

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014-YL-016

**İNSAN OSTEOSARKOMA HÜCRE HATTINDA (Saos-2)
BAİCALEİN'İN 12-LOX VE 15-LOX mRNA İFADESİ VE
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Yağmur BABAT

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Celal ÜLGER

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi **Yağmur BABANT** tarafından hazırlanan "**İnsan Osteosarkoma Hücre Hattında (Saos-2) Baicalein 12-LOX mRNA İfadesi ve Apoptozis Üzerine Etkisi**" başlıklı tez, **18.04.2014** tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

| | Ünvanı, Adı Soyadı | Kurumu | İmzası |
|--------|-----------------------------|--------|--------|
| Başkan | :Prof. Dr. Muharrem BALKAYA | ADU | |
| Üye | :Prof. Dr. Celal ÜLGER | ADU | |
| Üye | :Doç. Dr. Ali ÖZMEN | ADU | |

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

18/04/2014

Yağmur BABAT

ÖZET

İNSAN OSTEOSARKOMA HÜCRE HATTINDA (Saos-2) BAİCALEİN'İN 12-LOX VE 15-LOX mRNA İFADESİ VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ

Yağmur BABAT

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Celal ÜLGER

2014, 65 sayfa

Baicalein *Scutellaria baicalensis*'ten izole edilen biyoaktif bir bileşiktir. Baicalein inflamasyon, kalp-damar hastalıklarının ve bakteriyel ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada çocuk ve erken yaş yaygın kanseri osteosarkoma dokularından kültür edilen Saos-2 hücre hattı kullanılarak baicaleinin apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır. Örnekler farklı konsantrasyonlar ve sürelerde baicalein ile muamele edildi ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Proliferasyonun belirlenmesi için MTT yöntemi kullanıldı. MTT yönteminde Saos-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda baicalein uygulaması yapıldı ve 24, 48 ve 72. saatler için veriler toplandı. Uygulama yapılan hücreler kontrol hücreleriyle kıyaslandığında baicaleinin 2 ve 4 μM 'lık konsantrasyonlarının zamana bağlı olarak canlı hücre sayısını %50'nin üzerinde azalttı. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için HO/PI yöntemi kullanıldı. Deney sonuçları 4 μM 'lık konsantrasyonun 24 ve 48 saatlik uygulamalarda apoptotik hücreleri istatistiksel olarak anlamlı bir oranda arttırdığını gösterdi. Baicaleinin apoptoz üzerine etkilerini anlamak için, apoptoz yolağında büyük öneme sahip olan Bcl-XL ve Bax proteinlerinin hücre içi ifadeleri Western blot yöntemi kullanılarak saptandı. Baicaleinin *12-LOX* ve *15-LOX* gen ifadeleri üzerine etkisi RT-PCR yöntemi ile saptandı. Bu çalışmada ayrıca, *survivin* gen ifadesi de çalışıldı. Sonuçlar baicaleinin Saos-2 hücrelerinde uygulama süresine bağlı olarak *survivin* gen ifadesini azalttığını gösterdi. Ayrıca çalışma baicaleinin Saos-2 hücre hattında hücre bölünmesini durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini ortaya koydu ancak baicalein Saos-2 hücre hattında *12-LOX* gen ifadesinde belirgin bir etki göstermemiştir.

Anahtar sözcükler: Saos-2, apoptoz, baicalein, kanser, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, *12-LOX*, *15-LOX*, *survivin*

ABSTRACT

EFFECT OF BAICALEIN ON 12-LOX AND 15-LOX mRNA EXPRESSION AND APOPTOSIS IN HUMAN OSTEOSARCOMA CELL LINE (Saos-2)

Yağmur BABAT

M.Sc. Thesis, Department of Biology Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Celal ÜLGER

2014, 65 pages

Baicalein is a bioactive compound isolated from *Scutellaria baicalensis*. Baicalein has been used for the treatment of inflammation, cardiovascular disease, and bacterial and viral infections. This study, investigated the effect of baicalein on apoptosis using Saos-2 cell line which were cultured from children and young age common cancer osteosarcoma tissues. Samples were treated with different concentrations and time periods by baicalein and results were compared with control groups. MTT method was used for the determination of proliferation. For this purpose, baicalein was applied to Saos-2 cells in different concentrations and data was collected for 24th, 48th and 72th hours. When we compared treated cells with the control cells, 2 and 4 μ M concentrations of baicalein reduced the number of viable cells by over 50% with respect of time. HO / PI method was used for the determination of apoptotic and necrotic cells. Results from experiments showed that 4 μ M concentration at 24 and 48 hours of applications increased apoptotic cells at a statistically significant rate. To understand the effects of baicalein on apoptosis, intracellular expressions of Bcl-XL and Bax proteins that are important in apoptosis pathway were identified using Western blot method. The effects of baicalein on *12-LOX* and *15-LOX* gene expressions were determined by RT-PCR method. Furthermore in this study, *survivin* gene expression was also studied. Results indicated that baicalein decreased the expression of *survivin* gene on Saos-2 cells, depending on the execution time. In addition, the study revealed that baicalein inhibited cell proliferation and induced apoptosis in Saos-2 cell line, but it had no significant effect on *12-LOX* gene expression in Saos-2 cell line.

Key words: Saos-2, apoptosis, baicalein, cancer, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, *12-LOX*, *15-LOX*, *survivin*

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, her zaman ilgili ve sabırlı olan, öğrencisi olmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof.Dr. Celal ÜLGER'e,

Tezimin gerçekleşmesi için maddi desteği FEF-13026 proje koduyla sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri birimine,

Yüksek lisans eğitimim için beni teşvik eden ve bana yol gösterip desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca laboratuvar çalışmalarımda her ihtiyacım olduğunda yanımda olan ve hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, eğitimim boyunca pek çok şey paylaştığımız sevgili arkadaşlarım Burcu AYHAN ŞAHİN'e, Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL'e, İlkem CEYLAN'a, ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen Biyoloji Bölümü Öğretim Üye ve Yardımcılarına,

Eğitimim için maddi manevi bütün destekleri sağlayıp beni bu günlere getiren, ilgisi ve sevgisiyle her zaman yanımda olan, her türlü nazıma katlanan, canımdan çok sevdiğim en değerli varlığım annem Gülay YILMAZ'a,

Tez çalışmalarım süresince desteğini ve ilgisini her zaman hissettiğim, sıkıntılı zamanlarımda bana katlanan, ihtiyacım olan her anımda yanımda olan Efe DUMANCI'ya ve ailesine,

Teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Yağmur BABAT

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI..... | iii |
| BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI | v |
| ÖZET..... | vii |
| ABSTRACT | ix |
| ÖNSÖZ | xi |
| İÇİNDEKİLER | xiii |
| SİMGELER DİZİNİ..... | xv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xvii |
| TABLolar DİZİNİ | xix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 4 |
| 2.1. Kanser | 4 |
| 2.2. Osteosarkoma..... | 6 |
| 2.3. Apoptoz | 7 |
| 2.3.1. Apoptotik Hücre Morfolojisi..... | 8 |
| 2.3.2. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler | 9 |
| 2.3.3. Apoptoz ve Nekroz..... | 10 |
| 2.3.4. Apoptotik Süreç | 11 |
| 2.3.4.1. Harici Yolak | 12 |
| 2.3.4.2. Dahili Yolak | 12 |
| 2.3.5. Kaspazlar | 13 |
| 2.4. Baicalein..... | 14 |
| 2.5. Lipoksijenazlar | 15 |
| 2.6. MTT-Proliferasyon Yöntemi..... | 16 |
| 2.7. Western Blot..... | 16 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2.8. Real-Time PCR | 18 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 20 |
| 3.1. Hücre Kültürü | 20 |
| 3.2. MTT Proliferasyon | 21 |
| 3.3. Apoptozun Belirlenmesi | 22 |
| 3.4. Western Blot Yöntemi | 23 |
| 3.5. RNA İzolasyonu ve RT-PCR | 30 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 34 |
| 4.1. Proliferasyon | 34 |
| 4.2. Apoptoz | 34 |
| 4.3. Western Blot Analizleri | 35 |
| 3.4. RT-PCR | 37 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 40 |
| KAYNAKLAR | 45 |
| ÖZGEÇMİŞ | 65 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-------------------|---|
| AIF | Apoptoz indükleyici faktör |
| AP | Alkalen fosfataz |
| Apaf-1 | Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1 |
| APS | Amonyum persülfat |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| BCIP | 5-bromo-4-kloro-3'indolilfosfat p-toluidin tuzu |
| bç | Baz çifti |
| BSA | Sığır serum albumin |
| CAD | Kaspaz yolu ile aktifleşen DNAaz |
| CASPASE | Sistein aspartat spesifik proteaz |
| cm ² | Santimetrekaare |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| C _T | Döngü eşik değeri |
| dH ₂ O | Distile su |
| DIABLO | Diablo, IAP-bağlayıcı mitokondriyal protein |
| DISC | Ölüm uyarıcı sinyal kompleksi |
| dk | Dakika |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| dNTP | Deoksiribonükleotit trifosfat |
| dsDNA | Çift iplikli DNA |
| EDTA | Etilen diamin tetra asetat |
| ELISA | Enzim temelli immünolojik yöntem |
| EtBr | Etidyum bromür |
| FADD | Fas ilişkili ölüm domaini |

| | |
|---------------------------|---|
| FAS | Ölüm reseptörü |
| FBS | Fetal sığır serum |
| g | Gram |
| HIV | İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü |
| HO/PI | Hoechst 33258 / Propidium Iodide |
| IAP | Apoptoz inhibitör proteinleri |
| kDa | Kilodalton |
| KH_2PO_4 | Potasyum dihidrojen fosfat |
| LOX | Lipoksijenaz |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| MgCl_2 | Magnezyum klorür |
| mRNA | Haberci RNA |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür |
| Na_2HPO_4 | Disodyum hidrojen fosfat |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NBT | Nitro-blue tetrazolyum klorid |
| nm | Nanometre |
| PBS | Fosfat tuz tamponu |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| PIC | Proteaz inhibitör kokteyl |
| PMSF | Fenil metil sülfonil florür |
| pRb | Retinoblastoma protein |
| PVDF | Polivinilidin difluorid |
| RNA | Ribonükleik asit |

| | |
|----------|---|
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SDS-PAGE | Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi |
| TBS | Tris-tamponlu tuz çözeltisi |
| TEMED | Tetra metil etilen diamin |
| TNF | Tümör nekroz faktörü |
| TNFR-1 | Tümör nekroz faktör reseptörü-1 |
| TRADD | Tümör nekroz faktör reseptörü tip-1 ilişkili ölüm domain proteini |
| UV | Ultraviyole |
| V | Volt |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| °C | Santigrat derece |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Apoptoz ve nekrozun şematik olarak gösterimi..... | 11 |
| Şekil 2.2. Baicaleinin (5,6,7-trihydroxyflavone) moleküler yapısı..... | 15 |
| Şekil 2.3. RT-PCR’da gözlenen amplifikasyon eğrisi | 19 |
| Şekil 3.1. Saos-2 hücre hattının mikroskop görüntüleri (4X) | 20 |
| Şekil 3.2. Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü.... | 21 |
| Şekil 3.3. Apoptoz yöntemi sonrasında çekilen mikroskopik fotoğraf | 23 |
| Şekil 3.4. Spacer cam ve düz cam..... | 25 |
| Şekil 3.5. Jel dökme aparatı | 25 |
| Şekil 3.6. Dikey elektroforez tankı..... | 26 |
| Şekil 3.7. Transfer işlemi için gerekli aparatlar | 26 |
| Şekil 3.8. Transfer işlemi sonrası membran görüntüsü | 27 |
| Şekil 3.9. Ponceau S ile boyama sonrası protein bantlarının görünümü | 28 |
| Şekil 3.10. Görüntüleme işlemi sonrası protein bantlarının membran üzerindeki görüntüsü | 29 |
| Şekil 4.1. Baicaleinin canlı hücre sayısına olan etkisi (MTT yöntemi) | 34 |
| Şekil 4.2. Baicalein ile muamele edilen hücrelerde apoptoz oranı..... | 35 |
| Şekil 4.3. Western blot membran görüntüleri (Bax, β -aktin)..... | 35 |
| Şekil 4.4. Western blot membran görüntüleri (Bcl-xL, β -aktin)..... | 36 |
| Şekil 4.5. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak Bax/Bcl-XL oranındaki değişiklik..... | 36 |
| Şekil 4.6. Western blot membran görüntüleri (Kaspaz-8, β -aktin) | 37 |
| Şekil 4.7. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak kaspaz-8 ifadesindeki değişiklik..... | 37 |
| Şekil 4.8. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak RT-PCR sonuçlarına göre Bax/Bcl-2 oranındaki değişiklik | 38 |
| Şekil 4.9. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak RT-PCR verilerine göre <i>survivin</i> gen ifadesi | 39 |

Şekil 4.10. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak RT-PCR verilerine göre
12-LOX gen ifadesi39

TABLolar DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 3.1. Hücre kültüründe kullanılan PBS tamponu içerikleri | 20 |
| Tablo 3.2. Poliakrilamid jel içerikleri | 24 |
| Tablo 3.3. Yürütme tamponu içerikleri | 25 |
| Tablo 3.4. Transfer tamponu içerikleri..... | 27 |
| Tablo 3.5. Western blot deneyinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri | 30 |
| Tablo 3.6. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği | 32 |
| Tablo 3.7. RT-PCR için kullanılan primerler | 33 |

1. GİRİŞ

Kanser vücudun belli bir bölgesindeki hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasından kaynaklanan hastalıkların genel adıdır. Kelime anlamı aşırı hücre çoğalmaları ve doku büyümeleri şeklinde kendini belli eden çeşitli bozuklukları tanımlar. Özellikle kalp rahatsızlıkları arkasından ikinci sırada ölüme neden olması nedeniyle patolojik bozuklukların en önemlilerindedir (American Cancer Society, 2011). Kanser kompleks bir hastalıktır ve hem çevresel hem de kalıtsal faktörlerden kaynaklanır (Lichtenstein vd., 2000). Diğer bir ifade ile kanser beslenme, genetik, yaşam tarzı ve meslek gibi birçok faktörün etkisiyle farklı yaş ve cinsiyetlerde değişen sıklıklarda ortaya çıkabilir.

Osteosarkoma, mezenşimal kemik oluşturan hücrelerde ortaya çıkar ve kas-iskelet sisteminin en yaygın malign tümörlerinden biridir. Osteosarkoma için kemoterapi, özellikle metastazların varlığı ya da kombine kemoterapiye zayıf tepki vermesi nedeniyle, tatmin edici olmaktan uzaktır (Anderson vd., 2010). Bu nedenle, son birkaç yılda ana tedavi öncesi (neoadjuvan) uygulamaların yaygın kullanımına rağmen, hayatta kalma oranı 1980'lerin ortalarından bu yana yaklaşık %70'te sabitlenmiştir (Osborne ve Khanna, 2012).

Son yıllarda çalışmaların birçoğu kanser gelişiminde önemli yolaklar üzerindeki moleküler hedeflerin belirlenerek bunlar üzerinde etkili olan çeşitli yöntemler geliştirmeye yoğunlaşmıştır. Bu amaçla çeşitli kimyasal bileşiklerin sentezi kadar doğal olarak elde edilen bazı kimyasalların kullanımı da literatürde yer bulmuştur. Bu doğal olarak elde edilen kimyasalların önemli bölümünde kaynak bitkisel ekstraktlar ve bunların içindeki etken maddelerdir (Winslow ve Kroll, 1998). Örneğin Ravent (*Polygonum cuspidatum*), binlerce yıldır kullanılan, iyi bilinen bitkilerden biridir. Çin'de geleneksel olarak cilt yanıkları, safra kesesi taşı, hepatit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Srinivas vd., 2003). Emodin ravent bitkisinde bulunan bir bileşiktir. Birçok proliferatif hastalığın tedavisinde etkili olduğu gibi, aynı zamanda anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-ülserojenik, anti-enflamatuvar ve immün baskılayıcı özelliklere de sahiptir (Srinivas vd., 2003; Yan vd., 2008; Ko vd., 2010). Bir diğer örnek ise *Silybum marianum* bitkisinden izole edilmiş bir flavonolignan bileşik olan silimarindir. Silimarın karaciğer hastalıkları için doğal bir çare olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır ve kanser önleyici ve tedavi edici etkileri olduğu bildirilmiştir (Chen vd., 2009).

Astragalus gummifera kanserli hücre büyümesini inhibe eder. *Bleekeria vitensis* Avrupa'da yaygın olarak ilerlemiş meme kanseri tedavisinde, *Aronia melanocarpa* kolorektal kanserde, kolon kanserinde, kalp-damar hastalıklarının tedavisinde, *Brassica oleracea* astım, sabah bulantısı, akciğer, mide, kolorektal, göğüs ve diğer kanserlerin tedavisinde, *Camellia sinensis* prostat, kolon ve mide kanserlerini önlemede, *Ginko biloba* uyum bozukluğu, depresyon, vertigo ve kanser tedavisinde kullanılır. *Daphne genkwa* anti-tümör, anti-alerjik ve anti-inflamatuar aktiviteye sahiptir. *Rhus succedanea* yapraklarının etanolik özütü anti-kanser ve anti-viral aktiviteler gösterir. *Oryza sativa*, diyabet ve hipertansiyonda, kalp hastalıklarında ve bağırsak kanseri tedavisinde kullanılır (Thakore vd., 2011).

Bu kimyasallar kanser hücrelerinin belirgin özelliklerini hedeflemektedir. Bunlar arasında metastazın durdurulması, anjiyogenez inhibisyonu veya apoptozun tetiklenmesi bulunabilir (Davies vd., 2011). Apoptoz çok hücreli bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin bir organizma olarak var olmasına ve yaşlanmasına kadar birçok gelişim aşamasında organizmada homeostazinin sürmesini sağlayan önemli bir fizyolojik mekanizmadır (Elmore, 2007). Kanser hücrelerinde apoptoz inhibisyonu yaygın olarak görülür. Bu nedenle de anti-kanser ilaçların hedefleri arasında önemli bir yer tutar (Lin vd., 2010). Bu kimyasalların elde edildiği tıbbi bitkilerden birisi olan *Scutellaria baicalensis* total kolesterol seviyesini düşürmekte, kan basıncını azaltmakta, anti-inflamasyon, anti-kanser, anti-viral ve anti-bakteriyel enfeksiyonları için geleneksel Çin tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır (Cheng vd., 2012). Baicalein *Scutellaria baicalensis*'ten elde edilen bir kimyasaldır (Cheng vd., 2012). Son yıllarda baicaleinin çeşitli kanser türlerinde apoptozu indüklediği ve bir dizi mekanizma ile hücre çoğalmasını inhibe ettiği de ortaya konulmuştur (Li-Weber, 2009).

Baicalein bir 12-lipoksijenaz (12-LOX) inhibitörü olarak bilinir. 12-LOX'un bazı insan kanserlerinin ilerlemesinde rol aldığı ortaya konulmasıyla 12-LOX inhibitörü olarak bilinen baicalein kanseri önlemede önemli bir seçenek olmuştur. Leung ve arkadaşları (2007) baicaleinin hücre bölünmesini S-fazında durdurma yoluyla proliferasyonu önlediğini ve ayrıca apoptoz ile ilgili proteinlerin düzenlenmesiyle apoptoz indüksiyonuna neden olduğunu ifade etmiştir. Birçok veri LOX-izoformlarının bazılarının yüksek ifadesinin insanda ve deneysel ortamda tümör gelişiminde pro-kanserojenik bir rolü olduğunu ortaya koymuştur. Yüksek LOX ifadesi prostat, akciğer ve diğer bazı hücre hatlarında bulunmuştur (Avis vd., 1996; Anderson vd., 1998; Ghosh ve Myers 1997; Wu vd., 2003; Hoque

vd., 2005; Payne vd., 2007). Bu çalışmada insan osteosarkoma hücre hattı Saos-2'de baicaleinin apoptoz, *12-LOX* ve *15-LOX* mRNA ifadeleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Saos-2 hücre hattında *12-LOX* ve *15-LOX* mRNA ifadesinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kanser

Vücutun tüm organlarını oluşturan hücreler sadece gerekli olduğu zaman bölünür ve daha fazla hücre oluştururlar. Eğer bu hücreler normal olmayan bir şekilde bölünürse bir doku kitlesi meydana getirirler. Bu normal dışı kitleye tümör adı verilir (Cooper, 1992). Tümörler benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilir (Wilson vd., 2006). Benign tümörlerdeki hücreler vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar. Bu tümörler nadiren hayatı tehdit edicidir. Buna rağmen, iyi huylu tümörlerin birçok türü malign olma potansiyeline sahiptir (Clark, 1991). Malign tümörlerdeki kanser hücreleri, yakındaki doku ve organlara ya da kan dolaşımına ve lenf sistemine girerse vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Kanser hücrelerinin bu yayılması metastaz olarak adlandırılır (Klein, 2008).

Genel olarak kanserler tümör hücrelerinin tipine göre sınıflandırılırlar. Bunlar;

1. Karsinomlar: Vücutun epitel dokularından ve bezlerden kaynaklanır. Yaklaşık tüm kanser tiplerinin %80'i bu gruptadır.
2. Sarkomlar: Kemik, kas, kıkırdak, fibröz doku ve yağ dokusundan kaynaklanan tümörlerdir.
3. Lenfomalar ve lösemiler: Lösemiler kandan ve kan yapan dokulardan oluşan kanserlerdir. Lenfomalar lenfatik kanallar ve lenf nodüllerinden gelişen kanserlerdir.
4. Blastomlar: Olgun olmayan öncül hücrelerden veya embriyonik dokulardan türemiş kanserlerdir. Bu kanserler yetişkinlere oranla çocuklarda daha sık görülür.
5. Germ hücreli tümörler: Testis ve yumurtalık hücrelerinden köken alırlar. Teratomlar ve seminomlar bu tümör tipleri arasında yer alır (National Cancer Institute).

Kanser hücrelerini karakterize eden özellikler; büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçabilme, sınırsız bölünme veya çoğalma potansiyeline sahip olma, anjiyogenezi destekleyebilme, doku invazyonu ve metastaz yapabilme olarak tanımlanmıştır

(Oláh, 2005). Bu özelliklerin ortaya çıkmasında yaygın olarak proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar rol oynar. Onkogenlerin yüksek ifadesi ve tümör baskılayıcı genlerin düşük ifadesi tümör gelişimi için önemli etkenlerdir (Guo vd., 2014).

Proto-onkogenler bir hücrede normal hücresel işlevleri kontrol eder. Bu genlerde mutasyon meydana geldiğinde genler işlev kazanır ve onkogene dönüşür. Bunun sonucunda hücreler kontrolsüz çoğalır ve kanser oluşur (Pitot, 1993; Oláh, 2005).

Onkogenler, hücrede normalde bulunan proto-onkogenlerin ya mutasyona uğraması ya da ifadesinin artması ile ortaya çıkar ve kansere neden olma potansiyeline sahiptir. Bu genler tümör hücrelerinde sık sık mutasyona uğramış veya yüksek seviyede ifade olan genlerdir (Pitot, 1993; Oláh, 2005; Croce, 2008). Birçok kanser ilacı onkogenler tarafından kodlanan proteinleri hedef alır (Bishop ve Harold 1989; Yokota, 2000; Croce, 2008). Onkogenler çoğunlukla transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, G proteinleri, serin/treonin kinazlar, reseptör olmayan tirozin kinazlar ve bazı sitoplazmik proteinleri kodlayan genlerdir (Martinez vd., 2003; Cario ve Croce, 2008). Kromozomal yeniden düzenlemeler, mutasyonlar ve gen amplifikasyonu ile onkogenlerin aktivasyonu, hücrelere büyüme veya uzun süre hayatta kalma avantajı kazandırır (Bishop, 1991). Bu mekanizmalar onkogen yapısında bir değişikliğe ya da genin artan veya düzensiz ifadesine neden olur (Folkman, 2006).

Tümör baskılayıcı genler ise hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Bu genlerde bir mutasyon olduğunda genin işlevinde azalma ya da kayıp meydana gelir (Kleinsmith 2006; Martinez vd., 2003; Weinberg, 2014). Örneğin keşfedilen ilk tümör baskılayıcı protein hücre döngüsünü düzenleyen retinoblastoma proteindir (pRb) ve genin her iki kopyasının inaktivasyonu diğer neoplazmalar ile aynı şekilde gözde tümör oluşumuna neden olur (Goodrich vd., 1991; Knillová vd., 2003). Diğer önemli tümör baskılayıcı, *TP53* geni tarafından kodlanan p53 tümör baskılayıcı proteindir. p53 proteini DNA hasarı durumunda hücreyi DNA tamiri için hücre bölünmesinin G1 evresine girmeden bekletir, gendeki hasar tamir edilemezse apoptozu indükler (Martinez vd., 2003; Knillová ve Kolar, 2003).

2.2. Osteosarkoma

Osteosarkoma nadir görülen, ağırlıklı olarak ergen yaş grubunun uzun kemiklerindeki metafizden gelişen primer malign kemik tümörüdür (Bielack vd., 2002). Osteosarkoma mezenşimal hücrelerden kaynaklanır ve patolojik olarak anormal kemiksi oluşum ve iğ hücreleriyle karakterize edilir (Mirabello vd., 2009). Osteosarkomların çoğu, etkili bir tedavi uygulanmazsa hastayı ölüme götürecek kadar çabuk büyür ve hızlı yayılır (Bielack vd., 2004).

Belirtiler ve şiddetleri hastadan hastaya değişebilir. Hastalarda yaygın olan belirtiler kemik ağrısı, tümörün bulunduğu bölgede şişme ve eklemlerin indirgenmiş hareketidir. Eklemler sert veya düzgün hareket edemiyor olabilir veya topallama gelişebilir. Daha az yaygın ve nadir belirtiler, yorgunluk, karıncalanma, kilo kaybı, yüksek sıcaklık veya ateş, gece terlemeleri ve nefes darlığını içerebilir. Bazı hastalarda ise kemiğin kırılmasıyla hastalık kendini belli eder. Bazı hastalar kanser uzun bir süredir devam ediyor olsa da belirti hissetmezler (Bone Cancer Research Trust).

Osteosarkomlar en çok çocukluk ve gençlik çağlarında görülen kötü huylu kemik tümörleridir. Erkeklerde görülme sıklığı daha yüksektir. Çocukluk çağı kanserleri arasında, osteosarkoma rastlanma sıklığı bakımından sekizinci sırada yer alır. Görülme sıklığına göre sıralaması: lösemi (%30), beyin ve diğer sinir sistemi kanserleri (%22.3), nöroblastom (%7.3), Wilms tümörü (%5.6), Non-Hodgkin lenfoma (%4.5), rabdomiyosarkoma (%3.1), Retinoblastom (%2.8), osteosarkom (%2.4) ve Ewing sarkomu (%1.4) (Ottaviani ve Jaffe, 2009).

Osteosarkoma sıklıkla diz eklemine bitişik distal femur (%43) veya proksimal tibia (%23) kaynaklıdır. Hastalığın sonraki en sık vakalarının yaklaşık %10'unu proksimal humerus temsil eder (Bielack vd., 2002). Bu kemiklerde ergenlik döneminde artan büyüme hızını kolaylaştırmak için hücre bölünmesi hızlıdır (Gill vd., 2013).

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation–WHO) osteosarkomları dokusal özelliklerine göre çeşitli tiplere ayırmaktadır: konvansiyonel osteosarkom, teleangiektatik osteosarkom, küçük hücreli osteosarkom, düşük malign merkezi osteosarkom, ikincil osteosarkom, paraossal osteosarkom, periostal osteosarkom, yüksek malign yüzey osteosarkom. En sık olanı konvansiyonel osteosarkomlardır.

Tüm osteosarkomların %80 ile 90'ını oluşturan konvansiyonel osteosarkomlar WHO sınıflandırmasına göre daha alt gruplara da ayrılır. Diğer tüm osteosarkomlar nadiren görülür (her biri %5'ten daha az). Bir osteosarkomun kötü huylı olmasının derecesi tedavi planlamasında dikkate alınır.

Radyoterapi, kemik hücrelerinde DNA hasarı meydana getirerek osteosarkom gelişimine neden olabilir. Paget hastalığı gibi kemiğin yapısında zaten bozukluk varsa, kemik kanserine yakalanma olasılığı daha yüksektir. Hasarlı genler kişinin ailesinden gelebilir, bu da kansere yatkınlığa neden olur. Yaş, boy ve cinsiyet osteosarkoma için risk faktörleridir. Osteosarkoma 10 - 24 yaş aralığındaki kişilerde daha sık görülür. Araştırmalar osteosarkoma görülen hastaların boylarının diğer insanlara göre daha uzun olduğunu göstermiştir. Erkeklerde kadınlara göre daha yüksek bir risk vardır (Bone Cancer Research Trust).

2.3. Apoptoz

Apoptozis veya apoptoz eski bir Yunan terimidir ve kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir (apo: -den/-dan, ptosis: düşmek) (Touchette ve Fogle, 1991). Apoptoz, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak Vogt (1842) tarafından tanımlanmıştır. Bu terim ilk kez 1972'de nekrozdan farklı gerçekleşen fizyolojik bir ölüm tipini tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr vd., 1972).

Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı ve hücre kaybı apoptoz ile eş anlamlı olarak kullanılabilen ve literatürde yer alan diğer ifadelerdir (Schwartzman ve Cidloski, 1993; Bellamy vd., 1995; Majno ve Torisl, 1995).

Ökaryotik hücrelerin yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar. Hücre yaşlanması, HIV gibi virüsler, kanser ilaçları, radyasyon, yüksek doz glukokortikoid, FAS ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler, oksidatif stress, büyüme faktörü eksikliği apoptoza yol açan nedenlerdendir (King ve Cidlowski, 1998; Israels ve Israels, 1999; Büyükgebiz ve Caferler, 2001). Deri, gastrointestinal sistem, bağışıklık sistemi gibi pek çok dokuda devamlılık apoptoz ve hücre yenilenmesine bağlıdır (Kumar vd., 2005). Bağırsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin

uzaklaştırılması apoptoz yoluyla gerçekleşir (Cohen, 1993). Kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} çekirdekli kan hücresi apoptoz yolu ile yok edilmektedir (Akşit ve Bildik, 2008). Memeli embriyonik gelişimi sırasında üretilen hücrelerin çoğu perinatal sürenin sona ermesinden önce fizyolojik bir hücre ölümü geçirir (Vaux ve Stanley, 1999). Apoptoz, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptoz ile ortadan kaldırılması büyük önem taşımaktadır (Nagata, 1997). Bu ölüm şekli fizyolojik şartlarda meydana geldiği için fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır. Apoptoz enerjiye bağımlı olarak gerçekleşir ve morfolojik değişikliklerle kendini gösterir. Eğer hücrede bir ATP yetmezliği varsa ölüm şekli nekroza kaymaktadır (Lu vd., 2000).

2.3.1. Apoptotik Hücre Morfolojisi

Apoptotik hücre ölümü, herhangi bir hasar sonucu görülen nekrotik ölüm denilen hücre ölümünden farklı bir süreç izlemektedir. Araştırmacılar ışık ve elektron mikroskoplarıyla apoptoz sırasında ortaya çıkan çeşitli mikroskobik değişiklikleri belirlemişlerdir (Hacker, 2000). Erken apoptoz sırasında hücre büzülmesi ve piknosis veya karyopiknozis ışık mikroskobisi ile görülebilir (Kerr vd., 1972). Hücre küçülmesi sayesinde hücreler boyut olarak daha küçüktür, sitoplazma yoğundur ve organeller daha sıkı bir şekilde paketlenir. Piknosis kromatin yoğunlaşmasının sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyama ile yapılan histolojik incelemelerde, apoptoz tek hücreleri veya küçük hücre kümelerini içerir. Apoptotik hücre koyu eozinofilik sitoplazmalı ve yoğun mor nüklear kromatin parçaları ile yuvarlak veya oval bir kitle olarak görünür (Elmore, 2007). Apoptoza uğrayan hücreler apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçacıkların en büyük özelliği, fragmante olmuş çekirdeklerin ve parçalanan hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak bağışıklık sistemini uyarmamasıdır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Savill ve Fadok, 2000). Apoptotik hücrelerin tanınması plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidilserin membranın dış tarafına geç eder. Fagositik hücrelerin reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Öktem vd., 2001).

DNA'nın endonükleaz ile özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp büyüklüğünde parçalara ayrılması DNA fragmentasyonu olarak adlandırılır ve bu apoptozun en önemli işaretidir (Zhang ve Xu, 2002).

İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder patern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Walker vd., 1999). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptozda yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Akşit ve Bildik, 2008).

2.3.2. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

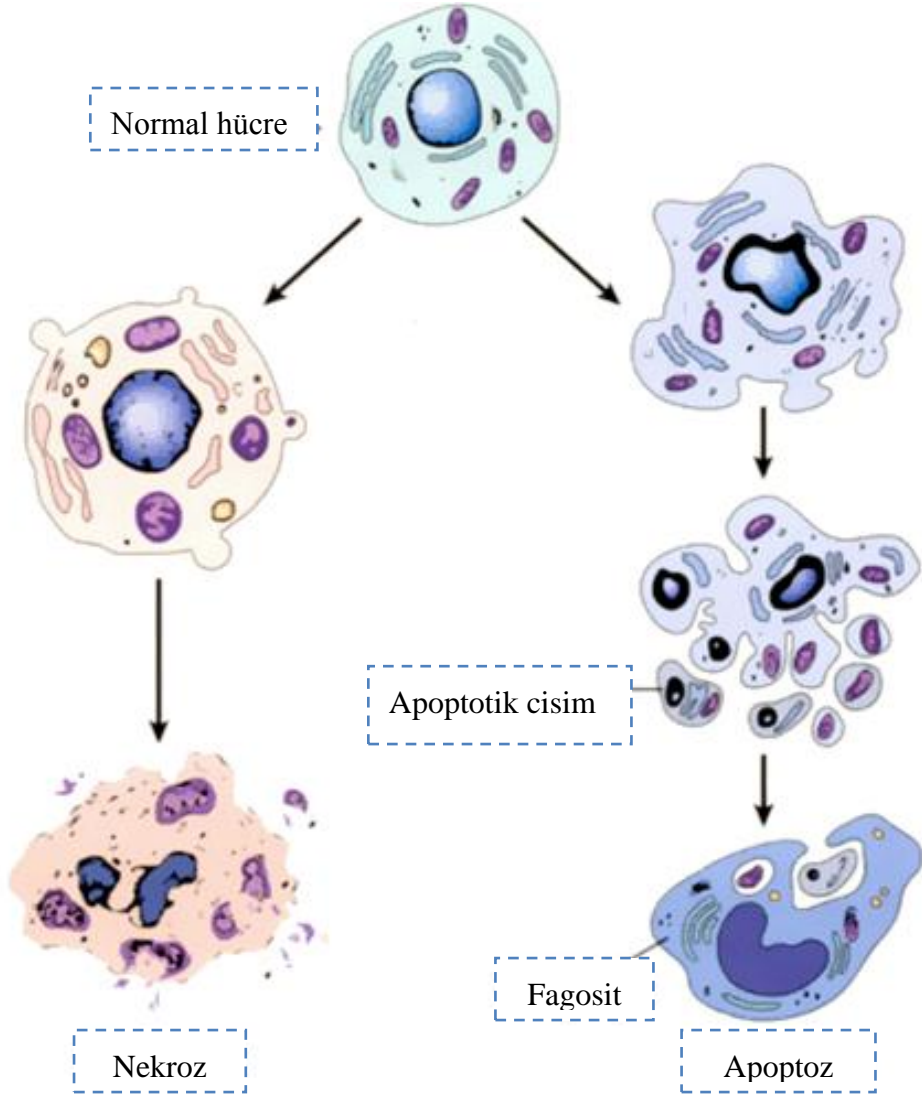
- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
 - ✓ Floresan Mikroskopu ya da Lazerli Konfokal Mikroskop: Propidium Iodide (PI), Hoechst Boyası
 - ✓ Faz Kontrast Mikroskopu
 - ✓ Elektron Mikroskopu (Yasuhara vd., 2003; Baskić vd., 2006).
- İmmunohistokimyasal yöntemler
 - ✓ Anneksin V Yöntemi
 - ✓ TUNEL Yöntemi
 - ✓ M30 Yöntemi
 - ✓ Kaspaz-3 Yöntemi (Engeland vd., 1998; Willingham, 1999).
- Biyokimyasal yöntemler
 - ✓ Agaroz Jel Elektroforezi
 - ✓ Western Blotting
 - ✓ Akım Sitometri (Yasuhara vd., 2003).
- İmmunolojik yöntemler

- ✓ ELISA
- ✓ Fluorimetrik Yöntem (Salgame vd., 1997)
- Moleküler Biyoloji Yöntemleri
 - ✓ DNA Microarrays
 - ✓ Comet Yöntemi (Olive vd., 1993; Godard vd., 1999; Collins, 2002).

2.3.3. Apoptoz ve Nekroz

Hem nekroz hem de apoptoz hücre ölüm şeklidir. İkisi de ölüm şekli olsa da histolojik ve fizyolojik sebepleri farklıdır (Wyllie vd., 1980; Walker vd., 1988). Nekrozun karakteristik özelliği ölümün hücre gurubunda ortaya çıkmasıdır ve nekrozun en yaygın nedeni oksijen yetersizliği anlamına gelen hipoksiyadır. Bununla birlikte arsenik, siyanit, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller de nekroza neden olabilir. Nekroz genellikle büyük hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir süreçtir, oysa apoptoz kontrollü ve enerji bağımlıdır ve tek tek hücreleri veya hücre kümelerini etkileyebilir (Elmore, 2007).

Apoptoz morfolojik olarak özgündür. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür (Choi vd., 2001). Nekrozda kromatin paterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir, ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanse olur (Gerner vd., 2002). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı bütünlüğünü korur ve üzerinde küçük cepçikler oluşur (Spencer vd., 1996). Nekrotik hücre sonra lizise uğrar, ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır (Cummings vd., 1997). Nekrozda plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama çıkışı sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptozda apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon gerçekleşmez (Savill ve Fadok, 2000; Kurosaka vd., 2003).



Şekil 2.1. Apoptoz ve nekrozun şematik olarak gösterimi (Kumar, 2009)

2.3.4. Apoptotik Süreç:

Farklı apoptotik uyarılara bağlı olarak iki farklı apoptoz yolağı bulunmaktadır: ölüm reseptörleri aracılığıyla harici yolak ve mitokondri aracılığıyla dahili yolak (Yan vd., 2008). Harici yolak kaspaz-8, dahili yolak da sitokrom-c ve kaspaz-9 içerir ve iki yolak kaspaz-3 aktivasyonu üzerinde birleşir (Srinivas vd., 2003; Yan vd., 2008; Yu vd., 2008).

2.3.4.1. Harici yolak:

Apoptozu başlatan dış sinyal yolları transmembran reseptörü aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen ailesine üye olan ölüm reseptörleri içerir (Locksley vd., 2001). TNF reseptör ailesi üyeleri ölüm bölgesi olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitten oluşan bir sitoplazmik kısım içerir (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Bu ölüm bölgesi apoptozun başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir ve ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde rol oynar. Bugüne kadar iyi karakterize edilmiş ligandlar ve onlara karşılık gelen ölüm reseptörleri: FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'dir (Chicheportiche vd., 1997; Ashkenazi ve Dixit, 1998; Peter ve Kramer, 1998; Suliman vd., 2001; Rubio-Moscardo vd., 2005). Apoptozun harici yolağını tanımlayan olaylar sırası en iyi FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile karakterize edilir. Duyarlı ligandların bağlanmasıyla üç TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir ve TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRADD ve FADD/Mort-1denilen adaptör proteinlere bağlanırlar (Hsu vd., 1995; Wajant, 2002). Bu noktada prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm uyarıcı sinyal kompleksi (DISC) oluşur (Kischkel vd., 1995). Kaspaz-8 aktive edildiğinde apoptozun ilerleme aşaması tetiklenir (Kataoka vd.,1998; Scaffidi vd., 1999).

2.3.4.2. Dahili yolak:

Hücrede apoptozun tetiklenmesini sağlayan uyarılar iç mitokondriyal membranda porların açılmasıyla sonuçlanan değişikliklere neden olur. Mitokondriyal transmembran kaybı 2 grup pro-apoptotik proteinin serbest kalmasını sağlar ve proteinler sitozole geçer (Saelens vd., 2004). Birinci grubu sitokrom-c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi oluşturur (Du vd., 2000; Garrido vd., 2006). Bu proteinler kaspaz-bağımlı mitokondriyal yolu aktif hale getirir. Salınan sitokrom-c, Apaf-1 ve prokaspaz-9'la birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozomda aktive edilen kaspaz-9 inaktif olan prokaspaz-3'ü keserek aktif kaspaz-3'e dönüştürür (Hill vd., 2004). Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi IAP (apoptoz inhibitör proteinleri) aktivitesini inhibe ederek apoptozu teşvik eder (Loo vd., 2002; Schimmer, 2004). Pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu, AIF, endonükleaz G ve CAD apoptoz sırasında mitokondriden salınır, ancak bu geç dönemde gelişen bir olaydır. AIF çekirdeğe

yerleşir ve DNA parçalanmasına neden olur (Joza vd., 2001). Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşir (Cory ve Adams, 2002). Bcl-2 protein ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya anti-apoptotik olabilir. Bugüne kadar Bcl-2 ailesinde toplam 25 gen tespit edilmiştir. Bazı anti-apoptotik proteinler; Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG ve bazı pro-apoptotik proteinler; Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, ve Blk'dir. Bcl-2 ve Bcl-XL mitokondriden sitokrom-c salınımını inhibe eder. Yapılan çalışmalar Bcl-2 ve Bcl-XL'nin, kaspaz proteazlarının aktivasyonunu kontrol ederek apoptotik ölümü inhibe ettiğini göstermektedir (Newmeyer vd., 2000).

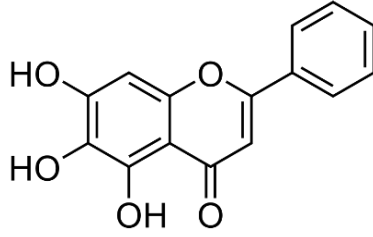
2.3.5. Kaspazlar

Kaspazlar sistein-proteaz grubu enzimlerdir ve apoptozda önemli rol oynarlar. Açılımı; Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cysteine Aspartate Specific Protease-CASPASE) şeklindedir. Kaspazların aktif merkezlerinde sistein aminoasidi bulunduğu ve hedeflerindeki proteinleri aspartik asit birimlerinden kestiklerinden bu şekilde adlandırılmışlardır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücre ve şekilsel değişimler bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler sonucunda olur (Nicholson, 1999). Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte inaktif halde bulunan prokaspaz enzimler aktif hale gelirler ve aktifleşen bu kaspazlar diğer inaktif kaspazları aspartik birimlerinden keserek aktifleştirirler. Farklı kaspazlar komşu amino asitlerin tanınması ile ilgili farklı özelliklere sahiptirler. Kaspazlar aktive edildikten sonra hücre ölümüne doğru geri dönüşü olmayan bir yola girer. Bugüne kadar on büyük kaspaz tespit edilmiştir ve bunlar genel olarak; başlatıcı (kaspaz-2, 8, 9, 10), sonlandırıcı/efektör (kaspaz-3, 6, 7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5) olarak 3 grupta toplanabilir. Başlatıcı kaspazlar inaktif haldeki efektör kaspazlara bağlanarak onları aktif hale getirir. Buna karşılık efektör kaspazlar da hücre içinde diğer proteinlere bağlanarak apoptotik süreci tetikler (Cohen, 1997; Rai vd., 2005). Fas/APO-1 ve TNFR1 yoluyla uyarılan kaspaz-8 aktif hale geldiğinde kaspaz-8 aktif fragmanlarının salınımı gerçekleşir. Pro-kaspaz-8 55 kDa, kaspaz-8'in p18 ve p10 alt birimleri sırasıyla 18 kDa ve 10 kDa'dır. Aktif kaspaz-8 kesim yaparak kaspaz-3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazları aktif hale getirir. Kaspaz-3 sonuçta apoptozun belirgin morfolojik özelliklerinden olan DNA fragmentasyonu ve hücre bütünlüğünü ortaya çıkarır (Boldin vd., 1996; Muzio vd., 1996; Hui vd., 2004).

2.4. Baicalein

Baicalein, *Scutellaria baicalensis* bitkisinden elde edilen ve bugüne kadar iltihap tedavisinde, kalp-damar hastalıklarında, bakteriyel ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir kimyasaldır (Kimura vd., 1981; Lin ve Shieh, 1996; Li-Weber, 2009). *Scutellaria* türleri, özellikle Asya kıtasında yoğun bir biçimde olmak üzere, çok uzun zamandan beri halk ilacı olarak kullanılan bitkilerdir. *Scutellaria baicalensis* bitkisi total kolesterol seviyesini düşürmekte, kan basıncını azaltmakta, anti-inflamasyon, anti-kanser, anti-viral ve anti-bakteriyel olarak geleneksel Çin tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kubo vd., 1985; Zhang vd., 1994). Bu nedenle çeşitli *Scutellaria* türleri üzerinde, hem kimyasal yapılarını hem de farmakolojik etkilerini konu alan çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Son yıllarda çeşitli kanser türlerinde apoptozu indüklemeye ve hücre büyümesini inhibe etme yeteneği ile baicalein önemli ilgi toplamıştır. Baicaleinin bir dizi mekanizma ile hücre çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir. Tipik bir hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olmak üzere dört ardışık fazdan oluşur. Hücre siklusu siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından kontrol edilir. Siklin bağımlı kinazların aktivasyonu veya inaktivasyonu arasındaki denge G1'den S fazına ve G2'den M fazına geçilip geçilmeyeceğini belirler. Baicaleinin tümör tipine bağlı olarak çeşitli kontrol noktalarında hücre döngüsünün durdurulmasını uyararak, tümör hücreleri üzerinde sitostatik etkiler gösterdiği bulunmuştur (Li Weber, 2009). Örneğin baicalein uygulaması sonucunda meme ve akciğer kanserlerinde total siklin D1 seviyelerinde düşüş görülmüştür (Lee vd., 2005). Prostat kanseri hücre hattında baicalein ile muamele sonucu azaltılmış siklin D1 ve D3 protein seviyeleri gözlemlenmiştir. Bu etkinin, G0/G1 aşamasında büyüme inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pidgeon vd., 2002).



Şekil 2.2. Baicaleinin (5,6,7-trihydroxyflavone) moleküler yapısı (Hsieh vd., 2007)

Baicalein molekülünün anti-kanser özelliği üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur. Oral kanserlerde hücre bölünmesinin siklin D1 degradasyonu ile G1 aşamasında tutulmasında etken olduğu gösterilmiştir (Cheng vd., 2012). Baicalein ile ilgili yapılan bir çalışmada baicalein uygulamasının insan hepatoma hücre hatlarında büyüme, migrasyon, invazyon ve adezyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar baicaleinin anti-kanser özelliği olduğunu sergilemiştir (Chiu vd., 2011). Pankreatik kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada baicaleinin pankreas kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (Takahashi vd., 2011). Bir başka çalışmada akciğer kanseri hücre hattı H460 ile çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda baicalein S-fazında durdurma yoluyla proliferasyonu önlemiştir. Ayrıca apoptoz ile ilgili proteinlerin düzenlenmesinde rol oynadığından apoptoza neden olmuştur (Leung vd., 2007). Bir çalışmada genistein ve onun yapısal analogu olan baicaleinin anti-östrojeniteleri geçici transfeksiyon modeli kullanılarak incelenmiştir. Hücre ölüm tayini ve akım sitometri analizleri sonucunda baicaleinin genisteinden daha güçlü bir apoptoz indükleyici ajan olduğu sonucuna varılmıştır (Po vd., 2002). Baicaleinin akciğer tümörüne etkisinin incelendiği bir çalışmada baicalein pulmoner adenom oluşumunu ve büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir ve güçlü anti-tümörogenik etkisi görülmüştür (Naveenkumar vd., 2012).

2.5. Lipoksijenazlar

Lipoksijenazlar, lipit peroksitleyici enzimlerin heterojen bir familyasıdır ve 4 alt gruba ayrılırlar; 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX ve 15-LOX (Ding vd., 2003; Nagashima vd., 2011). Arakidonik asit LOX'un substratıdır. Birkaç sinyal molekülünün öncülüdür ve bu molekülün metabolik yolundaki değişiklik insan tümör gelişiminde rol oynar. Örneğin 5-LOX, arakidonik asidi hidroksieikosatetraenoik

asite veya leukotrienlere dönüştürür. Bu moleküller proliferasyonu arttırma ve insan hücrelerinde apoptozu baskılama özelliğine sahiptir (Hoque vd., 2005).

Bir çok veri LOX-izoformlarının bazılarının yüksek ifadesinin insanda ve deneysel ortamda tümör gelişiminde pro-kanserojenik bir rolü olduğunu ortaya koymuştur. Yüksek LOX ifadesi prostat, akciğer ve diğer bazı hücre hatlarında bulunmuştur (Avis vd., 1996; Anderson vd., 1998; Ghosh ve Myers 1997; Wu vd., 2003; Hoque vd., 2005; Payne vd., 2007). Ayrıca 15-LOX-1 ve onun ana ürünü 13-S-hidroksioktadekadienoik asit (13-S-HODE) ifadesi insan kolorektal kanserinde ve özafagus kanserinde düşüktür. Bazı terapötik ilaçlar bu düşük 15-LOX-1 ifadesini indükleyerek apoptozu tetiklerler ve tümör büyümesi engellenir (Wu vd., 2003). İnsan gastrik hücre hatlarında 12-LOX ifadesi ve hücre proliferasyonuna etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmada 12-LOX inhibitörü baicalein kullanılmış ve hücre proliferasyonunun belirgin bir şekilde inhibe olduğu gözlemlenmiştir (Wong vd., 2001).

2.6. MTT-Proliferasyon Yöntemi

MTT-proliferasyon yöntemi hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] bir tetrazolyum tuzudur. Bu tuz canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine özgüdür. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondrisinde yer alan süksinat-dehidrogenaz enziminin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazan tuzları oluşturmaya dayanır (Dikmen vd., 2008). Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir. Bu formazan kristalleri DMSO ile çözdürülerek spektrofotometrede ölçüm yapılır ve ölçülen değer o solüsyondaki canlı hücre sayısını gösterir (Plumb, 2004). Hücrede proliferasyon azaldıkça formazan kristalleri azalır ve bunun sonucunda absorbans değeri de azalır. Bunun tam aksine, proliferasyon artıyorsa solüsyondaki formazan kristallerine paralel olarak absorbans değeri de artar. Absorbans okumaları 560 nm dalga boyu ve 620 nm'lik referans dalga boyunda spektrofotometrede gerçekleştirilir (Ogbomo vd., 2008). MTT ayırıcı ışığa duyarlı olduğu için, MTT deneyleri genellikle doğrudan ışık almayacak şekilde gerçekleştirilir.

2.7. Western Blot

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile molekül ağırlığına, büyüklüğüne ve yüküne veya izoelektrik noktasına göre ayrılmış kompleks bir karışım içinde hedeflenen bir proteini özgün bir şekilde saptamak için kullanılan en genel yöntem Western blot yöntemidir. Bu yöntem membran üzerindeki 1-5 ng'a kadar az miktardaki proteinleri saptamaya elverişlidir. Ardışık 2 aşamadan oluşur: önce jel üzerindeki proteinler, boyama yapılmaksızın sabit bir yüzeye (membrana) aktarılır; sonra da hedeflenen protein özgün bir belirteçle saptanır. Saptamada en yaygın yol immünolojik belirteç kullanımıdır. Bu durumda protein kendine özgü antikorla muamele edilir (Temizkan ve Arda, 2008). Primer antikor seçimi tanınacak antijene bağlıdır. Bu işlem için monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanılabilir. Poliklonal antikorları üretmek, monoklonal antikorlar ile karşılaştırıldığında, kısa vadede oldukça basit ve ucuzdur. Bunun yanında, büyük hayvanlardan (örneğin, at, keçi, tavşan vb.) antikorca zengin büyük hacimde serum elde edilebilir. Ancak orijinal stok azaldığında tekrarlanabilirlik açısından dezavantajlıdır. Buna karşılık, monoklonal antikorlar tek bir hücre hattından elde edilir ve hem güvenli hem de standart sistemlerin gelişmesini sağlar (Nelson vd., 2000). Sekonder antikorun seçimi primer antikorun geliştirildiği canlıya bağlıdır, primer antikor hangi canlıya ait ise sekonder antikorda aynı canlıdan seçilir. Antijen-antikor bağlantısının gerçekleştiği bölgeler, antikordaki özel bir işaret aracılığıyla belirlenir. Biotin, floresan, rodamin, yaban turpu (horseradish) peroksidaz, alkalin fosfataz işaretleyicileri kullanılabilir. Seçilecek olan substrat istenen sensitivite, tanıma metodu, sinyalin şekli ve kullanılan enzim işaretleyicisine göre değişiklik gösterir. Bu substratlar uygun enzim ile biraraya geldiğinde membran üzerinde çözünmeyen renkli çökeltiler oluşturur ve ek görüntülemeye ihtiyaç duymazlar (Tezel, 2013). Nitro-blue tetrazolium klorid (NBT) ve 5-bromo-4-kloro-3'indolilfosfat p-toluidin tuzu (BCIP) solüsyonu alkalin fosfataz (AP) ile kullanılan substratlardır.

Western blotta sıklıkla nitroselüloz membran veya polivinilidin difluorid (PVDF) membran kullanılır (Petrasovits, 2014). Bu tip saptamaların jelden çok membran üzerinde yapılmasının önemli nedenleri vardır:

- Belirteçler (örneğin, antikorlar) membran yüzeyindeki proteinlerle daha kolay etkileşir. Böylece jelin içinde gömülü durumda iken saptanamayan,

ancak membrana aktarıldıktan sonra yüzeyde toplanan çok az miktardaki proteinler bile kolaylıkla belirlenebilir.

- İşlemler daha az belirteçle ve daha kısa sürede gerçekleştirilir.
- Membran jele göre daha dayanıklı olduğundan uzun süre saklanabilme avantajına sahiptir.

Membran üzerindeki proteinler başka yöntemlerle de saptanabilir. Bunlara (nükleik asitlere bağlanan proteinler için) işaretli DNA/RNA problemleri ile melezleme, radyoaktif işaretli proteini otoradyografi ile saptama, sadece hedef proteinlerle (örneğin glikoproteinlerle) etkileşen moleküllerden (örneğin lektinlerden) yararlanma örnek verilebilir (Temizkan ve Arda, 2008).

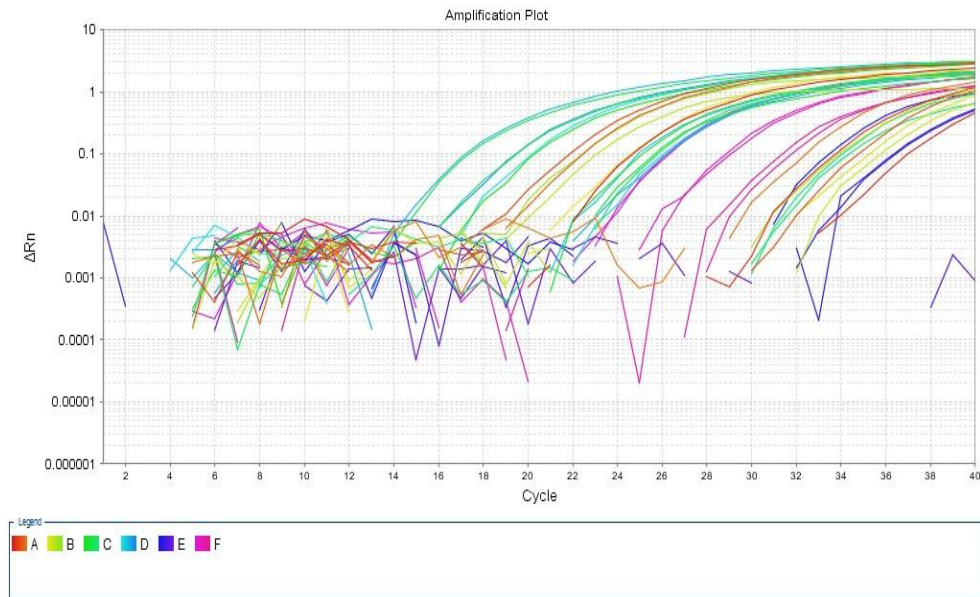
2.8. Real-Time PCR

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu olarak da adlandırılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu moleküler biyolojide hedef DNA molekülünü çoğaltmak ve aynı zamanda ölçmek için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. qPCR, kantitatif PCR için kullanılan kısaltmadır (VanGuilder vd., 2008). Real-time PCR'da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun döngü sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir (Günel, 2007).

Kantitatif çalışmalar 3 ana metot ile yapılır; hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri ve DNA-bağlayıcı ajanlar. Çift iplikli DNA (dsDNA)'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boya en basit metottur. Bu boya PCR sırasında tüm çift sarmallı DNA'lara bağlanır ve bu da boyanın floresan ışımaya yapmasına neden olur. PCR esnasında DNA ürününün artışı floresan yoğunluğunda bir artışa yol açar ve dolayısıyla DNA konsantrasyonları ölçülebilir hale gelir. Böylece her bir döngüde ölçüm yapılır. Ancak, SYBR Green I gibi dsDNA boyalarının spesifik olmayan PCR ürünleri de dahil olmak üzere, tüm çift iplikli DNA'lara bağlanacak olması yöntemin bir dezavantajıdır (Zipper vd., 2004). Bu yöntemden en doğru şekilde sonuç alınabilmesi için primerler doğru tasarlanmalıdır. Primerler cDNA'ya özgül olmalı, primer dimeri oluşturmamalı ve ampikon uzunluğu mümkün olduğunca kısa seçilmelidir. SYBR-Green I metodu haricinde daha güvenli olan ve floresan ışımaya yapabilen problemler de vardır. Floresan problemler sadece

prob dizisini içeren DNA'yı tespit eder. Bu nedenle, prob kullanımı önemli ölçüde özgüllüğü artırır ve özgül olmayan DNA varlığında da ölçümü sağlar. Real-Time PCR'da çoğaltılan DNA'nın istenilen bölge olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılır. T_m değeri bir DNA parçasının yarısının denatüre olduğu sıcaklık değeridir. Her DNA parçasının uzunluğuna ve nükleotit içeriğine göre farklı bir T_m değeri vardır. Sıcaklık kademeli olarak yükseltilir, floresan sinyali kademeli olarak düşer ve bu şekilde erime eğrisi analizi yapılır. Bu analiz ile PCR ürünlerinin özgüllüğü saptanır (Ririe vd., 1997). Real-Time PCR'da ölçüm belirli bir eşik seviyesine göre yapılır. Floresanın eşığı aştığı döngü sayısı eşik döngüsü (C_T) olarak adlandırılır. Yani üründeki ilk anlamlı artış bu noktada meydana gelir (Bustin vd., 2009). Gen ifadesini ölçmek için ilgilenilen genin farklı örnekleri arasında RNA miktarı ve kalitesinde meydana gelebilecek değişiklikleri normalize etmek için bir referans gen kullanılır. Bu normalizasyon işlemi ΔC_T metodu olarak adlandırılır ve farklı örnekler arasında ilgilenilen genin ifadesinin karşılaştırılmasını sağlar (Scheffe vd., 2006).

Relatif kuantifikasyonda en yaygın yöntem $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemidir. Bu yöntem iki varsayıma dayanır. Birincisi reaksiyonun %100 verimlilikle çalışması, ikincisi örnekler arasında ifadesi sabit olan bir genin olmasıdır (Livak ve Schmittgen, 2001).

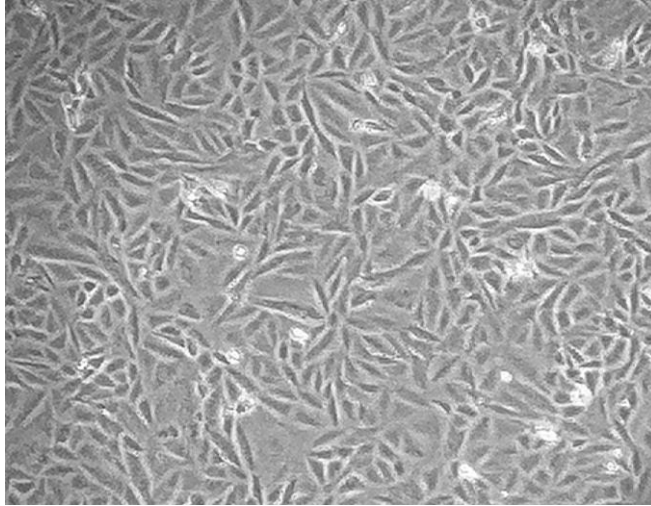


Şekil 2.3. RT-PCR'da gözlenen amplifikasyon eğrisi

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

İnsan osteosarkoma hücre hattı Saos-2; Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü'nden temin edildi (HÜKÜK No. 02111901). Hücreler %15 FBS ve %1 PenStrep eklenen McCoy's 5A (Modified) (serum içermeyen, L-Glutaminli) besiyerinde 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda 25 cm²lik ve 75 cm²lik kültür kaplarında çoğaltıldı. Besiyeri 48 saat aralıklarla değiştirildi. Değiştirme işlemi sırasında hücreler +4 °C'de saklanan 3 ml PBS ile yıkandı ve ardından 13 ml taze besiyeri eklendi. 25 cm²lik bir kültür kabının tamamı hücrelerle doluyken içerisinde yaklaşık olarak 2-3 milyon hücre bulunur. 75 cm²lik kültür kabı tam doluyken içerisinde yaklaşık olarak 8-10 milyon hücre bulunur. MTT proliferasyon, apoptoz, Western blot ve Real-Time PCR deneylerinde hücre sayıları tam dolu flaskın içerisinde bulunan hücre miktarı baz alınarak hesaplandı.



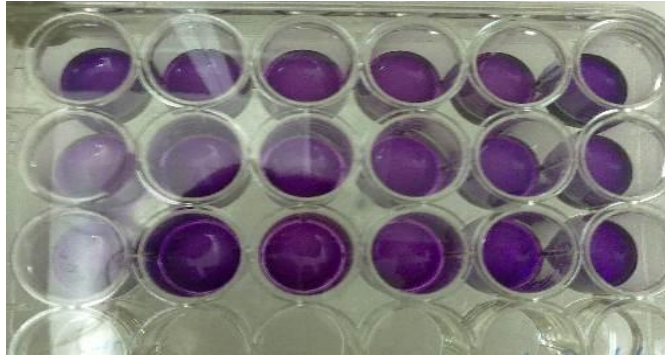
Şekil 3.1. Saos-2 hücre hattının mikroskop görüntüleri (4X)

Tablo 3.1. Hücre kültüründe kullanılan PBS tamponu içerikleri

| | |
|-------------------------------|--|
| 10X PBS stok (pH:7,4): | NA ₂ HPO ₄ : 18 g KH ₂ PO ₄ : 3 g NaCl: 81,84 g Distile su: 1 litre |
|-------------------------------|--|

3.2. MTT Proliferasyon

MTT proliferasyon yönteminde 24, 48, 72 ve 96 olmak üzere 4 saat dilimi için 4 adet 48 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Deney için her bir kültür kabının 18 kuyucuğu kullanıldı. Bu 18 kuyucuğun her birine 400 µl besiyerinde resüspanse edilmiş 10.000 hücre eklendi. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda 1 gece inkübe edildi. İkinci gün her bir kültür kabında 18 kuyucuğun 3'ü kontrol grubu olarak bırakıldı. 3 kuyuya 4 µM DMSO eklendi. En yüksek konsantrasyonda uygulanan baicalein miktarı 4 µM olduğundan bu konsantrasyon seçildi. Geri kalan 12 kuyuya her biri 3 tekrar olmak üzere 0,5 µM, 1 µM, 2 µM ve 4 µM'lık konsantrasyonlarda baicalein uygulaması yapıldı ve 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda inkübe edildi. Üçüncü gün 24 saatlik kültür kabının her kuyucuğuna 40 µl MTT eklendi. Toz halde bulunan MTT 5 mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde çözülerek hazırlandı. Kontrol grubundan bir kuyu blank olarak kullanılmak üzere MTT eklenmeden bırakıldı. MTT uygulamasının ardından kültür kabı 4 saat 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda inkübe edildi. 4 saatin sonunda 18 kuyucuktaki solüsyon vakum ile uzaklaştırıldı. Boş kuyular üzerine 100 µl DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı ve ardından spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Absorbans okumaları 560 nm dalga boyu ve 620 nm'lik referans dalga boyunda gerçekleştirildi. Aynı işlemler 48, 72 ve 96 saatlik kültür kapları için de uygulandı.



Şekil 3.2. Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü

Elde edilen verilerin analizi yapılırken tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değeri çıkarıldı ve formazan kristallerinden kaynaklanan esas absorbans değeri hesaplandı. 48. saat, 72. saat ve 96. saat verileri ayrı ayrı 24. saat verileriyle karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma 24. ve 48. saatler için şu şekilde yapıldı: her örnek

in 48. saatteki esas absorbans değerinden 24. saatteki esas absorbans değeri çıkarıldı, bu fark 48. ve 24. saatlerdeki kontrol absorbanslarının farkına bölündü ve elde edilen sonuç 100 ile çarpılarak her örnek in yüzde proliferasyon değeri hesaplandı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştiğinden, her örnek in elde edilen üç değerin ortalaması alındı ve ortalama değerler elde edildi. Ortalama değerler GraphPad 5.0 programına girildi ve hücrelerin proliferasyon değişikliklerini gösteren grafikler çizildi. Aynı hesaplamalar 72. saat ve 96. saat verileriyle 24. saat verilerinin kıyaslanmasıyla ayrı ayrı yapıldı ve grafikler elde edildi.

3.3. Apoptozun Belirlenmesi

Apoptozu belirlemek in HO/PI (Hoechst 33258/Propidium Iodide) yöntemi kullanıldı. 24, 48, 72 ve 96 olmak üzere 4 saat dilimi in 4 adet 48 kuyucuklu kültür kabı kullanıldı. Deney in her bir kültür kabının 18 kuyucuğu kullanıldı. Bu 18 kuyucuğun her birine 800 l besiyerinde resüspanse edilmiş 20.000 hücre eklendi. Hücreler 37 C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda 1 gece inkübe edildi. İkinci gün her bir kültür kabının 18 kuyucuğunun 3' kontrol grubu olarak bırakıldı. 3 kuyuya 4 M DMSO eklendi. En yüksek konsantrasyonda uygulanan baicalein miktarı 4 M olduğundan bu konsantrasyon seçildi. Geri kalan 12 kuyuya her biri 3 tekrar olmak üzere 0,5 M, 1 M, 2 M ve 4 M'lık konsantrasyonlarda baicalein uygulaması yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan 24 saat sonra 24 saatlik kültür kabı etüvden çıkarıldı. Tüm kuyulardaki besiyeri vakum ile uzaklaştırıldı. Her kuyuya 1 ml PBS eklendi ve kültür kabı sağa sola sallanarak hücrelerin yıkanması sağlandı. PBS'in vakumla uzaklaştırılmasının ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Tüm kuyulara 100 l tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin-0,53 mM EDTA) eklendi ve tüm yüzeyi kaplaması sağlandı. 37 C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda 5 dk inkübasyonun ardından kuyulara 500 l besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Hücreler Ependorf tüplere alındı ve 5 dk 800 rpm'de santrifüjlendi. Fazla besiyeri atılarak hücreler 100 l taze besiyeri ile resüspanse edildi. nc gün Hoechst 33258 ve Propidium Iodide boyaları 1:1 oranında ışıksız ortamda karıştırılarak hazırlandı. Her bir Ependorf tüpüne HO/PI karışımından 10 l eklendi ve 37 C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karanlık odada her bir Ependorf tüpünden lam üzerine 30 l örnek alındı. Örnekler floresan mikroskopta UV ışığı ve DAPI filtresi ile incelendi ve fotoğraflandı. Çekilen fotoğraflardan canlı hücreler, apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler sayıldı.

Apoptotik ve nekrotik hücrelerin oranlarının belirlenmesinin ardından sonuçları gösteren grafikler GraphPad 5.0 programı kullanılarak çizildi.



Şekil 3.3. Apoptoz yöntemi sonrasında çekilen mikroskopik fotoğraf

3.4. Western Blot Yöntemi

- **Hücre lizatı elde edilmesi**

75 cm²lik kültür kabında hücre yoğunluğu 1×10^6 ya ulaştığında 2 kültür kabındaki hücreler toplandı. Toplama işleminde kültür kabındaki besiyeri atıldı, hücreler 2 kez 3 ml PBS ile yıkandı ve 2,25 ml tripsin-EDTA eklenerek 5 dk 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda inkübe edildi. Ardından tripsin-EDTA ile kaldırılmış hücelere besiyeri ilave edildi ve hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası besiyeri ve tripsin-EDTA içeren solüsyon döküldü. Dibe çöken hücreler 2 ml PBS ile resüspanse edilerek 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Fazla PBS uzaklaştırılıp dipteki hücreler 20 ml besiyeri ile resüspanse edilerek mililitresinde yaklaşık 1 milyon hücre olan solüsyon elde edildi. Baicalein uygulamasından önce bu çözeltinin 2 ml'si (yaklaşık olarak 2 milyon hücre) 0. saat protein izolasyonu için ayrıldı. Kalan çözeltiye 4 µM konsantrasyonda baicalein uygulaması yapıldı. Uygulama sonrasında hücreler inkübe edildi. Uygulamadan önce 0. saat protein izolasyonu için ayrılan 2 milyon hücre 1.000 rpm'de 3 dakika +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler 2 ml soğuk PBS ile resüspanse edildi ve aynı şartlarla santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılıp PBS ile yıkama işlemi tekrarlandı. Pellet üzerine 100 µl lizis tamponu, 2,5 µl PMSF ve 2,5 µl PIC eklendi, pellet homojenize edildi ve 10.000

rpm'de 20 dakika +4 °C'de santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatant dikkatlice bir Ependorf tüpe alınarak 0. saat hücre lizatı olarak -20 °C'de saklandı. Baicalein uygulaması yapılan hücreler 2, 4, 8, 24 ve 48. saatlerde toplandı. Hücreler toplanırken çözeltideki hücre yoğunluğu spektrofotometrede 620 nm'de ölçüldü ve her saat dilimi için 2 milyon hücre alındı. 0. saat protein izolasyonu için ayrılan 2 milyon hücrenin absorbansına göre 2, 4, 8, 24, ve 48. saatlerde hücre absorbansları alınarak her saat dilimi için 2 milyon hücre toplandı. 2, 4, 8, 24 ve 48. saatler için de 0. saat için yapılan protein izolasyon işlemleri tekrarlandı. Sonuçta belirtilen 6 saat dilimi için proteinler elde edildi. Elde edilen proteinler -20 °C'de saklandı.

- **Elektroforez**

Elde edilen proteinlerin elektroforezi için poliakrilamid jel hazırlandı. Yürütme jeli %12.5'lük, yükleme jeli %4'lük hazırlandı.

Tablo 3.2. Poliakrilamid jel içerikleri

| %12.5'lük jel (yürütme jeli) | %4'lük jel (yükleme jeli) |
|--|--|
| Akrilamit:Bisakrilamit (30:0.8) 3.1 ml | Akrilamit:Bisakrilamit (30:0.8) 660 µl |
| 1 M Tris-Cl pH:8.8 3 ml | 1 M Tris-Cl pH:6.8 630 µl |
| %20 SDS 38 µl | %20 SDS 25 µl |
| Distile su 1.3 ml | Distile su 3.6 ml |
| %10 *APS 36 µl | %10 *APS 25 µl |
| *TEMED 5 µl | *TEMED 5 µl |

*APS ve TEMED jel dökülmeden hemen önce eklendi.

Sağ ve sol yanında 1 mm'lik aralayıcı bulunan bir cam üzerine aynı boyutta düz bir cam kapatıldı ve altından sızdırma olmayacak şekilde jel dökme aparatına yerleştirildi. Jel dökme aparatına yerleştirilen iki cam arasındaki boşluğa dikkatlice jel döküldü.



Şekil 3.4. Spacer cam ve düz cam



Şekil 3.5. Jel dökme aparatı

İlk olarak %12.5'lik jel döküldü ve üzeri su ile dolduruldu. 45 dk polimerleşmesi beklendi ve su uzaklaştırılıp kurutulduktan sonra üzerine hazırlanan %4'lük jel döküldü. 1 mm'lik tarak yerleştirildikten sonra yine 45 dakika polimerleşmesi beklendi. Hazırlanan jel dikey elektroforez aparatına yerleştirildi ve tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Jel kuyucukları kalıntıları uzaklaştırmak için tampon ile tekrarlı pipetaj aracılığıyla temizlendi.

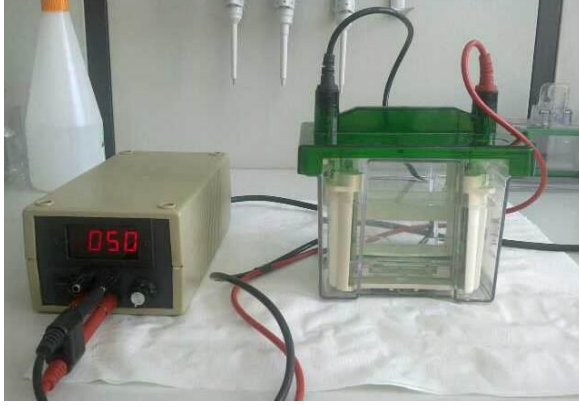
Tablo 3.3. Yürütme tamponu içerikleri

| | | | |
|-------------------------|---------------|--------------|---------|
| Yürütme tamponu: | 28.8 g Glisin | 6 g Tris-baz | 2 g SDS |
|-------------------------|---------------|--------------|---------|

Karışım distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Protein konsantrasyonları Nanodrop 2000 spektrofotometrede (Thermo Scientific) Bradford yöntemi ile ölçüldü. Ölçüm sonrasında örnekler mililitresinde 1 µg protein olacak şekilde Ependorflara alındı. Protein ve boya (2:1) oranında karıştırılarak 95 °C'de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası proteinler jele

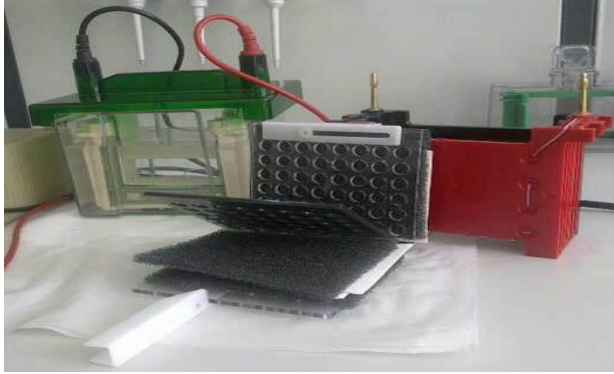
yüklendi. İlk kuyucuğa prestained protein belirteci (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard) yüklendi. Yürütme tankı içi buz dolu bir kaba oturtuldu. Yükleme jeline 100 V, yürütme jelinde 200 V akım uygulanarak elektroforez yapıldı.



Şekil 3.6. Dikey elektroforez tankı

- **Transfer İşlemi**

Elektroforez sonrası jelin %4'lük yükleme kısmı uzaklaştırıldı. Transfer için sandviç aparat, sünger, filtre kağıdı ve membran hazırlandı.



Şekil 3.7. Transfer işlemi için gerekli aparatlar

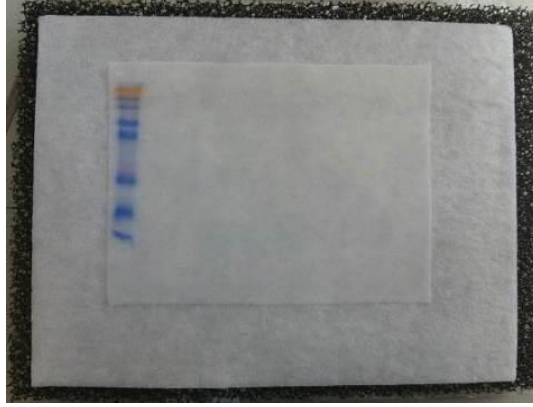
Sünger ve filtre kağıdı transfer tamponunda ıslatıldı.

Tablo 3.4. Transfer tamponu içerikleri

| | | | |
|---------------------------|----------------|---------------|----------------|
| Transfer tamponu*: | 2.5 g Tris-baz | 11.2 g Glisin | 200 ml metanol |
|---------------------------|----------------|---------------|----------------|

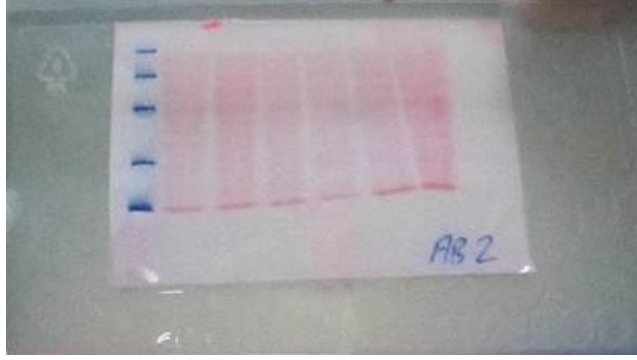
*Karışım distile su ile 1 litreye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı.

Jel de transfer tamponuna alındı. Membran kullanılacağı zaman transfer tamponunda ıslatılmak üzere önce saf metanol içerisine alındı. Sandviç, jel ve membran doğru akım yönünde olacak şekilde hazırlandı. Sırasıyla sünger + filtre kağıdı + membran + jel + kağıt + sünger konularak sandviç kapatıldı. Membran ve jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Sandviç, içinde buz aküsü bulunan transfer tankına yerleştirildi ve 1 saat 100 V'da transfer işlemi yapıldı. Transfer sonrası membran sandviç aparat içinden alındı.



Şekil 3.8. Transfer işlemi sonrası membran görüntüsü

Ardından membran 1 dk ponceau S (0,5 g/l) ile boyanıp protein transferi doğrulandıktan sonra membrandaki fazla ponceau S kurutma kağıdına emdirildi ve membran 10 dk saf metanolde çalkalandı.



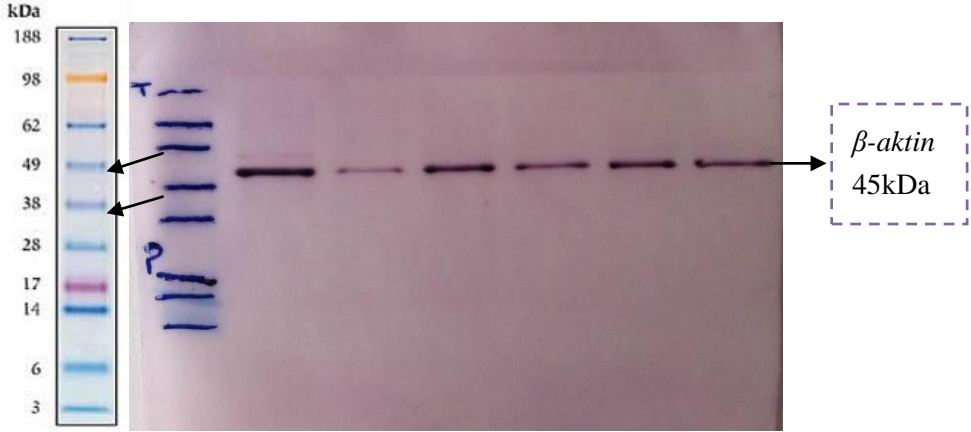
Şekil 3.9. Ponceau S ile boyama sonrası protein bantlarının görünümü

- **Antikor uygulaması**

Membran 3 kez 5'er dakika 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası bloklama sütüne alınan membran 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Bloklama sonrası membran 8 dakika 1X TBS, 7 dakika 1X TBS-Tween ile yıkandı. 3 ml BSA içine 6 µl primer antikor eklendi ve membran bu karışım içinde gece boyu +4 °C'de çalkalandı. Bu çalışmada Bax, Bcl-XL, kaspaz-8 ve β-aktin antikorları (Katalog numaraları sırasıyla 5023, 2762, 4790, 4970-Cell Signaling) kullanıldı. Ertesi sabah membran çözüldüden çıkarıldıktan sonra 5 dakika 1X TBS, 10 dakika 1X TBS-Tween ile yıkandı. Yıkamadan sonra 10 ml bloklama sütü içine 10 µl sekonder antikor (Katalog no. 7054 Anti-rabbit IgG AP-linked Antibody, Cell Signaling) eklendi ve membran bu karışım içinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalandı. Sonra membran 5 dakika 1X TBS, 10 dakika TBS-Tween ile yıkandı.

- **Görüntüleme**

Yıkama işleminin hemen ardından membrandaki fazla yıkama tamponu kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı ve görüntüleme işlemine geçildi. Görüntüleme işlemi BCIP/NBT boyası ile yapıldı. BCIP ve NBT (1:1) oranda karıştırılarak membran üzerine 1 ml uygulama yapıldı. Birkaç dakika bekledikten sonra membranda görüntü elde edildi. Bantlar belirdikten sonra membran fotoğraflandı.



Şekil 3.10. Görüntüleme işlemi sonrası protein bantlarının membran üzerindeki görüntüsü

- **Veri Analizi**

Western blot yöntemiyle membran üzerinde elde edilen görüntülerin fotoğrafı taranarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve Image J (imagej.softpedia.com) programı kullanılarak analizi yapıldı. Analizde her bir bantın alanı hesaplanarak bu alana göre sayısal değerler elde edildi. Araştırılan genin her saat dilimi için elde edilen değerleri (0, 2, 4, 8, 24, 48. saatler) tek tek referans genin, hesaplanan alan sonucu elde edilen değerlerine bölündü. Referans gen ile normalize edilen uygulama grubu değerleri (2, 4, 8, 24 ve 48. saatler) 100 ile çarpılıp kontrol grubu (0. saat) değerine bölünerek sayısal değerler elde edildi. Elde edilen bu değerler ile grafik çizildi. Referans gen olarak *β-aktin* kullanıldı. Analiz için her örneğin en az üç ayrı verisi kullanıldı.

Tablo 3.5. Western blot deneyinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri

| | |
|---|---|
| PAGE yükleme tamponu 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 2,4 ml %20 SDS: 3 ml %100 Gliserol: 3 ml β -merkaptotanol: 1,6 ml Bromfenol mavisi: 0,006 g | 10X TBS stok (pH:7,6) TRIS: 24,2 g NaCl: 80 g Distile su: 1 litre |
| 1X TBS + Tween % 0,1'lik kullanılır 100 ml 1X TBS'e 100 μ l Tween | BSA (10 ml için) 0,5 g BSA 1 ml 10X TBS 10 μ l Tween 20 |
| Bloklama sütü 2,5 g süt tozu 5 ml 10X TBS 25 μ l Tween 20 Distile su: 50 ml | Lizis tamponu 219,15 mg NaCl 151,37 mg Tris, pH:8.0 250 μ l Triton-X-100 Distile su: 25 ml |

3.5. RNA İzolasyonu ve RT-PCR

Hücre yoğunluğu 75 cm²lik kültür kabında 1x10⁶ya ulaştığında 2 kültür kabındaki hücreler toplandı. Toplama işleminde kültür kabındaki besiyeri atıldı, hücreler 2 kez 3 ml PBS ile yıkandı ve 2,25 ml tripsin-EDTA eklenerek 5 dk 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda inkübe edildi. Ardından tripsin-EDTA ile kaldırılmış hücrelere besiyeri ilave edildi ve hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası besiyeri ve tripsin-EDTA içeren solüsyon döküldü. Dibe çöken hücreler 2 ml PBS ile resüspanse edilerek 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Fazla PBS dökülerek dipteki hücrelere 20 ml besiyeri eklendi ve mililitresinde 1 milyon hücre olan solüsyon elde edildi. Baicalein uygulamasından önce bu çözeltinin 2 ml'si 0. saat protein izolasyonu için ayrıldı. Kalan çözeltiliye 4 μ M konsantrasyonda baicalein uygulaması yapıldı. Uygulama sonrasında hücreler

inkübe edildi. Uygulamadan önce 0. saat RNA izolasyonu için ayrılan 2 milyon hücre RNeasy total RNA izolasyon kiti (Qiagen, Maryland, USA) kullanılarak üretici firmanın önerilerine uygun olarak total RNA izole edildi.

Total RNA izolasyon protokolü:

- 1) İki milyon hücre 800 rpm'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi.
- 2) Besiyeri uzaklaştırıldı ve pellet 350 ml RLT tamponu ile homojenize edildi. Hücrelerin parçalanması amacıyla çözelti 5 kez şırıngadan (G20) geçirildi.
- 3) Eşit hacimde %70'lik etanol eklenip pipetaj yapıldı.
- 4) Çözelti spin kolona alındı ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüjlendi.
- 5) Alttaki kolondan çıkan sıvı uzaklaştırıldı.
- 6) Kolona 700 ml RW1 tamponu eklendi ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
- 7) Alttaki kolondan çıkan sıvı dökülerek 500 ml RPE tamponu eklendi ve aynı koşullarda santrifüj yapıldı.
- 8) Tekrar 500 ml RPE tamponu eklendi ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.
- 9) Kolon toplama tüpüne alındı ve maximum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 10) Kolon yeni bir Ependorf tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen distile su eklendi.
- 11) 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak RNA Ependorf tüpte toplandı ve derin dondurucuda -80 °C'de saklandı.

Baicalein uygulaması yapılan hücreler 2, 4, 8, 24 ve 48. saatlerde toplandı. Hücreler toplanırken çözeltideki hücre yoğunluğu spektrofotometrede ölçüldü ve her saat dilimi için 2 milyon hücre alındı. Toplanan bütün örnekler için izolasyon işlemleri tekrarlandı. TaqMan Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biosystems) kullanılarak izole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 3.6. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| RNA (1µg) | X µl |
| 10X buffer | 5 µl |
| MgCl ₂ | 11 µl |
| dNTP | 10 µl |
| Random Hexamer | 1.25 µl |
| Oligo d(T) | 1.25 µl |
| RNase inhibitörü | 1 µl |
| Revers transkriptaz | 1 µl |
| ddH ₂ O (RNaz içermeyen) | (19.5 – X) µl |
| Toplam hacim | 50 µl |

cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon koşulları:

25 °C 10 dakika

48 °C 30 dakika

95 °C 5 dakika

Elde edilen cDNA'lar Real-time PCR'da kullanıldı. Uygulama SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile yapıldı. Real-time PCR'da *Bax*, *Bcl-2*, *12-LOX*, *15-LOX* (iki farklı primer çifti), *5-LOX* ve *GAPDH* genleri için dizayn edilmiş primerler kullanıldı.

Real-Time PCR içeriği (1 örnek için):

SYBR Green Master Mix: 5 µl

F primer: 0,2 µl

R primer: 0,2 µl

dH₂O: 3,6 µl

cDNA: 1 µl

Tablo 3.7. RT-PCR için kullanılan primerler

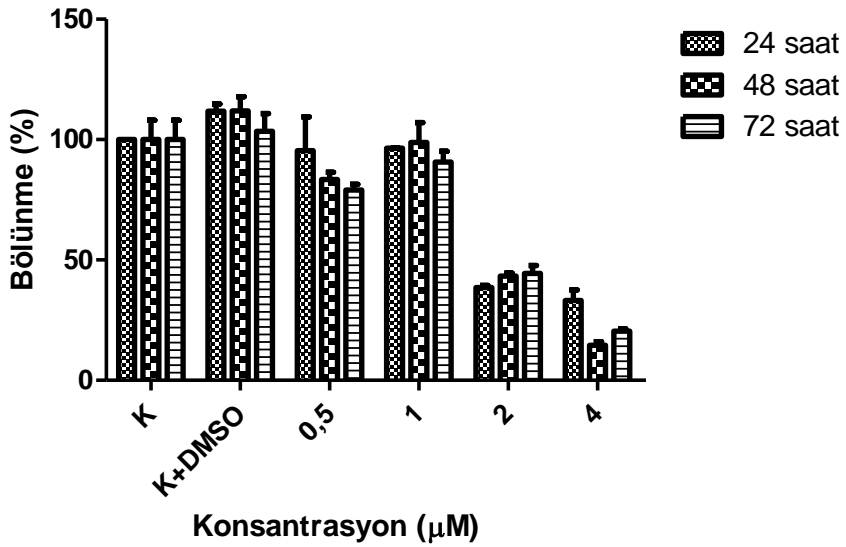
| | | |
|-----------------------|--|--------|
| <u><i>Bax</i></u> | (F) 5'-ATGCGTCCACCAAGAAGC-3' (R) 5'-ACGGCGGCAATCATCCTC-3' (Chen vd., 2010) | 91 bç |
| <u><i>Bcl-2</i></u> | (F) 5'-GTGTGGAGAGCGTCAACC-3' (R) 5'-CTTCAGAGACAGCCAGGAG-3' (Chen vd., 2010) | 182 bç |
| <u><i>12LOX</i></u> | (F) 5'-AGAATGGTTCCTGTTTGAAGCT-3' (R) 5'-CCATTGGGCTCCATCTTCAG-3' (Hu vd., 2013) | 98 bç |
| <u><i>15LOX-1</i></u> | (F) 5'-GCTGCGGCTCTGGGAAATCATCT-3' (R) 5'-GGGCCCCGAAAATACTCCTCCTCA-3' (Hu vd., 2013) | 458 bç |
| <u><i>15LOX-2</i></u> | (F) 5'-TGATGACAAGTGGGACTGGTTGCT-3' (R) 5'-ACTCAGAGAAGCCTTCAATGCCGA-3' (Hu vd., 2013) | 280 bç |
| <u><i>5LOX</i></u> | (F) 5'-CCAAAGCGATGGAGAACCTG-3' (R) 5'-GCAGAAGGTGGGTGATGGTC-3' (Hu vd., 2013) | 563 bç |
| <u><i>GAPDH</i></u> | (F) 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' (R) 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' (Gilsbach vd., 2006) | 87 bç |

PCR reaksiyonları sonucu elde edilen ortalama C_T değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplandı. Uygulama grubu (2, 4, 8, 24 ve 48. saatler) C_T değerlerinden referans gen (2, 4, 8, 24 ve 48. saatler) C_T değerleri çıkarıldı. Kontrol grubu (0. saat) C_T değerinden referans gen (0. saat) C_T değeri çıkarıldı. Böylece uygulama ve kontrol gruplarının ayrı ayrı ΔC_T değerleri hesaplandı. Uygulama grubu ΔC_T değerinden kontrol grubu ΔC_T değerinin çıkarılmasıyla $\Delta\Delta C_T$ değeri hesaplandı. Bu değerler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülünde yerine konularak gen ifadesi analizleri yapıldı. Her bir deney aşamasında her bir örnek ve ölçüm için üç tekrarlı çalışıldı ve her bir deney ayrı zamanlarda en az üç kez tekrar edildi.

4. BULGULAR

4.1. Proliferasyon

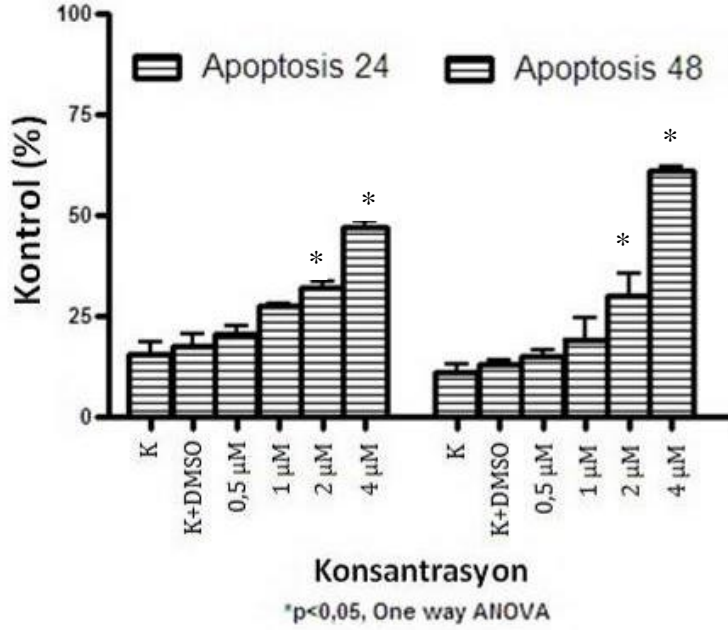
Baicaleinin proliferasyona etkisi süreye ve doza bağlı olarak araştırılmıştır. Bu deneyde baicaleinin uygulanan dozlarında (0,5-1-2 ve 4 μM) 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde uygulamadan sonraki 24. ve 48. saatte kontrol hücreleriyle kıyaslandığında özellikle 2 ve 4 μM 'lık konsantrasyonun canlı hücre sayısını %50'nin üzerinde azalttığı görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Baicaleinin canlı hücre sayısına olan etkisi (MTT yöntemi)

4.2. Apoptoz

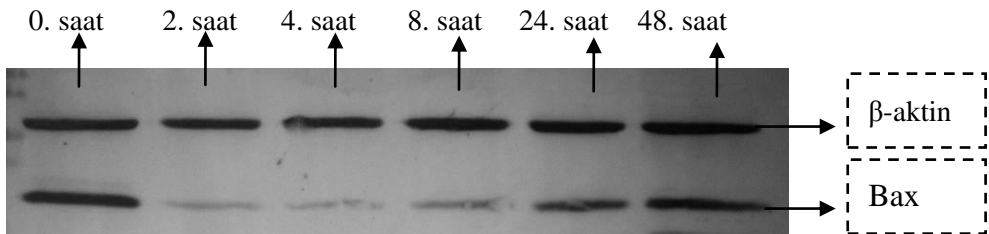
Baicalein uygulaması sonucu apoptotik hücrelerin oranlarının belirlenmesi amacıyla HO/PI yöntemi kullanılmıştır. Yapılan proliferasyon deneyinde elde edilen ve etkin olduğu belirlenen konsantrasyonlardan 4 μM 'lık konsantrasyonun 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda apoptotik hücrelerin istatistiksel olarak anlamlı bir oranda ($p < 0,05$) arttığı görülmektedir (Şekil.4.2). 72. ve 96. saatlerde hücreler canlılığını yitirdiğinden bu grafiklere yer verilmemiştir.



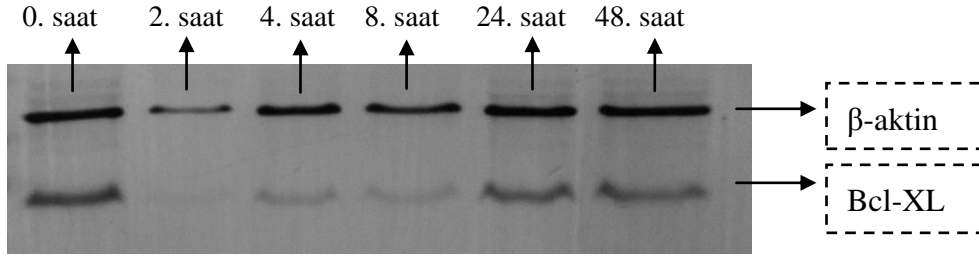
Şekil 4.2. Baicalein ile muamele edilen hücrelerde apoptoz oranı (24. ve 48.saat)
*Önemli artış gösteren konsantrasyonlar

4.3. Western Blot Analizleri

Apoptoz ilişkili proteinlerin seviyelerinin belirlenmesi için yapılan Western blot deneyinde Bax ve Bcl-XL proteinleri için yapılan çalışmada aşağıdaki jel görüntüleri elde edilmiştir. Bu çalışmada Bcl-2 proteini için de Western blot çalışması yapılmış ancak Bcl-2 antikorunun çalışmaması nedeniyle bu proteini görüntülemek mümkün olmamıştır. Deneyde belirlenen altı farklı zaman aralığında etkin doz olarak saptanan 4 µM konsantrasyon uygulanmıştır. Protein seviyesinin karşılaştırılması için referans gen ürünü olarak β -aktin kullanılmıştır (Şekil 4.3 ve 4.4).

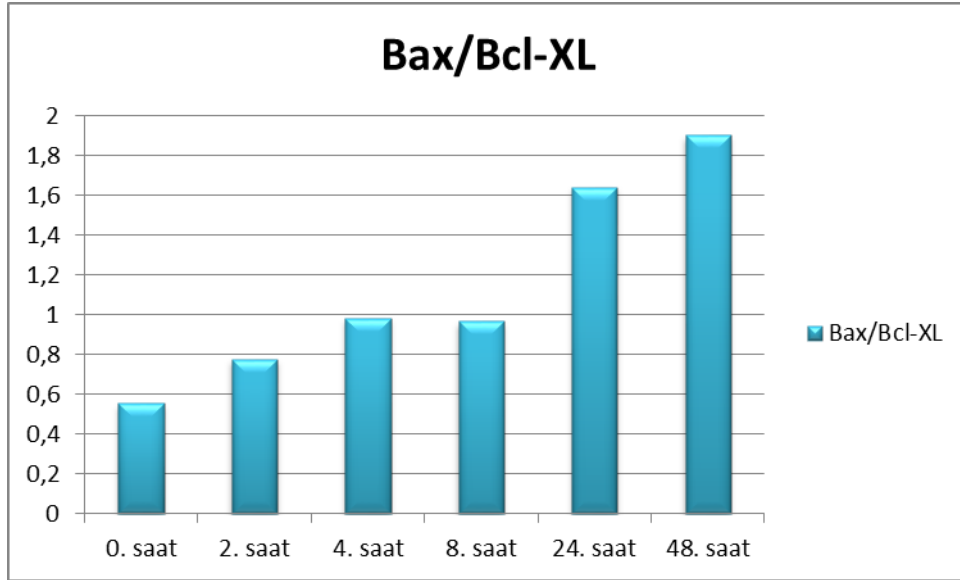


Şekil 4.3. Western blot membran görüntüleri (Bax, β -aktin)



Şekil 4.4. Western blot membran görüntüleri (Bcl-xL, β -aktin)

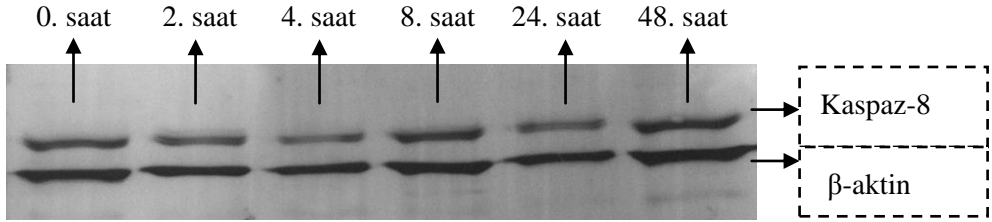
Membran görüntüleri Image J programı ile analiz edilmiştir. Analizde her bir bantın alanı hesaplanarak bantların yoğunlukları sayısal olarak elde edilmiş ve aşağıdaki grafik çizilmiştir (Şekil 4.5). Grafikte Bax/Bcl-XL oranındaki artış görülmektedir.



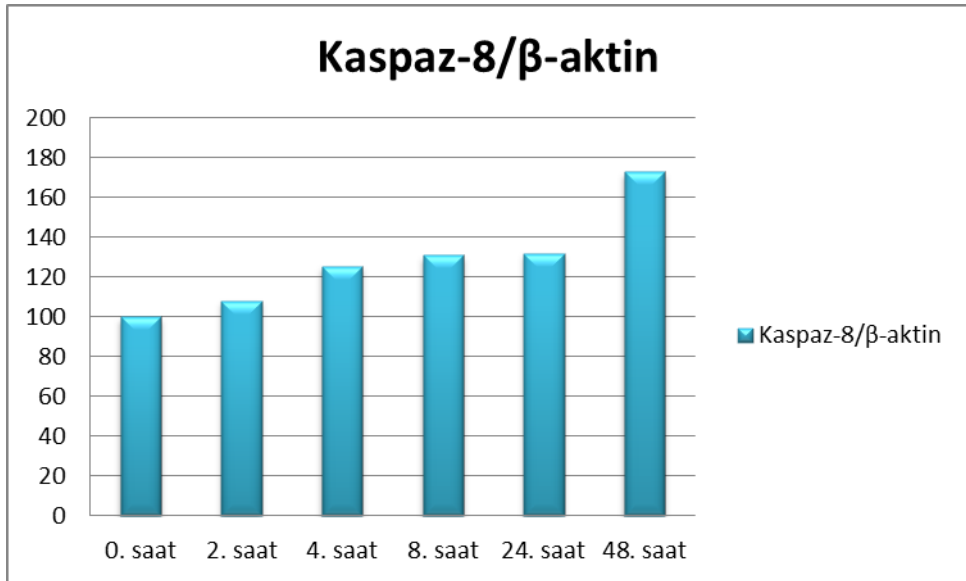
Şekil 4.5. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak Bax/Bcl-XL oranındaki değişiklik

Verilerin desteklenmesi amacıyla kaspaz-8 proteini için de Western blot deneyi yapılmış ve aşağıdaki sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.6). Deneyde 4 μ M konsantrasyon uygulanmıştır.

Western blot deneyinin membran görüntülerinde yer alan bantların yoğunluklarına bağlı grafikler çizilmiştir. Grafikte kaspaz-8 ifadesindeki artış görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Western blot membran görüntüleri (Kaspaz-8, beta-aktin)

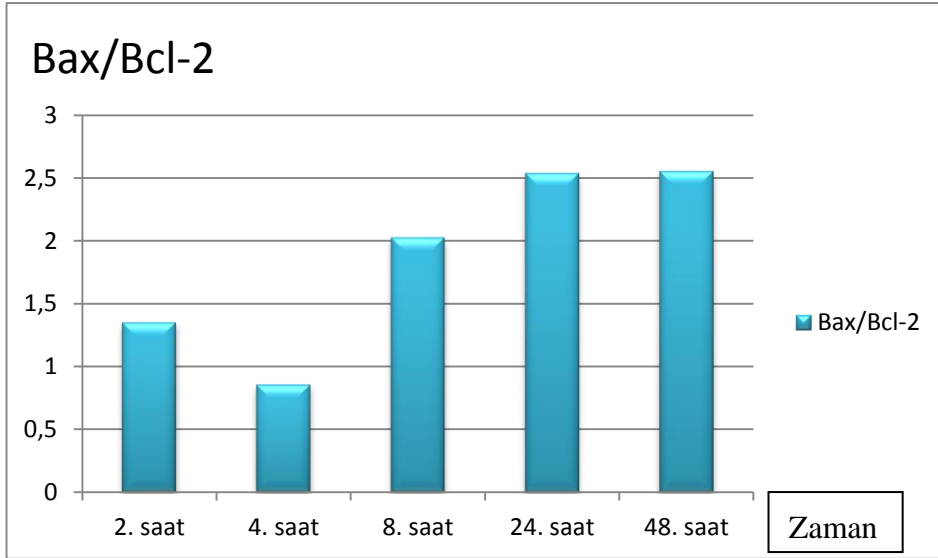


Şekil 4.7. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak kaspaz-8 ifadesindeki değişiklik

4.4. RT-PCR

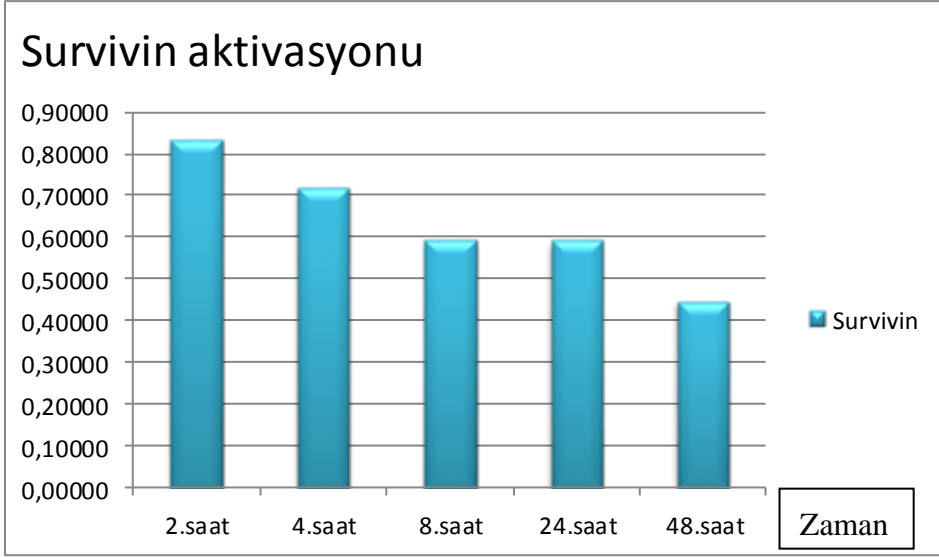
Baicalein ile muamele edilen hücrelerden izole edilen total RNA'lardan gen ifade seviyelerinin belirlenmesi için RT-PCR çalışması yapıldı. Real-Time PCR uygulamasında elde edilen amplifikasyon eğrilerinin C_T 'lerinden $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplanarak aşağıdaki grafik elde edilmiştir (Şekil 4.8). Grafikte 24. ve 48. saatlerde 4 μ M baicalein uygulamasının apoptoz için belirteç olan Bax/Bcl-2 oranında bir artışa yol açtığı görülmektedir (Şekil 4.8). Aynı uygulama ve süreler

için survivin ve LOX genleri için de RT-PCR ile gen ifadesi çalışması yapılmıştır. Survivin gen ifadesinde azalma görülürken (Şekil 4.9), LOX genlerinden sadece 12-LOX ifadesi saptanabilmiş ve bu gen ifadesinin değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.10). Bunun dışında diğer LOX genleri için (5-LOX ve 15-LOX) ifade saptanmamıştır.

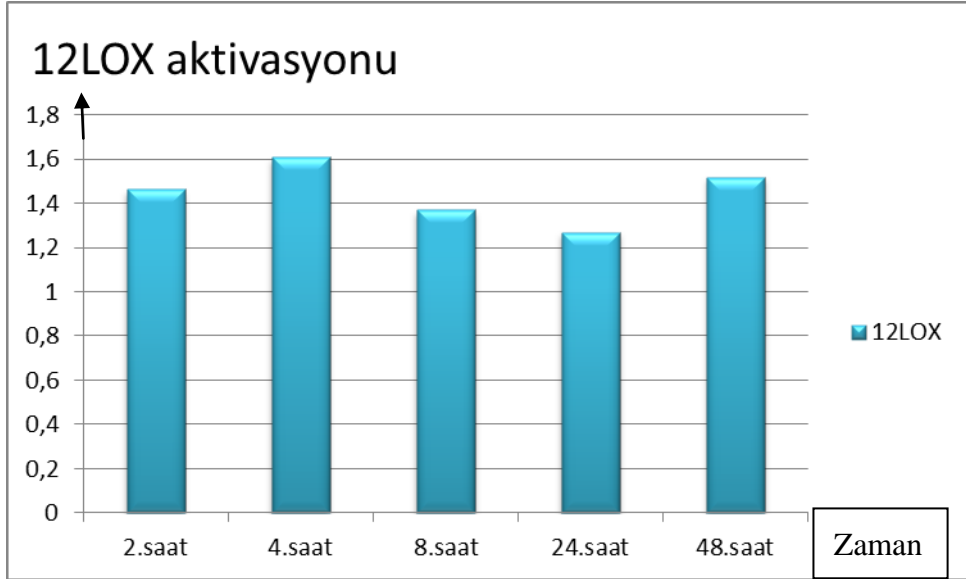


Şekil 4.8. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak RT-PCR sonuçlarına göre Bax/Bcl-2 oranındaki değişiklik

Verilerin desteklenmesi amacı ile survivin proteini için Real-Time PCR uygulaması yapılmıştır. Elde edilen verilerden aşağıdaki grafik çizilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak RT-PCR verilerine göre *survivin* gen ifadesi



Şekil 4.10. Baicaleinin uygulama süresine bağlı olarak RT-PCR verilerine göre *12-LOX* gen ifadesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptoz, kaspaz aktivasyonunun merkezi rol oynadığı, özgül morfolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterize edilen, özenle düzenlenmiş enerji bağımlı bir süreç olarak kabul edilir. Apoptotik yolları aktif veya inaktif eden önemli apoptotik proteinlerin çoğu tespit edilmiştir (Elmore, 2007). Hücre ölümünün düzenlenmesindeki anormallikler hastalıkların önemli bir etkeni olabilir. Bazı durumlarda aşırı apoptoz olurken, diğer durumlarda yetersiz apoptoz görülebilir. Pek çok patolojik durumda normalden fazla apoptoz özelliği vardır. Böyle hastalıklarda (örneğin nörodejeneratif hastalıklar, AIDS) apoptoz yapay olarak inhibe edilebilir. Anti-apoptotik tedavinin olası yöntemlerinin kısa listesi IAP ailesi proteinlerin uyarılması, kaspaz inhibisyonu, PARP inhibisyonu, PKB/Akt yolunun uyarılması ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin inhibisyonunu içerir. Kanser, hücre döngüsü düzenlenmesinde normal mekanizmanın işlevsiz olduğu bir hastalıktır (King ve Cidlowski, 1998). Kanser sırasında apoptoz baskılanmasının bazı kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr vd., 1994). Tümör hücreleri, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin yüksek ifadesi ya da Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin düşük ifadesi veya mutasyonu ile apoptoza karşı direnç geliştirebilirler (Miyashita vd., 1994).

Epidemiyolojik çalışmalar beslenmede flavonoidlerin alınmasındaki artışın iltihap, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, bakteriyel ve viral enfeksiyonlardaki riskin azalması ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Arts ve Hollman, 2005; Knekt vd., 2002). Flavonoidler bitkilerin ikincil ürünleridir ve böylece meyve, sebze ve diğer gıdalarla günlük olarak alınabilir. Besinsel flavonoid çalışmaları, hücre kültüründe hücre çoğalmasının engellenmesi, apoptoz indüksiyonu, bazı hücre içi enzim aktivitesinde değişiklikler ve antioksidan özellikleri de dahil olmak üzere bu moleküllerin biyolojik aktivitelerini geniş bir yelpazede ortaya koymuştur (Havsteen, 2002). En önemlisi, flavonoidler normal periferik kan ve myeloid hücreleri veya normal hepatositler üzerinde hemen hemen hiç toksik etki göstermemektedir (Hwang vd., 2006; Chen vd., 2009). Baicaleinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklemeye yeteneği ve hücre çoğalmasındaki inhibitör etkisi yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Cheng vd., 2012). Bu bileşik hücre döngüsünün durmasına sebep olur ve kanser hücrelerinin çoğalmasını önler. Ayrıca, baicalein çeşitli insan kanser hücre hatlarında apoptoza yol açar (Chen vd., 2000; Po vd., 2002; Kuo vd., 2009). Ancak, baicaleinin anti-metastatik

yeteneklerinin altında yatan kesin mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (Chiu vd., 2011).

Bu çalışmada baicaleinin insan osteosarkoma hücre hattında apoptoz ve *LOX* geni (*12-LOX*, *15-LOX* ve *5-LOX*) mRNA ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. *LOX*'un kanser hücrelerinin ölümünü ve büyümeyi düzenlediği gösterilmiştir (Jiang vd., 2003). Farklı çalışmalar apoptotik hücrelerin kaldırılması sırasında 12/15-*LOX*'un potansiyel rolünü göstermiştir. Makrofajlar tarafından apoptotik hücre fagositozunun 12/15-*LOX* ifadesini arttırdığı ve fagositin plazma zarına bu enzimin translokasyonu ile bağlandığını göstermiştir (Miller vd., 2001; Uderhardt ve Krönke, 2012). Meme kanserinde normal doku ile karşılaştırıldığında tümörlü dokuda 12-*LOX* ifadesi yüksek, 15-*LOX* ifadesi ise düşük bulunmuştur (Jiang vd., 2003).

İlk olarak baicaleinin proliferasyona etkisini saptamak üzere MTT-proliferasyon yöntemi kullanılmıştır. Deney sonucunda baicaleinin 2 ve 4 μM 'lık konsantrasyonlarının, kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, canlı hücre sayısını zamana bağlı olarak %50'nin üzerinde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.1). Farklı hücre hatları ile yapılan çalışmalarda hücre tipine göre baicaleinin etkin konsantrasyonları da farklılık göstermiştir. İnsan kolon kanseri hücre hatları HCT-116 ve HT-29 ile yapılan çalışmada, baicalein 20-50 μM konsantrasyonlarda kayda değer bir anti-proliferatif etki göstermiştir. HT-29 çoklu ilaç direncine sahip olduğundan, bu hücre hattı için aktif madde konsantrasyonu HCT-116 için gerekli konsantrasyondan daha yüksektir (Wang vd., 2013). Promiyelositik lösemi HL-60 hücre hattında 10 μM baicalein uygulaması hücre büyümesini inhibe etmiştir (Özmen vd., 2010). Osteosarkoma hücre hatları ile yapılan çalışmalarda Saos-2 ve MG-63'ün gambogic asit ile tedavisinde 0,5 ve 1 μM 'lık konsantrasyonlar kullanılmıştır (Xin vd., 2013). Osteosarkoma hücre hatları U2OS, MG-63 ve Saos-2'ye oridonin uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, MTT uygulamasında etkin dozun 50 μM olduğu saptanmıştır. 3 hücre hattında da 50 μM 'lık konsantrasyon ve 24 saatlik uygulama apoptozu indüklemiştir (Jin vd., 2007). Deneylerde kullanılan konsantrasyonlar ve saatler uygulanan kimyasala ve hücre hatlarına göre değişiklik göstermektedir.

Baicaleinin apoptoz üzerine etkisini görmek amacıyla ilk olarak apoptotik hücrelerin morfolojik olarak saptanmasına dayanan HO/PI yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem apoptotik hücreleri morfolojik olarak saptamak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Darzynkiewicz vd., 1992; Eguchi vd., 1997; Grusch vd., 2002; Lim vd., 2007; Fuchs vd., 2012). Bu deney sonucunda 4 μM 'lık konsantrasyonun 24 ve 48 saatlik uygulamalarda apoptotik hücreleri anlamlı bir oranda ($p < 0,05$) arttırdığı görülmüştür (Şekil.4.2). Farklı hücre hatlarına (meme kanseri hücre hattı MCF-7, insan myeloma hücre hattı RPMI8226, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı H460, insan dil kanseri hücre hattı SCC-4, insan hepatoma hücreleri J5, insan skuamöz karsinom hücre hattı A431, oral kanser hücreleri HSC-3) baicalein uygulamasının yapıldığı diğer çalışmalarda da MTT yöntemi ve apoptoz için benzer süreler yer almaktadır (Po vd., 2002; Li vd., 2006; Leung vd., 2007; Lin vd., 2007; Kuo vd., 2009; Wu vd., 2011; Cheng vd., 2012).

Apoptozu saptamak amacıyla bu morfolojik yöntemin yanında moleküler yöntemler de kullanılmıştır. Apoptotik süreçte yer alan bazı pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin varlığını saptamak amacı ile Western blot yöntemi kullanılmıştır. Apoptotik süreçte önemli yeri olan anti-apoptotik protein Bcl-2 ve pro-apoptotik protein Bax'ın oranı tespit edilerek apoptozun varlığı araştırılmıştır. Bcl-2 protein ailesi üyeleri önemli apoptoz düzenleyicileridir (Cory ve Adams, 2002). Bcl-2 ailesi, sırasıyla sitokrom-c salınımını destekleyen ya da geciktiren pro- ve anti-apoptotik üyelerden oluşur (Zeiss, 2003). Bcl-2'nin apoptoz önleyici etkisi pro-apoptotik protein Bax ile kontrol edilir (Reed, 1994). Çalışmamızda elimizde bulunan Bcl-2 antikorumun çalışmaması nedeniyle diğer bir anti-apoptotik protein olan Bcl-XL antikoru kullanılmıştır. *Bcl-2* gen ifadesi ise total RNA'dan mRNA seviyesinde saptanmıştır. Deney sonrasında protein bantlarının yoğunluklarının sayısal olarak elde edilmesiyle uygulama süresine bağlı olarak Bax/Bcl-XL oranında artış görülmüştür (Şekil 4.5). Baicalein uygulaması ile pro-apoptotik protein Bax'ın ifadesinin artması ve anti-apoptotik protein Bcl-XL'nin ifadesinin azalması arasında süreye bağlı olarak bir paralellik görülmüştür. Yüksek Bax/Bcl-2 oranları daha fazla apoptotik aktiviteye yol açmaktadır (Jarskog vd., 2004). Bu yüzden bu pro-apoptotik/anti-apoptotik protein oranı apoptoz için belirleyici olmuştur. Bir baicalein türevi ile yapılan çalışmada HepG2 hücre hattında Bcl-2 ve Bax proteininin ifadesinin oranı (Bax/Bcl-2) aynı şekilde yükselmiştir (Zhou vd., 2013). Bir başka çalışmada baicalein ve wogonin uygulaması Bax'ın artan, Bcl-2'nin azalan ifadesi ile sonuçlanmıştır ve

uygulamanın HT-29 hücrelerinde apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (Kim vd., 2012). Bu verilerin desteklenmesi amacı ile apoptozda önemli yeri olan bir diğer protein kaspaz-8 ile çalışılmıştır. Apoptotik süreç efektör kaspazların hücre içinde diğer proteinlere bağlanmasıyla tetiklenir (Cohen, 1997; Rai vd., 2005). Kaspaz-8 aktif hale geldiğinde kaspaz-3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazları aktif hale getirir (Boldin vd., 1996; Muzio vd., 1996; Hui vd., 2004). Western blot deneyi sonucunda kaspaz-8 ifadesinde artış görülmüştür (Şekil 4.7). Buna benzer bir çalışmada, baicaleinin HL-60 hücrelerinde bid proteinin parçalanmasını indüklemesi sitokrom-c'nin mitokondriden sitozole çıkışı ve kaspaz-3, 8 ve 9 aktivasyonu ile sonuçlanmıştır (Wang vd., 2004). Saos-2 hücrelerine baicalein uygulaması Bax protein ifadesinin artmasıyla, sitokrom-c'nin mitokondriden çıkışı apoptotik süreci tetikleyen kaspaz-8 ifadesini arttırması ile sonuçlanmıştır. Bax/Bcl-XL oranı ve kaspaz-8 ifadesindeki artış baicaleinin doza ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediğini göstermiştir.

RT-PCR çalışması ile apoptoz ilişkili genlerin ifadeleri mRNA düzeyinde de araştırılmıştır. *Bax* gen ifadesi ve Western blot yönteminde saptanamayan *Bcl-2* gen ifadesi RT-PCR ile araştırılmıştır. Deney sonucunda Bax/Bcl-2 oranı artmıştır (Şekil 4.8). Bu sonuç proteinlerle yapılan deney sonuçları ile örtüşmektedir ve bu artış baicaleinin apoptozu indüklediğinin bir göstergesidir. LOX inhibitörü olarak bilinen baicalein sitokrom-c'nin mitokondriden sitozole salınmasına aracılık ederek apoptozu indükler (Tong vd., 2002). Çeşitli çalışmalar LOX inhibisyonunun farklı insan kanserlerinde apoptoza neden olduğunu göstermiştir (Avis vd., 2001). 12-LOX mRNA ve protein düzeyinde prostat, melanoma, göğüs ve diğer insan kanser hücre hatlarında tespit edilmiştir (Wong vd., 2001). Birçok rapor baicalein gibi 12-LOX inhibitörlerinin, önemli anti-proliferatif etkisinin bulunduğunu ve insan kanserlerinde apoptoza neden olduğunu göstermektedir (Ikemoto vd., 2004; Yoshimura vd., 2004). Baicaleinin apoptoz ilişkili proteinleri düzenleyerek hücre döngüsünü S fazında durdurma yoluyla apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Li vd., 2004; Leung vd., 2007). Bu çalışmada baicalein uygulamasından sonra *15-LOX* ve *5-LOX* mRNA ifadesi saptanmamıştır. *12-LOX* mRNA seviyelerinde bir değişme gözlenmemiştir (Şekil 4.10). Bu *15-LOX* ve *5-LOX* gen ifadesinin Saos-2 hücre hattında gerçekleşmediğini ve *12-LOX* geni için baicaleinin herhangi bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada ilave olarak, apoptoz inhibitör ailesinin (IAP) bir üyesi olan *survivin* gen ifadesi de RNA düzeyinde çalışılmıştır. Survivin insan kanserlerinin çoğunda aşırı eksprese edilir (Ambrosini vd., 1997; Xing vd., 2001). Survivin aktif kaspaz-3 ve kaspaz-7'ye bağlanarak apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (LaCasse vd., 1998). Survivin aynı zamanda hücre bölünmesini de mitoz bölünmede mitotik iğ ipliklerinde tübinle etkileşerek düzenler. Hücre bölünmesinin G2-M fazında yüksek oranda ifade edilir (Olie vd., 2000). Akut Lenfoblastik Lösemi CCRF-CEM hücrelerinde baicalein tedaviden 24 saat sonra survivin protein ifadesinde önemli azalmalara yol açmıştır (Chen vd., 2013). İki prostat kanseri hücre hattında (PC3 ve DU-145) baicalein tedavisine yanıt olarak survivin ve Bcl-2 protein ifadelerinde azalma gözlemlenmiştir (Pidgeon vd., 2002). Mesane kanseri hücre hattı BFTC905 hücrelerinde baicalein survivin protein seviyelerini konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azaltmıştır (Chao vd., 2007). Literatürler ile paralel olarak Saos-2 hücrelerine baicalein uygulaması sonucunda uygulama süresine bağlı olarak survivin ifadesinde azalma görülmüştür (Şekil 4.9).

Bu çalışma sonucunda baicaleinin Saos-2 hücre hattında *LOX* gen ifadeleri üzerinde herhangi bir etkisi saptanamazken, hücre bölünmesini durdurduğu ve apoptozu indüklediği ortaya konulmuştur. Diğer bir sonuç olarak apoptoz ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde rolü olan *survivin* gen ifadesinin de baicalein uygulaması ile azaldığı saptanmıştır. Baicaleinin bu anlamda hem survivin ile olan ilişkisinin hem de diğer hücre döngüsü ve apoptotik proteinlerin ifadeleri ile ilişkisinin araştırılması detaylı olarak baicaleinin anti-proliferatif ve apoptik mekanizmasını ortaya koyacaktır.

KAYNAKLAR

- Akşit, H., Bildik, A. 2008. Apoptozis. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 19(1): 55-63.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin expressed in cancer and lymphoma. **Nature Medicine**, 8: 917–921.
- American Cancer Society (<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/economic-impact-of-cancer>), Erişim Tarihi: 15.12.2013.
- Anderson, K.M., Seed, T., Vos, M., Mulshine, J., Meng, J., Alrefai, W., Ou, D., Harris, J.E. 1998. 5-Lipoxygenase inhibitors reduce PC-3 cell proliferation and initiate nonnecrotic cell death. **Prostate**, 1;37(3): 161-73.
- Anderson, P.M., Tomaras, M., McConnell, K. 2010. Mifamurtide in osteosarcoma a practical review. **Drugs Today**, 46: 327–337.
- Arts, I.C., Hollman, P.C. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81: 317S–325S.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. 1998. Death receptors: Signaling and Modulation. **Science**, 281: 1305-8.
- Avis, I.M., Jett, M., Boyle, T., Vos, M.D., Moody, T., Treston, A.M., Martinez, A., Mulshine, J.L. 1996. Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling. **Journal of Clinical Investigation**, 1:97(3): 806-13.
- Avis, I., Hong, S.H., Martinez, A., Moody, T., Choi, Y.H., Trepel, J., Das, R., Jett, M., Mulshine, J.L. 2001. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions, **Federation of American Societies for Experimental Biology**, 15(11): 2007-9.

- Baskić, D., Popović, S., Ristić, P., Nebojša, N. 2006. Arsenijević. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell Biology International**, 30(11): 924–932.
- Bellamy, C.O., Malcomson, R.D., Harrison, D.J., Wyllie, A.H. 1995. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. **Cancer Biology**, 6: 3-16.
- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubek, A., Jürgens, H., Winkler, K. 2002. Prognostic factors in highgrade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **Journal of Clinical Oncology**, 20(3): 776–790.
- Bielack, S.S., Machatschek, J.N., Flege, S., Jürgens, H. 2004. Delaying surgery with chemotherapy for osteosarcoma of the extremities. **Expert Opin Pharmacother**, 5(6): 1243-56.
- Bishop, J.M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, 44: 235-248.
- Bishop, J.M., Harold E. 1989. "the cellular origin of retroviral oncogenes". The Nobel Prize in Physiology or Medicine.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. 1996. **Cell**, 85: 803–815.
- Bone Cancer Research Trust (http://www.bcrct.org.uk/bci_symptoms_of_osteosarcoma.php), Erişim Tarihi: 28.01.2014
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments". **Clinical Chemistry**, 55(4): 611–22.

- Büyükgebiz, O., Caferler, J.S. 2001. Apoptoz. **Sendrom**, 13: 102-7.
- Cario, M., Croce, M.D. 2008. Oncogenes and Cancer **The New England Journal of Medicine**, 358: 502-511.
- Chao, J.I., Su, W.C., Liu, H.F. 2007. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. **Molecular Cancer Therapeutics**, 6: 3039-3048.
- Chen, B., Wang, X., Zhao, W., Wu, J. 2010. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 19: 29-99.
- Chen, C.H., Huang, T.S., Wong, C.H., Hong, C.L., Tsai, Y.H., Liang, C.C., Lu, F.J., Chang, W.H. 2009. Synergistic anti-cancer effect of baicalein and silymarin on human hepatoma HepG2 Cells. **Food and Chemical Toxicology**, 47(3): 638-44.
- Chen, C.H., Huang, L.L., Huang, C.C., Lin, C.C., Lee, Y., Lu, F.J., 2000. Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines: a potential medicine for hepatoma. **Nutrition and Cancer**, 38: 287–295.
- Chen, K.S., Hsiao, Y.C., Kuo, D.Y., Chou, M.C., Chu, S.C., Hsieh, Y.S. 2009. Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. **Leukemia Research**, 33: 297–307.
- Chen, Y.J., Wu, C.S., Shieh, J.J., Wu, J.H., Chen, H.Y., Chung, T.W., Chen, Y.K., Lin, C.C. 2013. Baicalein Triggers Mitochondria-Mediated Apoptosis and Enhances the Antileukemic Effect of Vincristine in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia CCRF-CEM Cells. **Evid Based Complement Alternat Medicine**, 2013:124747.
- Cheng, Y.H., Li, L.A., Lin, P., Cheng, L.C., Hung, C.H., Chang, N.W. Lin, C. 2012. Baicalein induces G1 arrest in oral cancer cells by enhancing the degradation of cyclin D1 and activating AhR to decrease Rb phosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 263(3): 360-7.

- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 32401–10.
- Chiu, Y.W., Lin, T.H., Huang, W.S., Teng, C.Y., Liou, Y.S., Kuo, W.H., Lin, W.L., Huang, H.I., Tung, J.N., Huang, C.Y., Liu, J.Y., Wang, W.H., Hwang, J.M., Kuo, H.C. 2011. Baicalein inhibits the migration and invasive properties of human hepatoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 255: 316–326.
- Choi, W.S., Lee, E.H., Chung, C.W. 2001. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. **Journal of Neurochemistry**, 77: 1531-1541.
- Clark, W.H. 1991. "Tumour progression and the nature of cancer". **British Journal of Cancer**, 64(4): 631–44.
- Cohen, G.M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, 326: 1–16.
- Cohen, J. J. 1993. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. **Hospital Practice**, 15: 35-43.
- Collins, A.R. 2002. Comet assay—principles, applications, and limitations. **Methods in Molecular Biology**, 203: 163–177.
- Cooper, G.M. 1992. Elements of human cancer. Jones and Bartlett Publishers, p. 16. Boston.
- Cory, S., Adams, J.M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, 2: 647–56.
- Croce, C.M. 2008. "Oncogenes and cancer". **The New England Journal of Medicine**, 358(5): 502–11.
- Cummings, M.C., Winterford, C.M., Walker, N.I. 1997. Apoptosis. **The American Journal of Surgical Pathology**, 21: 88-101.

- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Bino, G.D., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, 13(8): 795–808.
- Davies, P.C.W., Demetrius, L., Tuszynski, J.A. 2011. Cancer as a dynamic phase transition. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, 8: 30.
- Dikmen, M., Öztürk, N., Öztürk, Y. 2008. Nar Meyve Kabuğu Ekstresinin Mcf-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Sitotoksik Ve İnhibitör Etkileri. **Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 37(3): 179–190.
- Ding, X.Z., Hennig, R., Adrian, T.E. 2003. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. **Molecular Cancer**, 2: 10.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, 102: 33–42.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. 1997. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis. **Cancer Research**, 57: 1835-1840.
- Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. 2007. **Toxicologic pathology**, 35: 495-516.
- Engeland, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., Chris, P.M. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Reutelingsperger2 Cytometry**, 31: 1-9.
- Folkman, J. 2006. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 57:1-18. PMID:16409133.
- Fuchs, C., Rosner, M., Dolznig, H., Mikula, M., Kramer, N., Hengstschläger, M. 2012. Tuberin and PRAS40 are anti-apoptotic gatekeepers during early human amniotic fluid stem-cell differentiation. **Human Molecular Genetics**, 21(5): 1049-1061.

- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death & Differentiation**, 13: 1423–33.
- Gerner, C., Gotzmann, J., Fröhwein, U., Schamberger, C., Ellinger, A., Saueremann, G. 2002. Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation. **Cell Death & Differentiation**, 9(6): 671-81.
- Ghosh, J., Myers, C.E. 1997. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 18;235(2): 418-23.
- Gill, J., Manpreet, K., Ahluwalia., GelleR, D., Gorlick, R. 2013. New targets and approaches in osteosarcoma. **Pharmacology & Therapeutics**, 137(1): 89–99.
- Gilsbach, R., Kouta, M., Bönisch, H., Brüß, M. 2006. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. **BioTechniques**, 40: 173-177.
- Godard, T., Deslandes, E., Lebailly, P., Vigreux, C., Sichel, F., Poul, J.M., Gauduchon, P. 1999. Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. **Histochemistry Cell Biology**, 112: 155–161.
- Goodrich, D.W., Wang, N.P., Qian, Y.W., Lee, E.Y., Lee, W.H. 1991. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. **Cell**, 67: 293–302.
- Grusch, M., Polgar, D., Gfatter, S., Leuhuber, K., Huettenbrenner, S., Leisser, C., Fuhrmann, G., Kassie, F., Steinkellner, H., Smid, K., Peters, G.J., Jayaram, H.N., Klepal, W., Szekeres, T., Knasmüller, S., Krupitza, G. 2002. Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside. **Cell Death & Differentiation**, 9: 169 ± 178.

- Guo, X.E., Ngo, B., Modrek, A.S., Wen-Hwa, L. 2014. Targeting Tumor Suppressor Networks for Cancer Therapeutics. **Current Drug Targets**, 15(1): 2-16.
- Günel, T. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, 27: 763-767.
- Hacker, G. 2000. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Research**, 301: 5–17.
- Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 96: 67–202.
- Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., Martin, S.J. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf- 1 apoptosomes. **EMBO Journal**, 23: 2134–45.
- Hoque, A., Lippman, S.M., Wu, T.T., Xu, Y., Liang, Z.D., Swisher, S., Zhang, H., Cao, L., Ajani, J.A., Xu, X.C. 2005. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. **Carcinogenesis**, 26(4): 785-791.
- Hsieh, C.J., Hall, K., Ha, T., Li, C., Krishnaswamy, G., Chi, D.S. 2007. Baicalein inhibits IL-1 β - and TNF- α -induced inflammatory cytokine production from human mast cells via regulation of the NF- κ B pathway. **Clinical and Molecular Allergy**, 5: 5.
- Hu, Y., Sun, H., O'Flaherty, J.T., Edwards, I.J. 2013. 15-Lipoxygenase-1-mediated metabolism of docosahexaenoic acid is required for syndecan-1 signaling and apoptosis in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, 34(1): 176–182.
- Hui, H., Dotta, F., Mario, U.D., Perfetti, R. 2004. Role of Caspases in the Regulation of Apoptotic Pancreatic Islet Beta-Cells Death. **Journal of Cellular Physiology**, 200: 177–200.

- Hwang, J.M., Kuo, H.C., Tseng, T.H., Liu, J.Y., Chu, C.Y. 2006. Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cells. **Archives of Toxicology**, 80: 62–73.
- Ikemoto, S., Sugimura, K., Kuratukuri, K., Nakatani, T. 2004. Antitumor effects of lipoxygenase inhibitors on murine bladder cancer cell line (MBT-2). **Anticancer Research**, 24: 733–736.
- Israels, L.G., Israels, E.D. 1999. Apoptosis. *The Oncologist*; 4:332-9.
- King KL, Cidlowski JA. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. **Annual Review of Physiology**, 60: 601-17.
- Jarskog, L.F., Selinger, E.S., Lieberman, J.A., Gilmore, J.H. 2004. Apoptotic Proteins in the Temporal Cortex in Schizophrenia: High Bax/Bcl-2 Ratio Without Caspase-3 Activation. **The American Journal of Psychiatry**, 161: 109–115.
- Jiang, W.G., Douglas-Jones, A., Mansel, R.E. 2003. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **PLEFA**, 69(4): 275–281.
- Jin, S., Shen, J., Wang, J., Huang, G., Zhou, J.G. 2007. Oridonin Induced Apoptosis Through Akt and MAPKs Signaling Pathways in Human Osteosarcoma Cells. **Cancer Biology & Therapy**, 6(2): 261-8.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., Penninger, J.M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, 410: 549–54.
- Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., Tschopp, J. 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. **The Journal of Immunology**. 161: 3936–42.

- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, 26: 239-245.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, 73: 2013–26.
- Kim, S.J., Kim, H.J., Kim, H.R., Lee, S.H., Cho, S.D., Choi, C.S., Nam, J.S., Jung, J.Y. 2012. Antitumor actions of baicalein and wogonin in HT-29 human colorectal cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, 6(6): 1443-9.
- Kimura, Y., Kubo, M., Tani, T., Arichi, S., Ohminami, H., Okuda, H. 1981. Studies on *Scutellariae radix*. III. Effects on lipid metabolism in serum, liver and fat cells of rats. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 29: 2308–2312.
- King, K.L., Cidlowski, J.A. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. **Annual Review of Physiology**, 60: 601–17.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **EMBO Journal**, 14: 5579–88.
- Klein, C.A. 2008. "Cancer. The metastasis cascade". **Science**, 321(5897): 1785–7.
- Kleinsmith, L.J. 2006. Principles of Cancer Biology. **Benjamin Cummings**, 22-29.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 76: 560–568.
- Knillová, J., Kolár, Z., Hlobilková, A. 2003. The significance of key regulators of apoptosis in the development and prognosis of prostate carcinoma. II. Products of suppressor genes Rb and PTEN, CDKI, Fas. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 147(1): 11-7.

- Knillová, J., Kolár, Z. 2003. The significance of key regulators of apoptosis in the development and prognosis of prostate carcinoma. I. Proteins of the Bcl-2 family and protein p53. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 147(1): 3-10.
- Ko, J.C., Su, Y.J., Lin, S.T., Jhan, J.Y., Ciou, S.C., Cheng, C.M., Chiu, Y.F., Kuo, Y.H., Tsai, M.S., Lin, Y.W. 2010. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via downregulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2. **Lung Cancer**, 69: 155-164.
- Kubo, M., Matsuda, H., Tani, T., Arichi, S., Kimura, Y., Okuda, H. 1985. Studies on *Scutellaria radix*. XII. Anti-Thrombic Actions of various Flavonoids from *Scutellaria radix*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 33(6): 2411-2415.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2005. Cellular adaptations, cell injury, and cell death. Pathologic basis of disease. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. Elsevier Saunders, 2005: 3-46, Philadelphia, Pennsylvania.
- Kumar, V. 2009. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition, 8th ed. Saunders, An Imprint of Elsevier.
- Kuo, H.M., Tsai, H.C., Lin, Y.L., Yang, J.S., Huang, A.C., Yang, M.D., Hsu, S.C., Chung, M.C., Wood, W.G., Chung, J.G. 2009. Mitochondrial-dependent caspase activation pathway is involved in baicalein-induced apoptosis in human hepatoma J5 cells. **International Journal of Oncology**, 35: 717-724.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **The Journal of Immunology**, 171: 4672-9.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., MacKenzie, A.E. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. **Oncogene**, 17: 3247-3259.

- Lee, H.Z., Leung, H.W., Lai, M.Y., Wu, C.H. 2005. Baicalein-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung squamous carcinoma CH27 cells. **Anticancer Research**, 25: 959–64.
- Leung, H.W., Yang, W.H., Lai, M.Y., Lin, C.J., Lee, H.Z. 2007. Inhibition of 12-lipoxygenase during baicalein-induced human lung nonsmall carcinoma H460 cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, 45(3): 403-11.
- Li-Weber, M. 2009. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. **Cancer Treatment Reviews**, 35: 57–68.
- Li, Y.C., Tyan, Y.S., Kuo, H.M., Chang, W.C., Hsia, T.C., Chung, J.G. 2004. Baicalein induced in vitro apoptosis undergo caspases activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 42: 37–43.
- Li, Q., You, Y., Chen, Z., Lü, J., Shao, J., Zou, P. 2006. Role of Baicalein in the regulation of proliferation and apoptosis in human myeloma RPMI8226 cells. **Chinese Medical Journal**, 119(11): 948-952.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **The New England Journal of Medicine**, 343(2): 78-85.
- Lin, Y.T., Yang, J.S., Lin, H.J., Tan, T.W., Tang, N.Y., Chaing, J.H., Chang, Y.H., Lu, H.F., Chung, J.G. 2007. Baicalein Induces Apoptosis in SCC-4 Human Tongue Cancer Cells *via* a Ca²⁺-dependent Mitochondrial Pathway. **in vivo**, 21: 1053-1058.
- Lin, C.C., Shieh, D.E., 1996. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. **The American Journal of Chinese Medicine**, 24: 31–36.

- Lin, M.L., Lu, Y.C., Chung, J.G., Li, Y.C., Wang, S.G., NG, S.H., Wu, C.Y., Su, H.L., Chen, S.S. 2010. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. **Cancer Letters**, 291: 46-58.
- Lim, S.C., Choi, J.E., Kim, C.H., Duong, H.Q., Jeong, G.A., Kang, H.S., HAN, S.I. 2007. Ethyl pyruvate induces necrosis-to-apoptosis switch and inhibits high mobility group box protein 1 release in A549 lung adenocarcinoma cells. **International Journal of Molecular Medicine** 20: 187-192.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods**, 25: 402-408.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, 104: 487–501.
- Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Vandenabeele, P. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. **Cell Death & Differentiation**, 9: 20–6.
- Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P. 2000. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. **Spine**, 25: 1859-1866.
- Majno, G., Torisl, A. 1995. Apoptosis oncosis and necrosis. **American Journal of Pathology**, 146: 3-15.
- Martinez, J. D., Parker, M.D., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A., Gerner, E.W. 2003. *Molecular Biology of Cancer*. John Wiley&Sons, Inc, Chapter One, 1-50, Arizona.
- Miller, Y.I., Chang, M.K., Funk, C.D., Feramisco, J.R., Witztum, J.L. 2001. 12/15-Lipoxygenase translocation enhances site-specific actin polymerization in macrophages phagocytosing apoptotic cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 276(22): 19431–19439.

- Mirabello, L., Troisi, R.J., Savage, S.A. 2009. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**, 115: 1531–1543.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J. C. 1994. Tumor suppressor *p53* is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, 9: 1799–805.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Kramer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. 1996. **Cell**, 85: 817–827.
- Nagashima, T., Ichimiya, S., Kikuchi, T., Saito, Y., Matsumiya, H., Ara, S. 2011. Arachidonate 5-lipoxygenase establishes adaptive humoral immunity by controlling primary B cells and their cognate T-cell help. **American Journal of Pathology**, 178: 222-232.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. **Cell**, 88: 355-365.
- National Cancer Institute (<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>). Erişim Tarihi: 07.02.2014.
- Naveenkumar, C., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Jagan, S., Anandakumar, P., Augustine, T.A., Kamaraj, S., Devaki, T. 2012. Potent antitumor and antineoplastic efficacy of baicalein on benzo(a)pyrene-induced experimental pulmonary tumorigenesis. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 26(2): 259-70.
- Nelson, P.N., Reynolds, G.M., Waldron, E.E., Ward, E., Giannopoulos, K., Murray, P.G. 2000. Monoclonal Antibodies. **Molecular Pathology**, 53(3): 111-7.
- Newmeyer, D.D., Bossy-Wetzell, E., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Beere, H.M., Green, D.R. 2000. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. **Cell Death & Differentiation**, 7: 402–7.

- Nicholson, D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death & Differentiation**,6: 1028-1042.
- Ogbomo, H., Michaelis, M., Klassert, D., Doerr, H.W., Cinatl, J.Jr. 2008. Resistance to Cytarabine Induces the Up-regulation of NKG2D Ligands and Enhances Natural Killer Cell Lysis of Leukemic Cells. **Neoplasia**, 10(12): 1402–1410.
- Oláh, E. 2005. Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. **The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 16: 2.
- Olie, R.A., Simões-Wüst, A.P., Baumann, B., Leech, S.H., Fabbro, D., Stahel, R.A., Zangemeister-Wittke, U. 2000. A Novel Antisense Oligonucleotide Targeting Survivin Expression Induces Apoptosis and Sensitizes Lung Cancer Cells to Chemotherapy. **Cancer Research**, 60(11): 2805-9.
- Olive, P.L., Frazer, G., Banath, J.P. 1993. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. **Radiation Research**, 136: 130–136.
- Osborne, T.S., Khanna, C. 2012. A review of the association between osteosarcoma metastasis and protein translation. **Journal of Comparative Pathology**, 146: 132–142.
- Ottaviani, G., Jaffe, N. 2009. The epidemiology of osteosarcoma. In: Jaffe N. et al. "Pediatric and Adolescent Osteosarcoma". New York. Springer. 152: 3-13.
- Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. 2001. Apoptozisin önemi. **Toraks Dergisi**, 2 (1): 91-95.

- Özmen, A., Madlener, S., Bauer, S., Krasteva, S., Vonach, C., Giessrigl, B., Gridling, M., Viola, K., Stark, N., Saiko, P., Michel, B., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., Askin-Celik, T., Krenn, L., Krupitza, G. 2010. In vitro anti-leukemic activity of the ethno-pharmacological plant *Scutellaria orientalis* ssp. *carica* endemic to western Turkey. **Phytomedicine**, 17(1): 55-62.
- Payne, S.L., Hendrix, M.J.C., Kirschmann, D.A. 2007. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer - A prospect. **Journal of Cellular Biochemistry**, 101: 1338–1354.
- Peter, M.E., Krammer, P.H. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. **Current Opinion in Immunology**, 10: 545–51.
- Petrasovits, L.A. 2014. Protein blotting protocol for beginners. **Methods in Molecular Biology**, 1099: 189-99.
- Pidgeon, G.P., Kandouz, M., Meram, A., Honn, K.V. 2002. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. **Cancer Research**, 62: 2721–7.
- Pitot, H. C. 1993. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, 72(3): 962-70.
- Plumb J.A. 2004. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Cancer Cell Culture**, 88: 165-9.
- Po, L.S., Chen, Z.Y., Tsang, D.S., Leung, L.K. 2002. Baicalein and genistein display differential actions on estrogen receptor (ER) transactivation and apoptosis in MCF-7 cells. **Cancer Letters**, 187(1-2): 33-40.
- Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V.K. 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. The **International Journal of Lower Extremity Wounds**, 4: 138–44.

- Reed, J.C. 1994. Bcl-2 and the Regulation of Programmed Cell Death. **The Journal of Cell Biology**, 124(1-2): 1-6.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. 1997. "Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction". **Analytical Biochemistry**, 245 (2): 154–160.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J.I., Schilhabel, M., Karran, E.L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L.M., Fernandez-Luna, J.L., Pinkel, D., Dyer, M.J., Martinez-Climent, J.A. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. **Blood**, 106: 3214–22.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, 23: 2861–74.
- Salgame, P., Varadhachary, A.S., Primiano, L.L., Fincke, J.E., Muller, S., Monestier, M. 1997. An ELISA for detection of apoptosis. **Nucleic Acids Research**, 25(3): 680–681.
- Savill, J., Fadok, V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, 407: 784–8.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., Peter, M.E. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, 274: 1541–8.
- Scheffe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., Funke-Kaiser, H. 2006. "Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula". **Journal of Molecular Medicine**, 84 (11): 901–10.
- Schimmer, A.D. 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer Research**, 64: 7183–90.

- Schwartzman, R.A., Cidloski, J.A. 1993. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocrine Reviews**, 14: 133-144.
- Spencer, S., Cataldo, N.A., Jaffe, R.B. 1996. Apoptosis in the human female reproductive tract. **Obstetrical and Gynecological Survey**, 5: 314-323.
- Srinivas, G., Anto, R.J., Srinivas, P., Vidhyalakshmi, S., Senan, V.P., Karunagaran, D. 2003. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. **European Journal of Pharmacology**, 473: 117-125.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., Srivastava, R.K. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. **Oncogene**, 20: 2122–33.
- Takahashi, H., Chen, M.C., Pham, H., Angst, E., King, J.C., Park, J., Brovman, E.Y., Ishiguro, H., Harris, D.M., Reber, H.A., Hines, O.J., Gukovskaya, A.S., Go, V.L., Eibl, G. 2011. Baicalein, a component of *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1813(8): 1465-74.
- Temizkan, G., Arda, N. 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul. ISBN: 9789754205831.
- Tezel, G.G. 2013. Southern, Northern and *Western Blotting. Basic Molecular Pathology Course with “Hands On” Interactive Practice.
- Thakore, P., Mani, R.K., Kavitha, Singh, J. 2011. A Brief Review Of Plants Having Anti Cancer Property . **IJPRD**, 3(11): 129-136.
- Tong, W.G., Ding, X.Z., Adrian, T.E. 2002. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 296: 942–948.

- Touchette, N., Fogle, S. 1991. Apoptosis: it chimes with mitosis. **JNIH Research**, 3: 75.
- Uderhardt, S., Krönke, G. 2012. 12/15-Lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance. **Journal of Molecular Medicine**, 90: 1247–1256.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, 44(5): 619-26.
- Vaux, D.L., Stanley, J. 1999. Korsmeyer Cell Death in Development, **Cell**, 96: 245–254.
- Vogt, C. 1842. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothurn: Jent und Gassmann.
- Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, 296: 1635–6.
- Walker, N.I., Harnon, B.W., Gobe, G.C., Kerr, J.F. 1988. Patterns of cell death. **Methods Achiev Exp Pathol**, 13: 18-54.
- Walker, P.R., Leblanc, J., Smith, B., Pandey, S., Sikorska, M. 1999. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. **Enzymology**, 17: 329-338.
- Wang, C.Z., Calway, T.D., Wen, X.D., Smith, J., Yu, C., Wang, Y., Mehendale, S.R., Yuan, C.S. 2013. Hydrophobic flavonoids from *Scutellaria baicalensis* induce colorectal cancer cell apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway. **International Journal of Oncology**, 42(3): 1018-26.
- Wang, J., Yu, Y., Hashimoto, F., Sakata, Y., Fujii, M., Hou, D.X. 2004. Baicalein induces apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in HL-60 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, 14(4): 627-32.
- Weinberg, R.A. 2014. "The Biology of Cancer." Garland Science, page 231.

- Willingham, M.C. 1999. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. **Journal of Histochem & Cytochem**, 47: 1101.
- Wilson, K.A., Waugh, A., Chambers, G., Grant, A., Ross, J. 2006. Ross and Wilson anatomy and physiology in health and illness. 53–54. Edinburgh, Churchill Livingstone. ISBN 0-443-10101-9.
- Winslow, M.D., Kroll, D.J. 1998. PhD Herbs as Medicines, **Archives of Internal Medicine**, 158(20): 2192-2199.
- Wong, B.C., Wang, W.P., Cho, C.H., Fan, X.M., Lin, M.C., Kung, H.F., Lam, S.K. 2001. 12 Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. **Carcinogenesis**, 22: 1349–1354.
- Wu, B., Li, J., Huang, D., Wang, W., Chen, Y., Liao, Y., Tang, X., Xie, H., Tang, F. 2011. Baicalein mediates inhibition of migration and invasiveness of skin carcinoma through Ezrin in A431 cells. **BMC Cancer**, 11: 527.
- Wu, J., Xia, H.H.X., Tu, S.P., Fan, D.M., Lin, M.C.M, Kung, H.F., Lam, S.K. Wong, B.C.Y. 2003. 15-Lipoxygenase-1 mediates cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in gastric cancer. **Carcinogenesis**, 24(2): 243–247.
- Wyllie, A.H., Kerr J.F.R., Currie, A.R. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, 68: 251-306.
- Xin, Z.F., Shen, C.C., Tao, L.J., Yan, S.G., WU, H.B. 2013. Gambogic acid inhibits invasion of osteosarcoma via upregulation of TIMP-1. **International Journal of Molecular Medicine**, 31: 105-112.
- Xing, N., Qian, J., Bostwick, D., Bergstralh, E., Young, C.Y. 2001. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. **Prostate**, 48: 7–15.
- Yan, Y., Su, X., Liang, Y., Zhang, J., Shi, C., Lu, Y., Gu, L., Fu, L. 2008. Emodin azide methyl anthraquinone derivative triggers mitochondrial-dependent cell apoptosis involving in caspase-8-mediated Bid cleavage. **Molecular Cancer Therapeutics**, 7(6): 1688-97.

- Yasuhara, S., Zhu, Y., Matsui, T., Tipirneni, N., Yasuhara, Y., Kaneki, M., Rosenzweig, A., Martyn, J. 2003. Comparison of Comet Assay, Electron Microscopy, and Flow Cytometry for Detection of Apoptosis. **Journal of Histochem & Cytochem**, 51: 873.
- Yokota, J. 2000. "Tumor progression and metastasis". **Carcinogenesis**, 21(3): 497-503.
- Yoshimura, R., Inoue, K., Kawahito, Y., Mitsuhashi, M., Tsuchida, K., Matsuyama, M., Sano, H., Nakatani, T. 2004. Expression of 12-lipoxygenase in human renal cell carcinoma and growth prevention by its inhibitor. **International Journal of Molecular Medicine**, 13: 41-46.
- Yu, C.X., Zhang, X.Q., Kang, L.D., Zhang, P.J., Chen, W.W., Liu, W.W., Liu, Q.W., Zhang J.Y. 2008. Emodin induces apoptosis in human prostate cancer cell LNCaP. **Asian Journal of Andrology**, 10(4): 625-634.
- Zeiss, C.J. 2003. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. **Veterinary Pathology**, 40: 481.
- Zhang, J., Xu, M. 2002. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. **Trends in Cell Biology**, 12(2): 84-89.
- Zhang, Y., Guo, Y., Onda, M., Hashimoto, K., Ikeya, Y., Okada, M., Maruno, M. 1994. Four Flavonoids from *Scutellaria baicalensis*. **Phytochemistry**, 35(2): 511-514.
- Zhou, Y., Lu, N., Zhang, H., Wei, L., Tao, L., Dai, Q., Zhao, L., Lin, B., Ding, Q., Guo, Q. 2013. HQS-3, a newly synthesized flavonoid, possesses potent anti-tumor effect in vivo and in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Science**, 49(4): 649-58.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, 32(12): e103.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Yağmur Babat
Doğum Yeri ve Tarihi : Kırklareli 25/08/1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi :
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Makaleler
 - SCI
 - Diğer
- b) Bildiriler
 - Uluslararası
 - Ulusal
- c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : yagmurbabat@hotmail.com
Tarih :18/04/2014