

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-031**

**İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
EMODİN'İN MİTOKONDRIYAL SİNYAL İLETİM
YOLAĞI ARACILIĞI İLE APOPTOZİSE ETKİSİ**

Burcu AYHAN

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Celal ÜLGER**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** Programı öğrencisi Burcu AYHAN tarafından hazırlanan “**İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Emodin’in Mitokondriyal Sinyal İletim Yolağı Aracılığı ile Apoptozise Etkisi**” başlıklı tez, 14.06.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof.Dr. Fevzi BARDAKCI	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof.Dr. Ayşegül BİLDİK	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof.Dr. Celal ÜLGER	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu **Yüksek Lisans** tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı 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.

14/06/2013

İmza

Burcu AYHAN

ÖZET

İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA EMODİN'İN MİTOKONDRIYAL SİNYAL İLETİM YOLAĞI ARACILIĞI İLE APOPTOZİSE ETKİSİ

Burcu AYHAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Celal ÜLGER
2013, 52 sayfa

Emodin, *Rheum palmatum* ve *Rheum officinale* bitkilerinin kök ve toprak altı gövdelerinde bulunan aktif bir antrakinon bileşimidir ve birçok kanser türünde tümör büyümesini engellediği bilinmektedir. Kolon kanseri gerek Türkiye’de gerekse dünyada görülme sıklığı ve ölüm oranı açısından özel öneme sahiptir. Bu çalışmada, kolon kanseri dokularından kültüre edilen HT-29 ve Caco-2 hücre hatları, emodinün mitokondriyal apoptozis üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda hücelere emodin uygulaması yapıldıktan sonra MTT yöntemi uygulanarak etkin konsantrasyon belirlenmiştir. Uygulama sonrası hücrelerin morfolojik gözlemi HO/PI boyama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Muhtemel apoptotik etkinin desteklenmesi amacıyla Bax, Bcl-2 ve mitokondriyal ve sitozolik sitokrom c miktarları Western blot yöntemiyle kontrol edilmiştir. Sonuç olarak HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde 40 µM’lık konsantrasyonun hücre büyümesini inhibe ettiği yapılan MTT testiyle belirlenmiştir. Yine her iki hücre hattında yapılan HO/PI boyama sonuçları, apoptotik hücre oranındaki artışı göstermektedir. Bunun yanı sıra mitokondriyal sitokrom c azalırken sitozolik sitokrom c seviyesinde artış belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak, emodinün HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücre hatlarında apoptozisi mitokondriyal yolakla aktive ettiği çıkarılabilir.

Anahtar sözcükler: Apoptozis, kanser, HT-29, Caco-2, Bcl-2, Bax, sitokrom c, emodin

ABSTRACT

EFFECT OF EMODIN IN HUMAN COLON CANCER CELL LINES THROUGH THE MITOCHONDRIAL SIGNALING PATHWAY

Burcu AYHAN

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Celal ÜLGER

2013, 52 pages

Emodin is an active anthraquinone compound found in roots and rhizomes of rhubarb. It is known that emodin inhibits tumor growth in many cancer types. Colon cancer has a specific importance for its incidence and mortality rates in the world and Turkey. In this study, HT-29 and Caco-2 cell lines, which were cultured from colon cancer tissues were used to investigate the effect of emodin on mitochondrial pathway of apoptosis. In accordance with this purpose, after emodin application to the cells, effective concentration was determined by MTT method. Morphologic observations of the cells after application were carried out by HO/PI staining method. In order to support probable apoptotic effect, Bax, Bcl-2 and mitochondrial and cytosolic cytochrome c levels were controlled by western blot. As a result, in HT-29 and Caco-2 cells, 40 μ M concentration was found to be the effective concentration by MTT test. Again in both cell lines, HO/PI staining results indicates the increase in apoptotic cell rate. These results were supported by the increase in Bax level and decrease in Bcl-2 level. In addition, while mitochondrial cytochrome c level was decreasing, cytosolic cytochrome c level has increased. According to these results, it can be concluded that emodin may activate mitochondrial pathway of apoptosis in HT-29 and Caco-2 colon cancer cell lines.

Key words: Apoptosis, cancer, HT-29, Caco-2, Bcl-2, Bax, cytochrome c, emodin

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden bu yana, desteğini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Celal ÜLGER'e,

Tezimin gerçekleşmesi için maddi desteği FEF-12027 proje koduyla sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri birimine,

Tez çalışmam boyunca manevi desteğine her zaman ihtiyaç duyduğum ve her anımda yanımda olan çok sevgili arkadaşım İlkem CEYLAN'a,

Laboratuvar çalışmalarımda değerli yardımlarını benden esirgemeyen arkadaşım Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL'e, Yağmur BABAT'a, Nilay Ezgi ÇAKAR'a ve ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen Biyoloji Bölümü Öğretim Üye ve Yardımcılarına,

Eğitimim için maddi manevi bütün destekleri sağlayan, beni bu günlere getiren, her zaman yanımda olan canımdan çok sevdiğim annem Saniye AYHAN, babam Fehmi AYHAN ve kardeşim İshak Burak AYHAN'a,

İhtiyacım olan her anımda yanımda olan, tez çalışmalarım süresince her türlü nazıma anlayışla katlanan, bana cesaret ve güç veren nişanlım Batuhan ŞAHİN'e

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	2
1.1.1. Kolorektal Kanserler	4
1.2. Apoptozis	4
1.2.1. Harici Yolak	7
1.2.2. Dahili Yolak	8
1.2.3. Kaspazlar.....	9
1.2.4. Bcl-2 Ailesi	10
1.2.5. Apoptozis Kanser İlişkisi	11
1.3. Bitkisel Tedaviler	12
1.3.1. Emodin	12
1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	14
1.5. MTT Proliferasyon Yöntemi.....	14
1.6. HO/PI Boyama Yöntemi	15
1.7. Western Blot Yöntemi.....	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Deneyleerde Kullanılan Tampon ve Çözeltilerin Hazırlanması	22
3.2. Hücre Kültürü.....	24
3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi.....	24
3.2.2. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması.....	24
3.3. MTT Proliferasyon Testi.....	25
3.3.1. Hücrelerin Plaklara Ekimi	25
3.3.2. Emodin'in Hazırlanması ve Uygulanması.	25
3.3.3. MTT Proliferasyon Testi.....	26

3.3.4. Elde Edilen Verilerin Analiz Edilmesi	26
3.4. Apoptozis ve Nekrozis Yöntemi	27
3.4.1. Hücrelerin Plaklara Ekimi ve Emodin Uygulaması	27
3.4.2. Apoptozis ve Nekrozis Yöntemi	27
3.5. Western Blot	28
3.5.1. Hücre Lizatı Elde Edilmesi	28
3.5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlanması	29
3.5.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	30
3.5.4. Membrana Transfer	30
3.5.5. Membran Bloklama ve Antikor Uygulaması.....	31
3.5.6. Görüntüleme	31
3.6. Emodin ile Uyarılan Hücrelerde Sitokrom c Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
4. BULGULAR	33
4.1. MTT Proliferasyon Yöntemi	33
4.2. Apoptotik Hücrelerin Sayımı	34
4.3. Western Blot.....	35
4.4. Emodin ile Uyarılan Hücrelerde Sitokrom c Konsantrasyonunun Belirlenmesi	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	51

SİMGELER DİZİNİ

μ l	mikrolitre
μ M	mikromolar
AP	Alkalen Fosfataz
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör-1
APS	Amonyum Per Sülfat
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BCIP	5-brom-4-klor-3-indolilfosfat
BSA	Sığır serum albümin
cm^2	santimetrekare
CML	Kronik Myelositik Lösemi
CO_2	Karbondioksit
COX-2	Siklooksijenaz-2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Besi yeri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DR	Ölüm Reseptörü
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ERK	Ekstrasellüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
FADD	Fas-Bağlı Ölüm Domeyni
FBS	Fötal Sığır Serum
HRP	Yaban Turpu Peroksidazı
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Potasyumdihidrojenfosfat
MDR	Çoklu İlaç Direnci
ml	Mililitre
mM	milimolar
mRNA	Haberci RNA
MRP	MDR-İlişkili Protein
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
Na_2HPO_4	disodyumhidrojenfosfat

NaCl	Sodyum klorür
NBT	Nitobluetetrazolyum klorür
nm	nanometre
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PARP	Poli(ADP-Riboz) Polimeraz
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen-strep	Penisilin-streptomisin
PIC	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PMSF	Fenilmetansülfonilflorit
PVDF	Polivinilidenflorit
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RPMI	Roswell Park Memorial Enstitüsü
RT-PCR	Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyumdodesilsülfat
TBE	Tris borik asit EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRAIL-R	TNF-Bağlantılı Apoptozis İndükleyici Ligand Reseptörü
UV	Ultraviyole
XTT	Sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi-6-nitro)benzen-sülfonik asit hidrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler	6
Şekil 1.2. Apoptozis yolları	7
Şekil 1.3. Harici yolak.....	8
Şekil 1.4. Dahili yolak.....	9
Şekil 1.5. Emodin ve anthraquinone moleküler yapısı.....	13
Şekil 3.1. Apoptozis/Nekrozis yönteminde çekilen fotoğraflara örnekler	28
Şekil 4.1. MTT proliferasyon yöntemi sonucu, HT-29 hücre hattı	33
Şekil 4.2. MTT proliferasyon yöntemi sonucu, Caco-2 hücre hattı	33
Şekil 4.3. Apoptotik hücre oranı, HT-29 hücre hattı.....	34
Şekil 4.4. Apoptotik hücre oranı, Caco-2 hücre hattı	34
Şekil 4.5. Western blot membran görüntüleri (HT29)	35
Şekil 4.6. Uygulama süresine bağlı olarak Bax/Bcl-2 oranındaki değişiklik (HT-29)	35
Şekil 4.7. Sitolitik/mitokondriyal sitokrom c oranı, HT-29 hücre hattı (HT-29)	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bitkilerden elde edilen modern ilaçlardan bazıları	12
Çizelge 3.1. 1X PBS hazırlanışı.....	22
Çizelge 3.2. Protein izolasyonu için lizis tamponu hazırlanışı.....	22
Çizelge 3.3. PAGE yükleme tamponu (Laemmli yükleme boyası) hazırlanışı...	23
Çizelge 3.4. PAGE yürütme tamponu (Laemmli tamponu, 1X) hazırlanışı	23
Çizelge 3.5. Transfer tamponu hazırlanışı	23
Çizelge 3.6. 1X TBS hazırlanışı.....	23
Çizelge 3.7. Bloklama sütü hazırlanışı.....	23
Çizelge 3.8. BSA hazırlanışı	23

1. GİRİŞ

Kanser, görülme oranı artan ve ölüm oranı yüksek olan bir hastalık grubu olması sebebiyle tüm dünyada büyük öneme sahiptir. Türkiye’de ve Amerika Birleşik Devletleri’nde ölüm sebepleri araştırmasında en çok ölüme neden olan ikinci hastalık olarak kanser gelmektedir (Anonim 2013c, American Cancer Society, 2013). Kanser erken teşhis edilmesi halinde tedaviye daha kolay cevap verir ve daha iyi sonuçlar elde edilebilir. Erken teşhis tarama yöntemleriyle mümkün olmaktadır. Özellikle meme, kolon, rektum ve servikte gelişen tümörler tarama yöntemleriyle erken teşhis edilebilmekte ve bu sayede ölüm oranlarında düşüş sağlanabilmektedir (American Cancer Society, 2013). Kanserın evresi ve yayılması belirlenerek türüne ve evresine göre ameliyat, radyoterapi veya kemoterapi uygulanabilir (Anonim 2013d).

Sağlık Bakanlığı’nın hazırladığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2010 verilerine göre Türkiye’de kanser türleri arasında görülme sıklığı bakımından bayanlarda meme, tiroid, kolorektal ve mide kanserleri ilk dört sırayı alırken erkeklerde bu sıralama akciğer, prostat, mesane ve kolorektal kanserler şeklindedir (Anonim, 2010). Çocukluk çağı kanserlerinde ise en sık görülen kanser türü lösemi olmakla birlikte lenfomalar, beyin tümörleri, böbrek tümörleri ve kemik tümörleri çocuklarda yaygın olarak görülen kanser türleri arasındadır (Çağlar, 2006).

Kanser türleri arasında kolorektal kanserler ölüm oranları bakımından Amerika Birleşik Devletleri’nde üçüncü, Türkiye’de ise dördüncü sırada yer almaktadır (Anonim 2013c, Siegel vd., 2013). Tüm kanser türleri için 2013 yılında tüm dünyada beklenen yeni vaka sayısı 1,660,290 iken beklenen ölümlerin sayısı ise 580,350’dir (Howlader vd., 2013). Bu vakaların bayanlarda ve erkeklerde %9’unun kolorektal kanser olacağı öngörölmekle birlikte beklenen ölüm oranları içinde de yine kolorektal kanserler %9 ile üçüncü sıradadır (Siegel vd., 2013).

Epidemiyolojik olarak bu denli öneme sahip olan kanser hastalığının moleküler düzeyde incelenmesi, hastalığın daha iyi tanınmasında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde büyük önem teşkil eder. Yapılan moleküler çalışmalar hangi yollardaki aksaklıkların hastalığa neden olduğu ve bu aksaklıkların nasıl giderileceği konusunda yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda en çok incelenen yollardan biri apoptozis yollarıdır. Bir organizmada gün içerisinde milyonlarca yeni hücre oluşurken bunu dengelemek için bazı hücrelerin yok edilmesi gerekir. Hücrelerin

ölümünü sağlayan mekanizmaların başında apoptozis gelmektedir. Apoptozis, genetik olarak kontrol edilen ve düzenlenen bir takım sinyaller sonucu hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilir ve bu nedenle programlanmış hücre ölümü olarak da anılır. Hasar görmüş hücreler apoptotik sinyallerle uyarılır ve apoptozis yollarının aktivasyonu sonucu hücre ölümü gerçekleşir (Kasibhatla ve Tseng, 2003). Kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri apoptotik sinyallerle duyarsız olmalarıdır. Bu sayede tümör oluşumuna neden olan hasarlı hücreler yok edilemez ve hücrelerin kontrolsüz çoğalması tümörün büyümesine ve gelişmesine neden olur (Alberts vd., 2007). Bu nedenle kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenmesi kanser tedavisinde önemli yaklaşımlardan bir tanesidir (Li-Weber, 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenmesinde bitkiler veya bitkilerden elde edilen etken maddeler önemli yer tutmaktadır. Bitkiler yüzyıllardır koruma ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Özellikle Çin’de geleneksel olarak birçok hastalığın tedavisinde bitkilerden yararlanılmaktadır. Bitkiler, kardiyovasküler hastalıkların, prostat problemlerinin, depresyonların, enflamasyonun ve ağrıların tedavisinde kullanılmaktadır. Bütün bunların yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalar, bitkilerden elde edilen etken maddelerin kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisinin bulunduğunu göstermektedir (Benzie ve Wachtel-Galor, 2011). Bu çalışmada, bitkisel bir bileşik olan Emodin’in kolon kanseri hücre hatları HT-29 ve Caco-2 üzerinde mitokondriyal sinyal iletim yolağında yer alan belirli belirteç genler kullanılarak apoptozisi indükleyici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Kanser

Kanser, kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ve bölünme sonucu oluşan bu hücrelerin yayılmasıyla karakterize edilen hastalıklara verilen genel isimdir (American Cancer Society, 2013). Moleküler düzeyde hücreler kontrolsüz bölündüğü halde yayılma özelliği göstermeyebilir. Bu şekilde davranan tümörler iyi huylu (benign) tümör olarak adlandırılır ve cerrahi müdahale ile normal dokudan tamamen uzaklaştırılabilir. Oluştugu primer (birincil) dokuyu parçalayarak kan veya lenf sistemi sayesinde vücudun başka bölgelerine ulaşabilen tümör hücreleri kanserleşmiş olur ve bu tümörler kötü huylu (malignant) tümör olarak adlandırılır. Kötü huylu tümör hücrelerinin farklı dokularda sekonder (ikincil) tümör oluşturması metastaz olarak adlandırılır.

Kanserler köken aldıkları dokuya göre sınıflandırılırlar:

- Karsinomalar: Epitel dokudan,
- Sarkomalar: Bağ doku ve kas dokudan,
- Lösemi veya lenfomalar: Kan hücrelerinden ve bu hücrelerin öncülleri olan hematopoietik hücrelerden köken alan kanserlerdir (Alberts vd., 2007).

Tümör oluşumu birçok basamakta gerçekleşir ve her bir basamak tümör gelişimini hızlandırır (Lewin, 2004). Bu süreçte meydana gelen olayların bütünü henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da, tümör gelişimi önemli genlerde meydana gelen ve tümör hücrelerine birtakım büyüme avantajları sağlayan mutasyonların birikmesiyle ortaya çıkmaktadır (Burger ve Abraham, 2003).

Bütün kanser hücrelerinin sahip olduğu ve kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran bir takım ortak özellikleri bulunmaktadır. Kısaca;

- Tüm kanser hücreleri büyüme sinyalleri bakımından diğer hücrelerden bağımsızdır. Proliferasyon için dış sinyallere ihtiyaçları yoktur.
- Kanser hücrelerinin apoptozla intiharı diğer hücrelere göre çok daha azdır. Kanser hücreleri apoptotik sinyallerden normal hücreler kadar etkilenmezler.
- Normal hücreler kısıtlı sayıda bölünebilirken kanser hücreleri sınırsız bölünme yeteneğine sahiptir.
- Kanser hücrelerinde mutasyon oranı çok yüksektir, bu nedenle genetik olarak kararsız hücrelerdir.
- Kanser hücreleri spesifik adhezyon moleküllerini içermediği için orijinal yerlerinde duramazlar, diğer dokulara dağılırlar ve bu dokularda çoğalmaya devam edebilirler (metastaz).
- Kanser hücreleri antiproliferatif sinyallere karşı duyarsızdır.
- Kanser hücreleri beslenmeleri için damar oluşumunu (anjyogenez) indükler (Alberts vd., 2003; Alberts vd., 2007).

1.1.1. Kolorektal Kanserler

Bütün kanser türleri arasında kolorektal kanserler bayanlarda ve erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser türüdür. 2013 yılında sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde kolorektal kanserlerde 102,480 yeni vaka ve 40,340 ölüm beklenmektedir. Kolorektal kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan yöntem ameliyattır. Özellikle yayılma göstermemiş tümörler cerrahi müdahale ile temizlenmektedir. Bununla birlikte çevre dokulara yayılma göstermiş hastalarda cerrahi müdahale ile birlikte kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır. Uygulanan bu yöntemler sayesinde kolorektal kanserlerde 1 yıllık hayatta kalma oranı %84, 5 yıllık hayatta kalma oranı %64 iken 10 yıllık hayatta kalma oranı ise %58'e düşmektedir (American Cancer Society, 2013).

Kolon kanserlerinin neredeyse tamamı kolon ve rektum duvarında oluşan benign poliplerin zamanla malignant hale dönüşmesiyle ortaya çıkar. İlk aşamalarında herhangi bir belirtisi yoktur, ancak tarama yöntemleriyle tespit edilebilir. İlerleyen aşamalarda karın ağrısı, rektal kanama, iştah kesilmesi ve kilo kaybı gibi belirtiler gösterir. Tedavi, hastalığın aşamasına bağlı olarak sadece cerrahi müdahale ile kanserli dokunun uzaklaştırılmasıyla yapılırken ileri safhalardaki hastalarda cerrahi müdahalenin yanı sıra kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları da yapılmaktadır.

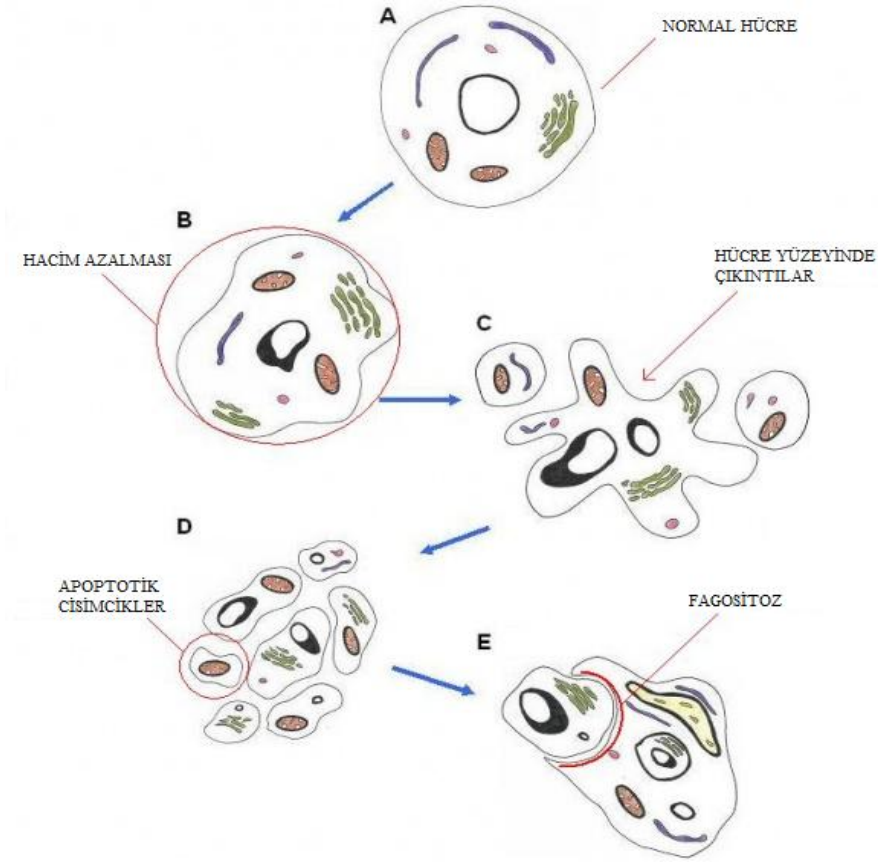
Hastalığa yakalanma riski yaşla birlikte artmaktadır. Bunun haricinde yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları hastalığın gelişmesinde etkilidir. Obezite, fazla kırmızı veya işlenmiş et tüketimi, alkol kullanımı, yağ oranı yüksek veya lif oranı düşük diyetler hastalık riskini arttıran etmenlerdendir (Anonim 2012, American Cancer Society, 2013).

1.2. Apoptozis

Hücre ölümü, gelişim sürecinde en önemli olaylardan biridir. Vücut boşluklarının oluşmasında, gelişim süresince fonksiyonu olan ancak yetişkin bireyde ihtiyaç duyulmayan yapıların yok edilmesinde hücre ölümünün önemi büyüktür. Yetişkin bireylerde de her gün homeostazinin sağlanması için milyonlarca hücre ölmektedir ancak hücre bölünmesiyle hücre ölümü dengede olduğundan bu durum sorun yaratmamaktadır (Raff, 1998).

Hücreler öldüğünde aldıkları karakteristik görünümlere ve özelliklerine göre farklı ölüm mekanizmaları bulunur. Bunlardan bir tanesi bir nevi intihar olarak nitelendirilmektedir. Hasar görmüş hücreler hücre içinde bir ölüm yolağı aktive ederler ve hücre ölümü gerçekleşir. Bu ölüm mekanizması programlanmış hücre ölümü veya apoptozis olarak adlandırılır ve apoptozise uğrayan hücreler komşu hücreler tarafından fagosite edilir, bu nedenle ölen hücrenin kalıntısı olmaz. Diğer bir mekanizma ise daha çok patolojik durumlarda ortaya çıkar ve hücre ölümü kontrolsüzdür. Nekrozis olarak adlandırılan bu mekanizmada hücreler patlar ve hücre içeriği ortama dağılarak diğer hücelere hasar verebilir (Raff, 1998).

Apoptozis, genetik olarak düzenlenen ve kontrol edilen, hücre ölümünün ana formudur (Yu vd., 2013). Apoptotik hücreler belirli morfolojik özellikler gösterir. Bu özellikler ilk olarak Kerr vd. (1972) tarafından yapılan elektron mikroskobu çalışmalarıyla tanımlanmıştır. Hücre hacminin azalması ve sitoplazmik yoğunlaşma, hücrelerin membran-bağlı apoptotik cisimciklere parçalanması apoptotik hücrelerin karakterize edilmesinde yardımcı olan morfolojik özelliklerdir (Şekil 1.1) (Kerr vd., 1972, Chen vd., 2004).

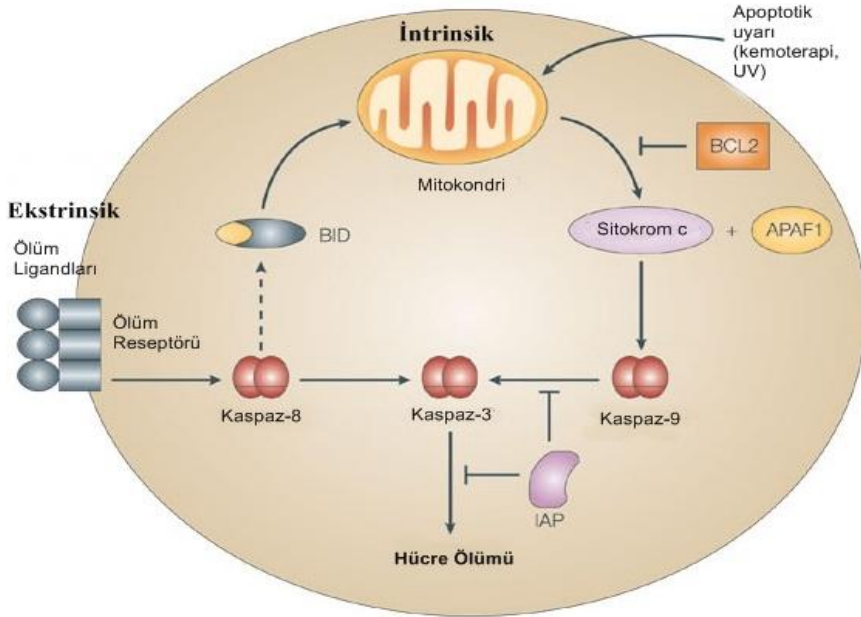


Şekil 1.1. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler (Anonim 2009)

Apoptotik hücreler morfolojik özelliklerin yanı sıra bazı biyokimyasal özellikler de gösterirler. Apoptotik hücrelerde gözlemlenen nükleer DNA fragmentasyonu ilk belirlenen biyokimyasal değişikliktir. Ancak yapılan çalışmalarda apoptozise uğradığı ve morfolojik değişiklikler gösterdiği halde DNA fragmentasyonu gerçekleşmeyen örnekler de bulunmuştur. Bu nedenle apoptozise uğrayan hücrelerin tamamında DNA fragmentasyonu görülmemekle birlikte, DNA fragmentasyonunun apoptozis için bir belirteç olduğu da bildirilmektedir (Gerschenson ve Rotello, 1992; Patel vd., 1996). DNA fragmentasyonunun yanı sıra kaspaz adı verilen spesifik proteazların aktivasyonu ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin translokasyonu apoptozisin önemli moleküler belirteçlerindedir (Yu vd., 2008).

Apoptotik uyarana bağlı olarak apoptozis için iki yolak tanımlanmıştır. Bu yolların biri harici (ekstrinsik) sinyallerle uyarılan ölüm reseptörleri yolağıyken

diğeri dahili (intrinsik) sinyallerle uyarılan mitokondriyal yolaktır (Mayer ve Oberbauer, 2003; Yan vd., 2008; Li-Weber, 2013). Her iki yolakta da kaspaz adı verilen spesifik proteazlar önemli rol oynarken, iki yolak kaspaz-3 aktivasyonunda birleşir (Şekil 1.2) (Srinivas vd., 2003).

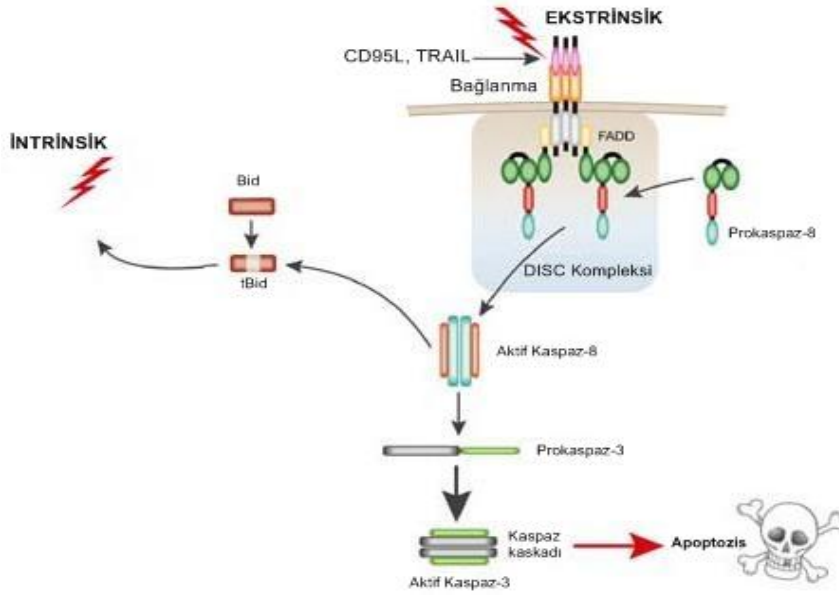


Şekil 1.2. Apoptozis yolları (Andersen vd., 2005)

1.2.1. Harici Yolak

Ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin bir üyesidir. Ölüm reseptörleri, yaklaşık 80 amino asitten oluşan ölüm domeyniyle karakterize edilir. Ölüm domeyni hücre yüzeyine gelen ölüm sinyallerini hücre içine iletir. En iyi bilinen ölüm reseptörleri Fas, CD95, TNF reseptör 1 (TNFR1), TNF-bağlantılı apoptozis indükleyici ligand reseptör 1 (TRAIL-R1), TRAIL-R2 ve DR3'tür (Fulda ve Debatin, 2006). Bu reseptörlere ekstraselüler ligandlar bağlandığında reseptörün yapısı değişir ve hücre içinde ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu komplekste TNF reseptör-bağlı ölüm domeyni veya Fas-bağlı ölüm domeyni (FADD) gibi adaptör moleküller ve prokaspaz-8 bulunur. Prokaspaz-8 DISC içinde otokatalitik olarak aktif kaspaz-8 haline gelir ve sitozole salınır. Kaspaz-8 ya efektör kaspaz olan kaspaz-3 aktivasyonunu gerçekleştirerek

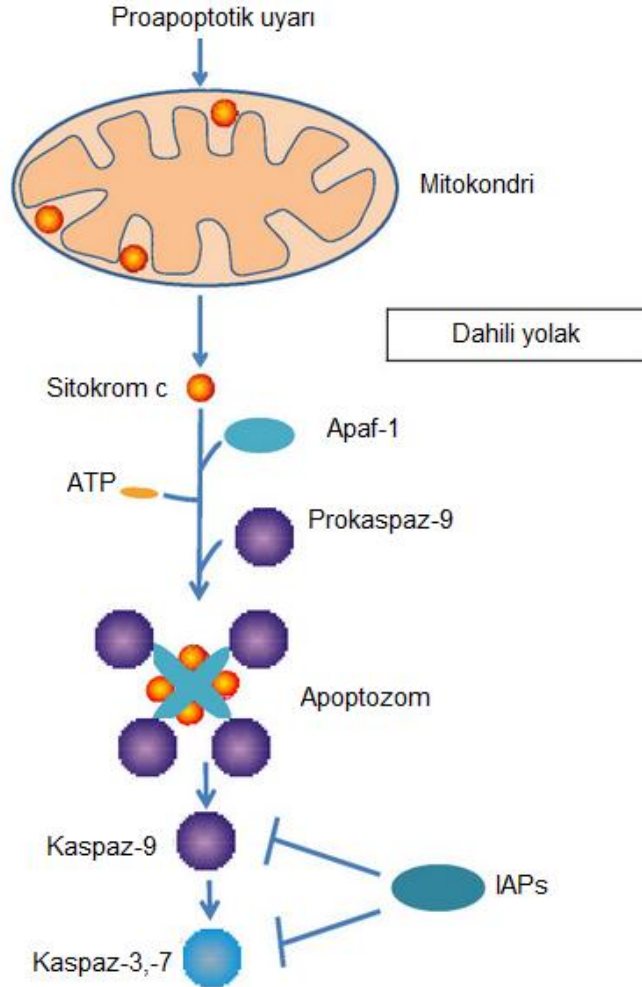
DNA fragmentasyonunu ve apoptozisi aktive eder ya da sitozolde bulunan Bid'i tBid'e dönüştürerek mitokondriyal yolağın aktivasyonuna neden olur (Şekil 1.3) (Creagh vd., 2003; Mayer ve Oberbauer 2003). Harici yolakta c-FLIP ve XIAP sırasıyla kaspaz-8 ve kaspaz-3'in aktivitesini negatif olarak düzenler bu nedenle harici yolağın düzenlenmesinde önemli yere sahiptir (Li-Weber, 2013).



Şekil 1.3. Harici yolak (Gillespie, 2004)

1.2.2. Dahili Yolak

Dahili yolakta ise reaktif oksijen türleri (ROS), DNA'ya zarar veren ajanlar ve Ca^{+2} 'yi hareket ettiren uyarıcılar gibi dahili ölüm uyarıcıları sinyalleri mitokondriye iletir (Li-Weber, 2013). Bu sinyaller mitokondrinin dış zarını geçirgen hale getirir ve zarlar arası boşluktaki sitokrom c, endonükleaz G gibi proteinlerin sitozole salınmasına neden olur (Fulda ve Debatin, 2006). Sitokrom c sitozole geçtiğinde Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), dATP ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur (Creagh vd., 2003). Prokaspaz-9 apoptozomda kesilerek aktive edilir ve aktif kaspaz-9 kaspaz-3,-6 ve -7'yi aktive eder (Lin vd., 2010; Li-Weber, 2013). Kaspaz-3'ün aktivasyonu DNA fragmentasyonu ve hücre ölümüne giden yolağı aktif hale getirir ve sonuçta apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 1.4) (Yu vd., 2013).



Şekil 1.4. Dahili yolak (Li ve Sheng, 2012)

1.2.3. Kaspazlar

Kaspazlar bir sistein proteaz ailesidir ve ölüm yollarında bulunan ortak efektör moleküller olarak görev alırlar. Kaspazlar birbirlerini belirli bölgelerden kesme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle kaspaz kaskadlarını oluştururlar (Fulda ve Debatin, 2006). Kaspazlar, organizmada normalde inaktif öncüller olarak bulunmakla birlikte, apoptotik yolağın aktivasyonu ile kaspaz kaskadları olarak aktive olurlar (Zou vd., 1999).

Memelilerde 13 tane kaspaz tanımlanmıştır. Amino asit dizisi ve yapısı bakımından bütün kaspazlar benzerlikler içerir. Kaspazların “prodomeyn” olarak adlandırılan bir N-terminali ve büyük ve küçük alt ünite olarak anılan iki alt ünitesi bulunmaktadır. Kaspazlar genel olarak apoptozisle ilişkili olanlar ve enflamatuvar cevaplarla ilişkili olanlar olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. Kaspaz, -3, -6, -7, -8 ve -9 apoptoziste aktive olurken insanlarda kaspaz-1, -4, -5 ve -12; farelerde kaspaz-1, -11, -12 ise enflamatuvar cevaplarda aktive olurlar. (McIlwain vd., 2013)

1.2.4. Bcl-2 Ailesi

Dahili yolak Bcl-2 ailesi proteinleri ile kontrol edilir ve düzenlenir (Yan vd., 2008; Li-Weber, 2013; Yu vd., 2013). Bu ailenin bazı üyeleri apoptozisi baskılayarak diğerleri apoptozisi teşvik eder (Yu vd., 2008). Apoptozisi baskılayan antiapoptotik grupta Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 ve A1 proteinleri bulunurken apoptozisi teşvik eden proapoptotik grupta ise Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bad, Bim ve Bik bulunur (Yu vd., 2013). Bu iki grup üyeleri ölüm sinyaline cevap olarak mitokondride birleşir ve sitokrom c salınımını düzenlemek için yarışır (Yan vd., 2008). Bu iki grup arasındaki denge birçok apoptozis sisteminde hücrelerin durumunu belirler (Yu vd., 2008).

Harici ve dahili yolları proapoptotik protein Bid birbirine bağlar. Ölüm reseptörüyle aktive olan kaspaz-8 Bid'i keser. Kesilmiş Bid fragmenti Bax ve Bak gibi diğer proapoptotik proteinlerle işbirliği yaparak efektör kaspazların ve apoptozisin aktivasyonu için gerekli olan mitokondriyal faktörlerin salınımını destekler (Yan vd., 2008). Ortamda ölüm sinyali olmadığında antiapoptotik proteinler mitokondride, endoplazmik retikulumda veya çekirdek zarında integral zar proteini olarak bulunurlar. Proapoptotik üyelerin ise çoğu sitozolde veya hücre iskeletinde lokalize olmuştur. Ölüm sinyali geldiğinde proapoptotik proteinler konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Bu değişiklik sayesinde mitokondriyal dış membrana bağlanabilir.

Proapoptotik protein Bax, ortamda ölüm sinyali olmadığında ya sitozolde ya da zarlara gevşek bağlı bir şekilde bulunur (Gross vd., 1999). Molekül ağırlığı 20 kDa'dur (Antonsson vd., 2001). Ölüm sinyali geldiğinde bu proteinler yer değiştirerek mitokondriye gider. Mitokondride integral membran proteini olabilir ve çapraz bağlanarak homodimer oluşturabilir. Dimer oluştuğunda mitokondriye

transloke olur (Gross vd., 1999). Bu translokasyon membran hasarının oluşmasına neden olur ve mitokondrinin dış zar bütünlüğünü bozar. Zar bütünlüğünün bozulması sitokrom c'nin mitokondriden salınmasına neden olur ve sitozole salınan sitokrom c dahili apoptozis yolağının başlatılmasında öncülük eder (Cory vd., 2003).

Bcl-2 26 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Bcl-2, Bax ile heterodimer oluşturarak Bax'ın homodimer yapmasını ve mitokondriyal membrana entegre olmasını engelleyerek aktivitesini inhibe eder. Bu nedenle hücrelerdeki Bax/Bcl-2 oranı hücrelerde apoptozisi yolağının aktivasyonunun belirlenmesi için önemli bir göstergedir (Yu vd., 2013).

1.2.5. Apoptozis ve Kanser İlişkisi

Apoptozisin olması gerekenden çok gerçekleşmesi dejeneratif hastalıklara yol açarken olması gerekenden az gerçekleşmesi ise proliferatif hastalıklarla bağlantılıdır. Bu nedenle apoptozis mekanizmasının anlaşılması bu hastalıkların tedavisinde büyük öneme sahiptir (Patel vd., 1996). Bu hastalıkların başında kanser gelmektedir. Kanserli dokularda proliferasyonun fazla olduğu ve hücre döngüsü proteinlerinde hasar olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte apoptozisteki bozukluklar birçok kanser türünde ortak bir durumdur ve tümör oluşumunda ve tedaviye dirençte önemli bir basamaktır (Kasibhatla ve Tseng, 2003; Li-Weber, 2013).

Tümör hücreleri normal dokular üzerinde gelişir. Tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eden radyoterapi gibi tedavi uygulamaları genellikle normal dokuya da zarar vermektedir. Normal dokulara verilen hasarın minimum seviyede tutulması için hedefli tedaviler uygulanmaktadır. Hedefli tedaviler, tümör hücrelerinde düzgün çalışmayan yolakların moleküler olarak hedeflenmesi ile mümkün olmaktadır. Bu sayede, sadece tümör hücrelerindeki aksaklıkların giderilmesi veya tümör hücrelerinin yok edilmesi amaçlanmaktadır (Kasibhatla ve Tseng, 2003). Son zamanlarda antikanser ilaç çalışmaları bu yönde yoğunlaşmıştır. Hedef hücrelerde apoptozisin indüklenmesi, antikanser terapilerin önemli hedeflerindedir (Lin vd., 2010).

1.3. Bitkisel Tedaviler

Bitkiler yüzyıllardır tedavi amaçlı kullanılmaktadır. 16. yüzyılda tıp okulları için bitki yetiştirmek amacıyla botanik bahçelerin oluşturulduğu bilinmektedir. 19. yüzyılın başlarına kadar devam eden bitkisel tıp uygulamaları, bilimsel yöntemlerin gelişmesiyle önemini yitirse de 1974 yılında Dünya Sağlık Örgütünün geliştirmekte olan ülkeleri geleneksel bitki ilaçları kullanmaları yönünde teşvik etmesiyle yeniden popüler oldu (Winslow ve Kroll, 1998). Modern ilaçların yüzde yirmi beşi bitkilerden elde edilmektedir (Rates, 2001).

Çizelge 1.1. Bitkilerden elde edilen modern ilaçlardan bazıları (Kong vd., 2003)

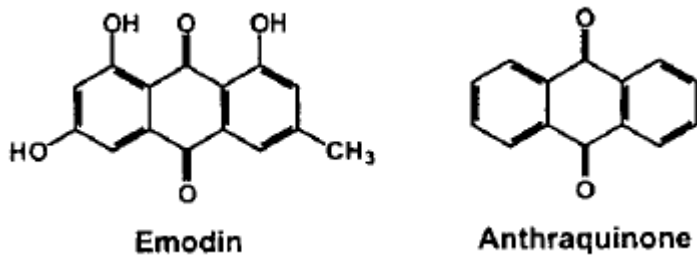
İlaç	Elde edildiği bitki	Klinik kullanımı
Atropine	<i>Atropa belladonna</i>	Antikolinergik
Physotigmine	<i>Physostigma venenosum</i>	Kolinesteraz İnhibitörü
Digoxin	<i>Digitalis purpurea</i>	Kardiyotonik
Senna	<i>Cassia acutifolia</i>	Laksatif
Colchicine	<i>Colchicum autumnale</i>	Antitümör ajan
Ephedrine	<i>Ephedra sinica</i>	Antihistaminik
Quinine	<i>Cinchona officinalis</i>	Antimalaryal
Cocaine	<i>Erythroxylon coca</i>	Lokal anestetik
Glasiovine	<i>Octea glaziovii</i>	Antidepresan
L-Dopa	<i>Mucuna sp</i>	Antiparkinsonizm
Vincristine	<i>Catharanthus roseus</i>	Antilösemik ajan
Nordihydroguaiaretic acid	<i>Larrea divaricata</i>	Antioksidan
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Antitümör ajan
Reserpine	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihipertansif
Scopolamine	<i>Datura fastuosa</i>	Sakinleştirici

1.3.1. Emodin

Rhubarb, Çin'de geleneksel tedavide binlerce yıldır kullanılan bir bitkidir (Huang vd., 2009). Bitkinin bazı türleri yiyecek olarak kullanılabilir. Ancak tıbbi amaçla kullanılan rhubarb ile yiyecek olarak kullanılan rhubarbın türleri farklıdır. Tıbbi rhubarb *Rheum officinale* ve *Rheum palmatum*'dan oluşur (Kemper, 1999).

Rhubarb, Çin bitkisel tedavisinin en iyi bilinen ilaçlarından biridir ve kabızlık, gastrointestinal kanama ve ülserin rahatlatıcı tedavisinde kullanılır. Rhubarbın temel biyoaktif bileşenleri antrakinon türevleridir (Li-Weber, 2013). Antrakinonlar çok çeşitli biyolojik özelliğe sahip geniş bir bileşikler ailesidir (Yan vd., 2008). İnsanlar direk veya indirek olarak tıbbi ve endüstriyel uygulamalarda antrakinonlara maruz kalır (Wang vd., 2001).

Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone) rhubarb bitkisinin rizom ve köklerinde bulunan aktif bir antrakinon türevidir (Ko vd., 2010; Su vd., 2010). Emodin'in rhubarbın haricinde *Polygonum cuspidatum* bitkisinde de bulunduğu bilinmektedir (Srinivas vd., 2003).



Şekil 1.5. Emodin ve anthraquinone moleküler yapısı (Wang vd., 2001)

Emodin Çin'de geleneksel olarak deri yanıklarında, hepatitte, safra taşında, enflamasyonda ve kemik iliği iltihabında kullanılır (Srinivas vd., 2003). Bu zamana kadar emodin kaba ve saf halleri kullanılarak çok çeşitli çalışmalar yürütülmüştür (Yan vd., 2008). Bu çalışmalarda emodin bağırsak temizleyici, antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antiülserojenik, antiinflamatuvar, antioksidan, immünsupresif, vazorelaksan ve kemopreventif etkileri gösterilmiştir (Yan vd., 2008, Srinivas vd., 2003, Yu vd., 2008, Wang vd., 2001, Ko vd., 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu özelliklerin yanı sıra, emodin protein tirozin kinazların tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiği ve kanser hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (Zhang vd., 1995; Wang vd., 2001; Ko vd., 2010). Emodinin akciğer, meme, serviks, karaciğer, yumurtalık, kemik iliği, prostat, kan kanseri gibi birçok kanser türünde proliferasyonu azalttığı ve apoptozisi indüklediği bulunmuştur (Yu vd., 2008, Huang vd., 2009, Su vd., 2010). Antiproliferatif etkisinin yanı sıra bazı kanser hücrelerinde hücrelerin kemoterapötik ajanlara hassasiyetini arttırdığı gösterilmiştir (Yu vd., 2013).

1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Caco-2 (ATCC® HTB-37™) 72 yaşındaki erkek kolorektal adenokarsinoma hastasından alınan tümör dokusunun kültüre edilmesiyle elde edilen bir hücre hattıdır. Kolon epitel hücrelerinden köken alır. Solid tümör hücre hattı olduğundan dolayı kültüre alındığı hücre kültür kabının yüzeyine tutunarak çoğalır. Primer tümörden 1977 yılında J. Fogh tarafından izole edilmiştir (Anonim 2013a). Caco-2 hücrelerinin en önemli özelliği hücreler tek tabaka yoğunluğuna ulaştığı anda başlayan ve yaklaşık 20 gün süren spontan bir değişikliğe uğramalarıdır. (Meunier vd., 1995)

HT-29 (ATCC® HTB-38™) ise 44 yaşındaki kadın kolorektal adenokarsinoma hastasından alınan tümör dokusunun kültüre edilmesiyle elde edilen bir hücre hattıdır. Caco-2 hücreleri gibi, HT-29 hücreleri de kolon epitel hücre kökenlidir ve solid tümör orijinli olduğundan kültür kabının yüzeyine tutunarak çoğalır. Primer tümörden 1964 yılında eksplant kültür yöntemiyle J. Fogh tarafından izole edilmiştir (Anonim 2013b). Caco-2 hücrelerinin aksine, normal kültür koşullarında değişikliğe uğrama özellikleri bulunmamaktadır. Ancak bazı kimyasallarla uyarılması durumunda değişikliğe uğrayabilirler (Meunier vd., 1995).

1.5. MTT Proliferasyon Yöntemi

Kanser araştırmalarının yapıldığı hücre kültürü çalışmalarında etkinin gözlemlenebilmesi için canlı hücre sayısının belirlenmesi gerekmektedir. Canlı hücre sayısı geleneksel olarak hemositometre veya koloni sayımı ile gerçekleşse de, örnek sayısının çok olduğu çalışmalarda tek tek hücre saymak zahmetli bir yöntem haline gelmektedir (Twentyman ve Luscombe 1987). Mosmann (1983), hücre saymaktan daha hızlı ve kolay uygulanan bir yöntem tanımlamıştır. Bu yöntem, mitokondriyal bir enzimin MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] adı verilen bir tetrazolium tuzunu substrat olarak kullanarak bu tuzu parçalamasına dayanmaktadır. Canlı hücrelerin mitokondriyelerinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri MTT'yi parçalayarak formazan kristalleri haline dönüştürür. Oluşan kristaller DMSO veya asitli izopropanolle çözüldüğünde oluşan mor renkli çözeltinin spektrofotometre kullanılarak 560nm test, 620 nm referans dalga boylarında absorbans ölçümü yapılır. MTT ancak canlı hücrelerin mitokondriyelerindeki aktif enzimler ile

parçalanacağından elde edilen absorbans değerleri canlı hücre oranlarıyla ilgili bilgi vermektedir. (Freimoser vd., 1999; Li vd., 2012)

Başka bir tetrazolium tuzu olan XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate), MTT yöntemi gibi mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesine dayalıdır. Bu yöntemde oluşan formazan, MTT'nin aksine suda çözülebilmektedir (Roehm, 1991).

Bunların yanı sıra proliferasyonun belirlenmesi için hangi parametrenin ölçüldüğüne bağlı olarak farklı yöntemler bulunmaktadır. 5-bromo-2'-deoksiüridin kullanılarak yapılan yöntem DNA sentezinin ölçülmesine dayanırken, lusiferaz ve lusiferin kullanılarak yapılan biyoluminesans temelli yöntem ise ATP konsantrasyonuna dayanır. Bu yöntemler arasından hangi yöntemin uygulanacağı hücre tipine ve protokole bağlı olarak değişebilir (Smith, 2012).

1.6. HO/PI Boyama Yöntemi

HO/PI boyama yöntemi, Grusch vd, (2001) tarafından tanımlanan, hücrelerin floresan özellikteki iki boya (Hoechst 33258 ve Propidium Iodide) ile boyanarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin tek preparatta gözlemlenebilmesine ve sayılabilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Hoechst 33258 bütün hücrelerin nükleuslarını boyarken propidium iodide membrandan geçemez. Bu nedenle propidium iodide membran bütünlüğü bozulmuş olan geç apoptotik ve nekrotik hücreleri boyar. Nekrotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması, nükleer fragmentasyon veya apoptotik cisimciklere parçalanma görülmez. Apoptotik hücrelerde ise fragmentasyon belirgindir. Bu sayede apoptotik, nekrotik ve canlı hücreler tek seferde ayırt edilebilir (Fahrig vd., 2003).

1.7. Western Blot Yöntemi

Western blot, ilk olarak Towbin vd., (1979) tarafından ortaya koyulan ve protein çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yöntem, proteinlerin poliakrilamid jelde membrana aktarılarak analizine dayanır. Temel olarak üç basamağı bulunmaktadır. İlk basamakta büyüklüklerine göre poliakrilamid jelde ayrıştırılan proteinler ikinci basamakta nitroselüloz veya PVDF membrana transfer edilir. Nitroselüloz membran protein afinitesi daha iyi olması açısından tercih edilebilir ancak çok hassastır ve tekrar kullanılamaz. Bu durumlarda PVDF

membranlar tercih edilir. Üçüncü basamak görüntüleme basamağıdır. Membran, hedef proteine spesifik primer (birincil) ve sekonder (ikincil) antikorlarla muamele edilir ve hedef protein membran üzerinde bantlar halinde görüntülenir. Görüntüleme, sekonder antikora bağlı olan sinyal molekülleri sayesinde mümkün olmaktadır (Mahmood ve Yang, 2012). HRP (Horse Radish Peroxidase) ve AP (Alkaline Phosphatase) görüntülemeyi sağlayan sinyal molekülleridir. Sekonder antikora bağlı molekülün substratı ortama eklenir ve sonuçta enzimatik reaksiyon sonucunda hedef proteinin olduğu bölgelerde bantlar oluşur (Blake vd., 1984).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkilerden elde edilen bileşiklerin kanser hücreleri üzerine etkisinin araştırılması son yıllarda yapılan çalışmalarda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Cucurbitacin, Cucurbitaceae ve Cruciferae familyalarına ait bitkilerden izole edilen tetrasiklik triterpenlerdendir. Escandell vd., (2008) kolon kanseri hücrelerine cucurbitacin uygulamasının apoptozisi indüklediği ve antitümörijenik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Kolon kanseri hücre hattı HT-29 ile yapılan başka bir çalışmada Nakamura vd, (2009), bu hücrelere indole-3-carbinol ve genisteinin birlikte uygulanmasıyla maddelerin tek tek etkisiz olduğu konsantrasyonda birlikte uygulandığında hücre canlılığının baskılandığını göstermişlerdir. Bu baskılamanın kaspaz-bağımlı apoptozisten dolayı olduğunu belirtmişlerdir. Dahası, birlikte uygulamanın Akt fosforilasyonunu inhibe ettiğini, Akt'nin akış aşağı hedeflerinden biri olan mTOR defosforilasyonu ile yönlendirilen otofajinin indüklenmesini desteklediğini gözlemlemişlerdir.

Baicalein ve wogonin Çin bitkisi *Scutellaria baicalensis*'ten elde edilen bitkisel bileşiklerdir. Kim vd, (2012), kolon kanseri HT-29 hücrelerine baicalein ve wogonin uygulaması yapmış, ve uygulama sonrası DNA fragmentasyonu, hücre döngüsünün G1 fazında birikim gibi apoptotik olaylarda artış gözlemlemiştir. Bu gözlemlerin yanı sıra yaptıkları *in vitro* çalışmalarda Baicalein uygulaması sonrası Bax/Bcl-2 oranındaki artışı ve Akt aktivasyonunu ile apoptozisin indüklediğini göstermişlerdir. Yaptıkları *in vivo* çalışmada baicaleinin tümör büyümesini inhibe ettiğini ve Akt aktivasyonu ile apoptozisi indüklediğini kanıtlamışlardır.

Kolon kanseri hücre hattı Caco-2 ile yapılan başka bir çalışmada ise Dinicola vd, (2013) üzüm tohumundan elde edilen özütler hücrelere uygulanmış ve hücrelerdeki ROS üretimi, hücre içi Ca^{+2} miktarı ve ERK (extracellular signal-regulated kinase) aktivasyonunu kontrol etmişlerdir. ERK aktivitesinin hayatta kalmayı teşvik ettiği düşünülmektedir bu nedenle bu kinazın inhibisyonu antitümör etkinin ortaya çıkmasında önemlidir. Yapılan çalışmada üzüm tohumu özütleri uygulamasının Caco-2 hücrelerinde ROS ve hücre içi Ca^{+2} seviyelerinde artışa ve ERK inaktivasyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Dahası, bir ROS tutucusu olan N-asetil sistein ile ön uygulama yapıldığında ERK fosforilasyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda üzüm tohumu

özütlerinin Caco-2 hücrelerinde ROS üretimi ve hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki artışı içeren ve daha önceden bilinmeyen ERK-temelli bir mekanizma ile apoptozisi indüklediği sonucuna ulaşılmıştır. 8-hidroksidaidzein fermente soya tohumundan izole edilen bir izoflavondur. Epirubisin ise mitokondriyal yolakla apoptozisi indüklediği bilinen antineoplastik bir ajandır ve antikanser ilaç olarak kullanılmaktadır. Lo (2013) kolorektal kanser Caco-2 hücrelerine 8-hidroksidaidzein uyguladığında ROS seviyesinde artış olduğunu gözlemlemiştir. 8-hidroksidaidzein ile epirubisin birlikte uygulandığında ise, tek tek uygulandıkları deneylere oranla ROS seviyesinde çok büyük bir artış belirlemiştir. Bununla birlikte 8-hidroksidaidzein ile epirubisinin birlikte uygulanmasıyla çoklu ilaç direnci proteini MDR1, MDR-ilişkili protein MRP-1 ve MRP-2 mRNA ifade seviyelerinin belirgin bir şekilde düştüğünü görmüştür. Bu özelliklerin yanı sıra birlikte uygulama sonucunda mitokondriyal membran potansiyelinin düştüğünü; hücre döngüsünün sub-G1 fazında tutuklanmanın arttığını; Bax, p53, kaspaz-3, -8 ve -9'un ifadesinin arttığını göstermiş ve birlikte uygulamanın apoptozisi indüklediği sonucuna varmıştır.

Emodin antitümör etkisi yapılan birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Srinivas vd, (2003) serviks kanseri hücre hatlarına emodin uygulamış, emodin DNA sentezini inhibe ettiğini ve apoptozisi indüklediğini belirlemişlerdir. Çalışmanın bundan sonraki evresinde ise mitokondriyal yolakta görev yapan proteinlerin ifadesini araştırmışlardır. Bu aşamada kaspaz-3, -8, -9 ve kaspaz-3'ün substratı olan PARP (poli(ADP-riboz) polimeraz) proteinleri araştırılmış ve kaspaz-3 ve -9'un miktarı artarken kaspaz-8 miktarında değişiklik olmadığını ve kaspaz-3 aktivitesi sonucunda kesilmiş PARP miktarının arttığını gözlemlemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda apoptozis indüksiyonunun mitokondriyal yolakla gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Emodin antiproliferatif ve apoptozis indükleyici etkisi RNA düzeyinde de belirlenebilmektedir. Yu vd, (2008) prostat kanseri hücre hattı LNCaP ile yaptıkları çalışmada emodin proliferasyon ve apoptozise olan etkisini araştırmıştır. Yapılan proliferasyon testiyle emodin doz ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bundan sonraki aşamalarda RT-PCR ve akış (flow) sitometresi yöntemlerini kullanarak emodin bu hücrelerde apoptozisi mitokondriyal yolakla aktive ettiğini belirlemişlerdir.

Emodinün antiproliferatif etkisi, hücre döngüsünün belirli aşamalarda tutulmasından da kaynaklanabilmektedir. Ayrıca emodin, reaktif oksijen türlerinin de birikimine neden olabilir. Yu vd, (2013) karaciğer kanseri hücre hattı HepG2 hücreleriyle yaptıkları çalışmada emodinün hücre döngüsünün G1 fazında birikimi indüklediğini gözlemlemişlerdir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasının ve kaspaz-8 ve kaspaz-9'un aktivasyonunun arttığını, Bcl-2 protein seviyesinin azaldığını göstermişler ve dahili ve harici yolakların dahil olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte emodin uygulamasının hücre içi reaktif oksijen türlerinin birikimini doza bağlı olarak arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca p53 protein seviyesinin arttığını NF-κB protein seviyesinin azaldığını gözlemlemiş ve bu iki proteinin emodinle indüklenen apoptoziste rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır. Bcl-2, direk anti-apoptotik etkisinin yanı sıra, Bax ile heterodimer oluşturarak Bax'ın apoptotik etkilerini nötralize eder. Yapılan bilgisayarlı modellemede emodinün Bcl-2'nin BH3 domainine direk olarak hidrojen bağıyla bağlanarak Bcl-2/Bax heterodimerleşmesine engel olduğunu belirlemişlerdir. Bütün çalışmalar sonucunda, emodinün karaciğer kanser hücre hattında apoptozisi çok yönlü kompleks olaylar kaskadıyla indüklediğini göstermişlerdir.

PRL-3 geni kanser hücrelerinde proliferasyonun teşvik edilmesinde ve apoptozisin inhibisyonunda rol aldığı bilinen bir genidir. Bu genin ifadesinin düşmesi, kanser hücrelerinde proliferasyonun inhibe edilmesinde ve apoptozisin indüklenmesinde önemlidir. Sun ve Pu (2012) yaptıkları çalışmada gastrik kanser hücre hattı SGC-7901 hücrelerini kullanmışlar ve ilk basamak olarak emodin uygulaması sonucu proliferasyonun inhibe edildiğini ve apoptozis oranının arttığını belirlemişlerdir. İkinci basamakta ise, *PRL-3* geninin ifadesini mRNA ve protein seviyesinde kontrol etmişler ve gen ifadesinin düştüğünü hem mRNA hem protein düzeyinde göstermişlerdir. Sonuç olarak gastrik kanser hücre hattı SGC-7901'de emodinün proliferasyonun inhibe edilmesinde ve apoptozisin indüklenmesinde rol oynadığını ve *PRL-3*'ün potansiyel bir terapötik hedef olduğunu göstermişlerdir.

ERCC1 ve Rad51 DNA tamir mekanizmalarında görev aldığı bilinen iki proteindir. Bu proteinlerin ifadesinin düşmesi kanser hücrelerinde proliferasyonun inhibe edilmesiyle bağlantılı olabilir. He vd, (2012), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri SK-MES-1 ve A549 hücrelerinde emodinün proliferasyonu baskılayıcı etkisini belirledikten sonra ERCC1 ve Rad51 ifadelerini protein ve mRNA seviyesinde kontrol etmişler ve her iki seviyede de düşüşü

gözlemlemiştir. Bunların yanı sıra emodin uygulaması sonrası hücreleri elektron mikroskobu ile incelemişler ve hücrelerde vakuolar dejenerasyonu gözlemlemiştir. Sonuç olarak emodinin bu hücre hatlarında ERCC1 ve Rad51'in ifadesini düşürerek proliferasyonu inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Emodinin meme kanseri hücrelerinde apoptozise etkisi de çalışmalara konu olmuştur. Huang vd, (2008) BCap-37 hücrelerine emodin uygulamış ve ilk olarak proliferasyonun baskılanmasını doza ve zamana bağlı göstermişlerdir. Emodinle indüklenen hücrelerde Bax ve sitozolik sitokrom c seviyelerinde artış, Bcl-2 seviyesinde ise azalma belirlemişler ve emodinin meme kanseri BCap-37 hücrelerinde mitokondriyal yolağın inhibisyonu yolu ile apoptozisi indüklediği sonucuna varmışlardır. Çocukluk çağında en sık görülen kanser türü olan lösemiler de emodinin antitümör etkisi de çalışılmıştır. Chun-Guang vd, (2010) kronik myelositik lösemi (CML) K562 hücrelerinde yaptığı çalışmada emodinin Bcl-2/Bax oranını ve prokaspaz-3, -8 ve -9 miktarlarını düşürdüğünü in vivo ve in vitro olarak göstermişlerdir.

Chen vd, (2002) ise bir başka lösemi türü olan promyelolösemi HL-60 hücrelerine emodin uygulamış ve emodinin proliferasyonu inhibe ettiğini ve kaspaz-3 kaskadı yoluyla apoptozisi indüklediğini göstermiştir.

Kanser hücrelerinin hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç göstermesi tedavideki en büyük handikalardan biridir. Hücrelerin ilaçlara karşı direncinin azalması ve hassasiyetinin artması tedavide olumlu sonuç alma yüzdesine büyük ölçüde katkı sağlayacaktır. Literatürde yer alan bazı yayınlarda emodinin ilaç direncine olan etkisinden bahsedilmektedir. Fu vd, (2012) çoklu ilaç direncine sahip olan MCF7/Adr hücrelerini kullanarak adriamycin ve cisplatin'e dirençli bu hücrelere emodin uygulamış ve emodin uygulaması sonucunda hücrelerin ilaç direncinin belirgin bir şekilde düştüğünü gözlemlemiştir. ERCC1 insan hücrelerinde hasar sonrası DNA onarımında görev alan bir protein olmakla birlikte bu proteinin fazla ifade edilmesi kanser tedavisinde kemoterapiye karşı çoklu ilaç direnci gelişimine neden olabilir. Bu durumun araştırıldığı deneyde emodin uygulaması öncesinde dirençli hücrelerde hassas MCF-7 hücrelerine oranla ERCC1 ifadesinin daha fazla olduğunu belirlemiş ve dirençli hücrelere emodin uygulamasının bu ifadeyi nasıl etkilediğine bakıldığında emodinin çoklu ilaç direncine sahip meme kanseri hücre hattı MCF-7/Adr'de ilaç direncini ve ERCC1 protein ifadesini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

İlaç direnciyle ilgili literatürde yer alan bir diğer çalışma yumurtalık kanser hücrelerinde yapılmıştır. Li vd, (2009), kanser tedavisinde etkin olarak kullanılan bir ilaç olan paklitakसेle dirençli yumurtalık kanseri hücrelerine ve normal, hassas hücrelere emodin uygulamıştır. Emodin tek başına uygulandığında her iki hücre hattında da belirgin bir değişiklik gözlenmezken emodin-paklitaksel birlikte uygulaması hücre canlılığında önemli bir düşüşe neden olmuştur. Bu durumun altında yatan mekanizmanın belirlenmesi için yapılan deneylerde emodinin antiapoptotik proteinlerin seviyesini düşürdüğünü ve paklitakselin hücre içine alımını kolaylaştırdığını göstermişlerdir.

Emodinin safra kesesi kanserinde de platinüm ilaçlarına hassasiyeti arttırdığı Wang vd, (2010) tarafından ortaya koyulmuştur. Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin ilaçları emodinle birlikte uygulandığında bu ilaçların antikanser etkisini arttırmaktadır.

COX-2, kolorektal kanserler de dahil olmak üzere insan kanserlerinde ifadesi yüksek olduğu çalışmalarda ortaya koyulmuş bir enzimdir. COX-2 enziminin inhibisyonu yoluyla ifadesinin düşürülmesi kemoterapötik olarak anlamlıdır. Li vd, (2001) COX-2 (Cyclooxygenase-2) inhibitörü olan NS398'in kolon kanseri hücre hatlarında apoptozis indükleyici etkisini araştırmış ve hücre canlılığındaki azalmayı göstermişlerdir. Bununla birlikte, hücre canlılığındaki azalmanın apoptozisin indüklenmesi ile gerçekleştiğini DNA fragmentasyonu ile, bu indüklemenin mitokondriyel yolakla olduğunu ise sitozolik sitokrom c artışı, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP kesilmesi ile kanıtlamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. DeneYlerde Kullanılan Tampon ve ÇöZeltilerin Hazırlanması

DeneYlerde kullanılacak olan hücrelerin çoğaltılması için gerekli besi yerleri hazırlanmıştır. HT-29 (ATCC® HTB-38™) hücreleri için %10 Fötal Sığır Serumu (FBS), %10 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep), 0.1 mM esansiyel olmayan amino asit içeren RPMI-1640 besi yeri, Caco-2 (ATCC® HTB-37™) hücreleri için %20 FBS, %10 Pen-Strep, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asit ve %1 L-glutamin içeren DMEM besi yeri hazırlanmıştır. Hücre kültürü için kullanılan kimyasallar Biological Industries (İsrail)'den temin edilmiştir.

Tripsin-EDTA (%0.25 Tripsin, 0.53 mM EDTA): 25 mg Tripsin ve 15.37 mg EDTA bir miktar distile suda çözülmüş ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Filtre ile steril edildikten sonra -20°C'de saklanmıştır.

1X PBS tamponu hazırlanıp steril edildikten sonra kullanılmıştır. +4°C'de saklanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. 1X PBS hazırlanışı

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH	7.4

Protein izolasyonu için kullanılacak olan lizis tamponu hazırlanıp +4°C'de saklanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Protein izolasyonu için lizis tamponu hazırlanışı

NaCl	150 mM
Tris	50 mM
Triton-X-100	% 1

Çizelge 3.3. PAGE yükleme tamponu (Laemmli yükleme boyası) hazırlanışı

1M Tris-HCl (pH: 6.8)	(0.24 M)
%20 SDS	(% 6)
% 100 Gliserol	(% 30)
β -merkaptoetanol	(2.28 M)
Bromfenolmavisi	(% 0.06)

Çizelge 3.4. PAGE yürütme tamponu (Laemmli tamponu, 1X) hazırlanışı

Tris	(0.025 M)
Glisin	(0.19 M)
SDS	(% 0.1)

Çizelge 3.5. Transfer tamponu hazırlanışı

Tris	(0.020 M)
Glisin	(0.15 M)
Metanol	(% 20)

Çizelge 3.6. 1X TBS hazırlanışı

Tris	(0.009 M)
NaCl	(0.068 M)
pH	7.6

Çizelge 3.7. Bloklama sütü hazırlanışı

Süt Tozu	(% 5)
10X TBS	(1X)
Tween-20	(% 0.1)

Çizelge 3.8. BSA hazırlanışı

BSA	(% 5)
10X TBS	(1X)
Tween-20	(% 0.1)

3.2. Hücre Kültürü

Hücrelerin çözülmesi, çoğaltılması, pasajlanması ve daha sonra yeniden kullanılmak üzere dondurulması için temel hücre kültürü yöntemleri kullanılmıştır. Hücreler yeterli miktarlarda çoğaltılarak deneylere hazırlanmıştır.

3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi

Stok halinde sıvı azotta saklanan Caco-2 ve HT-29 hücrelerini içeren cryo tüpler alkolle silinerek steril ortam sağlayan laminar flow hava akışlı kabine (Heraeus Herasafe HS-12 Class II) alınmış ve tüplerin kapağı hafifçe açılarak havasının çıkması sağlanmıştır. Tüpler 37°C'deki su banyosuna alınarak donmuş haldeki içeriğin çözülmesi sağlanmıştır. İçerik 15 ml'lik falkon tüpe aktarılmış ve üzerine önceden 37°C'ye ısıtılmış besi yerinden 4 ml ilave edilmiştir. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerden oluşan pellet 5 ml besi yeri ile resüspanse edilmiştir. Bu süspansiyon 25 cm²'lik hücre kültür kabına aktarılmış ve 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda büyümeye bırakılmıştır. Hücrelerin gelişebilmesi için nemli ortama ihtiyaç olduğundan dolayı ilerleyen aşamalarda inkübatör olarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör (Nuaire DH Autoflow NU-5500) kullanılmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması

Büyümeye bırakılan hücrelerin belirli aralıklarla besi yerleri tazelenmiştir (HT-29 hücreleri için iki günde bir, Caco-2 hücreleri için üç günde bir). Besi yeri tazelenmek için kültür kabının içindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve kültür kabının hücre bulunan yüzeyi 1X PBS ile yıkanmıştır. Kültür kabına 5 ml taze besi yeri eklenmiş ve hücrelerin büyümeleri için tekrar inkübe edilmiştir. Çoğalan hücreler kültür kabının yüzeyini kapladıktan (konfluent) sonra 75 cm²'lik kültür kaplarına pasajlanmış ve hücreler bu kültür kaplarında çoğaltılmaya devam edilmiştir. Pasajlama işlemi şu şekilde yapılmıştır: Kültür kabı içindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve kültür kabının hücre bulunan yüzeyi 1X PBS ile yıkanmıştır. 25 cm²'lik kültür kaplarına 1 ml, 75 cm²'lik kültür kaplarına 3 ml Trypsin-EDTA eklenmiş ve hücreler 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonunda kültür kabının yüzeyinden ayrılan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alınmış, üzerine 5 ml besi yeri ilave edilmiş ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant

uzaklaştırılmış, pellet 13 ml besi yeri ile resüspanse edilmiş ve 75 cm²'lik kültür kaplarına alınarak inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. 75 cm²'lik kültür kabında yüzeyi kaplayan hücreler deneyler için gerekli hücre sayısına bağlı olarak 1:2, 1:3 oranında seyreltilerek pasajlanmıştır. Son pasajlarda hücrelerin bir kısmı stok olarak saklanmak üzere hücreler %10 dimetilsülfoksit (DMSO), %20 FBS içerecek şekilde cryo tüplere aktarılmış, -80°C'de bir gece dondurularak sıvı azot tankına alınmıştır.

3.3. MTT Proliferasyon Testi

Emodin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre çoğalmasındaki değişim MTT Proliferasyon Yöntemi ile belirlenmiştir.

3.3.1. Hücrelerin Plaklara Ekimi

MTT Proliferasyon Yöntemi 24 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Uygun ortamda çoğaltılan hücreler her kuyucukta 800 µl besi yeri içinde 20.000 hücre olacak şekilde kuyucuklara aktarılmış ve etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve deney grupları haricinde bir kuyucuğa blank olarak kullanılmak üzere ekim yapılmıştır.

3.3.2. Emodin'in Hazırlanması ve Uygulanması

Çalışmada kullanılacak olan Emodin (Sigma-Aldrich, Almanya) toz halde temin edilmiştir. Emodin çözeltisinin hazırlanması aşamasında çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde Emodin stok çözeltisi hazırlanmış ve besi yeri ile seyreltmeler yapılmıştır.

Plaklara ekilen hücreler gece boyu inkübe edildikten sonra iki kontrol grubu ve dört deney grubu ile uygulama yapılmıştır. Deney gruplarına artan konsantrasyonlarda emodin uygulaması yapılmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda emodin diğer kanser hücre hatlarına etkisinin belirlenmesi için kullanılan konsantrasyonlar hücre hattına göre genellikle 1-100 µM arasında değişmektedir (Su vd., 2005; Srinivas vd., 2003; Yu vd., 2008). Bu ön bilgiye istinaden yapılan ilk denemelerde 5-80 µM aralığında konsantrasyon uygulaması yapılmış ve konsantrasyonun 40 µM'a kadar uygulanması uygun bulunmuştur. Bu nedenle konsantrasyonlar 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM olarak seçilmiştir. Kontrol

gruplarından birine herhangi bir madde uygulaması yapılmazken diğerine emodinin çözülmesinde kullanılan DMSO eklenmiştir. Eklenen DMSO, en yüksek konsantrasyonda (40 µM) uygulanan emodin miktarıyla aynıdır. Emodin'in etkisi 24., 48., 72. ve 96. saatlerde inceleneceği için her saat dilimi için ayrı bir plak kullanılmıştır. Uygulamalar tamamlandığında plaklar etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.3.3. MTT Proliferasyon Testi

Çalışmada kullanılan MTT (Sigma-Aldrich, Almanya) toz halde temin edilmiştir. MTT solüsyonu 1X PBS içinde son konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Uygulamadan sonraki 24. saatte ilgili plak etüvden çıkarılmış, kör kuyucuğu haricindeki kuyucuklara 80 µl MTT uygulaması yapılmış ve plak tekrar etüve alınarak 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda bütün kuyucuklardaki besi yeri hücrelere ve oluşan formazan kristallerine zarar vermeden aspire edilmiştir. Formazan kristallerinin çözülmesi amacıyla bütün kuyucuklara 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Plak 15 dakika çalkalanmış ve kristaller tamamen çözüldüğünde test 560 nm, referans 620 nm dalga boyunda Thermoskan Multi-plate reader ile tüm kuyucuklar için absorbans değerleri elde edilmiştir. Uygulamadan sonraki 48., 72. ve 96. saatlerde aynı yöntem uygulanmış ve absorbans verileri elde edilmiştir.

3.3.4. Elde Edilen Verilerin Analiz Edilmesi

Tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değeri çıkarılmış ve formazan kristallerinden kaynaklanan esas absorbans değeri hesaplanmıştır. 48. saat, 72. saat ve 96. saat verileri ayrı ayrı 24. saat verileriyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma 24. ve 48. saatler için şu şekilde yapılmıştır: her örnek için 48. saatteki esas absorbans değerinden 24. saatteki esas absorbans değeri çıkarılmış, bu fark 48. ve 24. saatlerdeki kontrol absorbanslarının farkına bölünmüş ve elde edilen sonuç 100 ile çarpılarak her örnek için yüzde proliferasyon değeri hesaplanmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildiğinden, her örnek için elde edilen üç değerlerin ortalaması alınmış ve ortalama değerler elde edilmiştir. Ortalama değerler GraphPad 5.0 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) programına girilmiş ve hücrelerin proliferasyon değişikliklerini gösteren grafikler çizilmiştir.

Aynı hesaplamalar 72. saat ve 96. saat verileriyle 24. saat verilerinin kıyaslanmasıyla ayrı ayrı yapılmış ve grafikler elde edilmiştir.

3.4. Apoptozis ve Nekrozis Yöntemi

Emodin'in farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda hücrelerin proliferasyonunda gözlenen azalmanın nedenini bulmak için apoptozis-nekrozis yöntemi uygulanmıştır. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için Hoechst 33258/Propidium Iodide (HO/PI) yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem sayesinde canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler tek seferde belirlenmiştir.

3.4.1. Hücrelerin Plaklara Ekimi ve Emodin Uygulanması

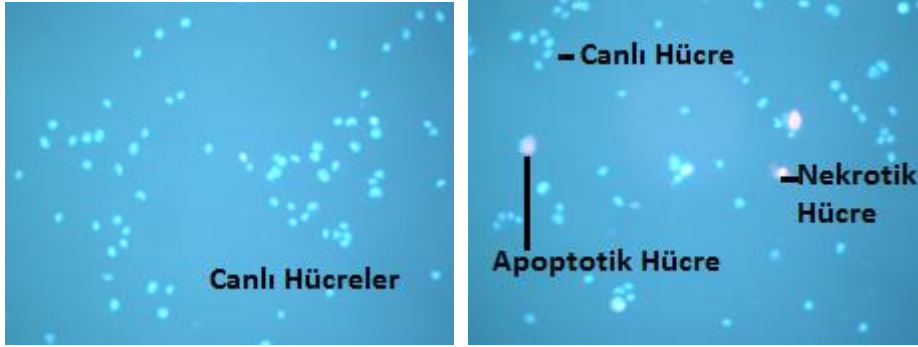
Hücre kültür ortamında çoğaltılan hücreler her kuyucukta 800 µl besi yeri içinde 20.000 hücre olacak şekilde kuyucuklara paylaştırılmıştır. Deney HT-29 hücrelerinde 24., 48. ve 72. saatlerde, Caco-2 hücrelerinde 72. ve 96. saatlerde gerçekleştirileceği için her saat dilimi için ayrı plaklara ekim yapılmıştır. Plaklar etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak yürütülmüştür.

Uygulanacak olan Emodin 3.3.2'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Uygulama, kontrol ve deney gruplarıyla gerçekleştirilmiştir. İki kontrol grubu, proliferasyon deneyinde olduğu gibi hiç uygulama yapılmayan grup ve DMSO uygulanan gruptan oluşmuştur. Deney grubu HT-29 hücreleri için iki konsantrasyondan (20 µM ve 40 µM) oluşurken Caco-2 hücreleri için dört konsantrasyon (5 µM, 10 µM, 20 µM ve 40 µM) uygulaması yapılmıştır. Uygulama tamamlandığında plaklar etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.4.2. Apoptozis ve Nekrozis Yöntemi

Hoechst 33258 ve Propidium Iodide boya ları hacimce 1:1 oranında ışık almayan ortamda karıştırılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra 24.saat plağı etüvden çıkarılmış ve plak yüzeyine tutunan hücreler Tripsin-EDTA ile muamele edilerek resüspanse edilmiştir. Resüspanse edilen çözeltilerden 100 µl Eppendorf tüpe aktarılmıştır. Her örneğe HO/PI boya karışımından 10 µl karanlık ortamda eklenmiştir. Tüpler alüminyum folyoyla sarılarak etüvde 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda her örnekten 30 µl alınıp lam üzerine damlatılmıştır, hücrelerin çökmesi için bir dakika beklenmiş ve floresan mikroskop (Olympus BX51) altında

UV ışığı ve DAPI filtresi ile hücreler incelenmiştir. Her örnekten fotoğraf çekilmiş ve bu fotoğraflardaki canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler sayılmıştır (Şekil 3.1). Sayımlar sonucunda apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına oranının 100 ile çarpılmasıyla apoptotik hücre yüzdesi belirlenirken aynı hesap nekrotik hücreler için de yapılmış ve nekrotik hücre yüzdesi belirlenmiştir. Elde edilen yüzdelere GraphPad 5.0 programı kullanılarak grafikler çizilmiştir.



Şekil 3.1. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin görünümü

3.5. Western Blot

Emodin'in mitokondriyal sinyal iletim yolağı aracılığı ile apoptozise etkisinin belirlenmesi amacıyla blotlama tekniği kullanılarak mitokondriyal yolda yer alan Bax, Bcl-2 ve sitokrom c proteinlerinin ifadeleri saptanmıştır.

3.5.1. Hücre Lizatı Elde Edilmesi

Genlerin protein düzeyindeki ifadesi HT-29 hücreleri için 0., 2., 4., 8., 24. ve 48.saat; Caco-2 hücreleri için 0., 8., 24., 48., 72. ve 96. saat olmak üzere altı farklı saat diliminde incelenmiştir. Hücreler 3.2'de anlatılan hücre kültürü yöntemleri ile çoğaltılmıştır. Hücre lizatlarının hazırlanması için mililitresinde 1×10^6 hücre olan hücre çözeltisi hazırlanmıştır. Uygulama yapılmadan önce hücre çözeltisi içinden 2 ml (2×10^6 hücre) bir falkon tüpe alınmış ve 0. saat lizatı hazırlamak üzere hemen buz üzerine konmuştur. Emodin stok çözeltisi 3.3.2'de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve son konsantrasyonu 40 μ M olacak şekilde kalan hücre çözeltisine uygulanmıştır. Uygulama sonrası hücre çözeltisi etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 0. saat için ayrılan hücreler 1000 rpm'de 3 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 2 ml soğuk PBS eklenerek aynı şartlarla tekrar

santrifüjlenmiştir. PBS ile yıkama işlemi tekrarlanmış ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 100 µl lizis tamponu, 2.5 µl PMSF ve 2.5 µl PIC (Protease Inhibitor Coctail) eklenip pipetaj yapıldıktan sonra 10.000 rpm'de 20 dakika +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda süpernatant dikkatlice bir eppendorf tüpe alınarak 0. saat hücre lizatı olarak -20°C'de saklanmıştır. Uygulamadan sonraki diğer saat dilimlerinde hücre çözeltisi içinden sayım yapılarak 2×10^6 hücre alınmış ve 0. saat için uygulanan yöntem bu örnekler için de uygulanmıştır. Sonuçta her iki hücre hattında altı saat dilimi için altı örnek elde edilmiştir.

3.5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlanması

Hazırlanan hücre lizatlarının elektroforezi poliakrilamid jel hazırlanarak yapılmıştır. Jel dökmeye geçmeden önce % 30:0.8 (v/w) akrilamid:bisakrilamid karışımı, 1M Tris-Hcl (pH: 8.8), 1M Tris-HCl (pH: 6.8), %20 sodyumdodesilsülfat (SDS), %10 amonyumpersülfat (APS) hazırlanmıştır. Jel dökme aparatları hazırlanarak dikey jel dökme düzeneği kurulmuştur. Yürütme jeli içeriği aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

% 30:0.8 akrilamid:bisakrilamid	:	3.1 ml
1M Tris-Hcl (pH: 8.8)	:	3 ml
%20 SDS	:	38 µl
dH ₂ O	:	1.3 ml

Bu karışıma son olarak 36 µl %10 APS ve 5 µl TEMED eklenerek camların arasına camın yarısına kadar yavaşça dökülmüştür. Kalan yarısına bir köşeden yavaşça dH₂O eklenmiş ve jel polimerleşmesi için bir saat beklenmiştir. Bir saatin sonunda jelin üzerine eklenen su uzaklaştırılarak, kurutma kağıdı ile camların arasında kalan su damlacıkları temizlenmiştir. Daha sonra yükleme jeli için aşağıdaki kimyasallar kullanılarak hazırlanan çözeltiye son olarak 25 µl %10 APS ve 5 µl TEMED eklenerek camların arasına dökülmüştür. Son olarak 1 mm tarak camlar arasına yerleştirilmiş ve yine jel oluşumu için 1 saat beklenmiştir. İkinci jel oluşumu da gerçekleştikten sonra camlar düzeneden çıkarılmış ve elektroforez için hazır hale getirilmiştir.

% 30:0.8 akrilamid:bisakrilamid	:	660 µl
1M Tris-Hcl (pH: 6.8)	:	630 µl
%20 SDS	:	25 µl

dH₂O : 3.6 ml

3.5.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Yürütme tankı hazırlanmış ve Laemmli yürütme tamponu (Çizelge 3.4) ile doldurulmuştur. Camlar arasındaki tarak çıkarılmış ve kuyucuklarda kalıntı veya tahribat olup olmadığı kontrol edilmiştir. Yükleme öncesinde hücre lizatı örneklerinden 6 µl alınıp 3 µl Laemmli yükleme boyasıyla (Çizelge 3.3) karıştırılmış ve önceden 98°C'ye ayarlanmış kuru blok ısıtıcıda 3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında ilk kuyucuk boş bırakılarak ikinci kuyucuktan itibaren örnekler artan zamana göre (HT-29 hücreleri için sırasıyla 0., 2., 4., 8., 24. ve 48. saatler; Caco-2 hücreleri için sırasıyla 0., 8., 24., 48., 72. ve 96. saatler) yüklenmiştir. Örneklerin yüklenmesi bittikten sonra ilk kuyucuğa 5 µl protein marker ön ısıtma işlemine tabi tutulmadan yüklenmiştir. Elektrotlar güç kaynağına bağlanmış ve elektroforez başlatılmıştır. Yükleme jeli boyunca 100 V, yürütme jeline geçtikten sonra 200 V akım uygulanmıştır. Markerin bantları iyice açılınca elektroforez bitirilmiş ve jeli içeren camlar çıkarılmıştır.

3.5.4. Membrana Transfer

Transfer için sandviç aparat, sünger, filtre kağıdı ve membran hazırlanmıştır. Süngerler ve filtre kağıtları transfer tamponu (Çizelge 3.5) içinde ıslatılmıştır. Sandviç aparatın beyaz kısmı alta getirilmiş ve sırasıyla bir sünger ve bir filtre kağıdı koyulmuştur. Membran önce saf metanole sonra transfer tamponuna alındıktan sonra filtre kağıdı üzerine yerleştirilmiştir. Jelin yükleme jeli kısmı atıldıktan sonra geriye kalan yürütme jeli, hava boşluğu kalmayacak şekilde membranın üzerine koyulmuştur. Jelin üzerine bir filtre kağıdı ve bir sünger koyulmuş ve sandviç aparat kapatılmıştır. Sandviç aparatın siyah kısmı transfer tankındaki siyah kısma gelecek şekilde aparat tanka yerleştirilmiştir. Soğutma amaçlı buz aküsü de tanka yerleştirildikten sonra 100 V'da 1 saat boyunca transfer gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrası sandviç açılmış ve membran çıkarılmıştır. Membran, 0.5 mg/ml Ponceau S içinde 1 dakika çalkalanmış ve filtre kağıdı üzerine alınarak fazla boyası emdirilmiştir. Tükenmez kalemle markerin bantları üzerinden geçilmiştir. Membran saf metanole alınmış ve boyası gidene kadar çalkalanmıştır.

3.5.5. Membran Bloklama ve Antikor Uygulaması

Boyası metanolla giderilen membran üç defa beşer dakika 1X TBS (Çizelge 3.6) ile yıkanmıştır. Bloklama sütü (Çizelge 3.7) içine koyulan membran bloklama için 1 saat çalkalanmıştır. Süre bitiminde membran iki defa 8 dakika %0.1 1X TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkama aşamaları bu şekilde tamamlandıktan sonra 3 ml BSA (Çizelge 3.8) içine 6 µl antikor eklenmiş, membran bu karışım içine alınmış ve gece boyu +4°C'de çalkalanmıştır. Bu çalışma kapsamında Bax, Bcl-2 ve β-aktin antikorları kullanılmıştır. Gece boyu antikorla muamele edilen membran ertesi sabah çıkarılmış ve 5 dakika 1X TBS ile, 10 dakika TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkamalardan sonra 10 ml bloklama sütü içine 10 µl alkalenfosfataz-bağlı (AP-linked) sekonder antikor eklenmiş ve membran bu karışımda oda sıcaklığında 1 saat çalkalanmıştır. Sekonder antikor uygulaması sonrası membran 5 dakika 1X TBS, 10 dakika TBS-Tween ile yıkanmıştır.

3.5.6. Görüntüleme

Son yıkamadan sonra membran filtre kağıdına tutularak fazla tamponun akması sağlanmıştır. NBT/BCIP karışımı filtreden geçirilmiş ve 1 ml karışım membran üzerine yayılmıştır. 1-2 dakika boyunca bant oluşumu için beklenmiş ve bantlar gözlemlenmiştir.

3.6. Emodin ile Uyarılan Hücrelerde Sitokrom c Konsantrasyonunun Belirlenmesi

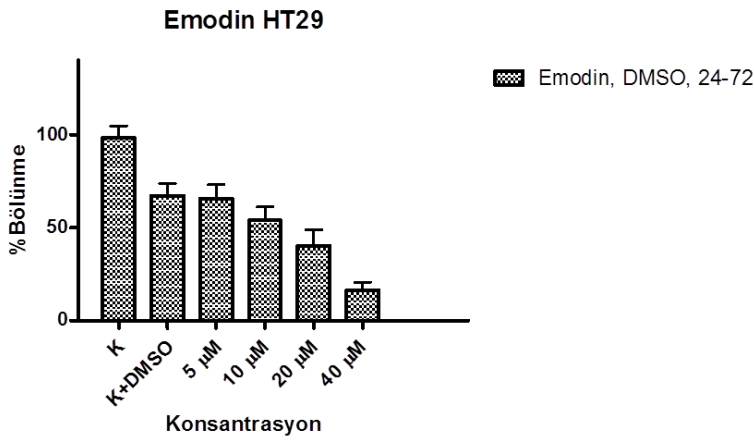
Hücreler apoptozise girdiğinde mitokondriden sitozole sitokrom c salınımı gerçekleşir. Bu nedenle Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit (Abcam, İngiltere) kullanılarak hücrenin total proteini mitokondriyal ve sitozolik olarak ayrılmıştır. Kitin içeriğinde Mitochondria Extraction Buffer (Mitokondri Ekstraksiyon Tamponu), 5X Cytosolic Extraction Buffer (Sitozolik Ekstraksiyon Tamponu), 1 M DTT ve PIC bulunmaktadır. 3.2'de anlatılan yöntemlerle çoğaltılan hücrelerden 5×10^7 hücre 0. saat örneği olarak kullanılmak üzere hemen buz üzerine koyulmuştur. Kalan hücrelere son konsantrasyon 40 µM olacak şekilde emodin uygulaması yapılmıştır. Buza alınan hücreler 600 x g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet 10 ml soğuk PBS ile resüspanse edilmiş ve 600 x g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir.

Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kit içeriği olan 5X sitozolik ekstraksiyon tamponu seyreltilerek 1X haline getirilmiş ve 1 ml'sine 2 µl PIC ve 1 µl DTT eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Pellet, hazırlanan 1X sitozolik ekstraksiyon tamponu ile resüspanse edilmiş ve buz üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ultrasonik homojenizatörle homojenizasyon yapılmıştır. Homojenat eppendorf tüpe alınmış ve 700 xg'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice yeni bir eppendorf tüpe alınmış ve 10.000 xg'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant "sitozolik kısım" olarak yeni bir tüpe alınmış ve -80°C'de saklanmıştır. Kit içeriğinde bulunan mitokondri ekstraksiyon tamponunun 1 ml'sine 2 µl PIC ve 1 µl DTT eklenerek tampon hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan tampondan 100 µl alınmış ve pellet bu tamponla resüspanse edilmiştir. 10 saniye vortekslendikten sonra "mitokondriyal kısım" olarak -80°C'ye kaldırılmıştır. Emodin uygulaması yapılan HT-29 hücrelerinden uygulamadan sonraki 2., 4., 8., 24. ve 48. saatlerde; Caco-2 hücrelerinden uygulamadan sonraki 0., 8., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde 5×10^7 hücre alınarak aynı protokol uygulanmış ve belirtilen altı saat dilimi için 12 örnek elde edilmiştir. Bu örnekler Western Blot yönteminde hücre lizati olarak kullanılmış ve protein seviyeleri sitokrom c antikorunu kullanılarak belirlenmiştir.

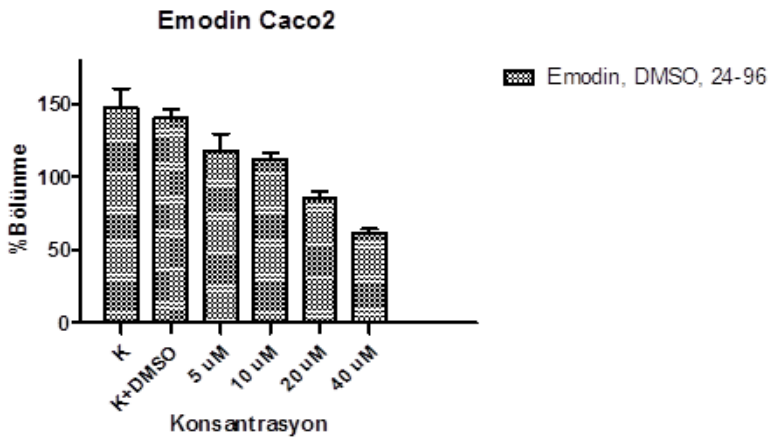
4. BULGULAR

4.1. MTT Proliferasyon Testi

Emodin'in hücre çoğalmasına etkisinin belirlenebilmesi için gerçekleştirilen MTT Proliferasyon Yöntemi sonucu elde edilen verilerin analizi yapılmış ve emodin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre yüzdesini gösteren grafikler elde edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). 40 μ M emodin konsantrasyonunun hücre çoğalmasını %50'nin üzerinde azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



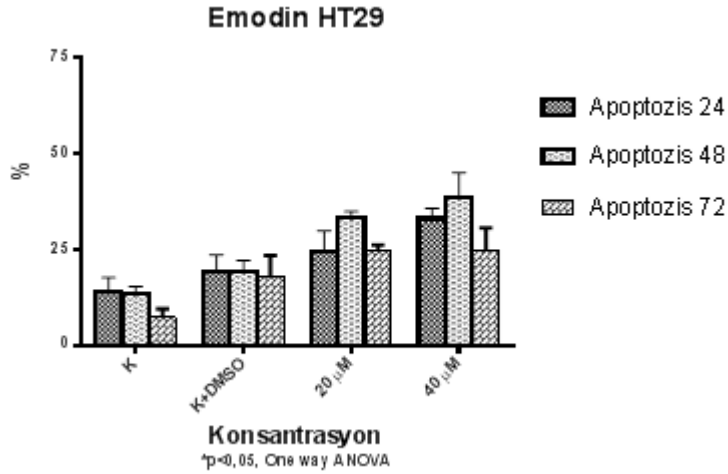
Şekil 4.1. MTT Proliferasyon Yöntemi Sonucu, HT29 Hücre Hattı



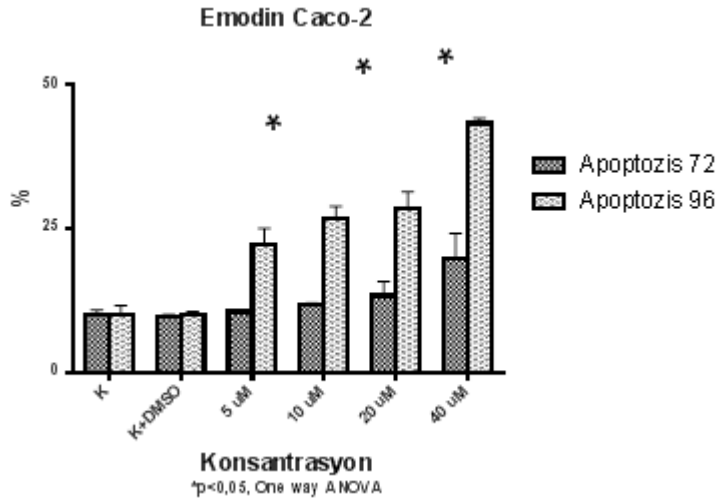
Şekil 4.2. MTT Proliferasyon Yöntemi Sonucu, Caco-2 Hücre Hattı

4.2. Apoptotik Hücrelerin Sayımı

Emodin uygulaması sonucu proliferasyondaki azalmanın apoptozisle ilişkisini belirlemek amacıyla apoptozis-nekrozis yöntemi uygulanmıştır. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için Hoechst 33258/Propidium Iodide (HO/PI) yöntemi uygulanmıştır. Her iki hücre hattı için apoptotik hücre oranının doza bağlı artışı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4).



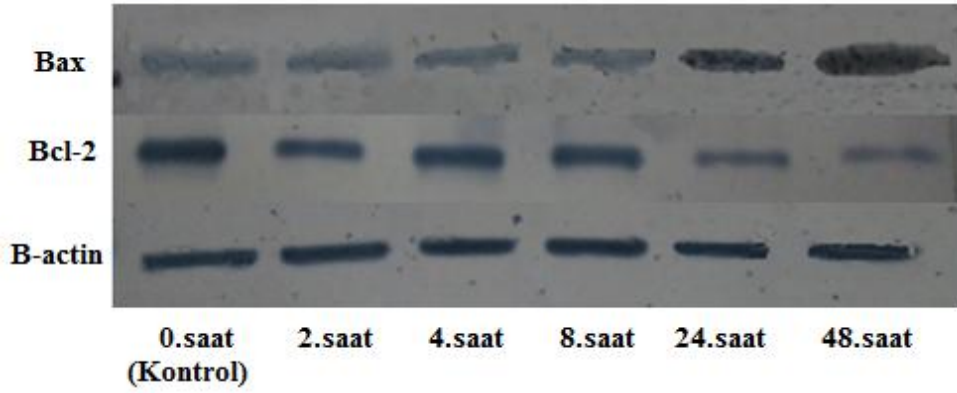
Şekil 4.3. Apoptotik hücre oranı, HT-29 Hücre Hattı



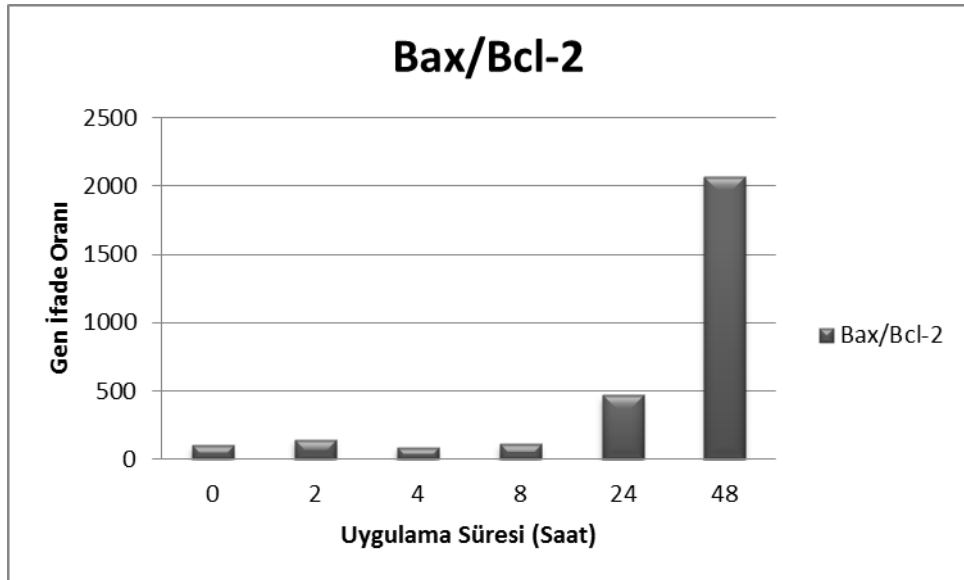
Şekil 4.4. Apoptotik hücre oranı, Caco-2 hücre hattı

4.3. Western Blot

Emodin'in mitokondriyal sinyal iletim yolağı aracılığı ile apoptozise etkisinin belirlenmesi amacıyla blotlama tekniğı kullanılarak mitokondriyal yolakta yer alan genlerin protein düzeyinde ifadeleri incelenmiştir (Şekil 4.5). Yapılan sayısal hesaplamalar sonucu elde edilen değerler grafiğıe döküldüğünde Bax/Bcl-2 oranındaki artış dikkat çekmektedir (Şekil 4.6)



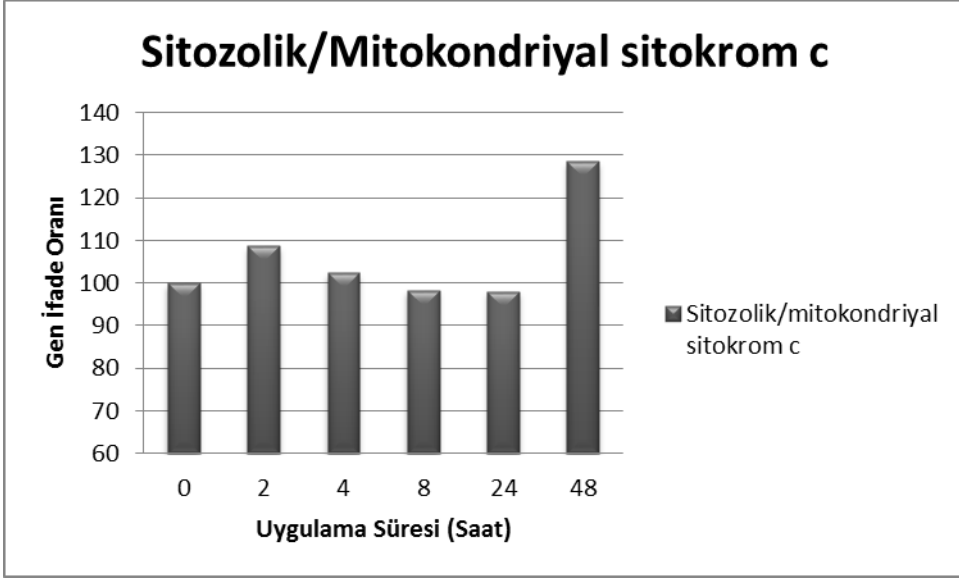
Şekil 4.5. Western blot membran görüntüleri (HT-29)



Şekil 4.6. Uygulama süresine bağılı olarak Bax/Bcl-2 oranındaki değışiklik (HT-29)

4.4. Emodin ile Uyarılan Hücrelerde Sitokrom c Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mitokondriden sitozole sitokrom c salınımını belirlemek için yapılan bu testte HT-29 hücrelerinde sitozolik/mitokondriyal sitokrom c oranında artış olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7. Sitozolik/mitokondriyal sitokrom c oranı, HT-29 hücre hattı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ve yıllarda bitkilerden elde edilen etken maddelerin araştırmalarda kullanılması yaygınlaşmıştır. Özellikle kanser hücreleriyle yapılan çalışmalarda bu maddelerin hücrelere etkisi belirlenmektedir. Bu kimyasallardan biri olan emodin, *Rheum officinale* ve *Polygonum cuspidatum* gibi bitkilerde bulunan aktif bir antrakinon bileşiktir (Yan vd., 2008). Emodinin antienflamatuvar (Meng vd., 2010), antiviral (Xiong vd., 2011), vazorelaksan (Huang vd., 1991) ve ağrı kesici (Gao vd., 2011) etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerin yanı sıra, emodinin akciğer (Lai vd., 2009), meme (Huang vd., 2008), karaciğer (Hsu vd., 2010), lösemi (Chun-Guang vd., 2010) gibi birçok kanser türünde antitümör etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmalardan bir kısmı emodinin apoptozis üzerine etkisine ve bunun moleküler mekanizmasına yoğunlaşmıştır. Apoptozisin mitokondriyal yolakla aktive olduğunu gösteren çalışmalarda apoptozis yolaklarında etkin rol oynayan kaspaz ailesi proteinleri (kaspaz-3, -6, -7, -8, -9), yine dahili yolağın düzenleyici proteinleri olan Bcl-2 ailesi proteinleri (Bax, Bcl-2, Bcl-xL gibi) ve mitokondriyal apoptozis yolağının en önemli belirteçlerinden biri olan sitozolik sitokrom c seviyeleri araştırılır (Huang vd., 2008; Yu vd., 2008; Yu vd., 2012). Bu çalışmada insan kolon kanseri HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde emodin uygulamasının proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediğini Bax/Bcl-2 oranı ve sitozolik sitokrom c miktarı artışına bağlı olarak mitokondriyal yolak aracılığı ile gerçekleştiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarda emodinin HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana getirdiğini gözlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2) .Yu vd. (2008) ve Huang vd. (2008) tarafından sırasıyla prostat ve meme kanseri hücrelerinde canlı hücre sayısında emodinin benzer etkisinin olduğu ve antitümör özelliği gösterilmiştir. Her iki çalışmada da Bax, Bcl-2 ve sitozolik sitokrom c artışı çalışılmış ve mitokondriyal yolakla apoptozisin indüklendiği belirlenmiştir.

Apoptozis DNA fragmentasyonu, hücrelerin küçülerek büzüşmesi ve küçük membran-bağlı apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi tipik morfolojik özelliklerle karakterize edilir (Regula vd., 2003). Bu morfolojik özelliklerden yararlanılarak geliştirilen teknikler sayesinde apoptotik hücrelerin sayımı gerçekleştirilebilmekte ve apoptotik hücre oranları belirlenebilmektedir. Apoptozisin belirlenmesine yönelik çalışmalarda, proliferasyon yönteminde uygulanan dozlar temel alınarak

yapılan uygulanmalarda apoptotik hücre oranının arttığı belirlenmiştir. Bu artışı belirleme yöntemlerinden bir tanesi Grusch vd, (2001) tarafından tanımlanan HO/PI boyama yöntemidir. Emodin uygulaması sonucu kolon kanseri hücrelerinde gözlemlenen canlı hücre oranındaki düşüşün apoptozisle ilişkisinin ortaya koyulması için HO/PI boyama yöntemi kullanılmış ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gözlemlenmesi hedeflenmiştir (Şekil 3.1). Bu yöntemle gerçekleştirilen hücre sayımları sonucu elde edilen grafiklere bakıldığında, emodin her iki hücre hattında da apoptozisi indüklediği görülmüştür (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Apoptozisin bir başka karakteristik özelliği hücrelerde DNA fragmentasyonudur. Bu özelliğin incelenmesi için hücrelere emodin uygulanarak belirli saatlerde DNA izole edilmiş ve DNA elektroforezi ile fragmentasyon tespit edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen görüntülerde tipik fragmentasyon görüntüsü elde edilememiştir. Ancak Patel vd., (1996) DNA fragmentasyonunun apoptozisin bir belirteci olduğunu, bununla birlikte bütün apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonunun gözlemlenmeyebileceğini belirtmiştir. Bu bağlamda DNA fragmentasyonunun gözlemlenmemiş olması apoptozisin indüklenmediği anlamına gelmemektedir.

Apoptozis iki farklı yolakla aktive olabilir ve bu yollar birçok protein tarafından kontrol edilir (Yu vd, 2013). Bu proteinlerin ifadelerinin incelenmesi, hücre ölümünün gerçekleşmesinin altında yatan yolak hakkında bilgi verir. Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozisin dahili yolağının düzenlenmesinde görev alırlar. Bu nedenle bu ailede yer alan proteinlerin ifadelerinin incelenmesi, apoptoziste dahili yolağın etkili olup olmadığı hakkında bilgi verir. Bu çalışmada Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi Bax ile antiapoptotik üyesi Bcl-2 seviyeleri internal kontrol proteine karşı Western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar emodin HT-29 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu oran mitokondriyal apoptozis yolağının aktivasyonunu gösterilmesinde önemli bir belirteçtir ve çalışmalarda bu amaçla kullanılmaktadır (Kim vd, 2012; Huang vd, 2008; Yu vd, 2013). Bir çok çalışmada olduğu gibi emodin'in başka bir kolon kanseri hücre hattı olan LS1034'te bu oranı arttırdığı ve mitokondriyal apoptozisi indüklediği belirtilmiştir (Ma vd., 2012). Dolayısıyla HT-29 hücrelerinde belirlenen Bax/Bcl-2 oranındaki artış, mitokondriyal apoptozisin indüklenmiş olduğunu göstermektedir. Caco-2 hücrelerinde meydana gelen bir kontaminasyondan dolayı Western blot deneyleri bu hücrelerde gerçekleştirilememiştir.

Emodinle indüklenen HT-29 hücrelerinde mitokondriyal ve sitozolik sitokrom c miktarlarının araştırılması, yine Western blot yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Emodin uygulamasıyla, sitozolik/mitokondriyal sitokrom c oranında zamana bağlı artış meydana gelmektedir. Bu artış, mitokondriyal apoptozisin indüklenmiş olabileceği yönündeki bulgularımızı desteklemektedir. Mitokondriyal apoptozisin önemli bir aşaması, mitokondriden sitozole sitokrom c salınımıdır. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı apoptozis için geri dönülmez bir aşamadır. Dahili yolakta hücreye gelen ölüm sinyalleri sonucunda mitokondriyal zarın geçirgenliğinin artmasıyla, sitokrom c mitokondriden sitozole salınır (Fulda ve Debatin, 2006). Dolayısıyla hücrelerde sitozolik sitokrom c seviyesinde artış gözlemlenir. Bundan sonraki aşamadan apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadının aktif hale gelmesi gerçekleşir. Literatürde yer alan mitokondriyal apoptozis çalışmalarında sitozole sitokrom c salınımı sıklıkla çalışılmış ve sitozolik sitokrom c seviyesindeki artış mitokondriyal apoptozis ile ilişkilendirilmiştir (Huang vd., 2008; Ma vd., 2012; Li vd., 2001). Sitokrom c ile birlikte mitokondriden salınan Endo G DNA'ya hasar vererek fragmentasyonun oluşmasına neden olur (Uren vd., 2005). DNA'nın hasar görmesi hücre bölünmesinin kontrol noktalarında hücrenin bekletilmesine neden olur ve hücre döngüsü devam edemez. Bu noktada DNA hasarı tamir edilmeye çalışılır ancak tamir edilemediği durumda hücre ölümü gerçekleşir (Wang ve Lippard, 2005).

Emodin gibi kanser hücrelerinde bitkilerden elde edilen kimyasalların uygulanmasıyla apoptozisin indüklenmesi kanser tedavilerinde önemli yere sahip olduğu bir gerçektir. Bu çalışmada bitkisel bir kimyasal olan emodin, kolon kanseri HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarına uygulanmış ve emodinin bu hücrelerde antiproliferatif etkisi ortaya koyulmuştur. Ayrıca, yapılan morfolojik gözlemler ve sayımlarda apoptozisin indüklendiğini göstermiştir. Bu indüksiyonu belirleyebilmek için mitokondriyal apoptozisle ilişkili olduğu bilinen proteinlerin ifadesi kontrol edilmiştir. Sonuçta Caco-2 hücrelerinde moleküler olarak ifade edilemese de, emodinin HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde apoptozisi indüklediği Hoechst 33258 ve Propidium Iodide yöntemi ile gösterilmiştir. Bu indüklemenin HT-29 hücrelerinde moleküler olarak Bax/Bcl2, mitokondriyal sitokrom c salınımı test edilerek mitokondriyal yolakla olduğu hipotezi yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Daha ileri çalışmalarda mitokondriyal yolakta apoptik süreçte yer alan diğer kaspaz kaskadına katılan moleküllerin test edilmesi ve hücre

bölünmesinde emodinin yine muhtemel hedeflerinin belirlenmesi moleküler mekanizmanın tam aydınlatılmasında önemli katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Roberts, K., Raff, M., Walter, P. 2003. Essential Cell Biology, 2.Baskı, Garland Publishing, New York.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2007. Molecular Biology of the Cell, 5. Baskı, Garland Science, New York.
- American Cancer Society. 2013. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society
- Andersen, M.H., Becker, J.C., Straten, Pt. 2005. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. **Nature Reviews. Drug Discovery**, 4(5): 399-409.
- Anonim (18.09.2009). 2009 Group Projects, Group 2 Cell Death – Apoptosis. [http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=2009_Group_2_Project], Erişim Tarihi: 08.05.2013.
- Anonim 2010. Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2010. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara.
- Anonim (17.11.2012). U.S. Colon Cancer, National Library of Medicine [<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000262.htm>] Erişim Tarihi: 08.05.2013.
- Anonim 2013a. American Type Culture Collection, Caco-2 (ATCC® HTB-37™) [<http://www.atcc.org/products/all/HTB-37.aspx>] Erişim Tarihi: 07.05.2013
- Anonim 2013b. American Type Culture Collection, HT-29 (ATCC® HTB-38™) [<http://www.atcc.org/products/all/HTB-38.aspx>] Erişim Tarihi: 07.05.2013
- Anonim 2013c. Türkiye İstatistik Kurumu, Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2010, 2011, 2012 [<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15847>] Erişim Tarihi: 08.05.2013
- Anonim 2013d. World Health Organization, Treatment of Cancer [<http://www.who.int/cancer/treatment/en/>] Erişim Tarihi: 08.05.2013.

- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., Martinou, J.C. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 276(15): 11615-11623.
- Benzie, I.F.F., Wachtel-Galor, S. 2011. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2. Baskı, CRC Press, Boca Raton (Florida).
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J., Gotschlich, E.C. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. **Analytical Biochemistry**, 136(1): 175-179.
- Burger, A., Abraham, D.J. 2003. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Volume 5: Chemotherapeutic Agents. In: Molecular Biology of Cancer (Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenco, N.A., Gerner, E.W.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J
- Chen, H.C., Hsieh, W.T., Chang, W.C., Chung, J.G. 2004. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 42: 1251-1257.
- Chen, Y.C., Shen, S.C., Lee, W.R., Hsu, F.L., Lin, H.Y., Ko, C.H., Tseng, S.W. 2002. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. **Biochemical Pharmacology**, 64(12): 1713-1724.
- Chun-Guang, W., Jun-Qing, Y., Bei-Zhong, L., Dan-Ting, J., Chong, W., Liang, Z., Dan, Z., Yan, W. 2010. Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, 627(1-3): 33-41.
- Cory, S., Huang, D.C., Adams, J.M. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, 22(53): 8590-8607.
- Creagh, E.M., Conroy, H., Martin, S.J. 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological Reviews**, 193: 10-21.

- Çağlar, K. 2006. Çocuklarda Kanser Hastalığı-1. [<http://www.drbdh.com/arsiv/kanser.html>] Erişim Tarihi: 09.05.2013.
- Dinicola, S., Mariggiò, M.A., Morabito, C., Guarnieri, S., Cucina, A., Pasqualato, A., D'Anselmi, F., Proietti, S., Coluccia, P., Bizzarri, M. 2013. Grape seed extract triggers apoptosis in Caco-2 human colon cancer cells through reactive oxygen species and calcium increase: extracellular signal-regulated kinase involvement. **The British Journal of Nutrition**, 25: 1-13.
- Escandell, J.M., Kaler, P., Recio, M.C., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Augenlicht, L., Ríos, J.L., Klampfer, L. 2008. Activated kRas protects colon cancer cells from cucurbitacin-induced apoptosis: the role of p53 and p21. **Biochemical Pharmacology**, 76(2): 198-207.
- Fahrig, R., Heinrich, J.C., Nickel, B., Wilfert, F., Leisser, C., Krupitza, G., Praha, C., Sonntag, D., Fiedler, B., Scherthan, H., Ernst, H. 2003. Inhibition of induced chemoresistance by cotreatment with (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (RP101). **Cancer Research**, 63(18): 5745-5753.
- Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., Tuor, U. 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(8): 3727-3729
- Fu, J.M., Zhou, J., Shi, J., Xie, J.-S., Huang, L., Yip, A.Y.S., Loo, W.T.Y., Chow, L.W.C., Ng, E.L.Y. 2012. Emodin affects ERCC1 expression in breast cancer cells. **Journal of Translational Medicine**, 10(1): S7.
- Fulda, S., Debatin, K.M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, 25: 4798-4811.
- Gao, Y., Liu, H., Deng, L., Zhu, G., Xu, C., Li, G., Liu, S., Xie, J., Liu, J., Kong, F., Wu, R., Li, G., Liang, S. 2011. Effect of emodin on neuropathic pain transmission mediated by P2X2/3 receptor of primary sensory neurons. **Brain Research Bulletin**, 84(6): 406-413.
- Gerschenson, L.E., Rotello R.J. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. **The FASEB Journal**, 6(7): 2450-2455.

- Gillespie, M.E. 2004. Extrinsic Pathway for Apoptosis, [http://gallus.reactome.org/cgi-bin/eventbrowser?DB=test_gallus_reactome_release_2_myisam&ID=109607&], Erişim Tarihi: 07.05.2013
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, 13(15): 1899-1911.
- Grusch, M., Fritzer-Szekeres, M., Fuhrmann, G., Rosenberger, G., Luxbacher, C., Elford, H.L., Smid, K., Peters, G.J., Szekeres, T., Krupitza, G. 2001. Activation of caspases and induction of apoptosis by novel ribonucleotide reductase inhibitors amidox and didox. **Experimental Hematology**, 29(5): 623-632.
- He, L., Bi, J.J., Guo, Q., Yu, Y., Ye, X.F. 2012. Effects of emodin extracted from Chinese herbs on proliferation of non-small cell lung cancer and underlying mechanisms. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 13(4): 1505-1510.
- Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A. 2013. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute, [http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/], Erişim Tarihi: 07.05.2013
- Hsu, C.M., Hsu, Y.A., Tsai, Y., Shieh, F.K., Huang, S.H., Wan, L., Tsai, F.J. 2010. Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 392(4): 473-478.
- Huang, H.C., Chu, S.H., Chao, P.D. 1991. Vasorelaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. **European Journal of Pharmacology**, 198(2-3): 211-213.
- Huang, Z., Chen, G., Shi, P. 2008. Emodin-induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway. **Archives of Pharmacal Research**, 31(6): 742-748.

- Huang, Z., Chen, G., Shi, P. 2009. Effects of emodin on the gene expression profiling of human breast carcinoma cells. **Cancer Detection and Prevention**, 32(4): 286,291.
- Kasibhatla, S., Tseng, B. 2003. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? **Molecular Cancer Therapeutics**, 2: 573-580.
- Kemper, K.J. 1999. Rhubarb root (*Rheum officinale* or *R. palmatum*), [<http://www.longwoodherbal.org/rhubarbroot/rhubarb.pdf>], Erişim Tarihi: 07.05.2013.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, 26(4): 239-257.
- 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): 1443:1449.
- 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 down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2. **Lung Cancer**, 69(2): 155-164.
- Kong, J.M., Goh, N.K., Chia, L.S., Chia, T.F. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacologica Sinica**, 24(1): 7-21
- Lai, J.M., Chang, J.T., Wen, C.L., Hsu, S.L. 2009. Emodin induces a reactive oxygen species-dependent and ATM-p53-Bax mediated cytotoxicity in lung cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, 623(1-3): 1-9.
- Lewin, B. 2004. Genes VIII, Pearson Prentice Hall, ABD.
- Li, J., Liu, P., Mao, H., Wanga, A., Zhang, X. 2009. Emodin sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis in vitro. **Oncology Reports**, 21(6): 1605-1610.

- Li, M., Wu, X., Xu, X.C. 2001. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. **Clinical Cancer Research**, 7(4): 1010-1016.
- Li, Y., Huang, W., Huang, S., Du, J., Huang, C. 2012. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 422: 85-90
- Li, Z., Sheng, M. 2012. Caspases in synaptic plasticity. **Molecular Brain**, 5:15
- Li-Weber, M. 2013. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. **Cancer Letters**, 332(2): 304-312.
- 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(1): 46-58.
- Lo, Y-L. 2013. A Potential Daidzein Derivative Enhances Cytotoxicity of Epirubicin on Human Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, 14: 158-176.
- Ma, Y.S., Weng, S.W., Lin, M.W., Lu, C.C., Chiang, J.H., Yang, J.S., Lai, K.C., Lin, J.P., Tang, N.Y., Lin, J.G., Chung, J.G. 2012. Antitumor effects of emodin on LS1034 human colon cancer cells in vitro and in vivo: roles of apoptotic cell death and LS1034 tumor xenografts model. **Food and Chemical Toxicology**, 50(5): 1271-1278.
- Mahmood, T., Yang, P.C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, 4(9): 429-434.
- Mayer, B., Oberbauer, R. 2003. Mitochondrial Regulation of Apoptosis. **Physiology**, 18: 89-94.
- Mcllwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W. 2013. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, DOI: 10.1101/cshperspect.a008656.

- Meng, G., Liu, Y., Lou, C., Yang, H. 2010. Emodin suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory responses and NF- κ B activation by disrupting lipid rafts in CD14-negative endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, 161(7): 1628-1644.
- Meunier, V., Bourri , M., Berger, Y., Fabre, G. 1995. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. **Cell Biology and Toxicology**, 11(3-4): 187-194.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65(1-2): 55-63
- Nakamura, Y., Yogosawa, S., Izutani, Y., Watanabe, H., Otsuji, E., Sakai, T. 2009. A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. **Molecular Cancer**, 8: 100
- Patel, T., Gores, G.J., Kaufmann, S.H. 1996. The role of proteases during apoptosis. **The FASEB Journal**, 10(5): 587-597.
- Raff, M. 1998. Cell suicide for beginners. **Nature**, 396: 119-122.
- Rates, S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39: 603-613.
- Regula, K.M., Ens, K., Kirshenbaum, L.A. 2003. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 35(6): 559-567.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunological Methods**, 142(2): 257-265.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. 2013. Cancer Statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 63: 11-30.

- Smith, C. (25.09.2012). Cell Proliferation Assays: Methods for Measuring Dividing Cells (<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/>), Erişim Tarihi: 08.05.2013.
- Srinivas, G., Anto, R.J., Srinivas, P., Vidhyalakshmi, S., Senan, V.P., Karunakaran, 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.
- Su, Y.J., Tsai, M.S., Kuo, Y.H., Chiu, Y.F., Cheng, C.M., Lin, S.T., Lin, Y.W. 2010. Role of Rad51 down-regulation and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 inactivation in emodin and mitomycin C-induced synergistic cytotoxicity in human non-small-cell lung cancer cells. **Molecular Pharmacology**, 77(4): 633-643.
- Su, Y.-T., Chang, H.-L., Shyue, S.-K., Hsu, S.-L. 2005. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Biochemical Pharmacology**, 70:229-241.
- Sun, Z.H., Bu, P. 2012. Downregulation of phosphatase of regenerating liver-3 is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis induced by emodin in the SGC-7901 human gastric carcinoma cell line. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 3(6): 1077-1081.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 76(9): 4350-4354.
- Twentyman, P.R., Luscombe, M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, 56(3): 279-285.
- Uren, R.T., Dewson, G., Bonzon, C., Lithgow, T., Newmeyer, D.D., Kluck, R.M. 2005. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(3): 2266-74.

- Wang, D., Lippard, S.J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, 4: 307-320.
- Wang, H.W., Chen, T.L., Yang, P.C., Ueng, T.H. 2001. Induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by emodin in human lung adenocarcinoma cell line CL5. **Drug Metabolism and Disposition**, 29(9): 1229-1235.
- Wang, W., Sun, Y.P., Huang, X.Z., He, M., Chen, Y.Y., Shi, G.Y., Li, H., Yi, J., Wang, J. 2010. Emodin enhances sensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs via glutathion depletion and MRP1 downregulation. **Biochemical Pharmacology**, 79(8): 1134-1140.
- Winslow, L.C., Kroll, D.J. 1998. Herbs as Medicines. **Archives of Internal Medicine**, 158: 2192-2199.
- Xiong, H.R., Luo, J., Hou, W., Xiao, H., Yang, Z.Q. 2011. The effect of emodin, an anthraquinone derivative extracted from the roots of *Rheum tanguticum*, against herpes simplex virus in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, 133(2): 718-723.
- 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): 1688-1697.
- 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.
- Yu, J.Q., Bao, W., Lei, J.C. 2013. Emodin regulates apoptotic pathway in human liver cancer cells. **Phytotherapy Research**, 27(2): 251-257.
- Zhang, L., Chang, C.J., Bacus, S.S., Hung, M.C. 1995. Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. **Cancer Research**, 55(17): 3890-3896.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **The Journal of Biological Chemistry**, 274(17): 11549-11556.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burcu AYHAN
Doğum Yeri ve Tarihi : AYDIN / 19.04.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Boğaziçi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce, Almanca

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal :

Ayhan, B., Ülger, C. 2012. İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Emodin'in Mitokondriyal Sinyal İletim Yolağı Aracılığı ile Apoptozise Etkisi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012 Ege Üniversitesi/İzmir

Ayhan, B., Ülger, C., Özmen A. 2012. Escin'in MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Apoptozise Etkisi. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık 2012 Uludağ Üniversitesi/Bursa

- c) Katıldığı Projeler : Escin'in MCF-7Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, FEF11001, Araştırmacı

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Boğaziçi Sigorta ve Reasürans Brokerliği Ltd. Şti.

İstanbul, Uzman 2009-2010.

ÖZ-AL Biyoteknoloji Tarım Sağlık Medikal İth. İhr. San. Tic. Ltd. Şti, Ürün Geliştirme Uzmanı, 2011-2012

Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Araştırma Görevlisi 2012-Devam ediyor

İLETİŞİM

E-posta Adresi : bburcuayhan@gmail.com

Tarih : 14.06.2013