T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı

CURCUMIN'İN EHRLICH ASSİT VE SOLİD TÜMÖR OLUŞTURULAN FARELERDE ANTİTÜMÖRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Seher YILMAZ

Danışman
Prof. Dr. Harun ÜLGER

Doktora Tezi

MART 2016
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı

CURCUMIN'İN EHRLICH ASSİT VE SOLİD TÜMÖR OLUŞTURULAN FARELERDE ANTİTÜMÖRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Hazırlayan
Seher YILMAZ

Danışman
Prof. Dr. Harun ÜLGER

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2014-5239 kodlu proje ile desteklenmiştir.

MART 2016
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Seher YILMAZ

İmza

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

''Curcumın'ın Ehrlich assit ve solid tümör oluşturulan farelerde antitümöral etkisinin araştırılması''. İsimli Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Doktora Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Seher YILMAZ

Danışman

Prof. Dr. Harun ÜLGER

Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Erdoğan UNUR

ONAY

Prof.Dr. Harun ÜLGER danışmanlığında Seher YILMAZ tarafından "Curcumin'in Ehrlich Assit ve Solid Tümör Oluşturulan Farelerde Antitümöral Etkisinin Araştırılması" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı Doktorac tezi olarak kabul edilmiştir.

24./03./2016

JÜRİ **İmza**

Üye:
Prof. Dr. Mehmet ÇİMEN (Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi AD)……

Danışman:
Prof. Dr. Harun ÜLGER (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, AnatomiAD)……

Üye:
Prof. Dr. Ayhan DÜZLER (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Anatomi AD)……

Üye:
Doç. Dr. Tolga ERTEKİN (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi AD)……

Üye: Yrd. Doç. Dr. İlhan OTAĞ (Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu)……

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 31.../03../2016 tarih ve 724.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

31./03./2016

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi ve planlanmasındaki katkılarından dolayı bir dönem danışmanlığımı yapan Doç.Dr Niyazi ACER'e, tezimin yürütülmesinde bana destek olan, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Harun ÜLGER'e, doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Prof. Dr. Kenan AYCAN ve Prof. Dr. Erdoğan UNUR'a, gerek ders ve gerekse tez döneminin deneysel aşamasında ve sonrasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Tolga ERTEKİN, Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ ve Yrd. Doç. Dr Ayşe SAĞIROĞLU'na, Histoloji Embriyoloji Anabilimdalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr Arzu YAY'a şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca ve bu çalışmayı yaparken benden katkısını esirgemeyen Anatomi ailesinden çok kıymetli arkadaşlarım Özlem BOZKURT, Şerife ÇINAR, Özge AL ve Hatice SUSAR'a, her konuda desteklerinden dolayı Anatomi Yüksek Lisans ve Doktora öğrencilerine ve Anatomi Anabilimdalı çalışanlarına, tezin deneysel aşamasında zaman zaman beraber çalıştığım arkadaşlarım Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri Emin KAYMAK ve Betül YALÇIN'a, hayvan teminindeki katkıları için DEKAM yöneticileri ve çalışanlarına, tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Ve özellikle her konuda desteğini ve emeğini benden esirgemeyen çok sevdiğim aileme sonsuz teşekkür ederim…

Seher YILMAZ

CURCUMIN'IN EHRLICH ASSIT VE SOLİD TÜMÖR OLUŞTURULAN FARELERDE ANTİTÜMÖRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Seher YILMAZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anatomi Anabilimdalı Doktora Tezi
Mart 2016
Danışman: Prof.Dr. Harun ÜLGER

ÖZET

Curcumin, halk arasında yaygın olarak baharat, yiyecek renklendirici ve koruyucu olarak kullanılan sarı renkli bir bitkisel üründür. Curcumin anti-inflamatuar, anti-kanserojen ve anti-oksidan özelliklerinden dolayı yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu çalışmada fare meme adenokarsinomundan kökenlenen ve Balb/C farelerde geliştirilen Ehrlich Assit Tümör modelinde farklı dozlarda curcumin uygulamasının assit ve solid tümör üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmamızda 6 tanesi stok hayvan diğerleri assit ve solid tümör gruplarında olmak üzere toplam 86 adet Balb/C fare kullanıldı. Farelerin tamamına stok hayvandan alınan Ehrlich assit tümör (EAT) hücreleri ($1x10^6$ EAT hücresi) intraperitoneal ve subkutan yolla enjekte edildi. Assit tümör oluşturulan hayvanların tedavi gruplarına 10 gün buyunca, solid tümör oluşturulan grupların tedavi gruplarına ise 15 gün boyunca intraperitoneal olarak 25mg/kg ve 50mg/kg curcumin uygulandı. Deney süresince tüm grupların kilo değişimleri kaydedildi. 10. günde assit tümör oluşturulan hayvanların periton boşluğu içerisindeki EAT hücrelerinin bulunduğu assit sıvısı alınarak canlı ve ölü hücre sayımı yapılarak *in vivo* sitotoksisitesi değerlendirildi. Deney sonunda hayvanlar dekapite edilip assit tümör oluşturulan gruplara ait hayvanların karaciğer, mide, dalak, böbrek, incebağırsak ve kalınbağırsak dokuları, solid tümör oluşturulan hayvanların ise tümör dokuları histopatolojik değerlendirme için alınarak tespit edildi. Solid tümör oluşturulan hayvanların tümör dokularının hacimleri ölçüldükten sonra kesitlerde immünohistokimyasal olarak Faktör VIII ekspresyonu ile angiogenesis, Tunel yöntemi ile de hücre Apoptozu belirlenerek gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Ayrıca curcumin'in EAT hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenebilmesi için curcumin ekstraktlarının 10, 20 ve 30µg mL^{-1} farklı konsantrasyonları uygulanarak canlı ve ölü hücre oranları farklı iki kişi tarafından sayılarak gruplar karşılaştırıldı. Assit tümör oluşturulan gruplardaki farelerin ağırlık artışına bakıldığında en fazla kilo artışının tümör kontrol grubundan sonra

25mg/kg curcumin verdiğimiz grupta ve daha sonra 50mg/kg curcumin uygulanan grupta olduğu gözlendi. Assit tümör oluşturulan hayvanların dokular histopatotojik sonuçları 50mg/kg curcumin uygulanan grupta tümör kontrol grubuna oranla alınan dokuların etrafında EAT hücrelerinin daha az olduğu gözlendi. Solid tümör oluşturulan hayvanlarda tümör hacim artışı kontrol grubuna (4603.99 mm^3) oranla en az 25mg/kg curcumin uygulanan grupta gözlenmiştir (1179.56 mm^3) ($p<0.05$). Deney sonunda 50mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda damar yoğunluğunun önemli derecede azaldığı (1.866) ve apoptotik hücre sayısının artmış olduğu gözlendi (7.775) ($p<0.05$). *In vitro* deney grubunda ise 10µg/ml curcumin uygulanan grupta 3 ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında apoptoza uğramış hücre sayısı daha fazla olarak gözlemlendi. Sonuç olarak EAT hücreleri ile oluşturulan gerek assit tümör gelşimi gerekse solid tümör gelişimi üzerinde curcumin'in antitümöral etki gösterdiği birkez de bizim çalışmamızda gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ehrlich Assit Tümör. Curcumin, Apoptoz, Faktör 8

THE RESEARCH OF THE ANTI-TUMORAL EFFECTS ON MICE FORMED OF CURCUMIN'S EHRLICH ASCITES AND SOLID TUMOR

Seher YILMAZ
Erciyes University, Institute Of Medical Sciences
Department Of Anatomy
PhD Thesis, March 2016
Supervisor: Prof. Dr. Harun ÜLGER

ABSTRACT

Curcumin is an herbal product with yellow color used for seasoning, protection and coloring of foods in the public. It is widely used due to its anti-inflammatory, anti-tumor and anti-oxidant features. In this study, effects of curcumin administration at different doses on ascites and solid tumors were investigated in Ehrlich Ascites Tumor model in Balb/C mice originating from rat breast adenocarcinoma. Overall, 86 Balb-c mice (6 as stock animal) were used in this study. Ehrlich ascites tumor (EAT) cells ($1x10^6$ EAT cells) harvested from stock animals were injected to all rats via intraperitoneal and subcutaneous route. Doses of 25 mg/kg (i.p.) and 50 mg/kg were given over 10 days to the animals in the treatment groups in which ascites tumor was induced whereas over 15 days to the animals in the treatment groups in which solid tumor was induced. Throughout experiments, weight changes were recorded in all groups. On the day 10, in vivo cytotoxicity was assessed by counting alive and death cells in ascites fluid including EAT cells obtained from peritoneal space of animals in which ascites tumors were induced. All animals were decapitated at the end of experiment. The liver, stomach, spleen, kidney, small intestine and large intestine tissues from animals with ascites tumor and tumor tissues from animals with solid tumor were removed for histopathological examination. In animals with solid tumor, volume of tumor tissues was measured and angiogenesis and apoptosis were assessed by Factor VIII expression and Tunnel method using immunohistochemical staining in tumor tissues respectively. The differences in angiogenesis and apoptosis were assessed among all groups. In addition, in order to determine in vitro cytotoxic effects of curcumin on EAT cells, alive and death cell ratios were counted by 2 different observers after giving curcumin concentrations of 10, 20 and 30µg mL^{-1}. When rats in the groups with ascites tumor were assessed, maximum weight gain was observed in tumor control group; followed by the group received 25 mg/kg curcumin and the group received 50mg/kg curcumin. Histopathological examination in ascites tumor groups revealed that number of EAT

cells at surrounding tissues was smaller in the group received 50 mg/curcumin when compared to tumor control group. The lowest increase in tumor volume was observed in the group received 25mg/kg curcumin (1179.56 mm^3) when compared to tumor control group (4603.99 mm^3) ($p<0.05$). At the end of experiment, it was observed that vessel intensity (1.886) was significant decreased while number of apoptotic cells (7.775) was significantly increased in the group received 50mg/kg curcumin ($p<0.05$). In the in vitro experiment group, greater number of apoptotic cells was observed in the group received 10 µg/ml curcumin after 3 and 24 hours incubation. In conclusion, anti-tumor activity of curcumin in both ascites and solid tumor development induced by EAT cells was reproduced in this study.

Key words: Ehrlich Ascites Tumor, Curcumin, Apoptosis, Factor 8

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii
ONAY iii
ONAY: iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMA VE SİMGELER xii
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ xv
1.GİRİŞ ve AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1 KANSER 3
2.1.1 Kanser ve ölüm oranları 4
2.1.2 Kanser ve tamamlayıcı Tıp: 4
2.2. TIPTA BİTKİ EKSTRELERİNİN KULLANIMI 5
2.3. CURCUMİN (TURMERIC) 6
2.3.1.Curcumin'in kimyasal özellikleri 6
2.3.2. Curcumin'in farmakokinetik özellikleri 7
2.3.3. Curcumin'in klinik özellikleri 8
2.3.4. Curcumin'in antikanserojen özellikleri 8
2.4. DENEYSEL KANSER MODELLERİ 9
2.4.1. Spontan veya transplante edilebilen tümör modelleri 9
2.4.2. Ehrlich Assit Tümörü (EAT) 10
2.4.3. Ehrlich Solid Tümörü 11
2.5.DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KANSERLİ DOKULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 11
2.5.1. Apoptoz 11
2.5.1.1. Apoptoza giden hücrede morfolojik değişiklikler 13
2.5.1.2. Apoptozun aşamaları 14
2.5.1.3. Apoptozisin indüklenmesi 15

2.5.2. Tümör anjiogenezisi 16
2.5.2.1. Anjiogenezis basamakları 17
3. GEREÇ VE YÖNTEM 18
3.1. Araştırmada kullanılan denek cinsi, sayısı ve dağılımı 18
3. 2. Deneysel prosedür 18
3.3.Stok farelerin oluşturulması 19
3.4. Hücre sayımı prosedürü 19
3.5. Curcumin ekstraktının çözünmesi ve sterilizasyonu 20
3.6. Deney gruplarının oluşturulması 20
3.7. Sıvı tümör grupları 20
3.7.1.Sıvı tümör oluşturulan deney gruplarında yapılan incelemeler 21
3.7.2. Histolojik doku takibi 21
3.8. Katı tümör grupları 22
3.9. İmmunohistokimyasal uygulama 23
3.9.1 Apoptozis tunel boyama metodu 23
3.9.2 Faktör 8 boyama 23
3.10 In vitro deney grubu 24
3.10.1 Hücre sayımı 25
3.11. Sonuçların değerlendirilmesi 25
4. BULGULAR 26
4.1. Deney süresince assit tümör gruplarının vücut ağırlık değişimleri 28
4.2. Histopatolojik bulgular 30
4.2.1. Böbrek dokusu 30
4.2.2 Karaciğer dokusu 33
4.2.3 Mide dokusu 35
4.2.4. Dalak dokusu 37
4.2.5. Kalın bağırsak dokusu 39
4.2.6. İnce bağırsak dokusu 40
4.3 Curcumin ekstraktının in vivo sitotoksisitesi 42
4.4 Deney süresince solid tümör gruplarının vücut ağırlık değişimleri 43
4.4.1 Deney süresince solid tümör gruplarının tümör hacim Değişimler 45
4.5. Apoptotik bulgular 46
4.6.Anjiogenezis bulguları 47

4.7. EAT hücreleri üzerine uygulanan curcumin ekstraktının invitro etkisi..... 49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 52
6.KAYNAKLAR..... 61
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMA VE SİMGELER

SEMBOL	ANLAMI
µg	**:**Mikrogram
µM	**:**Mikromolar
µl	**:**Mikrolitre
µm	**:**Mikrometre
cm	**:**Santimetre
DAB	**:**Diaminobenzidin
DAPI	**:**4,6-diamidino-2-phenylindole
DEKAM	**:**Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
EAT	**:**Ehrlich assit tümörü
EAC	**:**Ehlich carcinoma cell
DMBA	**:**Dimethylbanz antthracene
MNNG	**:**N-methyl-N-nitro-N nitrosoguanidine
DMSO	**:**Dimethil sülfoksit
SF	**:**Serum fizyolojik
H&E	**:**Hematoksilen eozin
FITC	**:**Floresan izotiyosiyanat
FVIII	**:**Faktör 8
H_2O_2	**:**Hidrojen peroksit
HUAEC	**:**İnsan umblikal arter endotelyal hücresi
HUVEC	**:**İnsan umblikal ven endotelyal hücresi
ml	**:**Mililitre
mm^3	**:**Milimetreküp

nm **:**Nanometre

PBS **:**Phosphate buffer saline

PMA **:**Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

RCC **:**Renal clear cell carcinoma

VWF **:**Von willenbrand faktör

W **:**Watt

IC_{50} :Maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu

ip :İntraperitoneal

iv :İntravenöz

sc :Subkutan

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği 21
Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği..... 22
Tablo 4.1. Kontrol ve tedavi grubuna ait farelerin vücut ağırlıklarının 1-10 gün aralığında değişimi. 28
Tablo 4.2. Gruplar arasında birinci gün ile diğer günler arasındaki vücut ağırlıklarının ortalama değişimi 29
Tablo 4.3. Deney gruplarında EAT hücrelerinin ortalama sayısı 42
Tablo 4.4. Kontrol ve tedavi grubuna ait farelerin vücut ağırlıklarının 1-15 gün aralığında değişimi. 44
Tablo 4.5. Gruplar arasında birinci gün ile diğer günler arasındaki vücut ağırlıklarının ortalama değişimi 45
Tablo 4.6. Gruplar arası solid tümör hacimlerinin günlere göre karşılaştırılması 46
Tablo 4.7. Gruplar arası apoptotik indeksin karşılaştırılması..... 46
Tablo 4.8. Faktör VIII'in damar yoğunluğunun deney grupları arası karşılaştırılması 48
Tablo 4.9. *In vitro* deney gruplarında hesaplanan ortalama canlı ve ölü hücre değerleri 51

ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Normal ve kanser hücrelerinin görünümü. 5
Şekil 2.2. Curcuma longa 6
Şekil 2.3. Curcumin'in molekül yapısı..... 7
Şekil 2.4. Apoptozis ve nekrozis..... 13
Şekil 2.5. Apoptoza giden hücrede morfolojik değişiklikler 14
Şekil 2.6. Apoptozise uğrayan hücre çekirdeği 16
Şekil 4.1. Grupların günlük ağırlık değişimi 29
Şekil 4.2. EAT hücrelerinin histopatolojik görüntüsü..... 30
Şekil 4.3. Böbrek dokusunada sağlıklı kontrol grubu (histolojik), tedavi ve tümör uygulama gruplarına ait (histopatolojik) bulgular 32
Şekil 4.4. 50mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda böbrek dokusunda oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. 33
Şekil 4.5. Karaciğer dokusunun sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarının (histopatolojik) bulguları 34
Şekil 4.6. Tümör kontrol grubunda karaciğer dokusunda oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. 34
Şekil 4.7. Mide dokusunun sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarına ait (histopatolojik) bulgular..... 36
Şekil 4.8. 25 mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda mide dokusunun kapsülünde oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. 37
Şekil 4.9. Dalak dokusunun sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarının (histopatolojik) bulguları 38
Şekil 4.10. Tümör kontrol grubunda dalak dokusunun kapsülünde oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü..... 38
Şekil 4.11. Kalın bağırsak dokusunun orta hattından alınan sağlıklı kontrol (histolojik) ve tedavi gruplarının (histopatolojik) bulguları 39
Şekil 4.12. Kalın bağırsak dokusunun 25 mg/kg curcumin verilen tedavi grubuna ait histolojik bulgular. 40
Şekil 4.13. İnce bağırsak dokusunun proksimal bölümüne ait sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarının (histopatolojik) bulguları 41

Şekil 4.14. 25 mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda ince bağırsak dokusundaki histopatolojik bulgular 42
Şekil 4.15. Deney gruplarına ait apopitotik hücreler 47
Şekil 4.16. Deney gruplarına ait damar yoğunlukları 49
Şekil 4.17. In vitro deney gruplarında 3 saatlik canlı ve ölü EAT hücrelerinin thoma lamı üzerindeki görüntüleri. 50
Şekil 4.18. In vitro deney gruplarında 24 saatlik canlı ve ölü EAT hücrelerinin thoma lamı üzerindeki görüntüleri 50
Resim 4.1. EAT hücresi verilen hayvanda assit birikimine bağlı abdominal bölgede görülen genişleme. 27
Resim 4.2. Deney grubuna ait farenin organlarının genel görünüşü 27
Resim 4.3. Ehrlich solid tümörünün görünümü ve tümör boyutlarının ölçümü 43

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yaklaşık olarak yılda ortalama 10 milyon kanser tanısı konmakta ve her yıl 6 milyondan fazla kişi kanserden ölmektedir. Bugün dünya üzerinde 22 milyondan fazla kanser hastası bulunmaktadır. Uluslararası kanser ajansı 2012 yılı verilerine göre bir önceki yıla oranla kanser vakası sayısında artış olduğunu bildirmiştir. 2012 yılında Dünya'da toplam 14.1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8.2 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir. Cinsiyete göre dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kanser görülme sıklığı ve ölüm oranlarına bakıldığında, erkeklerde en çok akciğer ve mide kanseri, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserlerin başta geldiği görülmektedir (1,2). Her iki cins için de kanser görülme sıklığı sırasıyla akciğer, meme ve kolorektal kanserleri şeklindedir. Türkiye'de 2012 yılında kanser hızı erkeklerde yüzbinde 261.4, kadınlarda ise yüzbinde 168.7'dir. Kadın erkek ortalama kanser insidansı ise yüzbinde 215.1'dir. 2012 yılı kanser istatistiklerine göre ülkemizde her yıl yaklaşık 97 bin erkek ve 62 bin kadın kansere yakalanmaktadır (3,4). Kansere neden olan birçok etken olup beslenme bunların arasında yer almaktadır. Beslenmenin kanser oluşumundaki payı yeni bir konu değildir. 19. yüzyıldan 21. yüzyıla kadar olan klinik tespitlerde diyetin bir risk faktörü olduğu pek çok kez ifade edilmiştir. Gıdalar söz konusu olduğunda, kanserojen oluşumların gıdada bulunma seviyesi yanında, bunlara maruz kalan bireylerin beslenme şekli ve gıda tüketim alışkanlıkları da önemli rol oynamaktadır. Kanser, pek çok faktörün bir arada etki ettiği kompleks bir mekanizma olduğundan şüphesiz ki kanserojen olduğu belirtilen maddeler tek başlarına kanser oluşumuna sebebiyet vermemektedir (5-7). Kanser tedavisinde sürekli yeni gelişmeler olmaktadır. Son zamanlarda kanser tedavisinde bitki ekstrelerinin kullanımı gün geçtikçe

artmaktadır. Bu bitki ekstrelerinden biri de curcumin'dir (8). Zingiberaceae ailesinin bir üyesi olan curcuma longa çok yıllık bir bitki olup ana vatanı Güney Asya'dır. Asıl üreticisi Hindistan olmakla birlikte Bangladeş, Çin, Endonezya, Karayip adaları ve Güney Amerika'nın birkaç ülkesinde de yetiştirilir. Turmerik tozu olarak bilinen curcuma longa, yemeklerde aroması ve sarı rengi nedeniyle köri baharatının üretiminde kullanılır. Turmerik gıda endüstrisinde renklendirici, koruyucu ve aromatik bitki olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Japonya' nın çeşitli bölgelerinde çay olarak da tüketilmektedir. Literatürde curcumin'in antineoplastik mekanizmasını ortaya koyan birçok makale bulunmaktadır. Curcuminin bazı tip kanser hücrelerinin ölüm hızını artırdığı ve tümör hücrelerinin bölünmesini durdurduğu bilinmektedir (8,9). Daha önce yapılan çalışmalarda curcumin'in güçlü bir antioksidan olduğu ve antikanserojen etki gösterdiği belirtilmiştir (10).

Kanser ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılmak üzere birçok deneysel kanser modeli geliştirilmiştir. EAT modeli yaygın olarak kullanılan bir tümör modelidir (11). EAT, ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış, tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel tümör haline dönüştürülmüş, daha sonra farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formu elde edimiş ve peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da oluştuğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır (12,13).

Bu çalışmanın amacı Balb/C türü farelerde deneysel olarak oluşturulan EAT hücrelerinin intraperitoneal ve subkutan enjeksiyonu ile elde edilen assit ve solid tümör üzerine curcumin'in antitümöral etkisini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, çağımızın en ciddi hastalığı olmakla beraber insan ölümlerine yol açan nedenler arasında önemli bir yere sahiptir (14,15). Birçok kanser türü sadece bir hücreden (ya da az sayıda hücreden) ortaya çıkmaktadır (16,17). Kanser, hücrenin büyümesi ve hücre mitozunu kontrol eden hücre genlerinin mutasyonu ya da anormal şekilde aktivasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır (18). Tümörlerin kökeninde normal büyümenin kontrol mekanizmalarına verilen yanıtın kaybolması durumu mevcuttur. Herhangi bir prokarsinojenin, metabolik aktivasyonu ile tetiklenen bir dizi aşamadan sonra neoplastik hücre oluşmaktadır (19). Neoplazmlar "tümör" adıyla anılır. Aslında tümör yalnızca bir dokuda ödem, hemoraji ve başka bir şekilde oluşturulan şişlik anlamına gelmektedir (18, 20). Normal hücre ile kanser hücresi arasında faklılıklar bulunur. Normal hücrelere göre kanser hücreleri birbirlerine daha az tutunurlar (21). Bu yüzden bu hücrelerin dokular arasında gezmeye eğilimleri vardır. Kan dolaşımına girerek vücuda dağılırlar ve yeni kanser odakları oluştururlar. Kanser hastalığının sebebi günümüzde multifaktöriyel olarak gösterilmektedir. Sigara, mikroorganizmalar, bazı kimyasal maddeler, hormonlar gibi nedenler kanser oluşumunu başlatabilir (4). Kanser hastalığının ilerlemesini durduran tümör baskılayıcı genlerdeki aksaklıkların genetik geçiş ile nesilden nesile aktarılması kansere yakalanma riskini daha da artırmaktadır (7). Bazı kanserler anjiyogenik faktörleri üretirler. Bunlar kanser dokusu içinde büyüyen çok sayıda damarların oluşmasına neden olarak kanserin büyümesi için ihtiyaç duyulan besin maddelerini sağlar. Anjiogenezis daha önceden mevcut damarlardan yeni kapillerlerin oluşması durumudur (22). Kanser tedavisinde kemoteropatik ajanların yanısıra tamamlayıcı tıp olarak tanımlanan bitkisel tedavi yöntemleride dünyada sıkça çalışılan

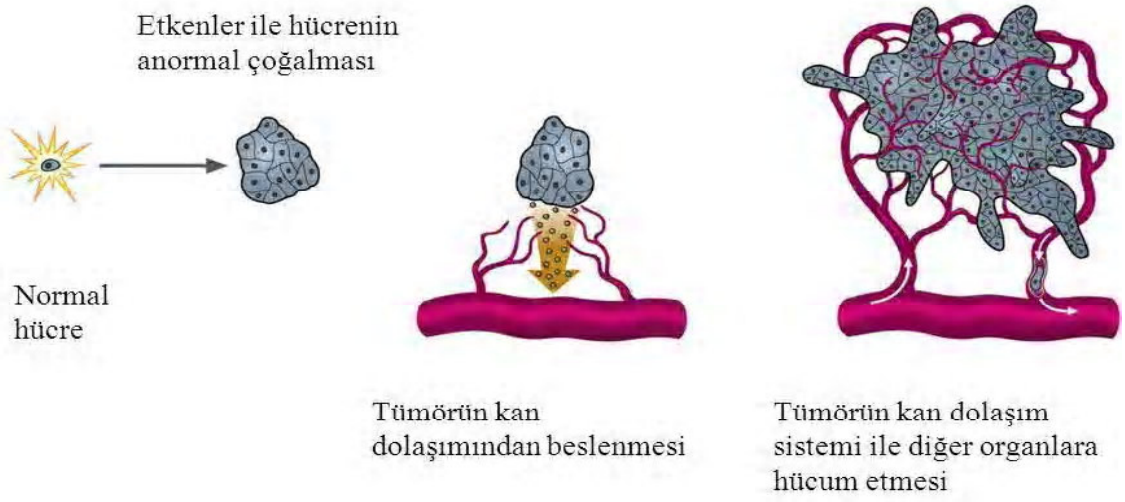
konular arasındadır. Curcumin bu bitkisel ajanlar arasında yer olan bir bitkidir ve antioksidan özelliğe sahiptir (23).

2.1.1 Kanser ve ölüm oranları

Kanser birçok ölüme neden olmuştur ve 2012 yılında Dünya'da toplam 8.2 milyon insan çeşitli kanserler nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Her yıl kanser görülme sıklığı ve kansere bağlı ölümler giderek artmaktadır. En sık ölümle sonuçlanan kanserler sırasıyla akciğer, mide, karaciğer, bağırsak ve meme kanseri olarak belirtilmektedir (4,24).

2.1.2 Kanser ve Tamamlayıcı Tıp

Dünya sağlık örgütünün açıklamalarına göre tüm ölümlerin % 13'ü kanser nedeniyle olmaktadır. Dünya sağlık örgütü 2030 yılında bu oranın % 45 olacağını belirtmektedir (25). En önemli ölüm nedeni olması sebebiyle kanser oluşumunun önlenmesi, üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir (2). Ülkemizde güvenilir veriler elde etmek amacıyla 1983 yılından itibaren ihbarı zorunlu hastalıklar grubuna alınmasına rağmen, kansere ait gerçek veriler elde edilememektedir. Yılda beklenen yeni kanser olgusu sayısı, 70-100 bin iken 1999 yılında bildirilen olgu sayısı 26 bin civarı olmuş ve bu sayı hiçbir zaman yılda 40 bini aşmamıştır (24). Gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ise giderek artmaktadır (14,26). Günümüzde kanser ile mücadele çok ciddi çabalar ve inanılmaz miktarlarda bütçeler harcanmaktadır. Bugün kanseri önlemede en umut verici strateji, kemoterapidir (4). Kemoterapi, insanda kanser gelişimini önleyici sentetik veya doğal maddelerin (yalnız başına veya kombinasyonu) kullanımı olarak tarif edilir. Halk tarafından kullanılan bitkiler, sebzeler ve şifalı otlar, kanser kemoterapisinin keşfedilmesinin ve gelişiminin ana kaynağı olmuştur. Dünya sağlık örgütünün (WHO) bazı ülkelerde özellikle Afrika ve Asya ülkelerinde tamamlayıcı tıp %70 seviyelerinde kullanılmaktadır (27). Kemoterapide uygulanan ilaçlar, kanser hücresi üzerine toksik etki gösterirken, aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerine de toksik etki göstermekte ve organlarda rahatsızlıklara neden olmaktadır (28).



Şekil 2.1. Normal ve kanser hücrelerinin görünümü (29).

Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötiklerin ve radyoterapinin önemli yan etkilerinin olması ve bazı tümörlerde kemoterapiye karşı direnç gelişmesi bu sorunların çözümü için özellikle kanserli hücrelerde apopitozu uyaran buna karşılık normal dokulara zarar vermeyen doğal maddelerin araştırılmasına sebep olmaktadır (30). Özellikle bitkilerden elde edilen ekstraktlar ile yapılan çalışmalar daha ümit verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Tıbbi bitkilerin ekstraktlarının antikanser aktivitelerinin araştırılması konusunda çalışmalar yapılmakta, ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde bu konu ile ilgili pek çok çalışma yürütülmektedir (31).

2.2. TIPTA BİTKİ EKSTRELERİNİN KULLANIMI

Günümüzde kanser tedavisinde uygulanan temel yöntemler ve kullanılan ilaçların yetersiz olduğu düşünülmektedir. Tedavide karşılaşılan bu problemler, yeni ilaçlar bulma ve araştırma çabalarını hızlandırmaktadır. Modern tıbbın içerisinde tamamlayıcı tedavi maddeleri olarak bitkiler yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. Amerikan Kanser Birliği (American Cancer Society) ve Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute), alternatif tedavileri hastalığın geleneksel tedavisinin yerine kullanılan uygulamalar şeklinde tanımlarken, tamamlayıcı tedavileri ise, modern tıp ile birlikte kullanılan tedavileri tamamlayıcı yaklaşımlar olarak tanımlanmaktadır (32,33).

Geçmişte hastalıkları tedavi edebilmek için bitkilerden yararlanıldığı bilinmektedir. Tıbbi bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin farmakoloji alanında yeni kimyasalların gelişmesinde katkısı olduğu bilinmektedir (34). Bu bitkilerden biri de ülkemizde

Zerdeçal olarak da bilinen curcumin'dir. Curcumin yüzyıllardır gıda olarak ve bitkinin tıbbi etkilerinden dolayı da tıpta kullanılan bir bitkidir (35).

2.3. CURCUMİN (TURMERIC)

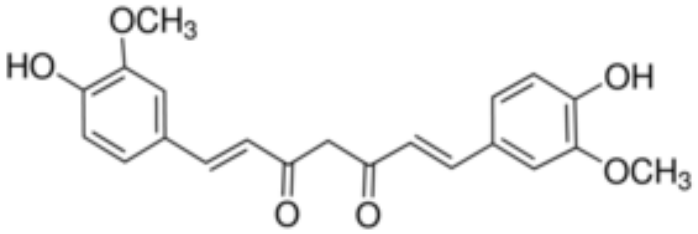
Curcumin (*curcuma longa*), zencefil ailesine ait çok yıllık otsu bir bitkidir ve yaygın olarak güney ve güneydoğu tropikal Asya'da yetiştirilmektedir (Şekil 2.2) (36). Turmeric, Zerdeçal ve Hint safranı olarak da bilinir. Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen sarıçiçekli, büyük yapraklı ve yumrulu bir bitkidir. Zerdeçal kullanımı çeşitli hastalıklar için tedavi edici bir ajan olarak etkili olduğu bulunduğundan bu yana, daha popüler bir hale gelmiştir (23,37). Zerdeçal, Hint tıbbında bir tonik ve kan temizleyicisi olarak kullanılmaktadır, Japonya'nın çeşitli bölgelerinde çay olarak da tüketilmektedir, Türkiye'de soğuk algınlığında, hazımsızlığı ve gaz söktürücü olarak kullanılmaktadır. Zerdeçal içinde doğal sarı bir pigment olan curcumin, bitkinin yumrularından elde edilir (38,39). Curcumin ,ilk kez 1842 yılında Vogel tarafından izole edilmiştir. Curcumin neredeyse su içerisinde hiç çözünmeyen turuncu-sarı kristal gibi bir tozdur. Curcumin'in yapısının diferuloylmethan olduğunu 1910 yılında Lampe ve Milobedeska ortaya koymuşlardır (10,40).

Şekil 2.2. Curcuma longa (41).

2.3.1.Curcumin'in kimyasal özellikleri

Curcumin polifenolik bir bileşiktir ve bis-α, β-unsature β-diketondur. Keto ve enol formu bulunmaktadır. Keto formu asidiktir ve nötral sıvı solusyonlarda ve hücre membranlarında bulunmaktadır. PH 3-7 aralığında curcumin güçlü bir H atom

donörüdür (42). Buna karşın pH 8'in üzerinde enol form hakimdir ve curcumin bir elektron donörü gibi hareket etmektedir ki bu fenolik antioksidanların toplayıcı aktivitesi için tipik bir mekanizmadır. Curcumin bazik pH'a karşı dayanıksızdır ve 30 dakika içerisinde trans-6-(4′-hidroksi- 3′metoksifenil)-2-4-diokso-5-hekzanal, ferulik asit, feruloilmetan ve vanilline indirgenir. pH 7'nin üzerinde rengi sarıdan kırmızıya doğru döner. Moleküler ağırlığı 368.38 g/mol ve erime noktasıda 183 °C'dır. Curcumin suda çözünmeyen fakat aseton, DMSO ve etanolde çözünebilen bir moleküldür (10,43).



Şekil 2.3. Curcumin'in molekül yapısı (14).

2.3.2. Curcumin'in farmakokinetik özellikleri

Curcumin'in transformasyonu bağırsaklardan absorbsiyonu sırasında gerçekleşmekte ve oldukça polar renksiz transforme ürünler meydana gelmektedir (43). Sıçanlara oral yolla curcumin verilerek yapılan bir çalışmada, curcumin'in % 60'ının emildiği ve idrar içerisinde glukuronid ve sülfat konjugatları olduğu, ayrıca curcumin'in büyük oranda gaitayla atıldığı gösterilmiştir (44). Daha sonraki yapılan çalışmalarda ise farelere intraperitoneal olarak verilen curcumin'in (0.1 g/kg) ilk olarak dihidrocurcumin tetrahidrocurcumin biyotransformasyonuna uğradığı, intraperitoneal yolla 15 dakika içerisinde maksimum plazma konsantrasyonuna (2.25 µg/mL) ulaştığı ve 1 saat içerisinde plama düzeyinin hızla düştüğü ve bu bileşiklerin hemen monoglukuronidkonjugatları haline dönüştüğü gösterilmiştir (45). Sıçanlara oral yolla verilen ve plazma içerisinde az miktarda bulunan curcumin'in yüksek oranlarda curcuminglukuronid ve curcumin sülfat, az miktarda ise heksahidrocurcumin, heksahidrocurcuminol ve heksahidrocurcuminglukuronid olabileceği gösterilmiştir (46).

Curcumin'in yüksek dozlarda alındığında bile toksik etkisi olmadığı bildirilmiştir (47). Oral yolla (1g/kg) verildikten 1 saat sonra curcumin'in yüksek oranda barsakta, daha az miktarlarda dalak, karaciğer ve böbrekte, en düşük oranda beyin dokusunda bulunmuştur (48). Biotransformasyona uğramış olan curcuminin, stabil formunun tetrahidrocurcumin olduğu ve bu formun curcumin'in biyolojik etkileri üzerinde önemli

role sahip olabileceği ayrıca curcumin'in redüksiyon ve glukuronidasyon gibi enzimatik reaksiyonlarla metabolik aktivite gösterebileceği bulunmuştur (23).

2.3.3. Curcumin'in klinik özellikleri

Curcumin diyetlerde baharat, yiyecek ve tekstilde de renk verici ajan olarak kullanılmasının yanında birçok hastalıkta da tedavi amaçlı kullanılmaktadır (49). Curcumin'in birçok farklı farmakolojik aktiviteleri ve biyolojik faydaları son yıllarda önemli ölçüde dikkat çekmiştir (50). Anti-oksidan, anti-kanserojen, anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-demans etkileri ve serbest radikal toplayıcısı olduğu yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir (51). Ayrıca curcumin'in anoreksia, öksürük, diabetes, karaciğer rahatsızlıkları, romatizma, Alzheimer, safra ile ilgili rahatsızlıklar, sinüzit gibi hastalıklara karşı güçlü bir ajan olduğuna inanılmaktadır. Escherichia coli ve staphylococcus aureus'a karşı bakterisidal etkinliği mikrobiyolojik olarak da kanıtlanmıştır. İnsan immun yetersizliği (HIV) de de antiviral, antimalaryal, antifungal, anti-protozoal (Leishmania major) etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (23)

Curcumin'in yerel olarak cilt hastalıklarında, böcek ısırmalarında ve su çiçeğinde kullanılmaktadır. Curcumin ile tedavi edilmiş yaradaki miyofibroblastlarda yara kontraksiyonu daha hızlı olmaktadır (52,53).

2.3.4. Curcumin'in antikanserojen özellikleri

Curcumin antikanser etkileri ile son yıllarda çok araştırılan bir moleküldür. Curcumin'in potansiyel antikanser etkinliği bazı araştırıcılar tarafından sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelerde apoptoz oluşturmasına bağlanmaktadır (54). Curcumin'in farklı tümörler üzerinde çok çeşitli mekanizmalarla anti-kanserogenik etki gösterdiği ifade edilmiştir. Birçok çalışma curcumin'in deri, meme bezi, ağız, özafagus, mide, bağırsak, kolon, akciğer ve karaciğerin tümör genezisini baskıladığını ortaya koymaktadır (55).

Hidrofobik bir molekül olduğu için plazma membranından kolaylıkla geçerek sitozole giren curcumin, fosfatidilserin indüklenmesi, plazma membran permeabilite artışı, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve hücre büzüşmesi gibi apoptotik hücrelerde gözlemlenen tipik özelliklere yol açmaktadır. Bir araştırmada histiositik hücre hattı (AK-5) tümör hücrelerinin büyümeleri üzerine curcumin etkileri araştırılmış; kontrol grubunun tümünde peritoneal şişkinlik oluştuğu ve 10. günün sonunda %90

ölüm gerçekleştiği bildirilirken Curcumin uygulanan grupta peritoneal şişkinlik %80 oranında gözlemlenmiştir ve denekler 40. günden sonra hayatta kalmışlardır. Curcumin'in 10 μM yoğunluğunda apopitozu 4. saat sonunda %40, 18. saat sonunda %100 uyardığı saptanmıştır (56).

2.4. DENEYSEL KANSER MODELLERİ

Kanser alanında uygulanan tedaviler bir önceki dönemin öğreti ve tekniklerini kullanarak veya sistemli ilaç uygulamaları ile günümüze kadar gelişme kaydetmiştir. Yalnız hangi metod kullanılırsa kullanılsın ilaç geliştirme araştırmalarında hayvan modellerinden yararlanmak bir yerde zorunluluk göstermektedir. Son yıllarda ön plana çıkan hücre kültürü veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen uygulanan ajanlara karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler, hayvan modellerinin kullanımından vazgeçilmesine engel olmaktadır (57).

Deneysel kanser araştırmalarının yapıldığı üç yüzyıllık dönem içinde kimyasal karsinojenler ile spontan veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Son 35 senede önceleri xeograft çalışmaları (1969), sonraları ise transgenik (1984) hayvan üretiminde hızlı gelişmeler kaydedilmiş ve bilimsel amaçlı bu üretim alanı bir ticaret sektörü halini almaya başlamıştır. Kimyasal vaya fiziksel karsinojenler ile oluşturulan modeller çeşitli kimyasal ajanları deney hayvanlarına değişik yollarla vererek intraperitoneal (ip), intravenöz (iv), subkutan (sc), intramüsküler (im) birbirinden farklı özellikte tümör modelleri oluşturulabilmektedir (57).

2.4.1. Spontan veya transplante edilebilen tümör modelleri

Bu grup içinde bulunan transplante edilebilen tümör modelleri spontan oluşan tümörlerden elde edilen süspansiyonlardan türetilmektedir. Spontan oluşan tümörle insan kanser tiplerine kinetik özellik açısından benzerlik göstermektedir. Dezavantajı geç dönemde ölçülebilir boyuta ulaşırlar. Solid tümörler sc, im, ip veya iv yolla hücre süspansiyonlarının inokulasyonu sonucunda transplante edilirler. Transplante edilen tümörler köken aldıkları spontan tümörlere erken oluşum fazları açısından oldukça benzerlik gösterirler. İyi karakterize edilmiş ve üretilebilir özellikte olup, ilaç takip çalışmalarında tercih edilmektedirler (57,58).

2.4.2. Ehrlich Assit Tümörü (EAT)

Günümüzde tedavide başarılı olmak ve kansere karşı yeni yöntemler geliştirmek üzere yapılan çalışmalar deney hayvanlarında oluşturulan bu deneysel hayvan tümörleri üzerinde sürdürülmektedir. Tümör hücrelerinin peritoneal boşluk içerisine enjekte edilmesinden sonra çoğalan neoplastik hücreleri içeren efüzyonun gerçekleşmesi ''assit'' terimi ile belirtilmektedir. Uygulanan bü tümör modellerinde hücre sayısında kademeli olarak çoğalma gözlenirken, elde edilen pasajların tekrarlanması ile pasajlarda tümör virülansı artmaktadır (12). Elde edilişinden bu yana pek çok araştırmaya konu olan deneysel hayvan tümörlerinden biri olan EAT, ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış ve Ehrlich&Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel tümör haline getirilmiştir (59,60). Loewenthal ve Jahn (1932) bu tümörün farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde etmeyi başarmışlar ve peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da oluştuğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır (61).

EAT diferansiye olmamış bir tümördür. Transplante edilebilme oranı yüksek olan, regresyon göstermeyen, hızlı proliferasyona, kısa yaşama süresine sahip, %100 ölüme götüren ve immünolojik açıdan tümör spesifik transplantasyon antijenleri (TSTA)'ne sahip olmayan bu tümörün orjinali hiperdiploiddir (12).

Tümör hücrelerinin herhangi bir vücut boşluğuna enjekte edilmesinden sonra orada çoğalmaları ile neoplastik hücreler ihtiva eden bir effüzyon meydana gelmesi, assit terimi ile ifade edilir. Genellikle tümörler tekrarlayan pasajlarla virülanslarını arttırırlar. Bu gibi tümörlerin büyüme hızı artar. Differansiasyon gitgide kaybolur, gelişmeyi kontrol eden başlıca mekanizmalardan sıyrılır, heterotransplantabilite kabiliyeti kazanır ve nihayet assit formuna dönüşebilirler (13). Assit, gri-beyaz bazen hafif kanlı görünümde koyu bir sıvı olup, 0.1cc'de yaklaşık 10 milyon neoplastik hücre içerir (62).

EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir. Dolayısıyla alışılmış basit sayma yöntemleriyle hem transplante edilen tümör hücre sayısının, hem de oluşan tümör büyüklüğünün kolay bir şekilde saptanabilmesi mümkün olmaktadır (13,14).

EAT amaca göre assit form veya solid form olarak kullanılmaktadır. Eğer tümör hücresi içeren assit sıvısı deney hayvanına ip yolla enjekte edilirse assit form, sc yolla enjekte edilirse solid form elde edilir. EAT hücreleri, farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon halinde çoğalırlar ve in vitroda yapay yüzeylere yapışmazlar. Pasajdan 4-6 gün sonra assit oluşmaya başladığı anlaşılabilir ve toplam 5-12 cc assit teşekkül eder (63). EAT hücreleri, farenin peritoneal boşluğuna inokulasyonu takiben 2 fazda çoğalırlar. Bu fazlar, hücre sayısının eksponansiyel olarak arttığı çoğalma fazı ve bunu izleyen, hücre sayısının hemen hemen sabit kaldığı plato fazıdır (64,65). Yapılan araştırmalarda, $3x10^6$ EAT hücresinin ip enjeksiyonundan sonra hücre sayısının 9. güne kadar eksponansiyel olarak arttığı, 9. ve 10. günden itibaren de plato fazına girildiği görülmüştür (66). EAT hücrelerinin %100 kötü huylu hücreler olmaması, çok kısa ömürlü olması ve tranplantasyon özelliğinin diğer tümör modellerine göre daha hızlı olması nedeniyle kanser modelleri içerisinde yaygın olarak tercih edilen bir modeldir (12).

2.4.3. Ehrlich Solid Tümörü

Ehrlich tümörü hücrelerinin deri altına verilmesi ile tümör oluşturulmuş olur. Tümörün 1cm'lik bir çapa ulaşması bir haftalık bir süreyi kapsamaktadır. Tümör 1 cm'lik büyüklüğe ulaştığında tümör'ün ortasında nekrotik saha gözlemlenmektedir (13). Tömör hücreleri eşit büyüklükte değildir. Solid tümörün yavaş büyümesinin sebebi olarak hücre ölümünün fazla olması gösterilmektedir (67,68). Tümörün büyüme göstermesi malign tümör olduğunu göstermektedir. Solid tümör elde etmek için subkutan olarak tümör hücresi $1x10^6$ml'lik hücre süspansiyonu deri altına enjekte edildiğinde bir haftalık süre sonrasında ölçülebilecek düzeyde solid tümör oluşmaktadır (62). Solid tümör oluşturulan deney hayvanlarında tedavi uygulanmazsa yaşam süresi yaklaşık olarak 40 gün kadardır (12,57).

2.5.DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KANSERLİ DOKULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

2.5.1. Apoptoz

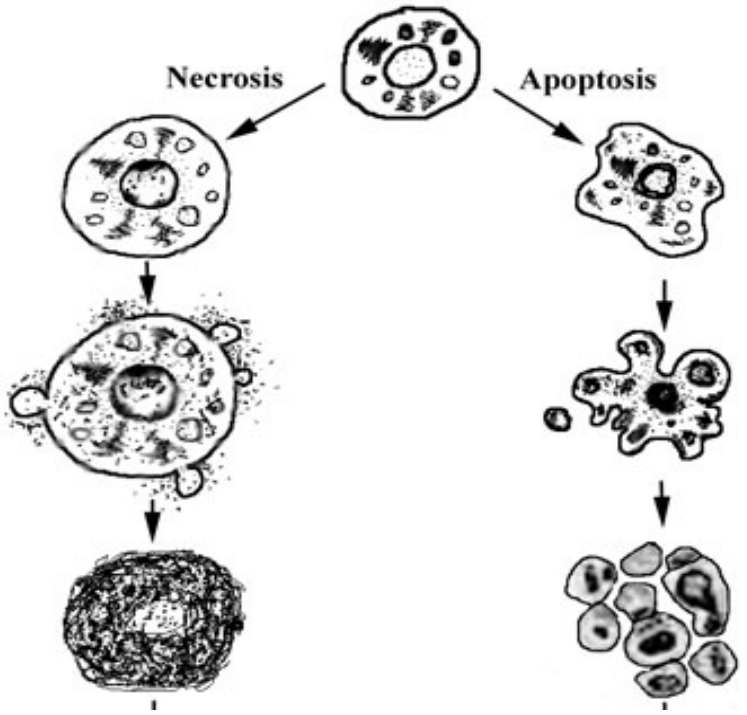
Genel olarak canlı organizmalarda iki tip hücre ölümü vardır. Bunlardan biri nekroz, diğeri apopitozdur. Nekroz, hücre yaralanmaları sonucu hücrenin zarar görerek şişmesi

ve patlayarak ölmesidir. Apoptoz ise hücre ölümü tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir (69,70).

Apoptoz; Yunan dilinde çiçeğin yapraklarının düşmesi, dökülmesi anlamına gelen bir sözcüktür. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir (71). Zamanı gelince ölen hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürler ("programmed cell death"). Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü ("physiological cell death") olarak da adlandırılır. Ayrıca, bir şekilde DNA'sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler ("cell suicide") ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin turnover"ında olduğu gibi) hücreler ortamdan ölerek kaybolur ("cell deletion"). İşte, tüm bu kavramlar (programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı) apoptoz ile eşanlamlı olarak kullanılabilen ve literatürde yer alan ifadelerdir (72,73)

Çok hücreli canlılarda asıl amaç hem yeni hücre üretmek hem de hücreler yaşlandığında veya aşırı çoğalmaya başladığında bu hücrelerin apoptoza gitmesini sağlayarak organizmanın homeostazını korumaktır. Apoptoz'da ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoz da yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (73,74). Apoptoz da ise hücreler birçok uyaranla ölüme giderler; ancak bu ölüm programlı, kontrollü ve düzenli bir şekilde gerçekleşir. Bu süreç nekrotik hücre ölümünden farklıdır. Nekrotik ölümde hücre kontrolsüz biçimde ölüme gider, hücre parçalanır, enflamasyon görülürken apoptoz da hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alır ve kendi ölümünün her aşamasına katkıda bulunur (75). Bu nedenle de apoptoz hücre intiharı olarak bilinir. Nekrozda patlayan hücre içerikleri komşu hücrelere zarar verirken, apoptozda çevre hücreler zarar görmez ve ölen hücreden etkilenmez. Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilirken nekrozis fizyolojik bir ölüm şeklidir. Apoptotik hücrede kromatin nukleus membranı agregasyon gösterir ve kondanse olur ancak nekroz da kromatin paterni normal hücredekine benzerdir (71). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına

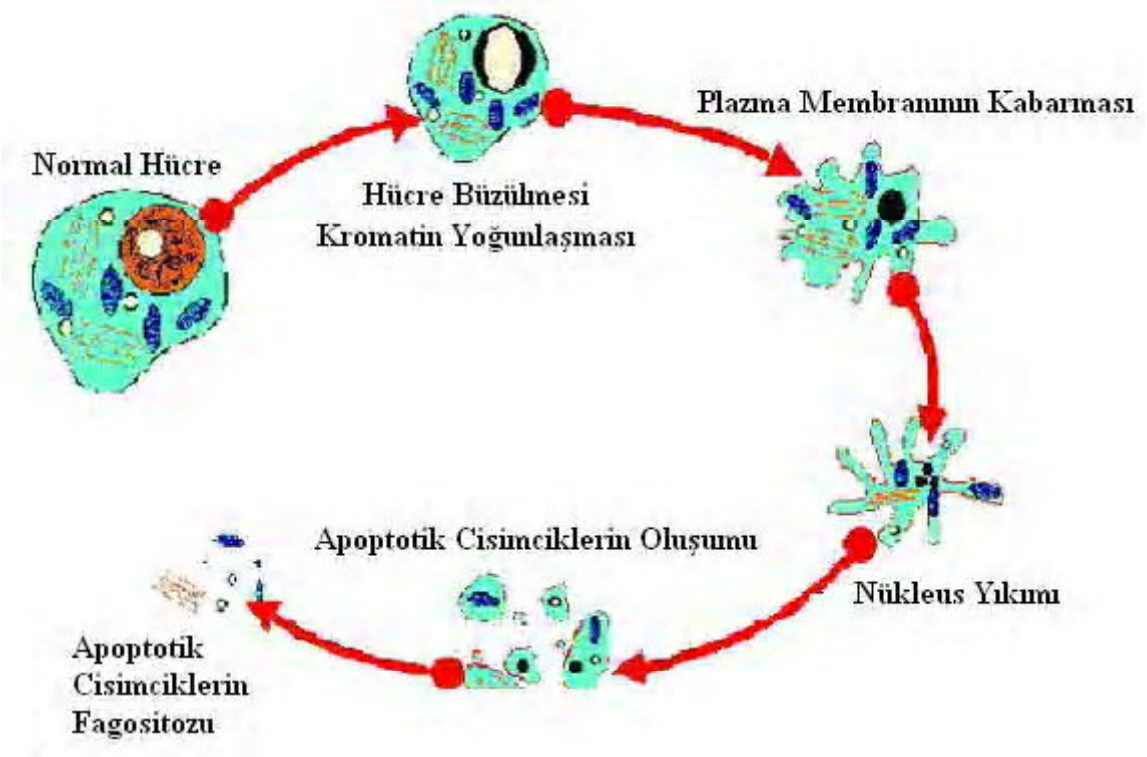
hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir (Şekil 2.4) (76,77). Apoptoz ile ölen bir hücrede hücre membranında enflamasyon gözlenmez; nekrozda ise, enflamasyon, hücresel şişme ve hücre zarının bozulması gözlenir (78). Apoptoz bir hücre hasarına yanıt olarak meydana gelir oysa nekroz genelde hasar sonucu gelişir. Apoptoz önceden bir yol ile koordineli olarak meydana gelirken, nekroz birçok biyokimyasal olaydan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının tükenmesi ile aktive olur (79). Apoptozda hücre büzülür ve komşu hücrelerden ayrılır. Hücre yüzeyinde 17 kabarcıklar oluşur. Bu kabarcıklar kaynamayı andıran bir görüntü oluşturur. Hücre içi organeller yapılarını korurken çekirdekte dağınık halde bulunan kromatin, çekirdek zarında yoğun heterokromatin birikintiler şeklinde gözlenir. Ayrıca apoptoz izlenen hücrelerde daha ileri değişikliklerin tipik göstergesi; çekirdeğin parçalara ayrılması ve hücrenin "apoptotik cisimcik" adı verilen çok sayıda yuvarlak biçimde yapılara bölünmesidir (71).



Şekil 2.4. Apoptozis ve nekrozis (80).

2.5.1.1. Apoptoza giden hücrede morfolojik değişiklikler

Apoptotik hücreler, dokuda 4-9 saat boyunca tanınabilir haldedirler ve diğer organeller gibi lizozomları da bozulmadan kalır. Apoptotik cisimler makrofajlar veya makrofaj aktivitesi gösterebilen hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptotik cisimciklerin makrofajlar tarafından tanınmasında, Fas ve Cd-36'nın rol oynadığı bildirilmiştir (71).



Şekil 2.5: Apoptoza giden hücrede morfolojik değişiklikler (81).

2.5.1.2. Apoptozun aşamaları

- Apoptozun indüksiyonu

- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması

- Sitokrom-c'nin salıverilmesi

- Apoptozom oluşumu (sitokrom-c + Apaf-1 + kaspaz-9)

- Mitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi

- Kaspazların aktivasyonu

- Fosfatidilserinin hücre membanının iç yüzünden dış yüze transloke olması

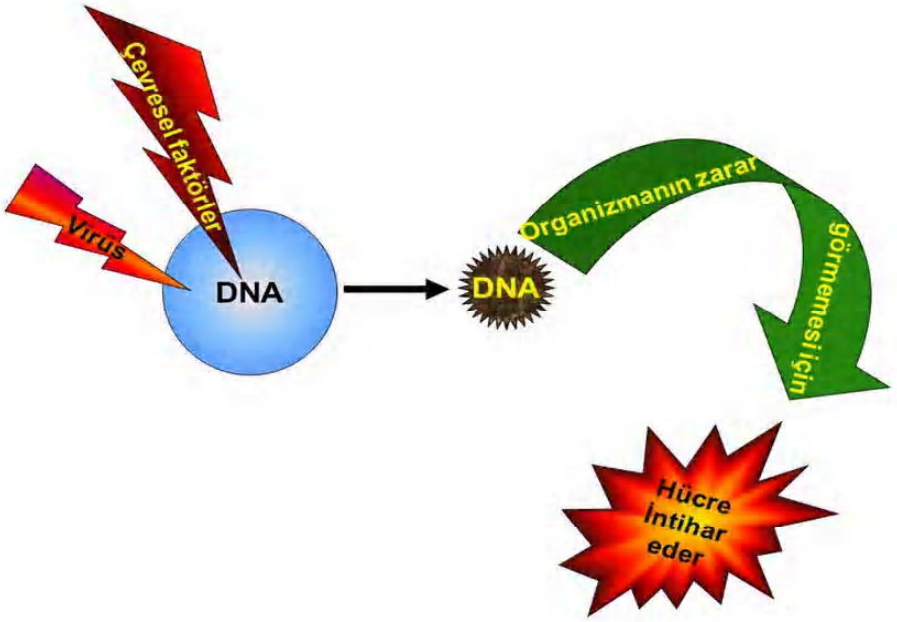
-Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptoza özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi (82).

Apoptozun görüldüğü hücre çeşitleri apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam

etmektedir. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (83).

2.5.1.3. Apoptozun indüklenmesi

Apoptozu başlatan nedenler çeşitlidir. Apoptoz klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir (84). Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNF ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokardda bulunur. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, TNF ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve "natural killer" hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri ("death domain") adı verilen TRADD ("TNFR-1 associated death domain") ve FADD ("Fas associated death domain") ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır (85). Apoptoz yukarıda da belirtildiği gibi genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak anti apoptotik (bcl-2) ve pro apoptotik (p53) olan onkoprotein grubunun indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açararak apoptozu başlatır (86,87).



Şekil 2.6: Apoptoza uğrayan hücre çekirdeği (88).

2.5.2. Tümör anjiogenezisi

Anjiyogenez kavramının tarihçesine bakıldığında yaklaşık 100 yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişimlerinden bahsedildiği görülmektedir. Damar gelişimi karmaşık bir süreç olmakla birlikte vaskulogenezis ve anjiogenezis süreçleri ile birlikte şekillenen bir gelişim sürecidir (89,90).

Damar gelişim süreci doğal olarak vücutta bulunan bir mekanizmadır, bazı durumlarda bu süreç patolojik de olabilir (91). Angiogenezis tümör gelişiminde ve metastazda önemlidir. Tümörler ilişkili anjiogenik faktörler tümör hücresi tarafından veya inflamatuar hücrelerden gelişebilir. En önemli anjiogenik faktörler vascular endothelial growth factor (VEGF) ve basic fibroblast growth factor (bFGF)'dir. Son çalışmalar tümör hücrelerinin hem anjiogenetik hem de antianjiogenetik faktörleri indüklediğini ortaya koymuştur. Anjiogenezis embriyolardaki ve yetişkinlerdeki mevcut damarlardan tomurcuklanma yolu ile yeni kan damarlarının gelişme sürecidir (92,93). Yapılan araştırmalarda tümör damarları hakkında bu damarların yeni çoğalan damarlar olup olmadığı, anjiogenezis sürecindeki adımlar nelerdir, anjiogenezis engellenebilir bir süreç midir? gibi sorulara cevap aranmıştır. Tümör gelişiminde iki süreç öne çıkar bunlar prevasküler ve vasküler faz evreleridir. Prevasküler faz sürecinde tümör 2-3 mm çaptan daha fazla büyüme gösterir. Bu fazda tümör hücreleri hızlı gelişim gösterir.

Tümör, damar yapısının artmasına bağlı olarak, hızlı bir şekilde büyür. Tümör içinde oluşan kan damarları tümör hücreleri için sadece oksijen ve besin kaynağı değildir aynı zamanda tümör hücrelerince oluşturulmuş olan atıkların uzaklaştırılması gibi görevlerde üstlenirler. Vasküler fazda, tümör hacmindeki artış azalmış olabilir bunun sebebi olarak tümör hücresinde görülen apoptoz gösterilmektedir (92-95).

Vaskulogenezis; Primitif vasküler ağ embriyonik gelişim süresince anjioblast denen endotel hücre prekürsörlerinden yapılır (96).

Anjıogenezis veya neovaskülarizasyon; Önceden var olan damarların yeni damar oluşturmak üzere kapiller tomurcuk geliştirmesi (96,97).

2.5.2.1. Anjiogenezis Basamakları

1) Bazal membranın proteolitik yıkımı
2) Endotel hücresinin anjiogenik stimulusa göçü
3) Endotel hücre proliferasyonu
4) Endotel hücre maturasyonu, kapiller tüp oluşumu
5) Periendotelyal hücrelerin endotelyal tüpleri desteklemek için toplanması ve damarın fonksiyon görüp devamlılığının sağlanması

Bu basamakların her biri Growth Factor (GF)'ler, vasküler hücreler ve ekstra selüler matriks ile kontrol edilir. Vaskülogenezis'de en çok rolü olan VEGF'dir. Erken vasküler gelişimde VEGF anjioblastlar üzerindeki reseptörüne bağlanır ve endotel hücre proliferasyonu gerçekleşir (98-100).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEKAM) temin edilen Balb/C türü fare kullanıldı. Çalışmanın deney hayvanları üzerinde gerçekleşen aşaması Erciyes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan 12/02/2014 tarih ve 14/029 sayılı karara uygun olarak DEKAM'da, deney sonrası elde edilen dokuların değerlendirilmesi ise Anatomi ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dallarının araştırma laboratuarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Araştırmada kullanılan denek cinsi, sayısı ve dağılımı

Yapılan bu çalışmada hayvanın soy, tür, cinsiyet, yaş ve ağırlık seçiminde yapılan diğer çalışmalardaki özellikler göz önünde bulundurularak 8-10 haftalık, ortalama 25-30 gr ağırlığında Balb/C türü olarak erkek fareler kullanıldı. Her bir grupta 10 fare olacak şekilde 8 grup oluşturulurken grupların dışında stok hayvan oluşturulması ve olası kanserli fare ölümleri de göz önünde bulundurularak 12 hayvan ayrıldı.

3.2. Deneysel Prosedür

Fareler araştırma süresince 21 ºC sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu özel hazırlanmış, otomatik olarak klimatize edilen odalarda korundu. Çalışmada gruplar oluşturulmadan önce yeterince EAT hücresi elde etmek için öncelikle stok fare oluşturuldu. Dört grup sıvı tümör, dört grup katı tümör için olmak üzere sekiz grup hayvan rastgele olacak şekilde beşerli iki kafese konularak etiketlendi. Sıvı ve katı tümör için birer grup negatif kontrol olarak ayrılması planlanırken diğer üç gruba periton içi ve üç gruba deri altına EAT hücreleri enjekte edilerek sıvı ve katı tümör oluşturuldu. Sıvı ve katı tümör gruplarından birer grup pozitif kontrol grubunu

ikişer grup ise curcumin tedavi gruplarını oluşturuyordu. Stok hayvan oluşturulmasından sonra stok farelerden alınan EAT assit sıvısı sıvı tümör,katı tümör oluşumu ve hücre kültürü için kullanıldı. Stok hayvandan enjektör yardımı ile çekilen assit sıvısı 0.1 ml PBS içerisinde süspanse edilerek thoma lamında sayıldı ve $1x10^6$ EAT hücresi farelerde sıvı tümör oluşturmak için intraperitoneal olarak enjekte edildi. Hücre kültürü için ise yine stok hayvandan enjektör yardımı ile çekilen assit sıvısı içinde bulunan hücreler sayılarak steril kültür kaplarına alınarak *in vitro* şartlarda kültüre edildi.

3.3. Stok farelerin oluşturulması

Stok hayvan oluşturulmasında -80 derecede saklanan EAT hücreleri kullanıldı. Stok hücreler oda sıcaklığında çözülerek, stok hayvana 0.1 cc olacak şeklide sol arka bacağı ve karın bölgesinin birleşim yerinden intraperitoneal verildi. Stok hayvanda 6-7 gün içerisinde assit tümör oluşumu beklenmektedir. Stok hayvandan enjektör yardımı ile çekilen assit sıvısı içindeki $1x10^6$ EAT hücresi 0.1 ml fosfat buffer saline (PBS) içerisinde farelere intraperitoneal olarak verilerek sıvı tümör, ense bölgesine subkutan olarak verilerek katı tümör oluşturuldu. Stok hayvanın intraperitoneal boşluğundan alınan sıvının 1 ml'sindeki EAT hücresi aşağıdaki prosedüre göre belirlendi.

3.4. Hücre Sayımı Prosedürü

- Stok hayvandan 10. günde 1ml abdominal bölgeden assit sıvısı çekilir.
- Bu sıvı üzerine 1 ml PBS konulur ve bununla birlikte toplam 2 ml sıvı elde edilir.
- 2 ml sıvıdan 100 mikrolitre (µl) çekilerek, epondorf tüpüne konulur.
- 100 mikrolitre sıvının üzerine 100 mikrolitre tripan blue ilave edilerek toplamda 200 mikrolitre sıvı elde edilir.

Karışımdan 50 mikrolitre çekilerek, thoma lamının sayım alanına enjekte edilir. 40'lık objektifte canlı hücreler büyük karelerde sayılır. Ölü hücreler maviye boyanmış olduğu için kolayca fark edilecektir. Thoma lamının her iki sayma alanından 5'er büyük kare seçilerek içindeki canlı hücreler sayılır. Ortalamasını almak amacıyla sayılan tüm hücreler toplanarak 10'a bölünür ve thoma lamının bir sayma alanında 16 büyük kare

bulunduğu için çıkan sonuç 16 ile çarpılır. Bu sonuç ise 10^4 ile çarpıldığında 1ml'deki hücre sayısı bulunmuş olur. Bu hesaplamalarda diliüsyon oranıda dikkate alınmalıdır.

3.5. Curcumin ekstraktının çözünmesi ve sterilizasyonu

Curcumin ekstraktı deney uygulama gününde DMSO (dimethil sülfoksit) ve PBS (phosphate buffer saline) tamponu ile her deney grubu için istenilen konsantrasyonları sağlayacak şekilde farklı hacimlerde çözdürüldü. DMSO oranı çalışmada %10 olarak tutuldu ve çözünme işleminden sonra filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Curcumin ekstraktının çözünmesi her enjeksiyon gününde taze olarak hazırlandı**.**

3.6. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda curcumin'in EAT hücreleri üzerindeki tedavi edici etkisi *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırıldı. *In vivo* etki sıvı ve katı tümör üzerinde değerlendirildi. Hayvanların ağırlıkları deneyin başladığı ilk günden sakrifiye edildikleri güne kadar ölçüldü. Aynı zamanda her gün katı tümör bölgesi elle palpe edilerek tümör oluşmaya başladıktan sonra tümör çapları da kumpas ile ölçüldü. Tümör hacimlerini ölçmek için $Tümör\ hacmi(mm^3) = En^2 \times Boy \times 0{,}52$ formülü kullanıldı (101).

3.7. Sıvı Tümör Grupları

Grup 1: Negatif kontrol grubu: Kanser oluşturulmadı ve hayvanlar 10 gün boyunca normal diet ile beslenildi. 10 gün boyunca intraperitoneal yolla 0.1 ml serum fizyolojik (SF) uygulandı.

Grup 2: Pozitif kontrol grubu: Bu grupta yer alan farelere 0. gün karın bölgesine içerisinde $1x10^6$ EAT hücresi bulunan 0.1 ml assit sıvısı intraperitoneal uygulanadı. 0. günden itibaren 10 gün süreyle farelere 0.5 ml serum fizyolojik intraperitoneal yolla enjekte edildi.

Grup 3: Tedavi grubu (25 mg curcumin): Bu grupta yer alan farelere 0. gün karın bölgesine içerisinde $1x10^6$ EAT hücresi bulunan 0.1 ml assit sıvısı intraperitoneal uygulandı. 0. günden itibaren 10 gün süreyle farelere 25mg/kg/gün curcumin intraperitoneal enjekte edildi.

Grup 4: Tedavi grubu (50 mg curcumin): Bu grupta yer alan farelere 0. gün karın bölgesine içerisinde $1x10^6$ EAT hücresi bulunan 0.1 ml assit sıvısı intraperitoneal

uygulandı. 0. günden itibaren 10 gün süreyle farelere 50mg/kg/gün Curcumin intraperitoneal enjekte edildi.

Tüm hayvanlar 11. gün ketamin-xylosine (50mg/kg, 15mg/kg) genel anestezisi altında sakrifiye edildi.

3.7.1. Sıvı tümör oluşturulan deney gruplarında yapılan incelemeler

Deneyin başladığı günden deneyin son gününe kadar hayvan ağırlıkları ölçüldü. Tüm gruplardaki farelerde 10. günde ketamin (0.1mg/kg) ve xylazin (0.05mg/kg) ile intramüsküler enjekte edilerek genel anestezi altında abdominal bölgeden intraperitoneal girilerek assit sıvısı 10 cc'lik enjektörle alındı ve hücre sayımı yapıldı. Daha sonra disseksiyonla karın ön duvarı açılarak intraperitoneal bölge kontrol edildi ve EAT hücrelerine bağlı olarak oluşmuş doku kitlesi var ise alınarak %10'luk soğuk formaldehit içinde tespit edildi. Ayrıca karın içi organlardan karaciğer, dalak, böbrek, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsaktan alınan dokular rutin histopatolojik inceleme için %10'luk soğuk formaldehit içinde tespit edildi. Daha sonra hayvanların kalplerine makas ile bir kesi atılarak uyanmaları engellendi.

3.7.2. Histolojik doku takibi

%10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin histolojik takip aşamalarından sonra hazırlanan ve parafin bloklara gömülecek olan dokulardan 5µm'lık kesitler pli-L lizinle kaplı lamlara alındı. Histolojik doku takibi aşamaları Tablo 3.1' de verilmiştir. Elde edilen deney gruplarına ait dokulara hemotoksilen-eozin ile boyadı. Bu boyama metoduna ait prosedürler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Işık mikroskobunda incelenecek dokuların hazırlanma tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	1 saat	**7**	% 100 alkol	1 saat
2	% 50 alkol	1 saat	**8**	% 100 alkol	1 saat
3	% 70 alkol	1 saat	**9**	Ksilen 1	20 dakika
4	% 80 alkol	1 saat	**10**	Ksilen 2	20 dakika
5	% 96 alkol	1 saat	**11**	Ksilen 3	20 dakika
6	% 100 alkol	1 saat	**12**	Parafin	2 saat

Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	**14**	Eozin	3-5 dakika
2	Ksilen I	10 dakika	**15**	Akarsu	1 dakika
3	Ksilen II	10 dakika	**16**	%50 Alkol	1 dakika
4	Ksilen III	10 dakika	**17**	%70 Alkol	1 dakika
5	Absolu Alkol I	5 dakika	**18**	%80 Alkol	1 dakika
6	Absolu Alkol II	5 dakika	**19**	%96 Alkol	1 dakika
7	%96 Alkol	5 dakika	**20**	Absolu Alkol I	1 dakika
8	%80 Alkol	5 dakika	**21**	Absolu Alkol II	1 dakika
9	%70 Alkol	5 dakika	**22**	Absolu Alkol III	1 dakika
10	%50 Alkol	5 dakika	**23**	Ksilen I	5 dakika
11	Akarsu	5 dakika	**24**	Ksilen II	5 dakika
12	Hematoksilen	6-8 dakika	**25**	Ksilen III	5 dakika
13	Akarsu	5 dakika	**26**	Entellanla kapatılır	

3.8. Katı tümör grupları

Grup 1: Negatif kontrol grubu: Kanser oluşturulmadı. Hayvanlar 15 gün boyunca normal diet ile beslendi. 15 gün boyunca subkutan yolla 0.1 ml serum fizyolojik (SF) uygulanadı.

Grup 2: Pozitif kontrol grubu: Bu grupta yer alan farelere 0. gün ense bölgesinden içerisinde $1x10^6$ EAT hücresi bulunan 0.1 ml assit sıvısı subkutan yolla uygulandı. 0. günden itibaren 15 gün süreyle farelere 0.5 ml serum fizyolojik subkutan yolla enjekte edildi.

Grup 3: Tedavi grubu (25 mg curcumin):: Bu grupta yer alan farelere 0. gün ense bölgesinden içerisinde $1x10^6$ EAT hücresi bulunan 0.1 ml assit sıvısı subkutan yolla uygulandı. 0. günden itibaren 15 gün süreyle farelere 25 mg/kg/gün curcumin subkutan olarak enjekte edildi.

Grup 4: Tedavi grubu (50 mg curcumin): Bu grupta yer alan farelere 0. gün ense bölgesinden içerisinde $1x10^6$ EAT hücresi bulunan 0.1 ml assit sıvısı subkutan yolla uygulandı. 0. günden itibaren 15 gün süreyle farelere 50 mg/kg/gün curcumin subkutan yolla enjekte edildi.

Katı tümör çalışmasında kullanılan hayvanların tamamı 15. gün ketamin-xylosine genel anestezisi altında sakrifiye edildi.

Deney sonrasında hayvanlardan alınan tümör doku örnekleri histopatolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokulara rutin doku takip aşamaları uygulanarak parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilen ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanarak mikroskop altında incelendi.

3.9. İmmunohistokimyasal uygulama

3.9.1 Apoptoz tunel boyama metodu

Kontrol ve deney gruplarına ait doku kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında en duyarlı ve en hızlı metot olarak TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end Labeling) işaretleme yöntemi kullanılmıştır. Özetle, poli-Llizinle kaplı lamlara alınan 5μm'lık kesitler ksilende deparafinize edildi, azalan alkol serilerinden geçirildi ve oda sıcaklığında PBS (phosphate buffer saline)'de 5 dk inkübe edildi. 15 dk proteinaz K ile inkübe edilen kesitler distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bastırmak için %30'luk H_2O_2 ile muamele edildi. Sonraki basamaklar için kitte (Apoptaq In Situ Cell Death Detection Kit, Millipore, S7110) bulunan ve üretici firma tarafından önerilen boyama metoduna uygun olarak immunofluoresan boyama yapıldı. Bunun için, PBS ile yıkanan kesitler TdT enzimi ile 37°C'de karanlık ve nemli ortamda 60 dakikada inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler oda sıcaklığında anti-digoxigenin conjugate ile tepkimeye girdi. Bütün inkübasyon basamakları nemli ortamda yerine getirildi. Görüntü elde etmek için slaytlar immunofluoresan mikroskobunda (Olympus BX 51) incelendi. Floresan izotiyosiyanat (FITCH) ve 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) sonrası elde edilen görüntülerde apoptotik hücreler belirlendi.

3.9.2. Faktör 8 boyama

Çalışmamızda farelerden elde edilen solid tümör dokularında ve Faktör 8 ekspresyonunu belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı.

Polilizinli lamlara alınan tümör doku kesitleri kasetler içerisine yerleştirilerek bir gece etüvde 60°C'de inkübe edildi. Daha sonra ksilen ve arkasından azalan dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehitrate edildi. 3 kere 2'şer dakika distile su ile yıkandı. Arkasından antijen geri kazanımı için % 10 luk sitrat buffer mikrodalga içinde 600 w'de 5 dakika sıcaklık uygulanıp sonrasında oda sıcaklığında 10 dakika soğumaya bırakıldı. PBS ile yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 12 dakika %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edilerek tekrar PBS ile yıkandı. Bundan sonraki aşamalar için boyama kiti (Thermo Scientific) kullanıldı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 10 dakika blok serum uygulandı. Daha sonra faktör 8 hazırlanıp dokulara damlatıldı. Negatif kontrol için dokulara fosfat tamponundan damlatıldı. Arkasından kesitler tank içerisine yerleştirilip 1 gece +4°C'de bekletildikten sonra 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra fosfat tamponu ile yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra fare dokularına bağlanabilen biotin-sekonder antikor ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yeniden yıkama işlemi yapılacak ve 10 dakika oda sıcaklığında streptavidin peroksidaz ile muamele edildi. Yeniden yapılan yıkama işleminden sonra immünreaktivitelerini görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) (Thermo Scientific) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 1.5 dakika muamele edildi. Arkasından 6 dakika distile su ile yıkandı. Gill hematoksilen ile zıt boyanan kesitler birkaç kez distile su ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılıp ksilenden geçirilen kesitler kapatma solüsyonu (Entellan®, Merck) ile kapatıldı ve Olimpus BX51 mikroskobunda incelendi.

3.10. In vitro deney grubu

Hücre kültürü için daha önce yapılan çalışmalar incelenerek curcumin'in 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml dozlarının EAT hücreleri üzerine etkisi araştırıldı. Curcumin %10 DMSO ve PBS içinde çözdürüldü. Kültür besi yeri (%20 Fetal Bovine Serum, %80 Dulbeccos Middle Eagle Medium ve 1ml penicilin/streptomycin: 10,000 unit/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin) ile hazırlandı. 96'lık plateler her grupta 24 kuyucuk olacak şekilde tümör kontrol,10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml curcumin tedavi grupları olarak 4 gruba ayrıldı. Herbir kuyucukta 160 µl medium içerisinde 104.000 EAT hücresi olacak şekilde 3 ve 24 saat CO_2 Incubator'de inkübe edildikten sonra hücreler sayıldı.

3.10.1. Hücre sayımı

Herbir kuyucuktaki medium içinde suspansiyon halindeki EAT hücreleri eppendorf tüpüne konudu. Üzerine 100 µl Trypan Blue ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine koyularak ve lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesinin üzerine lamel kapatıldı. Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucunu dayayarak tam orta noktasından yavaşça 50 µl hücre solusyonu sayım alanına pipetlendi. Daha sonra Thoma lamı mikroskobun tablasına yerleştirildi. 15-20 saniye kadar beklerken mikroskop objektifi 40X'e ayarlanarak sayma alanı bulundu. Hücreler tek tek sayılarak not edildi.

3.11. Sonuçların Değerlendirilmesi

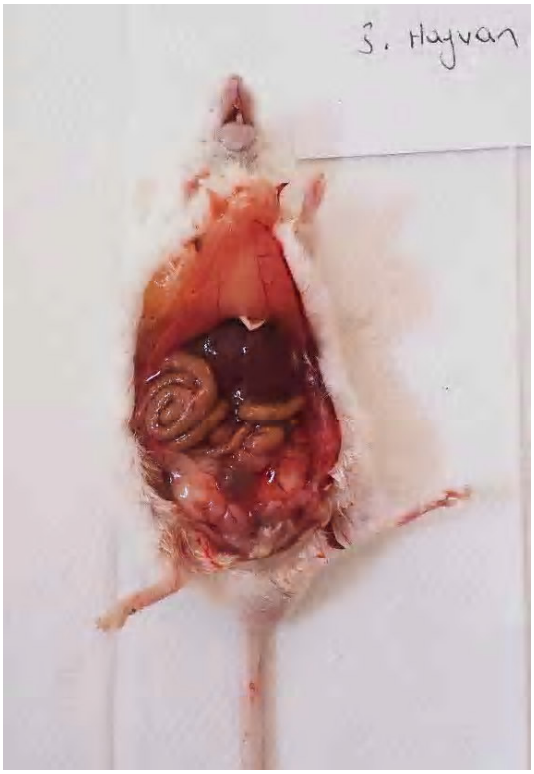
İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Inc., ILL, USA) programı kullanıldı. Gruplar arasındaki kilo ve Faktör 8 ile ilgili analizlerde independent sample T testi kullanıldı. Gruplar arasındaki hacim karşılaştırması için Mann Whitney U testi ve *in vitro* deney gruplarında doz karşılaştırmada Kruskall Wallis testleri uygulandı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ve medyan (%25-% 75) olarak belirlendi. İstatistiksel analiz $p< 0.05$ ise anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Deney gruplarından sağlıklı kontrol grup hariç diğer grupları oluşturan deneklere $1x10^6$ EAT hücresi intraperitoneal olarak enjekte edildikten sonra sağlıklı kontrol grubuna göre tümör kontrol grubundaki hayvanların tamamında karın bölgesinde assit birikimine bağlı olarak genişleme görüldü. 25mg/kg curcumin uygulama grubundaki 6 hayvanın karın bölgesi assit birikimine bağlı olarak genişlerken diğer 4 hayvanda karın bölgesinde bir genişleme gözlenmedi. 50mg/kg curcumin uygulama grubunda ise 4 hayvanın karnında assit birikimine bağlı olarak genişleme gözlendi (Resim 4.1). Karnında genişleme olmayan hayvanların deney sonunda karınları açıldığında periton içinde bir miktar assit birikiminin mevcut olduğu ve adipoz dokuya benzer bir dokunun bazı deneklerin karın ön duvarında ve karın içi organların üzerinde olduğu gözlendi.

EAT hücresinin intraperitoneal yolla enjekte edildiği hayvanların karın içi organlarında sağlıklı kontrollere göre morfolojik olarak bir farklılık gözlenmemiştir (Resim 4.2).

Resim 4.1 EAT hücresi verilen hayvanda assit birikimine bağlı abdominal bölgede görülen genişleme.



Resim 4.2 Deney grubuna ait farenin organlarının genel görünüşü

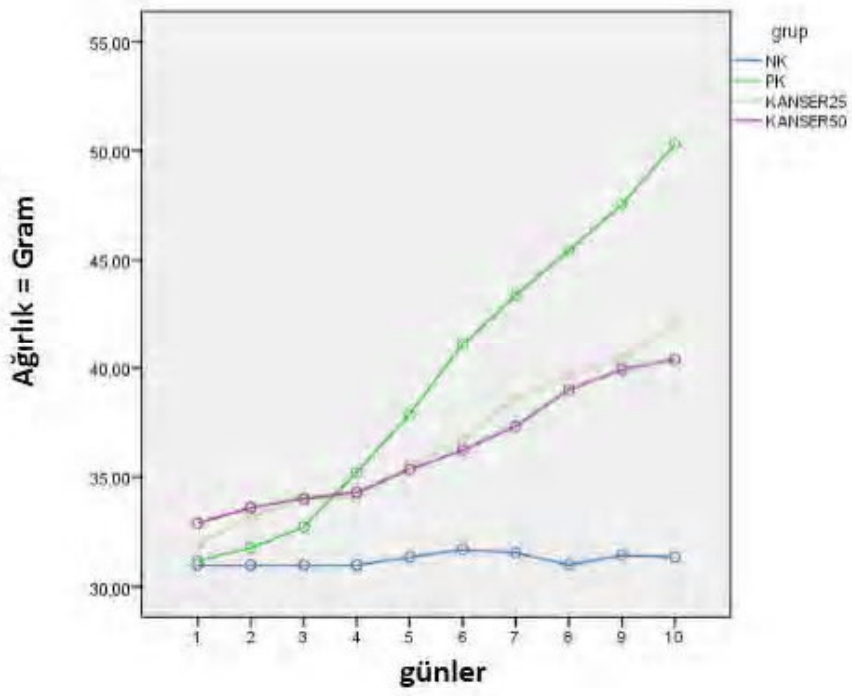
4.1. Deney süresince assit tümör gruplarının vücut ağırlık değişimleri

Deney süresince (10 gün) günlük olarak gruplara ait hayvanların vücut ağırlıkları ilgili verilere bakıldığında tümör kontrol grubunda 4. günden itibaren hızlı bir artış gözlenmiştir (Tablo 4.1). Bu hayvanlardaki kilo artışının nedeni intraperitoneal sıvıda tümör hücrelerinin artmasıdır. Tedavi gruplarında ise bu artışın daha geç olduğu, 25mg/kg curcumin verilen grupta yedinci günden itibaren, 50mg/kg curcumin verilen grupta ise sekizinci günden itibaren gözlenmiştir. Birinci ve onuncu günler arasında en fazla kilo artışı farkı tümör kontrol grubunda gözlenirken (19.11 g), bunu sırasıyla 25g/kg curcumin verilen tedavi grubu (10.06 g) ve 50mg/kg curcumin verilen tedavi grubu (7.49 g) izlemiştir (Şekil 4.1 ve Tablo 4.2).

Sağlıklı kontrol grup kendi içerisinde deney günleri boyunca karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı görülürken, tümör kontrol ve tedavi grupları kendi içerisinde deney boyunca ilk gün ile diğer günlerin kilo farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4.1. Kontrol ve tedavi grubuna ait farelerin vücut ağırlıklarının 1-10 gün aralığında değişimi. Ağırlıklar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Günler	Negatif kontrol Grubu gr± SS (n=10)	Tümör Kontrol Grubu gr ± SS (n=10)	25 mg/kg Curcumin gr ± SS (n=10)	50 mg/kg Curcumin gr ± SS (n=10)
1	30.98±2.29	31.19±1.45	31.96±2.78	32.91±1.80
2	30.98±2.29	31.77±1.53	33.25±2.52	33.62±1.96
3	30.98±2.29	32.74±1.57	33.99±2.14	34.04±1.90
4	30.98±2.29	35.24±1.74	34.07±2.65	34.32±1.87
5	31.35±2.26	37.89±2.07	35.56±3.63	35.36±1.72
6	31.70±2.32	41.11±2.76	36.71±4.52	36.25±2.48
7	31.55±2.15	43.39±2.07	38.62±5.02	37.35±3.74
8	31.00±2.00	45.03±2.71	39.67±5.23	39.01±5.24
9	31.43±2.22	47.53±2.11	40.43±5.16	39.93±4.98
10	31.35±1.90	50.30±2.38	42.02±4.92	40.40±5.37



Şekil 4.1 Grupların günlük ağırlık değişimi

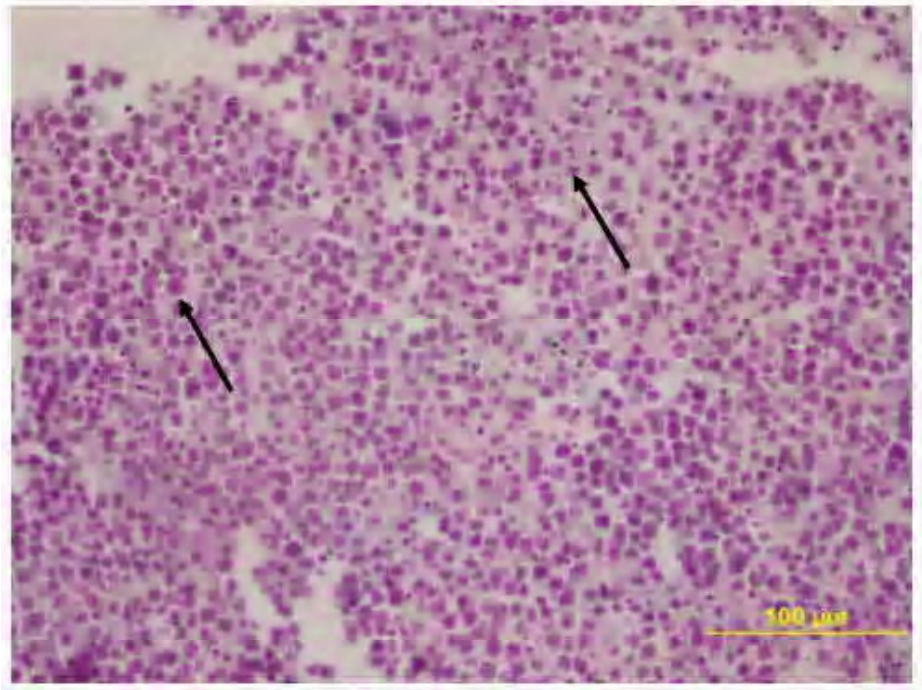
Tablo 4.2. Gruplar arasında birinci günden başlayarak vücut ağırlıklarındaki ortalama değişim

Günler	Negatif kontrol grubu gr± ss (n=10	Tümör kontrol grubu gr± ss (n=10)	25mg/kg Curcumin gr± ss (n)=10	50 mg/kg Curcumin gr± ss (n)=10
1-2	0.00± 0.00	0.58 ± 0.58	1.29*±0.97	0.71 ±0.53
1-3	0.00± 0.00	1.55* ± 0.80	2.03*±1.15	1.13*±1.00
1-4	0.00± 0.00	4.05* ± 2.02	2.11*±0.88	1.41*±0.85
1-5	0.36±0.35	6.70* ± 2.06	3.60*±2.56	2.45*±2.13
1-6	0.71±0.57	9.92* ± 1.66	4.75*±3.39	3.32*±3.01
1-7	0.56±0.41	12.20*±1.41	6.66*±4.15	4.44*±4.09
1-8	0.01±0.34	14.24*±1.95	7.71*±4.65	6.10*±5.87
1-9	0.45±0.45	16.34*±1.70	8.47*±4.26	7.02*±5.54
1-10	0.36±0.48	19.11*±2.38	10.06*±4.22	7.49*±5.97

Kontrol ile karşılaştırıldığında *p<0.05. Yüzde değişimi=(Son gün–İlk gün)/Son gün.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızda karın içi organlardaki EAT hücre metastazının daha iyi anlaşılması için EAT hücreleri tarafından deri altında oluşturulan bir solid tümör kesitindeki hücre yapısı Şekil 4.2'de verilmiştir. Yapılan histopatolojik incelemeler sonrasında sağlıklı kontrol gruplarının dokuları normal histolojik özellikler gösterirken, EAT hücresi verilen gruplarda karaciğer, böbrek ve dalak gibi organların doku kapsülüne, sindirim sistemine ait organların ise tunika serozalarına invaze olmuş dağınık halde EAT hücre toplulukları gözlendi. Kanser grubu hayvanların karın bölgesi genişlemeyenlerinde de benzer histopatolojik yapı gözlendi (Şekil 4.2-4.14).

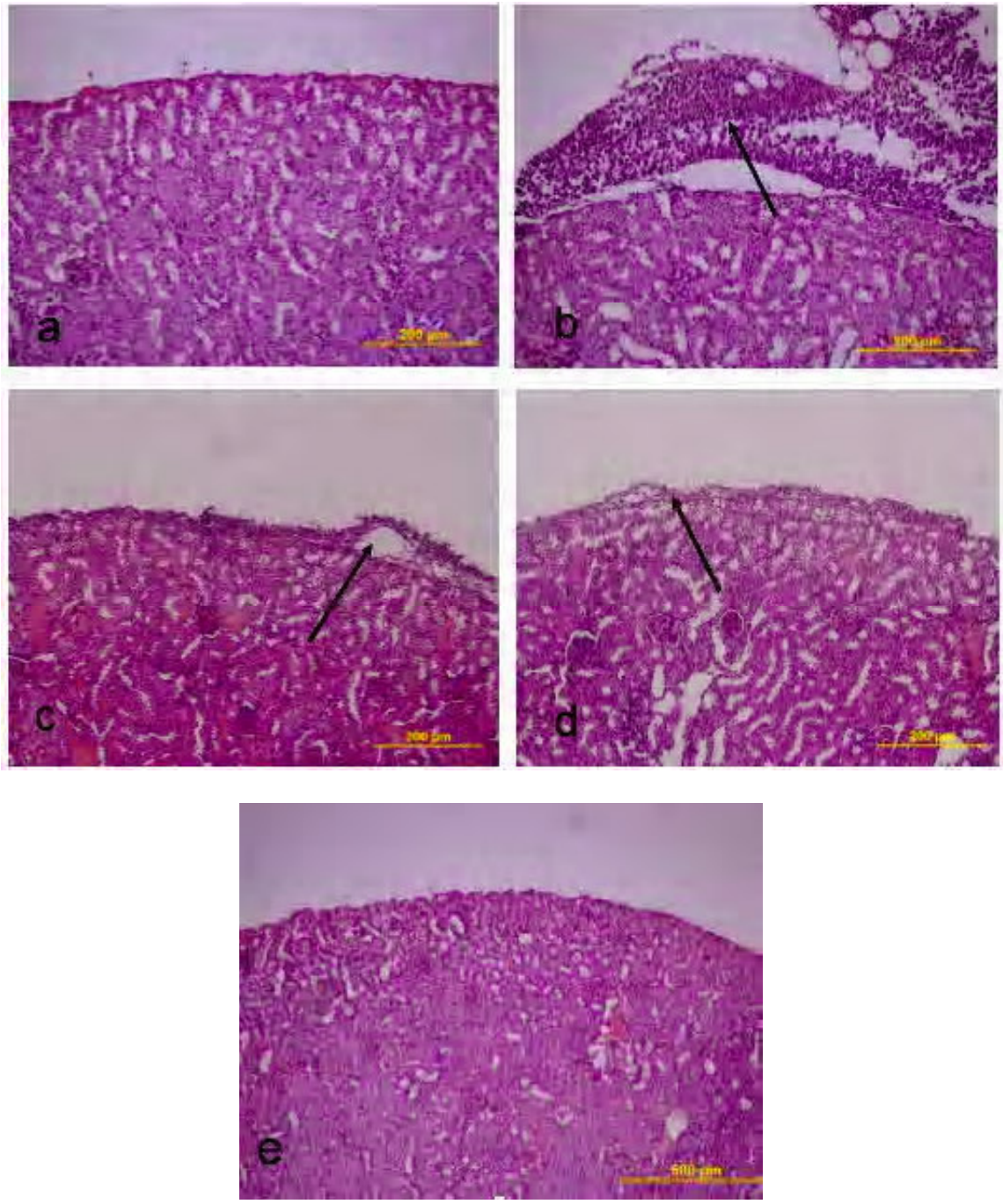


Şekil 4.2. EAT hücrelerinin histopatolojik görüntüsü. EAT hücreleri iri hiperkromatik nükleuslu ve eozinofilik sitoplazmalı farklı büyüklük ve şekilde hücreler olarak gözlendi.(ok= farklı büyüklükteki EAT hücrelerini göstermektedir. (H&E 40X)

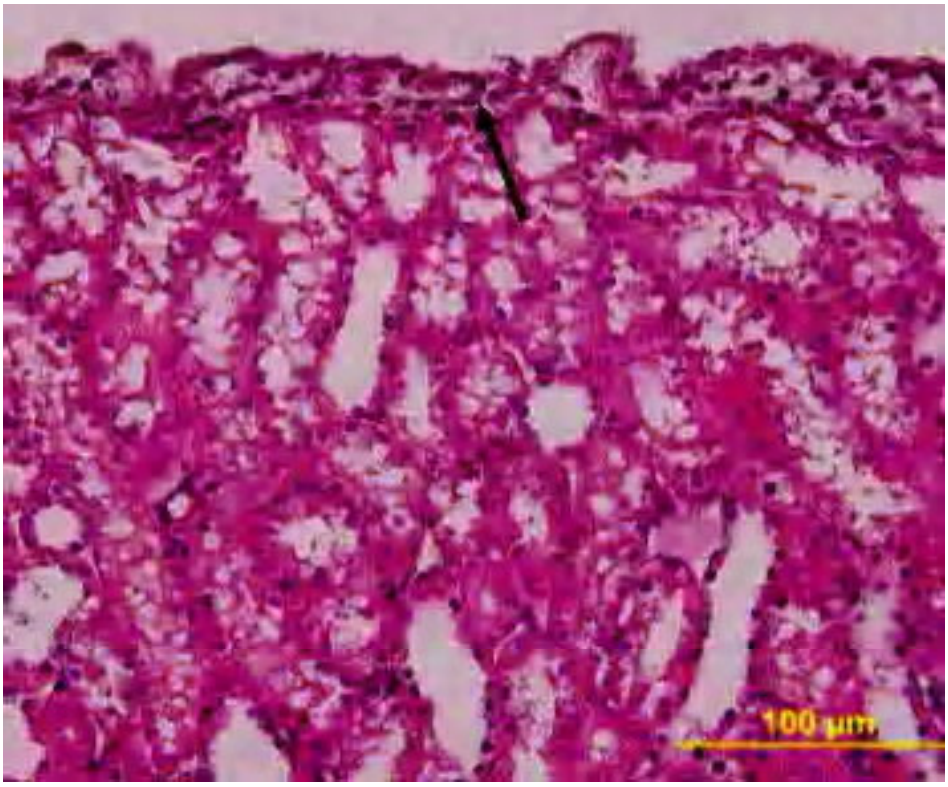
4.2.1. Böbrek Dokusu

Sağlıklı kontrol grubuna ait böbrek dokularında bağ dokusu kapsülü normal görünmekte olup, böbrek parankiması, renal korpuskülleri, proksimal ve distal tübüller, peritübüler kapillerler normal histolojik bulgular göstermekteydi (Şekil 4.3.a). Tümör kontrol grubunda bağ dokusu kapsülüne tutunmuş şekilde EAT hücreleri gözlendi. Bu gruba ait

böbrek kesitleri incelendiğinde, dokunun kapsülüne invaze tümör hücrelerinin farklı yoğunluklarda olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.b ve Şekil 4.4). 25mg/kg curcumin grubunun böbrek kapsülünde tümör kontrol grubunda gözlemlenen özellikteki tümör hücrelerinin varlığı saptanmıştır, ancak EAT hücreleri tümör grubundaki hücre yoğunluğu kadar fazla değildi (Şekil 4.3.c). 50mg/kg curcumin grubuna ait dokuların bazı kesitlerinde dokunun bağ dokusu kapsülünde tümör hücresi uygulanan gruptan ve 25mg/kg curcumin uygulanan gruptan daha az kümeleşmiş EAT hücre gruplarının varlığı tespit edilirken (Şekil 4.3.d), bazı kesitlerde doku kapsülünde EAT hücresi gözlenmedi (Şekil 4.3.e).



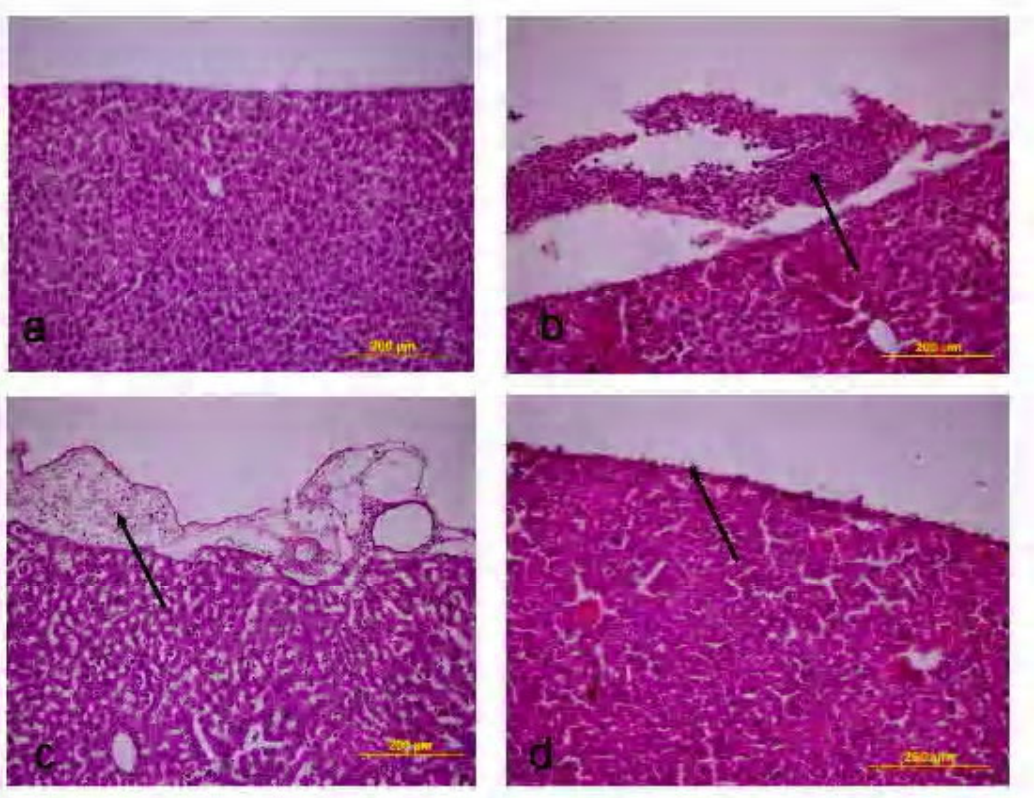
Şekil 4.3. Böbrek dokusunda sağlıklı kontrol grubu (histolojik), tedavi ve tümör uygulama gruplarına ait (histopatolojik) bulgular (H&E, 20X).**a)** Sağlıklı kontrol grubu. **b)** Tümör kontrol grubu **c)** Tümör ve 25mg/kg curcumin uygulanan grup. **d)** Tümör ve 50mg/kg uygulanan grup. **e)** Tümör ve 50 mg/kg curcumin uygulanan grup (H&E, 10X)



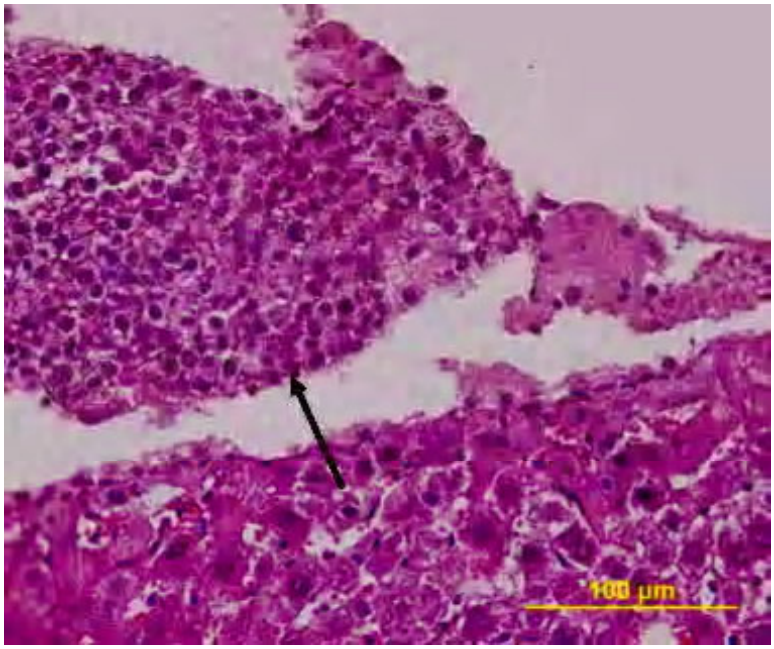
Şekil 4.4 50mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda böbrek dokusunda oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. (H&E 40X). ok=böbrek kapsülüne invaze EAT hücreleri.

4.2.2. Karaciğer dokusu

Histolojik değerlendirmeler sonucunda sağlıklı kontrol grubuna ait elde edilen karaciğer dokularında normal parankimal yapıya ait özellikler gözlenmiştir. Bu gupta, lobüller içerisinde vena centralis etrafında ışınsal tarzda ilerleyen karaciğer hücreleri normaldi. Karaciğer sinüzoidlerinin ise hepatosit kordonları arasında normal olarak uzandığı gözlenmiştir. Portal alanlarda bağ dokusu içerisinde yer alan safra kanalı, hepatik arter ve ven yapıları belirgindi (Şekil 4.5a). Tümör kontrol grubuna ait karaciğer dokularında glisson kapsülünü oluşturan bağ dokusu tabakasına tutunmuş belirgin ve çok sayıda EAT hücresinin bulunduğu gözlenirken (Şekil 4.5b ve Şekil 4.6), Tümör ve 25mg/kg curcumin uygulanan grupta karaciğer dokusu kapsülünde bağ dokusuna tutunmuş şekilde EAT hücrelerinin varlığı gözlendi (Şekil 4.5c). Tümör ve 50mg/ kg curcumin verilen grupta doku kapsülünde EAT hücrelerinin çok az bulunduğu hatta bazı kesitlerde hiç bulunmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.5d).



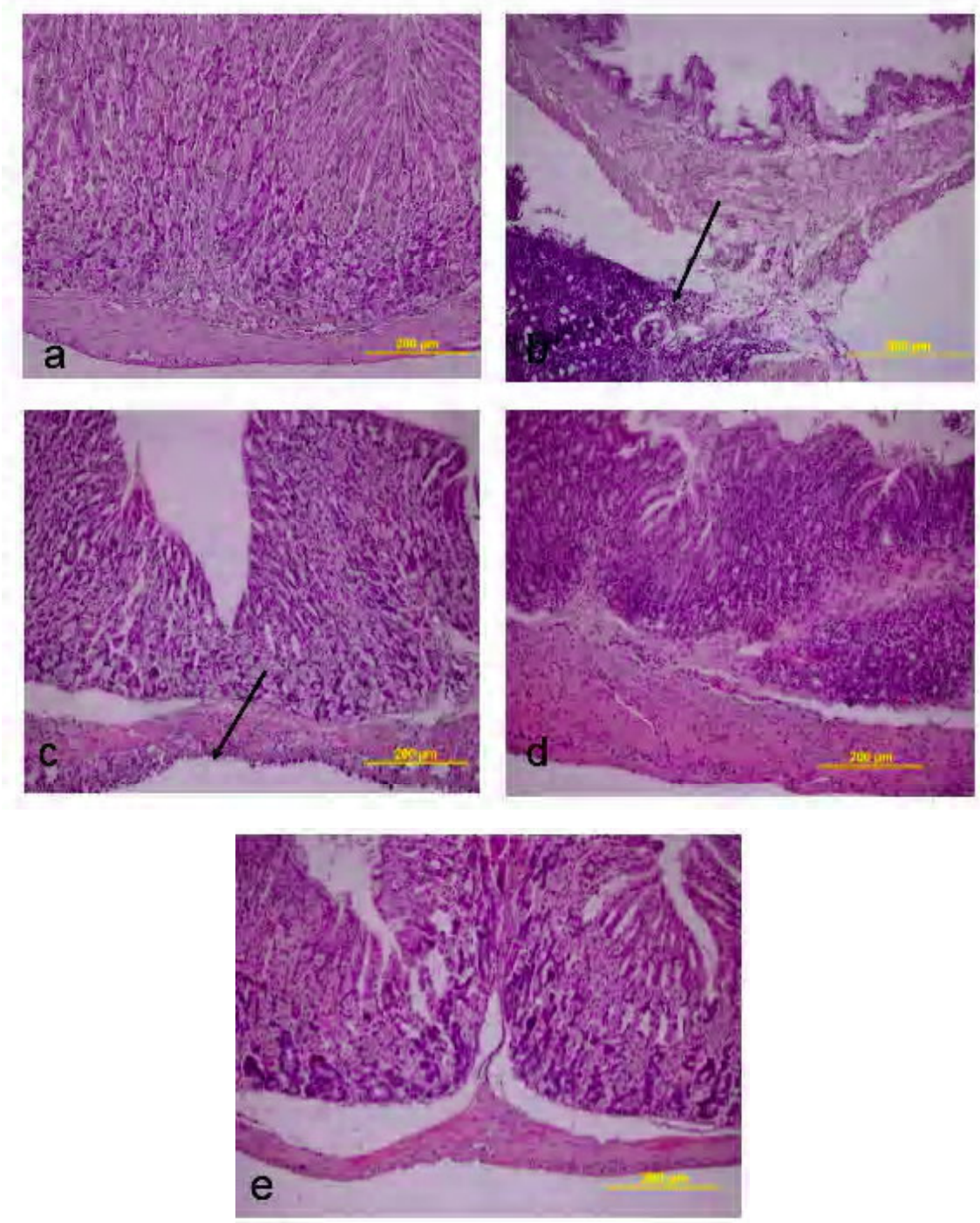
Şekil 4.5. Karaciğer dokusunun sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarının (histopatolojik) bulguları (H&E, 20X). **a)** Sağlıklı kontrol grubu **b)** Tümör kontrol grubu. **c)** Tümör ve 25mg/kg curcumin uygulanan grup. **d)** Tümör ve 50mg/kg curcumin uygulanan grup.



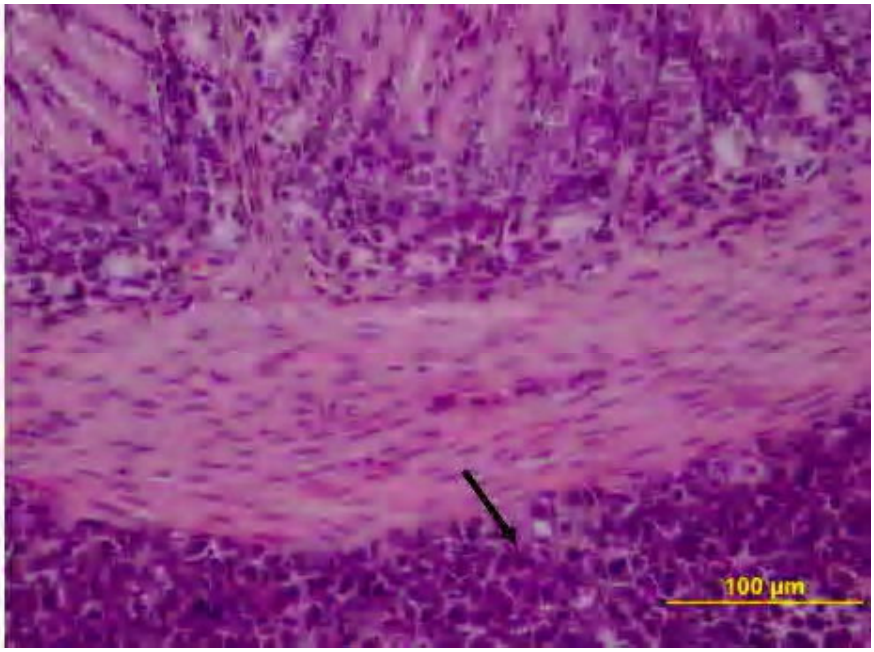
Şekil 4.6. Tümör kontrol grubunda karaciğer dokusunda oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. (H&E 40X). ok=Karaciğer dokusunun kapsülüne invaze EAT hücrelerini göstermektedir.

4.2.3. Mide dokusu

Deney gruplarına ait mide dokusunun histopatolojik değerlendirmelerine ait bulgular (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8)'de gösterilmiştir. Sağlıklı grupta histolojik bulgularda mide bezleri az dallanan basit tübüler bez yapısı göstermektedir. Bu bezler lümenden itibaren lamina propriaya kadar uzanmaktadır. Tunika muskularisin içten dışa oblik, sirküler ve longitudinal seyreden üç tabakalı düz kas liflerinden oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.7a). Tümör kontrol grubunda tunika seroza tabakasına tutunmuş iri hiperkromatik nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı ve farklı morfolojik özelliklere sahip EAT hücrelerinin invaze olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7b). Tümör ve 25mg/kg curcumin verilen grupta mide bezlerinde yapısal bir bozulmanın bulunmadığı ve seroza tabakasında EAT hücre kümelerinin sadece tümör uygulanan gruba oranla daha az olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.7c). Tümör ve 50mg/kg curcumin uygulanan grupta 25mg/kg curcumin uygulanan gruba oranla tunika seroza tabakasında, daha az EAT hücresinin varlığı gözlenmiş olup bu gruba ait dokuların mide bezlerinin yapısı sağlıklı gruba benzemekteydi (Şekil 4.7d). Tümör ve 50mg/kg curcumin uygulanan gruptaki bazı mide dokularında tunika seroza tabakasına invaze EAT hücresi gözlenmedi (Şekil 4.7e).



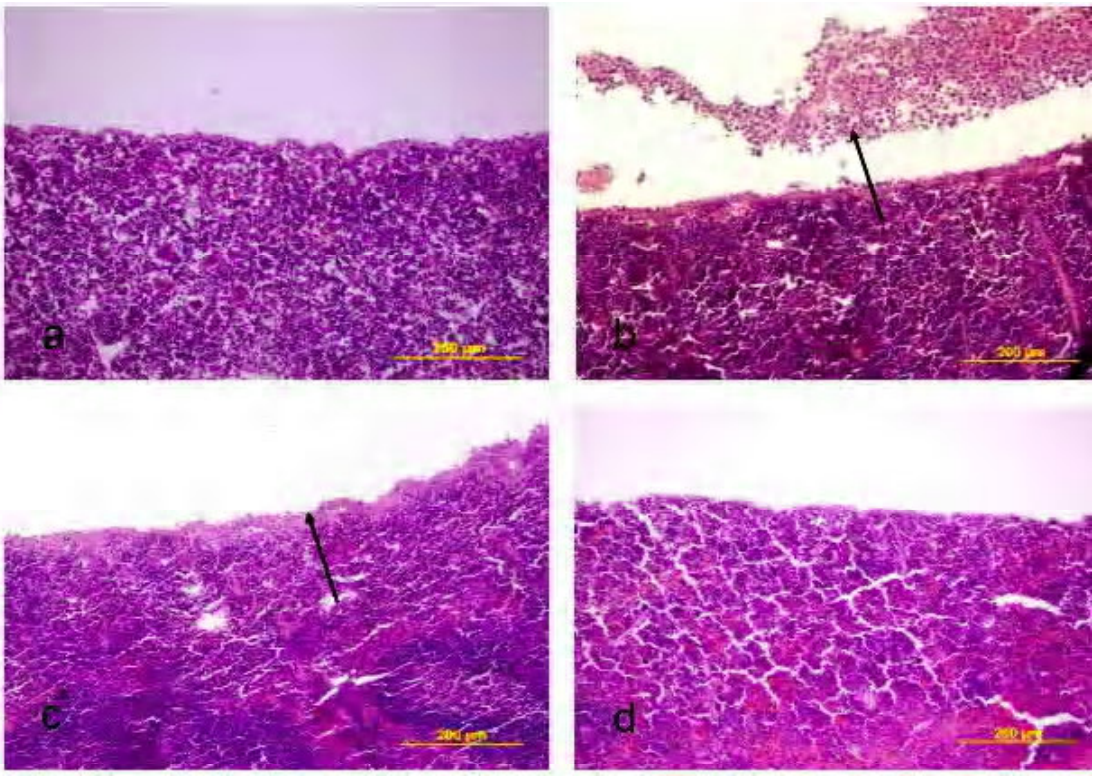
Şekil 4.7. Mide dokusunun sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarına ait (histopatolojik) bulgular (H&E, 20X). **a)** Sağlıklı kontrol grubu **b)** Tümör kontrol grubu (H&E, 10X).**c)** Tümör ve 25mg/kg curcumin uygulanan grup. **d)** Tümör ve 50mg/kg uygulanan grup. **e)** Tümör ve 50mg/kg curcumin ve uygulanan grup.



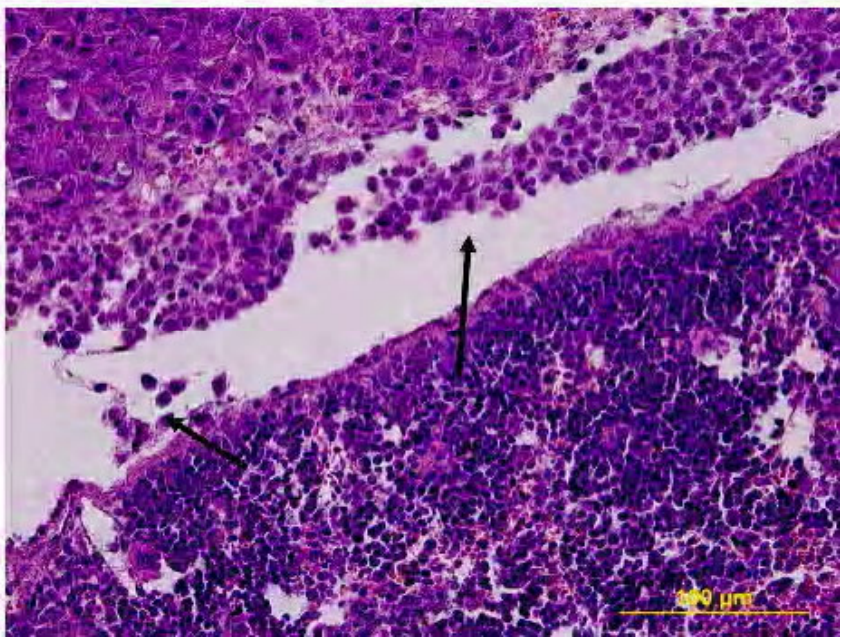
Şekil 4.8. 25 mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda mide dokusunun kapsülünde oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. (H&E 40X). ok=mide dokusunun kapsülüne invaze EAT hücrelerini göstermektedir.

4.2.4. Dalak dokusu

Deney gruplarına ait dalak dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, sağlıklı grupta histolojik incelemeler sonrasında organın dıştan fibromüsküler bağ dokusu ile kaplı olduğu gözlenmiştir. Dalağa ait histopatolojik görüntüler (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10)'da gösterilmiştir. Bu grupta, dalak genel yapısal özelliği olan trabekülalar, sinuslar ve splenik kordonları içeren kırmızı pulpa ve kırmızı pulpa içerisinde beyaz pulpa olarak adlandırılan lenf foliküllerini sergilemekteydi (Şekil 4.9.a). Tümör kontrol grubunda doku kapsülü etrafında kümelenmiş olarak bulunan EAT hücre toplulukları gözlenmiş olup doku kapsülü boyunca tümör hücrelerinin varlığı belirlenmiştir. (Şekil4.9b). Tümör ve 25mg/kg curcumin uygulanan grupta tümör kontrol grubunda olduğu gibi EAT hücrelerinin kümelenmediği gözlenmiştir. (Şekil 4.9c) Tümör ve 50mg/kg curcumin ve uygulama grubunda, organ kapsülünde belirgin EAT hücresi yoktu. (Şekil 4.9d)



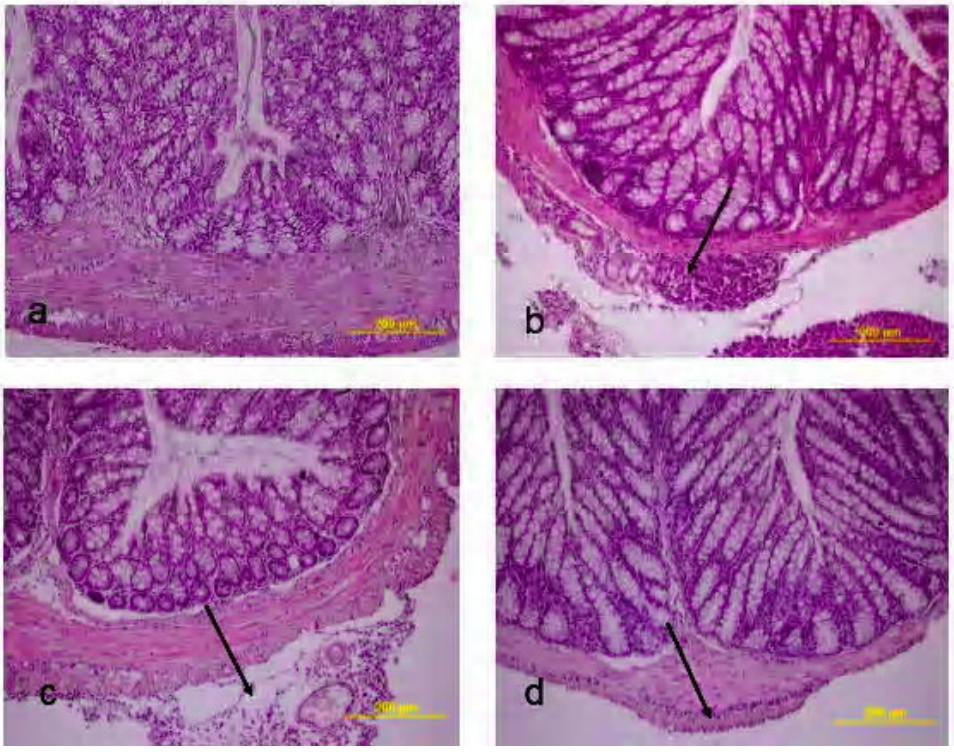
Şekil 4.9. Dalak dokusu sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarında (histopatolojik) bulgular (H&E, 20X). **a)** Sağlıklı kontrol grubu **b)** Tümör kontrol grubu **c)** Tümör ve 25mg/kg curcumin uygulanan grup **d)** Tümör 50mg/kg curcumin uygulanan grup.



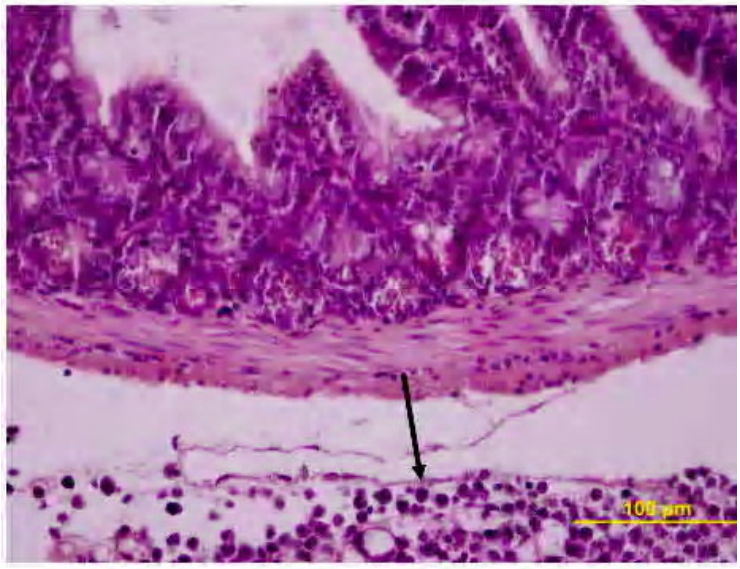
Şekil 4.10. Tümör kontrol grubunda dalak dokusunun kapsülünde oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. (H&E 40X). ok=dalak dokusunun kapsülüne invaze EAT hücrelerini göstermektedir

4.2.5. Kalın Bağırsak Dokusu

Mevcut çalışmada, histopatolojik değerlendirme için deney sonunda kalın bağırsağın proksimal, orta hat ve distal bölgesinden olacak şekilde farklı bölgelerinden dokular alınmıştır (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12) Kalın bağırsak dokusuna ait bütün bölümlerde sağlıklı kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde, organın tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muscularis ve tunika seroza normal histolojik özellik göstermekteydi (Şekil 4.11a). Tümör kontrol grubunda kalın bağırsak dokusunda en dış tabakası olan tunika seroza'ya invaze olmuş değişik yoğunlukta tümör hücrelerinin varlığı saptanmıştır (Şekil 4.11b). Tümör ve 25 mg/kg curcumin uygulanan grupta, incelenen dokularda histopatolojik bulgular tümör kontrol grubu ile aynı bulguları göstermiştir. Bu grupta tümör kontrol grubuna benzer şekilde fakat daha az oranda anormal hücre yığınlarının tunika seroza'ya invaze olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11c). Tümör ve 50 mg/kg curcumin uygulanan gruptan alınan dokularda 25 mg/kg curcumin uygulanan gruba göre tunika seroza'da daha az EAT hücresinin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11d).



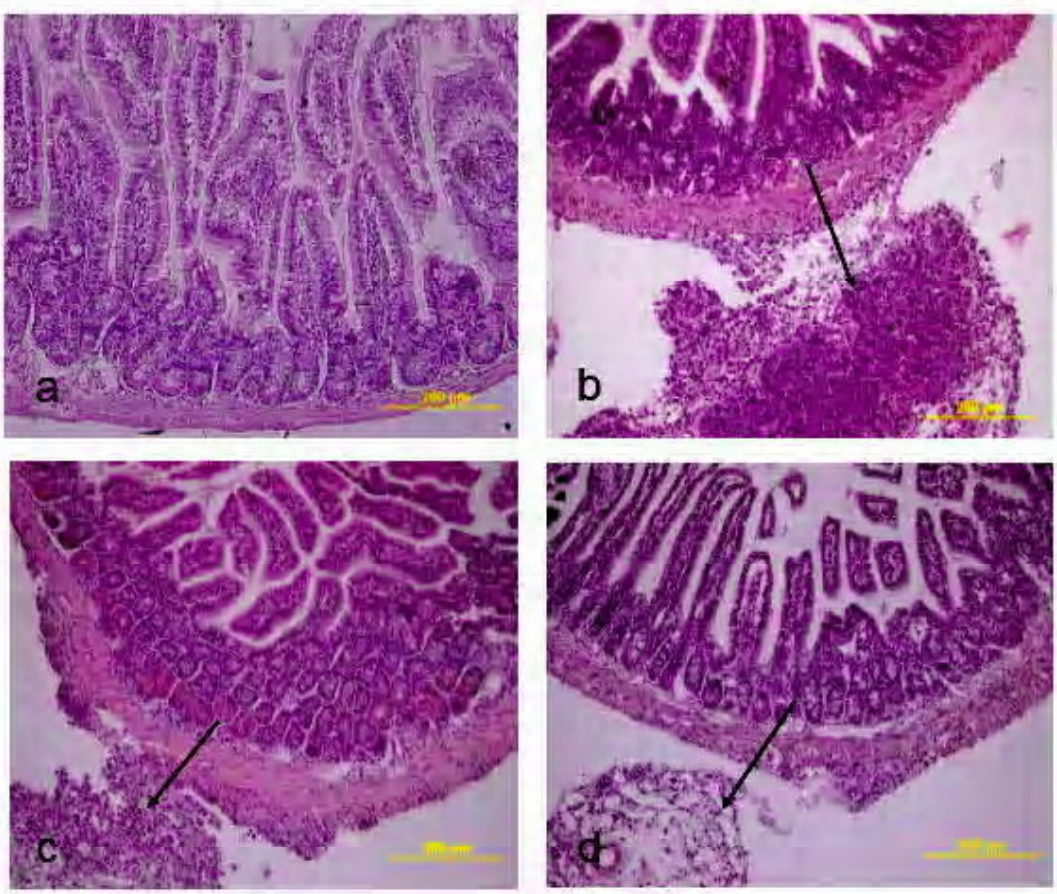
Şekil 4.11. Kalın bağırsak dokusunun orta hattından alınan sağlıklı kontrol (histolojik) ve tedavi gruplarının (histopatolojik) bulguları (H&E, 20X). **a)** Sağlıklı kontrol grubu **b)** Tümör kontrol grubu **c)** Tümör ve 25 mg/kg curcumin uygulanan grup **d)** Tümör ve 50 mg/kg curcumin uygulanan grup.



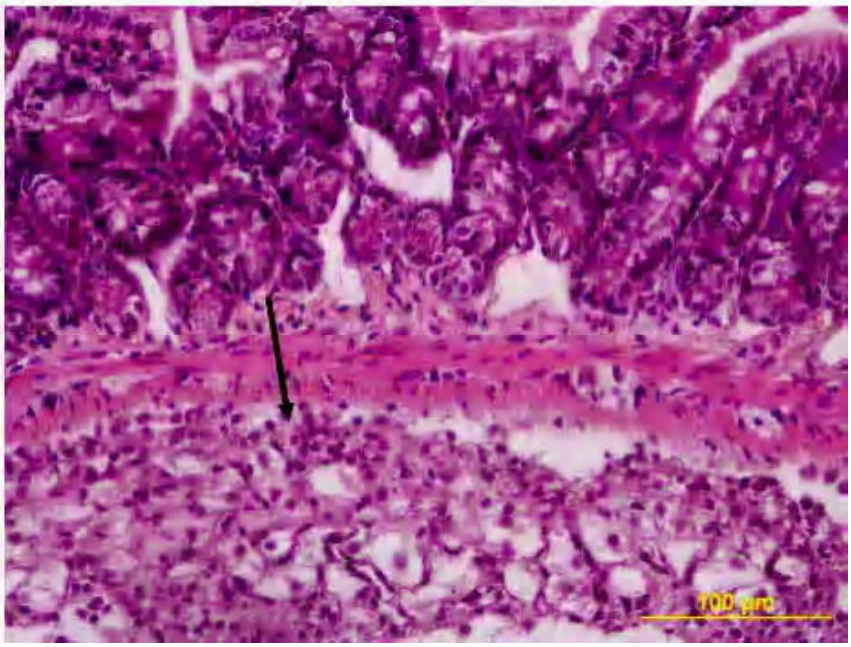
Şekil 4.12. Kalın bağırsak dokusunun orta hattından 25mg/kg curcumin verilen tedavi grubundan alınan kesitteki dokunun tunika seroza tabakasında oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. (H&E 40X). ok=Kalın bağırsak dokusunda görülen EAT hücrelerini göstermektedir.

4.2.6. İnce bağırsak dokusu

Yapılan çalışmada, histopatolojik değerlendirme için deney sonunda ince bağırsağın proksimal, orta hat ve distal bölgesinden olacak şekilde farklı bölgelerinden dokular alındı (Şekil 4.13, Şekil.4.14). Sağlıklı deney grubunda normal histolojik bulgular gözlendi (Şekil 4.13a). Tümör kontrol grubunda villusların lümene doğru uzantıları bozulmuş ve dokuda tunika seroza etrafında EAT hücrelerinin yoğun bir şekilde kümeleşme özelliği gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum ince bağırsak dokusunun proksimal, orta hat ve distal bölümünden alınan dokularda da gözlenmiştir (Şekil 4.13b). Tümör ve 25mg/kg curcumin ve verilen grupta tümör kontrol grubu ile aynı histopatolojik bulgular belirlenmiştir (Şekil 4.13c). Tümör ve 50mg/kg curcumin verilen gruptan alınan dokular ile tümör kontrol grubuna ait ince bağırsak proksimal, orta hat ve distal bölgede gözlemlenen histopatolojik bulgular benzer olarak gözlenmiştir. Bu gruba ait dokularda tunika serozayı oluşturan gevşek bağ dokusu içinde tek tek invaze EAT hücrelerinin varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.13d).



Şekil 4.13. İnce bağırsak dokusunun proksimal bölümüne ait sağlıklı kontrol (histolojik), tümör kontrol ve tedavi gruplarının (histopatolojik) bulguları (H&E, 20X). **a)** Sağlıklı deney grubu. **b)** Tümör kontrol grubu **c)** Tümör ve 25mg/kg curcumin verilen grup **d)** Tümör ve 50mg/kg curcumin verilen grup.



Şekil 4.14. 25mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda ince bağırsak dokusundaki histopatolojik bulgular. Proksimal hattan alınan kesitteki dokunun tunika seroza tabakasında oluşan EAT hücrelerinin görüntüsü. (H&E 40X). ok=İncebağırsak dokusunda görülen EAT hücrelerini göstermektedir.

4.3. Curcumin ekstraktının in vivo sitotoksisitesi

Deney sonunda gruplardan intraperitoneal sıvı alınarak tripan mavisi ile boyandı ve 1 ml'deki EAT hücreleri sayılarak hesaplandı. Deney sonrasında tümör kontrol grubundan 10 adet hayvandan intraperitoneal sıvı elde edilirken, tedavi gruplarından 25mg/kg curcumin verilen gruptan 6 hayvandan, 50mg/kg curcumin verilen gruptan ise 4 hayvandan intraperitoneal sıvı elde edildi. Alınan bu sıvılardaki EAT hücreleri sayılarak aritmetik ortalaması Tablo 4.3'de verilmiştir. Deneyimizde tedavi gruplarında daha az hayvandan intraperitoneal sıvı alındığı için kontrol grubu ile istatistiksel bir karşılaştırma yapılamadı.

Tablo 4.3. Deney gruplarında EAT hücrelerinin ortalama sayısı

Grup No	**Ortalama Canlı Hücre Sayısı (ml)**
Sağlıklı kontrol grubu n=10	-
Tümör kontrol grubu n=10	54.40×10^6
Tümör ve 25mg/kg curcumin grubu n=6	37.66×10^6
Tümör ve 50mg/kg curcumin grubu n=4	30.40×10^6

4.4. Deney süresince solid tümör gruplarının vücut ağırlık değişimleri

Deneysel çalışmanın başlangıcında ense bölgelerinden subkutan yolla $1x10^6$ EAT hücresi bulunan 0.1 ml assit sıvısı enjekte edilen farelerde, 5.günde tümör kitlesi elle palpe edilebilir boyuta ulaşmıştı. 7. günde tümör hacmi ölçülebilir boyuta gelmişti. 15. günün sonunda deney grubundaki farelerde tümör dokularının farklı boyutlarda olduğu gözlendi (Resim 4.3). 15 günlük deney süresince kontrol ve tedavi gruplarındaki hayvanların ortalama vücut ağırlıkları ölçüldü ve değerler Tablo 4.4'de verilmektedir. Tümör hücresi verilen kontrol grubunun ilk gün ortalama ağırlığı 28.84g olarak ölçülürken, son gün kontrol grubunun ortalama ağırlığı 37.17 g olmuştur. Tedavi grubundan biri olan 25 mg/kg curcumin grubunun ilk gün ortalama ağırlığı 29.34 g, son gün tedavi grubunun ortalama ağırlığı 33.01 g olarak ölçülmüştür. Diğer tedavi grubu 50mg/kg curcumin uygulanan grupta ise ilk gün ortalama ağırlık 28.35 g, son gün ortalama ağırlığı ise 32.98 g olarak ölçülmüştür (Tablo 4.4). 15 günlük çalışma süresince, hem kontrol hem tedavi grubundaki hayvanların 1. güne göre vücut ağırlığındaki değişimler Tablo 4.5 ' de verilmektedir.

Resim 4.3. Ehrlich solid tümörünün görünümü ve tümör boyutlarının ölçümü (ok=Ehrlich solid tümörü)

Tablo 4.4. Kontrol ve tedavi grubuna ait farelerin vücut ağırlıklarının 1-15 gün aralığında değişimi. Ağırlıklar ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir.

Günler	Negatif Kontrol	Tümör Kontrol	25mg/kg Curcumin	50mg/kg Curcumin
	ORT. ± SS.	**ORT. ± SS.**	**ORT. ± SS.**	**ORT. ± SS.**
1.gün	28.69±3.25	28.84±1.55	29.34±1.54	28.35±1.55
2. gün	29.67±2.37	28.97±1.42	29.29±1.70	28.59±1.65
3. gün	29.63±2.47	29.43±1.34	28.59±1.67	28.01±2.41
4.gün	29.59±1.80	31.37±1.27	28.79±1.66	28.39±2.40
5.gün	30.03±1.58	33.70±1.07	29.83±1.28	29.21±2.31
6.gün	30.32±1.59	34.58±1.16	30.05±0.96	29.49±1.93
7. gün	31.26±1.84	35.31±0.97	30.40±1.12	30.73±1.91
8. gün	31.14±1.71	35.59±0.91	31.16±0.70	30.66±1.67
9. gün	31.57±1.47	35.68±0.74	31.08±0.94	30.84±1.77
10.gün	31.62±1.82	36.31±0.89	31.55±0.52	31.17±1.86
11. gün	32.46±1.68	36.38±0.65	32.24±0,82	32.58±1.85
12. gün	32.89±1.81	36.65±0.76	33.16±0,93	29.92±10.64
13. gün	32.14±1.78	36.15±2.05	32.25±1.02	32.40±1.66
14. gün	32.41±1.54	37.08±0.86	32.70±1.07	32.53±1.65
15. gün	32.52±1.48	37.17±0.90	33.01±1.20	32.98±1.35

Tablo 4.5. Gruplar arasında birinci gün ile diğer günler arasındaki vücut ağırlıklarının ortalama değişimi

Gün	Negatif Kontrol grubu kilogram ± SS (n=10)	Tümör Kontrol grubu kilogram ±SS (n=10)	Tedavi grubu 25mg/kg Curcumin kilogram ± SS (n=10)	Tedavi grubu 50mg/kg Curcumin kilogram ± SS (n=10)
1-2	0.03±0.05	0.04±0.03	-0.02±0.04	0.00±0.03
1-3	0.03±0.05	0.02±0.02	-0.02±0.03	-0.01±006
1-4	0.03±0.06	0.08±0.03	-0.02±0.03	-0.00±0.06
1-5	0.04±0.06	0.14±0.04	0.01±0.03	0.02±0.05
1-6	0.05±0.06	0.16±0.04	0.02±0.04	0.03±0.03
1-7	0.08±0.07	0.18±0.05	0.03±0.07	0.07±0.03
1-8	0.08±0,07	0.18±0.04	0.05±0.04	0.07±0.03
1-9	0.09±0.07	0.19±0.03	0.05±0.03*	0.08±0.03
1-10	0.09±0.07	0.20±0.05	0.07±0.04	0.08±0.03
1-11	0.11±0.06	0.20±0.04	0.08±0.04	0.01±0.04*
1-12	0.12±0.07	0.21±0.04	0.11±0.04	0.13±0.04
1-13	0.10±0.08	0.19±0.08	0.08±0.04	0.12±0.05
1-14	0.11±0.08	0.22±0.03	0.10±0.05	0.12±0.05
1-15	0.11±0.08	0.22±0.03	0.11±0.05	0.13±0.05

Kontrol ile karşılaştırıldığında *$p<0.05$. Yüzde değişimi = (Son gün–İlk gün)/Son gün.

4.4.1. Deney süresince solid tümör gruplarının tümör hacim değişimleri

Kontrol ve tedavi gruplarında tümör büyüklüğü deri yüzeyinden tümör hacminin ölçülebildiği günden itibaren kaydedildi. Tümör kontrol grubunda 7. günden itibaren ölçülmeye başlanırken bu ölçümler tedavi gruplarında 8. günden itibaren ölçülebildi. Tüm hayvanlardaki tümör büyüklüklerinin tamamı kendi aralarında hacimsel olarak karşılaştırıldı ve bu karşılaştırmaya ait bulgular (Tablo 4.6)'da verildi. Her grupta hacim artışı gözlenirken kontrol grubunun ortalama hacmi son gün 4603.99 mm^3, 25mg/kg curcumin verilen tedavi grubunun ortalama hacmi son gün 1179.56 mm^3. 50mg/kg curcumin verilen tedavi grubunun son gün hacmi 2059.12 mm^3 olarak ölçüldü.

Tablo 4.6. Gruplar arası solid tümör hacimlerinin günlere göre karşılaştırılması

Gün	Tümör kontrol Grubu (n=10) Medyan (%25 – 75)	Tedavi Grubu 25mg/kg Curcumin (n= 10) Medyan (%25 – 75)	Tedavi Grubu 50mg/kg Curcumin (n= 10) Medyan (%25 – 75)	*p*
7	60.42(49.29–110.71)	-	-	-
8	212.13(52.11–376.16)	72.54(19.02-354.76	159.98(39.85-195.49)	0.614
9	384.57(253.49-762.10)	138.07(77.79-263.49)	309.62(142.49-482.17)	0.118
10	1127.99(345.56-2156.91)	388.91(282.76-415.76)*	604.96(195.70-875.25)*	0.011
11	1763.52(514.33–2574.21)	478.30(335.68-677.29)*	1379.30(497.122451.48)*	0.008
12	1746.88 (494.36–3161.91)	606.99(341.79-773.41)*	1162.43(462.502303.32)*	0.008
13	2728.83(1363.49–3881.40)	810.26(477.03-1323.69)*	1857.10(639.812447.20)*	0.008
14	4086.90(2093.69–8049.06)	969.56(579.21-1669.80)*	2112.84(859.812864.16)*	0.006
15	4603.99(3196.06–8049.06)	1179.56(607.81-1910.22)*	2059.12(855.162059.12)*	0.006

Kontrol ile karşılaştırıldığında *p<0.05.

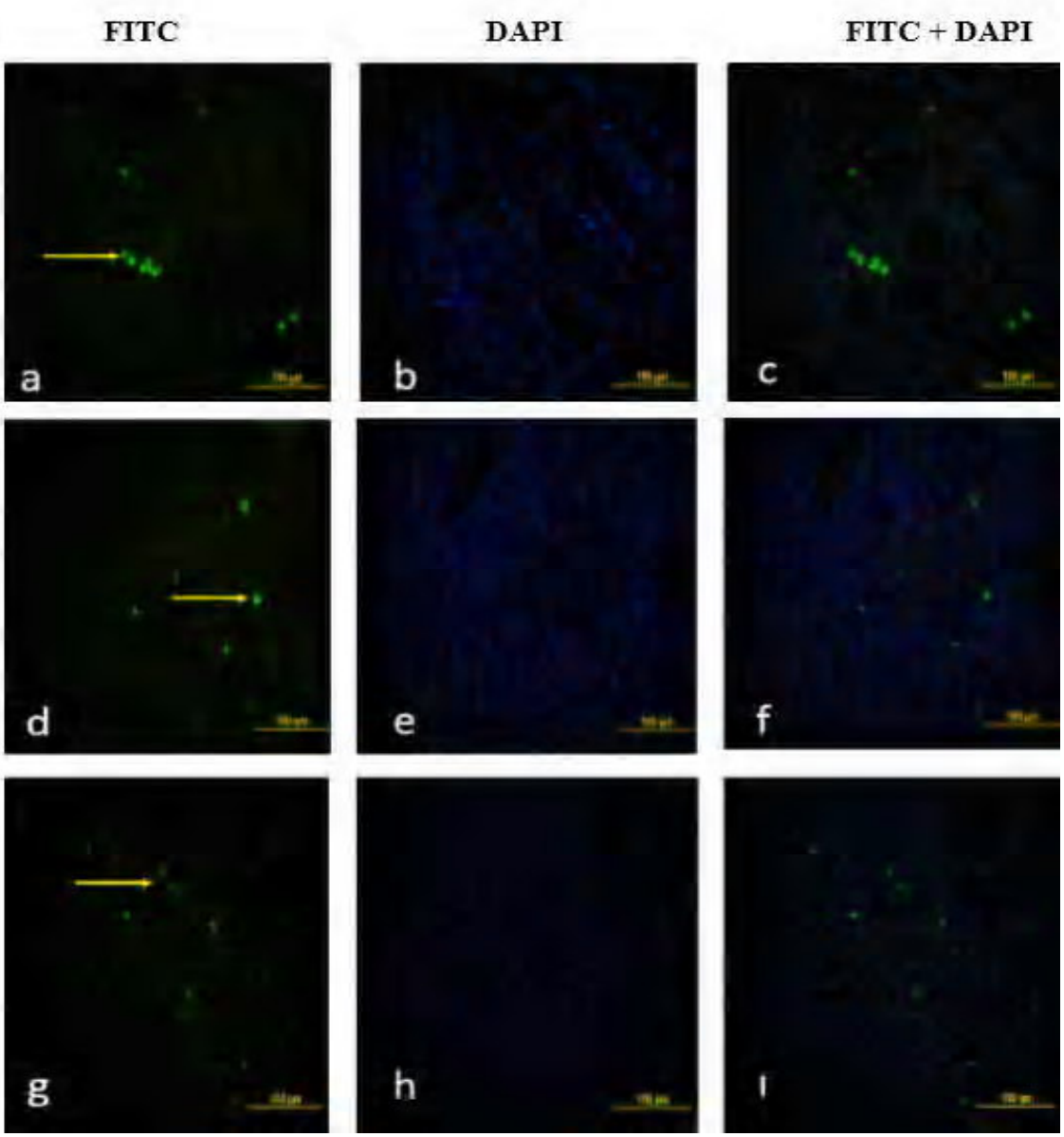
4.5. Apoptotik Bulgular

Çalışmada, apoptotik hücreler TUNEL metodu ile belirlendi ve TUNEL pozitif hücreler yeşil flouresan yansıma ile gösterildi. Deney gruplarından elde edilen solid tümör doku kesitleri incelendiğinde, apoptotik hücrelerin tümör dokusunun geneline dağıldığı gözlendi (Şekil 4.15). Kesitlerden alınan fotoğraflar üzerinde yapılan sayım sonrasında istatistiksel analiz sonuçlarına göre apoptotik hücre sayısı kontrol grubunda 5.455±3.23 iken 25 mg/kg curcumin verilen tedavi grubunda 6.575±6.57, diğer tedavi grubu olan 50 mg/kg curcumin grubunda 7.775±4.72 olarak bulundu (Tablo 4.7). Elde edilen sonuçlara göre, tedavi gruplarının her ikisinde de apoptotik hücre sayısında belirgin bir artış gözlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlendi (p <0.05).

Tablo 4.7. Gruplar arası apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması

	Tümör Kontrol grubu	Tedavi 25 mg/kg Curcumin	Tedavi 50 mg/kg Curcumin
Tunel Pozitif Hücre sayısı (n=120)	5.455±3.23	6.575±6.57*	7.775±4.72*
Min–max değeri	0-15	0-22	0-21

Kontrol ile karşılaştırıldığında *p<0.05. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.



Şekil 4.15. Deney gruplarına ait apoptotik hücreler **a-c)** Kontrol grubuna ait apoptotik hücreler **d-f)** Tedavi grubuna (25mg/kg curcumin) ait apoptotik hücreleri **g-ı)** Tedavi grubuna (50mg/kg curcumin) ait apoptotik hücreler. Ok=apoptotik hücreler. Ölçek çubuğu=100µm

4.6. Anjiogenezis Bulguları

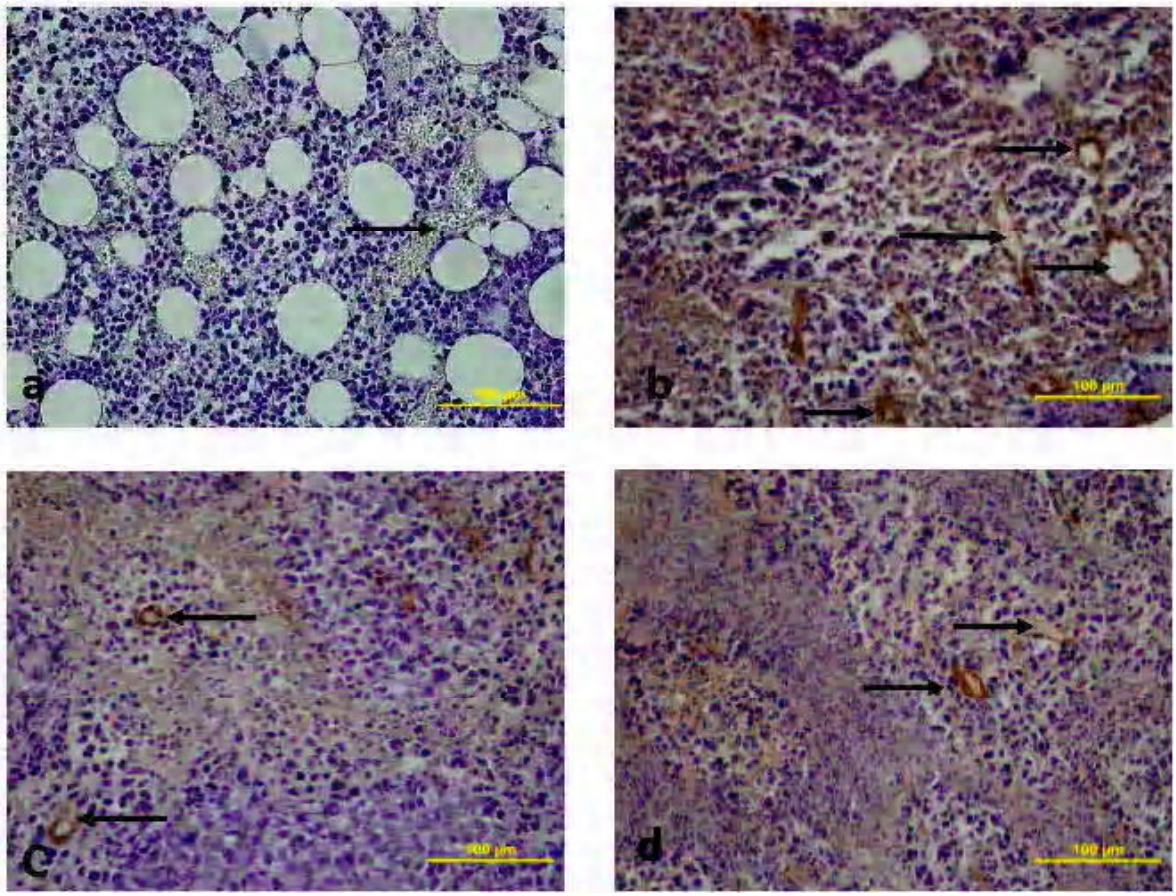
Deney sonunda, kontrol ve tedavi gruplarında oluşturulan tümör dokularından alınan kesitlerde Faktör VIII ekspresyonunun belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı. Gruplara ait dokulardan elde edilen kesitlerde Faktör VIII ile belirlenen ortalama damar yoğunluğu Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Faktör VIII için yapılan immunohistokimyasal boyama ile kontrol ve tedavi gruplarına ait kesitlerdeki damar endotel hücrelerinde pozitif boyanma gözlendi (Şekil 4.16). Tümör dokusuna ait

nekrotik bölgeler değerlendirmeye alınmadı. Gruplar arasındaki damar yoğunluğuna bakıldığında kontrol grubunda ortalama damar yoğunluğu 6.033 olarak hesaplanırken, tedavi gruplarından 25mg/kg curcumin uygulanan grupta ortalama damar yoğunluğu 3.000, 50mg/kg curcumin uygulanan grupta ise 1.866 olarak hesaplandı. Gruplar Faktör VIII ekspresyon yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlendi ($p<0.05$). (Tablo 4.8).Negatif kontrol olarak boyanan kesitte Faktör VIII immunoreaktivitesi gözlenmedi.

Tablo 4.8. Faktör VIII'in damar yoğunluğunun deney grupları arası karşılaştırılması

	Tümör Kontrol	**Tedavi 25 mg/kg**	**Tedavi 50 mg/kg**
Damar yoğunluğu (F8) (n=30)	6.033±2.14	3.000±2.05*	1.866±1.45*
Min–max değeri	2-11	0-8	0-5

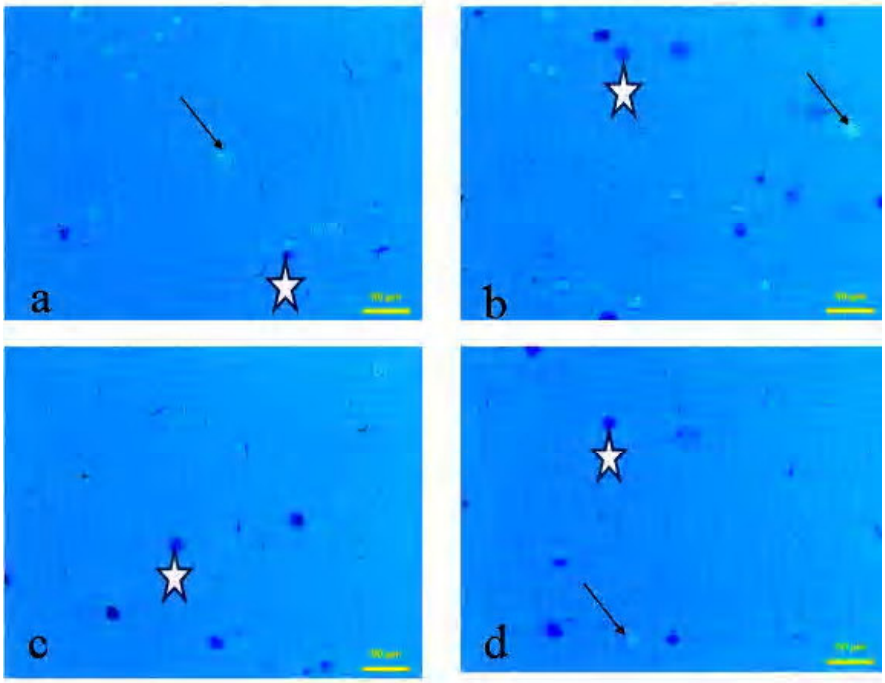
Kontrol ile karşılaştırıldığında *$p<0.05$. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.



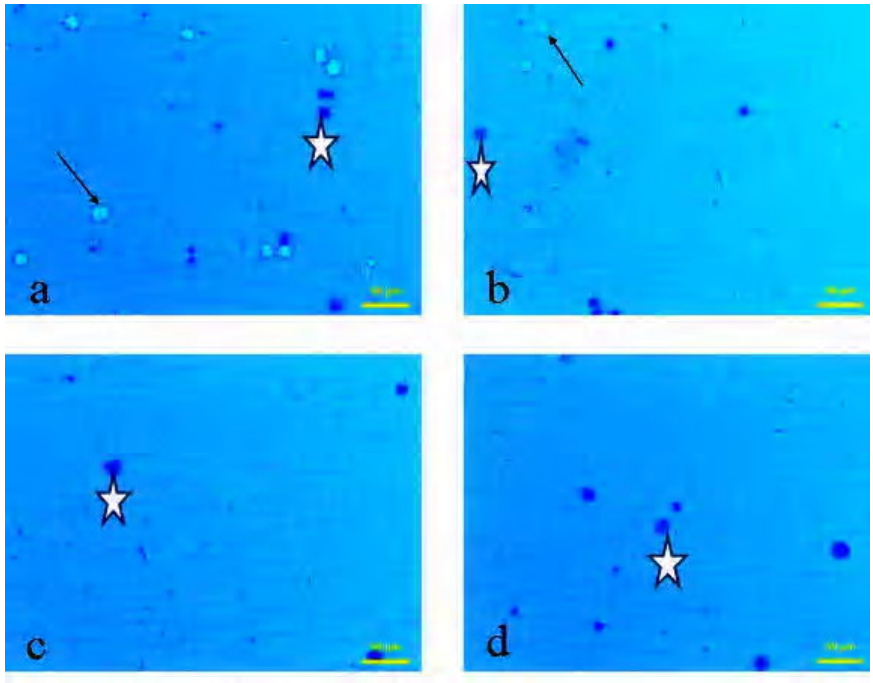
Şekil 4.16. Deney gruplarına ait damar yoğunlukları **a)** Negatif kontrol grubu, **b)**Tümör kontrol grubu, **c)**Tedavi grubu 25mg/kg curcumin **d)** Tedavi grubu 50mg/kg curcumin damar endotelinde Faktör VIII'in ekspresyonu (ok= Faktör VIII pozitif kapiller). 40X. Ölçek çubuğu =100µm.

4.7. EAT hücreleri üzerine uygulanan curcumin ekstraktının invitro etkisi

Deneyde 10µg/ml, 20µg/ml ve 30µg/ml olarak hesaplanan curcumin dozları kullanıldı. EAT hücreleri üzerine eklenen curcumin dozlarının 3 ve 24 saatlik inkübatörde bekletilme süresi sonrasında hücre sayımı bulguları değerlendirildi. Yapılan *in vitro* deney sonrasında gruplarda hesaplanan canlı ve ölü hücre sayıları ortalama değer ve standart sapma olarak aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 4.9). EAT hücreleri sayımı sonrasında canlı ve ölü hücreler görüntülendi Şekil 4.17 ve Şekil 4.18.



Şekil 4.17. *In vitro* deney gruplarında 3 saatlik canlı ve ölü EAT hücrelerinin thoma lamı üzerindeki görüntüleri. **Ok**=Canlı EAT Hücreleri, **yıldız**=Ölü EAT Hücreleri. **a)** Tümör kontrol grubu EAT hücrelerinin görüntüleri. **b)** 10µg/ml curcumin uygulanan EAT hücreleri. **c)** 20µg/ml curcumin uygulanan EAT hücreleri. **d)** 30µg/ml curcumin uygulanan EAT hücrelerinin görüntüsü. 20X. Ölçek çubuğu =50µm.



Şekil 4.18. *In vitro* deney gruplarında 24 saatlik canlı ve ölü EAT hücrelerinin thoma lamı üzerindeki görüntüleri. **Ok**=Canlı EAT hücreleri, **yıldız**=Ölü EAT hücreleri. **a)** Tümör kontrol grubu EAT hücrelerinin görüntüleri. **b)** 10µg/ml curcumin uygulanan EAT hücreleri. **c)** 20µg/ml curcumin uygulanan EAT hücreleri. **d)** 30µg/ml curcumin uygulanan EAT hücrelerinin görüntüsü. 20X. Ölçek çubuğu =50µm.

Tablo 4.9. *In vitro* deney gruplarında hesaplanan ortalama canlı ve ölü hücre değerleri

	Tümör Kontrol ort hücre sayısı ± SS	**Tedavi 10µg/ml curcumin ort hücre sayısı±SS**	**Tedavi 20 µg/ml curcumin ort hücre sayısı±SS**	**Tedavi 30µg/ml curcumin ort hücre sayısı±SS**
Canlıhücre (3saatlik)	5.79±0.20	5.81±1.16	5.70±0.15	5.73±0.16
Ölü hücre (3saatlik)	5.63±0.19	5.79±0.20	5.62±0.19	5.69±0.20
Canlıhücre (24saatlik)	5.69±0.19	5.60±0.16	5.64±0.15	5.50±0.15
Ölü hücre (24saatlik)	3.98±2.43	4.66±1.80	3.84±2.06	3.91±2.30

Üç saatlik sayım sonrasında tümör kontrol ve tadavi grupları arasında yapılan canlı ve ölü hücre sayımında pozitif kontrol ve 10µg/ml curcumin ($p<0.025$) ile 10µg/ml ile 20µg/ml curcumin ($p<0.037$) verilen gruplar arasında yapılan sayım istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *In vitro* deney gruplarında 24 saat süre ile inkübatörde bekletilen gruplar arasında yapılan canlı ve ölü EAT hücreleri sayımında 30µg/ml curcumin ile 10µg/ml ($p<0,08$), 30µg/ml curcumin ile 20µg/ml curcumin ve pozitif kontrol ile 30µg/ml curcumin grubu arasında yapılan sayım istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, tümörleri oluşturan hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ve hızla yayılması ile karakterize edilen ve çoğunlukla çevre dokulara yayılması nedeniyle ölümle sonuçlanan bir hastalıktır (5). Ölümlere neden olan kanser türlerinin erkeklerde ve kadınlarda görülme sıklığı farklılıklar göstermektedir. Akciğer kanserleri her iki cinste, prostat kanseri erkeklerde, meme kanseri ise kadınlarda sık görülen ve zaman zaman ölümle sonuçlanan kanser türleridir (102,103). Kanser hastalarına genel olarak bakıldığında erişkin hastalarda kanser vakalarında hayatta kalma oranı 1960'larda %39 iken 1990'larda bu oran %60'a yükselmiştir. Kanser olgularında yıllar içerisinde hayatta kalma oranındaki artışın sebebi kanser tedavilerinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin hastalara birlikte uygulanması olarak ifade edilmektedir. Hastalara uygulanan cerrahi girişimdeki amaç vücutta kontrolsüz bir şekilde oluşan tümörlü dokunun uzaklaştırılması diğer uygulanan tedavilerde amaç ise kanser hücrelerinin öldürülerek yok edilmesidir (21,104,105). Son yıllarda kanser tedavisinde yukarıda belirtilen tedavilere ek olarak tamamlayıcı tıptan da faydalanılmaktadır. Bazı bitkilerin kanser tedavisinde faydalı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Çeşitli ülkelerde halk tarafından kullanılan bitkiler, sebzeler, kanser kemoterapisinin ilerlemesine ışık tutmuştur (106). Bu bitkilerden bazılarının ihtiva ettiği doğal kimyasalların (kırmızı üzümdeki resveratrol, soyadaki genistein ve zerdeçaldaki curcumin gibi) kanseri önleyici özellikleri olduğunu göstermiştir (20).

Zerdeçal (curcuma longa, turmerik, Hint safranı), Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen zencefil ailesine ait sarıçiçekli, büyük yapraklı ve yumrulu bir bitkidir. Zerdeçal kullanımı çeşitli hastalıklar için tedavi edici bir ajan olarak etkili olduğu

bulunduğundan bu yana, curcumin ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Curcumin daha önce Hint tıbbında deri hastalıkları tedavisinde kullanılmıştır. Anti inflamatuvar ve antimikrobiyal ajan olarak kullanımı Çin'de ve Hindistan'da yaygındır (107,108). Curcumin ve kanser ile ilgili yapılan çalışmalarda curcuminin kanser hücrelerinin ölümünü hızlandırdığı ve tümör hücrelerinin bölünmesini durdurduğu bilinmektedir (109). Curcuminin kanser hücreleri üzerindeki anti kanserojen özelliği bu bitki ile ilgili araştırmaları artırmış ve değişik kanser modeli üzerinde denenmesine sebep olmuştur (8,21).

Günümüzde kanser üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların amacı kanser biyolojisini ortaya koyup, tedavi yollarını bulmak ve geliştirmek için yapılmaktadır. Kanser üzerinde yapılan çalışmalarda geliştirilmiş kanser modelleri ve tümörlerden elde edilen hücre hatları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu modellerden biri de EAT modelidir. EAT deneysel olarak oluşturulan hayvan tümörlerinden biri olmakla beraber pek çok araştırmaya konu olmuştur. İlk defa dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak gelişmiş olan EAT Ehrlich ve Apolant (1905) tarafından tümör hücreleri fareden fareye subkutan transplante edilerek deneysel tümör modellerinde kullanılır hale getirilmiştir (59,60). EAT ile ilgili çalışmaların bir kısmı kanser dokuları üzerine etkisi olabilecek tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin değerlendirilmesine yönelik çalışmalardır (12).

Birçok deneysel kanser modeli üzerine bazı bitkilerin ve şifalı otların kanser hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında bu bitkiler içerisinde curcumin olası anti kanserojen etki bakımından ümit vaad eden bir bitkidir. Farklı kanser modellerinde curcumin ekstraktının farklı dozlardaki etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Kanter ve ark. (110) gamma radyasyona bağlı oluşan jejenum mukoza hasarına karşı curcumin ve amifostinn koruyucu etkilerini araştırmışlardır ve yüksek doz radyasyonda curcumin'in etkinliğinin azaldığını belirtmişlerdir. Lopez (111) çalışmasında 20µg/ mL dozda curcuminin K-562 insan kronik miyelojen lösemi hücrelerinde büyümeyi %50 oranında durduğunu göstermişlerdir Pan ve ark. (112) Farelerde Alzheimer modeli oluşturarak curcumin'in tedavi edici etkisi üzerinde çalışmışlardır. Hipokampusları incelenen farelerde Bax seviyelerinin değişmediğini çalışmalarında belirtmişlerdir Yu-Wen ve ark. (113) farelerde deneysel olarak oluşturulmuş akut pankreatit olgusunda curcuminin önleyici

etkisini araştırmışlar ve 6 gün boyunca 50mg/kg/gün olarak intraperitoneal curcumin enjeksiyonu yapmışlardır. Deney sonrasında pankreastaki hasarın azaldığını ve serum amylase seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Ueki ve ark. (114) cisplatin ile uyarılmış renal inflamasyonu olan farelerdeki curcuminin düzenleyici etkisini araştırmışlar, cisplatin ile birlikte curcumin (100mg/kg) verdikleri grupta serum TNF konsantrasyonunun %30 azaldığını, sadece curcumin (50mg/kg) verdikleri grupta ise serum TNF düzeyinin %10 olarak belirlediklerini ve renal fonksiyonların bozukluğunda azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bhaumik ve ark. (56) çalışmalarında AK-5 tümör hücreleri üzerine curcumin etkileri araştırılmış kontrol grubunun hepsinde peritoneal bölgede gözle görülür bir şişkinlik meydana geldiği ve 10. günün sonunda deney grubunda %90 ölüm olduğu bildirilmiştir. Curcumin verilen grupta ise peritoneal şişkinlik oranının %80 olarak belirlendiği ve gruptaki hayvanlar 40. günden sonraya kadar hayatta kaldıkları bildirilmiştir. Curcumin 10µM konsantrasyonda apopitozu 4. saat sonunda %40, 18'inci saat sonunda %100 olarak artırdığını çalışmalarında belirtmişlerdir.

Pan ve ark. (44) çalışmalarında farelerde curcuminin biyotransformasyonuna bakmışlar ve curcumin dozunu farelere 0.1 gr/kg intraperitoneal olarak Limtrakul ve ark. (51) yapmış oldukları çalışmalarında curcumini farelere oral olarak vermişlerdir. Bunun için farelerin yemlerine 115 mg/kg/gün dozunda curcumin ekleyerek 3 ay süre ile farelere curcumin dozunu günlük olarak vermişlerdir. 3 aylık süre sonrasında curcumin dozunun toksik değerlere ulaşmadığını ve farelerde oluşan kanserli hücrelerde apopitozisi indüklediğini çalışmalarında belirtmişlerdir Aktaş ve ark. (115) dişi farelerde iyonize radyasyona maruz bırakmadan önce 10 gün boyunca farelerin diyetlerine 100mg/kg curcumin eklemişler ve deney sonunda radyasyona bağlı ovaryum foliküllerinde curcuminin foliküler atreziyi engellediğini rapor etmişlerdir Srimal ve ark. (116) ratlarda yapmış oldukları curcuminin antiiflamatuar etkisinin araştırmışlar ve oral olarak verilen curcuminin (160mg/kg) inflamasyonun gerilemesinde etkili olduğunu belirtmişlerdir Zunino ve ark. (117) yapmış oldukları lenfoblastik lösemide oral ve parenteral curcuminin 4 farklı dozunu (5, 10, 25, 50mg/kg) çalışmışlar ve lösemide 10 ve 25mg/kg curcumin dozunu etkin bulmuşlardır.

Yukarıda belirtilen çalışmalarda 10 ile 160mg/kg dozlarındaki curcuminin oral, intraperitoneal ve parenteral yollarla uygulandığında genel olarak kanserli dokularda

etkin olduğu rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada EAT hücreleri intrapritoneal verilerek assit tümör, subkutan verilerek solid tümör grupları oluşturulmuş ve curcuminin literatürde belirtilen doz sınırları içinde 25mg/kg/gün ve 50mg/kg/gün dozları intraperitoneal enjekte edilerek EAT hücreleri üzerindeki antimetastatik etkileri araştırılmıştır. In vitro çalışmalar için ise 10µg/ml, 20µg/ml ve 30µg/ml curcumin dozları kullanılmıştır.

Ceylan'ın (118) yapmış olduğu çalışmada EAT hücreleri ile farelerde oluşturulan deneysel kanser üzerine gilaburu *(Viburnum opulus)* meyve suyunun etkilerini araştırmış ve tümör kontrol grupta karaciğer ve böbrek dokusunda EAT hücrelerinin metastas yaptığını, tedavi gruplarında da metastas olduğunu ancak EAT hücre topluluklarının doku kapsülü etrafında tümör kontrol grubu kadar yoğun olmadığını rapor etmiştir. Facchini ve ark. (119) yapmış oldukları çalışmalarında *Pleurotus ostreatus*'a ait (mantar türü) polisakkarit fraksiyonlarının etkilerini intraperitoneal olarak $5x10^6$ EAT hücresi verilmiş farelerde araştırmışlar ve yüksek derecede tümör inhibisyonu olduğunu çalışmalarında belirtmişlerdir Hanafy (120) çalışmasında EAT hücreleri enjekte edilmiş farelerde Ginger bitkisinin koruyucu etkisini araştırmışlar ve yapmış oldukları çalışmada hayvanlara intraperitoneal yolla EAT hücreleri ($2,5x10^6$ hücre) enjekte etmişlerdir ve çalışmış oldukları bitkinin kanseri önlemede ve tedavisinde etkin olabileceğini vurgulamışlardır. Patra ve ark. (121) *Sargassum tenerrimum* isimli bitkinin intraperitoneal olarak EAT hücresi ($2x10^6$ hücre) verilen farelerdeki antitümör ve antioksidan etkisini incelemişler ve hayvanların hayatta kalma süresinin uzadığını çalışmalarında belirtmişlerdir Özaslan ve ark. (122) Ehrlich ascites tümör uygulanmış balb/c türü farelerde *Plantago majör* bitkisinin antitümöral etkisini in vivo olarak araştırmışlar ve $1x10^6$ EAT hücresini intraperitoneal olarak deney gruplarına uygulamışlardır. Plantago majör bitkisinin EAT hücre sayısını azalttığını çalışmalarında bildirmişlerdir. Raju ve ark. (106) benzer bir çalışmada EAT taşıyan farelerde *Drosera burmannii vahl.* bitkisinin etanol ve sulu ekstrelerinin antitümör aktivitesine bakmışlar, çalışmalarında 14 gün boyunca tedavi uygulamışlar çalışma boyunca hayvan ağırlıklarında intraperitoneal hücre artışına bağlı olarak artış olduğunu bildirmişlerdir. Normal grupta hayvan ağırlığını 21.73g olarak belirlerken tümör kontrol grubunda 39.1g, tedavi gruplarında ise 23.45g, 22.83g ve 24.85 g olarak ölçmüşler.

Yukarıda verilen çalışmalardan anlaşılacağı üzere EAT modeli bitki ekstraktları, bitkilerden izole edilmiş fragment, bileşik ve ajanların *in vivo* ortamda antitümöral etkisinin çalışılabileceği uygun bir modeldir. Bu modelde periton içine enjekte edilen EAT hücrelerinin sayısı literatürde $1x10^6$ ile $5x10^6$ arasında değişmektedir. EAT hücreleri hızlı çoğalan bir hücre grubu olduğundan curcuminin EAT hücreleri üzerine etkilerini in vivo olarak daha uzun bir süre gözlemleyebilmek için çalışmamızda düşük hücre sayısı ($1x10^6$ EAT hücresi) deney gruplarına enjekte edilmiştir. Intraperitoneal EAT hücresi verilen gruplarda tümör kontrol ve tedavi gruplarında hayvan ağırlıklarında sağlıklı kontrollere göre bir artış gözlemlendi. Bu artışın sebebinin intraperitoneal alanda EAT hücrelerindeki artışa bağlı olduğu düşünüldü. Tümör kontrol grubuna göre 25mg/kg ve 50mg/kg curcumin uygulanan gruplarda kilo artışının daha az olduğu belirlendi. Deney sonu (10. gün) hayvanların ortalama ağılığı sağlıklı kontrollerde 31.35g, tümör kontrol grubunda 50.30g, 25mg/kg curcumin verilen grupta 42.02g ve 50 mg/kg curcumin verilen grupta ise 40.40g olarak bulundu.

Yaptığımız çalışmada EAT hücrelerini intraperitoneal olarak verdiğimiz tümör pozitif ve tedavi gruplarından aldığımız böbrek, karaciğer, dalak mide, ince ve kalın bağırsak dokularında yapmış olduğumuz histopatolojik incelemede literatürde de belirtildiği gibi tümör kontrol grubunda doku etrafında ya da kapsül etrafında invaze iri hiperkromatik nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı farklı şekillerdeki EAT hücreleri toplulukları gözlemledik. EAT ile birlikte curcumin dozları uyguladığımız gruplarda ise yüksek doz verdiğimiz (50mg/kg curcumin) doku etrafında EAT hücreleri tümör kontrol grubundaki kadar yoğun değildi hatta bazı dokularda neredeyse yok denecek kadar az EAT hücresi gözlemledik. Bu grupta dokuların yapıları normal histolojik özellikler sergilemekteydi. 25mg/kg curcumin verdiğimiz grupta ise diğer tedavi grubuna oranlar daha fazla EAT hücresini doku kapsülünde gözlemledik. Curcuminin in vivo sitotoksisitesine baktığımızda ise tümör kontrol grupla karşılaştırdığımızda hücre sayısının tümör kontrol gruptan daha az olduğunu gözlemledik.

Zeybek ve ark. Joseph ve ark. Ekinci ve ark. (57,123,124) yapılan çalışmalarda $1x10^6$ EAT hücre süspansiyonunun konak farenin derialtına enjekte edildiğinde bir haftalık süre sonunda ölçülebilecek düzeyde solid tümör oluştuğunu bildirilmiş Ekinci ve ark. Önder ve ark. (124,125) çalışmalarında tümör dokusunun boyutlarının hayvanlarda eşit olmadığını belirtmişlerdir çalışmamızda subkutan Ehrlich tümör oluşturulan deney

gruplarına ait hayvanların ağırlıkları 15 günlük deney sonunda tümör kontrol grubunda 9 g, tedavi gruplarında ise ortalama 4 g artmış olduğu belirlendi. Son gün ortalama tümör hacmi, tümör kontrol grubunda 4603.99mm^3, 25mg/kg curcumin uygulanan tedavi grubunda 1179.56mm^3, 50mg/kg curcumin uygulanan diğer tedavi grubunda ise 2059.12mm^3 olarak ölçüldü. Çalışmamızda tümör dokusunda aktif ve nekrotik alanların varlığı lobüllü yapı şeklinde gözlendi. Lobül yapılarının merkezi kısımlarında nekrotik hücrelerin, periferik kısımlarında ise mitoz gösteren hücrelerin miktarca fazla olduğu gözlendi, tümör kitlesinde bu alanların görülmesi, tümörün hızlı büyümesine rağmen bu büyüme hızına damarlanmanın eşlik edemediğini ve tümör de hücre ölümlerinin ortaya çıkabildiğini göstermektedir.

Apoptoz, hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma ile hücre ölümünü kontrol eden, hücrenin intiharı olarak tanımlanır (70,71). Curcuminin apopitozu indükleyici etkisi araştırıcılar tarafından değişik kanser hücre hatlarında çalışılmıştır. Choudri ve ekibinin (126) curcumin uygulanan akciğer kanseri hücre hatlarında 24 ve 48 saatlik (10µM ve 25µM) tedavisi sonrasında apoptozun arttığını rapor etmişlerdir Odot ve ark. (127) B16 melanom hücrelerine karşı curcuminin *in vitro* olarak antitümöral etkisine bakmışlar ve 100µM curcumin uygulanan grupta B16 hücre ölümlerinin artmış olduğunu belirtmişlerdir. Somasundaram ve ark. İnsan meme kanseri hücresinde, Bhaumik ve ark. ise AK5 hücre hattında, Weir ve ark ovaryum kanser modeli olan p53 mAPK hattında curcuminin apaptozu artırdığını rapor etmişlerdir (56,128,129). Ayrıca Ehrlich solid tümöründe curcuminin apoptoz üzerine etkisini araştıran çalışmalarda mevcuttur. Armutak ve ark. (130) çalışmalarında Balb/C türü deneklere $3x10^6$ EAT hücresini subkutan olarak enjekte ettikten sonra deneklere tedavi olarak 100mg/kg curcumini gavaj yolu ile uygulayıp apoptotik hücre sayısını ortalama kontrol grubunda 3.50, tedavi grubunda ise 1.75 olarak belirlemişlerdir. Pal ve ark. (131) $1x10^6$ EAT hücresi enjekte ederek oluşturdukları tümör üzerinde tedavi olarak uygulanan 50µM curcuminin apoptozu artırıcı etkisini rapor etmişlerdir.

Mevcut çalışmada $1x10^6$ EAT hücresi ile oluşturulan subkutan solid tümörler üzerine tünel boyama metodu uygulandı. Tümör kontrol grubu ile iki ayrı tedavi grubunu karşılaştırıldığında tümör kontrol grubunda apoptoza uğrayan hücre sayısı 5.455 iken tedavi gruplarından 25mg/kg curcumin uygulanan grupta 6.575, 50mg/kg curcumin

uygulanan grupta ise 7.775 olup tedavi grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $p<0.05$. Sonuçlar literatürde rapor edilen sonuçlarla uyumlu olup curcuminin deneysel kanser modellerinden biri olan EAT hücrelerinde apoptoza neden olduğunu desteklemektedir.

Anjiyogenezis büyüme gelişme esnasında normal fizyolojik bir olay iken aynı zamanda kanser hücrelerinin çoğalması ve büyümesi için de gereklidir (132). Faktör 8 endotel hücrelerde eksprese edilen önemli bir protein olup iyi ve kötü huylu lezyonların endotelyal orjinli olup olmadığını belirlemek, solid tümör tipini tespit etmek ve kanserin metastaz oluşumunu tespit etmek için birim alanda gözlemlenen mikro damar yoğunluğunun değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerdendir. Faktör 8'in ekspresyon yoğunluğu tümör dokusundaki vaskularizasyonunun ne derece olduğunu belirler (133,134). Kanserli dokular üzerinde yapılan çalışmalarda antikanserojen etkiye sahip olduğu düşünülen bazı maddelerin tümör damarlanmasını azalttığı ortaya konulmuştur. Geng ve ark. (135) akciğer kanseri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada hücreler üzerine cisplatin ve deksametason uygulamışlar ve çalışmalarında tümörde meydana gelen yeni damarlanmaların azaldığını belirlemişlerdir Perassi ve ark. (136) deneysel kanser modellerinden biri olan xenograft modeli üzerine yapmış oldukları çalışmalarında melatoninin meme kanseri üzerine etkisinin araştırmışlar ve çalışmada tümör üzerinde mikrodamar yoğunluğunun ve tümör büyümesinin azaldığını aynı zamanda anjiyogenezisinde kontrol grubuna oranla daha az oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Fu ve ark. (137) yapmış oldukları çalışmada karaciğerde oluşan tümörler üzerinde 20μM curcumin tedavisine bağlı olarak anjiogenezisin azaldığını ve apoptotik hücrelerin sayısında artış olduğunu bildirirken, Panahi ve ark. (138) bir transkripsiyon faktörü olan Nuclear Factor kappa B (NF-κB) üzerine curcuminin anjiogenezis etkilerine bakmışlar ve sonuç olarak curcuminin anjiogenezisi azalttığını belirtmişlerdir. El Azab ve ark. (22) yapmış oldukları çalışmada EAT hücresi verilmiş farelerde curcumin ve resveratrolün anti anjiogenik etkisine bakmışlar ve çalışmalarında curcumin ve resveratrolün mikro damarlanmayı baskıladığını belirtmişlerdir.

Sunulan çalışmada kontrol ve tedavi gruplarında oluşturulan tümör dokularından alınan kesitlerde F8 ekspresyonunun belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı ve mikrodamarlanmanın solid tümörün gelişimi ile bağlantısını araştırıldı. Tüm tümör kitlelerinde F8'in ekspresyon yoğunluğunun nekrotik alanlarda

oldukça az, perifer bölgelerde nispeten fazla olduğu görüldü. Damar yoğunluğundaki bu farklılık, hızlı prolifere olma özelliğine sahip olan Ehrlich tümörlerinde damarlanmanın tümör büyüme oranı ile aynı hızda olmaması, tümör dokusundaki bölgesel farklılıkların ve buna bağlı olarak nekrotik alanların oluşma gerekçesini açıklayabilir. Çalışmamızda tümör dokusuna ait nekrotik bölgeler değerlendirmeye alınmadı. Gruplar arasındaki damar yoğunluğuna bakıldığında kontrol grubunda ortalama damar yoğunluğu 6.033 olarak hesaplanırken, tedavi gruplarından 25mg/kg curcumin uygulanan grupta ortalama damar yoğunluğu 3.000, 50mg/kg curcumin uygulanan grupta ise 1.866 olarak hesaplandı. Gruplar arasındaki F8 ekspresyon yoğunluğu açısından tedavi gruplarındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Sonuçlarımız diğer çalışmalarda olduğu gibi curcuminin anjiogenezisi önlediği doğrultusundadır.

In vitro olarak curcumin ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok curcuminin IC_{50} değerini belirlemek üzerine yapılmış çalışmalardır. Agrawall ve ark. (139) çalışmalarında *Brucine*'nin EAT hücreleri üzerine antitümöral etkisini araştırmışlar ve 96'lık plate'lere ekilen $1x10^6$ EAT hücresinde curcumin tedavisi sonrası IC_{50} değerine 20µM curcumin dozunda ulaştıklarını belirtmişlerdir Odot ve ark. (127) melanom hücreleri üzerine curcuminin antitümöral etkisini araştırmışlar ve B16R melanom hücreleri üzerine 50µM curcuminin 24 ve 36. saatlerde IC_{50} (maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu) değerine ulaştığını ve denenen 27µM ve 18µM curcuminin de B16R melanom hücreleri üzerine toksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Abuelba ve ark. (140) yapmış oldukları curcuminin göğüs adenokarsinomu üzerine etkilerine MDA-MB-231 hücre hattında çalışmışlar ve 48 saatlik inkübasyondan sonra 15µM curcumin'in tümör hücresi gelişimini baskıladığını ve curcumin'in apoptozu artırdığını rapor etmişlerdir. Gayatri ve ark. (141) EAT hücreleri üzerine S*phaeranthus amaranthoides* bitkisinin *in vitro* olarak çalışmışlardır. 15µM tedavi uyguladıkları grupta EAT hücre hattında %82 civarında hücrelerin baskılandığını ve tedavinin hücre hattında azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir Ceylan (118) EAT hücre hattında gilaburu (*Vıburnum opulus*) meyve suyunun ekstresinin etkilerini araştırmış ve IC_{50} değeri 250 µg ml^{-1} olarak bulunmuştur. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada 96 kuyucuklu plate'lere kontrol ve deney gruplarında eşit olacak şekilde hazırlanan EAT hücre süspansiyonundan 50µl alarak ekim işlemini yapıldı. Her bir kuyucukta 160µl medium içerisinde 104000 hücre olacak şekilde ayarlanan hücre hattının üzerine 10µg/ml, 20µg/ml ve 30µg/ml oranında curcumin ekleyerek inkübatörde 3 saat ve 24

saat bekletildikten sonra thoma lamında tekrardan canlı ve ölü hücreler sayıldı. Sayma işlemini ölü ve canlı hücreler üzerinde iki ayrı kişi tarafından yapıldı. İki ayrı kişinin yapmış olduğu sayımlar 3 saatlik ve 24 saatlik canlı hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $p<0.05$. 3 saatlik ve 24 saatlik sonuçlarda tedavi gruplarında 10µg/ml curcumin verilen gruplarda ölü hücrelerin ortalama sayısının daha fazla olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda *in vivo ve in vitro* gelişen tümörlere örnek olması açısından EAT hücreleri kullanıldı. Intraperitoneal ve subkutan enjeksiyon ile oluşturduğumuz Ehrlich assit ve solid tümör dokusunda yaptığımız incelemeler sonucunda, *in vivo* olarak assit tümör oluşturulan gruplarda dokulara ait histopatolojik sonuçlarda 50mg/kg curcumin uyguladığımız tedavi grubuna ait dokularda EAT hücre tutulumunun diğer tedavi grubuna ve kontrol grubuna oranla daha az olduğunu gözlemledik. Deney sonrasında hayvanlardan aldığımız sıvılarda EAT hücrelerini saydığımızda 50mg/kg curcumin uygulanan grupta EAT hücre sayısının azalmış olduğunu gördük. Subkutan uygulama gruplarında tümör hacmi ölçümünde 25mg/kg curcumin uygulanan grupta diğer tedavi grubu 50mg/kg curcumin'e oranla tümör hacminin daha da azalmış olduğunu belirledik. Apoptozun 50mg/kg curcumin uygulanan grupta arttığını anjiogenezisin ise bu grupta azaldığını deneyler sonrasında kaydettik. *In vitro* deneylerde ise EAT hücreleri üzerine eklenen curcuminin (10µg/ml) hücre ölümünü artırdığını belirledik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara bakarak curcumin'in EAT hücrelerinin baskılanmasında etkin olduğunu söyleyebiliriz.

Bu çalışmanın curcumin ile ilgili olarak yapılacak diğer *in vivo ve in vitro* çalışmalarda curcumin dozları hakkında yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

6.KAYNAKLAR

1 Çetin A. Kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. Bitirme Ödevi. 2013;25-27.

2- Merlo LM, Pepper JW, Reid, B.J. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nature Reviews Cancer 2006;6: 924-935.

3 -http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/) Erişim tarihi 22.11.2015 20:08

4- Gültekin M, Boztaş G. Meme kanseri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı 2014;12-28.

5- Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara,1996;731-79,

6- Weiss RB, Henney JE, DeVita VT. Multimodal treatment of primary breast carcinoma. analiysis of accomplishments and problem areas. The Amercian Journal of Medicine, 1981;70:844-851.

7- Çevik Ö, Aydın U, Gürsoy M. Kanser tedavisinde lenfatik hedeflendirme. Hacettepe üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2012;32:67-90.

8- Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Uz YH, Metin MS, Kızılay G. Kanser tedavisinde curcuminin yeri. Yeni Tıp Dergisi 2010;27:142-147.

9- Kocaadam B, Şanlıer N. Curcumin, an active component of turmeric (curcuma longa), and Its effects on health. Crit Rev Food Sci Nutr 2015;3:123-127.

10- Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM. Curcumin from ancient medicie to current clinical trials. Cell Moll Life 2008;65:1631-1652.

11- Gevorkyan L, Gambashidze K. Anticancer efficacy of hydroxyethylthiamine diphosphate in vivo. Exp Oncol. 2014;36:48-49.

12- Ozaslan M, Karagoz I, Kilic I, Güldür M. Ehrlich ascites carcinoma. African Journal of Biotechnology 2011;10:2375-2378.

13- Kaleoğlu Ö, İşli N. Ehrlich asit tümörü. Tıp Fakültesi Mecmuası. 1977;40978-984.

14- Kürkçü E. Deneysel olarak oluşturulmuş meme tümörlerinde curcuminin arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve nitrik oksit düzeylerine etkisi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı Yüksek Lisans Tezi. 2008;29-34.

15- Berrington D, Lall N. Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma cell line. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012;11-13.

16- Abdullaev F. Plant-drived agents against cancer. Pharmacology And Therapeutics İn The New Millennium. Narosa Puplising House, New Delhi, India 2001;345-348.

17- Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. Türk Onkoloji Dergisi 2007;22:197-204.

18- Mızrak D, Akbulut H. Kanser hastası ve açlık. Türk Onkoloji Dergisi 2015;30:152-157.

19- Suffiness M, Douros J. Drugs of plant origin. Cancer Drug Development 1982;26:73-126.

20- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer 2003;3:768-80.

21- Tozkoparan B, Aytaç SP, Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon S-transferazlar. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2007;27:139-164.

22- Azab ME, Hishe H, Moustapha Y, Awady ES. Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. 2011;652:7-14.

23- Thakam A, Saewan N. Antioxidant activities of curcumin-metal complex. Thai Journal of Agricultural Science 2011;44:188-193.

24- http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/) Erişim tarihi 26-01-15 22:45

25- Kolutek R, Avcı İA. The effect of training and monitoring at home on the knowledge level and practices of married women regarding breast and cervical cancer. J Breast Health 2015;11:155-62.

26- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. The Journal of Biological Chemistry 1992;267:10931-10934.

27- Zhu Y, Warin RF, Soroka DN, Chen H, Sang S. Metabolites of ginger component shogaol remain bioactive in cancer cells and have low toxicity in normal cells. Chemical Synthesis and Biological Evaluation 2013;8:1-13.

28- Aydıntuğ S. Meme kanserinde erken tanı. Sted 2004;13:226-228.

29- http://slideplayer.biz.tr/slide/2961072/# Erişim tarihi 01-01-2016 16:30.

30- Ghosh S, Bhattacharryya S, Rashid K, Sil PC. Curcumin protects rat liver from streptozotocin-induced diabetic pathophysiology by counteracting reactive oxygen species and inhibiting the activation of p53 and mapks mediated stress response pathways. Toxicology Reports 2015;2:365-376.

31- Bonadonna G, Does chemoterapy fulfill its expectations in cancer treatment?. Annals of Oncology, 19901:11-21.

32- Robert A, Saslow D et all. American cancer society guidelines for breast cancer. 2003;53:141-169.

33- Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of indian traditional medicine with antioxidant activity. Ethno Pharmacol 2000;71:23-43.

34- Işık M. Akçay F. Kanser tedavisinde tamamlayıcı ve alternatif tıp. Turkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics 2014;5:28-36.

35- Ali T, Shakir F, Morton J. Curcumin and inflammatory bowel disease. Biological Mechanisms and Clinical Implication. Digestion 2012;85:249–255.

36- Cao F, Liu T, Xu Y et all. Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human osteoclastoma cell shrough MMP-9, NF-κB and JNK signaling pathways. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8:6037–6045.

37- Rashid K, Sil PC. Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from celluler stress induced inflammation and apoptosis in diabetics rats. Toxikology and Applied Pharmacology 2015;287:297-310.

38- Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. Inhibitory effect of curcumin on tumorigenesis in mice. Journol of Biochemistry Supplement 1997;27:26-34.

39- Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: A short review. Life science 2006;78:2081-2087.

40- Mahady G. B, Pendland, S. L,Yun, G; Lu, Z. Z. Turmeric(Curcuma longa) and curcumin inhibit the growth of helicobacterpylori, a group 1 carcinogen. Anticancer Res 2002;22:4179–81.

41- https://natashadh.wordpress.com/2014/03/21/turmeric-natures-pharmacy/ Erişim tarihi 26-02-2016 09:30

42- Kheradpezhouh E, Barritt GJ, Rychkov GY. Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. Redox Biology 2015;7:1-7.

43- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer 2005;43:1955-1968.

44- Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformat ion of curcumin through reduction and glucuronidat ion in mice. Drug Metab Dispos 1999;27:486-494.

45- Kim CY, Le TT,Chen C, Cheng CX et all. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. The Journal of Nutritional Biochemistry 2011;22:910-920.

46- Deshpande SS, Ingle AD. and Maru GB. Inhibitory effects of curcumin free aqueous turmeric extract on benzo[a]pyrene-induced forestomach papillomas in mice. Cancer Letters 1997;118:79–85

47- Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. Nutrition and Cancer 1992;17:77–83

48- Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, phytochemical. Biochemical Pharmacology 1995;49:1551–1556.

49- Chen HW, Huang HC. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. British Journal of Pharmacology 1998;124:1029–1040.

50- Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of curcuma longa. Planta Medica 1991;57:1–7.

51- Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcuminon skin carcinogenesis in mice. Cancer Lett 1997;116:197-203.

52- Kuttan R, Sudheeran PC, Joseph CD. Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy. Tumori 1987;73:29-31.

53- Kohli K, Ali J, Ansari MJ, Raheman Z. Curcumin a antiinflammatory agent. Indian J Pharmacol. 2005;37:141-147.

54- Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. Carcinogenesis 2002;23:143-50.

55- Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC, Awasthi S.Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. Int J Biochem Cell Biol 1998;30: 445-56.

56- Bhaumik S. Anjum R, Rangaraj N, Pardhasaradhi BV, Khar A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. FEBS Lett 1999;456:311-314.

57- Zeybek Ü. Kanser araştırmaları ve deneysel modeller. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi 2013;3:187-198.

58- Fantozzi A. Mouse models of breast cancer metastasis. Breast Cancer Research 2006;8:1-11.

59- Aktaş, E. Ehrlich asit sıvısının L-hücrelerinin çoğalma hızına etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul 1996;18-21.

60- Ehrlich P. Apolant H. Beobachtungen uber maligne mausentumoren. Berlin Klin Wochenschr 1905;42:871–874.

61-Taşkın Eİ. Ehrlich Ascites Tümörü ile Balb/c ırkı farelerde oluşturulmuş solid tümör modelinde curcuminin apoptoz üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul 2002;16-28.

62- Lazebnik YA, Medveda DN, Zenin VV. Reversible G2 block in the cell cycle of ehrlich ascites carcinoma cells. Experimental Cell Research 1991;195:247-254.

63- Gümüşhan H. i.p., i.v., s.c., yollarla uygulanan adriamycin'in Ehrlich Asit Tümörü (EAT) taşıyan farelere etkileri üzerine bir çalışma. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa 2002;28-31.

64- Siems WG, Grune T, Schmidt H Tikhonov YV, Pimenov MA. Purine nucleotide levels in host tissues of Ehrlich Ascites Tumor bearing mice in different growth phases of the tumor. Cancer Research 1993;53:5143-5147.

65- Öner D. Ehrlich Ascites Tümör hücrelerinde vincristin'e karşı duyarlılığın tümör yaşı ile ilikisi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Radyoloji ve Sağlık Fizyolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul 1985;36-38.

66- Altun S. Normal, tümoral ve rejeneratif büyümeler arasındaki kinetik ilişkiler. Traditional Journal of Biology. Tübitak 1996;20:153-173.

67- Baillif RN. The solid phase of the ehrlich ascites tumor in mice. Cancer Research 1954;14:554-558.

68- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. Inflammation 1990;14:125–131.

69- Pamir A.Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları 2005;145-148.

70- Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. Pathol Annu 1982;17:229-259.

71- Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. American College of Physicians Chest 1993;103:99-101.

72- Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozin önemi Toraks Dergisi 2001;(1):91-95.

73- Simon HU, Haj YA, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS)in apoptosis induction Apoptosis 2000;5:415–418.

74- Ogata Y, Takahashi M. Bcl-xas an Antiapoptotic Molecule for Cardiomyocytes Drug News Perspect 2003;16:446-52.

75- Gil J, Yamamoto H, Zapata JM, Reed JC, Perucho M Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. Cancer Res 1999;59:2034-2037.

76- Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide Apopitoz. Fırat Tıp Dergisi 2006;11:6-11.

77- Apoptoz ders notları, Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr /apoptoz ders notu (11-12-2015 20:00).

78- Cohen JJ, Duke RC. Apoptosis and programmed cell death in Immunity. Annu Rev Immunol 1992;10:267-293.

79- Hsueh AJW, Eısenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonodal cell apoptosis. Recent Progress in Hormone Research 1996;51:432-457.

80- http://medicinembbs.blogspot.com.tr/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html Erişim tarihi 12-12-2015 17:00.

81- https://www.quora.com/What-role-does-apoptosis-play-in-metamorphosis.Erişim tarihi 12-12-2015 18:00.

82- Mis L, Yeltekin AÇ. Review: Apoptozis. BEÜ Fen Bilimleri Dergisi 2014;3:102-112.

83- Elmore S. Apoptosis a review of programmed cell death.-Toxicol Pathol. 2007;35:495-516.

84- Searle J, Kerr JF, R, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. Pathology Annual 1982;17:229-59.

85- Thompson CB. Apotosis in the pathogenesis of autoimmune disease. Clin Immunol Immunopathol 1995;267:1456-1462.

86- Narula J, Kharbanda S, Khaw B A. Apoptosis and the heart. Chest 1997;112:1358-62.

87- Bulan Ö. Ehrlich Ascites Tümör hücrelerinde yaşlanma ile hücre kinetiği arasındaki ilişkiler. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 1990;58-60.

88- Kaymak E. Ehrlich solid tümörlerinde netrin 1 ve faktör 8 ekspresyonu üzerine paklitaksel'in etkisinin incelenmesi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yükseklisans Tezi 2015;58-60.

89- Folkman J. Tumor angiogenesis. Adv Cancer Res 1985;43:175-203.

90- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM, Hansen CC, Ghezzi F. Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage endometrial carcinoma. Obstet Gynecol 1995;86:479-85.

91- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? Natl Cancer Inst 1990;82:4-6.

92- Velasco P, Lange-Asschenfeldt B. Dermatological aspects of angiogenesis. British Journal of Dermatology 2002;147:841-52.

93- Ertekin T. Farelerde deneysel olarak oluşturulan kolon kanseri üzerine angıostatın'in etkileri. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 2008;22-25.

94-Beecken WD, Engl T, Jonas D, Blaheta RA. Expression of angiogenesis inhibitors in human bladder cancer may explain rapid metastatic progression after radical cystectomy. Int J Mol Med 2009;23:261-66.

95- Albo D, Granick MS, Jhala N, Atkinson B, Solomon MP. The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinomas of the head and neck. Ann Plas Surg 1994;32:588-94.

96- Shımızu K, Oku N. Cancer anti-angiogenic therapy. Biological Pharmaceutical Bulletin 2004; 27:599-605.

97- Vukanovic J, Isaacs JT. Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis, and macrophage infiltration with in rat prostatic cancers. Cancer Research 1995;55:1499-1504.

98- Hu DE, Fan TPD. Suppression of VEGF-induced angiogenesis by the protein tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A. British Journal of Pharmacology 1995;114:262-268.

99- Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. JNCI 1994;86:614-619.

100- Weidner N, Semole JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991;324:1-8.

101-Reilly M, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth Cell 1997;88:277-285.

102-Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics . CA Cancer J Clin 2003;53:5-26.

103-Greenlee RT, Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics. Cancer J Clin 2001;51:15-36.

104-Kızılcı S. Kemoterapi alan kanserli hastalar ve yakınlarının yaşam kalitesini etkileyen faktörler. C Ü Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi 1999;3:18-26.

105-Özkan S. Psiko-Onkoloji. İstanbul:Form Reklam Hizmetleri 2007;104-106.

106-Raju A,Christina MJA, Murali A Antitumor activity of ethanol and aqueous extracts of Drosera Burmannii vahl. İn EAC Bearing Mice. Spatula DD 2012;2:83-88.

107- Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcuminon skin carcinogenesis in mice. Cancer Lett 1997;116:197-203.

108- Priyadarsini KI. Free radical reactions of curcumin in membrane models. Free Radic Biol Med 1997;23:838-843.

109-Ushida J, Sugie S, Kawabata K, Pham QV, Tanaka T, Fujii K, et al. Chemopreventive effect of curcumin on N-nitrosomethylbenzylamine induced esophageal carcinogenesis in rats. Jpn J Cancer Res 2000;91:893-898.

110-Kanter P,Tarladaçalışır YT,Akpolat M, Mercantepe T. Gamma radyasyona bağlı oluşan jejenum mukoza hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin incelenmesi. Tıp aaraştırmaları dergisi 2008;6(3):128-135.

111-Lopez LM Anticancer and carcinogenic properties of curcumin. Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. Mol. Nutr. Food Res 2008;52:103–127.

112-Pan HM, Huang TM, Lın JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 1998;27:486-493.

113-Yu GW, Xu G,Ren JG, et all. Preventive Action of Curcumin in Experimental Acute pancreatitis in mouse. İndian J Med Res 2011;134:717-724.

114-Ueki M, Ueno M, Morishita J, Maekava N. Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice. Journal of Bioscience and Bioengineering 2013;115:547-551.

115-Aktas C, Kanter M, Kocak Z. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation. Toxicology and Industrial Health 2011;1:12-15.

116-Srimal RC, Khanna NM, Dhavan BN. A Preliminary Report on Anti Inflamatory Activity of Curcumin. Int J Pharm 1971;3:110-115.

117-Zunino SJ, Storms DH, Newman JW, Pedersen TL, Keen CL, Ducore JM. Oral or parenteral administration of curcumin does not prevent the growth of high risk acute lymphoblastic leukemia cells engrafted ınto a NOD/SCID mouse model. International Journal of oncology 2013;42:741-748.

118-Ceylan D. Farelerde deneysel olarak oluşturulan kanser üzerine gilaburu (vıburnum opulus) meyve suyunun etkileri. Erciyes üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 2015;58-65.

119-Facchini JM, Alves EP, Aguilera C, Gern RMM, Silveira MLL, Elisabeth W, Furlan SA. Antitumor activity of pleurotus ostreatus polysaccharide fractions on

ehrlich tumor and sarcoma. International Journal of Biological Macromolecules 2014;68:72-77.

120-Hanafy ZE, Ginger extract antimutagens as cancer chemopreventive agent against ehrlich ascites carcinoma. Academic Journal of Cancer Research 2009;2:61-67.

121-Patra S, Muthuraman MS, Prabhu AR, Priyadharshini RR, Partthiban S. Evaluation of antitumor and antioxidant activitiy of sargassum tenerrimum against ehlich ascites carcinoma in mice. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2015;16:915-921.

122-Özaslan M, Karagöz D, Kalender ME,Kılıç H. In vivo antitumoral effect of plantago majorl. extract on balb/c mouse with ehrlich ascites tumor. The Ameerican journal of Chinese Medicine 2007;35:841-851.

123-Joseph MM, et all. Antitumor activity of galactoxyloglucan-gold nanoparticles against murine ascites and solid carcinoma colloids and surfaces b. biointerfaces. Journal of Cancer Prevention 2014;116:219–227.

124-Ekinci G. Katı Ehrlich ascites tümörünün büyüme kinetiği. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2000;22-27.

125-Önder GÖ. Ehrlich solid tümörlerinde kanser kök hücre varlığının ımmunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi Kayseri. 2015;52-53.

126-Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G.curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. Febs Letters 2002;512:334-340.

127.Odot J, Albert P, Carlıer A , Tarpın M, Devy J, Madoulet C. In vitro and ın vivo antı-tumoral effect of curcumın agaınst melanoma cells Int J. Cancer 2004;111:381–387.

128-Somasundaram S,Endmund NA et all. Dietary curcumin ınhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. Cancer Res 2002;62:3868-3870.

129-Weir NM, Selvendiran K, Kutula VK, et all. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovariana cancer cells by modulating akt and p53 mAPK. Cancer Biology and Therapy 2007;6;178-184.

130-Armutak EI, Gültekin M. Effect of on apoptosisin in vivo solid ehrlich ascites tumor model in Balb-C mice. İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 2014;40:183-190.

131-Pal S, Choudhuri T, Chattopadhyay S et all. Mechanisms of curcumin induced apoptosis of ehrlich's ascites carcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communicationns 2001;288:658-665.

132-Kajdaniuk D, Marek B, Foltyn W, Kos-Kudła B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) -Part 1: In Physiology and Pathophysiology. Endokrynol Pol 2011;62:444-455.

133-Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical Application of Antiangiogenic Therapy: Microvessel Density, What it Does and Doesn't Tell Us. J Natl Cancer Inst 2002; 94:883–893.

134- Delisser HM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. Am J Pathol 1997;151:671-677.

135-Geng Y, Wang J , Jing H, H.W, Bao Y X. Inhibitory effect of dexamethasone on lewis mice lung cancer cells. Genet. Mol. Res 2014;13:6827-6836.

136-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NRS, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. Cancer Ins 2014;9:236-239.

137-Fu Z, Chen X, Guan S, Yan Y, Lin H, Hua ZC. Curcumin ınhibits angiogenesis and ımproves defective hematopoiesis ınduced by tumor-derived vegf in tumor model through modulating vegf-vegfr2 signaling pathway. Oncotarget 2015;14:6:19469–19482.

138-Panahi Y,Darvishi B, Ghanei M, Jowzi N, Beiraghdar F, Varnamkhasti BS. Molecular mechanisms of curcumins suppressing effects on tumorigenesis, angiogenesis and metastasis, focusing on nf-κb pathway. cytokine growth factor. Rev Pharmacognosy Research 2015;15:1359-71.

139-Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. Life Sciences 2011;89:147-158.

140-Abuelba H, Cotrutz CE, Stoıca BA, Stoica L, Olınıcı D, Petreuş T. İn vitro evaluatio of curcmin effect on breast adenocarcinoma 2D and 3D cell cultures. Rom J. Morphol Embryol 2015;56:71-76.

141-Gayatri S, Reddy CUM, Chitra K, Parthasarathy V. Assessment of in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity of sphaeranthus amaranthoides burm. Pharmacognosy Research 2015;7:198-202.

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI: Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ: Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)

Tarih:12.02.2014 **Toplantı Sayısı**: 02 **Karar No**:14/029

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu **12.02.2014** tarihinde **Prof. Dr. Harun ÜLGER**'in başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun ÜLGER	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Abdullah İNCİ	Prof. Dr.	Veteriner Fak.	
Özlem CANÖZ	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fak.	
Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	Katılmadı
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fak.	
Gökçen Yuvalı ÇELİK	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	
Servet KESİM	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fak.	Katılmadı
Gökçen DİNÇ	Dr.	DEKAM	
Serap ALTUNDAŞ EROĞLU	Av.	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Katılmadı
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Der. Başk.	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	Katılmadı

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinden **Doç Dr Niyazi ACER**tarafından sunulan **"Curcumin'in ehrlich assit ve solid tümör oluşturulan farelerde antitümöral etkisinin araştırılması"** adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 12.05.2014

Etik kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmzası :

KARAR SIRA NO	KARARA ESAS OLAN EVRAKIN TARİHİ	NO	NEREDEN GÖNDERİLDİĞİ	DÖNDEN
237	03.02.2014			Doktora Öğrencisi Seher YILMAZ'ın Tez Proj

Toplantı Tarihi: 03.02.2014

Başkan: Prof. Dr. Harun ÜLGER

Üyeler: Prof. Dr. Erdoğan UNUR
Prof. Dr. Kenan AYCAN
Doç. Dr. Niyazi ACER
Yrd. Doç. Dr. Tolga ERTEKİN
Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

KARAR

Anabilim dalımız doktora öğrencisi Seher Yılm hazırlamış olduğu doktora tez projesi " Curcumin'in, Ehrlich Assit ve Solid Tümör Oluşturulan Fareler Antitümöral Etkisinin Araştırılması" isimli tez kon akademik kurulunda görüşülmüş araştırmanın yapıla uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Harun ÜLGER
Başkan

Prof. Dr. Kenan AYCAN

Prof. Dr. Erdoğan UNU

Doç. Dr. Niyazi ACER

Yrd. Doç. Dr. Tol ERTEK

Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Seher YILMAZ

Uyruğu :Türkiye (TC)

Doğum Tarihi : 17-04-1980

Doğum Yeri :KAYSERİ

Medeni Hali :Bekar

Tel: 0536 344 67 63

Adres: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı.

E-Posta: sehery38@hotmail.com, seher.yilmaz@kapadokya.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ:

2004 :Erciyes üniversitesi Atatürk Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Bölümü
2010 :Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim dalıYükseklisans programı

Yabancı Diller :İngilizce Üds not 62.750

DENEYİMLER :

2004-2014 Erciyes üniversitesi tıp fakültesi hastanesi hemşire
2014-2016 Kapadokya Meslek Yüksek Okulu Öğretim görevlisi