLA_gNP_(C) ile yapılan IC₅₀ çalışmasının 12 ve 24. saat sonrası sonuçları.

Tablo 5.3: PVLA_gNP_(Y) ile yapılan IC₅₀ çalışmasının 12 ve 24. saat sonrası sonuçları.

Tablo 5.4: RocheLightCycler 480 II sistemi ile analiz edilen genlerin ortalama C_t değerleri

Tablo 5.5: Göreceli gen ekspresyon sonuçları

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

μM: Mikromolar

μl: Mikrolitre

C_t: Cycle threshold (Eşik Döngüsü)

ASCUS: Atypical squamous cell of underetermned significance

AgNP: Gümüş nanopartikül

PVLA_gNP: *Primula vulgaris* ekstraktı yüklü gümüş nanopartikül

PVLA_gNP_(ç): *Primula vulgaris* çiçek ekstraktı yüklü gümüş nanopartiküller

PVLA_gNP_(y): *Primula vulgaris* yaprak ekstraktı yüklü gümüş nanopartiküller

BAX: *BCL2* ile ilişkili X proteini

cDNA: Komplementer deoksiribo nükleik asit

Cdk: Siklin bağımlı kinaz

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü

FBS: Yenidoğan sığır serumu

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GİS: Gastrointestinal sistem

HeLa: İnsan serviks adenokarsinoma hücresi

HIV: İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü

HPV: İnsan papilloma virüsü

IC₅₀: Inhibitory concentration of %50

KRAS: RAS/MAPK yolağından K-RAS proteini salgılayan gen

LD₅₀: Lethal dose. Hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyon

MDR1: Multi during resistance gen

MI: Miyokart infarktüs

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

MSS: Merkezi sinir sistemi

p53: Tümör protein 53

PCR: Polimeraz zincir reaksiyon

PI3K: Fosfoinozid 3-kinaz

P-gp: P-glikoprotein

pRb: Protein retinoblastoma

RNA: Ribonükleik asit

RPM: Dakikadaki devir sayısı

VLP: Virüs benzeri partiküller

URR: Upper regulatory region

LCR: Long control region

NCR: Noncoding region

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gen

BH3: BCL2 gen ailesinin homolog alanlarından biri

DISC: Ölümü baskılayan sinyal kompleks

APAF-1: Apoptoz aktive edici faktör 1

SMAC/DIABLO: Mitokondriyal protein

IAP: Inhibitor of apoptosis protein

GADD-45: The growth arrest and DNA damage

H₂O₂: Hidrojen peroksit

AgNO₃: Gümüş nitrat

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

MCF-7: Meme hücresi kanser hattı

WHCO₃: Özofagus kanser hücre hattı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HeLa HÜCRE HATLARINDA
***PRİMULA VULGARİS* EKSTRAKTI YÜKLÜ GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN**
***BCL2*, *MDR1* VE *p53* GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN**
ARAŞTIRILMASI

Gamze DULKADİR

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Akın TEKCAN

Serviks kanseri dünya çapında kadınlar arasında meme kanserinden sonra en yaygın ikinci kanser türüdür. HeLa hücreleri bir insan serviks kanseri hücre hattıdır. HeLa, kanserli hücrelerin moleküler biyolojik özelliklerini incelemek amacıyla en yaygın kullanılan model hücre hattıdır. Bu çalışmada, *Primula vulgaris* bitkisinin çiçek ve yaprak ekstraktları yüklü gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) HeLa hücre hattında hücre proliferasyonu ile *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Primula vulgaris bitkisinin çiçek ve yaprak ekstraktları yüklü AgNP IC₅₀ doz değerleri iCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle belirlendi. IC₅₀ doz belirlenmesinin ardından, IC₅₀ doz grubu (1. Grup), LD₅₀ doz grubu (2. Grup), Sisplatin grubu (3.Grup), bitki ekstraktı yüklenmemiş AgNP doz grubu (4.Grup) ve kontrol grubu (5. Grup) olmak üzere 5 farklı grupta *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

HeLa hücre hatlarına; *Primula vulgaris* çiçek ekstraktı yüklü AgNP (PVLAgNP_(ç)) ilavesi ardından 12. saat ve 24. saatte belirlenen IC₅₀ değerleri sırasıyla 58,39 µg/ml ve 57,65

$\mu\text{g/ml}$ 'dir ($r^2= 1$). *Primula vulgaris* yaprak ekstraktı yüklü AgNP (PVLA_gNP_(Y)) ilavesi ardından 12. saat ve 24. saatte belirlenen IC₅₀ değeri sırasıyla 42,14 $\mu\text{g/ml}$ ve 48,50 $\mu\text{g/ml}$ 'dir ($r^2= 1$). PVLA_gNP_(Ç) ve PVLA_gNP_(Y) uygulanan HeLa hücrelerinin ölüm oranlarının doza bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). PVLA_gNP IC₅₀ doz grubunda kontrol grubuna göre; *BCL2* gen ekspresyon miktarında 0,7 kat artış, *MDR1* gen ekspresyon miktarında 1,2 kat artış ve *p53* gen ekspresyon miktarında 2,6 kat azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak, PVLA_gNP_(Ç-Y)' lerin HeLa hücre hattı üzerinde dozla orantılı olarak hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. PVLA_gNP_(Ç) dozundaki artışla orantılı olarak *BCL2* ve *MDR1* gen ekspresyon seviyelerindeki artışlar ilaç direnci gelişimi açısından değerlendirilmelidir. *Primula vulgaris* ekstraktının serviks kanserinin tedavisinde kullanımı konusunda daha detaylı ve *in vivo* araştırmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Ocak 2021, 88 sayfa.

Anahtar Kelimeler: HeLa, *Primula vulgaris*, *p53*, *BCL2*, *MDR1*, Gen, Ekspresyon.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF *PRIMULA VULGARIS* EXTRACT LOADED SILVER NANOPARTICULES ON *BCL2*, *MDR1* AND *p53* GEN EXPRESSION LEVELS IN HELA CELL LINES

Gamze DULKADİR

Kırşehir Ahi Evran University Institute of
Health Sciences Department of
Molecular Medicine

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Akın TEKCAN

Cervical cancer is the second most common type of cancer among women worldwide after breast cancer. HeLa cells are a human cervical cancer cell line. HeLa is the most widely used model cell line to study the molecular biological properties of cell lines cancerous cells. In this study, it was aimed to investigate the effects of flower and leaf extracts loaded silver nanoparticles (AgNP) of *Primula vulgaris* plant on cell proliferation and *BCL2*, *MDR1* and *p53* gene expression levels in HeLa cell line.

AgNP IC₅₀ dose values of *Primula vulgaris* plant loaded with flower and leaf extracts were determined by iCELLigence real time cell analysis system. After IC₅₀ dose determination, IC₅₀ dose group (1st Group), LD₅₀ dose group (2nd Group), Cisplatin added group (3rd Group), AgNP dose group without plant extract (4th Group) and control group (5th Group) *BCL2*, *MDR1* and *p53* gene expression levels in 5 different groups were analyzed by qRT-PCR method. To HeLa cell lines; After the addition of AgNP loaded with *Primula vulgaris* flower extract (PVLAgNP_(C)), the IC₅₀ values determined at the 12th hour and 24th hour are 58,39 µg/ml and 57,65 µg/ml, respectively ($r^2 = 1$). Following the addition of AgNP loaded with *Primula vulgaris* leaf extract (PVLAgNP_(Y)), the IC₅₀ value determined at the 12th hour and 24th hour is 42,14 µg/ml and 48,50 µg/ml, respectively ($r^2 = 1$). It was

determined that the death rate of HeLa cells loaded with *Primula vulgaris* flower and leaf extract loaded with AgNP increased depending on the dose ($p < 0.05$). According to the control group in the AgNP dose group loaded with *Primula vulgaris* extract; A 0,8-fold decrease in the amount of *BCL2* gene expression, a 1,1-fold decrease in the *MDR1* gene expression amount and a 1,3-fold decrease in the amount of *p53* gene expression were observed.

As a result, it has been determined that *Primula vulgaris* plant inhibits the proliferation of HeLa cells. Further studies are needed to test the clinical applicability of the study results.

January 2021, 88 Pages.

KeyWords: HeLa, *Primula vulgaris*, *p53*, *BCL2*, *MDR1*, Expression.

1.GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kanser; bir hücre, doku veya organda meydana gelen kontrolsüz çoğalmalar ile çevresindeki hücre, doku ve/veya organlara metastaz yaparak ilerleyen bir hastalıktır (Baykara O, 2016). Kanser, tahmini 9,6 milyon ölüme neden olarak dünyada önde gelen ikinci ölüm nedeni olarak kayıtlara geçmiştir (Siegel R ve ark. , 2018). Dünyada her 6 ölümden 1'i kanser kaynaklıdır (Fitzmaurice C ve ark., 2017). Önümüzdeki yirmi yılda yeni kanser vakalarının %70 civarında artması beklenmektedir (Giles GG ve ark., 2006). Cinsiyetlere göre kanser türü yaygınlığına bakıldığında akciğer, mide, karaciğer, kolorektal ve prostat dokusunun kanserleri erkeklerde daha yaygın görülürken meme, akciğer, kolorektal, tiroid ve serviks kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser türleridir (Gültekin M ve Boztaş G, 2015).

Serviks kanseri; kadınlar arasında meme kanserinden sonra en yaygın görülen ve ölüme neden olan kanser tipidir (Newton CL ve ark., 2017). Dünya genelinde, serviks kanseri, 2018 yılı kadın kanser ölümlerinin %7,5 ini oluşturur ve her yıl tahmini yeni vaka sayısı 570.000 ile kadınlar arasındameme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanser türüdür (Bray F ve ark., 2018). Epidemiyolojik çalışmaların sonucunda temel risk faktörü *Human Papillomavirus (HPV)*'dir (Howley PM, 1983). Papillomavirus ailesinden olan proteinle çevrili çift sarmal DNA'ya sahip olan bu virüsler sadece insanları enfekte eden DNA virüsleridir. Cinsel yolla bulaşan bu virüs grubu anüs, penis, vajina kanserlerine ve daha düşük oranda orofarenks ve ağız kanserlerine de neden olduğu bilinmektedir (Chaturvedi AK, 2010). Serviks kanseri; tarama ve tedaviye olan ulaşım zorluğu nedeniyle dünyada gelişmekte olan ülkelerde mortalitesi yüksek bir kanserdir. Verilerine göre her yıl serviks kanseri nedeniyle olduğu tahmin edilen 311.000'den fazla ölüm gerçekleşmekte ve bunların %85'inden fazlası az gelişmiş bölgelerde meydana gelmektedir (DSÖ, 2018). Serviks kanseri risk faktörleri belirlenmiş olup önlenabilir bir hastalıktır (Özgül N, 2011). Bu açıdan bakıldığında, serviks kanserinin tedavisinde kullanılabilecek kemoterapötik etkili yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi son derece önemlidir. Bu çalışmada, *Primula vulgaris* bitkisinin çiçek ve yaprak ekstraktları yüklü gümüş nanopartiküllerinin

(PVLA_gNP) HeLa hücre hattında hücre proliferasyonu ile *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

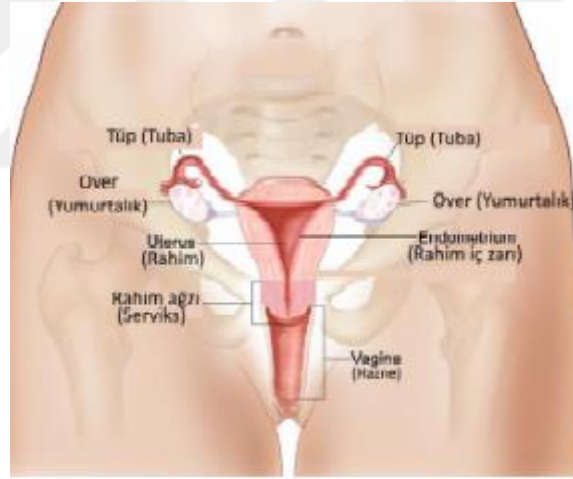


2. GENEL BİLGİLER

2.1 Serviks Anatomisi

Kadın üreme organları iç ve dış üreme organları olmak üzere ikiye ayrılır. Dış üreme organları (vulva) perinede yerleşmiş; klitoris, hymen, üretra, büyük ve küçük dudaklardan oluşur. İç üreme organları ise pelvik kavitede yer alan; vajina (hazne), rahim ağzı (serviks), rahim (uterus), fallop tüpleri ve overlerden oluşmaktadır. Yumurtalık ve tüpler sağ ve solda birer tane olmak üzere toplam iki adettir (Şekil 1.1). Uterus (rahim), dört kısımdan oluşur; fundus, korpus, isthmus ve servikstir (Taşkın L, 2007).

Serviks, intrauterin hayatın 6.-7.haftalarında meydana gelir. Uterusun alt kısmında 3-4 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde silindirik şekilli bir organdır. Büyüklüğü ve şekli, kadının yaşına, yaptığı doğum sayısına ve hormonlarına bağlı olarak değişir (Robbins SL ve ark., 2003).



Şekil 1.1: Kadın üreme sistemi (Lipkowitz S 2009, <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR609921.jpg>. Erişim tarihi: 26.12.2019).

2.2. Serviks Kanseri

Serviks kanseri; kadınlar arasında meme kanserinden sonra en yaygın görülen ve ölüme neden olan ikinci kanser tipidir (Newton CL ve ark., 2017). Dünya genelinde, serviks kanseri, 2018 yılı kadın kanser ölümlerinin %7,5'ini oluşturur ve her yıl tahmini yeni vaka sayısı 570.000 ile kadınlar arasında meme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanser

türüdür (Bray F ve ark., 2018). Serviks kanseri; tarama ve tedaviye olan ulaşım zorluğu nedeniyle dünyada gelişmekte olan ülkelerde mortalitesi yüksek bir kanserdir. Araştırmalara göre serviks kanserinden tahmin edilen ölüm sayısı 311.000'dir (DSÖ, 2018). Bu ölümlerin %85' inden fazlası daha az gelişmiş bölgelerde meydana gelmektedir (Bray F ve ark., 2018). Serviks kanseri risk faktörleri belirlenmiş olup önlenabilir bir hastalıktır. Serviks kanseri tüm jinekolojik kanserler arasında üçüncü, tarama ve önleme yöntemleri açısından yetersiz, gelişmekte olan ülkelerde ikinci sırada görülen yaygın bir malign hastalıktır. Yapılan etiyolojik çalışmalarda majör risk faktörünün Human Papillomavirus (HPV) olduğu kanıtlanmıştır (Bray F ve ark., 2018). Serviks kanserinin %99'unda HPV olgusuna rastlanmaktadır. Her HPV olgusu malignite niteliği taşımaz ve kendiliğinden düzelirken HPV16 ve HPV18 genellikle prekanseröz lezyonların oluşumuna neden olur ve servikal kanser ile uyumludur (Senapati R ve ark., 2016). HPV'nin HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 ve HPV58 tipleri yüksek riskli HPV türleri iken HPV6 ve HPV11 tipleri non-onkojenik HPV tipleridir (Senapati R ve ark., 2016).

2.3. Serviks Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörü

İlk olarak 1980'lerin başında alman virologist H.Hausen tarafından HPV serviks kanseri ilişkisi tanımlanmıştır. Günümüzde HPV DNA pozitifliği tanının konmasında yeterli olmaktadır. HPV virüsü cinsel yolla bulaşan onkojenik bir virüstür. Cinsel yolla bulaşan bu virüs grubu anüs, penis, vajina kanserlerine ve daha düşük oranda orofarenks ve ağız kanserlerine de neden olduğu bilinmektedir (Tablo 2.1) (Chaturvedi AK, 2010). HPV; servikte neden olduğu değişiklikler sonunda metaplastik epitelde kalıcı bozukluklara yol açmaktadır. HPV'nin yanı sıra serviks kanseri için risk oluşturan faktörleri demografik, davranışsal ve seksüel faktörler ve medikal/jinekolojik faktörler olarak gruplayabiliriz (Tablo 2.2).

Tablo 2.1: HPV pozitifliği (%) gösteren kanser tipleri (Akhan SE. 2013.<https://hpv.com.tr/hpv-tipleri-neden-oldugu-hastaliklar-turkiyede-genital-sigil-ve-rahim-agzi-kanseri-sikligi/> Erişim tarihi: 12.01.2020).

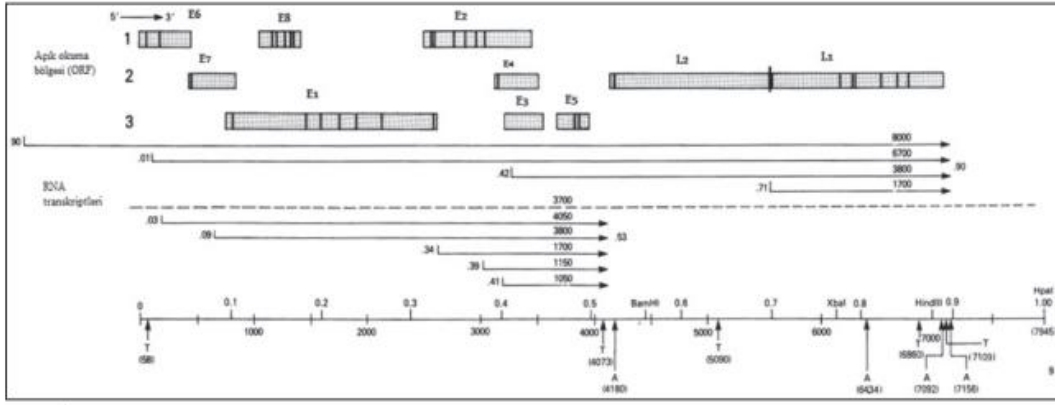
<i>KANSER TİPİ</i>	<i>HPV POZİTİFLİĞİ %</i>
Serviks Kanseri	>99,7
Anal ve Perianal Kanser	>75
Vulvar Kanser	>50
Vaginal Kanser	>50
Penil Kanser	>50
Orofaringeal Kanser	~25
Ösefagus Kanser	10-35
Cilt Kanseri	50-80

Tablo 2.2: Serviks Kanseri İçin Risk Oluşturan Faktörler (Kaur H ve Verschraegen CF, 2012).

<u>Demografik Özellikler</u>	<u>Davranışsal ve Seksüel Özellikler</u>	<u>Medikal/Jinekolojik Faktörler</u>
İleri yaş (40-55 yaş arası)	Çok eşlilik	Erken yaşta gebelik
İrk (Siyah kadınlar)	Partnerin partner sayısının fazla olması	Cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü (HIV)
Düşük sosyo-ekonomik düzey	Küçük yaşta cinsel ilişki (16 yaş ve öncesi)	Çok fazla doğum (multiparite)
Düşük eğitim düzeyi	Sigara	HPV enfeksiyonu (HPV-16/HPV18)
	Uzun süreli doğum kontrol hapi kullanma	İlk gebelik ve doğum yaşının 17 ve altında olması

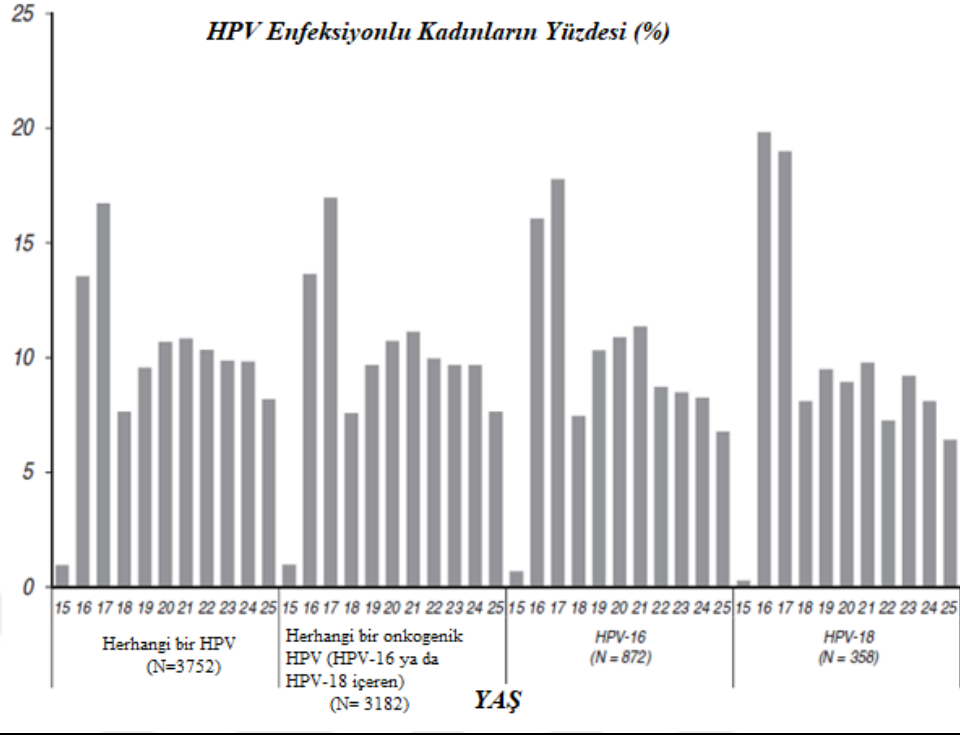
2.4. Human Papillomavirus (HPV)

Sadece insanları enfekte eden, *Papillomaviridae* ailesinden olan DNA virüsleridir (Ramael M ve ark., 2004). Gen dizilimlerindeki farklılıklara göre 200'den fazla HPV tipi olduğu bilinmektedir. HPV genetik yapısı şekil 2.2'de gösterilmiştir. DNA yapısına göre sınıflandırıldıkları için diğer virüslerin aksine genotipleri numaralandırılır (De Villiers EM ve ark., 2004). Klinik olarak üç grupta incelenir. Bunlar; serviks kanseri açısından düşük riskli olan HPV'ler (Tip-6, Tip-11, Tip-40, Tip-42, Tip-43, Tip-44, Tip-54, Tip-55 ve Tip-62), serviks kanser açısından olası yüksek riskli olanlar (Tip-26, Tip-53 ve Tip-66) ve serviks kanseri açısından yüksek riskli HPV'ler (Tip-16 ve Tip-18 en sık görülmek üzere Tip-31, Tip-33, Tip-35, Tip-39, Tip-45, Tip-51, Tip-56, Tip-58, Tip-59, Tip-68, Tip-73 ve Tip-82) olarak incelenmektedirler (Trottier H ve ark., 2009; Bouvard V ve ark., 2009).



Şekil 2.1: İnsan Papilloma Virüs (HPV) genetik yapısı (Howley PM, 1983).

İnsan Papillomavirüs, en önemli bulaş şekli cinsel aktivite (vajinal, oral, anal) olsa da kontamine yüzeylerden, ciltlerdeki lezyonlardan ve doğum kanalından olmak üzere doğrudan veya dolaylı olarak bulaşı görülmektedir (Milde-Langosch K ve ark., 2000). Virjinlerde (bakire kadın) HPV enfeksiyon oranı %14.8'dir (Pao CC, ve ark., 1993). Yapılan araştırmalarda seks hayatı aktif olan kadınların %75'inde HPV pozitifdir. Cinsel yolla bulaşta en önemli iki faktör partner sayısı ve enfeksiyonun alındığı yaştır. İlk cinsel ilişki yaşının erken olması, HPV enfekteliği ve ilerleyen zamanlarda gelişecek malign lezyonlar açısından önem taşımaktadır (Cancer Research 2016; American Cancer Society 2017a). HPV enfeksiyonlu kadınların yaş aralıklarına göre yüzdelik dağılımları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Yaş aralığına göre HPV Enfeksiyonlu Kadınların Yüzdelik Dağılımı (Bahmanyar ER ve ark., 2012).

HPV enfeksiyonlarının geneli semptomsuz, geçici ve değişken klinik tablo gösterebilir (Ramael M ve ark., 2004). Klinik tablonun değişkenliği; HPV virüsünün tipinden (özellikle Tip-16 ve Tip-18 invaziv karsinomla ilişkilidir), lezyonun yerleştiği bölgeden, kişinin bağışıklık düzeyinden (gebe ve immün yetmezliğinde daha ağır seyreder) ve epitel dokunun yapısından (serviksin değişim bölgesindeki epitelyum, HPV'nin onkogenik etkilerine daha yatkındır) etkilenir (Bosch FX ve ark., 2002). Çoğu HPV enfeksiyonu asemptomatiktir ve tanı sadece HPV DNA testi ile konulmaktadır. Genital siğiller birkaç ayda meydana gelirken kanser oluşumu uzun yıllar sürebilmektedir. Genital HPV enfeksiyonu üç klinik aşamadan meydana gelir. Latent, subklinik ve klinik dönemleridir (Milde-Langosch K ve ark., 2000).

HPV, doğal immunitiyi engelleyen bazı mekanizmalara sahip olduğundan enfeksiyona karşı immün yanıt, genellikle diğer viral enfeksiyonlara kıyasla daha geç gelişir. Yüksek riskli HPV enfeksiyonlarında enfeksiyonun tamamen giderilmesi için yaklaşık 16-18 ay gerekirken düşük riskli HPV enfeksiyonlarına karşı on aylık bir süre yeterli olmaktadır (Avcı GA ve Bozdağı G., 2013).

2.5. HPV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemleri

HPV enfeksiyonu tanısında kullanılan yöntemler moleküler olmayan teknikler ve moleküler teknikler olmak üzere ikiye ayrılır (Avcı GA ve Bozdağı G, 2013).

i. Moleküler Olmayan Teknikler

Çıplak gözle muayene

Kolposkopi

Sitoloji ve Histoloji

ii. Moleküler Teknikler

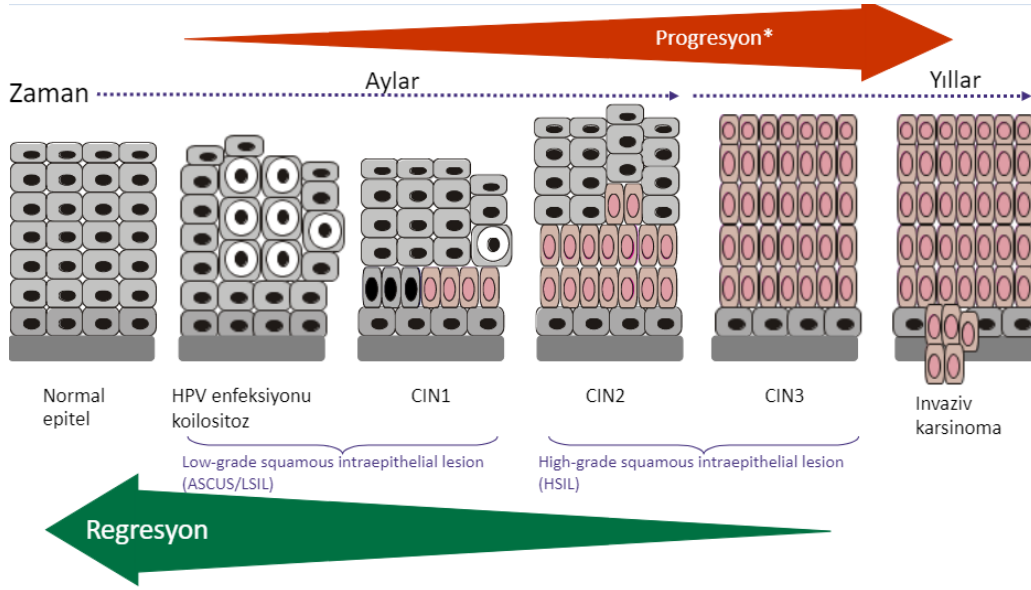
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Hybrid Capture testi

HPV mRNA'sının belirlenmesi (Avcı GA, Bozdağı G, 2013).

2.6. HeLa Serviks Adenokarsinoma Oluşum Süreci

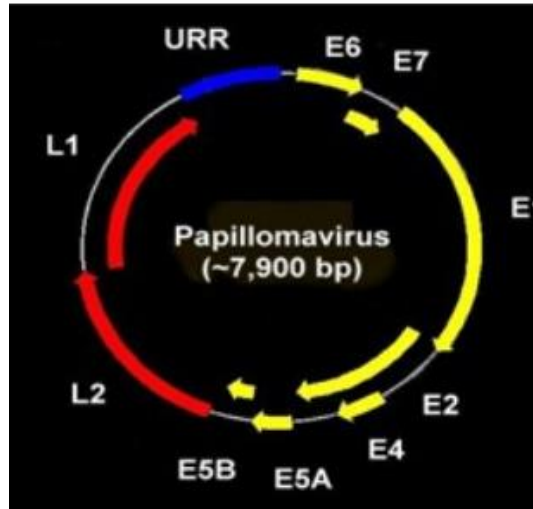
Genellikle transforma alanı denilen, rahim ağzındaki tek bir bölgede, bölgede başlayan kanser öncüsü lezyon (prealign lezyon), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) olarak adlandırılır. Rahim ağzının üst dokusunda tuttuğu derinliğe göre sınıflandırılır (Middleton K ve ark., 2003). Epitel dokunun %25'i tutulmuş ise CIN1 (hafif displazi), %50'si tutulu ise CIN2 (orta derece displazi), %75'i tutulu ise CIN3 (ağır displazi) olarak sınıflandırılır. CIN3 evresindeki lezyon zamanla serviks kanserini oluşturmaktadır (Origoni M ve ark., 2014) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Servikal karsinogenez progresyonu (Solomon D ve ark., 2002).

2.7. Servikal Kanserin Moleküler Mekanizması

İki viral onkoprotein olan E6 ve E7; HPV enfeksiyonun servikal kanserde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Viral genom, konağın genomu ile entegre olduğu zaman E6 ve E7 up-regüle olmakta ve hücre sinyal yolundaki kritik proteinlerin regülasyonu bozulmaktadır. Örneğin *p53* ve *pRb* gibi iki önemli supresor proteini inhibe olmaktadır (Oyervides-Munoz MA ve ark., 2018) (Şekil 2.4). Lau ve arkadaşları; E7'yi içeren DNA tümör virüs onkogenlerinin cGAS/STING DNA-duyarlı yolağa bağlanıp bu bölgeyi baskıladığını açıklamışlardır (Lau L ve ark., 2015). Bunun yanı sıra; PI3K yolağının kilit proteini olarak görev yapan PIK3CA, KRAS ve EGFR'de mutasyona neden olduğu kanıtlanmıştır (Wright AA ve ark., 2013). Günümüzde serviks kanserinin tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve platin bazlı (sisplatin ve tedavi kombinasyonları gibi) kemoterapi kullanılmaktadır (Bhatla N ve ark., 2018).



Şekil 2.4: HPV DNA genomu (Munoz N ve ark., 2006).

Erken bölge genleri; E6, E7, E1, E2, E4, E5, geç bölge genleri; L1, L2'dir. Kontrol bölgeleri; URR, LCR VE NCR'dir. E1: replikasyondan, E2: replikasyon ve transkripsiyonun regülasyonundan, E4: Viral (VLP) serbestleşmeden, E5: transformasyon ve EGF aktivasyonundan sorumludur. İki önemli erken proteinden biri olan E6: *p53*'e bağlanarak onkojenik transformasyonu sağlar. Hücre içinde, *p53*'ün ubiquitin yolu ile yıkılmasını sağlar. Proapoptotik Bax proteinin yıkılmasını sağlar. E7 ise *pRb*'ye bağlanarak onkojenik transformasyonu gerçekleştirir. Hücre içinde Rb (retinoblastom) azalışına neden olur. Siklin A ve E'yi stimüle eder. Sonuç olarak E6 ve E7 tümör supresor gen olan *p53* ve Rb'nin fonksiyonlarını bozarak kanser gelişimine neden olur (Onan M, 2013).

2.8. Serviks Kanseri Belirtileri

HPV enfeksiyonları genellikle semptomsuz, kendiliğinden düzelen, geçici, belirti vermez veya başka bir hastalığa neden olmazlar. Ancak HPV'nin sık görülen tipleri olan Tip-16 ve Tip-18'in sebep olduğu enfeksiyonlar kanser öncesi lezyonlara neden olabilirler (Avcı GA ve Bozdağı G, 2013). Bu lezyonlar tedavi edilmezlerse serviks kanserine kadar ilerleyebilirler. Süreç genellikle uzun ve belirtsiz gelişir. Kanser belirtileri lezyonlar belirli bir aşamaya gelip kanserojen dokuları oluşturdukları ve metastaz yaptıkları ileri bir

aşamaya gelindiğinde ortaya çıkar. Serviks kanserinde genel olarak şu belirtiler görülebilir (American Cancer Society, 2015);

- Menstrüasyon (adet) dönemleri arasında düzensiz kan lekesi veya hafif kanama (normalden daha uzun sürmesi),

- Menopoz sonrası düzensizlikler (lekelenme veya kanama),
 - Cinsel ilişki esnasında ağrı,
 - Cinsel ilişki sonrası kanama,
 - Anormal vajinal akıntı (kötü kokulu,sulu, pembe, soluk ve devamlı akıntı)
- (American Cancer Society, 2015),

Mesane, bağırsak, akciğer veya karaciğere yayılmış çok ileri düzey serviks kanseri olgularında ise şu belirtiler görülür (Kaur H ve Verschraegen CF, 2012);

- Sırt ağrısı
- Kemik ağrısı ve kırıklar
- Yorgunluk, bitkinlik
- Vajinadan idrar ve dışkı kaçağı
- Bacak ağrısı
- İştah kaybı
- Pelvik ağrı
- Şişmiş ayaklar
- Kilo kaybı (Kaur H ve Verschraegen CF , 2012)

2.9. Serviks Kanseri Evreleri

Tedavi şekline ve gidişatına karar vermek için kanserleri evrelemek standart bir yoldur. Serviks kanseri evreleri aşağıdaki gibidir (Türk Jinekolojik Onkoloji Derneği, 2020):

Evre I: Kanserli doku oluşumu serviksle sınırlıdır. IA ve IB olarak iki alt grupta evrenir. IA; sadece biyopsi ile görülebilen mikroskopik kanserdir. IB ise; çıplak gözle görülebilen

kanser evresidir. Kanser boyutuna göre iki alt grupta evrelenir. IB1: 4 cm'den daha küçük kanser dokusunu oluştururken, IB2; 4 cm'den daha büyük kanser oluşumudur.

Evre II: Serviksin yakınındaki yumuşak dokuya veya vajina kubbesine yayılım vardır.

Evre III: Pelvik yan duvarlarında tutulum, ayaklarda şişme veya idrar torbasına idrar akışının blokesi bu evrede görülür.

Evre IV: Kanser; idrar torbası, karaciğer, akciğer ya da rektum gibi daha uzak organlara metastaz yaptığı evredir (Türk Jinekolojik Onkoloji Derneği, 2020).

2.10. Serviks Kanseri Tanı Yöntemleri

Uzun bir preklinik döneme sahip olması serviks kanserine erken tanı imkanı sağlamaktadır. Serviksin premalign koşulları semptomlara neden olmadığı için uygun bir tarama testi ile erken tanı konulabilir. Erken tanıda amaç; asemptomatik bireylerde yüksek dereceli lezyonları saptamak ve tedavi ederek hastalığın ilerlemesini önlemektir (NG ve ark., 2017). Erken tanıda kullanılan iki yöntem vardır;

- **Smear Testi:** Serviks ve vajen epitelinden dökülen normal hücreler ve hastalık nedeni ile değişmiş hücrelerin incelenmesini temel alan testtir. Pap smear testi ile preinvaziv ve kanseröz dönemdeki hücreler endoservikal kanalda saptanmakta ve bu aşamadaki kanser tedavisi ile hücreler kanser oluşturmada gelişim önlenmektedir (Demirgöz Bal M, 2014, Canavan TP ve Doshi NR, 2000).
- **HPV testi:** Mevcut servikal tarama testleri içerisinde en objektif ve tekrarlanabilir olanıdır. HPV DNA testinin serviks kanseri ile ilişkisi kanıtlanmış ve kanser vakalarının %99,9' unda pozitifliği görülmüştür (Baran M, 2013). Son yıllarda sitolojik tarama yöntemlerine oranla HPV DNA testinin daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Örenli G, 2015).

3. SERVİKS KANSERİ GENETİĞİ

3.1. Apoptoz

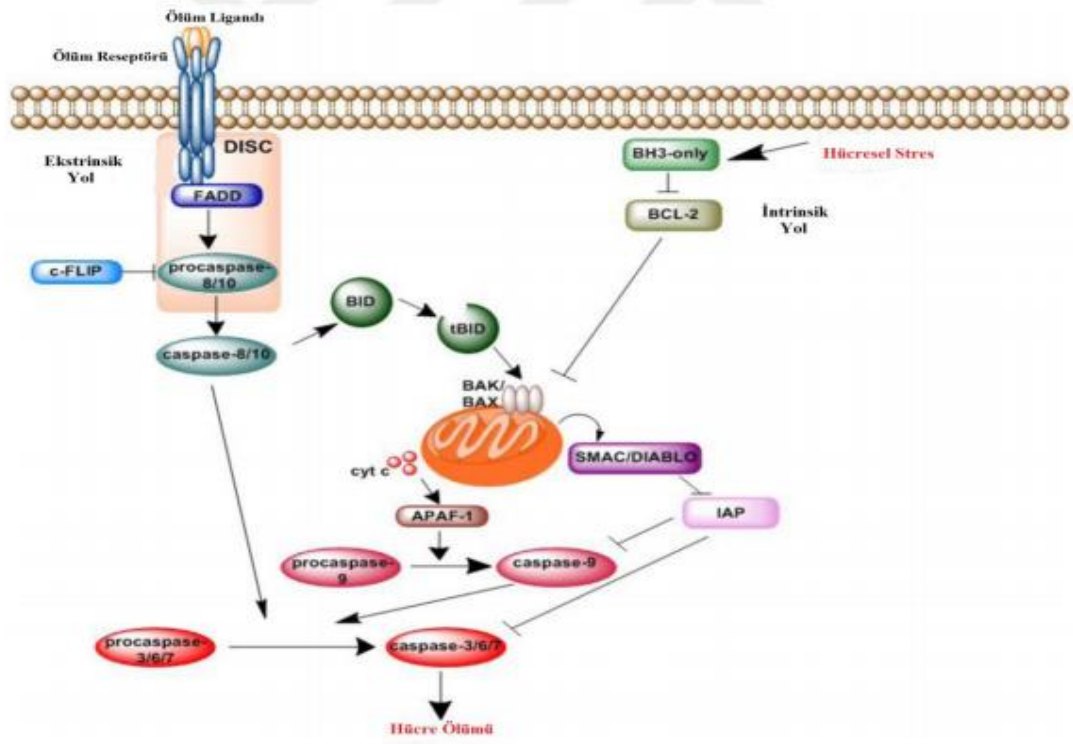
Apoptoz; ilk defa 1972 yılında A. Wyllie tarafından tanımı yapılmıştır. Bu tanım morfolojik ve biyokimyasal olarak diğer hücre ölümlerinden farklı olduğunu hücrenin kendi ölümüne programlı bir şekilde katılmasını ifade eder (Irvine AE ve ark., 2002). Embriyonik gelişim ve doku homestazı için gerekli bir mekanizmadır (Kerr JF ve ark., 1972). Başta DNA hasarı olmak üzere birçok uyarana fizyolojik bir yanıt oluşturur (Sperandio S, 2000). Birçok hastalığın seyrinde önemli rol oynar. Parkinson, tip1 diyabet, hepatit C ve miyokard infarktüsü (MI) gibi hastalıklarda apoptoz hızlanırken kanserlerde ve otoimmün hastalıklarda yavaşladığı tespit edilmiştir (Tomatır AG, 2003)

Apoptoz; hücre içi proteaz grubu olan kaspazların aktivasyonu sonucu meydana gelir (Boatright KM, 2003). Hücre ölümü sürecinde başlatıcı (kaspaz-2, 8, 9, 10) ve yürütücü (kaspaz-3, 6, 7) kaspazlar rol oynar. Kaspazlar; DNA hasarı, growth faktör eksikliği veya sitokin yokluğu gibi hücre içi sinyallerde ya da hasar görmüş hücrelere yanıt olarak hücre dışı ölüm indükleyici sinyaller tarafından aktive olur (Pompei LM ve ark., 2015).

Apoptoz, intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik olmak üzere iki yolla gerçekleşir (Şekil 3.1).

- **İntrinsik yol;** farklı tipte hücrel stresle yanıt vermek için kullanılır. *BCL2* protein ailesi tarafından düzenlenir. Hücrel stresle aktive olan intrinsik yol BH3 homolojisi olan proapoptotik proteinler apoptotik *BCL2* proteinini inhibe eder. Böylece; *BAK/BAX* oligomerizasyonu, mitokondri permeabilizasyonu sağlanır, sitokrom C ve *SMAC/DIABLO* salınımı baskılanır. Sitokrom c, kaspaz-9 ve APAF-1 ile kompleks oluşturur ve başlatıcı olan kaspaz-9'un aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz-9 yürütücü kaspazları (kaspaz-3, 6 ve 7) aktive eder ve programlı hücre ölümü indüklenir (Pompei LM ve ark. 2015; Buzin A ve ark., 2015).
- **Ekstrinsik yol;** Ölüm ligandı tarafından ölüm reseptörü aktive edilir. Ölüm reseptörü ölümü indükleyen sinyal kompleks (DISC) ile kompleks oluşturur ve başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-8 ve kaspaz-10'unu aktive eder. Her iki kaspaz

yürütücü kaspaz olan kaspaz-3'ün aktivasyonunu gerçekleştirir (Zhang XJ ve ark., 2015).



Şekil 3.1: İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptoz Yolları (Zaman S, 2014).

3.2. BCL2 Gen Ailesi

BCL2 bir proto-onkogendir ve apoptozu engelleyici protein kodlar. Bu gen ilk defa B hücreli lenfomada 14. ve 18. kromozomlar arasındaki translokasyon kırılma noktalarında keşfedilmiştir (Tsujimoto Y, 1985). *BCL2* ailesi hem *BAX*, *BAK*, *BAD*, *BCL-Xs*, *BID*, *BIK*, *BIM* ve *HRK* gibi proapoptotikleri hem de *BCL2*, *BCL-XL*, *BCL-W*, *BFL-1* ve *MCL-1* gibi apoptotik proteinlerinden oluşmaktadır (Sengupta P, 2017). Pro veya anti-apoptotik işlevlerine ve homoloji derecesine göre üç grupta sınıflandırılırlar. *BCL2* ailesinin anti-apoptotik üyeleri endoplazmik retikulum, mitokondri veya nükleer membran ile ilişkili proteinlerdir. Endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve mitokondri de ise proapoptotik üyeler yer alır. Tablo 3.1'de *BCL2* gen ailesi ve hücre içi lokasyonları detaylı olarak gösterilmektedir (Kale J, 2018).

Tablo 3.1: *BCL2* Gen Ailesi ve Hücre İçi Lokasyonları (Kale I 2018).

Protein	Lokalizasyon									
	ER	NE	TGN	Sitozol	MOM	MM	MIM	Sito-iskelet	Plazma Membranı	Nukleus
BCL-2	XX				XX					
BFL-1										
BCL-X _L					XX					
BCL-W										
MCL-1					XX					
BCL-G					XX					
BAX				XX						
BAK					XX					
BOK	XX									
BMF										
BIM										
BID				XX						
PUMA					XX					
NOXA					XX					
HRK										
BAD				XX						
BIK	XX									
BECLIN-1	XX									
BNIP										
SPIKE				XX						
BAP31	XX									
BCL-G										
BFK				XX						
BCL-Rambo					XX					

Abbreviations

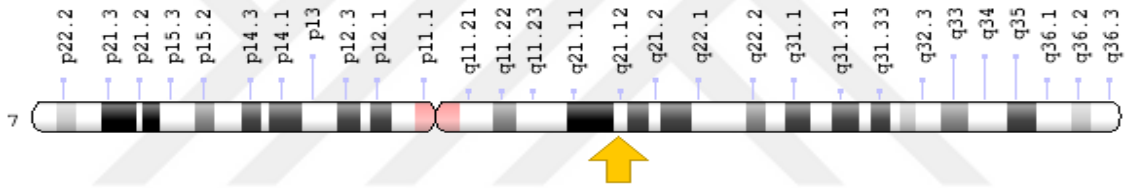
ER	Endoplazmik Retikulum
NE	Nukleus Zarf
MOM	Mitokondri Dış Membranı
MIM	Mitokondri İç Membranı
MM	Mitokondriyal Matris
TGN	Trans Golgi Ağı

	Normal Koşullarda
	Apoptotik Koşullarda
XX	Baskın Lokalizasyonu

BCL2 ekspresyonunda azalma antikanser ilaçlara karşı apoptotik tepkiyi yükseltirken ekspresyonunun artması radyasyon terapisine ve kemoterapötik ilaçlara karşı dirençe neden olur. Bunun yanı sıra, yüksek *BCL2* ekspresyonu hücre döngüsünün G₀ fazında hücrelerin birikmesine neden olur ve kemorezistansı artırır. Proapoptotik *BCL2* üyeleri apoptoz destekleyici olarak çalışırken anti-apoptotik üyeler sitokrom C'nin salımını engeller ve apoptozu önleyici olarak çalışırlar. *BCL2*'nin intrinsik yolda over-ekspresyonu ekstrinsik kontrollü apoptozu baskılar (Li JP ve ark., 2015).

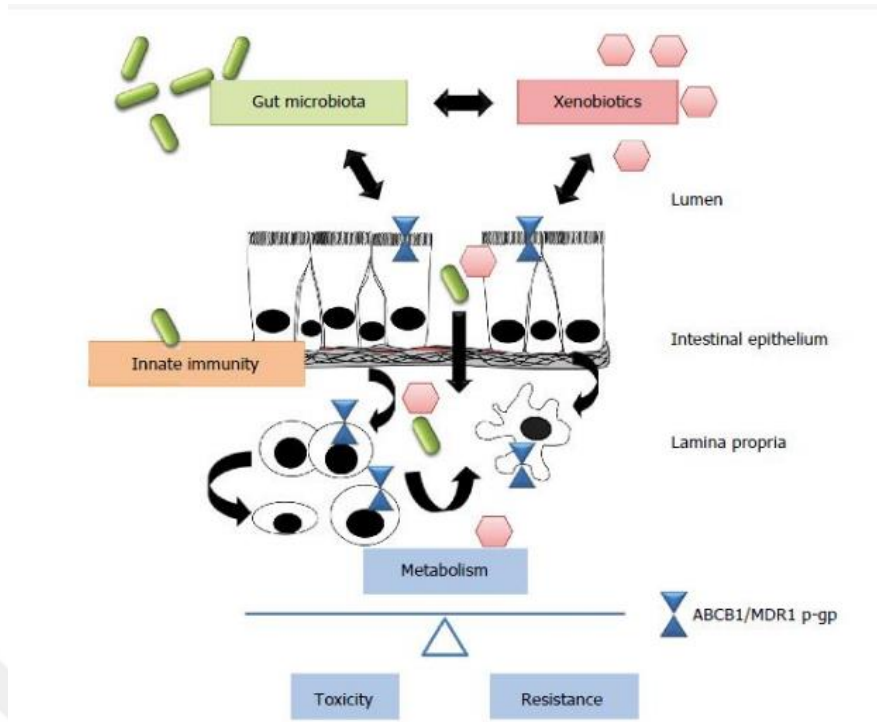
3. 3. *MDR1*

Multidrug Resistance (*MDR1*) geni; ABCB1 geni olarak da adlandırılır. Gen lokasyonu 7q21'dir ve 28 ekzonu kapsamaktadır. Transmembran taşıyıcı bir gen olan P-glikoproteini (P-gp) kodlar (Ueda K ve ark., 1987). P-glikoprotein hem birçok ilacın hücre dışına taşınmasında hem de metabolizma atıklarının hücre dışına taşınmasında önemli rol oynar (Sakaeda T ve ark., 2005; Schwab EM ve ark. 2003). P-gp; kanser hücrelerinde gen ifadesinin yükselmesi ve kemoterapi ilaçlarına karşı gelişen kemoterapötik direnç fenotipi sonucu keşfedilmiştir. Güncel bilgilerde P-gp'nin GİS boyunca ilaç emilimini etkilediği, idrar ve safra yoluyla ilaç atıklarının atılımını sağladığı ve ilaçların kan beyin bariyerine giriş-çıkışlarda engel olduğu bilinmektedir. Yani P-gp, sadece kanser hücrelerine çoğul ilaç direnci sağlamanın yanı sıra normal dokulardaki birçok ilacın farmakokinetiğini de etkilemektedir (Schwab EM ve ark., 2003). *MDR1* gen lokasyonu Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: *MDR1* gen lokasyonu (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCB1#location>) Erişim Tarihi 25.12.209.

P-gp ekspresyonu ya da inhibisyonu, insanlarda bazı hastalıklarla ilişkidir ve duyarlılığı artırmaktadır. Viral immün yetmezlik sendromu yani HIV de bu hastalıklardan biridir. HIV'de; P-gp ekspresyonu HIV proteaz inhibitörleri bağırsakta emilimi ve beyin bariyerlerinden geçişi sınırlandırarak virüsün kalıcılığına katkıda bulunduğu bilinmektedir. P-gp'nin bloke edilmesi ise bazı ilaçların MSS'ye girişine sebep olur (Şekil 3.3). *MDR1* gen bölgesinde polimorfizm ilk olarak kanserli hücrelerde yapılan çalışmalarla tespit edilmiş ve daha sonra, tüm *MDR1* kodlama bölgesi detaylı olarak belirlenmiştir (Marzolini C ve ark., 2004). Araştırmalarda *MDR1* gen bölgesinde 50'den çok SNP belirlenmiştir. *MDR1* gen bölgesinde yer alan polimorfizmler P-gp aktivitesini ve gen regülasyonunu düzenleyerek yapısal düzenlemeleri yapar (Wang LH ve ark., 2013).



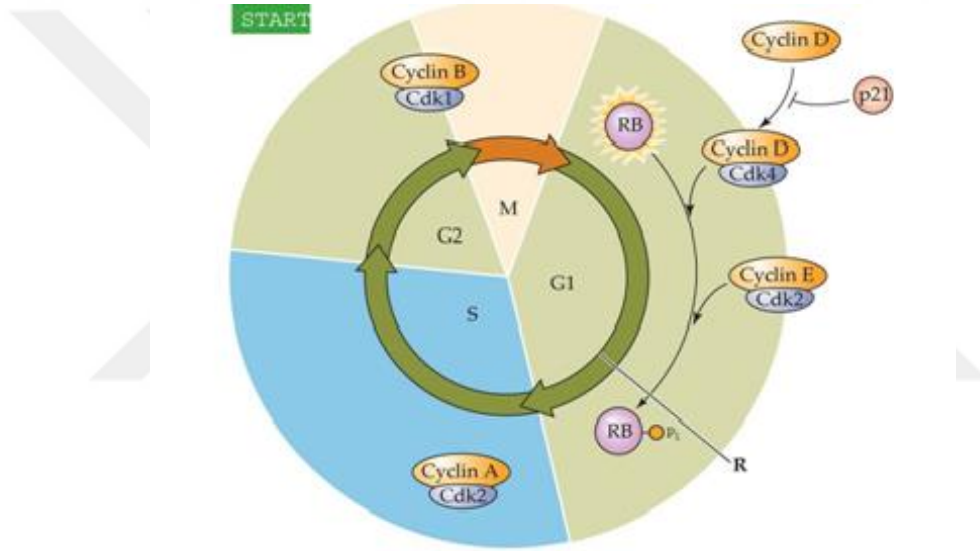
Şekil 3.3: *MDR1*'in rolünün gösterimi (Cario E, 2017).

3.4. *p53* Geni

p53 geni; 17. kromozomun p kolunda yerleşen (17p13.1) bir tümör supresor bir gendir. DNA sentez ve tamiri, gen transkripsiyonu ve apoptoz gibi önemli biyolojik aktivitelerde görev alır. Birçok kanserin temelini *p53* gen mutasyonu oluşturmaktadır (Yamada Y, 1991). Normal koşullarda inaktif halde bulunan *p53* geni DNA hasarı ile aktifleşir. *p53* geni DNA transkripsiyonu üzerinde etkisi bulunan birçok genin ekspresyonunu düzenler. *p53* bağlanma bölgesi (PBS) içeren genlere yaban tip *p53* geni bağlanır ve büyümeyi baskılayan genlerin ekspresyonunu uyarır. Mutasyona uğramış *p53* geninde büyümeyi baskılayan genlerin ekspresyonunda azalma ya da engelleme meydana gelir. *BCL2*, *p21*, *bax* genleri ve *GADD-45* (Growth arrest and DNA damage) bu genlerin bir kaçını oluşturmaktadır (Kastan MB ve ark., 1991).

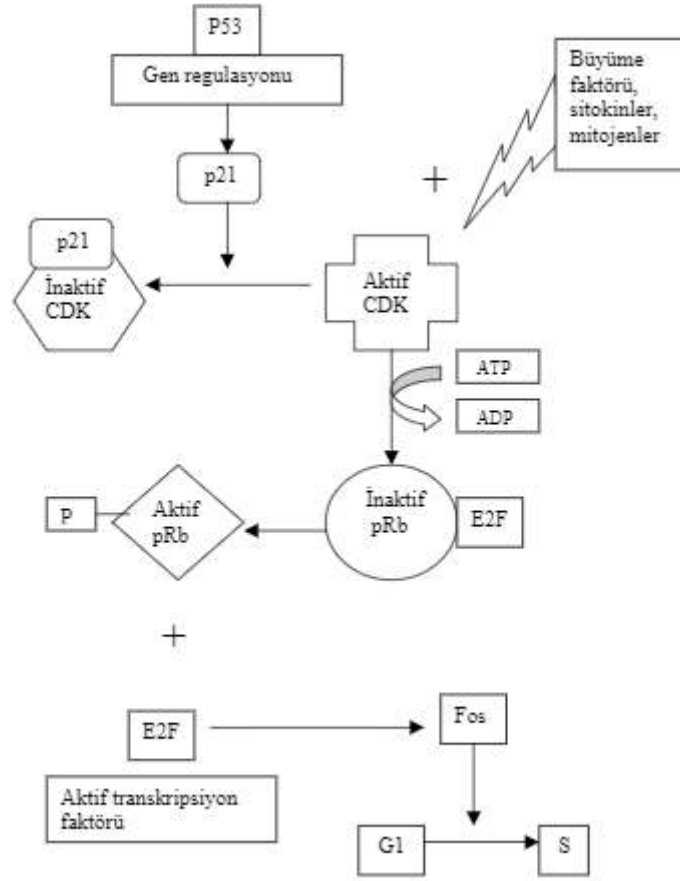
Hücre proliferasyonu hücre döngüsü boyunca kontrol altında tutulur (Vermeulen K ve ark., 2003). Hücre döngüsünün kontrolü protein kinazlar ve siklinler olmak üzere iki grup özelleşmiş proteinler ile sağlanmaktadır. Hücre döngüsünde görev alan proteinkinazlar, siklin bağımlı kinazlar olarak adlandırılırlar ve Cdk ile gösterilir. Siklin'e bağlandıklarında aktivasyonu gerçekleşen protein kinazlar, hedef proteinlerin yapısında bulunan serin,

threonin veya tirozin aminoasitlerine fosfat (P) grubu bağlayarak hedef proteinin aktivitesini değiştirirler (Vermeulen K ve ark., 2003). Cdk-siklin kompleksleri tarafından fosforlanan hedef proteinler ile hücre döngüsü kontrolü sağlanmış olur. Fosfor grubunun bağlanması ile aktif hale geçen protein görevini tamamladıktan sonra protein fosfotaz enzimi tarafından bağlandığı fosfor grubundan ayrılarak defosforilasyon gerçekleşir. Böylece hedef protein tekrar inaktif hale geçer (Bates S ve Vousden KH, 1999). Hücre döngüsü G₁, S ve G₂ olmak üzere üç evrede kontrol edilir. Her evrede görev alan siklin ve siklin bağımlı kinazlar (Cdk) vardır (Şekil 3.4). *p53*'ün hücre döngüsündeki görevleri şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve siklinler (William PK ve ark., 2004).

Hücre döngüsünde geçişleri tetikler. Retinoblastoma (Rb) fosforilasyon ile aktifleşen bir tumor supresördür. Siklin A ve B1-2, siklusa maksimum düzeye ulaşır ve S ve G2 fazları esnasında ve mitozu geçişi düzenlerler. Siklin D1-Cdk4 kompleksi G1 progresyonunu düzenler. Siklin E-Cdk2 kompleksi S fazına girişi kontrol eder. Siklin A-Cdk2 kompleksi S fazının düzenlenmesini kontrol eder. Siklin B-Cdk1 kompleksi mitozu kontrol eder. Siklin D1, E ve A p21'in G1 fazından S fazına geçişindeki engelleyici etkisini kontrol eder (Sakaguchi T. ve ark., 1998).

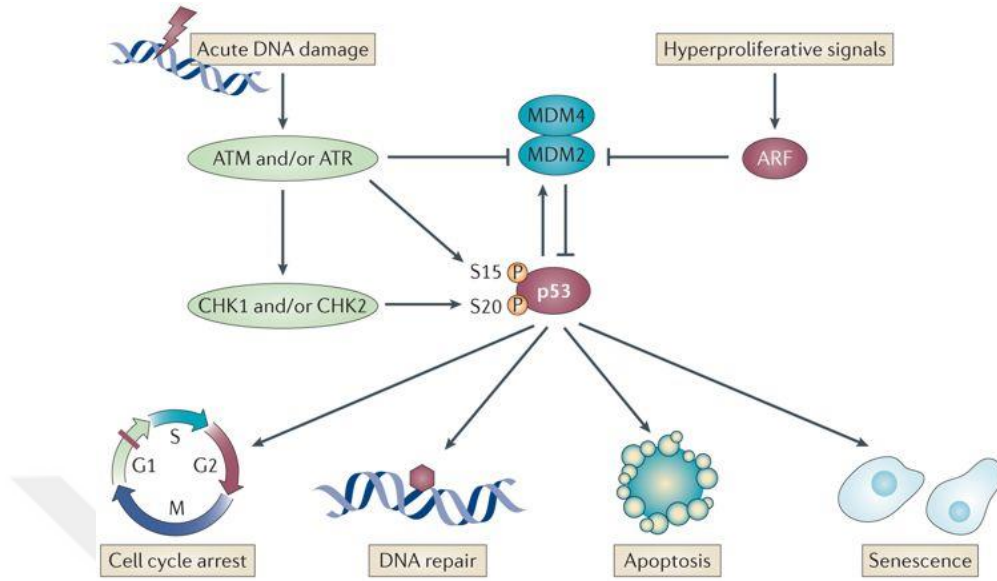


Şekil 3.5: *p53*'ün hücre siklusundaki yeri (Ulukaya E. 2001).

p21 proteinin artması *cdk*'nın kendi substratlarını fosforile etmesini önler. DNA hasarı oluşumu ile hücre döngüsünde S fazına geçiş durdurulur ve DNA hasarının giderilmesi sağlanır. G1 evresinde döngünün durması için *p21* gereklidir. *p21* bakımından eksik olan hücrelerde DNA hasarı sonrası hücre döngüsü G1 evresinde durmaz (Schmid M ve ark., 2001). Eğer hücredeki hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse *p53* apoptozu uyarak hasarlı hücreler ölür (Pompei LM ve ark., 2015).

UV ışınlar, hücresel metabolizma, zararlı kimyasallar veya hatalı DNA eşlenmesi gibi DNA üzerinde meydana gelebilecek herhangi bir hasara karşı *p53* geni aktifleşerek DNA'yı mevcut hasara karşı korur (Bieging KT ve ark., 2014). DNA hasarı uyarını ile aktifleşen *p53* geninin yanıt mekanizması şekil 3.6'da gösterilmiştir. DNA hasarı ile aktifleşen *p53* geni hasara; 1) hücre döngüsünün durdurulması, 2) DNA'nın yeniden

yapılandırılması, 3) programlı hücre ölümü (apoptozis), 4) hücre yaşlanması olarak karşılık verir (Bieging KT ve ark., 2014)



Şekil 3.6: DNA hasarı uyararı ile aktifleşen *p53* geninin yanıt mekanizması (Bieging KT ve ark., 2014).

3. 5. *Primula Vulgaris*

Bitkiler, birçok medeniyetler tarafından birçok hastalığa karşı geleneksel bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Majid A ve ark., 2014). *Primula vulgaris*, *Primula* cinsine ait çiçekli bir bitkidir ve 400 ile 500 arası türden oluşmaktadır (Özkan MT ve ark., 2017).Çeşitli çalışmalarda farklı *Primula* türlerinin sitotoksik etkisi araştırılmıştır.

Demir ve arkadaşlarının yürüttükleri bir çalışmada *Primula vulgaris* çiçek ekstraktının insan serviks kanseri (HeLa) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini ve olası mekanizmalarını incelemişlerdir. *Primula vulgaris* yaprak ekstraktı HeLa hücrelerine karşı hücre döngülerini S fazında durdurduğunu ve konsantrasyona bağlı bir şekilde mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak normal fibroblast hücrelerine kıyasla apoptotik hücre sayısını indükleyerek seçici sitotoksik etkiler sergilediğini görmüşlerdir. Yapılan bu çalışma *Primula vulgaris* çiçek ekstraktının çoğalmaya karşı etkisini koyan ilk çalışma olmuştur (Demir S ve ark., 2018).

Özkan ve arkadaşlarının yürüttükleri çalışmada ise fenolik bileşikler açısından zengin *Primula vulgaris* özütünün, sünnet derisi fibroblast hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkisini araştırmışlardır. *Primula vulgaris* ekstraktının kuyruklu yıldız tahlili ile oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma da *Primula vulgaris* ekstresinin fenolik kompozisyonu, antioksidan ve antigenotoksik etkisi üzerine yapılan ilk çalışma olmuştur (Özkan MT. ve ark., 2018).

3.6. Sisplatin ve Serviks Kanseri Tedavisi

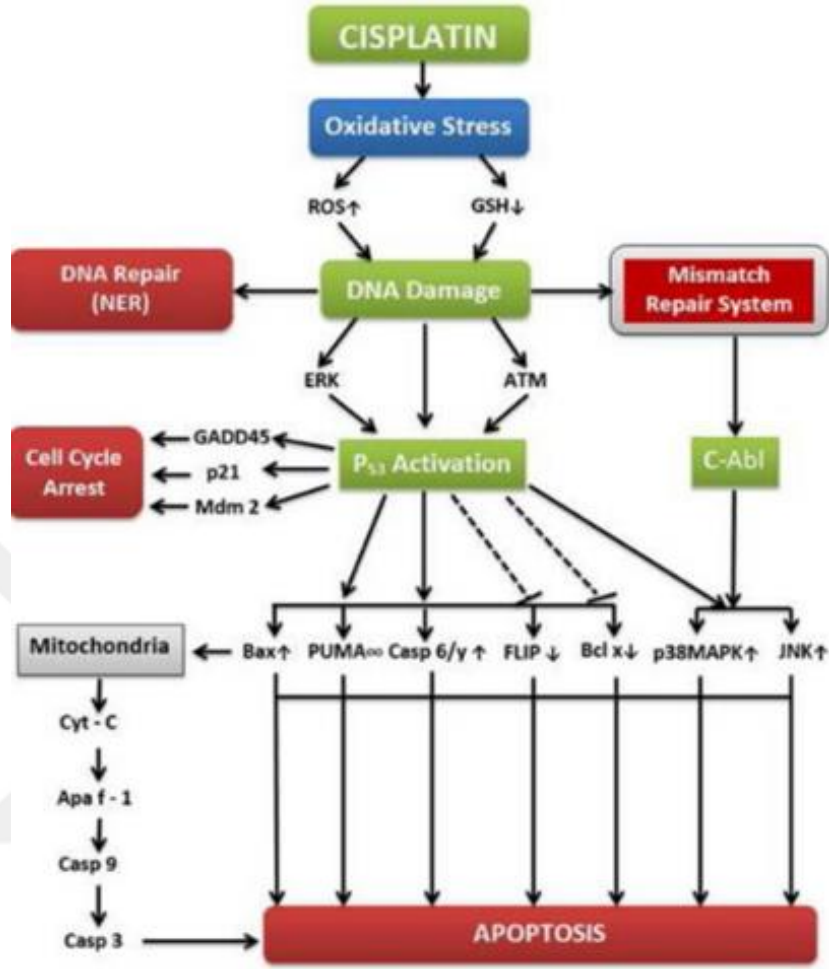
İlerlemiş veya yineleyen serviks kanseri tanısı konulan hastalar kötü prognoza sahiptirler ve hastaların %20'sinden azı bir yıl hayatta kalabilmektedir (Moore D.H. ve ark., 2004). Sisplatinin antitümör etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Vücut sıvılarına ve tüm dokulara hızlı dağılmasına rağmen kan-beyin bariyerine geçişi zordur. Vücutta beyin omurilik sıvısında (BOS) çok az miktarlarda bulunur (Ruggiero A. ve ark., 2013).

Sisplatin; bakteri büyümesini engelleyen, küçük moleküllü platin bileşiğinden oluşan kemoterapötik bir ajandır. Oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı/turuncu renkte kristal tozdur. Suda iyi çözünmez. Normal sıcaklıklarda ve basınç altında stabil olarak bulunur. Hücre dışında inaktif olarak bulunan sisplatin hücreye girdiğinde aktifleşir. Sitoplazmada sisplatin üzerinde bulunan klor atomları ile su molekülleri yer değiştirir. Böylece herhangi bir nükleofil ile reaksiyona girebilecek güçlü bir elektrofil oluşur. Sisplatin, pürin kalıntıları üzerindeki N7 reaktif merkezine bağlanarak kanser hücrelerinde DNA hasarına neden olur ve hücre büyümesini engelleyerek, apoptoza neden olur (Şekil 3.7) (Johnstone TC ve ark., 2014).

Sisplatin; germ hücreli tümörler, sarkom, lenfoma ve karsinoma gibi birçok kanser türüne karşı etkilidir. Sisplatin, yaygın olarak kullanılan veya göğüs, testis, yumurtalık, servikal, prostat, baş ve boyun, mesane, akciğer ve refrakter Hodgkin dışı lenfomalar dahil olmak üzere çeşitli malignitelerin tedavisinde önemli bir kemoterapötik ajandır. Ayrıca carboplatin, paklitaksel ve bevacizumab ile beraber kombinasyonel tedavide sıklıkla kullanılmaktadır (Marquina ve ark., 2018).

İlk olarak 1844'te M.Peyrone tarafından sentezlendi ve kimyasal yapısı 1893'te A. Werner tarafından açıklandı. 1965'te Rosenberg'in gözlemleri sonucu platin ağ elektrotlarının bazı

elektroliz ürünlerinin *Escherichia coli* bakterisindeki hücre bölünmelerini engellediği gözlemlendi (Rosenberg B ve ark., 1965).



Şekil 3.7: Kanser tedavisinde sislptinin moleküler mekanizmasının şeması (Dasari S ve Tchounwou PB, 2014).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

1. RPMI-1640 medyum (HyCloneTM lot:AE28955304)
2. FBS (Fetal Bovin Serum Capricorn scientific Lot: CP18-2144)
3. Penicilin-Streptomycin Solution (HyCloneTM lot:SV30010)
4. Trypsin-EDTA (HyCloneTM Lot:CP18-2218)
5. DMSO (Dimethyl sulfoxide Lot: 8K57494)
6. WizPrepTM Total RNA Mini Kit (Tissue) (Wizbiosolutions Lot:2D0718-26)
7. RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (thermoscientific Lot: 00645333)
8. SensiFASTTM SYBR No-ROX Kit (Lot: SF581-B066180)
9. 2-Mercaptoethanol (for synthesis Germany Lot: S7573840 910)
10. Laminar Akımlı Kabin (Alpina Bio190 Biyogüvenlik Kabini Class II 187 cm)
11. Karbondioksit (CO₂) Etüvü (n-biotek NB-203XL)
12. Steril tek kullanımlık T-75 cm² Flask (Lot: 9020711, Germany)
13. 15 cm santrifüj tüpleri (Isolab, non-steril, Germany, Lot: CTPPN9015002)
14. 50 cm santrifüj tüpleri (Isolab, steril, Germany, Lot: CTPPN9015001)
15. Otoklav (Alp)
16. Everest Ultrasonic CleanEx 401
17. Santrifüj cihazı (Hettich Santrifügen Universal 320 R)
18. Mikro-santrifüj cihazı (Microfuge 20R centrifuge, Beckman Coulter)
19. -20 Derin Buzdolabı (Siemens)
20. Buzdolabı (Siemens)
21. -80 Derin Dondurucu (Thermo Scientific Forma 700 Series)
22. qPCR (LightCycler^R 480 II)
23. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Everest Ultrasonic)
24. İnverted Faz Kontrast Mikroskop (Olympus Corporation)
25. Elektronik Pipet Seti (Thermo)
26. Pipet Ucu (Thermo)
27. Etüv (Mettler IN110)

28. Mikrovölüm Spektrometre (Jenway Genova Nano)
29. iCELLigence Sistemi (ACEA Biosciences)
30. 225 mm Cam pipet (ISOLAB Lot: 002.R.0)
31. E-Plate L8 (ACEA Lot: 20160348)
32. Beyaz 96 Kuyucuklu Plate (LightCycler 480 Lot:16021520)
33. PCR tüp 0,2 ml (İSOLAB Lot:PCPPS8002001)
34. Filtre 33mm (MILLEX-HA Lot: R4PA22811)
35. Nuclease Free Water (Thermo Scientific,Litvanya Lot: 00660702)
36. Yıkama Şişesi 500ml (İSOLAB Lot: WBPEN5500002)

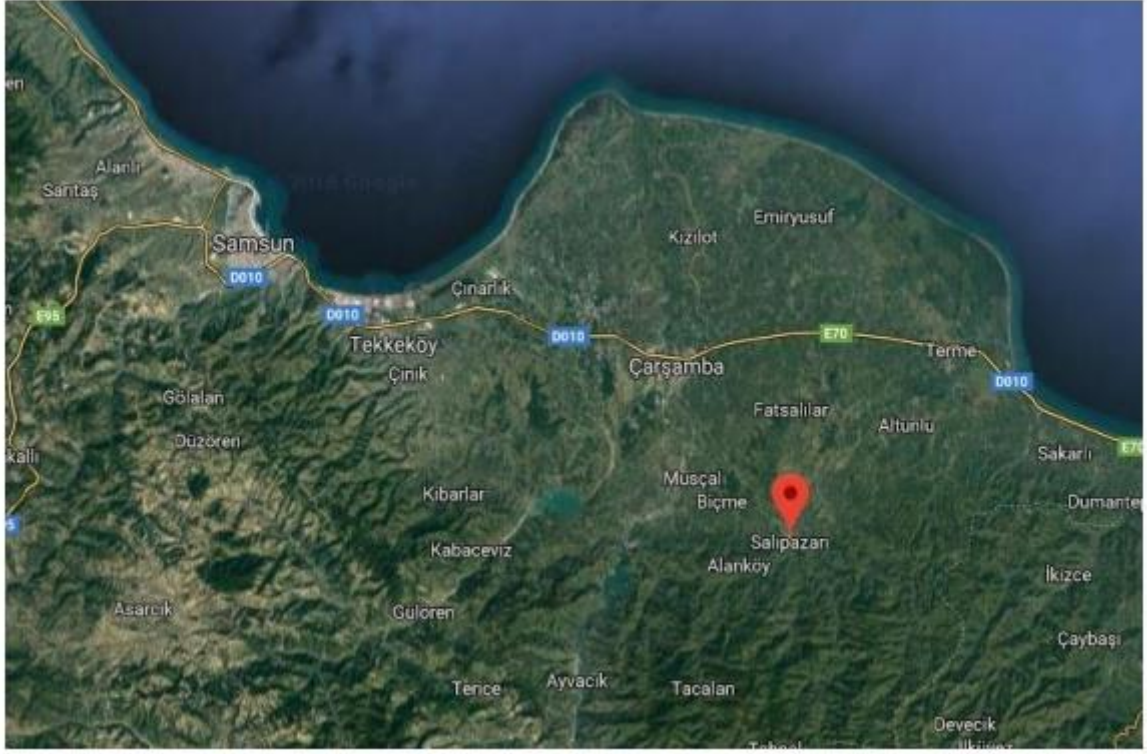
4.2. YÖNTEM

4.2.1. Hücre ve Özellikleri

HeLa (ATCC® CCL-2™) epitel hücrelerden ve adenokarsinomalardan türevlenen insan servikal kanser hücre hattıdır (Lucey BP ve ark., 2009). Çalışmamızda, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalından temin edilen insan serviks epiteloid karsinom hücre hattı olan HeLa hücreleri kullanıldı.

4.2.2. Bitki Materyali ve Yeşil Sentez Yöntemiyle Sentezlenmiş *Primula Vulgaris* Yüklü Nanoparçacıkların Eldesi

Bu çalışmada kullanılan *Primula vulgaris* bitki örnekleri 2019 yılı ilkbahar mevsiminde Samsun'un Salıpazarı ilçesinden Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Burcu Yazıcı tarafından toplanan toplanmıştır. İlçenin konum bilgisi şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: *Primula vulgaris* bitkisinin toplandığı bölge.

4.2.3. *Primula Vulgaris* Yüklü Gümüş Nanopartiküllerin (PVLAgNPs) Sentezi

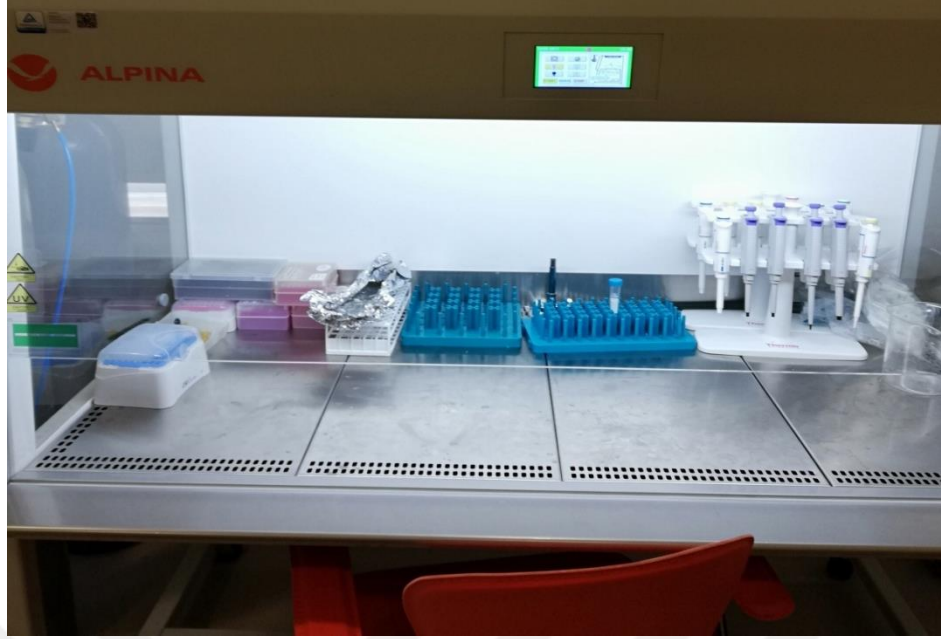
10 ml *Primula vulgaris* ekstraktına kademeli olarak çeşitli konsantrasyonlarda (10^{-4} ila 10^{-2} M) 90 ml AgNO_3 solüsyonu eklendi. Daha sonra 24 saat ışıksız (25°C) saklandı. Ardından makroskopik olarak numunelerin renginin kahverengiye döndüğü görüldü. Renk değişimi, AgNP'lerin oluşumunu kanıtlar. İndirgenmiş AgNPs çözeltileri falkon tüplerine aktarıldı ve 4500 rpm'de 1 saat santrifüjlendi. Santrifüjlemeden sonra (Beckman Coulter, Microfuge 20R), falkon tüpleri üzerindeki sıvı kısım atıldı ve tüpün dibinde biriken ıslak katı numune eppendorf tüplerine aktarıldı. PVLAgNPs numuneleri liyofilizasyon (Labconco, Freezone Plus) işleminden sonra katı olarak elde edildi. Hücre kültürü çalışmaları için, çiçeklerin ve yaprakların her birinden elde edilen 25 mg PVLAgNP tartıldı, volümetrik şişelere ilave edildi ve son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı. Böylece, 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda PVLAgNPs çözeltileri elde edildi. Çözeltiden 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda farklı dozlar (25 ile 125 $\mu\text{g/ml}$) kullanıldı ve hücrelere 2 tekrarla uygulandı. Nihai hacimler, hücre ortamı ile 600 μl ' ye tamamlandı. Şekil 4.2'de PVLAgNP'ler gösterilmiştir.



Şekil 4.2: PVLA_gNP'ler.

4.2.4. HeLa Hücre Hattı Kültürü

Hücre kültürüne başlamadan önce; RPMI-1640 (+25mM HEPES,+L-Glutamine) medyumuna+ %10 Fetal Bovin Serum (FBS)+ %1 Penisilin/Streptomisin içeren besiyeri steril şartlarda UV kabin içerisinde hazırlandı. Şekil 4.3'de hücre kültürü deneyinin yapıldığı kabin gösterilmiştir. Şekil 4.4'de besiyerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler gösterilmiştir.



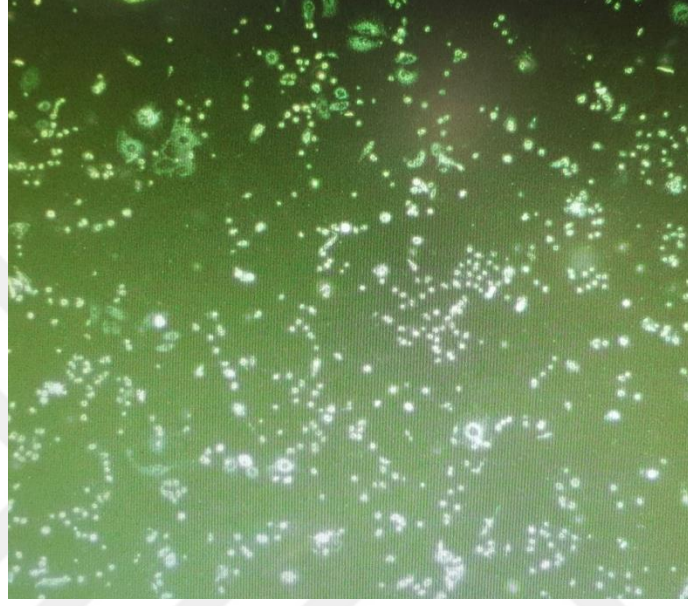
Şekil 4.3: Hücre kültürü deneylerinin yapıldığı kabin.



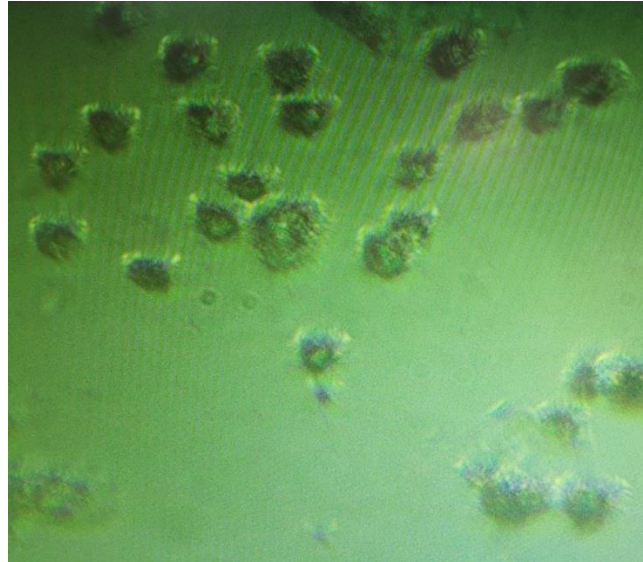
Şekil 4.4: Besiyerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler. Soldan sağa doğru; Penisilin-Streptomisin solüsyonu (PBS), Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640 Medium.

Dondurulmuş hücreler kademeli olarak çözülerek hazırlanmış olan besiyeri ile birlikte T-75 cm²'lik flask içerisine steril cam pipetler yardımıyla her flaskta 15 ml besiyerini geçmeyecek şekilde alındı. Hücrelerin flaskta ekiminin ardından hücrelerin durumları invert

mikroskop ile kontrol edildi ve ardından flasklar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonra hücrelerin zemine yapışmasını gözlemlemek için invert mikroskopta ilk görüntüleme yapıldı. Şekil 4.5'de ekim işlemi sonrası hücrelerin invert mikroskopta ilk görüntüleri gösterilmiştir (x10). Hücre kültürü besiyeri 2 gün ara ile hücre çoğalma durumuna göre değiştirildi. Şekil 4.6'da bir günlük HeLa hücrelerinin invert mikroskopta görüntüleri verilmiştir (x40).



Şekil 4.5: Ekim işlemi sonrası hücrelerin invert mikroskop altında görüntüsü (x10).



Şekil 4.6: HeLa hücrelerinin invert mikroskopta görünümü (x40, 1.Gün).

4.2.5. HeLa Hücre Hattının Pasajlanması

Flask yüzeyindeki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştınca hücreler klasik tripsinojen yöntemi ile pasajlandı. Şekil 4.8'de ekimin dördüncü gününde %100 doluluğa ulaşmış HeLa hücrelerinin invert mikroskopta görüntüsü verilmiştir (x40). Kültür flaskı içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 75 cm²'lik kültür flaskı içerisine 5 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ilave edildi ve hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dk bekletildi. İvert mikroskopta hücrelerin yüzeyden tamamen kalktığı görüldü. Tripsin-EDTA'nın hücrelere zarar vermesini önlemek amacıyla tripsin-EDTA'nın iki katı (10ml) kadar (2:1) besiyeri eklenerek tripsinin etkisi inaktif hale getirildi. Flask içerisindeki kalkmış halde bulunan hücreler besiyeri (10ml) ve tripsin (5ml) içeriği ile 15 ml'lik falkon tüplerine alındı. 10 dk'da 1200 rpm'de santrifüj edildikten sonra supernatant kısım çöken hücrelerden uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 2 ml besiyeri eklendi. Yavaş, dikkatli ve nazik bir şekilde pipetaj yaparak pelletin çözünmesi sağlandı. Diğer deneylerin gerçekleştirmek ve yeterli miktarda hücre eldesi sağlamak için alt pasajlar yapılarak üretildi. Hücreler yaklaşık olarak beş günde bir pasajlandı. Şekil 4.7'de iki günlük HeLa hücrelerinin invert mikroskopta görüntüsü (x40) verilmiştir.



Şekil 4.7: HeLa hücrelerinin invert mikroskopta görüntüsü (x40, 2. Gün).



Şekil 4.8: %100 doluluğa ulaşmış HeLa hücre hattının invert mikroskopta görüntüsü (x40, 4. Gün).

4.2.6. iCELLigence Sistemi ile Hücre Sayısının Optimizasyonu

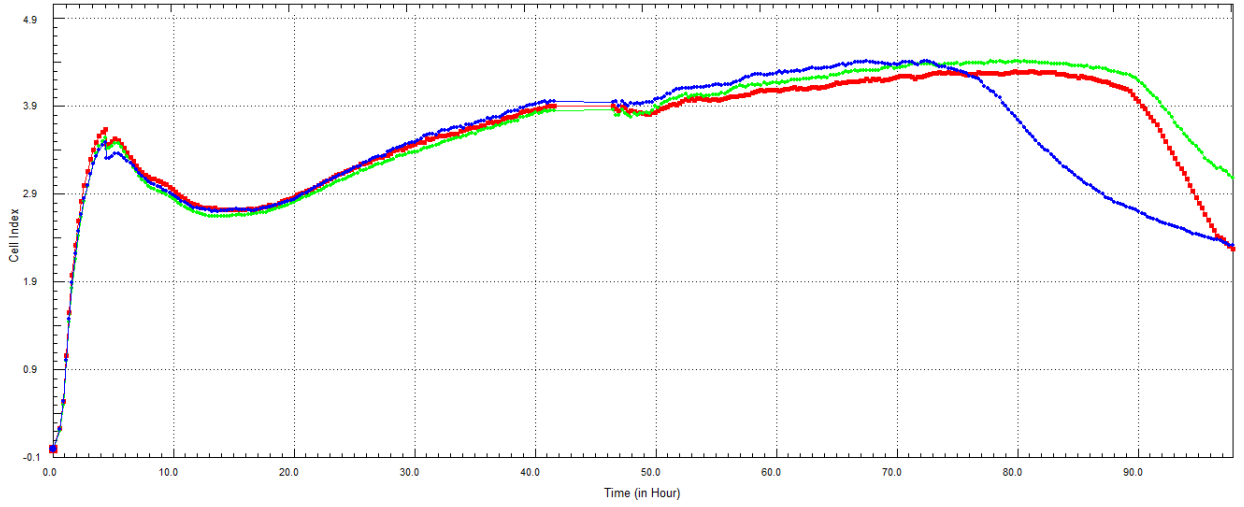
iCELLigence, maddelerin hücre üzerindeki sitotoksik etkilerin, hücre çoğalması ve ölümünün gerçek zamanlı olarak istenilen süreler ile takip edilmesini sağlayan gelişmiş bir hücre analiz sistemidir (Türker Şener L ve ark., 2017). Şekil 4.9’da iCELLigence sistemi ve hücre canlılığı takibi gösterilmiştir. iCELLigence sistemi için en uygun HeLa hücre sayısını belirlemek amacıyla thoma lamında hücre sayım işlemi yapıldı. Her kuyuya 1×10^4 , 2×10^4 ve 3×10^4 hücre/ml hücre konarak hücre canlılığı optimizasyonu yapıldı. Şekil 4.10’da e-platelerin kuyularına hücre ve besiyeri ekim işlemi gösterilmiştir. Şekil 4.11’de göstermiş olduğumuz HeLa hücre canlılığı optimizasyonunda iCELLigence sistemi için en uygun hücre sayısının 2×10^4 hücre/ml olduğu belirlenmiştir. Hücre sayısının belirlenmesinin ardından PVLAGNP’lerin moleküler ve kimyasal etkilerini araştırdığımız her bir madde için muamele saati, uygun dozu ve en uygun cevap alınacak hücre indeksi zamanı belirlendi.



Şekil 4.9: iCELLigence sisteminde hücre canlılığı takibi



Şekil 4.10: iCELLigence sistemine yüklenecek e-plate kuyucuklarına hücre ve besiyeri ekimi.



Şekil 4.11: iCELLigence sisteminde HeLa hücre canlılığı optimizasyonu. Yeşil: 10.000 hücre/ml, Kırmızı: 20.000 hücre/ml, Mavi: 30.000 hücre/ml.

4.2.7. iCELLigence Sisteminde HeLa Hücrelerine PVLAgNP'lerin Uygulanması

Pasaj işlemi tamamlanan hücreler sayımı yapıldıktan sonra E-plate'in kuyucuklarının her birine 250 µl besiyeri eklendi. E-plate'ler iCELLigence sistemine konularak sistemin elektrik bağlantısı kontrol edildi ve arka plan ölçümü yapıldı. Arka plan ölçümünden sonra her kuyucukta 20.000 hücre/ml olacak şekilde hücre ekim işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin zemine çökmesini sağlamak için toplamda 30 dk oda sıcaklığında plateler bekletildi. 30 dk'nın sonunda plateler tekrar sisteme yerleştirildi ve 96 saat boyunca her 15 dk'da bir ölçüm yapacak şekilde sistem başlatıldı. 20. saatte madde ilaveleri yapılmak üzere plateler sistemden çıkarıldı. Birinci plate'in ilk iki kuyucuğa 25 µg/ml, 3. ve 4. kuyucuğa 50 µg/ml, 5. kuyucuğa 75 µg/ml, 6. ve 7. kuyucuğa 100 µg/ml, 8. kuyucuğa 125 µg/ml *Primula vulgaris* bitkisinin çiçeğinden elde edilen çiçek özütü ve toplamda 450 µl besi yeri olacak şekilde madde ilavesi yapıldı. İkinci plate'in ise ilk iki kuyucuğuna 25 µg/ml, 3. kuyucuğa 50 µg/ml, 4. kuyucuğa 75 µg/ml, 5. kuyucuğa 100 µg/ml, 6. kuyucuğa 125 µg/ml *Primula vulgaris* bitkisinin yaprağından elde edilen yaprak özütü eklendi. İkinci platede son iki kuyucuğa hiçbir etken madde eklenmedi kontrol grubu olarak değerlendirmede kullanıldı. Şekil 4.12'deki gibi e-plate üzerindeki kuyucuklara madde ilavesi tamamlandıktan sonra

plate sistem içerisine yerleştirilerek deneye devam edildi. 96 saat boyunca yapılan hücre indeksi ölçümleriyle IC₅₀ değerleri belirlendi.

Kuyucuklar	1.PLATE	2.PLATE
A	25 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek özütü	25 µg/ml <i>P.vulgaris</i> yaprak zt
B	25 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek özütü	25 µg/ml <i>P.vulgaris</i> yaprak zt
C	50 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek özütü	50 µg/ml <i>P.vulgaris</i> yaprak zt
D	50 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek özütü	75 µg/ml <i>P.vulgaris</i> yaprak zt
E	75 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek özütü	100 µg/ml <i>P.vulgaris</i> yaprak zt
F	100 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek özütü	125µg/ml <i>P.vulgaris</i> yaprak zt
G	100 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek zt	Kontrol grubu
H	125 µg/ml <i>P.vulgaris</i> iek zt	Kontrol grubu

şekil 4.12: E-plate dizaynı.

4.2.8. RNA İzolasyonu

4.2.8.1. RNA İzolasyonu Öncesi ve Sonrası Kullanılan Cihazlar

1. Buzdolabı (İsviçre, Roche LightCycler 480)
2. -80 Derin Dondurucu (ABD, Thermo Scientific)
3. Mikrosantrifüj (ABD, Beckman Coulter, Microfuge 20R)
4. UV Kabin (Alpina Bio190 Biyogüvenlik Kabini Class II 187 cm)
5. Thermo Scientific™ Finnpiptette™

4.2.8.2. RNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Wizprep™ Total RNA Mini Kit (Tissue)
2. RL Buffer – Homejenizatör Solüsyonu
3. W1 Buffer – Yıkama Tamponu1
4. W2 Buffer - Yıkama Tamponu2
5. RNase-Free Water
6. β -mercaptoethanol
7. %70 Ethanol

Toplam RNA hücrelerden Wizprep™ Total RNA Mini Kit (Tissue) protokolüne göre izole edildi.

1. Hücrelerin üzerine 500 μ l RL Buffer ve 5 μ l β -mercaptoethanol eklendi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi.
2. Süspansiyon 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. Filtreli tüp, toplayıcı tüpün üzerine konuldu.
4. Ependorf tüpündeki sıvı, filtreli tüpe aktarıldı.
5. 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
6. Filtreli tüp atıldı.
7. Toplama tüpüne 400 μ l %70 etanol eklendi ve 5 dk pipetajla yavaşça karıştırıldı.
8. Toplama tüpü santrifüj tüpü ile birleştirildi.
9. 800 μ l'lik karışım santrifüj tüpüne alındı ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
10. Santrifüj tüpüne 100 μ l DNase I solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.

11. Santrifüj tüpüne 500 µl W1 Buffer eklendi ve 13.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi ve altta kalan sıvı kısım döküldü.
12. Santrifüj tüpüne 600 µl W2 Buffer (etanol eklenmiş olan) eklendi. 13.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Altta kalan sıvı kısım döküldü.
13. Santrifüj tüpüne 600 µl W2 Buffer eklendi 13.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi dipteki sıvı kısım döküldü.
14. 13.000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi.
15. Yeni 1.5 ml’lik tüpe santrifüj tüpü birleştirildi.
16. 50 µl RNase-Free water eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.
17. 13.000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi.
18. Santrifüj tüpü atıldı.
19. İzole edilen total RNA’lar kullanılabildiği kadar -80°C ‘de saklandı.

4.2.9. RNA’nın Kalitatif Tayini

Bu çalışmada RNA’nın kalite ölçümü için Jenway Genova cihazı kullanıldı. Cihaz açılışında öncelikle RNA analiz kısmı seçildi, ardından dalga boyu (260/280) seçildi. Güvenli bir ölçüm için saf su ile kör bakıldı. RNA’dan 2 µl pipet ile alındı. Cihazın sensör kısmına eklenip elde edilen RNA’nın kalitesine bakıldı.

4.2.10. Total RNA’dan cDNA Sentezi

Toplam RNA’dan cDNA thermoscientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak sentezlendi.

4.2.10.1 Total RNA’dan cDNA Sentezi Öncesi ve Sonrası Kullanılan Kimyasallar

1. 5X Reaction Buffer
2. RiboLock RNase Inhibitor
3. 10 mM dNTP Mix
4. RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase
5. Primer
6. Nuclease- free water

4.2.10.2.Total RNA'dan cDNA Sentezinde Uygulanan Protokol

1. IC₅₀ doz, LD₅₀ doz, Sisplatin, AgNP ve kontrol grubu olmak üzere toplamda 5 grupta yürüttüğümüz araştırmamızda; Primer + RNA + Su karışımı totalde 12µl olacak şekilde buz üzerinde karıştırıldı.

1.grup IC₅₀: 6 µl RNA + 1µl Primer+ 5 µl su

2.grup LD₅₀: 6 µl RNA + 1µl Primer+ 5 µl su

3.grup Sisplatin: 6 µl RNA + 1µl Primer + 5 µl su

4.grup AgNP: 5 µl RNA + 1µl Primer+ 6 µl su

5.grup Kontrol Hücre: 5 µl RNA + 1µl Primer+ 6 µl su

oranlarında totalde 12 µl olan karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. İkinci aşamaya geçildi.

2. Karışımın üzerine 5X Reaction Buffer 4 µl + RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl) 1 µl + 10 mM dNTP Mix 2 µl+ RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) 1 µl eklenerek totalde 20 µl olan yeni bir karışım elde edildi.
3. Karışım nazıkçe karıştırıldı ve santrifüj edildi.
4. Yeni karışım 25°C'de 5 dk, 42°C'de 60 dk inkübe edildi.
5. Sentezlenen cDNA'lar -20°C'de çalışılincaya kadar saklandı.

4.2.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Analizi

Roche LightCycler 480 cihazında kantitatif olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) reaksiyonuna alındı. Her grup için PCR cihazında 3 tekerrür çalışıldı. Çalışmada Roche LightCycler 480 II qPCR cihazına uygun SensiFAST™ SYBR^R No-ROX kiti kullanılarak basic relative quantification analizi yapılarak *BCL2*, *MDR1* ve *p53* genlerine ait anlatım seviyeleri belirlendi (Şekil 4.13). Çalışma; PVLA_{AgNP}(_e) IC₅₀ doz grubu (1.grup), PVLA_{AgNP}(_e) LD₅₀ doz grubu (2. grup), sisplatin grubu (3. grup), Çiçek ekstraktı yüklü olmayan AgNP grubu (4. grup) ve Kontrol hücre grubu (5. grup) olmak üzere toplam 5 grup üzerinde yürütüldü (Şekil 4.14; Şekil 4.15; Şekil 4.16).

4.2.11.1. SensiFAST™ SYBR^R No-ROX Kit Prosedür

1. Her bir kuyucuğa toplamda 20 µl SensiFAST™ SYBR^R No-ROX µl'lik PCR mastermix hazırlandı. 10 µl SensiFAST™ SYBR^R No-ROX Mix+ 10µM forward primer (0,8 µl) + 10 µM reverse primer (0,8µl) + 1,4 µl cDNA + 7 µl H₂O karıştırılarak 20 µl mastermix hazırlandı.
2. 96 kuyucuklu e-plate'in kuyucuklarına *BCL2*-F/R, *GAPDH*-F/R, *MDR1*-F/R ve *p53*-F/R ile toplam 20 µl'lik karışım eklendi.
3. E-plate 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. cDNA ve mastermixin dibe çökmesi sağlandı.
4. E-plate 3 adımlı döngüsünü ayarladığımız qPCR'a yerleştirildi ve analiz başlatıldı.

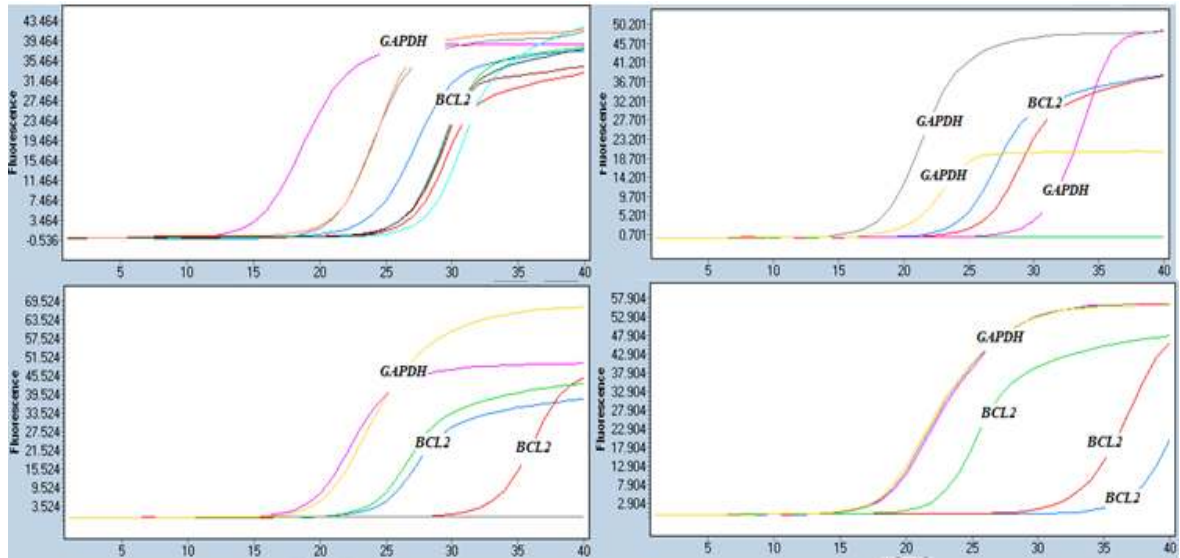
Yaklaşık bir buçuk saat süren reaksiyonun ardından spesifik gen ürünlerinin varlığı basic relative quantification analizi ile doğrulandı ve elde edilen *BCL2*, *MDR1* ile *p53* genlerine ait Ct değerleri *GAPDH* düzeylerine göre normalize edildi. Sistem üzerinden elde edilen C_t değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile değişim farklılıkları analiz edildi. *BCL2*, *MDR1* ve *p53* genlerine ait anlatım oranları referans gen olarak kullanılan *GAPDH* ile oranlanarak hesaplandı. *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizilimleri tablo 4.1'de gösterilmiştir.



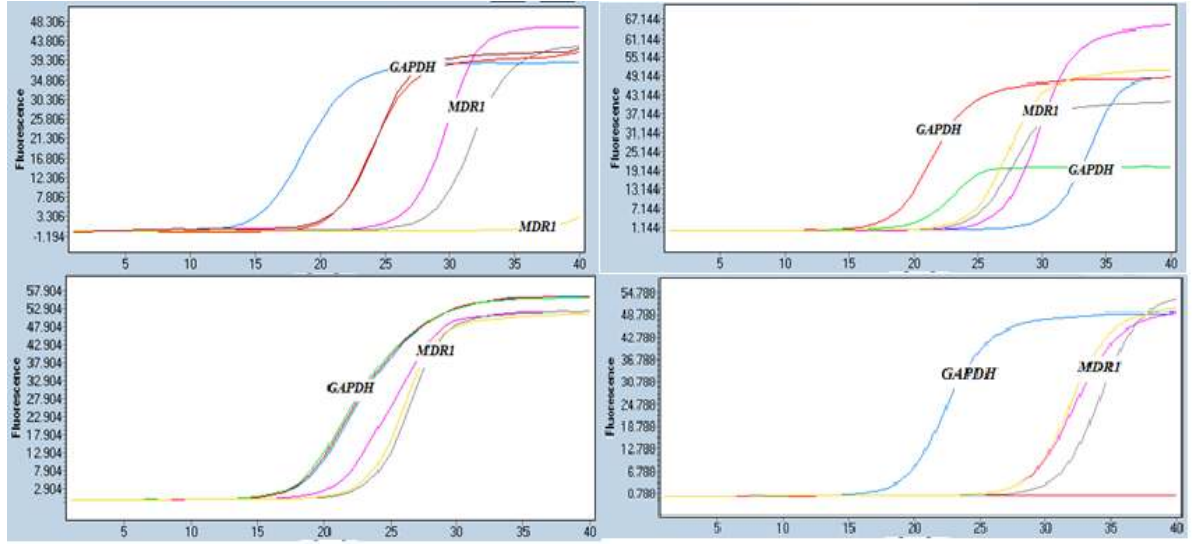
Şekil 4.13: Roche LightCycler 480 II Sistemi.

Tablo 4.1: *BCL2*, *MDR1* ve *p53* Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerlerin Baz Dizilimleri.

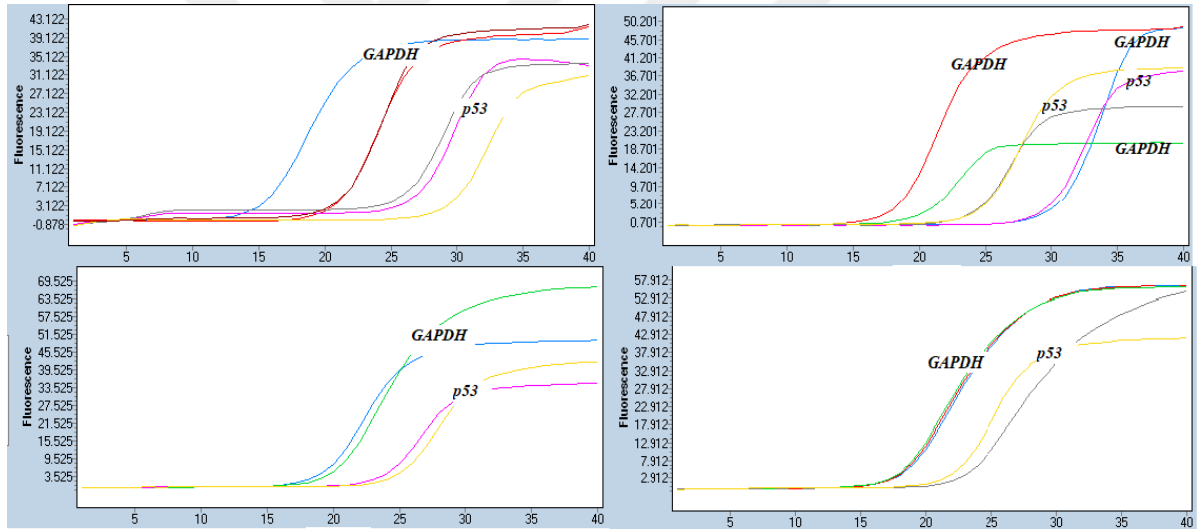
<i>BCL2</i> - F	5'-TGT TTT GAG AGC GTC AAC CG-3'
<i>BCL2</i> - R	5'- TCA GGT AGA GGC CGC ATG CTG-3'
<i>GAPDH</i> - F	5'- GTC GTA TTG GGC GCC TGG TCA-3'
<i>GAPDH</i> - R	5'- GCC AGC ATC GCC CCA CTT GAT- 3'
<i>MDR1</i> - F	5'- AAC TTC TAT CCC ACC CGA CGG- 3'
<i>MDR1</i> - R	5'- GTA CTG CAG TCA AAC AGA TGG TT-3'
<i>p53</i> -F	5'- CAC GAG CGC TGC TCA GAT AGC-3'
<i>p53</i> -R	5'- ACA GGC ACA AAC ACG CAAAA-3'



Şekil 4.14: *BCL2* gen ekspresyon çalışması pik profillerinin gösterimi.



Şekil 4.15: *MDR1* gen ekspresyon çalışması pik profillerinin gösterimi.



Şekil 4.16: *p53* gen ekspresyon çalışması pik profillerinin gösterimi.

4.3. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

PVLA $\text{AgNP}_{(\text{C-Y})}$ 'lerin hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla; iCELLigence sisteminin madde ilavesinden sonra çalışma süresi boyunca gerçek zamanlı olarak her 15 dk'da bir hesaplanmış olduğu hücre indeks değerlerinin farklı çalışma grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmasında "SPSS 21.0 Paket Programı" kullanılmıştır. Çiçek

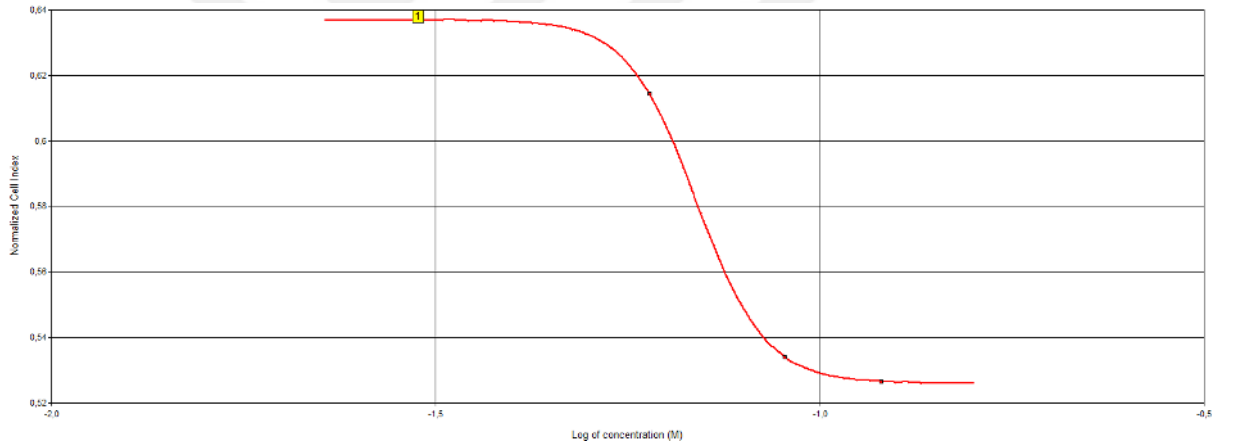
ve PVLA_{gNP(Y)}'lerin farklı dozlarda 12 ve 24 saat boyunca elde edilen hücre indeks değerleri ile kontrol hücre grubundan 12 ve 24 saat boyunca elde edilen hücre indeks değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında parametrik olmayan bir test olan “Mann Whitney U” testi kullanılmıştır. Sonuçlar $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon sonuçlarının değerlendirilmesinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılmıştır.



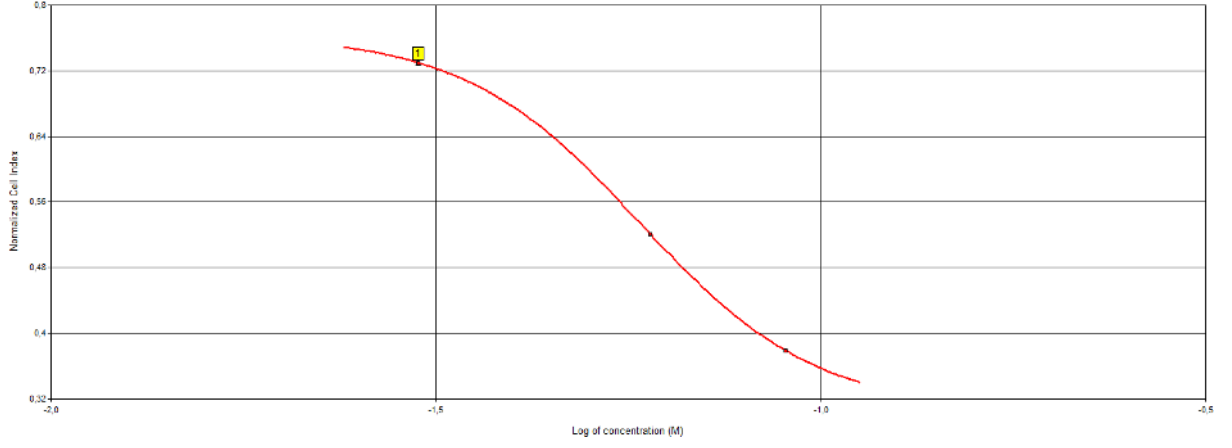
5. BULGULAR

5.1. IC₅₀ Doz Hesaplama

IC₅₀; hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitor konsantrasyonudur (Battaloğlu İnanç, 2013). iCELLigence sisteminde ekimi yapılan HeLa hücrelerine 20. saatte madde ilavesi yapıldı. Madde ilavesinin yapılmasından 12 ve 24 saat sonra (yani kültürün 32. ve 44. saatleri) Sigmoidal dose response (variable slope) yöntemiyle IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. PVLA_gNP_(C) için hesaplanan IC₅₀ değeri sırasıyla 58,39 µg/ml ve 57,65 µg/ml olarak belirlenmiştir ($r^2=1$) (Şekil 5.1; Tablo 5.1). PVLA_gNP_(Y) için hesaplanan IC₅₀ değeri ise; sırasıyla 42,14 µg/ml ve 48,50 µg/ml olarak belirlenmiştir ($r^2=1$). Normalizasyon süresi 20.saattten itibarenidir (Şekil 5.2; Tablo 5.1).



Şekil 5.1: iCELLigence sisteminde PVLA_gNP_(C) HeLa hücrelerinin IC₅₀ doz hesaplama çalışması.



Şekil 5.2: iCELLigence sisteminde PVLAgnP_(Y) HeLa hücrelerinin IC₅₀ doz belirleme çalışması.

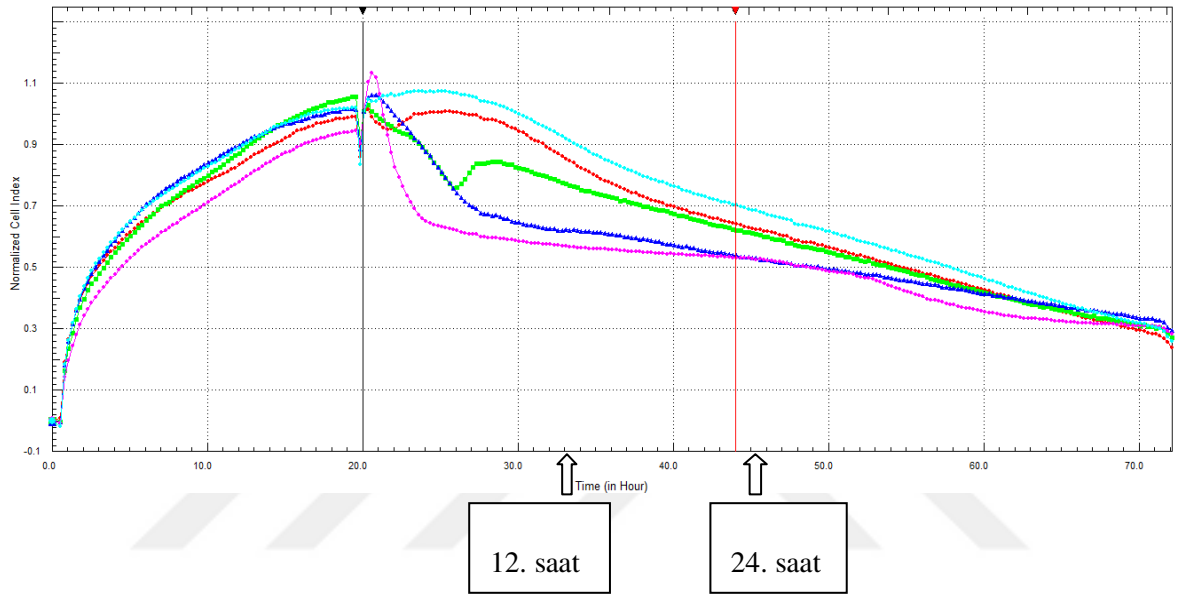
Tablo 5.1: PVLAgnP_(Ç-Y) madde ilavesinin 12. ve 24. saatlerinde hesaplanan IC₅₀ sonuçları.

	IC ₅₀ (µg/ml)	
	12. Saat	24. Saat
PVLAgnP _(Ç)	58,39	57,65
PVLAgnP _(Y)	42,14	48,50

5.1.1. PVLAgnP_(Ç)'lerin HeLa Hücreleri Üzerinde IC₅₀ Doz Belirleme Çalışması

HeLa hücrelerine; 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarda PVLAgnP_(Ç)'ler e-plate üzerindeki kuyucuklara eklenmiştir (Şekil 5.3). Hücre canlılığı optimizasyon grafiğine bakıldığında PVLAgnP_(Ç) madde ilavesi yapılan HeLa hücrelerinde; 50 µg/ml üzeri PVLAgnP_(Ç) dozu HeLa hücreleri için ölümcül seyretmektedir. Grafikte 25 µl'nin ve kısmi olarak 50µg/ml'nin kontrol hücre grubu ile aynı paralellikte çoğalmaya devam ettiklerini gözlemliyoruz. Kontrol hücre grubu ile 25, 50, 75 ve 100 µg/ml PVLAgnP_(Ç) ile yapılan IC₅₀ çalışmasında 12 saat maruz bırakılan hücre indeks değerlerinin istatistiksel karşılaştırılmaları yapıldı (Tablo 5.2). Buna göre, kontrol grubuna göre PVLAgnP_(Ç) 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml ve 100 µg/ml dozları istatistiksel olarak anlamlı seviyede HeLa

hücrelerinin çoğalmasını durdurarak ölümüne neden olmuştur ($p < 0.05$). Yine, kontrol hücre grubu ile 25, 50, 75 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ PVLA $\text{gNP}_{(\text{Ç})}$ ile yapılan IC_{50} çalışmasında 24 saat maruz bırakılan hücre indeks değerlerinin istatistiksel karşılaştırmalarının neticesinde; kontrol grubuna göre PVLA $\text{gNP}_{(\text{Ç})}$ 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$ ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozları istatistiksel olarak anlamlı seviyede HeLa hücrelerinin çoğalmasını durdurarak ölümüne neden olmuştur ($p < 0.05$).



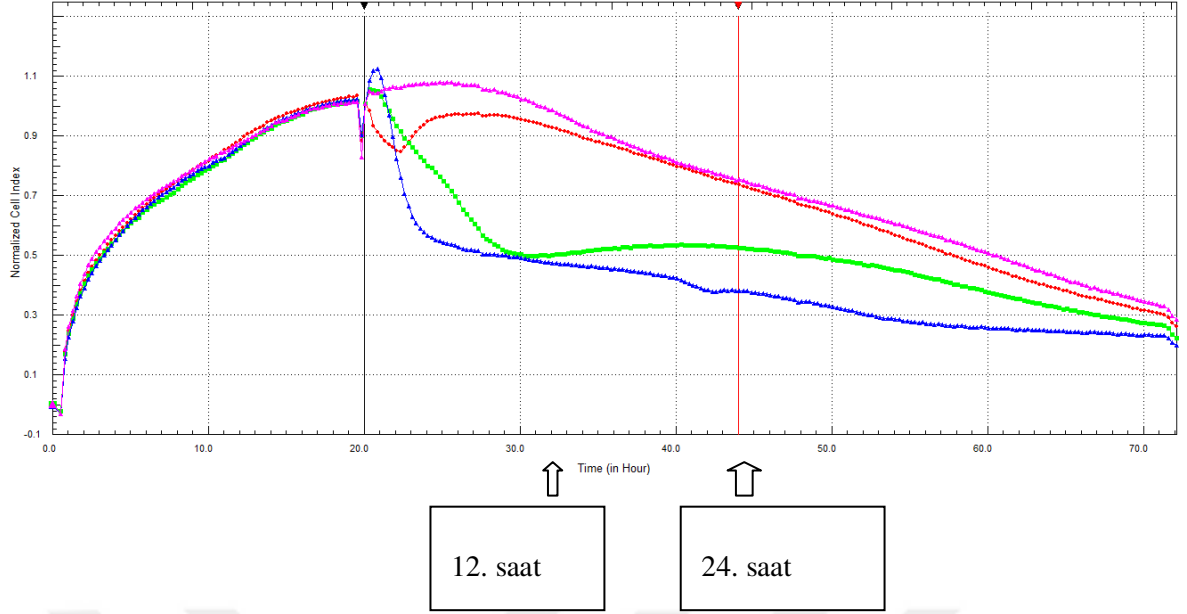
Şekil 5.3: iCELLigence sisteminde PVLA $\text{gNP}_{(\text{Ç})}$ HeLa hücrelerinin hücre canlılığı optimizasyonu. Turkuaz: Normal hücre, Kırmızı: 25 $\mu\text{g/ml}$, Yeşil: 50 $\mu\text{g/ml}$, Mavi: 75 $\mu\text{g/ml}$, Pembe: 100 $\mu\text{g/ml}$

Tablo 5.2: PVLAGNP_(Ç) ile yapılan IC₅₀ çalışmasının 12 ve 24. saat sonrası sonuçları.

	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	Normal
4. SAAT	0,9937	0,8685	0,8684	0,6438	1,0624
8. SAAT	0,9736	0,8353	0,6695	0,5906	1,0298
12. SAAT	0,8789	0,7825	0,6205	0,5698	0,94
16. SAAT	0,7643	0,7201	0,6032	0,5525	0,8343
20. SAAT	0,6905	0,6688	0,5673	0,5387	0,7555
24. SAAT	0,6487	0,6296	0,5424	0,5312	0,7079

5.1.2. PVLAGNP_(Y) 'lerin HeLa Hücreleri Üzerinde IC₅₀ Doz Belirleme Çalışması

HeLa hücrelerine; 25, 50 ve 75 µg/ml dozlarında PVLAGNP_(Y) 'lerin IC₅₀ doz belirleme çalışması sonuçlarımıza göre; 25 µg/ml PVLAGNP_(Y) ' maddesinin HeLa hücreleri üzerinde öldürücü bir etkisi olmadığı, hücrelerin kontrol hücre grubu ile aynı paralellikte çoğalmaya devam ettiği görülmektedir (Şekil 5.4). Kontrol hücre grubu ile 25, 50 ve 75 µg/ml PVLAGNP_(Y) ile yapılan IC₅₀ çalışmasında 12 saat maruz bırakılan hücre indeks değerlerinin istatistiksel karşılaştırılmaları yapıldı. Buna göre; kontrol grubuna göre PVLAGNP_(Y) 25, 50 ve 75 µg/ml dozları istatistiksel olarak anlamlı seviyede HeLa hücrelerinin çoğalmasını durdurarak ölümüne neden olmuştur (p<0.05). Yine, 24 saat PVLAGNP_(Y) 'ye maruz bırakılan hücrelerin 25, 50 ve 75 µg/ml dozlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede HeLa hücrelerinin çoğalmasını durdurarak ölümüne neden olmuştur (p<0.05).



Şekil 5.4: iCELLigence sisteminde PVLAgnP_(Y) HeLa hücrelerinin ve etken madde eklenmeyen HeLa hücrelerinin hücre canlılığı optimizasyonu. Pembe: Normal hücre, Kırmızı: 25µg/ml, Yeşil: 50 µg/ml ve Mavi: 75 µg/ml.

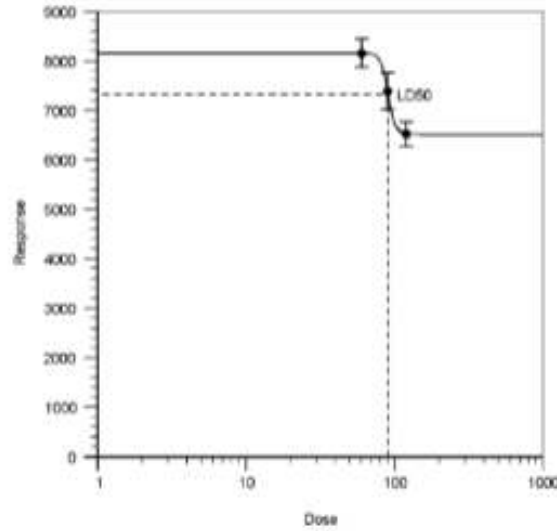
Tablo 5.3: PVLAgnP_(Y) ile yapılan IC₅₀ çalışmasının 12 ve 24. saat sonrası sonuçları.

	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	Normal
4. SAAT	0,9391	0,7936	0,5629	1,0647
8. SAAT	0,9607	0,5431	0,5	1,0451
12. SAAT	0,9187	0,496	0,4705	0,9776
16. SAAT	0,8565	0,5189	0,4518	0,8834
20. SAAT	0,7908	0,5299	0,4192	0,805
24. SAAT	0,7429	0,5253	0,3816	0,7591

5.2. LD₅₀ Doz Hesaplama

LD₅₀; belirli bir süre için bir maddenin eklenmesi ya da yutulması ile bu maddenin test edilmiş bir populasyonun yarısını öldürdüğü doz değeridir (Adamson RH, 2016). LD₅₀ değeri toksisite ile ters orantılıdır. PVLA_gNP_(Ç) LD₅₀ değeri; 75,55 µg/ml olarak belirlenmiştir.

LD50 Doz Hesaplama



Şekil 5.5: LD₅₀ doz hesaplama (<https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>).

5.3. qRT-PCR Sonuçları

Çalışma; PVLA_gNP_(Ç) IC₅₀ doz grubu (1.grup), PVLA_gNP_(Ç) LD₅₀ doz grubu (2. grup), sisplatingrubu (3. grup), Çiçek ekstraktı yüklü olmayan AgNP grubu (4. grup) ve Kontrol hücre grubu (5. grup) olmak üzere toplam 5 grup üzerinde yürütüldü. Gruplara ait ortalama Ct değerleri Tablo 5.4’de verilmiştir.

Tablo 5.4: Roche LightCycler 480 II sistemi ile analiz edilen genlerin ortalama C_t değerleri.

Genler	IC ₅₀ Dozu C_t	LD ₅₀ Dozu C_t	Sisplatin C_t	AgNP C_t	Kontrol C_t
<i>BCL2</i>	21,31	20,82	25,29	22,72	18,86
<i>MDR1</i>	25,33	20,01	17,17	23,14	17,62
<i>p53</i>	24,64	25,32	21,69	23,41	21,57
<i>GAPDH</i>	14,94	19,38	14,70	15,95	19,18

5.3.1. *BCL2* Gen Ekspresyon Sonuçları

IC₅₀ doz grubunda *BCL2* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 0,7 kat artış meydana gelmiştir (Tablo 5.5; Şekil 5.6). AgNP doz grubunda *BCL2* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 0,8 kat azalma görölmüşür (Tablo 5.5; Şekil5.6). Sisplatin doz grubunda *BCL2* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 1,3 kat azalma görölmüşür (Tablo5.5; Şekil5.6). LD₅₀ doz grubunda *BCL2* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 16,9 kat artış gözlenmiştir (Tablo 5.5; Şekil5.6).

5.3.2. *MDR1* Gen Ekspresyon Sonuçları

IC₅₀ doz grubunda *MDR1* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 1,2 kat azalma meydana gelmiştir (Tablo 5.5; Şekil 5.6). LD₅₀ doz grubunda *MDR1* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 6,5 kat artış gözlenmiştir (Tablo 5.5; Şekil 5.6). Sisplatin doz grubunda *MDR1* gen ekspresyon miktarı kontrol grubuna göre 0,3 kat artış gözlenmiştir (Tablo 5.5; Şekil 5.6). AgNP doz grubunda *MDR1* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 1,1 kat azalma görölmüşür (Tablo 5.5; Şekil 5.6).

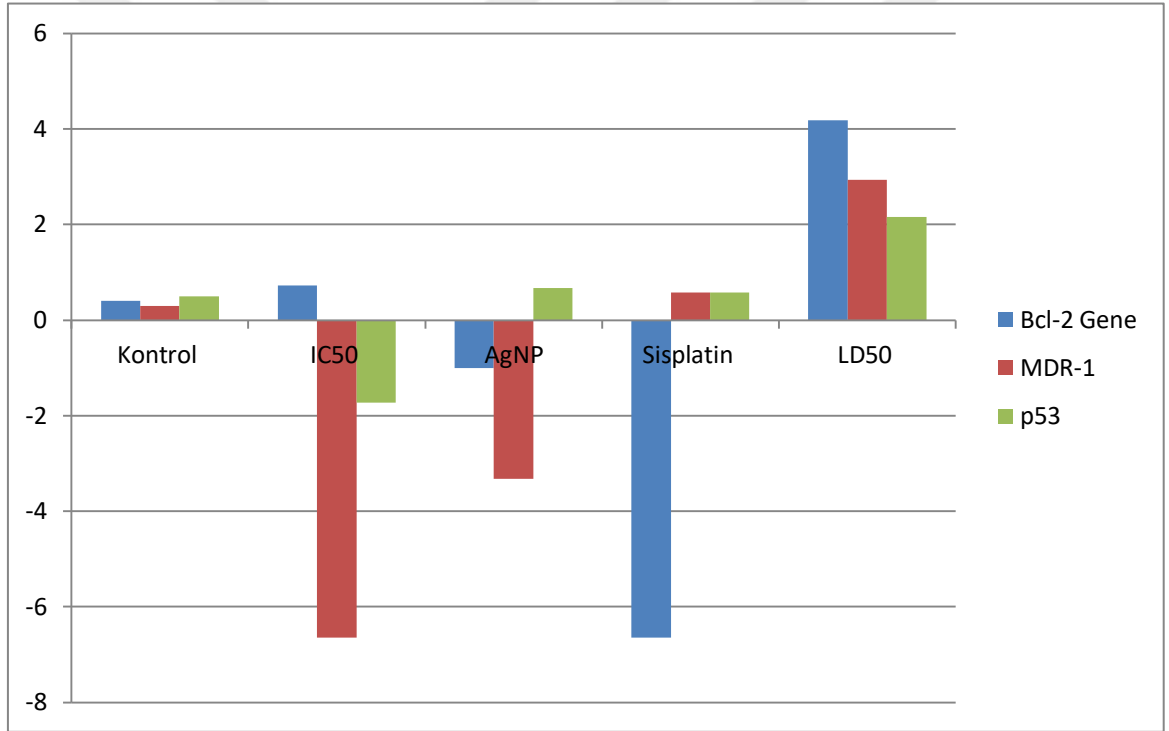
5.3.3. *p53* Gen Ekspresyon Sonuçları

IC₅₀ doz grubunda *p53* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 2,6 kat azalma meydana gelmiştir (Tablo 5.5; Şekil 5.6). Sisplatin doz grubunda *p53* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 1,4 kat azalma görölmüşür (Tablo 5.5; Şekil 5.6).AgNP doz grubunda *p53* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 1,3 kat azalma

meydana gelmiştir (Tablo 5.5; Şekil 5.6). LD₅₀ doz grubunda *p53* gen ekspresyon miktarında kontrol grubuna göre 1,6 kat artış gözlenmiştir (Tablo 5.5; Şekil5.6).

Tablo 5.5: Göreceli gen ekspresyon sonuçları.

Genler	IC50 Doz Grubu	AgNP Grubu	Sisplatin Grubu	LD50 Doz Grubu
<i>BCL2</i>	0,7	-0,8	-1,3	16,9
<i>MDR1</i>	-1,2	-1,1	0,3	6,5
<i>p53</i>	-2,6	-1,3	-1,4	1,6



Şekil 5.6: Göreceli gen ekspresyon verilerinin log2 tabanında gösterimi.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, HeLa hücre hatlarında *PVLA_gNP*'lerin hücre çoğalması ile *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi incelenmiştir. Tümörler değişik fenotiplerde ve değişik metastatik özelliklerde olabilmektedir (Pozo-Guisado ve ark., 2002). Çalışmamızda, insan serviks kanseri HeLa hücre hattı kullanılmıştır. Serviks kanseri, dünyada kadınlar arasında meme kanserinden sonra ikinci sıklıkta görülmektedir (Bray F ve ark., 2018). 2018 yılında dünya genelinde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin %7,5'si serviks kanseri kaynaklı olmakta ve her yıl tahmini yeni vaka sayısı 570.000'dir (Bray F ve ark., 2018). Birçok gelişmiş ülkede serviks kanseri nedeniyle ortaya çıkan morbidite ve mortaliteyi azaltmak amacıyla etkin tanı, tedavi ve tarama stratejileri araştırılmaktadır. Serviks kanserinin tedavisinde etkili tedavi stratejilerinin geliştirmesi hastalığa bağlı ölümleri azaltmak açısından önemlidir (Chen XF ve ark., 2016).

İnsanlığın varoluşundan itibaren bitkiler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda ise bitkilerden elde edilen etken maddelerin özellikle insan kanserlerinin tedavisinde kullanımları ve hücreler üzerinde etkilerinin araştırılmaları yaygınlaşmaktadır (Christou L ve ark., 2001, Mukherjee ve ark., 2001, Pezzutto, 1997). Günümüzde, bitkisel kaynaklı etken maddelerin kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkileri olduğu yönünde ciddi bulgular ortaya çıkmaktadır. Bitkilerden elde edilen etken maddelerin kanserli hücreler yanında, kardiyovasküler hastalıklar, prostat, depresyon, enflamasyon ve ağrı gibi hastalıkların tedavilerinde kullanılabilecekleri ile ilgili literature giderek daha da zenginleşmektedir (Iris BFF ve Sissi WG, 2011). Hem yeşil bitki ekstraktı hem de mikroorganizma kullanılarak yürütülen bir çalışmada, canlı hücrelerin metal iyonlarını indirgeyerek toksik maddelerin toksisite oranlarını azalttığı gözlemlenmiştir (Saifuddin N, 2008). 19. yy'dan beri bitki ekstraktlarının metal iyonlarını indirgeme özellikleri bilinmekte fakat indirgeme ajanlarının doğal mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Yeşil bitki ekstraktı ya da bitki dokusunun metal tuzlarını indirgediği öngörülmektedir (Çiftçi H ve ark, 2021). *Primula vulgaris* ekstraktında çözelti renginin sarıdan kahverengiye dönmesi Ag iyonlarının tek bir adımla indirgenmesiyle meydana gelir. Sonuç olarak Ag iyonlarının ve bitki ekstraktının içinde bulunduğu sıvının renginin değişmesi ile AgNP'lerin sentezi gerçekleşmiş olur (Kalimuthu K ve ark., 2008, Sastry M ve ark., 1998). Çeşitli çalışmalarda farklı *Primula* türlerinin sitotoksik etkisi araştırılmıştır

(Demir S ve ark.,2019). Literatürde; HeLa hücre hatlarında *Primula vulgaris* ekstraktının gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması bu anlamda HeLa hücre hatlarında *Primula vulgaris* ekstraktı yüklü gümüş nanopartiküllerin *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisini araştırmayı amaçlayan ilk çalışma olma özelliğindedir.

Programlı hücre ölümü anlamına gelen apoptoz (Irvine AE ve ark., 2002), hücrelerde DNA hasarı başta olmak üzere pekçok biyokimyasal veya fizyolojik olaya yanıt olarak ortaya çıkabilmektedir (Sperandio S, 2000). Parkinson, tip1 diyabet, hepatit C ve MI gibi hastalıklarda apoptoz hızlanırken kanserlerde ve otoimmün hastalıklarda yavaşladığı tespit edilmiştir (Tomatır AG, 2003). Demir ve arkadaşlarının *Primula vulgaris* çiçek ekstraktının insan serviks kanseri (HeLa) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini ve olası mekanizmalarını inceledikleri çalışmada; *Primula vulgaris* çiçek ekstraktının normal fibroblast hücrelerine kıyasla HeLa hücrelerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde mitokondriyal membran potansiyelini azalttığını, hücre siklusunun S fazında durmasını sağlayarak seçici bir sitotoksik etki ortaya çıkardığını ve apoptotik hücrelerin sayısının arttığını belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışma *Primula vulgaris* çiçek ekstraktının HeLa hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisini ortaya koyan ilk çalışmadır (Demir S. ve ark., 2018). *Primula vulgaris* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının yeşil sentez yoluyla elde ettiğimiz AgNP'lerin farklı konsantrasyonlara sahip ekstraktlarının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile 96 saatlik periyotta HeLa hücre hattı üzerine antiproliferatif etkilerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada; PVLA_{AgNP(C)} ve PVLA_{AgNP(Y)}'lerin HeLa hücre hattı üzerine doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. 96 saat boyunca yapılan ölçümlere göre; PVLA_{AgNP(C)}'lerin 12 ve 24.saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 58,39 µg/ml ve 57,65 µg/ml olarak belirlenirken, PVLA_{AgNP(Y)}'lerin 12 ve 24. saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 42,14 µg/ml ve 48,50 µg/ml olarak tespit edilmiştir. *Primula vulgaris* bitkisinin yapraklarından dimetil sülfoksit kullanılarak elde edilen ekstraktın insan kolon (WiDr), akciğer (A549), karaciğer (HepG2), meme (MCF7), ve prostat (PC-3) kanser hücre hatları üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; tüm kanserli hücre hatları üzerinde seçici bir şekilde sitotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlar ve IC₅₀ değerini 191,8-375,3 µg/ml olarak belirlemişlerdir (Demir S. ve ark., 2018). Turan ve arkadaşları *Primula vulgaris* bitkisinin yaprak ekstraktlarının insan akciğer (A549), karaciğer (HepG2), meme (MCF-7), prostat (PC-3) ve kolon (WiDr) kanser hücre hatları üzerinde normal fibroblast hücrelerine kıyasla sitotoksik etkileri olduğunu ortaya koymuş ve beş kanser hücre hattında

IC₅₀ değerinin 133,3-253,8 µg/ml arasında değiştiğini saptamışlardır (Turan İ ve ark., 2017). Özkan ve arkadaşlarının *Primula vulgaris* ekstraktının fenolik bileşik oranı ile antioksidan özelliğini belirlemek ve insan fibroblast hücre hatlarında *Primula vulgaris* ekstraktının H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarını önleyip önlemediğini saptamak amacıyla geręekleřtirdikleri çalışmada; bitki ekstresinde kumarik asit ve rutin yonunlukla bulunduğunu belirlemişlerdir (Özkan MT ve ark., 2018). *Primula vulgaris* ekstraktı antioksidan özellikli fenolik bileşiklerce çok zengindir. DNA hasarına neden olarak malign transformasyon süreçlerini başlatma potansiyeline sahip metil metanosülfonat, doksorubisin ve H₂O₂ gibi genotoksik ve teratojen özelliklere sahip kimyasal maddelere karşı primula vulgaris gibi bitkilerin ekstraktlarının tedavi amacıyla kullanılıp kullanılamayacağının belirlenmesi son derece önemli sonuçlar doğurabilecektir. Özkan ve arkadaşlarının çalışmasında hidrofobik karakterli, sitoplazma içerisine kolayca difüze olarak hidroksil radikallerinin transformasyonuna neden olan H₂O₂'nin fibroblast hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğu belirlenmiştir. DNA kırığı oluşturulan fibroblast hücre kültürlerine *Primula vulgaris* ekstraktı ilavesiyle doza bağlı olarak %16-32 oranında DNA kırıklarında azalmaların olduğu belirlenmiştir (Özkan MT ve ark., 2018). Literatür bilgileri işığında, *Primula vulgaris* iek ve yaprak ekstraktlarının HeLa hücre hatları üzerine proliferasyon profilleri ile ilgili bulgularımız daha önce geręekleřtirilen çalışmalarla uyumlu görünmektedir. Bu açıdan bakıldığında, *Primula vulgaris* iek ve yaprak ekstraktlarının kanserli hücreler üzerinde antiproliferatif etkileri olduğu görölmektedir.

Bungu ve arkadaşlarının (2006) yılında yürüttükleri çalışmada, *Tulbaghia violacea* bitkisinin yaprak ve soğan ekstrelerinin HeLa, MCF-7 ve WHCO3 hücre hatlarında 24 ila 48 saat arasında apoptozu indüklediği belirlemişlerdir (Bungu L ve ark., 2006). Özcan Arıcan ve arkadaşlarının acı iğdem (*Colchicum umbrosum* S. ve *Colchicum baytopiorum* C) bitki ekstrelerinin HeLa hücre hatları üzerinde antitümoral etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; *Colchicum baytopiorum* bitkisi ekstresinin 0,1 mg/ml konsantrasyonunda yaklaşık 48 saat içerisinde apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir (Özcan Arıcan G ve ark., 2010). Xu ve arkadaşlarının *Actinidia valvata* Dunn bitkisinden elde ettikleri korosolik asitin HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada; korosolik asitin hücreler üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu saptanmıştır (Xu Y ve ark., 2009).

Apoptoz, ölüm liganları ile tetiklenen dış (ekstrinsik) ölüm yolağı ve mitokondri yolu ile gerçekleşen iç (intrinsik) ölüm yolakları olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. İntrinsik yolakta apoptozun başlatılması için kaspaz kaskadın aktif hale gelmesi için sitokrom c'nin sitozole salınması gerekir. Apoptozda ilk evre olan sitokrom c'nin salınması, *BCL2* aile üyeleri tarafından pozitif ve negatif olarak ayarlanmaktadır. Yine, mitokondriyal geçirgenliğin düzenlenmesi ve growth faktör eksikliği, hücrede kalsiyum (Ca^{+2}) iyonunun miktarındaki artış, DNA hasarı gibi hücre için stres oluşturan uyarılara cevap olarak oluşan intrinsik mitokondriyal yolağın düzenlenmesi *BCL2* gen ailesi tarafından gerçekleşmektedir (Frenzel A ve ark., 2009; Lalier L ve ark., 2007). *BCL2* aile grubundan *BCL2*, *BCL-XL*, *BCL-W* ve *MCL-1* anti-apoptotik iken, *BAX*, *BAK*, *BID*, *BIK*, *BIM* ve *BAD* gibi genler pro-apoptotik özelliktedir (Wittmann S ve ark., 2003; Yin X ve ark., 2003). Sitokrom c'nin salınımı ile birlikte apoptozom oluşur ve kaspaz kaskad aktivasyonu meydana gelir. Ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ile *bid* proteini *t-bid* olarak kaspaz-8 aracılığıyla intrinsik apoptoz yolağı aktifleşir. *Bid* proteini intrinsik ve ekstrinsik ölüm yolakları arasında köprü görevi oluşturur (Frenzel A ve ark., 2009; Levine B ve ark., 2008; Tang DG ve Kehrer JP, 2007). *BCL2* gen aile üyelerinden *BAX*, uyarılara karşı apoptozu tetikler. *BAX* geninde meydana gelen bir mutasyon çeşitli ilaçlara karşı apoptotik cevabı ortadan kaldırmaktadır (O'Connor S ve ark., 2003). Gottardi ve arkadaşları malignant $CD5^{+}$ B hücrelerinde apoptoz kontrol mekanizmasını araştırarak *BCL2* gen ailesinin anlatımına bakmışlardır. RT-PCR sonuçlarında malignant $CD5^{+}$ B hücrelerinde *bax* geninin ekspresyonunun arttığını, çok az örnekte ise *BCL-XS* gen ekspresyonunun azaldığını saptamışlardır (Gottardi D ve ark., 1996). *BCL2* ve *BCL-XL*; kaspaz-3 ve kaspaz-7 üzerinde negatif düzenleyici etkileri ile apoptozu engellemektedir (Chang HY ve Yang , 2000). *BCL2* proteinlerindeki mutasyonlar, tümör hücrelerinin kemoterapi veya radyoterapiye olan hassasiyetlerini etkiler. *BCL2* geninin overekspresyonu sonucunda hücre gelişimi yavaşlar ve hücre ölümü gerçekleşir, anti-apoptotik fonksiyonlarda durmaktadır (Zhivotovsky B ve Orrenius S, 2009). Sitorus ve arkadaşları, retinoblastomada gerçekleşen apoptozun farklı yolaklarında rol oynayan genlerin ekspresyonlarını araştırmışlardır. Çalışmalarında 19 hastadan 10 tanesi göz içi tümörü, 9 tanesi göz dışı tümörü olarak örnek alınmış ve çalışılmıştır. Çeşitli tümörlerde apoptozun şiddeti ile *BCL2* gen ekspresyonu ters orantılı olmasına rağmen iki grup arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır. Tümörlerin hepsinde *BCL2* gen ekspresyonu aşırı artarken apoptotik hücre sayısında da artış tespit edilmiştir. Hatta, 11 tümörde *BCL2* geninin ekspresyonunun

olmadığı ve bunlardan 4 tanesinde apoptoz belirgin olarak tespit edilememiştir. Çalışmanın sonunda aşırı *BCL2* ekspresyonunun her zaman apoptozu baskılamadığı sonucuna varılmıştır (Sitorus RS ve ark., 2009). Özcan Arıcan ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları acı çiğdem (*Colchicum umbrosum* S. ve *Colchicum baytopiorum* C.D) bitki ekstrelerinin HeLa hücreleri üzerine anti-tümöral etkilerini araştırdıkları çalışmada *BCL2* ailesine ait genlerin ekspresyon durumlarına bakılmış ve MCL-1, BCL-X gen ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla artış olduğunu, *BAX*, *BAK*, *BİK* ve *BFL-1* gen ekspresyonların devam ettiği ama *BCL2* gen ekspresyonunun olmadığını tespit etmişlerdir (Özcan Arıcan G ve Dağdeviren Ö, 2010). Literatür verileri ışığında, apoptoz miktarı ile *BCL2* gen ekspresyonunun ters orantılı olduğunu ifade edebiliriz. Çalışmamızda, *BCL2* gen ekspresyonu *Primula vulgaris* çiçek ekstraktı yüklü IC₅₀ ve LD₅₀ doz gruplarında sırasıyla 0,7 ve 16,9 kat artarken, sadece AgNP ve sisplatin uygulanan HeLa hücrelerinde *BCL2* gen ekspresyonu sırasıyla 0,8 ve 1,3 kat azalmıştır. Buradan hareketle, PVLAgNP_(Ç) IC₅₀ ve LD₅₀ doz grupları ile ekstrakt yüklü olmayan sadece AgNP uygulanan gruplar arasında *BCL2* gen ekspresyonu seviyelerinde fark olması bitki ekstraktının etkilerini göstermektedir. Anti-apoptotik *BCL2* gen ekspresyonunun PVLAgNP_(Ç) dozunun artışına bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile gerçekleştirdiğimiz ve PVLAgNP_(Ç) dozunun artışına bağlı olarak hücre ölümünün artış gösterdiği sonuçlarımızla uyum göstermemektedir. PVLAgNP_(Ç) dozuna bağlı HeLa hücrelerinin ölüm oranı artmakta ve beklenilen aksine *BCL2* gen ekspresyonu seviyesinde de artış görülmektedir. *BCL2* gen ekspresyonundaki artışla ilgili sonuçlarımızı; apoptozu indükleyen kemoterapötik etkinin inhibisyonuna neden olan *BCL2* ve *BCL-XL* gen ekspresyon miktarlarının artışlarla ilgili bilgilerle (Gülyenli ve Bakar, 2019) birlikte değerlendirmek yerinde olabilecektir.

MDR1 (P-gp veya ABCB1); ABC proteininin en iyi taşıyıcısı olarak bilinir. ABC ailesinin bilinen en karakteristik özellikleri ATP bağlamalarıdır (Gottesman MM ve Pastan I, 1993). *MDR1*'in geniş substrat özgüllüğü ve taşıyıcı fonksiyonu kanser kemoterapisinde bazen problemlere neden olur (Noonan ve ark., 1990; Roninson 1992). Uzun süre kemoterapi ilaçlarına maruz kalma *MDR1*'in transkripsiyonel aktivasyonunu baskılar. Kanser hücreleri üzerinde artan *MDR1* ekspresyonu önemli miktarda antikanser ilaçların hücre dışına pompalanmasına neden olur (Yuen AR ve Sikic BI, 1994). Birçok antikanser ilaç *MDR1* için substrat özelliği taşır. Bu nedenle çok fazla sayıda antikanser ilaç uygulaması malign hücrelerde *MDR1* aktivitesini kolayca baskılayabilir (Marzolini C. ve ark., 2004). Kugawa

F ve ark. çalışmalarında HeLa hücre hattını kullanarak *MDR1* substrat/inhibitörlerinin analizini yaptıkları çalışmada HeLa hücrelerine PBK-CMV/MDR veya pBK-CMV plazmidi ekleyerek ve 4 hafta boyunca yüksek oranlarda (2mg/ml) G418 seçimi yapılmıştır. *MDR1* cDNA'nın entegrasyonunu doğrulamak amacıyla bazı HeLa hücre kolonlarından DNA saflaştırılmış ve PCR için şablon olarak kullanılmış. Çalışmada E2 ve E3 klonları açık bir şekilde PCR verdiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, PBK-CMV vektörü olmayan kontrol HeLa hücre hatlarının western blotlanmasında intrinsik *MDR1* ekspresyonu tespit edilmemiştir (Kugawa F ve ark., 2009). Kalsiyum bağlayıcı bir protein olan Sorcin indüklemesinin ortadan kaldırılması HeLa hücrelerinde *MDR1* ekspresyonunda azalışa neden olur. Söz konusu çalışmada HeLa hücreleri ve *MDR1*'i aşırı eksprese eden HeLa hücre grubunun bir alt hattı olan Hvr100-6 üzerinde sorcin protein indüklemesi üzerinde çalışmışlardır. Hvr100-6'yı, HeLa hücre hattını vinblastin sülfata aşamalı olarak maruz bırakılmasıyla elde etmişlerdir. cDNA mikrodizin analizi ile 148 genin gen ve protein ekspresyon seviyelerini analiz etmişlerdir. HeLa hücreleri ve *MDR1*'i aşırı eksprese eden Hvr100-6 hücreleri karşılaştırıldığında Cy5 / Cy3 (47) ve Cy3 / Cy5 (7) oranlarının ikiden fazla olduğunu tespit etmişlerdir. 93 gende ekspresyon seviyelerinde artış olurken sadece bir (Pleiomorphic adenoma gene-like 1) gende ekspresyon seviyesinde azalma olduğunu saptamışlardır. Sorcin, ilaç dirençli tümör hücrelerinde veya *MDR1* eksprese eden çeşitli lenfositlerde artan ekspresyon göstermektedir (Kawakami M ve ark., 2007). Twist1 ve *MDR1* ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon kanıtlayan Zhu ve arkadaşları Twist1'in HeLa hücrelerinin büyümeleri üzerine engelleyici etkili olduğunu saptamışlardır. Twist1'i susturmanın HeLa hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisini Annexin-V ve PI çift boyama yöntemi ile incelemişlerdir. Apoptotik hücrelerin %48,14'ünde, kontrol hücrelerin ise %12,86'sında Twist1 saptanmıştır. Sonuç olarak Twist1'in azalan ekspresyonu HeLa hücrelerinde büyümeyi engellediği ve apoptozu teşvik ettiği saptanmıştır (Zhu K ve ark., 2011). *MDR1* ekspresyonundaki artış serviks kanserinde görülmektedir. Ayrıca serviks kanserli *MDR1* gen ekspresyonu negatif olan bireylerin yaşam ömrünün pozitif olanlara göre daha uzun olduğu belirlenmiştir (Yang F ve ark., 2017). Yine, başka bir çalışmada invaziv karakterli ve apoptoz oranı düşük serviks kanserli hastalarda *MDR1* ekspresyon seviyesinin arttığı belirtilmektedir (Park SY ve ark., 2018). *MDR1* gen ekspresyonunun artması kanserleşmede olumsuz bir prognostik faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Han J ve ark., 2012). İnsan kanserlerinde *MDR1* gen ekspresyonundaki artış kemoterapötik ilaçlara karşı

gelişen ilaç direnci ile de sıklıkla ilişkilendirilmektedir (Liu F ve ark., 2010). Çalışmamızda, IC₅₀ doz grubu ve sadece AgNP uygulanan grupta *MDR1* ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 1,2 ve 1,1 kat azaldığı belirlenmiştir. Sisplatin uygulanan grupta *MDR1* ekspresyon seviyesinde bir değişiklik olmazken, LD₅₀ doz grubunda *MDR1* ekspresyon seviyesi 6,5 kat artmıştır. Sonuçlarımız literatür verileri ışığında değerlendirildiğinde; PVLA_{AgNP}(Ç)'lerin dozunun artmasına bağlı olarak HeLa hücre hatlarında ilaç direnci geliştiği görülmektedir. Kontrol grubuna kıyasla IC₅₀ doz grubunda *MDR1* ekspresyon seviyesi 1,2 kat azalmışken, LD₅₀ doz grubunda *MDR1* ekspresyon seviyesinin 6,5 kat artması bu fikrimize önemli bir dayanak oluşturmaktadır.

p53; kanserde apoptoz yolağında artış gösteren tümör baskılayıcı bir proteindir. *BCL2* ve *p53* apoptozun kontrolünü sağlayan önemli iki gendir. *p53*; DNA hasarlarına tepki olarak hücre ölümünü başlatır. DNA hasarlarında normal hücrelerde *p53* düzeyinde artış meydana gelerek hücre döngüsü G1 fazında bloke edilir. Hücre döngüsünün durdurulması ile DNA hasarı giderilir ve S fazına geçmeden sorun ortadan kaldırılmaya çalışılır. Eğer hücrede meydana gelen hasar büyük boyutlarda ise hücre apoptoza girer (Offer H ve ark., 2002). *p53* geninde meydana gelen bir mutasyon tümör hücrelerinde oluşan DNA hasarlarının hasarlı DNA kalıbı kullanılarak DNA çoğalması başlar (Schmid M ve Carson DA, 2001). Lu ve arkadaşları, serviks kanser hücrelerinde VTRNA2-1-5p inhibisyonu ve inhibisyonun hücre apoptozuna ve artan *p53* ekspresyonuna neden olduğunu kanıtlamışlardır. Üç servikal epitelyal hücre hattının (HeLa, SiHa ve H8), western blot yöntemi ile IHC tarafından *p53* ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Bu hücre hatlarında ilk olarak VTRNA2-1-5p ekspresyon seviyeleri belirlenmiş ve sonuç olarak H8 (HPV16 olan insan servikal mukozal epitelyum hücre çizgisi)'de HeLa ve SiHa epitelyum hücrelerine oranla daha yüksek seviyelerde VTRNA2-1-5p saptanmıştır. Toplam protein miktarları eşdeğerken (50 µg), H8 hücrelerindeki çeşitli *p53* izoformlarının seviyesi SiHa ve HeLa hücrelerinde bulunan *p53* sayısından daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak VTRNA2-1-5p'nin artan ekspresyonu rahim ağzı kanseri dokusu ve hücrelerinde, *p53* ekspresyonunda azalışa neden olmaktadır (Lu K ve ark., 2015). Serviks kanserinde Sisplatin kullanılarak yürütülen bir çalışmada ise, sisplatinin E6 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltırken *p53* ekspresyon seviyesinde artış sağladığı tespit edilmiştir (Gadek JW ve Horkya M, 2006). Normal serviks dokusunda *p53* ekspresyonu negatiftir (Wang P ve ark., 2018). Serviks kanseri olan 78 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada 48 hastada *p53* ekspresyonu pozitifken 30 hastada *p53* ekspresyonu negatif seyretmiştir. Radyoterapi hastalarda *p53* ekspresyon

seviyesinde artış sağlamaktadır (Wang P ve ark., 2018). Serviks kanserinde RT sonrası hücrelerde G1 fazında döngünün durması ve apoptozun meydana gelmesi *p53* ekspresyon seviyesindeki artış ile meydana gelmektedir (Kumar D ve ark., 2016). Serviks kanseri hastalarında % 6,6 seviyesinde seyreden *p53* ekspresyon seviyesi RT sonrası % 13,9 oranına yükselerek kanser hücrelerinin apoptoza eğilimlerini artırır (Su X ve ark., 2016).

Çalışmamızda, IC₅₀, AgNP ve Sisplatin doz gruplarında *p53* gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 2,6 ; 1,3 ve 1,4 kat azalma olduğu belirlenmiştir. LD₅₀ doz grubunda ise; kontrol grubuna kıyasla *p53* gen ekspresyon seviyesinde 1,6 kat artış olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında bir tümör süpressör gen olan *p53*'ün ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olmayan PVLA_{AgNP}(Ç)IC₅₀ dozunda HeLa hücrelerinde apoptoza neden olmazken, LD₅₀ dozundaki *p53* gen ekspresyon artışı kanser hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır.

7. SONUÇ

Çalışmamızda, HeLa hücrelerinin gerçek zamanlı analizine imkan veren iCELLigence sisteminin klasik yöntemlere oranla daha az hataya yer vermesi ve hassasiyetinin yüksek olması sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmaktadır.

PVLA_{AgNP}(Ç-Y)'lerin HeLa hücre hattı üzerinde dozla orantılı olarak hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, *BCL2*, *MDR1* ve *p53* gen ekspresyonlarının IC₅₀ ve LD₅₀ doz gruplarında sadece AgNP verilen gruplara göre farklılıklar göstermesi, *Primula vulgaris* çiçek ekstraktlarının hücreler üzerinde özgün bir etkisinin olduğunu ortaya koymaktadır.

PVLA_{AgNP}(Ç) dozundaki artışla orantılı olarak *BCL2* ve *MDR1* gen ekspresyon seviyelerindeki artışlar hücreler üzerinde bir ilaç direnci gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Söz konusu ve muhtemel etkiden sorumlu hücresel mekanizmaların aydınlatılması serviks kanserinin tedavisi amacıyla kullanılabilecek yeni bitkisel kökenli ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yeni ve daha etkili anti-tümöral ajanların bulunmasında ülkemizde yetişen endemik türlerin araştırılarak çalışılmasının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

PVLA_{AgNP}'lerin serviks kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğini belirleyebilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Primula vulgaris'in yapısında bulunan etken maddelerin daha ileri çalışmalarla tanımlanması, serviks kanserinin tedavisinde kullanımı konusunda daha detaylı ve *in vivo* araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

8. KAYNAKÇA

1. ABCB1 ATP binding cassette subfamily B member 1 [*Homo sapiens* (human)] [İnternet]. 22.11.2020 güncelleştirilmiş. [Erişim Tarihi 25.12.2019] Erişim Adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5243#location>
2. Adamson RH. The acute lethal dose 50 (LD50) of caffeine in albino rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016; 80: 274-76.
3. Akhan SE. HPV pozitifliği (%) gösteren kanser tipleri [İnternet]. 2013. [Erişim Tarihi 12.01.2020] Erişim Adresi: <https://hpv.com.tr/hpv-tipleri-neden-oldugu-hastaliklar-turkiyede-genital-sigil-ve-rahim-agzi-kanseri-sikligi/>
4. Alp Avcı G, Bozdayı G. İnsan papilloma virüsü. *Kafkas Journal of Medical Sciences*. 2013; 3: 136–44.
5. Arıcan Özcan G, Dağdeviren Ö. Acı çiğdem (*Colchicum umbrosum* S. ve *Colchicum baytopiorum* C.D.) ekstrelerinin HeLa hücreleri üzerine antitümöral etkilerinin araştırılması [yüksek lisans tezi]. Yer: İstanbul Üniversitesi; Nisan 2010.
6. Bahmanyar ER, Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Chow SN, Apter D, et al. Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. *Gynecologic Oncology*. 2012; 127(3): 440-50.
7. Baran M. Meme ve serviks kanseri konusunda kadınların bilgi ve bilinç düzeyleri (Diyarbakır İl Merkezi Örneği) [Yüksek Lisans Tezi]. Yer: İstanbul: Beykent Üniversitesi ; 2013.
8. Bates S, and Vousden KH. Mechanisms of p53- mediated apoptosis. *CMLS. Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999; 55: 28-37
9. Battaloğlu İnanç B. Bazı Bitkisel Ekstrelerin Sitotoksitelerinin Araştırılması. *Eurasian Journal of Family Medicine*. 2013; 2(2): 83-88.
10. Baykara O. Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2016;5(3):154-165 .
11. Bhatla Neerja , Daisuke Aoki , Daya Nand Sharma , Rengaswamy Sankaranarayanan. *Cancer of the cervix uteri* 2018;143(2):22-36.
12. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. 2014; 14(5): 359–370.

13. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003; 15(6): 725-31. 46.
14. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2002; 55: 244–65.
15. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2018; 68(6): 394-424.
16. Bungu L, Frost CL, Brauns C. ve Venter M. *Tulbaghia violacea* inhibits growth and induces apoptosis in cancer cells in vitro. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5(20): 1936-1943.
17. Buzin A, Pinto FE, Nieschke K, Mittag A, de Andrade TU, Endringer DC et al. Replacement of specific markers for apoptosis and necrosis by nuclear morphology for affordable cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2015; 420:24-30.
18. Campos NG, Tsu V, Jeronimo J, Mvundura M, Kim JJ. Evidence-based policy choices for efficient and equitable cervical cancer screening programs in low-resource settings. *Cancer medicine*. 2017; 6, 8, 2008-14.
19. Canavan TP, Doshi NR. Cervical cancer. *American Academy of Family Physicians*. 2000; 61(5): 1369-1176.
20. Cario Elke. P-glycoprotein multidrug transporter in inflammatory bowel diseases: More questions than answers. 2017; 23(9): 1513-1520.
21. Cervical cancer risk factors [İnternet]. 2016 [Erişim Tarihi: 20.09.2019] Erişim adresi: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cervical-cancer/risks-causes>
22. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2000; 64(4): 821-826.
23. Chaturvedi AK, "Beyond cervical cancer: burden of other HPV-related cancers among men and women," *Journal of Adolescent Health*. 2010; 46(4): S20-S26.
24. Chen X-F, Liu Y. MicroRNA-744 inhibited cervical cancer growth and progression through apoptosis induction by regulating Bcl-2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 81; 379-87.

25. Christou L, Hatzimichael E, Chaidos A, Tsiara S, Bourantas KL. Treatment of plasma cell leukemia with vincristine, liposomal doxorubicin and dexamethasone. *European Journal of Hematology*. 2001; 67; 51-53.
26. Çiftçi H, Er Çalışkan Ç, Öztürk K, Yazıcı B. Yeşil Sentez Yöntemiyle Sentezlenen Biyoaktif Nanopartiküller. *Black Sea Journal of Engineering and Science*. 2021; 4(1): 29-42.
27. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014; 740: 364-378.
28. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324: 17-27.
29. Demir S, Turan İ, Aliyazıcıoğlu R, Yaman Özer S, Aliyazıcıoğlu Y. Primula vulgaris extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervix cancer cells. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018; 8: 307-311.
30. Demir S, Turan İ, Aliyazıcıoğlu Y. Antioxidant properties of Primula Vulgaris flower extract and its cytotoxic effect on human cancer cell lines. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi* 2019; 22(1): 19-25.
31. Demirgöz Bal M. Kadınların PAP smear testi yaptıрма durumlarının sağlık inanç modeli ölçeği ile değerlendirilmesi. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2014; 4: 133–8.
32. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, worldwide, females, all ages. *Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. [İnternet]. 2018. [Erişim Tarihi: 30.12.2019] Erişim Adresi: <http://gco.iarc.fr/today/home>
33. Female reproductive system [Internet]. 2009 [Erişim Tarihi: 02.03. 2020]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR609921.jpg>.
34. Fitzmaurice C, Allen C, Barber R, Barregard L, Bhutta Z, Brenner H, et al. Global burden of disease cancer collaboration: Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology*. 2017; 3: 524-48.
35. Frenzel A, Grespi F, Chmielewski W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Springer Science*. 2009; 14: 584-596.

36. Gadek JW, Horkya M. How the Nucleolar Sequestration of p53 Protein or Its Interplayers Contributes to Its (Re)-Activation. 2006; 1: 1010.
37. Giles GG, Simpson JA, English DR, Hodge AM, Gertig DM, Macinnis RJ et al. Dietary carbohydrate, fibre, glycaemic index, glycaemic load and the risk of postmenopausal breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2006; 118(7): 1843-7.
38. Gottardi D, Alfano B, Leo AMD, Stacchini B, Rigo B, Aragno M et al. In leukaemic CD5+ B cells the expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *British Journal of Haematology*. 1996; 94(4): 612-18
39. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry*. 1993; 62: 385–427.
40. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2015; 43.
41. Gülyenli ÖD, Bakar E. Dışa Atım Pompa Sistemleri ve Bu Sistemlerin Kanser Tedavisindeki Etkinlikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*. 2019; 3(1); 54-69
42. Han J, Yu M, Dai M, Li Hongwei, Xiu R, Liu Q. Decreased expression of MDR1 in PEG-conjugated hemoglobin solution combined Cisplatin treatment in a tumor xenograft model. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2012; 40(7): 239-44.
43. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. Warner-Lambert Parke-Davis Award Lecture. *The American Journal Pathology*. 1983; 113: 414-21.
44. Iris BFF, Sissi WG. Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In: *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 1.
45. Irvine AE, McMullin MF, Ong YL. Bcl-2 family members as prognostic indicators in AML. *Hematology*. 2002; 7(1): 21-31.
46. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018; 25(1): 65-80.

47. Kalimuthu K, Babu RS, Venkataraman D, Bilal M and Gurunathan S. Biosynthesis of Silver Nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2008; 65: 150-153.
48. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. 1991; 51(23): 6304-11
49. Kaur H, Verschraegen CF. *Cervical Cancer*. Paul Silverman. *Oncologic imaging: A multidisciplinary approach*. Saunders Elsevier; 2012.
50. Kawakami M, Nakamuro T, Okamura N, Komoto C, Markova S, Kobayashi H et al. Knock-down of Sorcin Induces Up-regulation of MDR1 in HeLa Cells. 2007; 30(6): 1065-73.
51. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972; 26(4): 239- 257.
52. Kugawa F, Suzuki T, Miyata M, Tomono K and Tamanoi F. Construction of a model cell line for the assay of MDR1 (Multi Drug Resistance gene-1) substrates/inhibitors using HeLa cells. 2009; 64(5): 296–300.
53. Kumar D, Basu S, Parija L et al. Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2016; 81:31-7
54. Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, Vallette FM. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. 2007; 12:887–896.
55. Lau L, Gray EE, Brunette RL, Stetson DB. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. 2015; 350: 568-571.
56. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl2 family members dual regulators of apoptosis and autophagy. 2008; 4 (5): 600-606.
57. Li JP, Yang YX, Liu QL, Pan ST, He ZX, Zhang X et al. The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. *Drug Design, Development Therapy*. 2015; 9: 1627-52
58. Lipkowitz S. Kadın üreme sistemi [İnternet]. 2009 [Erişim Tarihi 26.12.2019]. Erişim Adresi: <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR609921.jpg>

59. Liu F, Liu S, He S, Xie Z, Zu X, Jiang Y. Survivin transcription is associated with P-glycoprotein/MDR1 overexpression in the multidrug resistance of MCF-7 breast cancer cells. 2010; 23(5): 1469-75.
60. Lu K, Hao Q, Wang Y, Zhou P, Zou B and Zhang Y. Regulation of p53 expression and apoptosis by vault RNA2-1-5p in cervical cancer cells. 2015; 22(6): 29.
61. Lucey BP, Nelson-Rees W, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells and cell culture contamination. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2009; 133(9): 1463-67.
62. Majid A, Hassan S, Hussain W, Khan A, Hassan A, Khan A at al. In vitro Approaches of Primula vulgaris Leaves and Roots Extraction against Human Pathogenic Bacterial Strains. World Applied Sciences Journal. 2014; 30(5) : 575 -80
63. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. Clinical Pharmacology&Therapeutics. 2004; 75:13–33.
64. Middleton K, Peh W, Southern S ve ark. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provide a basis for selection of diagnostic markers. Journal of Virology. 2003; 77: 10186–201.
65. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Löning T at al. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. Virchows Archiv. 2000; 437: 227-33.
66. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI ve ark. Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. 2001; 1(10): 515-519.
67. Munoz N, Castellsague X, Gonzales AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006; 24(3): 1-10.
68. Newton CL, Mould TA. Invasive cervical cancer. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine. 2017; 27(1): 7-13
69. O’connor S, Briones F, Chari NS, Cho SH, Hamm RL, Kadowaki Y ve ark. Apoptosis in action, Yin X.M., Dong Z. Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research. Humana Press Inc. 2003; 177-199.

70. Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, et al. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis*. 2002; 23(6): 1025-32.
71. Örenli G. İlköğretim ikinci kademedeki öğrenim gören kız öğrencilerin annelerinin rahim ağzı kanseri ve HPV aşısı konusunda bilgi tutum davranışları [Yüksek Lisans Tezi]. Yer: Bülent Ecevit Üniversitesi; 2015.
72. Origoni M, Salvatore S, Perino A, Cucinella G, Candiani M. Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) in pregnancy: European review for medical and pharmacological sciences. The state of the art. 2014; 18: 851-860.
73. Oyervides-Munoz MA, Perez-Maya AA, Rodriguez-Gutierrez HF, Gomez-Macias GS, Fajardo-Ramirez OR, Trevino V ve ark. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. 2018; 61: 134-144.
74. Özgül N. Türkiye'de Serviks Kanserinin Durumu ve Yapılan Serviks Kanser Tarama Çalışmaları. İçinde: Türkiye'de Kanser Kontrolü. Ankara, 2011; 379-384.
75. Özkan MT, Aliyazicioglu R, Demir S, Misir S, Turan I, Yildirmis S, Aliyazicioglu Y. Phenolic characterisation and antioxidant activity of *Primula vulgaris* and its antigenotoxic effect on fibroblast cells. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2017; 12(1): e40073.
76. Pao CC, Tsai PL, Chang YL, Hsieh TT, Jin JY. Possible non-sexual transmission of genital human papillomavirus infections in young women. 1993; 12(3): 221-2.
77. Park SY, Kim JW, Byun HJ, Lee JJ, Jeoung D, Park ST ve ark. Role of DDX₅₃ in taxol Resistance of cervix cancer cells in vitro. 2018; 506(3): 641-647.
78. Pompei LM, Cunha EP, Steiner ML, Theodoro TR, Mader AM, Petri G et al. Effects of estradiol, progestogens, and of tibolone on breast proliferation and apoptosis. *Climacteric*. 2015; 1-5.
79. Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernandez-Salguero PM. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell Cycle. 2002; 64(9): 1375-86.

80. Prof. Dr. Süleyman Engin Akhan HPV [İnternet]. 2013 [Erişim Tarihi: 12.01.2020]. Erişim Adresi: <https://hpv.com.tr/hpv-tipleri-neden-oldugu-hastaliklar-turkiyede-genital-sigil-ve-rahim-agzi-kanseri-sikligi/>
81. Rahim ağzı (Serviks) kanseri [İnternet]. 2020 [Erişim Tarihi: 04.03.2020]. Erişim Adresi: trsgo.org/menu/152/rahim-agzi-serviks-kanseri.
82. Ramael M, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. Natural history and biological behaviour of human papillomavirus: implications for cervical cancer screening. *ACTA Medica Lituanica*. 2004; 11: 1-7.
83. Robbins SL , Kumar V, Cotran R. Serviks İntraepitelyal Neoplazi ve Skuamöz Hücreli Karsinom, Serviks Tümörleri, Kadın Genital Sistem ve Meme. 2003; 7: 686-89
84. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M ve ark. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs*. 2013; 24(10):1007-19.
85. Saifuddin N, Wong CW, Yasumira AA. Rapid Biosynthesis Of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant Of Bacteria With Microwave Irradiation. *E-Journal of Chemistry*. 2008; 6(1): 61-70.
86. Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacogenetics: Fact or fiction? *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2005; 20: 391-414
87. Sakaguchi T, Watanabe A, Sawada H, Yamada Y. Prognostic Value of Cyclin E and p53 Expression in Gastric Carcinoma. *Cancer*. 1998; 82 (7): 1238-42.
88. Sastry M, Patil V, Sainkar SR. Electrostatically controlled diffusion of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles in the thermally evaporated fatty amine films. 1998; 102(8): 1404-10.
89. Schmid M, Carson DA. Cell cycle regulation and hematological disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Caller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds): *Williams Hematology*, McGraw-Hill Company, New York. 2001; (6): 131-41.
90. Schwab E.M., Fromm M.F. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003; 43: 285-307
91. Senapati R, Senapati NN, Dwivedi B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infectious Agents and Cancer* . 2016; 59: 11.

92. Sengupta P, Chattopadhyay S, Chatterjee S. G-Quadruplex surveillance in BCL2 gene: a promising therapeutic intervention in cancer treatment. *Drug Discovery Today*. 2017; 22(8): 1165-86.
93. Siegel RL, Kimberly D. Miller, Ahmedin Jemal . *Cancer Statistic*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018; 68: 7–30.
94. Sitorus RS, Gumay S, Valk P. The apoptotic paradox in Retinoblastoma. 2009; 1171: 77-86.
95. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. 2000; 97(26): 14376-81. 45.
96. Su X, Chen WJ, Xiao SW et al. Effect and safety of recombinant adenovirus-p53 transfer combined with radiotherapy on long-term survival of locally advanced cervical cancer. *Human Gene Therapy*. 2016; 27: 1008-14
97. Tang DG, Kehrer JP. *Malignant Transformation and Metastasis*. Srivastava R., Apoptosis, cell signaling, and human diseases, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. 2007, 97-117.
98. Taşkın L. Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği. Sistem Ofset Matbaacılık. 2007; 15(8): 607-616.
99. Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2003; 23: 499-508.
100. Trottier H, Burchell AN. Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics*. 2009; 12: 291–307.
101. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 1985; 229(4720): 1390-3.
102. Turan İ. , Demir S. , Aliyazıcıoğlu R. , Aliyazıcıoğlu Y *Primula vulgaris* Yaprak Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi* 2017; 20 (4), 361-367.
103. Türker Şener L, Albeniz G. , Dinç B. , Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines (Review). *Experimental And Therapeutic Medicine*. 2017; 14: 1866-1870.
104. Ueda K, DP Clark, CJ Chen, I B Roninson, M M Gottesman, I Pastan. The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. 1987; 262(2): 505-8.

105. Ulukaya E. Bölüm III. Prof. Dr. Kayıhan Engin, Prof. Dr. Nihat Özyardımcı. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2001.
106. Vermeulen K , Bockstaele VDR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation in basic and clinical sciences*. 2003; 36(3) : 131-149
107. Wang LH, Song YB, Zheng WL, Jiang L, Ma WL. The association between polymorphisms in the MDR1 gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis of 52 case-control studies. *Cancer Cell International*. 2013; 13: 46.
108. Wang P, Wenqing S, Wang L, Gao J, Zhang J, He P. Correlations of p53 expression with transvaginal color Doppler ultrasound findings of cervical cancer after radiotherapy. *Journal of the Balkan Union of Oncology*. 2018; 23(3): 769-775
109. William PK, Sadava DE, Gordon OH, Heller CH. *Life: The Science of Biology*. 2004; 7.
110. Wittmann S, Bali P, Donapaty S, Nimmanapalli R, Guo F, Huang M, Jove R, Wang HG and Bhalla K .Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cell to epothilone B-induced apoptosis. 2003; 63: 93–99.
111. Wright AA, Howitt BE, Hirsch MS. Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. 2013; 119(21): 3776–3783.
112. Xu Y, Ge R, Du J, Xin H. Corosolic acid induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspase activation in human cervix adenocarcinoma HeLa cells. 2009; 284(2): 229-37.
113. Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K. p53 Gene Mutations in Gastric Cancer Metastases And in Gastric Cancer Cell Lines Derived from Metastases. *Cancer Research*. 1991; 51: 5800-5
114. Yang F, Gao B, Li R, Li W, Chen W, Yu Z, Zhang J. Expression levels of resistant genes affect cervical cancer prognosis. 2017; 15(5): 2802-2806.

115. Yin X, Yi X, Dong Z. Inhibition of Bid-induced Apoptosis by Bcl-2tBid Insertion, Bax Translocation, And Bax/Bak Oligomerization Supressed. JBC Papers in Press. 2003; 278(19): 16992-9.
116. Yuen AR, Sikic BI. Multidrug resistance in lymphomas. Journal of Clinical Oncology. 1994; 12:2453–2459.
117. Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. Leukemia&Lymphoma. 2014; 55(9): 1980-92.
118. Zhang XJ, Mei WL, Tan GH, Wang CC, Zhou SL, Huang FR et al. strophalloside induces apoptosis of sgc-7901 cells through the mitochondrion-dependent caspase-3 pathway. Molecules. 2015; 20:5714-28.
119. Zhivotovsky B, Orrenius S. Clinical perspectives of cell death: where we are and where to go. 2009; 14: 333-335.
120. Zhu K, Chen L, Han X , Wang J and Wang J. Short hairpin RNA targeting Twist1 suppresses cell proliferation and improves chemosensitivity to cisplatin in HeLa human cervical cancer cells. 2012; 27(4): 1027-34.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Gamze DULKADİR
Doğum yeri	Kırşehir
Doğum Tarihi	07.09.1995
Uyruğu	T.C.
E-posta Adresi	gamzedlkdr@gmail.com

Eğitim Bilgileri	
	Lisans
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte	Sağlık Yüksekokulu
Bölümü	Hemşirelik
Mezuniyet Yılı	2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Tıp
Programı	Moleküler Tıp
Mezuniyet Tarihi	2021

Makale ve Bildiriler
1) IAMHC Medicine& Health Science 1st International Ahi Evran Medicine and Helath Science Congress 11-14 Eylül 2019 Kırşehir, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sözlü Sunum: Pankreas Kanserinin Tanısında MikroRNA'ların Yeri Poster Sunum: Meme Kanserinin Tanısında MikroRNA'ların Önemi 2) International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (BiotechBiochem 2020) Online 16-18 December 2020, Ankara Sözlü Sunum: HeLa Hücre Hatlarında <i>Primula Vulgaris</i> Ekstraktı Yüklü Gümüş Nanopartiküllerin <i>BCL2</i>, <i>MDR1</i> ve <i>p53</i> Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisinin Araştırılması