T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CURCUMİN VE HİDROKSİÜREA'NIN GEN DÜZENLEYİCİ VE ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

GÜLER GÜL

MOLEKÜLER TIP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970178

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CURCUMİN VE HİDROKSİÜREA'NIN GEN DÜZENLEYİCİ VE ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

MOLEKÜLER TIP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLER GÜL

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doc. Dr. Yasemin SOYSAL

II. Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doc. Dr. Harun M. SAİD

(Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 215S169 proje numarasıyla desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970178

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Yüksek Lisans programı öğrencisi Güler GÜL 'Curcumin ve Hidroksiürenin Gen Düzenleyici ve Antianjiyogenik Etkilerinin Meme Kanserli Hücre Hattında Araştırılması" konulu Yüksek Lisans tezini 14 /03/2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Yrd. Doc. Dr. Yasemin SOYSAL
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
ÜYE
İzmir Ekonomi Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doc. Dr. Zahide ÇAVDAR
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yrd.Doc. Dr. Harun M. SAİD
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Doc. Dr. Sefa KIZILDAĞ
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Mehmet KORKMAZ
YEDEK ÜYE
Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER i
TABLO DİZİNİ v
ŞEKİL DİZİNİ vii
TEŞEKKÜR 1
ÖZET 2
ABSTRACT 4
1. GİRİŞ AMAÇ 6
2. GENEL BİLGİLER 8
2.1. Meme Yapısı 8
2.2. Meme Kanseri Tanım ve Epidemiyoloji 8
2.3. Meme Kanseri ve Risk Faktörleri 9
2.3.1. Yaş 9
2.3.2. Aile Hikayesi 9
2.3.3. Yaşam Tarzı ve Diyet 10
2.3.4. Genetik Geçmiş 10
2.3.5. İlk Gebelik Yaşı 10
2.3.6. Erken Menarş 10
2.3.7. Radyasyon 10
2.3.8. Sigara ve Alkol Kullanımı 10
2.4. Meme Kanseri Moleküler Sınıflandırma 11
2.5. Metastaz 12
2.6. Anjiyogenez 13
2.7. VEGF 15
2.8. HIF-1 16

2.9. Raf/MEK/ERK Sinyal Yolağı ve C-Raf (Raf-1) 17
2.10. EPO 19
2.11. Apoptoz 20
2.12. Kaspaz-9 22
2.13. Bevacizumab 23
2.14. Hidroksiüre 23
2.15. Curcumin 24
2.16. İlaç Kombinasyonlarında Sinerjizm 25
2.17. Hücre Hatları 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1. Araştırmanın Tipi: 29
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı: 29
3.3. Çalışma Materyali: 29
3.4. Çalışmanın Değişkenleri: 30
3.5. Veri toplama Araçları: 30
3.5.1. Hücre Kültürü 30
3.5.1.2. Hücrelerin Çözülmesi 32
3.5.2. Curcumin Ve Hidroksiüre Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 33
3.5.3. Deney Grupları 33
3.5.4. WST-1 Testi 34
3.5.5. IC50 Değerlerinin ve Kombinasyon Gruplarının Sitotoksik Sinerjisinin Araştırılması 35
3.5.6. Migrasyon Testi (Scratch Assay) 35
3.5.7. RNA İzolasyonu 36
3.5.8. RNA Örneklerinin Kantitasyonu 37

3.5.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 37
3.5.10. Real Time PCR 37
3.5.11. Western Blot Analizi 39
3.6. Araştırma Planı 46
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi 46
3.8. Araştırma Sınırlılıkları 47
3.9. Etik Kurul Onayı 47
4. BULGULAR 48
4.1. Curcumin' in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 İle Belirlenmesi 48
4.2. Bevacizumabın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 İle Belirlenmesi 50
4.3. Hidroksiürenin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 İle Belirlenmesi 52
4.4. Hücrelerin Curcumin, Bevacizumab ve Hidroksiüre İçin IC50 Değerleri 54
4.5. Hücrelere Uygulanan Curcumin ve Bevacizumab Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi 55
4.6. Hücrelere Uygulanan Curcumin ve Hidroksiüre Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi 57
4.7. Hücrelere Uygulanan Bevacizumab ve Hidroksiüre Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerleri 60
4.8. Hücrelere UygulananCurcumin, Bevacizumab ve Hidroksiüre Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi 64
4.9. Hücrelerin Scratch Uygulamalarının Görüntüleri 66
4.10. Curcuminin Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 86
4.11. Bevacizumabın Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 87
4.12. Hidroksiürenin Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 88
4.13. Curcumin Ve Bevacizumab Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 89

4.14. Curcumin Ve Hidroksiürenin Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 90

4.15. Bevacizumab Ve Hidroksiürenin Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 92

4.16. Curcumin, Bevacizumab Ve Hidroksiürenin Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 93

4.17. Kombinasyon Gruplarının Seçilmesi 95

4.18. RNA Örneklerinin Kantitasyonu 96

4.19. Gen Ekspresyon Analizleri 97

4.1. Protein Örneklerinin Kantitasyonu 117

4.2. Protein Ekpresyon Analizleri 118

5. TARTIŞMA 131

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 139

7. KAYNAKLAR 140

8. EKLER 168

8.1. Etik Kurul Onay 168

8.2. ÖZGEÇMİŞ 170

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri 11
Tablo 2. İlaçların kombine kullanımının etkilerini belirlemek için kombinasyon indeksi (CI) değerleri 26
Tablo 3. MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF-10A' nın özellikleri 28
Tablo 4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihaz ve malzemeler. 30
Tablo 5. Çalışmada uygulanacak olan madde konsantrasyonları 34
Tablo 6. cDNA için hazırlanan karışım 37
Tablo 7. Tasarlanan Primerler 38
Tablo 8. Real Time PCR analizi için reaksiyon bileşenleri.....38
Tablo 9. Nükleer Protein İzolasyonu İçin Gerekli Maddeler Ve Konsantrasyonları 40
Tablo 10. SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%10 ve 12) hazırlanması 42
Tablo 11. SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması.....42
Tablo 12. Western Blot Analizinde kullanılan maddeler ve cihazlar 45
Tablo 13. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri için IC50 değerleri 55
Tablo 14. Curcumin ve bevacizumab kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri.....55
Tablo 15. Curcumin ve Bevacizumab kombinasyonunun uygulandığı 56
Tablo 16. Curcumin ve Bevacizumab kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri 57
Tablo 17. Curcumin ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri.....57
Tablo 18. Curcumin ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri.....58
Tablo 19. 72 saat inkübasyon süresi ile curcumin ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri 59
Tablo 20. Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri.....60
Tablo 21. Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri 61

Tablo 22. Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri 63
Tablo 23. Curcumin, bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri 64
Tablo 24. Curcumin, bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri 65
Tablo 25. Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri.....65
Tablo 26. MCF-7 hücre hattında seçilen kombinasyon grupları 95
Tablo 27. MDA-MB-231 hücre hattında seçilen kombinasyon grupları.....95
Tablo 28. MCF-7 örneklerine ait RNA miktarları.....96
Tablo 29. MDA-MB-231 örneklerine ait RNA miktarları 97
Tablo 30. MCF-10A örneklerine ait RNA miktarları 97
Tablo 31. MCF-7 örneklerine ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri.....98
Tablo 32. MCF-7 örneklerine ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri.....99
Tablo 33. MCF-7 örneklerine ait EPO gen ekspresyon düzeyleri 100
Tablo 34. MCF-7 örneklerine ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri 101
Tablo 35. MDA-MB-231 örneklerine ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri.....105
Tablo 36. MDA-MB-231 örneklerine ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri 106
Tablo 37. MDA-MB-231 örneklerine ait EPO gen ekspresyon düzeyleri 107
Tablo 38. MDA-MB-231 örneklerine ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri 108
Tablo 39. MCF-10A örneklerine ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri 111
Tablo 40. MCF-10A örneklerine ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri 112
Tablo 41. MCF-10A örneklerine ait EPO gen ekspresyon düzeyleri.....113
Tablo 42. MCF-10A örneklerine ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri.....114
Tablo 43. MCF-7 hücre hattı için hücre lizatı ortalama protein düzeyleri.....117
Tablo 44. MDA-MB-231 hücre hattı için hücre lizatı ortalama protein düzeyleri.....118
Tablo 45. MCF-10A hücre hattı için hücre lizatı ortalama protein düzeyleri 118

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Hipoksi ve normoksi yanıtı (150- 154) 18
Şekil 2. Raf/MEK/ERK sinyal iletimi.....19
Şekil 3. Hidroksiürenin kimyasal yapısı (218).....23
Şekil 4. Curcuminin kimyasal yapısı (230).....24
Şekil 5. MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarının morfolojik görüntüleri ..29
Şekil 6. Curcuminin MCF-7 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 48
Şekil 7. Curcuminin MDA-MB-231 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 49
Şekil 8. Curcuminin MCF-10A hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 49
Şekil 9. Bevacizumabın MCF-7 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 50
Şekil 10. Bevacizumabın MDA-MB-231 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 51
Şekil 11. Bevacizumabın MCF10A hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 52
Şekil 12. Hidroksiürenin MCF-7 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 53
Şekil 13. Hidroksiürenin MDA-MB-231 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları 53
Şekil 14. Hidroksiürenin MCF-10A hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları. 54
Şekil 15. MCF-7 hücre hattı üzerinde curcumin IC50, bevacizumab IC50 ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması 56
Şekil 16. MCF-7 hücre hattı üzerinde curcumin 50 µM, hidroksiüre 3 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması 58
Şekil 17. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde curcumin 40 µM, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....59

Şekil 18. MCF-7 hücre hattı üzerinde Bevacizumab 250 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımı ile Bevacizumab 350 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması 61
Şekil 19. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Bevacizumab 250 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımı ile Bevacizumab 350 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....62
Şekil 20. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Bevacizumab IC50, hidroksiüre IC50 ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....63
Şekil 21. DMSO uygulanmış ve kontrol MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin scratch görüntüleri 67
Şekil 22. Curcumin 40 µM ve 50 µM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 68
Şekil 23. Curcumin IC50 ve Bevacizumab 250 µg/ml uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 69
Şekil 24. Bevacizumab 350 µg/ml ve IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri.....70
Şekil 25. Hidroksiüre 1 mM ve 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 71
Şekil 26. Hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 72
Şekil 27. Curcumin 40 µM+ Bevacizumab 250 µg/ml ve Curcumin 40 µM+ Bevacizumab 350 µg/ml uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 73
Şekil 28. Curcumin 50 µM+ Bevacizumab 250 µg/ml ve Curcumin 50 µM+ Bevacizumab 350 µg/ml uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 74
Şekil 29. Curcumin IC50+ Bevacizumab IC50 ve Curcumin 40 µM+ hidroksiüre 1 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri75
Şekil 30. Curcumin 40 µM+ hidroksiüre 3 mM ve Curcumin 50 µM+ hidroksiüre 1 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri76
Şekil 31. Curcumin 50 µM+ hidroksiüre 3 mM ve Curcumin IC50+ hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri77

Şekil 32. Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 78
Şekil 33. Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 79
Şekil 34. Bevacizumab IC50+ hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 80
Şekil 35. Curcumin 40 µM + Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 40 µM + Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 81
Şekil 36. Curcumin 40 µM, Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 40 µM, Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 82
Şekil 37. Curcumin 50 µM, Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 50 µM + Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 83
Şekil 38. Curcumin 50 µM + Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 50 µM + Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 84
Şekil 39. Curcumin IC50 + Bevacizumab IC50 + hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri 85
Şekil 40. Curcumin uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyonunun belirlenmesi 86
Şekil 41. Bevacizumab uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyonunun belirlenmesi 87
Şekil 42. Hidroksiüre uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyonunun belirlenmesi 88
Şekil 43. Curcumin ve Bevacizumab uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi 89
Şekil 44. Curcumin ve Bevacizumab uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi 90

Şekil 45. Curcumin ve hidroksiüre uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi 91
Şekil 46. Curcumin ve hidroksiüre uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi.....91
Şekil 47. Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi.....92
Şekil 48. Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi.....93
Şekil 49. Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi.....94
Şekil 50. Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi.....94
Şekil 51. MCF-7 hücre hattına ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri.....102
Şekil 52. MCF-7 hücre hattına ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri.....103
Şekil 53. MCF-7 hücre hattına ait EPO gen ekspresyon düzeyleri 104
Şekil 54. MCF-7 hücre hattına ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri 104
Şekil 55. MDA-MB-231 hücre hattına ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri.....109
Şekil 56. MDA-MB-231 hücre hattına ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri 109
Şekil 57. MDA-MB-231 hücre hattına ait EPO gen ekspresyon düzeyleri 110
Şekil 58. MDA-MB-231 hücre hattına ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri 111
Şekil 59. MCF-10A hücre hattına ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri 114
Şekil 60. MCF-10A hücre hattına ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri 115
Şekil 61. MCF-10A hücre hattına ait EPO gen ekspresyon düzeyleri.....116
Şekil 62. MCF-10A hücre hattına ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri.....116
Şekil 63. BSA standart kalibrasyon eğrisi.....117
Şekil 64. MCF-7 hücrelerinde sitoplazmik HIF-1α protein ekspresyonlarının western bulguları 119
Şekil 65. MDA-MB-231 hücrelerinde sitoplazmik HIF-1α protein ekspresyonlarının western bulguları 120
Şekil 66. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde nükleer HIF-1α protein ekspresyonlarının western bulguları.....121
Şekil 67. MCF-7 hücrelerinde EPO protein ekspresyonlarının western bulguları 121

Şekil 68. MDA-MB-231 hücrelerinde EPO protein ekspresyonlarının western bulguları 122
Şekil 69. MCF-10A hücrelerinde EPO protein ekspresyonlarının western bulguları 123
Şekil 70. MCF-7 hücrelerinde C-Raf protein ekspresyonlarının western bulguları ..124
Şekil 71. MDA-MB-231 hücrelerinde C-Raf protein ekspresyonlarının western bulguları 125
Şekil 72. MCF-10A hücrelerinde C-Raf protein ekspresyonlarının western bulguları 126
Şekil 73. MCF-7 hücrelerinde kaspaz-9 protein ekspresyonlarının western bulguları 127
Şekil 74. MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-9 protein ekspresyonlarının western bulguları 128
Şekil 75. MCF-10A hücrelerinde kaspaz-9 protein ekspresyonlarının western bulguları 129
Şekil 76. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde VEGF protein ekspresyonlarının western bulguları.....130

KISALTMALAR

APS: Amonyum Persülfat

ATCC: American Type Culture Collection

BCA: Biçinkonik Asit

BSA: Bovin Serum Albümin

BV: Bevacizumab

CU: Curcumin

DMEM/F12: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri Nutrien Karışımı F-12

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri

DMSO: Dimetilsülfoksit

ECL: Gelişmiş Kemilüminisans

EGF: Epidermal Büyüme faktörü

EMT: Epitel Mezenkimal Geçiş

EPO: Eritropoietin

ER: Östrojen Reseptör

FBS: Fötal Sığır Serumu

FGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

HIF-1α: Hipoksi İndükleyici Faktör- 1α

HS: At Serumu

HU: Hidroksiüre

MAPK: Mitojen-Aktive Protein Kinaz

MCF-10A: Normal Meme Hücre Hattı

MCF-7: Meme Adenokarsinom Hücre Hattı

MDA-MB-231: Meme Adenokarsinom Hücre Hattı

MG-63: Osteosarkom Hücre Hattı

ml: Mililitre

mM: Milimolar

Na_2VO_4 : Sodyum Vanadat

PBS : Fosfat Tamponu

PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PI3K: Fosfoditilinositol 3-Kinaz

PR: Progesteron Reseptör

PVDF : Poliviniliden Difilorür

SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

TEMED : Tetrametiletilendiamin

TGF-β: Transforme Edici Faktör β

TNF-α: Tümör Nekroz Faktör α

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

WST: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

TEŞEKKÜR

Benim ben olmamı sağlayan, bana her konuda destek olan ve tez çalışmamın her adımında benimle beraber sevilip üzülen sevgili canım aileme,

Tanıştığımız günden bu yana benden sadece bilgi birikimini değil, her daim desteğini ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Yasemin Soysal'a,

Bu araştırmanın oluşturulmasında katkılarını ve desteğini eksik etmeyen, ikinci danışmanım Yrd. Doç. Dr. Harun Said'e,

Yüksek lisansa başlamama önayak olan ve güvenini her zaman hissettiğim Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan'a,

Öneri ve yardımlarıyla yol gösteren Moleküler Tıp Anabilimdalı Başkanı Prof. Dr. Hüray İşlekel'e ve Anabilim Dalının tüm değerli hoca ve öğrencilerine,

Bu tez sürecinde hep yanımda olan, başım sıkışınca bana büyük sabırla yardımcı olan Burcu Açıkgöz, Ayşe Koçak, Emre Tuncer, Hüsniye Şahin, Cemre Ural ve Durgu Harmancı'ya,

Beni yalnız bırakmayan ve her daim yüzümü hep güldüren Tuğba Uysal, Uğur Bora, Deniz Berber ve üniversitede tanıştığım K-7 ekibine,

Çalışmamızda ihtiyacımız olduğunda bize destek olan Prof. Dr. Safiye Aktaş, Prof. Dr. Zeynep Sercan, İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik AD. Yrd.Doc.Dr. Özden Yalçın, Ege Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Prof. Dr. Ruchan Uslu, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji AD. Başkanı Doç.Dr. Mükremin Uysal ve Histoloji Embriyoloji AD. Başkanı Prof.Dr. Murat Tosun'a,

Projeyi maddi yönden destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Güler GÜL

CURCUMİN VE HİDROKSİÜREA'NIN GEN DÜZENLEYİCİ VE ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir
Güler GÜL
guler_gul56@hotmail.com

ÖZET

Anjiyogenez, lokal tümör büyümesini etkileyerek meme kanserinin metastazı ve gelişiminde önemli rol oynar. Toksik olmayan ve kemo-direnç göstermeyen anjiyogenezi inhibe eden ajanların geliştirilmesi önem taşımaktadır.

Çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A normal meme hücre hattında curcumin, bevacizumab ve hidroksiürenin tek başlarına ve kombine kullanımlarında anti anjiyogenik etkinliklerini değerlendirmeyi amaçladık.

Curcumin, hidroksiüre ve bevacizumab'ın hücre canlılığı üzerinde zamana ve doza bağlı etkisini araştırmak için Curcumin, 40 μM ve 50 μM; bevacizumab 250 μg/mL ve 350 μg/mL; hidroksiüre 1 mM ve 3mM konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde MDA- MB-231, MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarında denendi. Sitotoksik etki WST-1 testi ile ölçüldü. 72 saat inkübasyon sonunda graphpad prism programı ile curcumin, bevacizumab ve hidroksiürenin IC50 değerleri hesaplandı. İlaç kombinasyonlarındaki sinerji ve kombinasyon indeks (CI) CalcuSyn yazılımıyla hesaplandı.

Hücrelere uygulanan ajanların hücre migrasyonu üzerindeki etkisi Scratch Assay uygulamasıyla değerlendirildi. Hem sinerjistik etki hem de <%50 migrasyon değeri gösteren kombinasyon grupları seçildi. Bu grupların HIF-1α, VEGF, EPO ve C-RAF gen ekspresyonlarını değerlendirmek için Real time

PCR yöntemi, protein ekpresyonlarını değerlendirmek için western blot analizi kullanıldı. Ayrıca kaspaz-9 protein ekspresyonu ile kullanılan ajanların apoptotik etkisi gösterildi.

Curcuminin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri için IC50 değerleri sırasıyla 46.96, 53,56 ve 39.4 μM; bevacizumabın IC50 değerleri sırasıyla 232.8, 335.7 ve 380.5 μg/mL; hidroksiürenin IC50 değerleri sırasıyla 0.36, 1.22 ve 1.22 mM olarak tespit edildi. Curcumin, bevacizumab ve hidroksiürenin ikişer farklı dozları MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 48. ve 72 saatte etkin sitotoksisite gösterirken MCF-10A hücreleri canlılık oranları anlamlı düşüş gösterdi. Migrasyon deneyinde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde madde uygulanan gruplardaki aralık kontrole göre geç kapanırken MCF-10A hücreleri 12.saatte tam kapanma gösterdi.

HIF-1α, VEGF, EPO ve C-Raf gen ekspresyonu analizlerinde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde en etkin down-regülasyon, MCF-10A hücresinde en etkin up regülasyonun olduğu IC50 ve kombinasyon harici gruplar curcumin 40 μM ve hidroksiüre 2 mM doz grupları olarak tespit edildi. Real time analizlerinin western blot analizleri ile paralellik gösterdiği belirlendi.

Anahtar sözcükler: Meme kanseri, anjiyogenez, VEGF, EPO, HIF-1α, C-Raf, Bevacizumab, Curcumin, Hidroksiüre

INVESTİGATİON OF ANTİ-ANGİOGENİC AND GENE REGULATORY EFFECTS OF CURCUMIN AND HYDROXYUREA İN BREAST CANCER CELL LİNE

Dokuz Eylul Universty, Institute Of Health Sciences,
Molecular Medicine Department, Izmir
Güler GÜL
guler_gul56@hotmail.com

ABSTRACT

Angiogenesis plays an important role towards the development of and metastasis for breast cancer by affecting the local tumor growth. It is important to develop angiogenesis inhibiting agents that is non-toxic and non-chemoresistant.

The aim of this study is to comment the anti-angiogenic effectiveness of curcumin, bevacizumab and hydroxyurea, alone or combined together, in the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines with MCF-10A normal breast cell line.

Curcumin, concentrating at 40 µM and 50 µM, bevacizumab, concentrating at 250 µg/mL and 350 µg/mL, hydroxyurea concentrating at 1 mM and 3mM were treated in MDA- MB-231, MCF-7 and MCF-10A cell lines during24, 48 and 72 hours. Cytotoxic effect was measured by WST-1 test. IC50 values of curcumin, bevacizumab and hydroxyurea were calculated with graphpad prism programme after 72 hours incubation. Synergy and combination index (CI) in drug combinations were investigated with CalcuSyn software.

Migration of cells were determined with scratch assay. Combination groups which have both synergistic effect and <50% migration value were selected. HIF-1α, VEGF, EPO ve C-RAF gene expressions of these groups were analyzed with Real time PCR, these protein expressions were analyzed

with western blot. Apoptozis was also investigated with caspase-9 protein expression.

For MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A cells respectively, IC50 values of curcumin are 46.96, 53,56 and 39.4 μM, IC50 values of bevacizumab are 232.8, 335.7 and 380.5 μg/mL, IC50 values of hydroxyurea are 0.36, 1.22 and 1.22 mM. Two each different dosages of curcumin, bevacizumab and hydroxyurea have effective cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB-231cells while viability ratios of MCF10A cells don't have significant decrease in 48 and 72 hours. In migration assay, spaces in treated MCF-7 and MDA-MB-231 groups close less as against control group while MCF-10A cells close completely in 12 hours.

In HIF-1α, VEGF, EPO and C-Raf gene expression analyzes, groups except IC50 and combinations which have predominant down regulation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells and up regulation in MCF-10A cells are curcumin 40 μM and hydroxyurea 2 mM dosage groups. Real time analyses show parallelism with western blot analyses.

Key Words: Breast cancer, angiogenesis, HIF-1α, VEGF, EPO, C-Raf, curcumin, bevacizumab, hydroxyurea

1. GİRİŞ AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda kanserden ölümün ana sebebi ve en yaygın kanser tipidir (1). Meme kanserinden ölümlerin çoğu primer tümörden değil, diğer organlara metastazın sonucu olarak gerçekleşir (2).

Anjiyogenez, metastaz oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rol oynar (3). Anjiyogenez tümörün mikroçevre adaptasyonu için önemlidir ve kanserin ayırıcı özelliği olarak tanımlanır (4). Tümörijenitede, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge proanjiyogenik tarafına kayar (5-7). Normal kan damarları, tümöre gerekli oksijen desteği için yetersizdir ve bu tümör hipoksisine yol açar (8). Tümör hücrelerinin ürettiği pro-anjiyogenik faktörler anormal damar oluşumunda artışa neden olur. İndüklenen hipoksik mikroçevre invazyon ve metastazı ilerletir (9).

Hipoksi indüklenir faktör-1 α (HIF-1α) anjiyogenik proteinlerin üretimini tetikler (3, 10, 11). Bunların arasında olan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), endotelyal hücrelerin proliferasyonu, invazyon ve migrasyonu uyarır ve mikrodamar geçirgenliğini arttırır (12-14). HIF-1α tarafından indüklenen diğer bir hormon da Eritropoietin'dir (EPO) (15). EPO, neoanjiyogenez, kanser hücrelerinin sağkalımı ve tümör gelişiminde önemli rol oynamaktadır (16). C-Raf (Raf-1) bir serin-treonin kinazdır. Aktifleşmiş C-Raf, MEK-ERK sinyalizasyonu aracılığıyla VEGF trankripsiyonunun uyarılması için HIF-1α' yı fosforiller (17).

Bevacizumab, meme kanserinde kombinasyon tedavi seçeneklerinden birisi olarak kullanılan ve VEGF ligandları ve reseptörleri arasındaki ilişkiyi inhibe etmesi için tasarlananmış bir monoklonal antikordur. (18, 19, 20).

Prototipik anti-metabolit ilaç olan hidroksiüre (HU) myeloproliferative ve neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan aynı zamanda anti-anjiyogenik etkisi olan sitostatik bir ajandır (21, 22). *Curcuma Longa* bitkisinden alınan elde edilen curcumin anti-tümör ve anti-inflamatuar etkili ajan olup anjiyogenez inhibisyonunda rol oynamaktadır (23).

Bu çalışmadaki amacımız meme ve meme kanseri hücre hatlarında curcumin, hidroksiüre ve Bevacizumab'ın angiogenez ile ilgili gen ifadelerini düzenleyici ve anti-anjiyogenik etkilerinin araştırılmasıdır. Bu doğrultuda,

curcumin, hidroksiüre ve Bevacizumab uygulaması sonrasında tümör anjiogenezinde fonksiyon gösteren genlerden olan *HIF-1α, VEGF, EPO, CRAF* gen ekspresyonlarının düzenlenmesinin gösterilmesi, hücre hatlarında kullanılan ajanların migrasyon etkilerinin araştırılması ve apoptoz belirteci olarak Kaspaz-9 ekspresyonunun incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Yapısı

Meme dokusu memeliler sınıfına özgü olup, yeni doğanın korunması ve gelişimi için süt sentezleyen ve salgılayan spesifik organdır (24). Meme yapı ve gelişim açısından deriye bağlı bir çeşit apokrin bezdir. Meme dokusu üç temel yapıdan oluşur: cilt, cilt altı yağ dokusu ve meme dokusu (parankim ve stroma) (25-28).

Meme lobüller (süt bezleri) ve duktuslar (süt kanalları) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Lobüller ve duktuslar arası boşlukta destek ve yağ dokusu bulunmaktadır. Memede süt salgılayan lobüller, duktuslar ile meme başına açılırlar. Meme de lobüllerin birleşmesiyle loplar oluşur (29). Lobüller, meme dokusunun ana yapı birimini oluşturur. Genç kadınlarda lobüllerin sayıları fazla ve büyük görünümde menapozdan sonra ise azalan yapıdadır.

Çocuklarda, puberteye kadar meme bezleri vücudun büyümesine paralel olarak büyürler. Meme boyutları da yağ dokusundaki belirgin artış nedeniyle büyür (30).

Meme gelişiminde yer alan çok sayıda hormon vardır. Östrojen, progesteron, adrenal kortikoidler, prolaktin, insülin ve büyüme hormonu meme gelişiminde rol oynamaktadır (31, 32).

Memenin lenf damarları önemlidir. Meme kanseri hücreleri, lenf damarlarına girerek lenf nodlarına ulaşır ve burada büyümeye başlayabilirler (33).

2.2. Meme Kanseri Tanım ve Epidemiyoloji

Meme kanseri, meme dokusundan orjinlenen hücrelerin düzensiz çoğalması ve büyümesidir (34). Pek çok meme kanseri duktal hattaki (süt kanalları) hücrelerde başlar. Bazıları ise lobüllerde (süt bezi) ve çok az bir kısım ise diğer dokularda başlar (35). Süt kanallarında oluşan meme kanseri duktal karsinom ve lobüllerde oluşan meme kanseri ise lobüler karsinom olarak adlandırılır (36).

Meme kanseri dünya çapında tüm kansere bağlı ölümlerin %15'inden sorumlu, tüm kanser vakalarının %25'ini oluşturarak, kadınlar arasında en sık tanı alan ve kansere bağlı ölüme neden olan kanser çeşididir (37).

2014 yılı içerisinde tanı konulan her 4 kadın kanserinden 1'i meme kanseridir. Meme kanseri, Türkiye Birleşik Veri Tabanı 2014 verilerine göre kadınlarda en sık görülen kanser olup ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45'inin 50-69, %40'ının ise 25-49 yaş aralığında olduğu bildirilmiştir (38).

Meme kanseri sıklığı ve mortalitesi dünyada coğrafi ve bölgesel farklılık göstermektedir. Batı toplumlarında daha sık görülmekte iken, gelişmekte olan ülkelerde sıklığı daha düşüktür. Bu farklılık sosyoekonomik, demografik ve diyet gibi faktörlerle açıklanabilir (39).

2.3. Meme Kanseri ve Risk Faktörleri

Meme kanseri, genetik ve çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimde olduğu kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Meme kanserinin gelişiminde genetik faktörlerin yanısıra genetik olmayan risk faktörleri de önem taşımaktadır (40). Bunların arasında yaş, aile hikayesi, genetik geçmiş, yaşam tarzı ve diyet, ilk gebelik yaşı, erken menarş, radyasyon, sigara ve alkol kullanımı gösterilebilir.

2.3.1. Yaş

İleri bir yaşa sahip olma meme kanserine yakalanmada risk faktörü olarak görülmektedir (41). 55 yaş üstü kadınlarda meme kanseri gelişiminde risk artışı vardır (42).

2.3.2. Aile Hikayesi

Meme kanseri olan birinci dereceden akraba meme kanseri riskini 2.1 kat arttırmaktadır (43).

2.3.3. Yaşam Tarzı ve Diyet

Yüksek sosyoekonomik statü ve eğitim düzeyinin yüksek seviyelerde olması risk faktörü olarak tanımlanmaktadır (44). Bazı çalışmalarda şişmanlığın özellikle 50 yaş ve üzerindeki kadınlarda meme kanserine yakalanma riskini yükselttiğine işaret edilmektedir (45).

2.3.4. Genetik Geçmiş

Hastaların %27'sinde meme kanseri gelişiminde aileden kalıtılan genetik geçmiş önemli bir rol oynamaktadır (46). Meme kanserine yatkınlık yaratan BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar meme kanseri geliştirme riskini arttırmaktadır (47).

2.3.5. İlk Gebelik Yaşı

İlk hamilelik yaşı meme kanseri riski ile ilişkilidir ve doğum yapmamış kadınlarda, kanser riskinin doğum yapmış kadınlara göre 1.4 kat daha fazla olduğunu belirtilmiştir (48, 49).

2.3.6. Erken Menarş

Erken menstruasyon yaşı, meme dokusunun östrojene maruz kalma süresini uzattığı için meme kanseri riskini arttırmaktadır (50).

2.3.7. Radyasyon

Göğüs bölgesinden radyasyon tedavisi görmek kadınlarda meme kanseri görülme riskini arttırır (51). İyonize radyasyona ve çeşitli çevresel sentetik kimyasallara maruziyet de majör risk faktörlerindendir (52).

2.3.8. Sigara ve Alkol Kullanımı

Yapılan araştırmaya göre düzenli alkol kullanımının, meme kanseri riskini 1.4-1.7 kat kadar arttırdığı belirtilmiştir (53).

Sigara ile meme kanseri arasında tam olarak bir ilişki kurulamasa da bazı araştırmalarda sigaranın meme kanseri gelişiminde bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (54).

2.4. Meme Kanseri Moleküler Sınıflandırma

Gen ekspresyon paternlerine bağlı meme kanseri sınıflandırılması, sağkalım (55, 56), hastalık nüksü (56), metastatik yayılım bölgesi (57) ve kemoterapi yanıtı (56,58) ile korelasyon gösteren klinik alt grubun karakterizasyonu ile sonuçlanmıştır.

Preou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme kanserlerini genomik özeliklerine ve sitokeratin yapılarına göre dört gruba ayırmıştır (59). Sorlie ve ark. yaptıkları çalışmayla daha önce Luminal tip olarak sınıflanan tümörleri Luminal A ve B olmak üzere iki gruba ayırmıştır (60). Meme kanseri immünohistokimyasal olarak ER (östrojen reseptörü), PR (progesteron reseptörü), Her2 ve Ki-67 (aktif olarak bölünen hücrelerin büyük bölümünün göstergesi) bakılarak Tablo 1'deki gibi gruplandırılmaktadır.

Tablo 1. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri

Moleküler Alt Tip	Prevalans	İHK Tanımı	Prognoz
Luminal A	%50-60	ER (+) PR (+) Her2(-) Ki-67 <%1	İyi
Luminal B	%10-30	ER (+) PR (+) Her2 (-/+) Ki-67≥ %14	Orta
Bazal Benzeri	%10-20	ER (-) PR (-) Her2 (-)	Kötü
Her2 pozitif	%10-15	ER (-) PR (-) Her2 (+)	Kötü
Normal Meme Benzeri	%5-10	ER (+) PR (+) Her2 (-)	Kötü

Luminal A, östrojen reseptör pozitif (ER) (+) ve/veya progesteron reseptör pozitif (PR) (+) ve HER2 negatif (HER2-) tir. Yavaş büyüyen ve diğer tiplere

göre daha az agresif özelliktedir. Hormon reseptörlerinin ekspresyonundan dolayı hormonal terapiye cevap verilebilir (61, 62).

Luminal B, luminal A tip gibi ER (+) ve/ veya PR (+) olup Ki-67 için oldukça pozitif durum olarak tanımlanır. Luminal A meme kanseri tipine göre çok agresif özelliktedir (63).

Bazal benzeri tip, aynı zamanda üçlü negatif olarak bilinmektedir. ER(-), PR (-) ve HER2 (-) 'dir. Bu tümörler için hedeflenmiş mevcut terapi olmadığından diğer meme kanseri tiplerine göre erken teşhisi kısa sürede olmamaktadır (62, 64, 65).

HER-2 pozitif meme kanseri tipi fazla HER2 üretirken, hormon reseptörlerini eksprese etmez. Diğer meme kanseri tiplerine göre daha agresif yayılma ve büyüme gösterir (62).

Normal benzeri tip, normal meme doku profili ile karakterize olup luminal A tipi ile benzer immünohistokimyasal özellik gösterir.

2.5. Metastaz

Kanserlerin ve kötü huylu tümörlerin en önemli özelliği, yakınındaki organ ve dokuları istila edip, yayılabilmesi ve orijinal tümörden kopup kan yolu ile vücuttaki uzak yerlere taşınabilmesidir. Bu şekilde hareket eden kanser hücreleri buralarda metastaza ya da sekonderler adı verilen yeni tümörlere yol açabilmektedir (66).

Meme kanserindeki ölümlerin çoğunluğu kendi primer tümöründen değil diğer organlara metastazı sonucunda olmaktadır (67). Tümör gelişimi ve metastazı yeni kan damarlarını gerektirir ve anjiyogenezis tümör büyümesi için temeldir (68). Anjiyogenezis meme kanseri sürecinde ve metastazda çok önemlidir ve olumsuz şekilde prognozu etkiler (69, 70).

Metastaz süreci bir seri adımdan oluşur. Metastaz primer tümörden orjinlenen hücrelerin kendi dokusunda lokal invazyonu ile başlar ve tümör hücrelerinin lenfatik damarlara istilası ve içeri girmesine kadar devam eder (71, 72). Tümör hücreleri uzak organlara kan veya lenfatik damarlar aracılığıyla yayılır. Sonra hücre döngüsünde durarak hedef organda kapiller zemine

yapışırlar. Böylece organ parankimasına yerleşme, proliferasyon ve anjiyogenezi başlatma süreci başlar (71). Bu adımlar sürerken tümör hücreleri simultane olarak immün sistemden ve yaşamını idame ettirmek için apoptozdan kaçar (71, 73). Eğer tümör hücreleri bu adımları başarıyla tamamlarsa sekonder metastazı gerçekleştirmek için bu süreci tekrarlar yani metastazın metastazı olayı olur (72, 74).

2.6. Anjiyogenez

Yeni kan damarlarının oluşum sürecidir (75). Gelişim, çoğalma ve yara iyileşmesinde gereklidir. Bu olaylarda, anjiyogenez oldukça düzenli bir mekanizmadır (76). Besin ve oksijen ihtiyaçlarının karşılanması kan damarları aracılığı ile olur. Endotelyal öncüllerin embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde farklılaşması ile ilkel damarsal ağı oluşturması vaskulogenez olarak adlandırılırken, daha sonra gerçekleşen damar oluşumu ise anjiyogenez olarak adlandırılır (77).

Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki dengenin bozulmasıyla anjiogenezin kontrolü yapılamaz hale gelir. Bu dengesizlik birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar (78).

Hücre adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, transkripsiyon faktörleri ve reseptörlerini içeren bir dizi farklı protein grubu kan-damar farklılaşması ve büyümesini sağlar (79). Fakat kanser gibi patolojik durumlarda aynı faktörlerle indüklenir (80). Onkolojik olay, tümör hücrelerine yaşamlarını sürdürmelerine izin vermesine rağmen, tümörün gelişimi için kan desteği gereklidir (81). Kan desteği alan tümör hücreleri, tümör mikroçevresindeki hücreleri aktive ederek vasküler büyümeyi indükler (80). Tümör ilişkili anjiogenez; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma yetenekleri ile hücre dışı matriks komponentlerine bağlıdır. Anjiojenezde rol alan birçok ajan, tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden ve kollajen matriksin yıkımı sonrasında ortaya çıkabilirler (82). Anjiyogenez, perisitlerden ve bazal membrandan endotelyal hücrelerin ayrılması, bazal membranlar arası

invazyon-metastaz ve sonra tümör çevresinin genişlemesi gibi basamaklarda normal ve tümör hücrelerindeki farklı moleküller arasındaki dengeye bağlıdır (83,84).

En sık tanımlanan anjiyogenik büyüme faktörleri ve sitokinleri, vasküler büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), transforme edici faktör beta (TGF-β) ve angiopoietinlerdir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) de önemli bir anjiyogenez düzenleyicisidir (85).

Son yıllarda yapılan birçok araştırmada meme kanserindeki anjiyogenez ve lenfogenezin invasiv ve insitu karsinom olduğu ve meme kanserinin gelişiminde anjiyogenezin de rolü olduğu klinik-patolojik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (86-89).

Tümör damar düzeninin indüklenmesi ‘’anjiyogenik anahtar’’ olarak adlandırılır (90). Anjiyogenik anahtarın indüksiyonu pro-anjiyogenezin lehine doğru olup tümör tipi ve çevresine bağlı olarak tümör gelişiminin farklı adımlarında oluşabilir (91).

Endotelyal öncül hücreler kemik iliği kaynaklı olup kan aracılığıyla büyüyen damar duvarlarına yerleşmek için taşınır (92). Endotelyal hücre çoğalması ve migrasyonunun aktivatörleri öncelikle VEGF, FGF, PDGF ve EGF gibi reseptör tirozin kinazlardır (82). Onkogen aktivasyonu ya da metabolik strese cevap oluştururken tümör hücreleri damar oluşumu için anjiyogenik anahtarı stimüle eden ya da anjiyogenik faktörlerin salınımı için makrofajları etkileyen VEGF ve Ang1 vasküler büyüme faktörlerini salgılarlar (93).

Damar oluşum süreci angioblastların endotelyal hücrelere farklılaşmasıyla başlar. Endotelyal hücreler de kan adacıklarını oluşturmak üzere çoğalırlar ve sonra primer damar ağı oluşumu için primitif vasküler tüpler ya da lümeni boş damarı oluşturmak için birleşirler. Damarların olgunlaşması migrasyon ile yeni damarların yayılmasına ve endotelyal hücrelerin çoğalmasına neden olur. Anjiyogenezin son adımı damarı çevreleyen perisit ve düz kas hücrelerinin toplanmasıyla damar stabilizasyonunun gerçekleşmesidir (94).

Anjiyogenez, pek çok transkripsiyon faktörü, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler ile düzenlenmektedir (78). Anjiyogenik faktörler arasında

endotelyal hücreler üzerinde reseptörü olup, endotelyal spesifik role sahip olduğu düşünülen 3 grup vardır. VEGFR1 ve VEGFR2 reseptörlerine bağlanan VEGF, Tie2/TER reseptörlerine bağlanan angiopoitinler (Ang1 ve Ang2), Eph A ve Eph B reseptörüne bağlanan Efrin A ve Efrin B dir (95).

FGF' ler, endotelyal hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve tubul formasyonunu uyararak pek çok farklı hücreye mitotik sinyal sağlar (96, 97).

TGF-β' nın apoptoz, adezyon, farklılaşma ve proliferasyonunu etkileyerek endotelyal hücre biyolojisini doğrudan ve VEGF up-regülasyonunu dolaylı olarak düzenleme yeteneği vardır (98). Ayrıca monositler, fibroblastlar ve anjiyogenezdeki diğer önemli inflamasyon ajanları için kemotaktik etki göstererek anjiyogenezi düzenler.

PDGF, PDGF-α ve PDGF-β reseptör tirozin kinazları aktive eder (99-101). PDGF, anjiyogenez sürecinde perisitlerin çoğalması ve bir araya gelmesi için kritik öneme sahiptir (84). Tümör bağımlı perisitlerde PDGFR sinyalizasyonu önemlidir ve bu hücre tipi tümör damar düzeni için önemli bir bileşen olup anti-anjiyogenik terapi için yeni bir hedeftir (102). İnflamasyon ve immün yanıt sırasında aktifleşmiş makrofajlardan salınan inflamatuar bir sitokindir (84). Diğer hücrelerden anjiyogenik faktörlerin üretimini uyararak ve hücrelerin farklılaşmasını sağlayarak doğrudan endotelyal hücreler üzerinde rol oynar (103).

Angiopoietinleri endotelyal hücrelerin spesifik Tie reseptörlerine bağlanan bir ekstraselüler ligand ailesidir (84). Sundukları bir grup reseptör tirozin kinazlar ile anjiyogenez ve vasküler yeniden modellemede fonksiyon gösterirler (104, 105).

VEGF, tümör hücrelerinden salınan bir sitokin olup normal ve tümör anjiyogenezinde önemli bir role sahiptir (106). Damar permeabilitesini arttırır.

2.7. VEGF

Anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı VEGF'dir. VEGF 46 kilodalton ağırlığında, homodimerik bir moleküldür (96). Endotele spesifik mitojenik faktör olarak etki gösterir. Ekspresyonu çeşitli

genlere ve proteinlere bağlı olarak değişim gösterir (107). Mutant p53 proteini ve mutant ras ekspresyonu VEGF ekspresyonunu arttırır (107-109).

VEGF ve reseptörleri anjiyogenezde rol oynar (110). VEGF ailesi 5 VEGF glikoproteini (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E) ve plasental büyüme faktörlerini (PGF 1,2) içerir. En iyi tanımlanmış olanı VEGF-A' dır. VEGF-A ve reseptörü olan VEGFR-2 anti-anjiyogenik ajanların anahtar hedefidir. VEGF endotelyal hücreleri hedefler ve tümör anjiyogenezini düzenlemek için kanser hücrelerinden salınır (111). VEGFR-2, VEGF-A' nın anjiyogenez sürecindeki hücresel etkilerini düzenler (112).

VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz C, PI3K ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar (112).

Başta ras, src ve her-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF-β, IGF-1, TNF-α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (112). Hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksi indüklenir faktör-1 (HIF-1)'de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (113).

Son yıllarda anti-VEGF-VEGFR ilaçları geliştirilmekte ve önemli solid tümör tedavilerinde kullanılmaktadır (114, 115).

2.8. HIF-1

Hipoksik stres, invaziv tümör gelişimi ve metastazı için gereklidir ve anjiyogenez düzenlenmesinde önemli rol oynar (116). Birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayın gen seviyesindeki düzenlenmeleri, hücrelerin oksijensiz ortamda oksijenlenmeyi sağlayacak yeni damar oluşturması, alyuvar üretiminde artış ve anaerobik glikoliz dahil metabolizmadaki pek çok değişiklik hipoksiyle düzenlenmektedir (117, 118).

Hipoksi, oksijen desteği olmayan mekanizmalarla tümörü genişletir (119, 120). Hipoksi VEGF ekspresyonunu indükleyen önemli faktörlerden biridir (121).

Düşük oksijen seviyesiyle artan VEGF ekspresyonunun temel aracısı HIF-1α ve HIF-1β alt birimlerini içeren hipoksiyle indüklenen faktör-1 dir (122).

Solid tümörlerin iç kısmında gözlenen hipoksik şok HIF-1' i aktive eder (123). HIF-1, VEGF promotorundaki hipoksi cevaplayıcı elementler (HRE) olarak bilinen 5' konsensus dizisine bağlanır ve böylece onun ekspresyonunu başlatır (124). Oksijen bağımlı bir transkripsiyon aktivatörü olan HIF-1α anjiyogenez, düşük oksijene metabolik adaptasyon ve sağkalımla ilgili birçok genin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (125, 126). Oksijen varlığında HIF-1α post transkripsiyonal modifikasyon sonrası proteozomlar tarafından hızla yıkılır (127). Hipoksik şartlar altında, HIF-1α stabil kalır ve nükleusa geçer, nükleusta kanser hücrelerinin büyümesi ve sağkalımı ile ilgili birçok genin transkripsiyonunu aktive etmek için HIF-1β ile heterodimerlerini oluşturur (126,128).

HIF-1α' nın fazla ekspresyonunun çeşitli tümör tiplerinin metastatik güç ve yüksek büyüme hızıyla bağlantılı olduğu bildirilmiştir (129-131). HIF-1α pozitif hücrelerin yüksek sıklığı meme kanserinin kötü prognozu ve ilerlemiş klinik durumlarıyla bağlantılıdır (129). Tanıda HIF-1α' nın yüksek seviyesi erken tekrarlama ve metastazda öngörücüdür ve insan meme kanserinde kötü klinik verilerle ilişkilidir (132-134). HIF-1 hedef genlerinin ekspresyonu üçlü negatif meme kanseri gruplarında arttığı bildirilmiştir (135). HIF-1α, anjiyogenez, kök hücrenin devamlılığı, metabolik yeniden programlama, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), invazyon, metastaz, radyasyon terapi ve kemoterapiye direnç gibi meme kanseri biyolojisinin birçok önemli yönlerinde anahtar rol oynar (136).

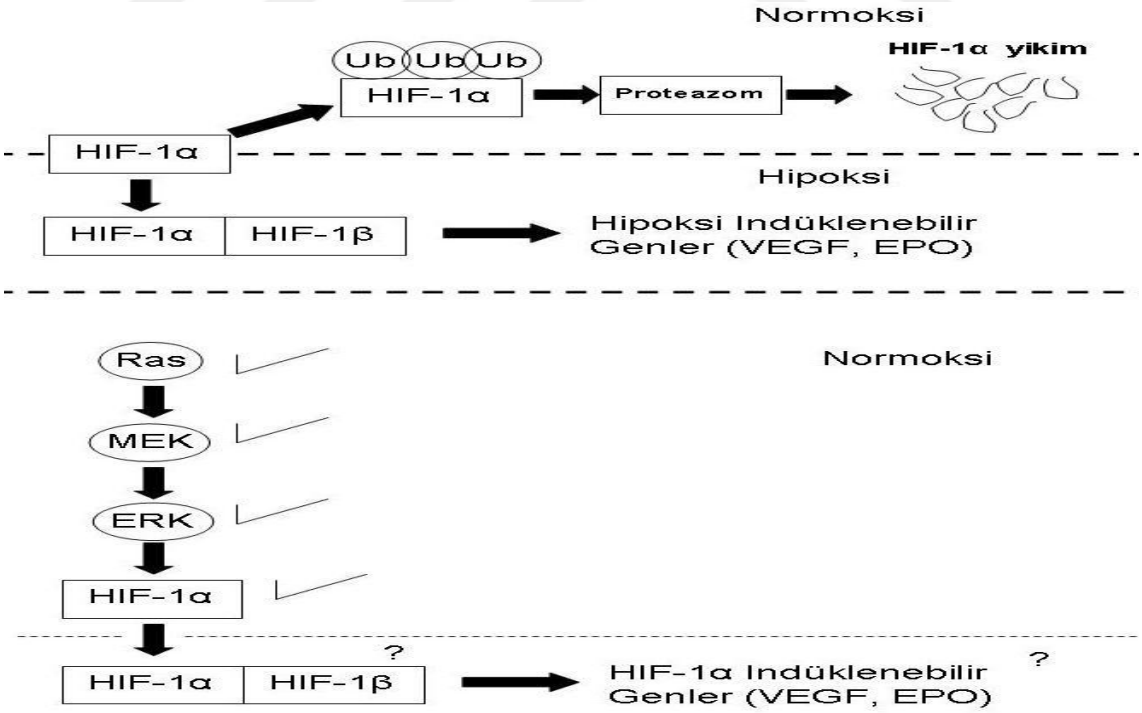
2.9. Raf/MEK/ERK Sinyal Yolağı ve C-Raf (Raf-1)

Ras küçük bir GTP bağımlı protein olup Raf/MEK/ERK ve PI3K/Akt gibi çeşitli sinyal yolaklarında rol alan moleküldür (137). Dinlenme fazındaki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GTP bağlanarak konformasyonel değişim olur. GTP bağlı Ras aktif haldedir ve hücre membranına Raf' ın yerleşmesini sağlar. Ras, insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğramış haldedir (138).

Memeli *Raf* gen ailesi, *A-Raf, B-Raf ve C-Raf (Raf-1)* den oluşur. Raf-1 bir serin-treonin kinaz olup Ras' ın plazma membranına interaksiyonu (139), Raf' ın dimerizasyonu (140), fosforilasyon/defosforilasyon (141) ve Raf kinaz inhibitör proteinin ayrılması (142, 143) gibi kompleks seri olaylarla aktifleşir.

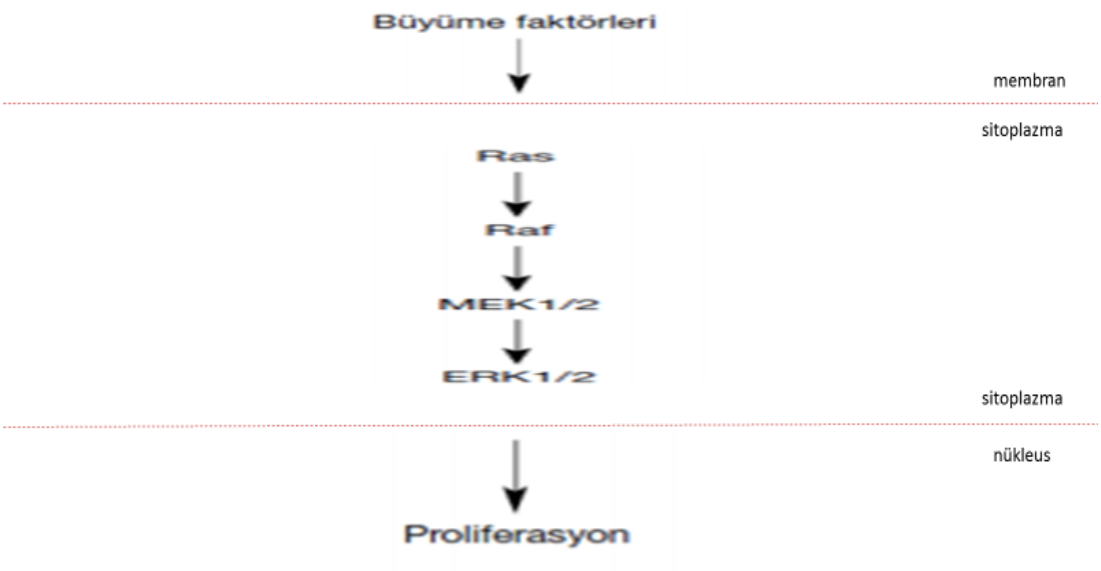
Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazların membrana yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar. Raf kinazlar da mitojen aktive ekstraselüler sinyal düzenleyen protein kinaz (MEK) ve ekstraselüler sinyal düzenleyen kinaz (ERK) yolağını aktive ederler (144). Aktive olan ERK, nükleusa yerleşir. Transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek aktive eder ve böylece hücre döngüsünden sorumlu genlerin aktivasyonunu başlatır (145).

HIF-1α Ras bağımlı yolda aktive olmakta (146) ve PI3K/Akt ile ERK1/2 sinyal yolakları HIF-1α protein ekspresyonu ile ilişkilidir (147). Ekstraselüler düzenleyici kinaz (ERK) mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) sinyal kaskadının bir üyesidir. ERK aktivasyonu anjiyogenezle bağlantılı hipokside gözlenmiştir (148, 149).



Şekil 1. Hipoksi ve normoksi yanıtı (150- 154)

Ras proteinleri küçük G proteinlerindendir ve protein sentezi, transkripsiyon, anjiyogenez, hücre döngüsü, hücre çoğalması ve hücre yaşamı dahil birçok hücresel fonksiyonu düzenlemek için MEK ve ERK aracılığıyla reseptör sinyallerini RAF protein serin\treonin kinaza iletir (155, 156). Mikroçevrede oluşan tümör anjiyogenezini indükleyen VEGF Ras ile aktive olmaktadır (157).



Şekil 2. Raf/MEK/ERK sinyal iletimi

2.10. EPO

Glukoprotein hormon eritropoietin (EPO) yetişkinlerde başlıca böbrek tubulointerstial hücrelerinde üretilir ve eritropoezin ana düzenleyicisidir (158). Eritropoietin (EPO) 34 kDa ağırlığında bir glikoprotein hormondur (159). EPO, eritroid öncüllerinin apoptozunu baskılayıp, proliferasyon ve farklılaşmasını uyararak fetal, neonatal ve yetişkin eritrositlerinin üretiminin devamını sağlar (160, 161). Reseptörü EPOR hipoksi indüklüdür (162, 163). EPOR sinyalleri PI-3K/AKT ve MAPK/ERK sinyalizasyonlarıyla ilişkilidir (164).

Anemi ve sonrasında gelişen doku hipoksisine bağlı olarak EPO gen ekspresyonu artar (165). EPO eritrositik progenitör hücrelerin sağkalım,

çoğalma ve farklılaşmasını sağlar (166). Oksijen desteği anemi ya da hipoksik şartlar ile kesildiğinde, periferal kandaki EPO konsantrasyonu önemli ölçüde azalır.

Transkripsiyon seviyesinde, EPO gen ekspresyonu HIF ile düzenlenir (167-169). Hipoksiye cevapta EPO üretimi HIF-1α tarafından uyarılır ve genellikle tedaviye direnç, daha yüksek tümör agresifliği ve kötü prognozla ilişkilidir (170). Hipoksik şartlar altında EPO indüksiyonu oluşur ve HIF-1α' nın bağlanmasıyla aktive olur (171). EPO reseptörleri (EPOR) anjiyogenez mekanizmasının bileşenleri olarak bilinir (172, 173). EPO ve EPOR embriyogenez sürecinde vaskülaritede eksprese olur ve anjiyogenez için kritik rol oynar (174). EPO molekülü tümör gelişiminde önemli bir faktör olup neoanjiyogenez, kanser hücrelerinin sağkalımı ve tümör gelişiminde önemli rol oynamaktadır (175).

2.11. Apoptoz

Apoptoz birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (176).

Yüksek organizmalarda hücre ölümü iki farklı olay ile meydana gelir, klasik hücre ölümü nekroz olarak tanımlanır. Hücre ölümün diğer şekli olan apoptoz ise birçok fizyolojik ve patolojik durumda ortaya çıkar ve genellikle inflamasyon olmaz (177).

Hücrenin yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Tüm hücre ölümleri fizyolojik şartlarda meydana geldiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (178).

Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hücresel yaralanma ve inflamasyon olmadan oluşur (179). Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde önemli bir rolü vardır (180).

Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptoz ile öldürülmesi önemlidir (181,

182). Tümörlerde sık görülen bir olay olup hücre ölümüne yol açan aktif olarak düzenlenmiş bir hücresel süreçtir. Apoptoza karşı direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlar (183).

Apoptozda esas morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalanmasıdır (184). Apoptozun erken evresinde hücreler sentrozomlarından ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler (185). Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (186).

Apoptoz 30 – 60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir (187).

Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün aktive olması, viral veya bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (cmyc gibi) yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler (188).

Apoptoz süreci; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı aracılığıyla ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir (189).

Apoptoz sürecinde önemli 3 bileşen vardır. Bunlar; Bcl–2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 proteinidir. Bu bileşenler, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (190).

Bcl-2 / Bax gen ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır (182). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya

geçerler (191). AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanan çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom-c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom-c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptozom' olarak isimlendirilir (182, 192).

Apoptozom kompleksindeki prokaspaz-9 ayrılarak aktifleşir. Aktif kaspaz-9, proteolitik kesim ile sonlandırıcı prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktive kaspaz-3, apoptozla ilgili hücresel bozuklukları sağlar ve hücre apoptoza gider (193, 194).

TNF, Ras/Raf/Erk, PI3–kinaz/Akt (PKB) gibi proteinler apoptozda görev yaptıkları gibi hücre sağ kalımında da görev yaparlar. Bu görevlerini de fosforilasyon ve defosforilasyon yoluyla yaparlar (195).

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır (196).

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler (196).

Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7) ve inflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) olmak üzere üçe ayrılırlar. DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar (197-199).

2.12. Kaspaz-9

Kaspaz-9 46 kDa ağırlığında olup öncül protein olarak sentezlenir. Diğer kaspazlar gibi 3 domain içerir: N terminal pro-domain, büyük alt birim ve küçük alt birim (200, 201).

İnsan kaspaz-9 proteini fosforilasyon ile negatif yönde düzenlenir. Bir serin treonin kinaz olan Akt, apoptozu baskılama sürecinde kaspaz-9'u fosforiller ve onun aktivasyonu ile proteaz aktivitesini inhibe eder (202).

Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur (197,198, 203). Apoptozom kaspaz- 9'u keserek aktifleştirir.

Kaspaz-9 hipoksi ile oluşan patolojik durumlarda merkezi rol oynar (204).

2.13. Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin, Genentech, San Francisco, CA, ABD) hümanize rekombinant monoklonal immünglobulin g (IgG) antikorudur. Tüm VEGF-A izoformlarına bağlanarak onları inhibe eder (205-207). Bevacizumab 148 kDa ağırlığındadır (208).

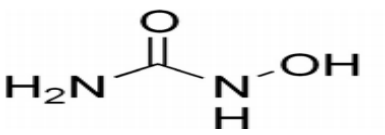
Birçok solid tümörlerin (kolerektal, meme, yumurtalık, akciğer ve böbrek) ve glioblastomların tedavisinde kulanılmaktadır (207, 209-211).

Anti-VEGF ajanı olan Bevacizumab, damar büyümesini inhibe etme, patolojik mikro damarların regresyonunu indükleme, normal damar stabilizasyonunu sağlama ve sızıntıyı engelleme gibi etkiler göstermektedir (212).

2008 yılında meme kanserinde Bevacizumab kullanımı onay almıştır, fakat 2011 yılında FDA tarafından yan etkileri ve genel sağ kalıma etkisiz olması sebebiyle kullanılması önerilmemiştir (213).

2.14. Hidroksiüre

Hidroksiüre (HU), ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe eden bir antimetabolittir (214). Hidroksiüre kronik myelogenik lösemi, baş-boyun kanseri ve diğer kanserlerin tedavisinde kullanılır (215, 216). Kullanım kolaylığı, düşük toksisite, düşük fiyat ve etki çeşitliliği Hidroksiürea'nın yıllardır tedavilerde yer bulmasını sağlamıştır (217).

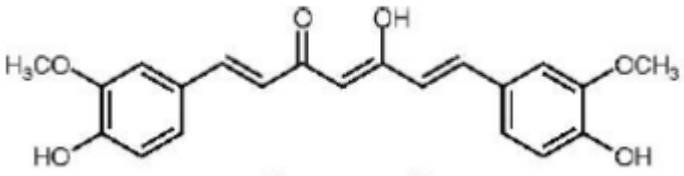


Şekil 3. Hidroksiürenin kimyasal yapısı (218)

Çoklu kanserlerde radyo-duyarlılaştırıcı olarak kullanılır (219-221). DNA sentezinin potansiyel inhibitörüdür (222, 223). HU' nun ilk anti-kanser ve hücresel hedefi ribonükleotid redüktaz (RNR)'dır. RNR, DNA replikasyonu ve onarımında dNTP sağlamak için aynı deoksi formların ribonükleotidlerini azaltır (224, 225). Hidroksiürea, endotelyal hücreler üzerinde VEGF seviyelerindeki azalmayla ilişkilidir (226). Orak hücre anemisinde Hidroksiürea tedavisi, anjiyogenik trombospondin-1 artması (227) ile pro-anjiyogenik faktörlerin azalmasıyla ilişkilidir (228).

2.15. Curcumin

Kaynağı, Güneydoğu Asyadaki insanların sıklıkça kullandığı zerdeçal (*Curcuma Longa*) baharatı olan curcumin (diferulometan) sarı renkli bir polifenoldür (239).



Şekil 4. Curcuminin kimyasal yapısı (230)

Curcumin anti-tümör ve anti-inflamatuar etkili doğal ajandır (231). Moleküler hedefleri arasında trankripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri, sitokinler, enzimler ve hücre proliferasyonu ile apoptozu düzenleyen genler vardır (232).

pH 7'nin üzerinde rengi sarıdan kırmızıya doğru döner. Moleküler ağırlığı 368.37 g/mol ve erime noktasıda 183 ˚C'dır. Curcumin suda çözünmeyen fakat aseton, DMSO ve etanolde çözünebilen bir moleküldür (233).

Preklinik çalışmalar curcumin' in meme kanseri dahil çeşitli kanser hücre hatlarında G1/S ya da G2/M fazlarındaki hücre döngüsünün durdurulmasını indükleyen anti-karsinojenik ajan olduğunu belirtmiştir (234-236). Curcumin ayrıca çeşitli transkripsiyon faktörlerini ve protein kinazları etkileyerek tümör

hücrelerinin transformasyonunu, proliferasyonunu ve invazyonunu engellemek için birçok fonksiyona sahiptir (237). Bazı çalışmalarda curcumin' in anti-anjiyogenik etki gösterdiği gösterilmiştir (238-244).

Yapılan çalışmalarla curcuminin, hücre proliferasyonu, hücre invasyonu, metastaz ve angiogenezle alakalı bir nükleer transkripsiyon faktörü olan NF-κB' yi inhibe ettiği ortaya konmuştur (245).

Yapılan çalışmalarla curcumin'in NIH3T3 hücresinde *VEGF* ekspresyonunu inhibe ettiği ve MDA-MB-231 meme karsinom hücre hattında iki önemli anjiyogenez faktörü olan *VEGF* ve *FGF*' in ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (246, 247). İnsan meme kanserinin ksenograft modelinde yapılan bir araştırmada curcumin tedavisinin akciğer metastaz insidansını azalttığı ve *NF-κB* ve *COX–2* ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (248).

2.16. İlaç Kombinasyonlarında Sinerjizm

1984 yılında Paul Talalay tarafından kombinasyon indeks terimi tanımlandı ve Joseph Chou ile beraber bilgisayar tabanlı yazılıma dönüştürüldü (249). İlerleyen çalışmalarla CalcuSyn veritabanı ikinci nesil olarak geliştirildikten sonra (250) 2005 de üçüncü nesil CompuSyn veritabanı Nick Martin tarafından yazıldı (251).

Bu yöntem, ilacın etkisi ve ilacın dozu, sitotoksisitesi, sitotoksik etkisi arasında en basit şekilde ilişki kurulabilmesini sağlamaktadır. Denklem ise şu şekildedir.

$$D = D_m \left[\frac{f_a}{1 - f_a} \right]^{1/m}$$

D: İlacın dozu, Dm: İlacın gücünü (potentliğini) gösteren ortanca etkili doz (bu değer median-efekt grafiğinin x bölümünden elde edilmektedir), fa: doz tarafından etkilenen bölüm, 1-fa: doz tarafından etkilenmeyen bölüm, m: doz etkinlik eğrisinin keskinliğini veren katsayı (252).

Median efekt denklemi ile x kadar yüzdesini inhibe eden ilaç dozu hesaplanılır. Bu değer de Dx olarak gösterilir. CI (kombinasyon indeksi) ise şu şekilde hesaplanır:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1[f_a/(1-f_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2[f_a/(1-f_a)]^{1/m_2}}$$

$(Dx)_1$ % x oranında inhibisyon yapan $(D)_1$ dozudur. $(Dx)_2$ % x oranında inhibisyon yapan $(D)_2$ dozudur.

İlaçların sinerjistik, antagonistik, aditif etkileri CI aralığına bağlı olarak değerlendirilir. CI değerine göre nasıl değerlendirme yapıldığı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. İlaçların kombine kullanımının etkilerini belirlemek için kombinasyon indeksi (CI) değerleri

CI (Kombinasyon İndeksi)	Sitotoksik Etki
0.1<	Çok kuvvetli sinerjizm
0.1 – 0.3	Kuvvetli sinerjizm
0.3 - 0.7	Sinerjizm
0.7 – 0.9	Hafif sinerjizm
0.9 – 1.1	Aditif
1.1 – 1.45	Hafif antagonizm

Kısaca kombinasyon indek (CI) aralığı, sinerjizm (CI <1), additif etki (CI = 1) ve antagonizm (CI > 1) olarak tanımlanır.

İlaçların kombine kullanımı ayrı ayrı kullanımından daha güçlü ise sinerjizm, daha etkisiz ise antogonizm etkinliği vardır (253, 254). Eğer ilaçların kombine kullanımı ayrı ayrı kullanımna eşitse additif etki olarak tanımlanır.

Geleneksel sitotoksik ajanların kombine tedavisi, ilaçların tek başlarına gerçekleştiremedikleri faydalar sağlamaktadır. Farklı ilaçların kombine kullanımı hücre içerisinde aynı anda farklı hedef molekülleri etkisiz hale getirebilir.

Sinerjistik terapötik etkiye ulaşmanın ana amacı, doz ve toksisiteyi azaltarak ilaç direncini düşürmek veya minimize etmektir (255).

Kombinasyon dozlar ile her ilacın tek tek elde ettiğinden daha fazla hücre ölümü gerçekleşmektedir. Kanser, hücrelerinin ilaca karşı geliştirdiği direnci azaltır veya yavaşlatır. Kişide toksik antagonizme yol açmadan hedef moleküle karşı seçici sinerji sağlar. Bu klinik faydalarından dolayı ilaç kombinasyonları kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonlarının sinerjistik etkilerini araştırmak üzere CompuSyn (Biosoft, İngiltere) yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım ile medyan etki denklemi ve kombinasyon indeksi denklemlerine göre ilaçların sinerjistik, antagonistik veya aditif etki gösterip göstermediğini otomatik olarak analiz edilebilmektedir.

2.17. Hücre Hatları

MDA-MB-231, MCF-7 meme kanseri hücre hatlarıdır. MDA-MB-231 bazal tip meme kanseri olup östrojen reseptör negatif (ER-), progesteron reseptör negatif (PR-) ve Her2 negatif (Her2-) dir (256, 257). MDA-MB-231 hücre hattı MCF-7’ ye göre oldukça invaziv olup antikanser ajanlarına karşı daha dirençlidir (258).

MCF10A meme epitelyal hücre hattı normal meme hücre modelinde sıklıkla kullanılır. Bu hücreler iyi huylu (benign) proliferatif meme dokusu kaynaklıdır ve ilgili faktörler olmadan çoğalırlar. Tümörijenik değildir ve östrojen reseptörünü eksprese etmezler (ER-) (259). MCF 10A bazal tip fenotiple benzerlik gösterir (260). İnsülin, glukokortikoid, kolera enterotoksin, and epidermal büyüme faktörüne (EGF) duyarlıdır.

Bu çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 ve MCF-7 ile normal meme hücre hattı olan MCF-10A’ nın özellikleri Tablo 3’ deki gibidir (261).

Tablo 3. MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF-10A' nın özellikleri

	MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A
Organizma	İnsan	İnsan	İnsan
Doku	Meme	Meme	Meme
Hücre Tipi	Epitelyal	Epitelyal	Epitelyal
Hastalık	Adenokarsinom	Adenokarsinom	Non tümörijenik
Cinsiyet	Kadın	Kadın	Kadın
Etnik Yapı	Kafkas	Kafkas	Kafkas
Kültür Ortamı	DMEM,%10FBS	DMEM,%10FBS	DMEM/F12,%5 HS
Kültür Şartları	37^0C, 5% CO_2	37^0C, 5% CO_2	37^0C, 5% CO_2

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

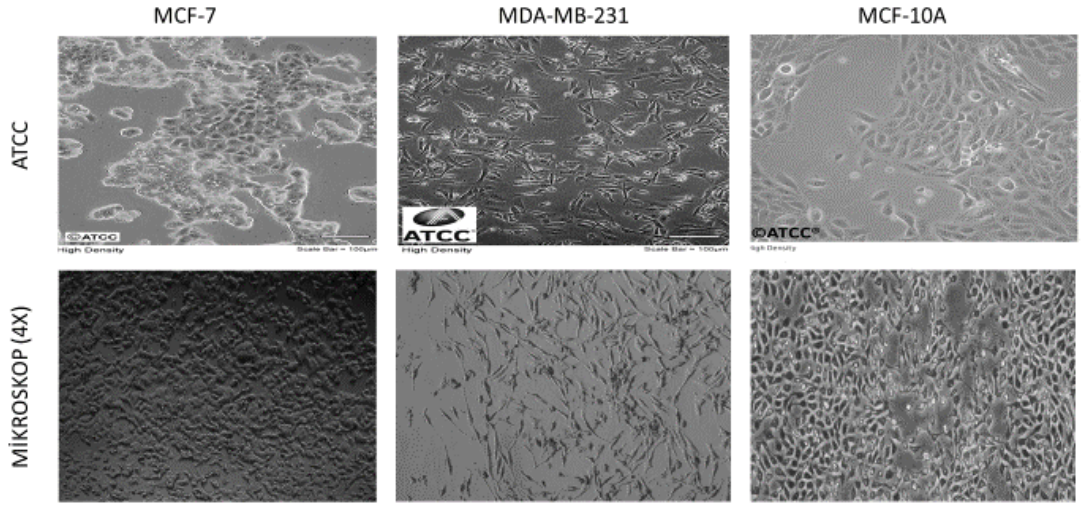
Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Bu araştırma Ocak 2016 ile Ocak 2017 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

3.3. Çalışma Materyali:

Araştırmada MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A normal meme epitel hücre hatları kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarının ATCC (262-264) ve çalışmada kullanılan mikroskoptaki morfolojik görüntüleri Şekil 5' deki gibidir.



Şekil 5. MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarının morfolojik görüntüleri

3.4. Çalışmanın Değişkenleri:

Çalışmanın bağımsız değişkeni: curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre maddelerinin doz ve inkübasyon süreleri

Çalışmanın bağımlı değişkeni: Hücre canlılık oranları, VEGF, HIF-1α, EPO, C-RAF ve Kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri, *VEGF, HIF-1α, EPO* ve *C-RAF* gen ekspresyon düzeyleri

3.5. Veri toplama Araçları:

3.5.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihaz ve malzemeler.

Malzeme/Cihaz Adı	Markası
DMEM	Life technologies
DMEM/F12	Life technologies
Fetal dana serum (FBS)	Life technologies
Penisilin/Streptomisin	Life technologies
İnsülin	Life Technologies
Hidrokortizon	Santa Cruz
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Life technologies
L- Glutamin	Life technologies
Tripsin/EDTA	Life technologies
At serumu (Horse Serum)	Life technologies
PBS (1X)	Life technologies
Moleküler kalite ultra saf su	Biological Industries
Moleküler kalite etanol	Millipore
Etanol	Tekkim
Tripan mavisi	Sigma

Dimetilsülfoksit (DMSO)	Santa Cruz
25 cm^2'lik Kültür Kabı	Corning
75 cm^2'lik Kültür Kabı	Corning
Steril Santrifüj Tüpü (15 mL)	Corning
Steril Santrifüj Tüpü (50 mL)	Corning
Steril Serolojik pipet (5, 10 ve 25 mL)	Corning
Steril filtre (0,22 µm)	Millipore
Şarjlı pipetör	Thermo
Hücre dondurma tüpleri (1.8 ml)	Corning
Laminar Akımlı Kabinet	HERAsafe
CO_2 İnkübatörü	Revco
Faz kontrast inverted mikroskop	Nikon
Santrifüj	Hettich Rotofix
Hücre kültürü aspiratörü	CA-Mİ Aspiret
Cam pastör pipeti	İso-lab
Otoklav	Hirayama
Manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica Ared
Derin Dondurucu -80^0 C	Thermo
Derin Dondurucu -20^0 C	Profilo
Buzdolabı +4^0 C	Samsung
Vorteks	Velp Scientifica
Hassas terazi	Sartorius
Sıvı nitrojen tankı	Thermo
Su banyosu	Memmert

Bu çalışmada kullanılan MCF-7 hücre hattı Doc. Dr. Zeynep Sercan' dan, MDA-MB-231 hücre hattı Prof. Dr. Safiye Aktaş ve Yrd.Doc.Dr. Özden Yalçın' dan, MCF-10A hücre hattı Yrd.Doc.Dr. Özden Yalçın ve Prof. Dr. Ruchan Uslu' dan alınmıştır.

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri için, 10% fetal sığır serumu (FBS), %1 L-Glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenen DMEM besiyeri kullanıldı.

MCF-10A hücreleri için %5 at serumu, 20ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF), 0.5 mg/ml hidrokortizon, 10µg/ml insülin 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenen DMEM/F12 besiyeri kullanıldı. Hücreler %5 CO_2 içeren inkübatörde 37° C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

Hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında 1:2, 1:3 oranında pasajlanmaları yapılarak kültürün devam etmesi sağlandı. Hücreler pasajlanırken 1xPBS ile yıkanıp besiyerinin hücre yüzeyinden uzaklaştırılması sağlandı. Flaska yapışan hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması için %0.05 tripsin/EDTA kullanıldı.

3.5.1.1. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler % 0.05 tripsin/EDTA kullanılarak flask yüzeyinden kaldırıldı ve 15 ml' lik santrifüj tüpüne alındı,1250 rpm' de, 4°C' de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra tüp içerisine dondurma besi yeri (MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri için %90 FBS, %10 DMSO; MCF-10A hücreleri için %70 bazal medium, %20 FBS ve %10 DMSO) eklenip hücre içeriği cryovial tüplerine alındı. Tüpler -20°C' de iki saat muhafaza edildikten sonra -80°C'lik dondurucu dolaplara ve sonrasında da sıvı nitrojen tankına -196 °C' de saklanmak üzere aktarıldı.

3.5.1.2. Hücrelerin Çözülmesi

Donmuş hücreler alınıp su banyosu' nda (37°C) çözüldükten sonra hücre içeriği 15 ml' lik santrifüj tüpü içerisine alındı. İçesine besiyeri ilave edilerek hücreler seyreltildi ve 1250 rpm' de 5 dk. santrifüj edilerek DMSO 'dan uzaklaştırıldı. Pelet üzerine besiyeri eklenerek pelet homojen hale getirildi ve flasklara alınıp kültürün devamı sağlandı.

3.5.1.3. Hücrelerin Sayılması

Tripan mavisi testi kullanılarak canlı ve ölü hücre sayımı Thoma Lamı üzerinde yapıldı. Lamın iki farklı kısmına tripan mavisi ile karıştırılan hücre içeriği yüklendi ve seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayıldı ve ikiye bölünerek ortalama hücre sayısı hesaplandı. Hücreler yoğun ise süspansiyon dilüe edildi ve yapılan hesaplamaya dilüsyon faktörü de dahil edildi. Çalışmada kullanılacak hücre sayıları bu yöntem kullanılarak ayarlandı.

Bu metotta, canlı hücreler boyanmazken ölü hücreler boyayı alarak maviye boyanır. 1 ml içindeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Hücre sayısı (1 ml)= Ortalama canlı hücre sayısı x dilüsyon faktörü x 10^4

3.5.2. Curcumin Ve Hidroksiüre Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Curcumin (Santa Cruz) konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde DMSO (Santa Cruz) içerisinde çözülerek hazırlandı ve sonra DMSO oranı % 0.1 olacak şekilde besiyeri içerisinde seyreltildi (265).

Hidroksiüre (Santa Cruz) konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde moleküler seviye ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (266). Steril ortamda 0,22 µm' lık steril filtreden geçirildi ve -20^o C' de saklandı.

3.5.3. Deney Grupları

Çalışmada öncelikle literatür taramasına dayanarak doz denemeleri yapıldı. Curcumin 40 µM, 50 µM, 60 µM ve 80 µM (267,268, 269); Bevacizumab 250 µg/ml), 350 µg/ml, 450 µg/ml ve 550 µg/ml (270, 271,272); hidroksiüre 1 mM, 3 mM, 5 mM ve 7 mM (273, 274) dozları ile WST-1 testi yapıldı. İnkübasyon süresi ve doz miktarı arttıkça % canlılık değerinde azalma gösteren 2'şer faklı dozlar seçildi. Çalışmada kontrol grubu (madde eklenmemiş grup), çözücü olarak kullanılan DMSO grubu, curcumin, hidroksiüre ve Bevacizumabın 2' şer doz grupları olmak üzere her hücre hattı için toplam 8 grup belirlendi. Çalışmada kullanılan maddeler Tablo 5' de gösterilen konsantrasyonlarda uygulandı.

Tablo 5. Çalışmada uygulanacak olan madde konsantrasyonları

	Curcumin	Hidroksiüre	Bevacizumab
1. Doz	40 µM	1 Mm	250 µg/ml
2.Doz	50 µM	3 Mm	350 µg/ml

Uygulama süresi 24, 48 ve 72 saat olarak belirlendi. Kontrol grubundaki hücreler madde uygulanmadan aynı sürelerde kültüre edildi.

3.5.4. WST-1 Testi

Sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan WST-1 testi canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testtir. Tetrazolium tuzları hücresel enzimler tarafından formazan tuzlarına dönüştürülmektedir. Canlı hücre sayısındaki artış örneklerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Enzim aktivitesinin güçlenmesiyle birlikte kültürdeki hücrelerde metabolik olarak aktif halde bulunan hücrelerin miktarı ile doğrudan korele olarak formazan ile boyanan hücre formunda artış olmaktadır. Formazan boya metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilmekte olup, spektrofotometre ile belirtilen dalga boyunda boyanan hücrelerin absorbansı ölçülmektedir (275).

96 kuyucuklu plaklara (Corning) her bir kuyucukta $4x10^3$ hücre olacak şekilde toplam hacmi 100 µl olan hücre süspansiyonu eklendi. Hücreler 37° C, %5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra Tablo 5' de belirtilen konsantrasyonlarda madde eklendi. Her bir grup için 5 kuyucuk planlandı. 24, 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuk için 10 µl WST-1 solüsyonu (Roche, Almanya) eklendi. Plaklar 3-4 saat 37°C ve %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra ELISA okuyucu (Biotek) ile 450 nm' de ölçüm yapılmıştır. Yapılan WST-1 testi 3 kere tekrar edildi. Bu deneyde kullanılan DMSO çözücüsünün ortamdaki oranı %0,1 olarak belirlendi. Bu oran hücreler üzerinde sitotoksik özellik göstermedi. % hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Hesaplama: % Canlılık= (Ortalama Örnek Abs – Kör Abs/ [Ortalama Kontrol Abs- Ort. Kör Abs]) x 100

3.5.5. IC50 Değerlerinin ve Kombinasyon Gruplarının Sitotoksik Sinerjisinin Araştırılması

Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu IC50 olarak tanımlanır. Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre 2 farklı dozda hücrelere uygulandıktan 72 saat sonra tespit edilen hücre canlılık değerleri baz alınarak maddelerin her birinin IC50 değerleri graphpad prism 7 programı ile hesaplandı.

Kombinasyonların sinerjistik etkilerini araştırmak üzere CampuSyn yazılımı kullanıldı. WST-1 testi sonucunda elde edilen absorbans değerlerine göre hesaplanan sitotoksisite yüzdeleri CalcuSyn programına girildi. Curcumin ve Bevacizumab'ın ikişer farklı dozlarıyla olan kombinasyonlar ve IC50 değerleri ile olan kombinasyon; curcumin ve hidroksiürenin ikişer farklı dozlarıyla olan kombinasyonlar ve IC50 değerleri ile olan kombinasyon; Bevacizumab ve hidroksiürenin ikişer farklı dozlarıyla olan kombinasyonlar ve IC50 değerleri ile olan kombinasyon; curcumin, Bevacizumab ve hidroksiürenin ikişer farklı dozlarıyla olan kombinasyonlar ve IC50 değerleri ile olan kombinasyon olmak üzere her hücre hattı için toplam 24 grup oluşturuldu. Bu kombinasyonlar ile ilaç potansiyellerinin kombinasyonunun sinerjisi 72 saatlik hücre kültürü inkübasyonlarında araştırıldı. 72 saat sonunda WST-1 testi yapıldı ve % hücre inhibisyon oranları hesaplanarak veriler CalcuSyn programına girildi. En iyi sinerjistik etkili kombinasyon oranı seçildi.

3.5.6. Migrasyon Testi (Scratch Assay)

Bu yöntem in vitro hücre migrasyonunun incelenmesinde kullanılmaktadır (276). 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (12 multi-well plate) $3x10^5$ sayıda hücre ekimi yapıldı, %70-80 konfuluensiye ulaştıktan sonra büyütülen hücrelerin bulunduğu yüzey alanını ortalayacak şekilde 200 µl 'lik pipet ucu kullanılarak düz bir çizik atıldı (scratch) ve böylece hücreler arasında yapay bir boşluk

oluşturuldu. 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarında (Corning) büyütülen hücreler arasında bu boşluk alanları oluşturulduktan sonra çalışmada kullanılan test maddeleri uygulanarak 0, 12, 24 ve 48. saatlerde mikroskop altında aynı alan olmasına dikkat edilerek görüntü alındı ve hücrelerin göçü gözlendi. Hücre görüntüleri 4x büyütme ile invert mikroskop (Nikon) kullanılarak elde edildi. Image J bilgisayar programı kullanılarak 0. saatteki boşluğun genişliği referans alınarak 48.saatteki boşluktaki kapanma hesaplandı ve % migrasyon aktivitesi belirlendi. Deney üç tekrar şeklinde yapıldı.

3.5.7. RNA İzolasyonu

Hücreler çalışmada kullanılan belirli dozlarda curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre ile muamele edildikten sonra tripsin/EDTA ile flask yüzeyinden kaldırıldı, 1XPBS ile yıkandı ve 15 ml'lik tüpe alındı, tripsin/EDTA'nın etkisini ortadan kaldırmak içinin tüp içine besi yeri ilave edildi. Toplanan hücreler 1500 rpm'de 5 dk santifüj edilerek çöktürüldü ve ortam uzaklaştırıldı. Pellet halinde toplanan hücrelerden RNA izolasyon kiti (Geneaid, Tayvan) protokolüne göre total RNA izolasyonu yapıldı. Çalışmada RNaz ve DNaz free sarflar kullanıldı.

Protokole göre, ilk olarak hücreler 100 µl RBC liziz tamponu eklendi ve 1.5 ml' lik tüpe aktarıldı. 400 µl RB tampon ve 4 µl β-merkaptoetanol eklendi ve vortekslenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında, lizat üzerine 500 µl %70 etil alkol içeren RNaz free su eklendi. Lizat karıştırıldıktan sonra kolon bulunan 2 ml'lik toplama tüpüne 500 µl eklendi ve 16000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve geride kalan lizattan 500 µl eklendi ve 16000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve üzerine 400 µl W1 tamponu eklendi. 16000xg'de 30 sn santrifüj edildi. Süpernatan atıldı ve 600 µl yıkama tamponundan eklendi. Bu işlem tekrarlandı ve kolonu kurutmak için 16000xg'de 3 dk santrifüj edildi. Kolon 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 50 µl RNaz-free sudan eklendi. Tüp 16000xg'de 1 dk santrifüj edilerek RNA'lar elde edildi ve -20^{o} C'de saklandı.

3.5.8. RNA Örneklerinin Kantitasyonu

Elde edilen RNA'ların ng/µl konsantrasyonlarının ölçümü Qubit RNA assay kiti ile Qubit 3.0 flourumetre cihazı (Applied Biosystems) ile yapıldı.

3.5.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA'dan cDNA elde etmek için High Capacity cDNA Reverse Transcripsion Kit (Applied Biosystems) kullanıldı. PCR koşulları ve PCR karışımı, kullanılan Kit'in talimatlarına uygun olarak hazırlandı. Qubit ile ölçümleri yapılan RNA'ların 10 µl için hesaplamaları yapılarak gerekli miktarlar alındı ve üzeri su ile tamamlandı. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde her bir steril PCR tüpüne Tablo 6'daki malzemelerden sırasıyla eklendi.

Tablo 6. cDNA için hazırlanan karışım

10× RT Tampon	2.0 µl
Revers transkriptaz	1.0 µl
10×RT Random Primerler	2.0 µl
25× dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
RNaz free su	4.2 µl
Total RNA	10 µl
Toplam	20 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı, thermal cycler cihazında (Boeco) 25 ºC'de 10 dakika, 37 ºC'de 120 dakika, 85 ºC'de 5 dakika ve son adım 4 ºC olan programa tabii tutuldu ve komplementer DNA sentezi gerçekleştirildi.

3.5.10. Real Time PCR

Gen ekspresyonlarının analizini yapmak için, kısa sürede ve etkili sonuç verebilen Real Time PCR ile çalışıldı.

Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems) ile Real Time PCR yöntemi kullanılarak *VEGF, EPO, C-RAF* ve *HIF-1α* genlerinin gen

ifadesi çalışıldı. Housekeeping gen olarak β-aktin kullanıldı. Reaksiyonda analiz edilecek genlere özgü primerler kullanıldı (Invitrogen). Bu primerler cDNA sentezinde kullanılan universal primerlerle çoğalan bölge ile spesifik primer bağlanma bölgesi arasını çoğaltacak şekilde hazırlandı.

Tablo 7. Tasarlanan Primerler

HIF-1α	Forward: 5'- CGCAAGTCCTCAAAGCACAG -3' Revers: 5'- TTCATCAGTGGTGGCAGTGG -3'
VEGF	Forward: 5'- CTGTCTAATGCCCTGGAGCC -3' Revers: 5'- ACGCGAGTCTGTGTTTTTGC -3'
EPO	Forward: 5'- ACTCCGAACAATCACTGCTG -3' Revers: 5'- ATGGTAGGTGCGAAAACAGG -3'
C-Raf	Forward: 5'-GCGGGAGTAAGAGGAAAACGA-3' Revers: 5'- AGTGATCTCCTTCTGCATCCT -3'
β-Aktin	Forward: 5'- TCGTGCGTGACATTAAGGAG -3' Revers: 5'- CGGAGGCGGTCACATTC -3'

Öncelikle primerlerin 100μM lık ana stoğu ve 1:10 dilüsyonlu ara stoğu hazırlandı. Ana ve ara stoklar -20^{o} C'de saklandı. Real Time PCR reaksiyonu için Tablo 8' de belirtilen maddeler kullanarak reaksiyon karışımı hazırlandı ve 25 μL'lik reaksiyon karışımları 96 kuyucuklu plaklara (Applied Biosystems) koyuldu. Negatif kontrol için PCR grade su kullanıldı. Buharlaşmayı önlemek amacıyla plağın üzeri kaplayıcı (Applied Biosystems) ile kapatıldı ABI7500 fast cihazında (Applied Biosystems) analiz gerçekleştirildi.

Tablo 8. Real Time PCR analizi için reaksiyon bileşenleri

2× Master Mix	12.5 μl
Primerler	1.5 μl
RNaz free su	10 μl
cDNA	1 μl
Toplam	25 μl

Real Time PCR analizinde 95°C 10 dk, (95°C'de 15 sn, 60°C'de 10 sn) 40 döngü programı kullanıldı. Erime eğrisi analiziyle de ürünlerin kalite kontrolü gerçekleştirildi. Her bir reaksiyondan elde edilen Ct değerleri ΔΔCt yöntemine göre analiz edildi. Excelde ΔCt değerleri, ekspresyon değişimini belirlemek amacıyla da ΔΔCt değerleri ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle de ekspresyon değişim miktarları hesaplandı. Gen ifadesi sonuçları ayrıca göreceli olarak REST 2009 programı kullanılarak hesaplandı (277).

3.5.11. Western Blot Analizi

2.5.11.1. Total Protein Lizatı Hazırlanması

72 saat inkübasyon sonrasında, buz üzerine alınan hücrelerin ortamları uzaklaştırılarak soğuk PBS ile 2-3 kez yıkandı. Ardından hücreler 1 ml PBS içerisinde hücre kazıyıcılar ile kazınıp 1,5 ml'lik tüpler içerisinde toplandı. Hücreleri çöktürmek için 1500xg'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Buz üzerinde çözünmüş olan RIPA lizis tamponuna Na_3VO_4, PMSF ve fosfataz inhibitörleri eklendi. Hücre pelletine hacminin üç katı kadar RIPA lizis tamponu (Santa Cruz) eklendi. Sonra içinde hücre içeriği olan mikrosantrifüj tüpleri buz üstünde protein ekstraksiyonu için 15 dakikada bir vortekslenerek 1 saat kadar inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücre debrislerinin uzaklaştırılması için örnekler 4° C' de 10000x g'de 10 dk santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve -80° C' de saklandı.

2.5.11.2. Nükleer Protein Lizatı Hazırlanması

Nükleer protein izolasyonu için 3 farklı tampon hazırlandı. Tampon içerikleri Tablo 9 belirtilmiştir.

Tablo 9. Nükleer Protein İzolasyonu İçin Gerekli Maddeler Ve Konsantrasyonları

Tampon A	Tampon B	Tampon C
• 10 mM HEPES-KOH, pH 7.9 • 2.5 mM $MgCl_2$ • 10 mM KCl • 0.5 mM DTT • 1 mM PMSF • 1 mM Na_3VO_4	• 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9 • 2.5 mM $MgCl_2$ • 0.42 M NaCl • 25% Gliserol • 0.2 mM EDTA • 0.5 mM DTT • 1 mM PMSF • 1 mM Na_3VO_4	• 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9 • 2.5 mM $MgCl_2$ • 100 mM KCl • 20% Gliserol • 0.2 mM EDTA • 0.5 mM DTT • 1 mM PMSF • 1 mM Na_3VO_4

Optimum sürelerde inkübasyon sonrasında buz üzerinde hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler 3 kez soğuk PBS ile yıkandı. Ardından hücreler 1 ml PBS içerisinde hücre kazıyıcılar ile kazınıp, 1.5 ml'lik tüpler içerisinde toplandı. 1,5 ml'lik santrifüj tüplerinde toplanan hücreler 10 dakika boyunca 300x g'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıktan sonra hücreler tekrar soğuk PBS ile yıkanıp sanrtifüjlendi. Hücre süpernatantı atılmış hücre pelletine hacminin 5 katı kadar tampon A' dan eklendi ve pipetaj yapılarak buz üzerinde 10 dk bekletildi. 300×g, 4 °C de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peletinin 2 katı kadar tampon A' dan eklendi. Vortekslendikten sonra 250×g, 4 °C de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peletine 100 µl tampon B' den eklendi (yaklaşık 10^7 hücre için). Vortekslendikten sonra buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. 25,000×g, 4 °C de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant alınarak üzerine 500 µl tampon C' den eklendi ve -80 °C 'de depolandı.

2.5.11.3 Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Örneklerden elde edilen ekstraktların protein miktarlarının belirlenmesi için BCA Protein Assay Kit (Thermo) kullanıldı.

Reaktif çözelti protein çözeltisine ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşerek, alkali koşullar altında bakır iyonları indirgenerek mavi-mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır Protein miktar tayini için kitin içerisinde hazır halde bulunan BSA stoğu kitte belirtilen oranlara göre dilüsyon yapılarak çalışma için uygun standartlar hazırlandı. Hazırlanan 9 standart 96' lık plaklara sırayla her biri 25 µl olacak şekilde eklendi. Örnekler toplam hacim 25 µl olacak şekilde 1:3 oranında RNaz free su ile seyreltildi. Standart ve örneklerin üzerine 200 µl hazırlanan çalışma solüsyonu eklenip 37^{o}C' de 30 dk bekletildi. Daha sonra örnekler spektrofotometrede 562 nm' de ölçüldü. Standart grafiği çizilerek örneklerin konsantrasyonu hesaplandı.

2.5.11.4 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Jelinin Hazırlanması

Western blot elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metodlarla gösterilmesidir. Çalışılan numunedeki SDS-polipeptit kompleksleri, poliakrilamid jele yüklenip elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman, proteinin moleküler ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutuba doğru göç etmekte ve jelde bulundukları yerde bantlar halinde yığılım göstermektedir.

SDS-PAGE'de mini elektroforez kullanıldı. %0.1 SDS içeren %12 ve 10 'luk ayrıştırma jeli hazırlandı ve elektroforezin iki camı arasına döküldü. Ayrıştırma jelinin üzerine yaklaşık 1 ml 2-propanol (izopropanol) koyuldu. Jelin katılaşması için yaklaşık 15 dakika beklendikten sonra 2-propanol kurutma kağıdıyla çekildi ve jel distile su ile yıkandı. Daha sonra yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan yığma jeli pipet ile ayrıştırma jelinin üzerine pipetlendi.

Tablo 10. SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%10 ve 12) hazırlanması

Bileşenler	%10	%12
ddH_2O	4.65 ml	3.85ml
3 M Tris-HCl	1.25 ml	1.25ml
%20 SDS	50 µl	50 µl
%40 akrilamid-bis akrilamid	4 ml	4.8 ml
%10 APS	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Tablo 11. SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması

ddH_2O	7.35 ml
1.5 M Tris-HCl	1.25 ml
%20 SDS	50 µl
%40 akrilamid-bis akrilamid	1.34 ml
%10 APS	100 µl
TEMED	20 µl

Elektroforez tarağı yerleştirildi ve yığma jeli katılaşması için bir süre beklendi. Tarak çıkarıldıktan sonra elektroforez camı tanka yerleştirildi. Elektroforez 10X yürüme tampon stoğundan (144 g glisin, 0.3 g Tris bazı, 10 g SDS ve 1000 ml ddH_2O) hazırlanan 1X tampon (100 ml 10X stok, 900 ml ddH_2O) örnek kuyucuklarını kapatacak şekilde tanka eklendi.

2.5.11.5 Örneklerin Yüklenmesi Ve Jelin Yürütülmesi

HIF-1α 92 kDa, VEGF 42 kDa, EPO 37 kDa, kaspaz-9 46 kDa, C-Raf 80 kDa, GAPDH 37 kDa ağırlığındadır.

Her bir protein için optimize edilen miktarda total/nükleer protein alındı ve bu proteinlerin denaturasyonu için %12 (140 mM) oranında beta-merkaptoetanol (Applichem) içeren 5X örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı.

Yaklaşık 30 µg/µl protein olan örnekler, 5X örnek yükleme tamponu ve dH2O kullanılarak total hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı.

Hazırlanan numuneler 95ºC'de 5 dakika denatüre edildi. Numuneler (25 µl) ve protein belirteci (5 µl) elektroforez kuyularına yüklendi. Aynı zamanda protein göçünü izleyebilecek nitelikteki belirteçlerden (Geneaid) 3 µl eklendi ve 125 V da elektrik akımı uygulanarak proteinler ayrıştırıldı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı. Elektroforez bittikten sonra ayrıştırma jeli cam plaklar arasından çıkarılarak distile su ile yıkandı.

2.5.11.6 Membran Transferi

Proteinlerin membrana transferi ıslak (wet) transfer yöntemiyle yapıldı. PVDF membran 1 dk kadar metanole konulup aktive edildikten sonra 10X transfer tampon stoğundan (144 g glisin 30.3 g Tris bazı, 10 g SDS ve 1000 ml ddH_2O) hazırlanan 1X transfer tamponu (100 ml 10X stok, 200 ml metanol ve 700 ml ddH_2O). Islak transfer yönteminde katottan anoda transfer olacak şekilde sırasıyla transfer kasedine sünger, 2 adet whatman kağıdı (transfer tamponda ıslatılmış), jel, membran, 2 adet whatman kağıdı (transfer tamponda ıslatılmış), sünger konularak kapatıldı. Elektroblotlama tankına kaset yerleştirildi ve transfer tampon eklendi. Jeldeki proteinler metanol ile aktive edilen PVDF membrana 400 miliamperde 1 saat transfer edildikten sonra membran distile suyla yıkandı.

2.5.11.7 Bloklama

Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama yapıldı. Transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran, bloklama çözeltisi içinde 60 dakika oda sıcaklığında bloke edildi. Bloklama çözeltisi %5 süt tozu içeren TBST içerisinde hazırlandı. 10X TBS (24 g Tris bazı, 88 g NaCl ve 900 mL ddH_2O pH:7.6) stoğundan 1X TBST (100 ml TBS stok, 900 mL ddH_2O ve1 mL Tween 20) hazırlandı. Membran üç defa 5’ er dk TBS-T ile yıkandı.

2.5.11.8 Primer Antikor ile İnkübasyon

Mouse HIF1 alfa, VEGF, C-RAF, GAPDH, Kaspaz-9 ve rabbit EPO monoklonal antikoru (sırasıyla 1:100, 1:200, 1:200, 1:500, 1:200 ve 1:200 oranında TBST içinde hazırlanmış %2 lik süttozunda dilüsyon yapıldı) ile bir gece +4 ^{o}C' de karıştırıcıda inkübe edildi. Membran tekrar üç defa 15'er dk TBS-T ile yıkandı.

2.5.11.9 Sekonder Antikor ile İnkübasyon

Mouse ve rabbit sekonder antikor ile (1:3000 oranında TBST içinde hazırlanmış %2 lik süttozunda dilüsyon yapıldı) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Üç defa 15'er dk TBS-T ile yıkandı.

2.5.11.10 Görüntüleme

Yıkama işleminden sonra sinyali görüntülemek için ECL solüsyonu kullanıldı. İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açar. Bu ışıma, Western Blot' a özel filmler veya cihazlar ile saptanır. Yaklaşık 1 ml ECL detection reagent membran üzerine 2 dakika süreyle uygulandı.

Membran şeffaf dosya ile kapatıldı ve sonra karanlık odada üzerine X-ray film konuldu. Film, film kasedi arasında membran üzerinde 1 veya 2 dakika bekletildikten sonra kendi tasarladığımız üç bölmeden oluşan (her biri 5 cm genişliğinde) plastik kap içinde manuel olarak banyo edildi. Developing solüsyonunda 30 sn, fixer solüsyonunda 30 sn bekletilerek film banyo edildi. Banyo işleminden sonra film bol miktarda dH2O ile yıkandı ve kurutuldu.

Tablo 12. Western Blot Analizinde kullanılan maddeler ve cihazlar

Malzeme-Cihaz Adı	Markası	Malzeme-Cihaz Adı	Markası
Primer Antikor	Santa Cruz	BCA assay kit	Thermo
Sekonder Antikor	Santa Cruz	Elektroforez Sistemi	Life Tech.
Mini jel kasetleri	Life Tech.	HCl	LiChroSolv
Elektrobloklama	Bio-Rad	SDS	Santa Cruz
ECL	Millipore	APS	Santa Cruz
Güç kaynağı	Life Tech.	TEMED	Ambion
Yağsız süt tozu	Santa Cruz	%40 akrilamid bisakrilamid	Ambion
Tris bazı	Santa Cruz	β-merkaptoetanol	Applichem
Glisin	Santa Cruz	Hücre kazıyıcı	Corning
Tween 20	Sigma	Film kasedi	Kodak
Metanol	LiChroSolv	Banyo solüsyonu	Kodak
RIPA tampon	Santa Cruz	X-Ray film	Kodak
Hepes	Sigma	Bromfenol mavisi	Applichem
KOH	Sigma	Whatman kağıdı	Thick Blot
Gliserol	Sigma	PVDF membran	Millipore
PMSF	Applichem	EDTA	J.T.Baker Inc
NaCl	Applichem	$MgCl_2$	MERCK
KCL	Fluka Biochemika	Protein marker	Geneaid
Na_3VO_4	Applichem	izopropanol	Ambion

3.6. Araştırma Planı

Projelendirme	Ocak 2016- Ocak 2017
Hücre kültürü	Mart 2016- Haziran 2016
WST-1, Scratch assay	Haziran 2016- Ağustos 2016
Protein izolasyonu	Ağustos 2016- Eylül 2016
RNA izolasyonu ve RT PCR	Eylül 2016- Ekim 2016
Western Blot	Ekim 2016-Kasım 2016
Real Time PCR	Kasım 2016-Aralık 2016
İstatistiksel analiz ve Tez yazımı	Aralık 2016- Şubat 2017

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiürenin IC50 değerleri Graphpad Prism 7 kullanılarak hesaplandı. Migrasyon deneyi ve western blotta protein bantlarının alan hesabı image J yazılımı kullanılarak yapıldı. İlaç kombinasyonlarının CI değerleri CompuSyn veritabanı ile hesaplandı.

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Varyansların homojenliği ise Levene testi ile analiz edildi. Parametrik testlerin varsayımları yerine geldiğinde bağımsız iki grup ortalamasının karşılaştırılması amacıyla Student's t testi kullanıldı.

Üç veya daha fazla bağımsız grup ortalamasının karşılaştırılması amacıyla ise tek yönlü varyans analizi ve ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Duncan testi kullanıldı. Bazı değişkenler bakımından parametrik testlerin ön şartlarının yerine gelmediği görüldüğünden söz konusu değişkenlere ilişkin bağımsız iki grup ortancasının karşılaştırılması amacıyla Mann-Whitney U testi kullanıldı. Üç ve daha fazla bağımsız grup ortancalarının karşılaştırılması amacıyla ise Kruskal-Wallis testi ve ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Dunn testi kullanıldı. Oranlar, iki oran z testi ile karşılaştırıldı.

$p<0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri setinin analizinde SPSS 17.0 istatistik paket programı kullanıldı

3.8. Araştırma Sınırlılıkları

Araştırmamızda kullanılan hücre hatları, araştırma bütçesi göz önüne alındığında ticari olarak satın alınamamıştır.

Araştırmamız normoksik şartlarda gerçekleştiği için western blot ile VEGF ve HIF-1α proteinlerinin bant görüntülerini elde etmek zor olduğunda, araştırma hipoksik şartlarda da gerçekleşmelidir.

3.9. Etik Kurul Onayı

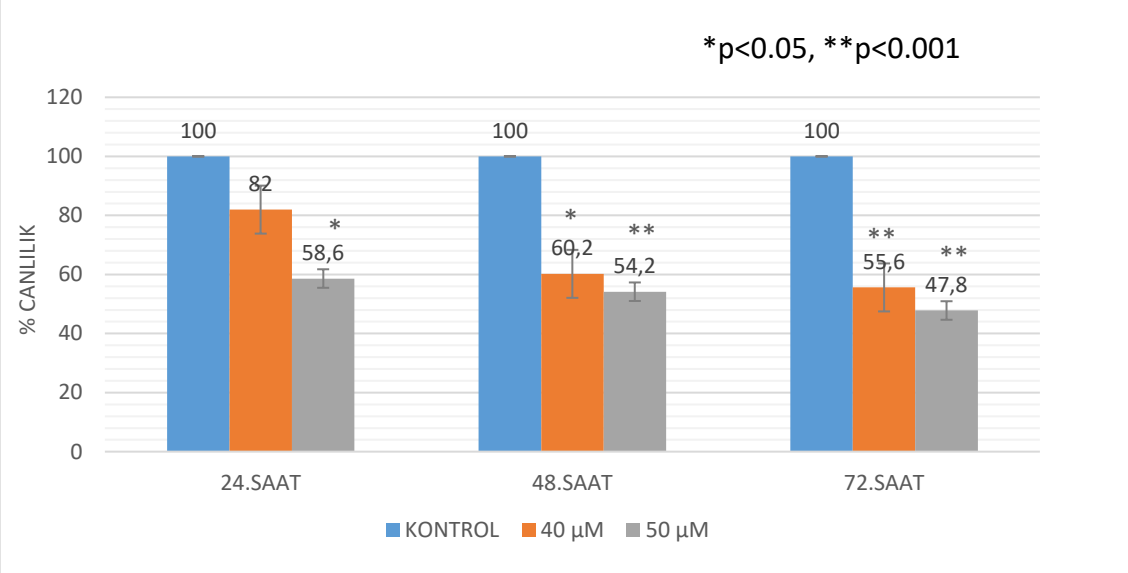
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 26.02.2015 tarih ve 2015/06-18 no.lu kararında; 1968-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Curcumin' in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 İle Belirlenmesi

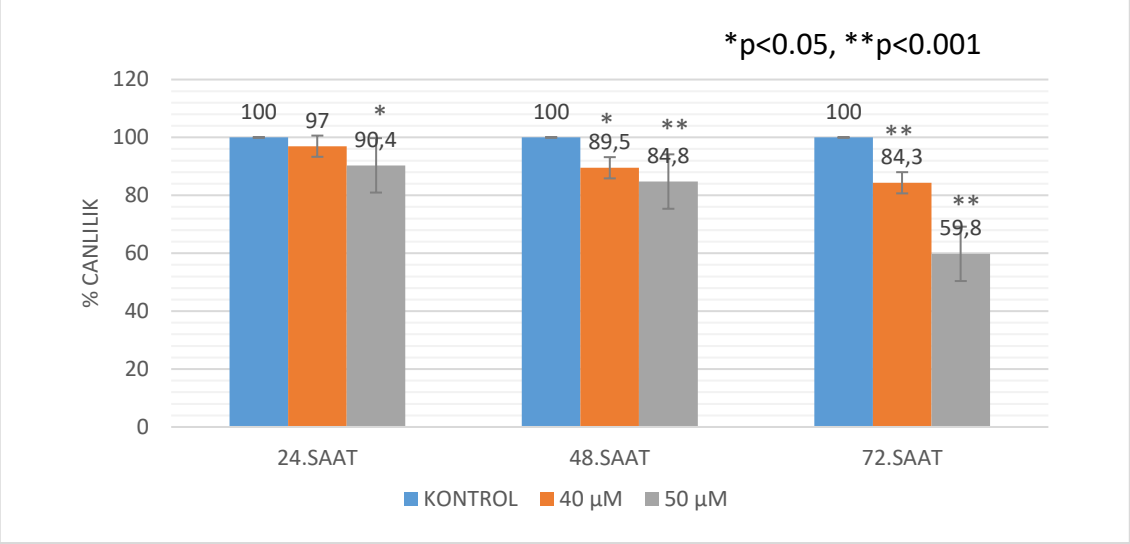
24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde 40 ve 50 µM dozlarda curcumin ile inkübe edilen MCF-7, curcuminin doza bağımlı olarak WST-1 sonrası hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği etkilere ilişkin bulgular sırasıyla Şekil 5, 6 ve 7'de verilmiştir. Bulgular standart hata ile birlikte gösterilmiştir. Tüm hücre hatlarında kontrol grubu curcumin uygulanmayan gruptur.

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde gösterilmiştir. * p <0,05 ve ** p <0,01 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



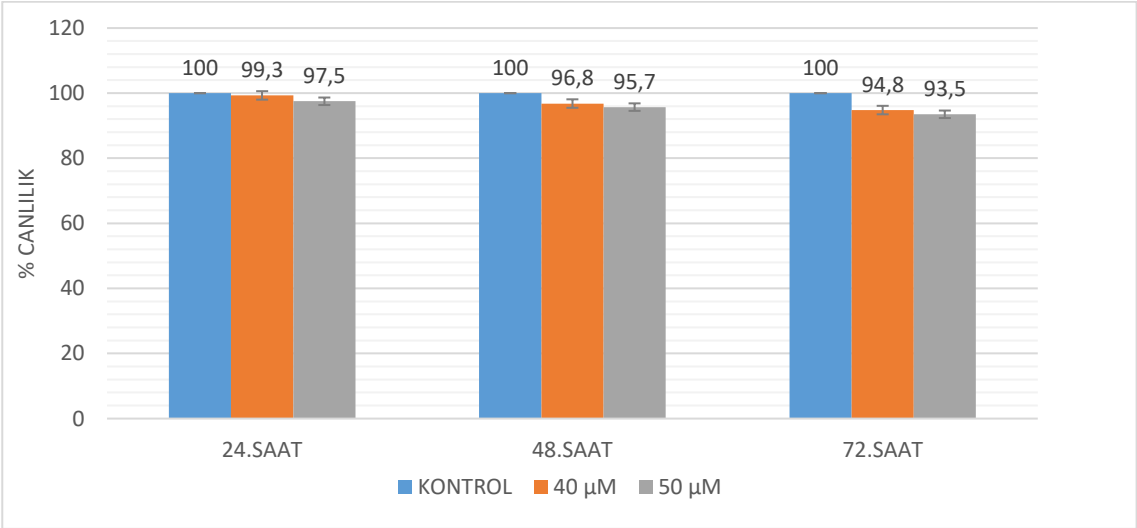
Şekil 6. Curcuminin MCF-7 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

24, 48 ve 72 saat 40 ve 50 µM dozlarda curcumin ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde canlılığının 72 s aat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre fark bulundu (p <0,01).



Şekil 7. Curcuminin MDA-MB-231 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

24, 48 ve 72 saat 40 ve 50 µM dozlarda curcumin ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark bulundu (p <0,01).



Şekil 8. Curcuminin MCF-10A hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

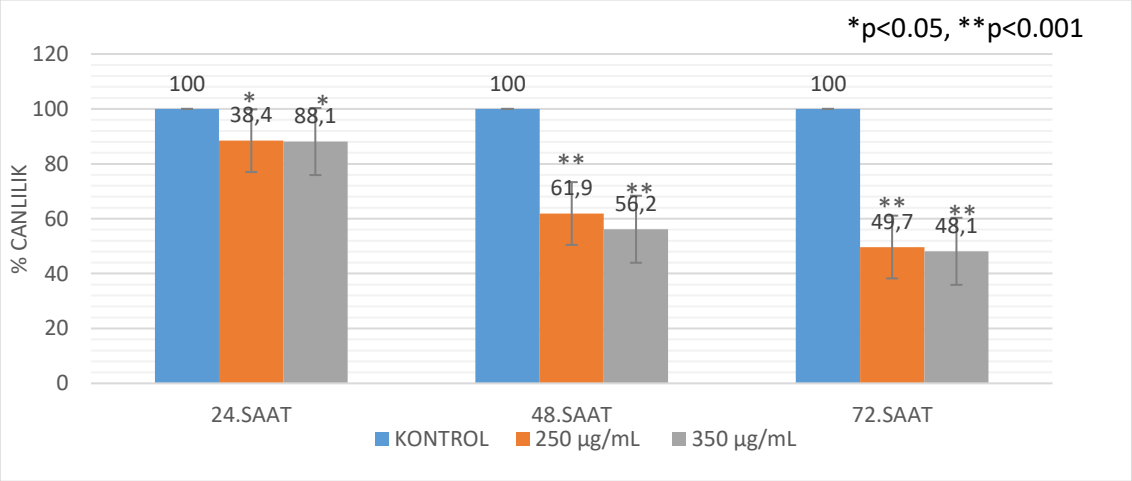
24, 48 ve 72 saat 40 ve 50 µM dozlarda curcumin ile inkübe edilen MCF-10A hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark elde edilemedi.

Duncan testine göre, curcumin 40 µM (24.saat ve 72.saat) ve curcumin 50 µM (48.saat ve 72.saat) grupları MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri arasında anlamlı farklılık göstermiştir.

4.2. Bevacizumabın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 İle Belirlenmesi

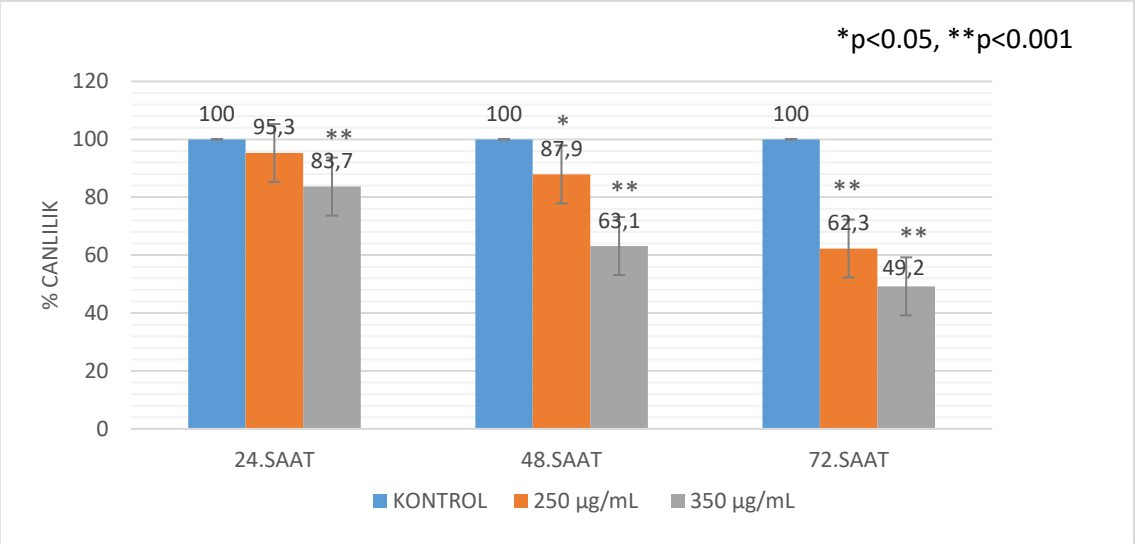
24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde 250 ve 350 µg/mL dozlarda Bevacizumab ile inkübe edilen MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ve MCF-10A normal meme hücre hatlarında, WST-1 sonrası Bevacizumabın doza bağımlı olarak hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği etkilere ilişkin bulgular Şekil 8, 9 ve 10'da verilmiştir. Bulgular standart hata ile birlikte gösterilmiştir. Kontrol grubu Bevacizumab uygulanmayan gruptur.

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde gösterilmiştir. * p <0,05 ve ** p <0,01 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



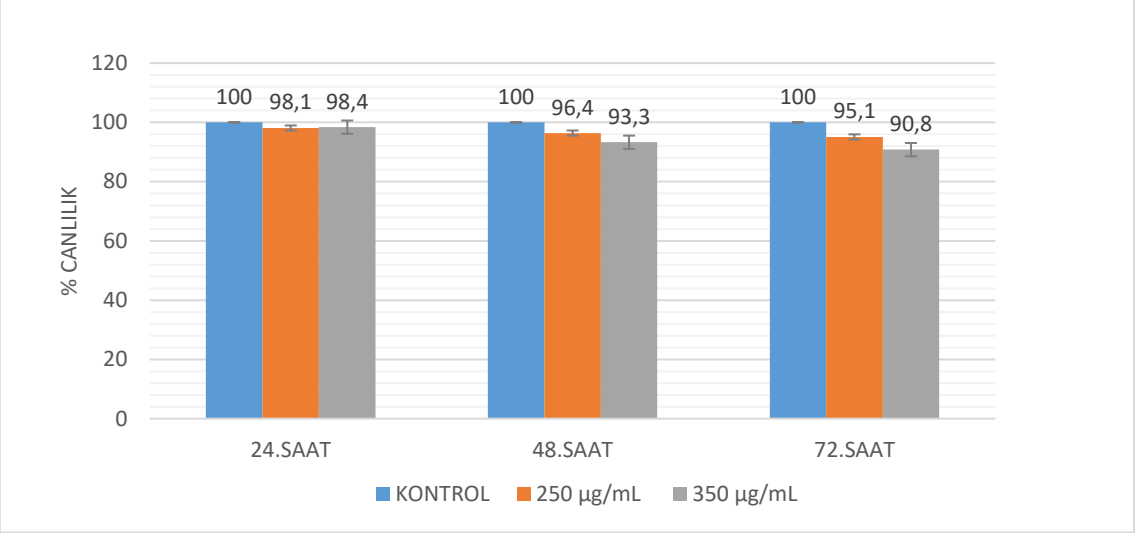
Şekil 9. Bevacizumabın MCF-7 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları

24, 48 ve 72 saat 250 ve 350 µg/mL dozlarda Bevacizumab ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark bulundu (p <0,01).



Şekil 10. Bevacizumabın MDA-MB-231 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

24, 48 ve 72 saat 250 ve 350 µg/mL dozlarda Bevacizumab ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark bulundu (p <0,01).



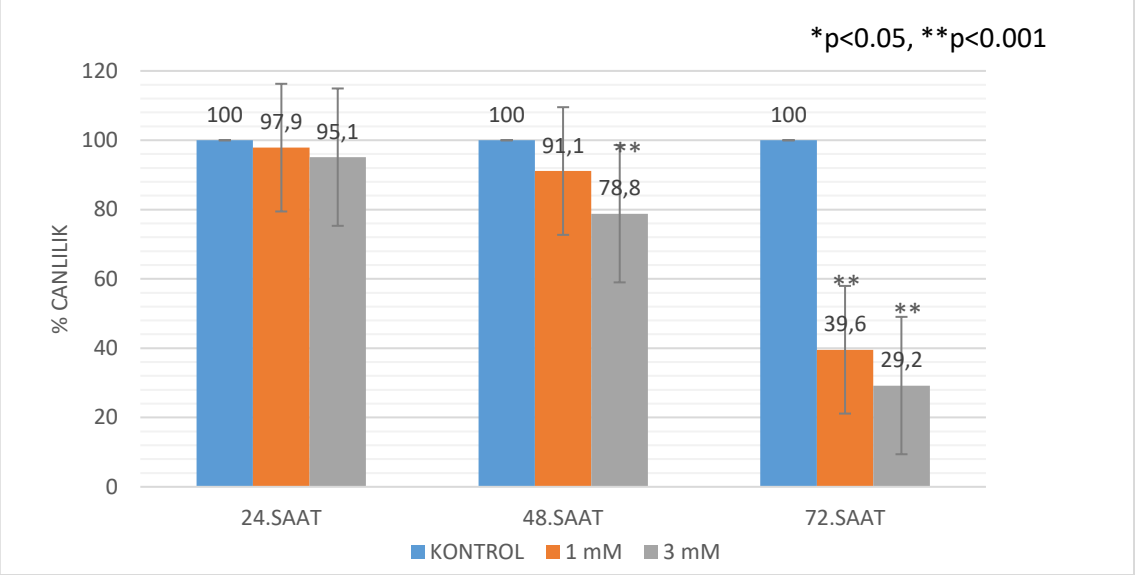
Şekil 11. Bevacizumabın MCF10A hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

24, 48 ve 72 saat 250 ve 350 µg/mL dozlarda Bevacizumab ile inkübe edilen MCF-10A hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark saptanmadı.

Ducan testine göre, Bevacizumab 250 µg/ml (72.saat) ve 350 µg/mL (48.saat) grupları MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri arasında anlamlı farklılık göstermiştir.

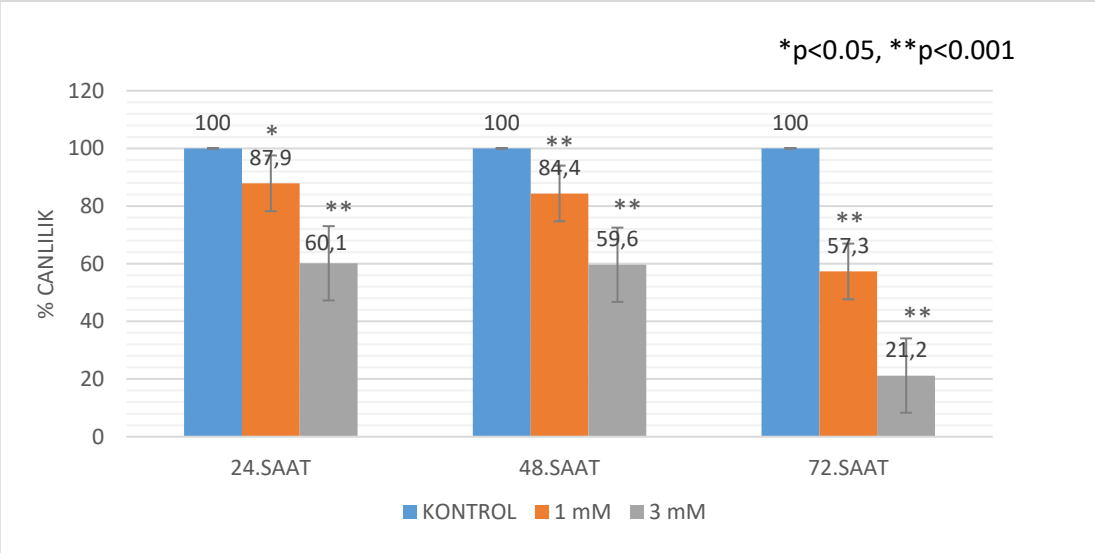
4.3. Hidroksiürenin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 İle Belirlenmesi

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde 1 ve 3 mM dozlarda hidroksiüre ile inkübe edilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde, WST-1 sonrası hidroksiürenin doza bağımlı olarak hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği etkilere ilişkin bulgular Şekil 11, 12 ve 13'de verilmiştir. Bulgular standart hata ile birlikte gösterilmiştir. Kontrol grubu hidroksiüre uygulanmayan gruptur.



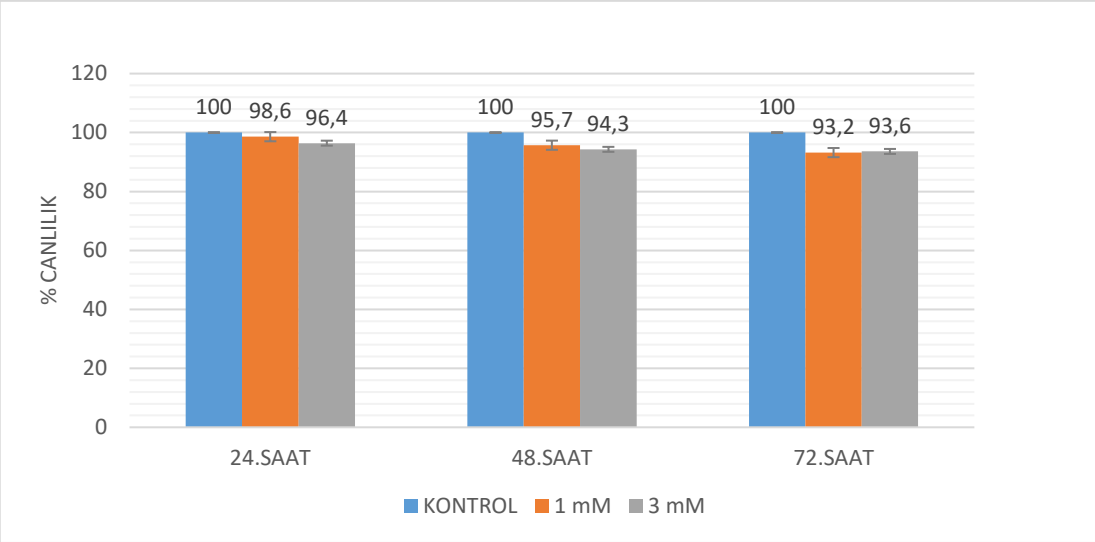
Şekil 12. Hidroksiürenin MCF-7 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

24, 48 ve 72 saat 1 mM ve 3 mM dozlarda hidroksiüre ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark bulundu (p <0,01).



Şekil 13. Hidroksiürenin MDA-MB-231 hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları

24, 48 ve 72 saat 1 mM ve 3 mM dozlarda hidroksiüre ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark bulundu (p <0,01).



Şekil 14. Hidroksiürenin MCF-10A hücre hattına 24,48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

24, 48 ve 72 saat 1 mM ve 3 mM dozlarda bevacizumab ile inkübe edilen MCF-10A hücrelerinde canlılığının 72 saat inkübasyonda her iki dozda da en düşük olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı fark saptanmadı. Ducan testine göre, hidroksiüre 1 mM (48. ve 72.saat) ve 3 mM (48. ve 72. saat) grupları MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri arasında anlamlı farklılık göstermiştir.

4.4. Hücrelerin Curcumin, Bevacizumab ve Hidroksiüre İçin IC50 Değerleri

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri için 72 saat inkübasyon süresi için belirlenen IC50 değerleri Tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri için IC50 değerleri

MADDE	MCF-7	MDA-MB-231	MCF 10A
Curcumın IC50	46.96 µM	53.56 µM	39.4 µM
Bevacızumab IC50	232.8 µg/ml	335.7 µg/ml	380.5 µg/ml
Hidroksiüre IC50	0.36 mM	1.22 mM	1.22 mM

4.5. Hücrelere Uygulanan Curcumin ve Bevacizumab Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi

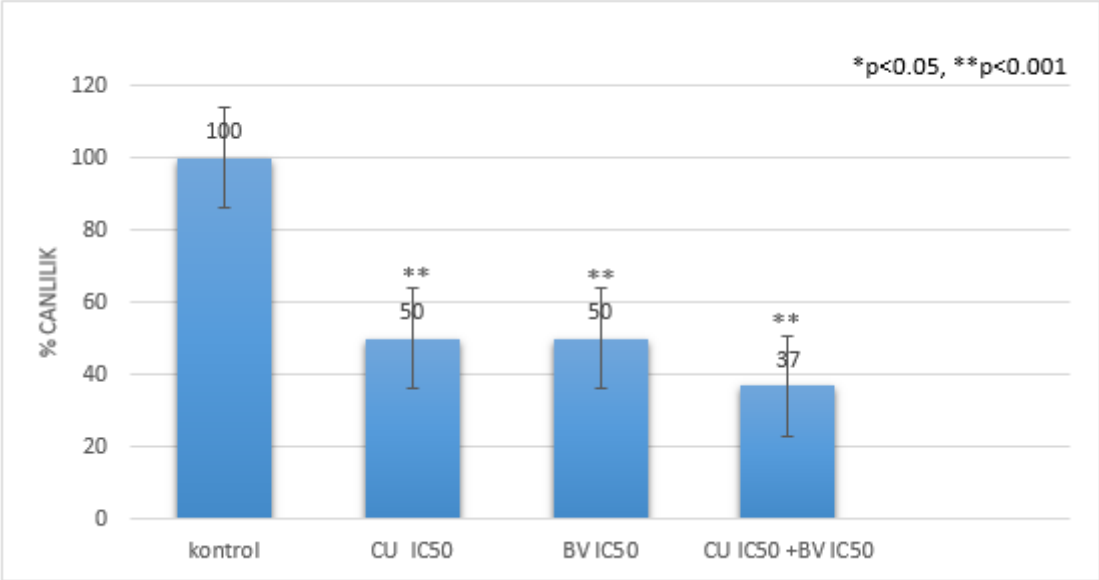
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında curcumin ve bevacizumabın kombinasyonu 5 farklı doz grubundan oluşmaktadır.

Curcumin (CU) ve Bevacizumab (BV) kombinasyonunun uygulandığı hücrelere 72 saat inkübasyondan sonra WST-1 testi yapıldı ve % inhibisyon değerleri belirlenerek CompuSyn veritabanı ile grupların CI değerleri hesaplandı. CI değeri <0.7 olan gruplar sinerjistik etki göstermektedir.

Tablo 14. Curcumin ve bevacizumab kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40µM)- BV (250 µg/ml)	40.57	8.95
CU (40µM)- BV (350 µg/ml)	28.19	3.73
CU (50µM)- BV (250 µg/ml)	49.29	2.33
CU (50µM)- BV (350 µg/ml)	25.26	4.19
CU (46.96µM)- BV (232.8 µg/ml)	63.05	0.74

MCF-7 hücre hattına uygulanan curcumin ve bevacizumab kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren IC50 (CI=0,74) kombinasyon doz grubudur.



Şekil 15. MCF-7 hücre hattı üzerinde curcumin IC50, bevacizumab IC50 ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Curcumin IC50 + Bevacizumab IC50 kombinasyon grubu, curcumin IC50 ve Bevacizumab IC50 a göre anlamlı fark göstermiştir (p <0,05).

Tablo 15. Curcumin ve Bevacizumab kombinasyonunun uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40μM)- BV (250 μg/ml)	75.17	0.99
CU (40μM)- BV (350 μg/ml)	64.22	1.41
CU (50μM)- BV (250 μg/ml)	80.67	1.05
CU (50μM)- BV (350 μg/ml)	72.00	1.39
CU (53.56μM)-BV (335.7 μg/ml)	69.23	1.49

MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan curcumin ve Bevacizumab kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren doz grubu bulunmamaktadır.

Tablo 16. Curcumin ve Bevacizumab kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40 µM)- BV (250 µg/ml)	61.8	1.5
CU (40 µM)- BV (350 µg/ml)	64.9	1.7
CU (50 µM)- BV (250 µg/ml)	72.4	1.3
CU (50 µM)- BV (350 µg/ml)	42.5	2.5
CU (39.4 µM)- BV (380.5 µg/ml)	60,4	1.7

MCF-10A hücre hattına uygulanan curcumin ve bevacizumab kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren doz grubu bulunmamaktadır.

4.6. Hücrelere Uygulanan Curcumin ve Hidroksiüre Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi

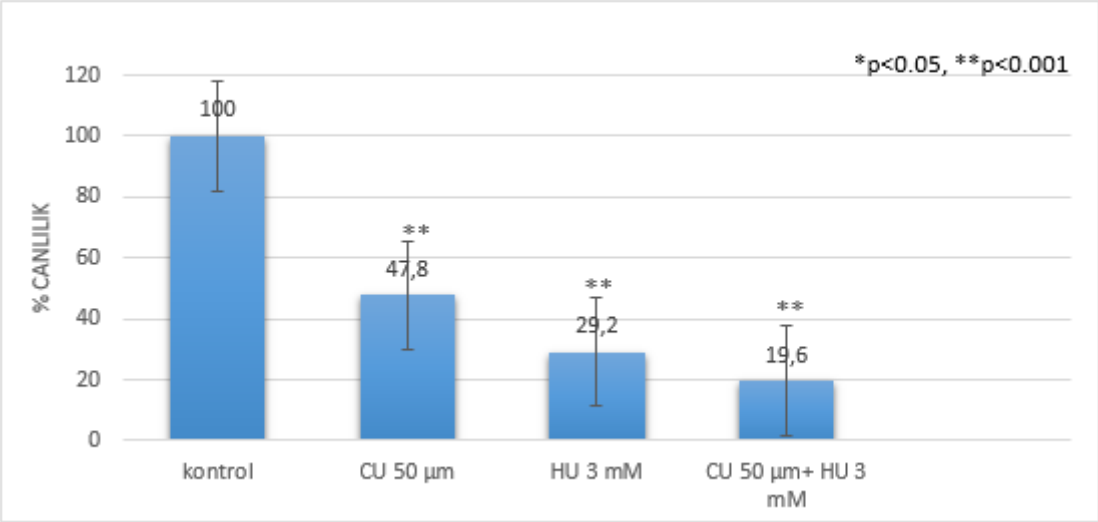
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında curcumin (CU) ve hidroksiürenin (HU) kombinasyonu 5 farklı doz grubundan oluşmaktadır.

Curcumin ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı hücrelere 72 saat inkübasyondan sonra WST-1 testi yapıldı ve % inhibisyon değerleri belirlenerek CompuSyn veritabanı ile grupların CI değerleri hesaplandı. CI değeri <0.7 olan gruplar sinerjistik etki göstermektedir.

Tablo 17. Curcumin ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40µM)- HU (1 mM)	62.92	0.84
CU (40µM)- HU (3 mM)	64.39	2.56
CU (50µM)- HU (1 mM)	69.22	0.95
CU (50µM)- HU (3 mM)	80.43	0.67
CU(46.96µM)-HU (0.363 mM)	64.77	0.88

MCF-7 hücre hattına uygulanan curcumin ve hidroksiüre kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren curcumin 50µM ve hidroksiüre 3 mM dozlarının (CI=0,67) kombine grubudur.



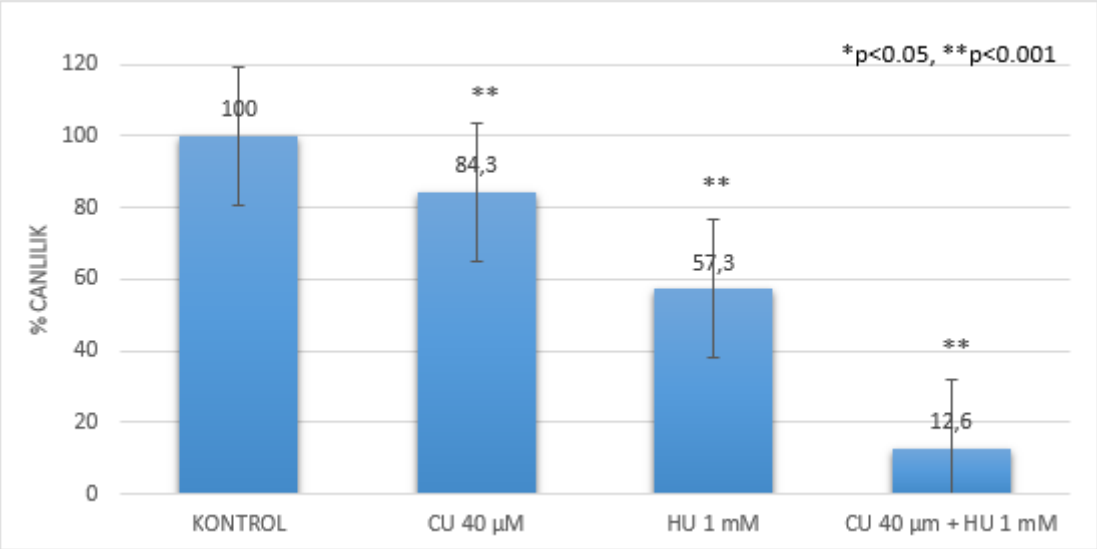
Şekil 16. MCF-7 hücre hattı üzerinde curcumin 50 µM, hidroksiüre 3 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Curcumin 50µM + hidroksiüre 3 mM kombinasyon grubu, curcumin 50µM'a göre anlamlı fark gösterirken ($p < 0,05$), hidroksiüre 3 mM'a göre anlamlı fark göstermemiştir.

Tablo 18. Curcumin ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40µM)- HU (1 mM)	87.72	0.74
CU (40µM)- HU (3 mM)	88.36	1.14
CU (50µM)- HU (1 mM)	85.59	0.92
CU (50µM)- HU (3 mM)	83.72	1.50
CU (53.56µM)- HU (1.22 mM)	86.61	1.03

MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan curcumin ve hidroksiüre kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren curcumin 40µM ve hidroksiüre 1 mM dozlarının (CI=0,74) kombine grubudur.



Şekil 17. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde curcumin 40 µM, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Curcumin 40µM + hidroksiüre 1 mM kombinasyon grubu, curcumin 40µM ve hidroksiüre 3 mM' a göre anlamlı fark göstermiştir (p <0,05).

Tablo 19. 72 saat inkübasyon süresi ile curcumin ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40 µM)- HU (1 mM)	66.9	1.4
CU (40 µM)- HU (3 mM)	68.8	2.5
CU (50 µM)- HU (1 mM)	63.3	1.7
CU (50 µM)- HU (3 mM)	76.6	2.3
CU (39.4 µM)- HU (1.22 mM)	68.9	1.5

MCF-10A hücre hattına uygulanan curcumin ve hidroksiüre kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren grup bulunmamaktadır.

4.7. Hücrelere Uygulanan Bevacizumab ve Hidroksiüre Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerleri

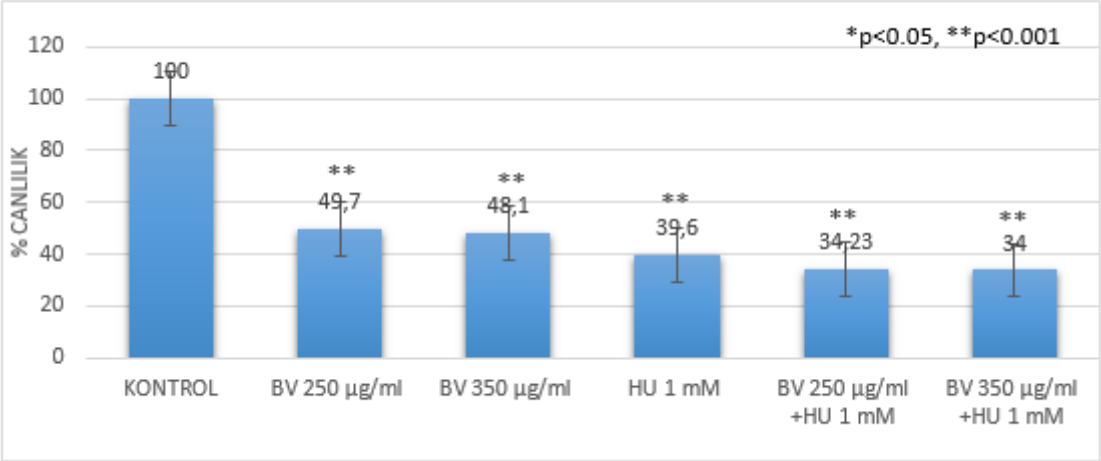
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında bevacizumab ve hidroksiürenin kombinasyonu 5 farklı doz grubundan oluşmaktadır.

Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı hücrelere 72 saat inkübasyondan sonra WST-1 testi yapıldı ve % inhibisyon değerleri belirlenerek CompuSyn veritabanı ile grupların CI değerleri hesaplandı. CI değeri <0.7 olan gruplar sinerjistik etki göstermektedir.

Tablo 20. Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
BV (250 µg/ml)-HU (1 mM)	65.77	0.62
BV (250 µg/ml)-HU (3 mM)	65.16	1.89
BV (350 µg/ml)-HU (1 mM)	66.00	0.61
BV (350 µg/ml)-HU (3 mM)	66.54	1.64
BV (232.8 µg/ml)-HU (0.36 mM)	56.10	0.83

MCF-7 hücre hattına uygulanan Bevacizumab ve hidroksiüre kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren bevacizumab 250 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM (CI=0,62) ile bevacizumab 350 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM (CI=0,61) kombinasyon grubudur.



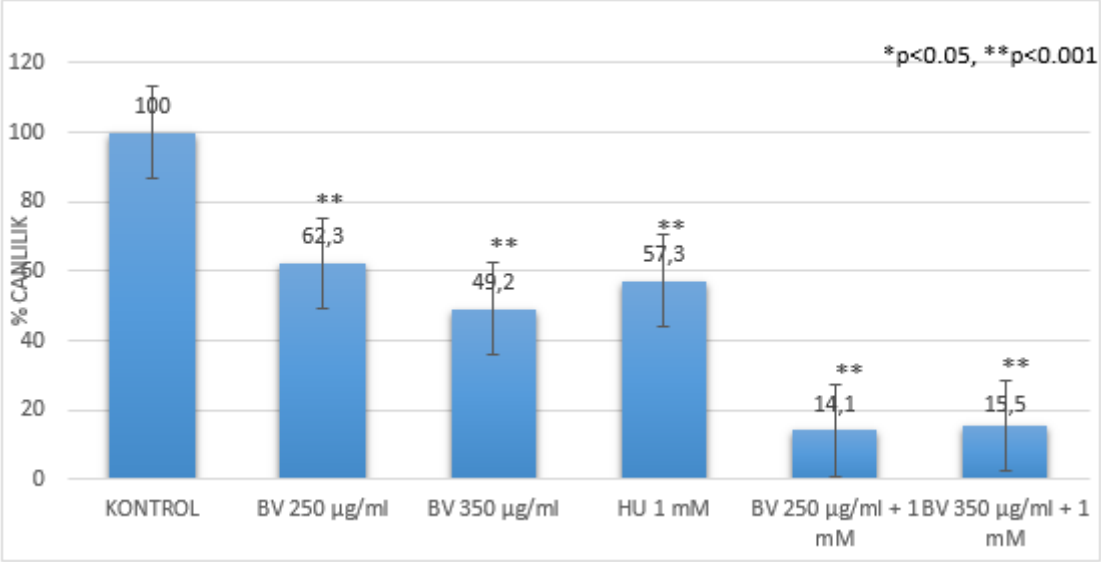
Şekil 18. MCF-7 hücre hattı üzerinde Bevacizumab 250 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımı ile Bevacizumab 350 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM kombinasyon grubu, Bevacizumab 250 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM' a göre anlamlı fark göstermiştir (p <0,05). Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM kombinasyon grubu, Bevacizumab 350 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM' a göre anlamlı fark göstermiştir (p <0,05).

Tablo 21. Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

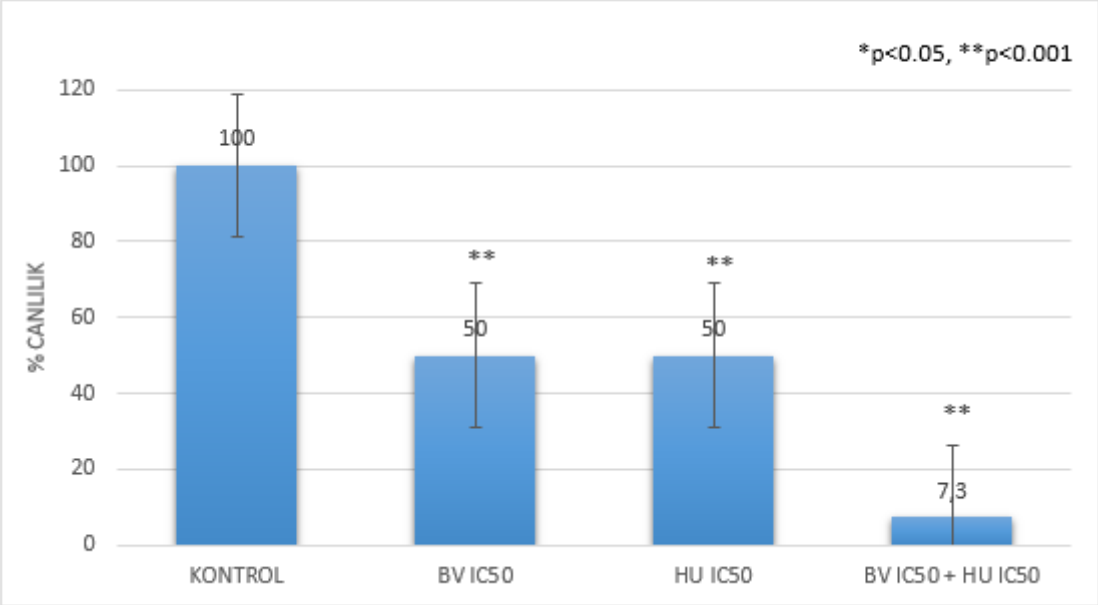
Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	85.92	0.50
BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	84.45	1.05
BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	84.49	0.65
BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	82.99	1.24
BV (335.7 µg/ml) - HU (1.22 mM)	92.67	0.41

MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan Bevacizumab ve hidroksiüre kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren bevacizumab 250 µg/ml ve hidroksiüre 1 Mm (CI=0,5); Bevacizumab 350 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM (CI=0,65) ile Bevacizumab IC50 (335.7 µg/ml) ve hidroksiüre IC50 (1.22 mM) (CI=0,41) kombinasyon grubudur.



Şekil 19. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Bevacizumab 250 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımı ile Bevacizumab 350 µg/ml, hidroksiüre 1 mM ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM kombinasyon grubu, Bevacizumab 250 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM' a göre anlamlı fark göstermiştir (p <0,05). Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM kombinasyon grubu, Bevacizumab 350 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM' a göre anlamlı fark göstermiştir (p <0,05).



Şekil 20. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Bevacizumab IC50, hidroksiüre IC50 ve ikisinin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Bevacizumab IC50 + hidroksiüre IC50 kombinasyon grubu, Bevacizumab IC50 ve hidroksiüre IC50'ye göre anlamlı fark göstermiştir (p <0,05).

Tablo 22. Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	69.7	1.1
BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	63.2	2.5
BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	65.6	1.3
BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	65.3	2.6
BV (380.5 µg/ml) - HU (1.22 mM)	66.0	1.5

MCF-10A hücre hattına uygulanan bevacizumab ve hidroksiüre kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren grup bulunmamaktadır.

4.8. Hücrelere Uygulanan Curcumin, Bevacizumab ve Hidroksiüre Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında curcumin, Bevacizumab ve hidroksiürenin kombinasyonu 9 farklı doz grubundan oluşmaktadır.

Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı hücrelere 72 saat inkübasyondan sonra WST-1 testi yapıldı ve % inhibisyon değerleri belirlenerek CompuSyn veritabanı ile grupların CI değerleri hesaplandı. CI değeri <0.7 olan gruplar sinerjistik etki göstermektedir.

Tablo 23. Curcumin, bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	48.35	5.62
CU (40 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	47.03	14.05
CU (40 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	37.52	32.10
CU (40 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	65.50	2.38
CU (50 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	48.83	5.63
CU (50 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	52.50	8.06
CU (50 µM) -BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	49.76	5.51
CU (50 µM) -BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	54.38	6.99
CU(46.96 µM)- BV(232.8 µg/ml) -HU(0.363 mM)	49.02	3.36

Tablo 24. Curcumin, bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	44.24	1.26
CU (40 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	41.07	1.43
CU (40 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	35.66	1.80
CU (40 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	33.75	1.97
CU (50 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	37.12	1.70
CU (50 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	37.00	1.70
CU (50 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	41.95	1.39
CU (50 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	31.38	2.09
CU (53.56 µM) -BV (335.7 µg/ml) -HU(1.22 mM)	34.75	1.88

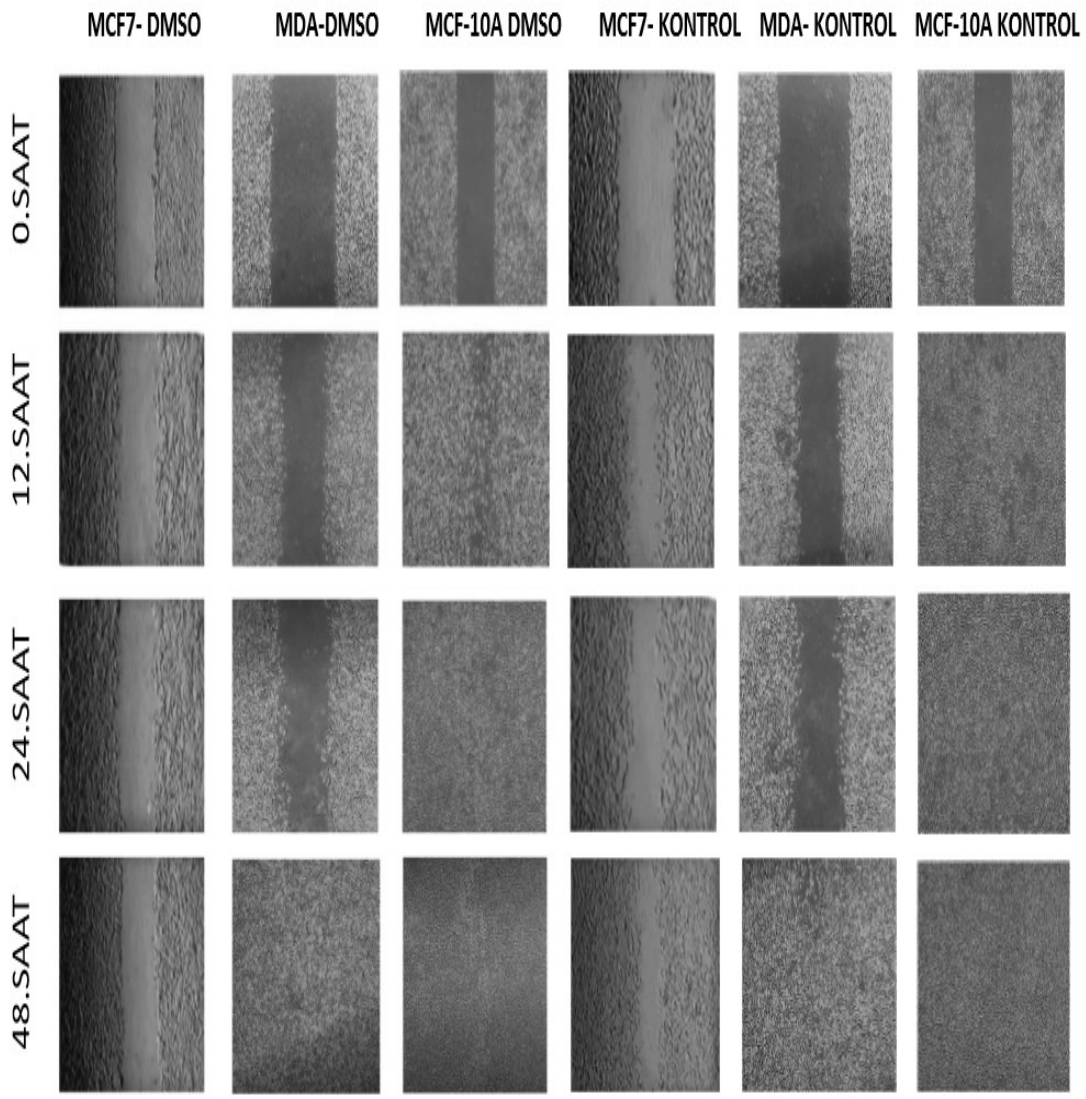
Tablo 25. Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyonunun uygulandığı MCF-10A hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
CU (40 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	87.9	1.1
CU (40 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	90.7	1.7
CU (40 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	90.6	1.1
CU (40 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	91.2	1.7
CU (50 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (1 mM)	91.0	1.1
CU (50 µM) - BV (250 µg/ml) - HU (3 mM)	90.9	1.7
CU (50 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (1 mM)	90.9	1.2
CU (50 µM) - BV (350 µg/ml) - HU (3 mM)	91.1	1.8
CU (39.4 µM) -BV (380.5 µg/ml) -HU (1.22 mM)	77.6	1.8

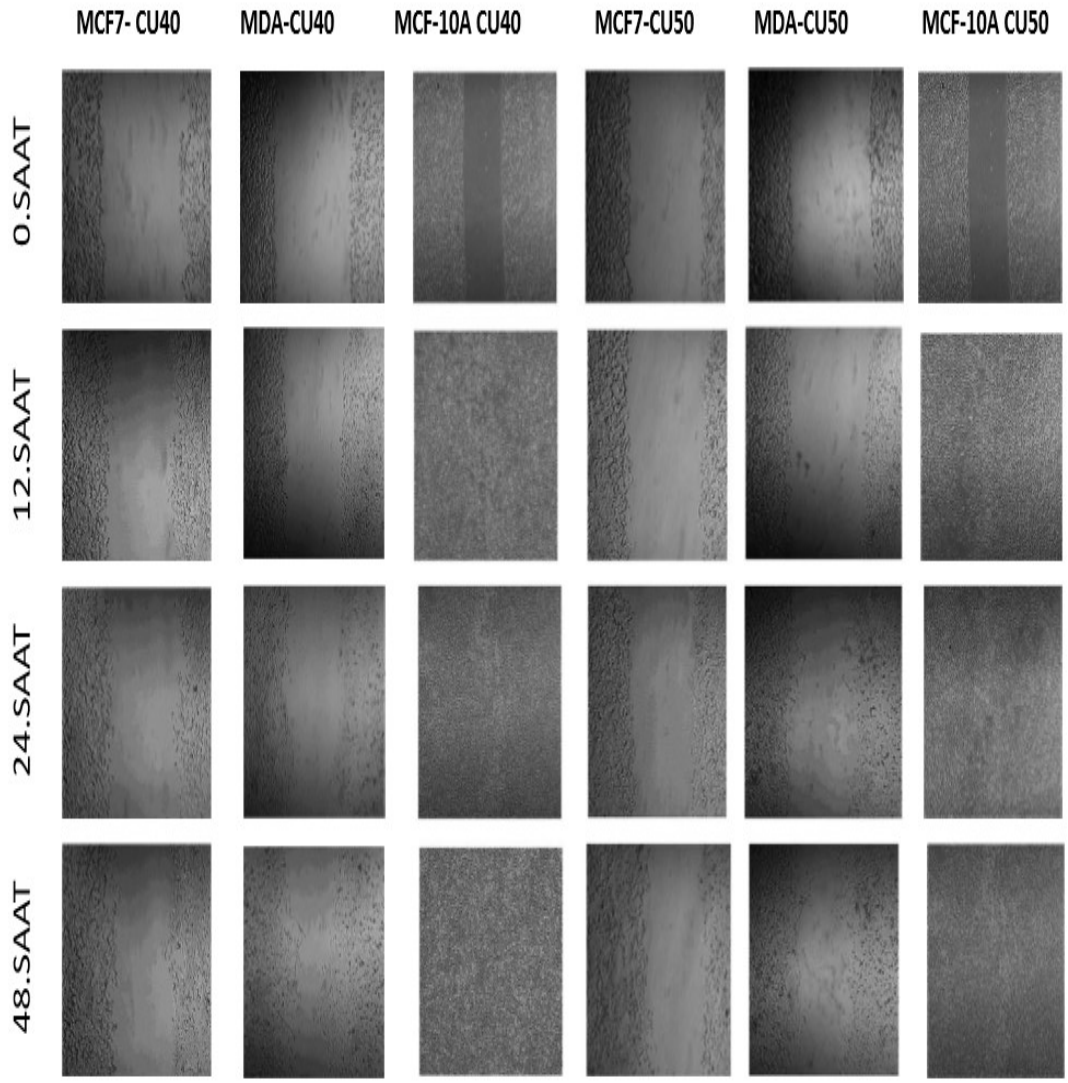
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattına uygulanan curcumin, bevacizumab ve hidroksiüre kombine dozları içinde sinerjistik etki gösteren grup bulunmamaktadır.

4.9. Hücrelerin Scratch Uygulamalarının Görüntüleri

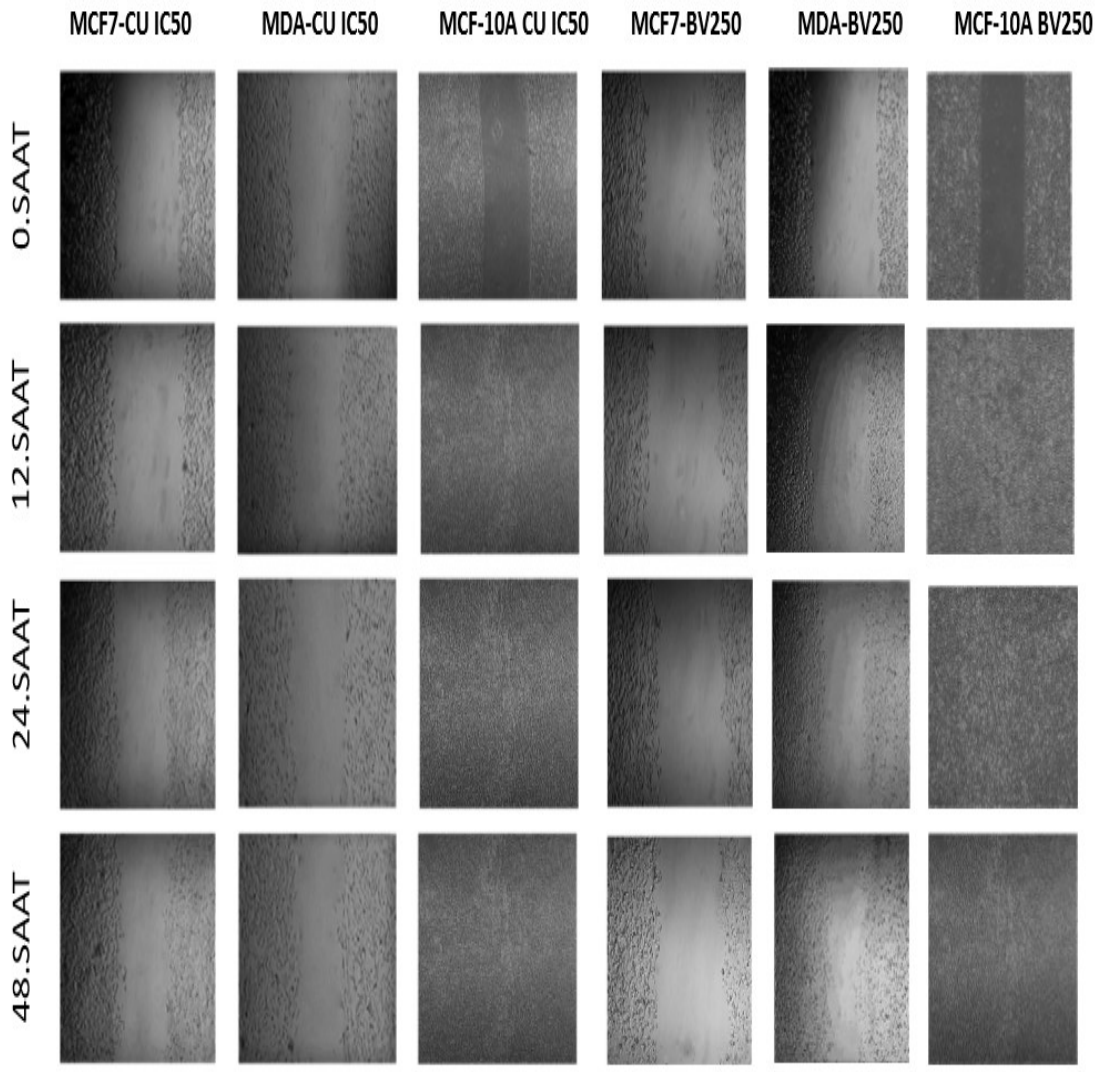
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri her kuyucukta yaklaşık $3x10^5$ hücre olucak şekilde 12 kuyucuklu kültür plağına ekildi. %70-80 konfuluensiye ulaştıktan sonra 200 µl' lik pipet ucu ile kuyucuğu tam ortalayacak şekilde çizik yapıldı. Mikroskopta 0., 12., 24. ve 48. saatlerde görüntüleri alınarak migrasyon gözlendi. 48. Saat ile 0. Saat arasındaki kapanan migrasyon alanı image-j programı ile ölçülerek % migrasyon oranı hesaplandı.



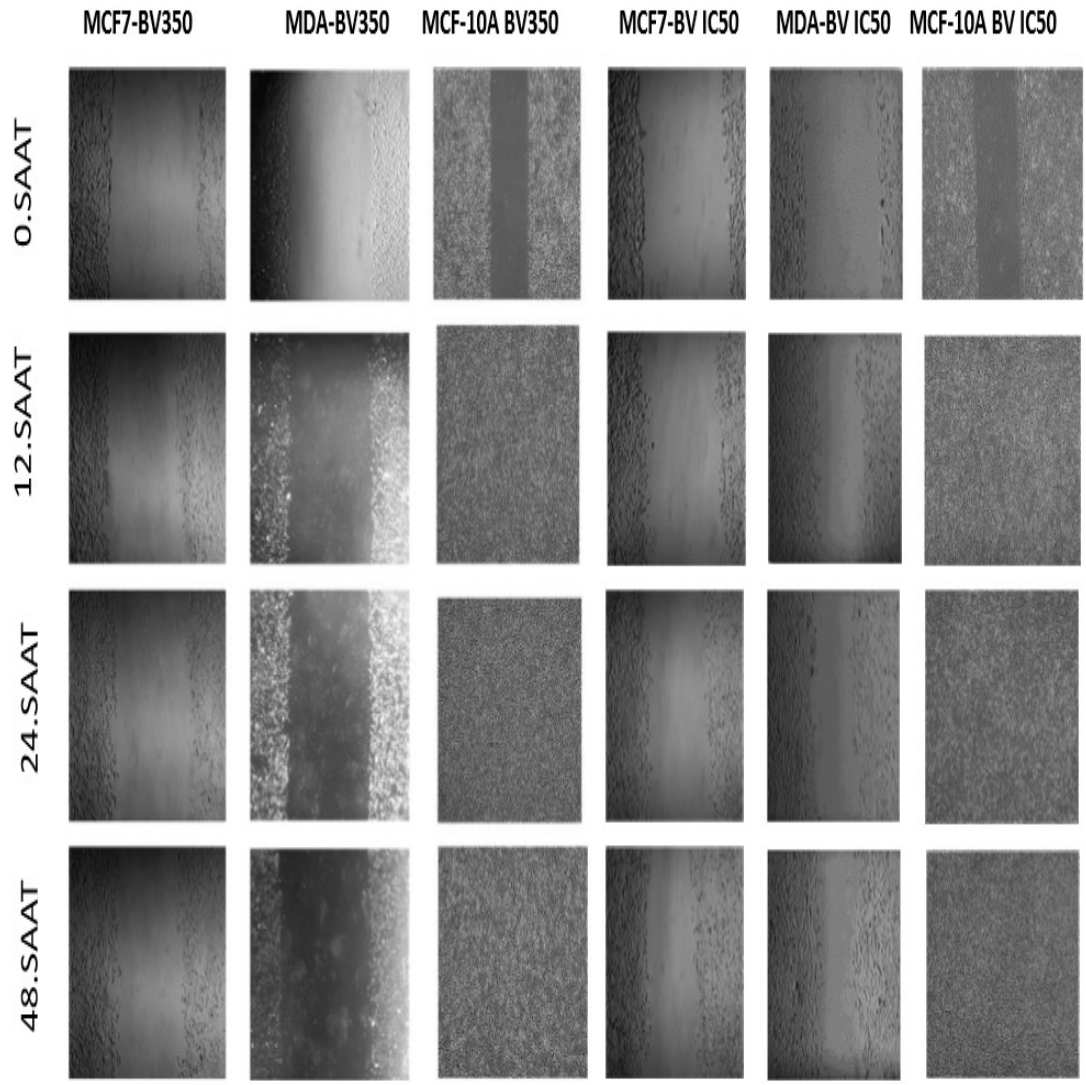
Şekil 21. DMSO uygulanmış ve kontrol MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin scratch görüntüleri



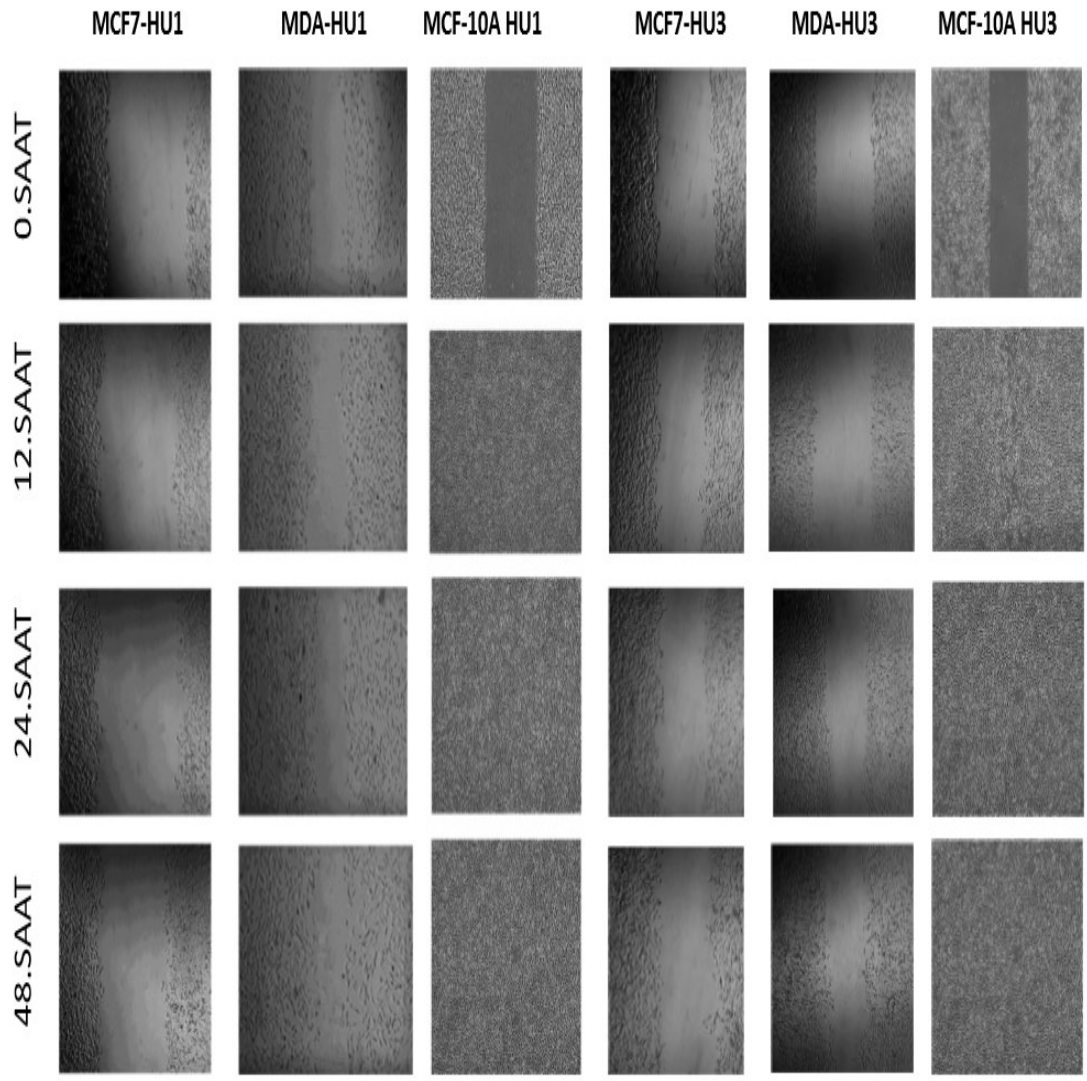
Şekil 22. Curcumin 40 µM ve 50 µM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



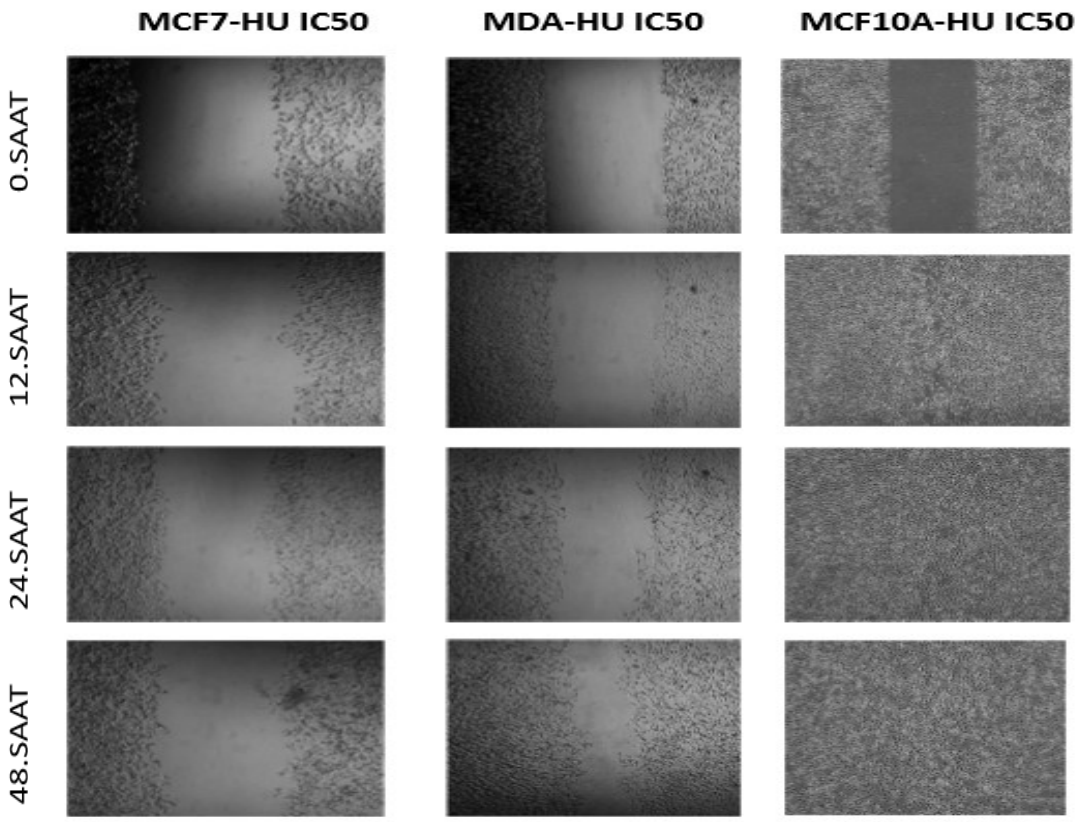
Şekil 23. Curcumin IC50 ve Bevacizumab 250 µg/ml uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



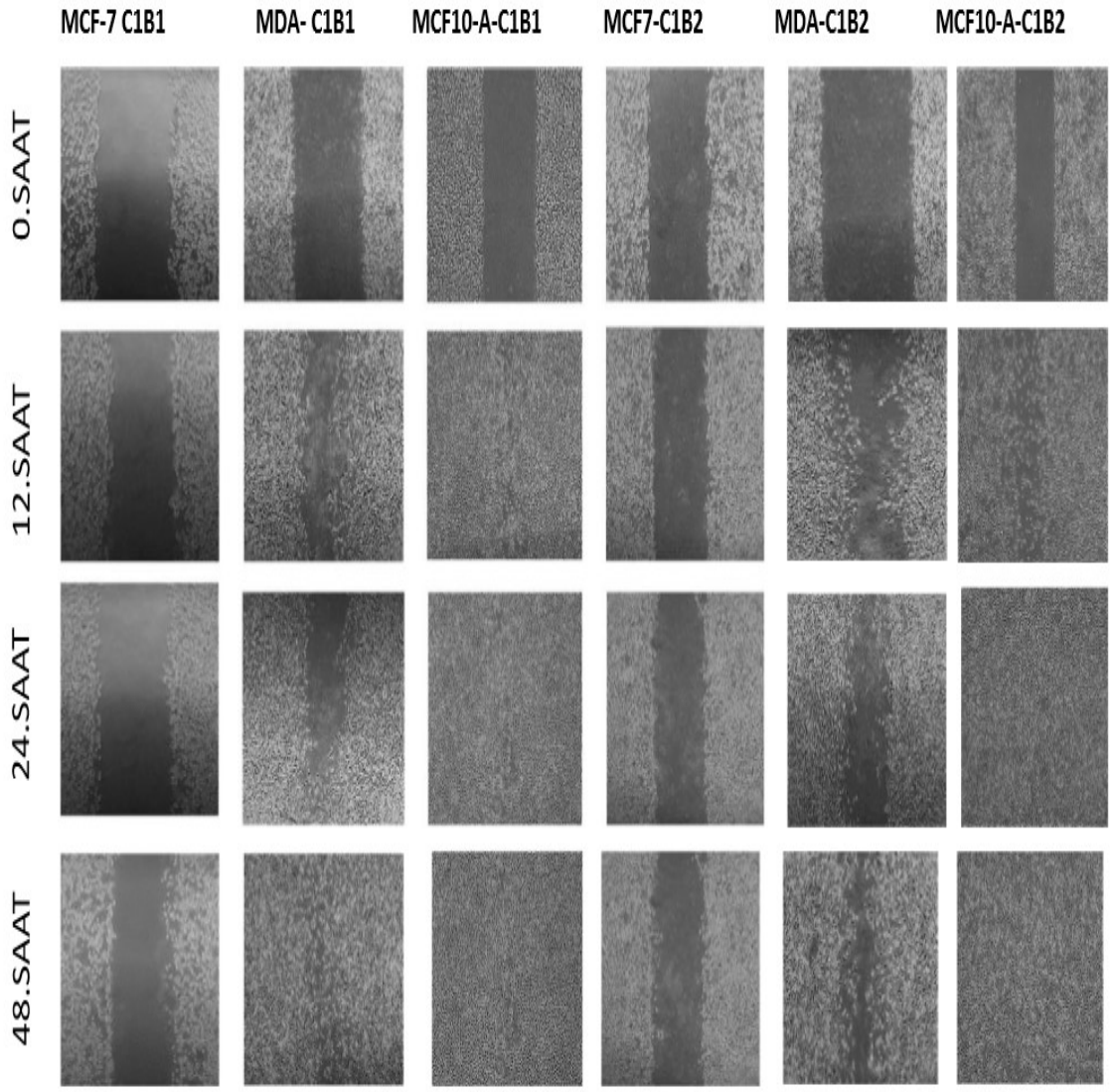
Şekil 24. Bevacizumab 350 µg/ml ve IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



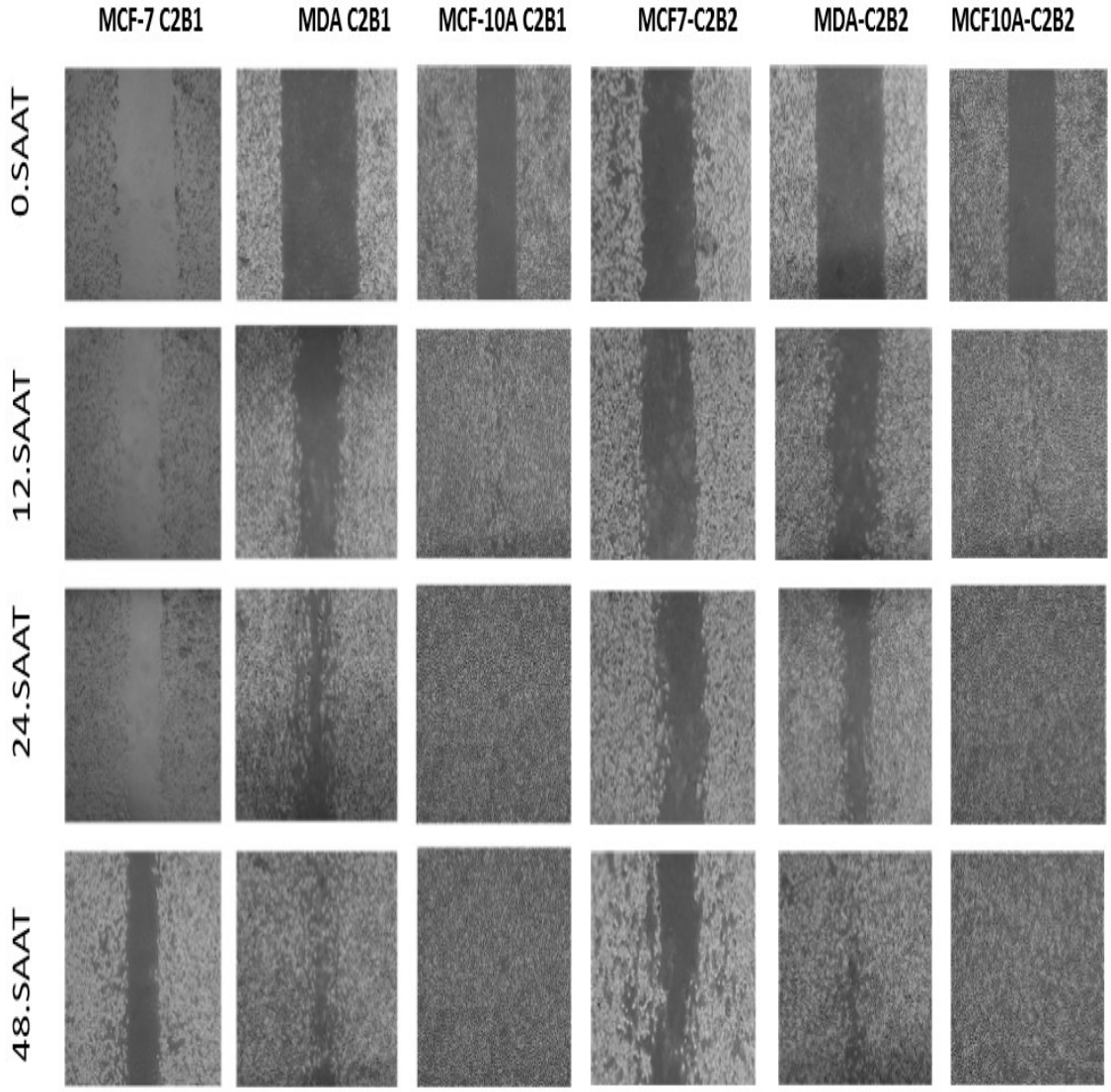
Şekil 25. Hidroksiüre 1 mM ve 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



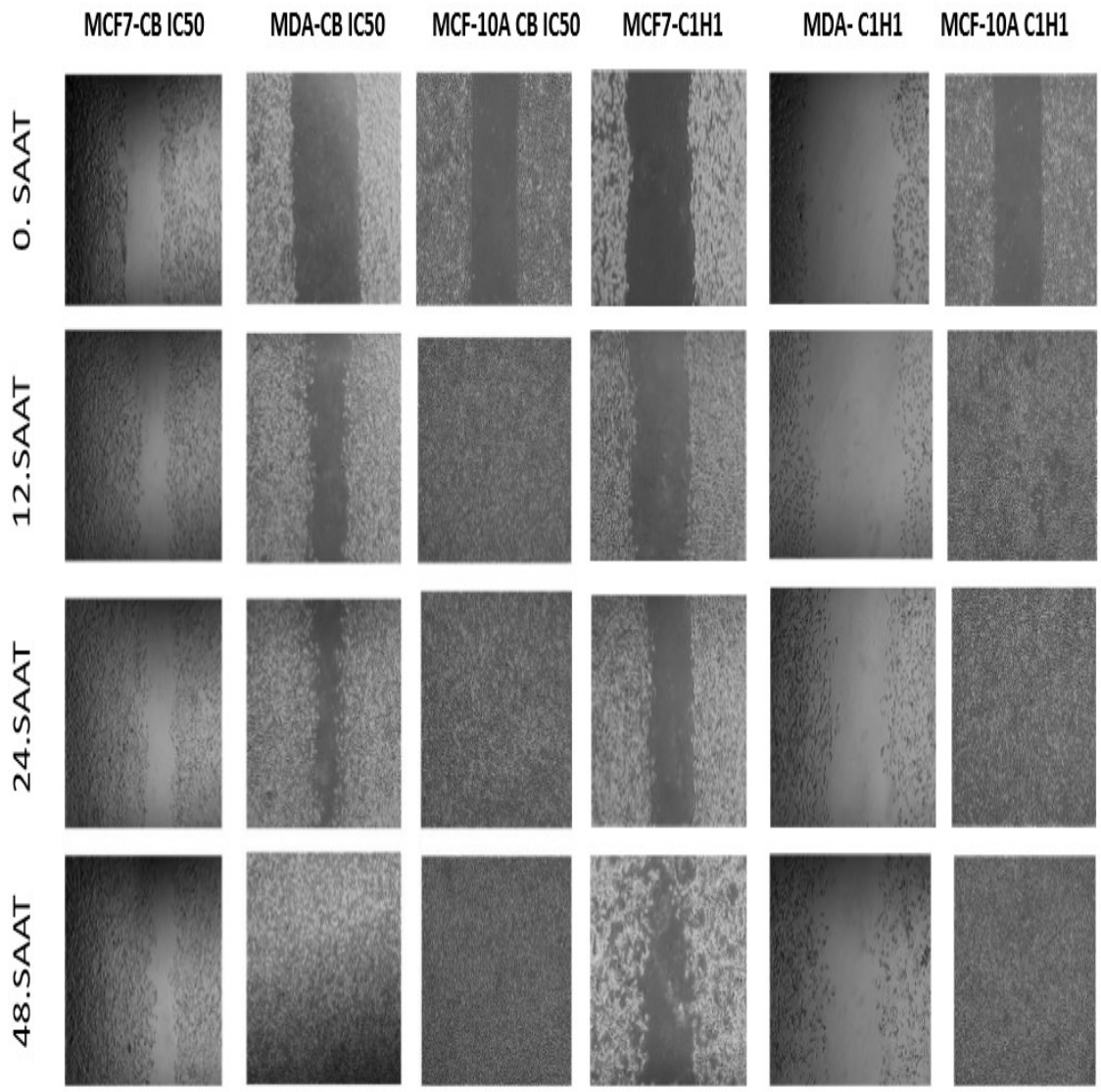
Şekil 26. Hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



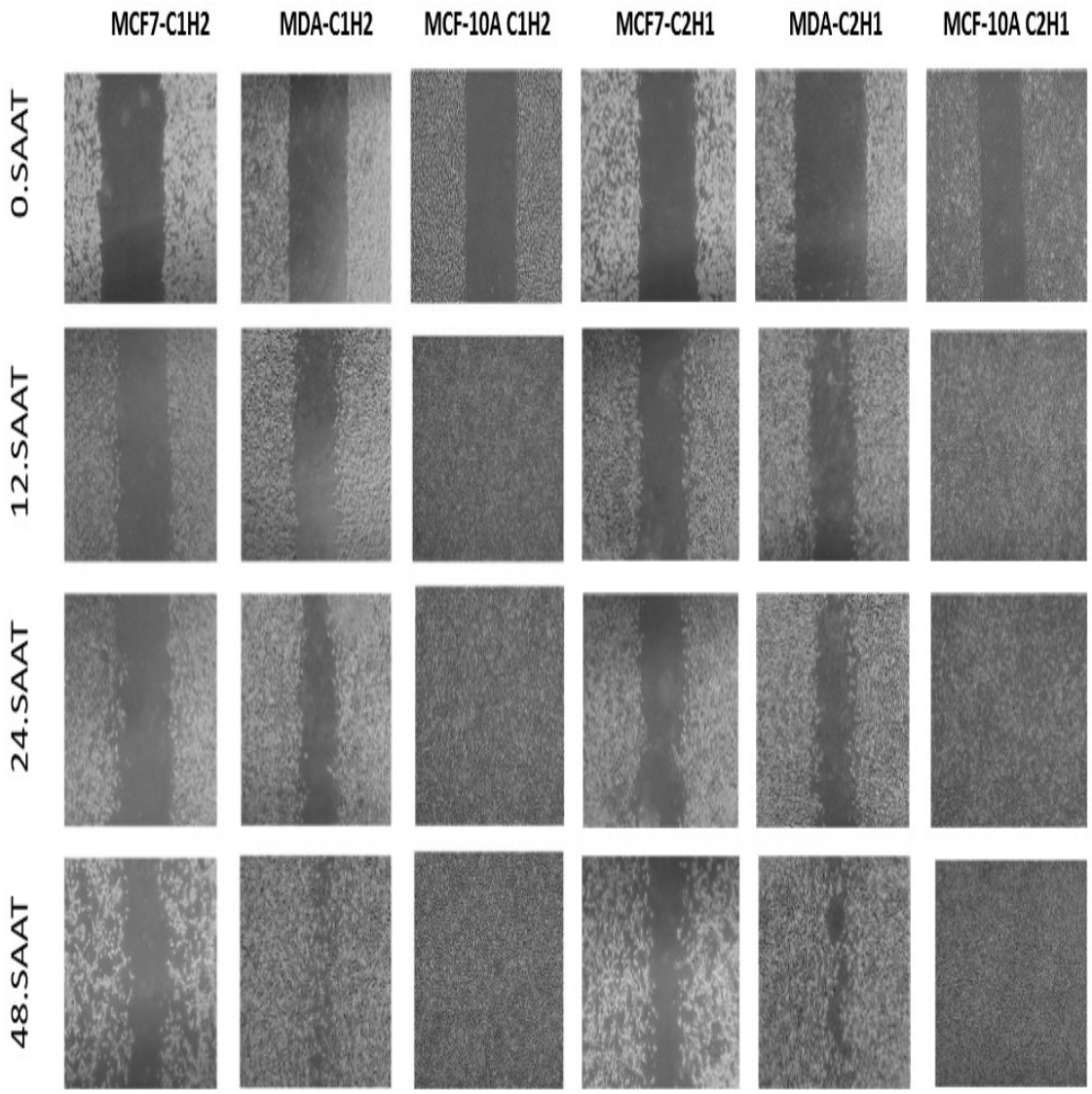
Şekil 27. Curcumin 40 µM+ Bevacizumab 250 µg/ml ve Curcumin 40 µM+ Bevacizumab 350 µg/ml uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



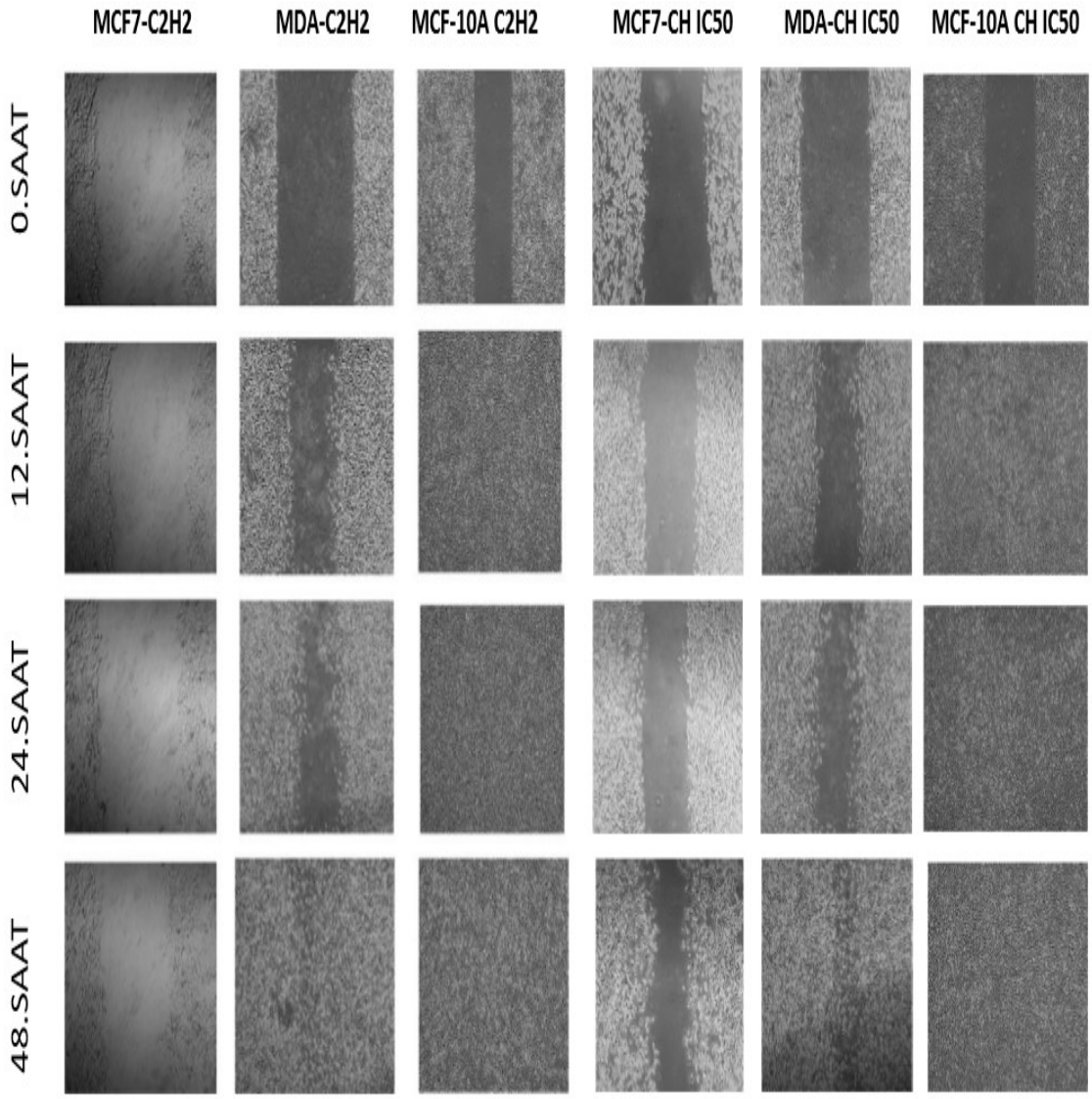
Şekil 28. Curcumin 50 µM+ Bevacizumab 250 µg/ml ve Curcumin 50 µM+ Bevacizumab 350 µg/ml uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



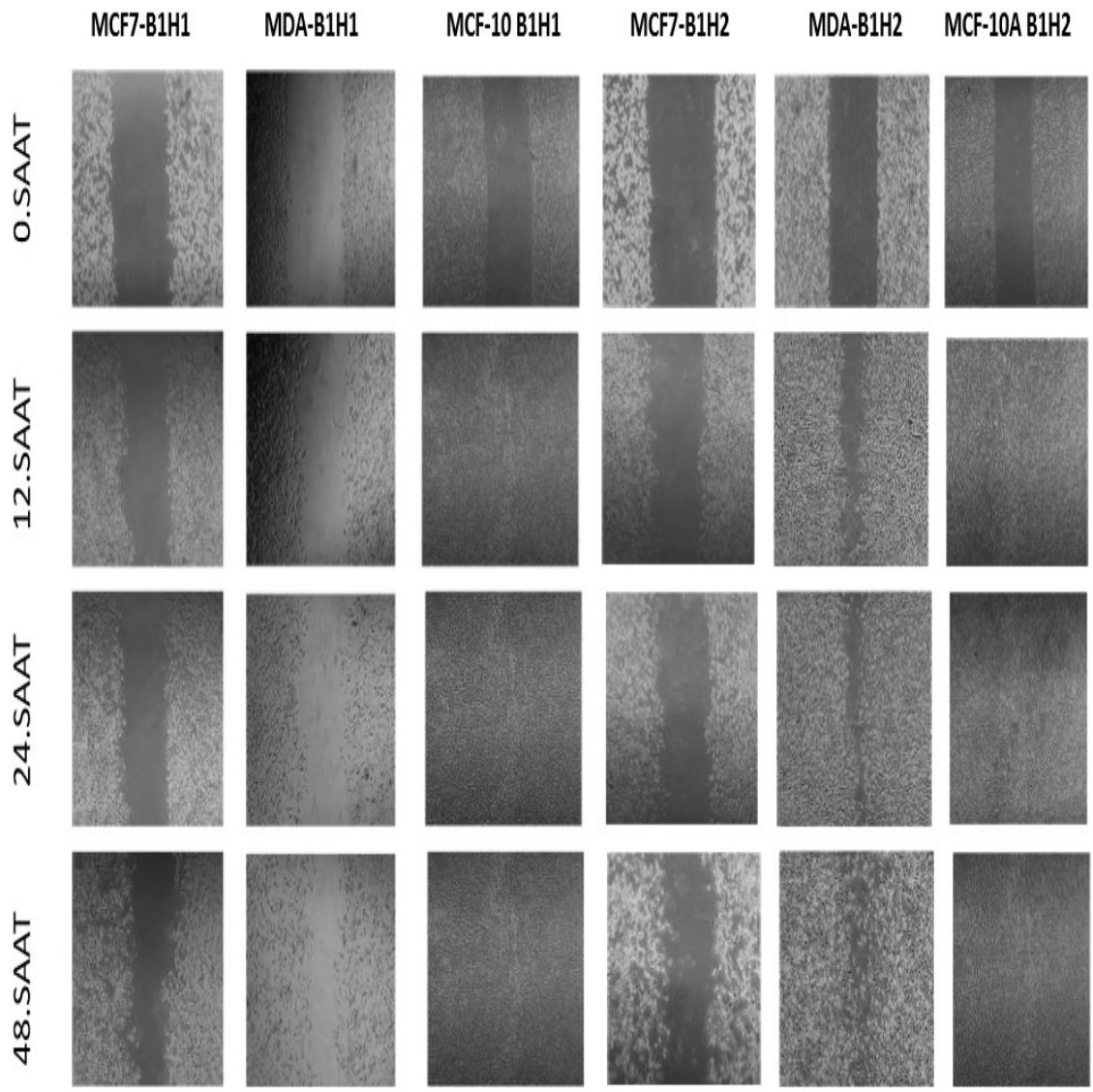
Şekil 29. Curcumin IC50+ Bevacizumab IC50 ve Curcumin 40 µM+ hidroksiüre 1 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



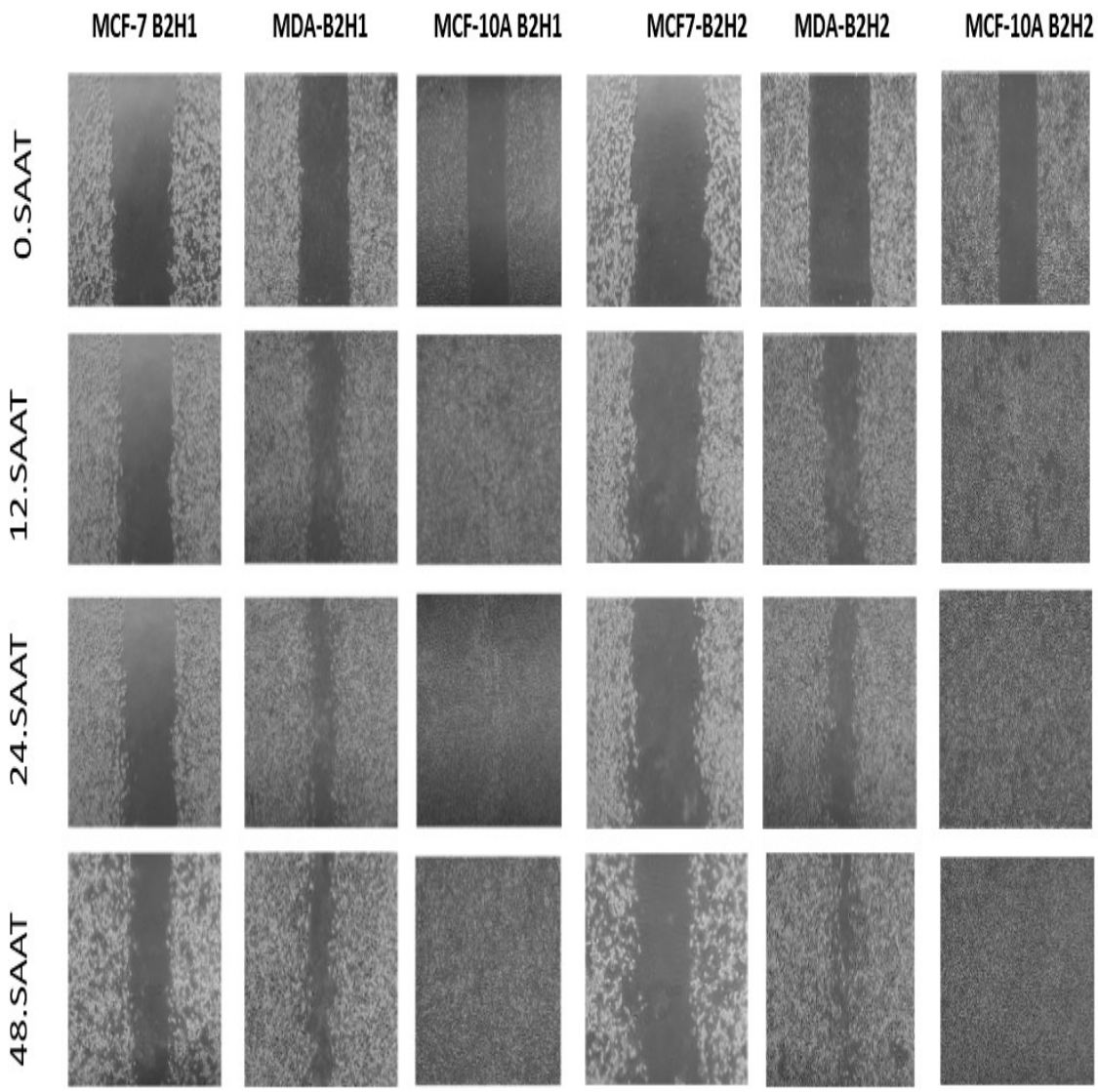
Şekil 30. Curcumin 40 µM+ hidroksiüre 3 mM ve Curcumin 50 µM+ hidroksiüre 1 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



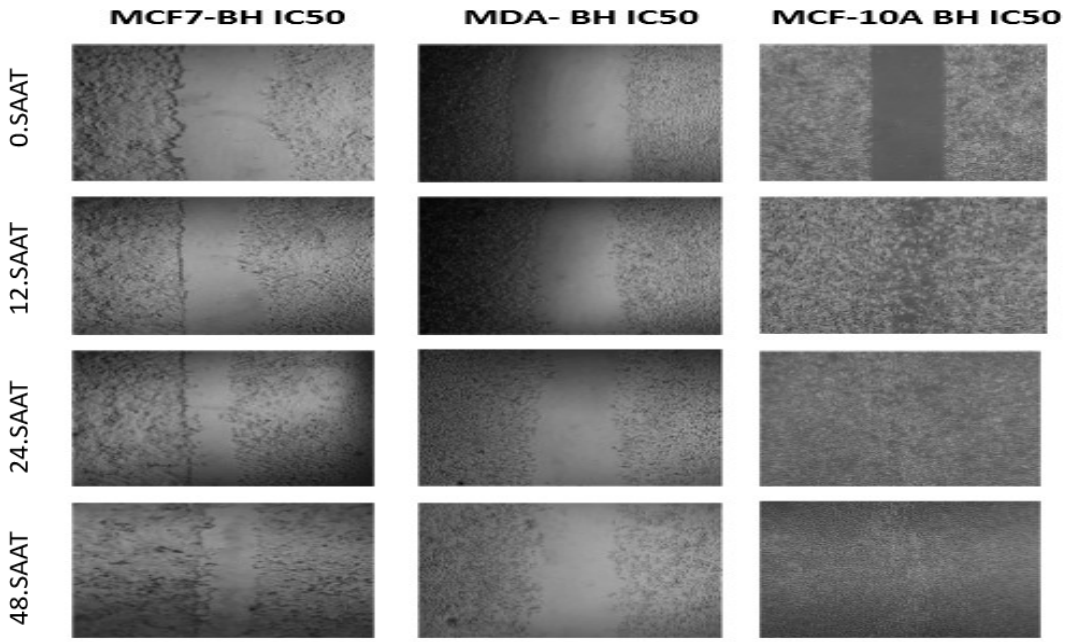
Şekil 31. Curcumin 50 µM+ hidroksiüre 3 mM ve Curcumin IC50+ hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



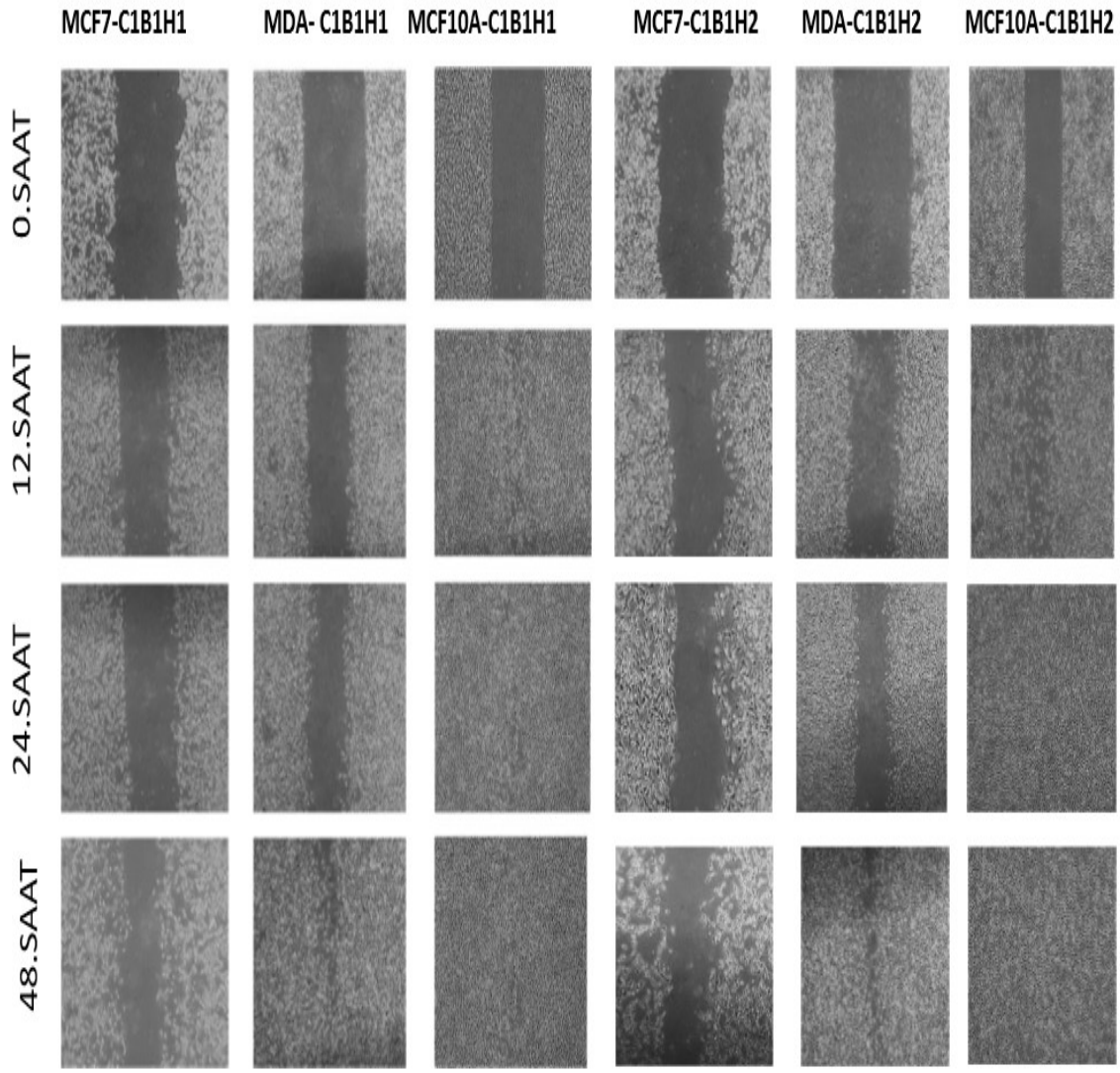
Şekil 32. Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



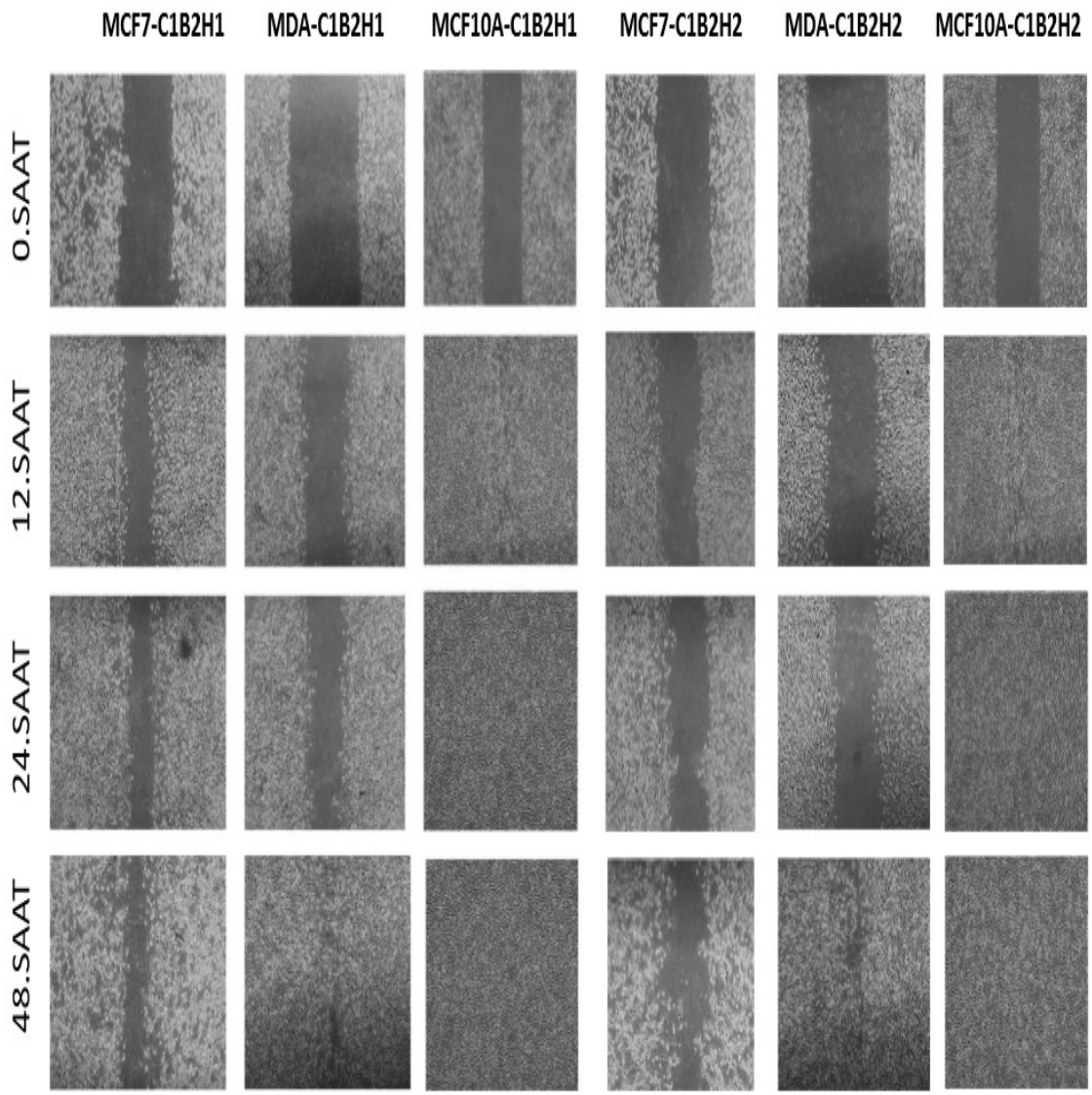
Şekil 33. Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



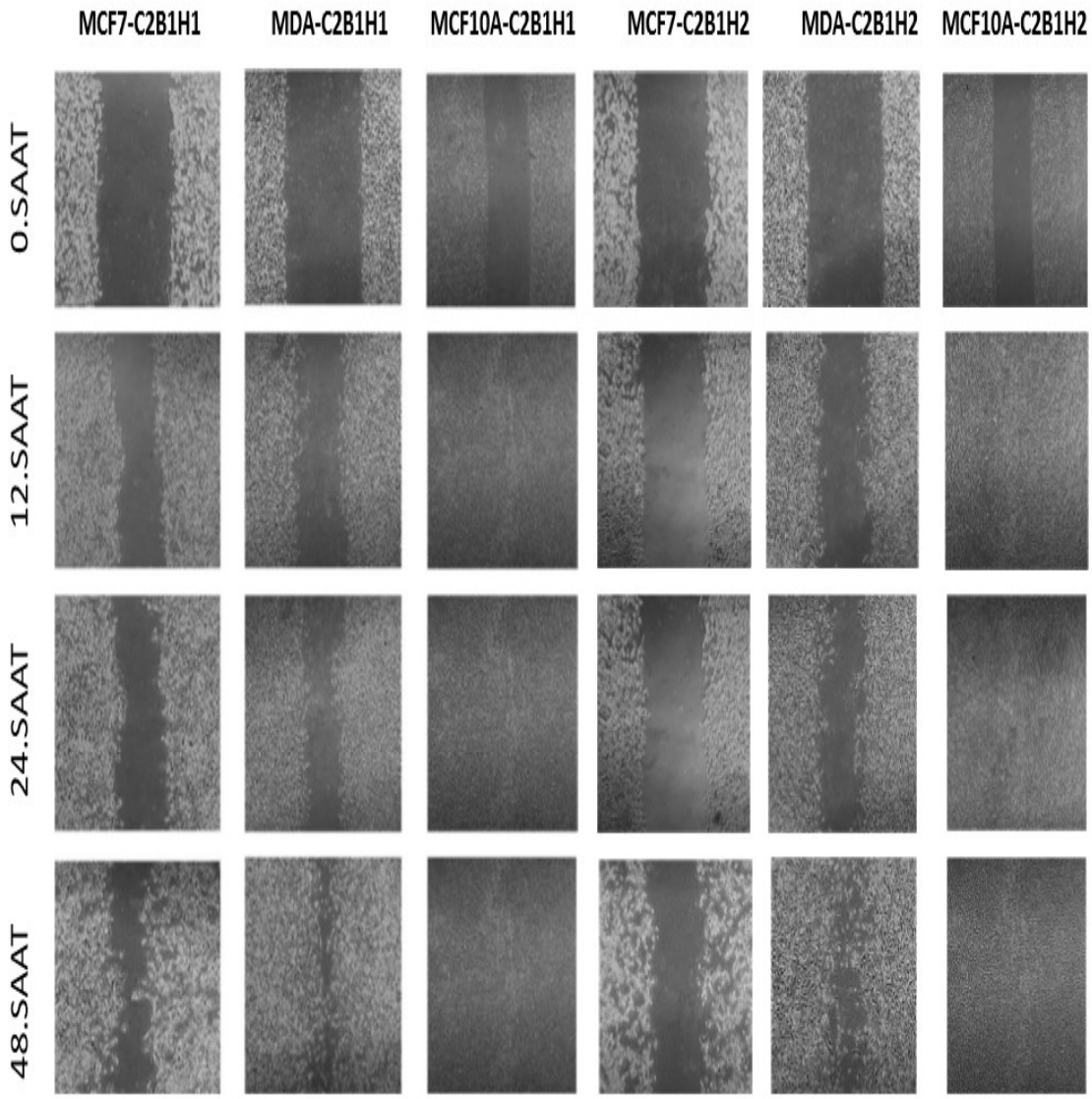
Şekil 34. Bevacizumab IC50+ hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



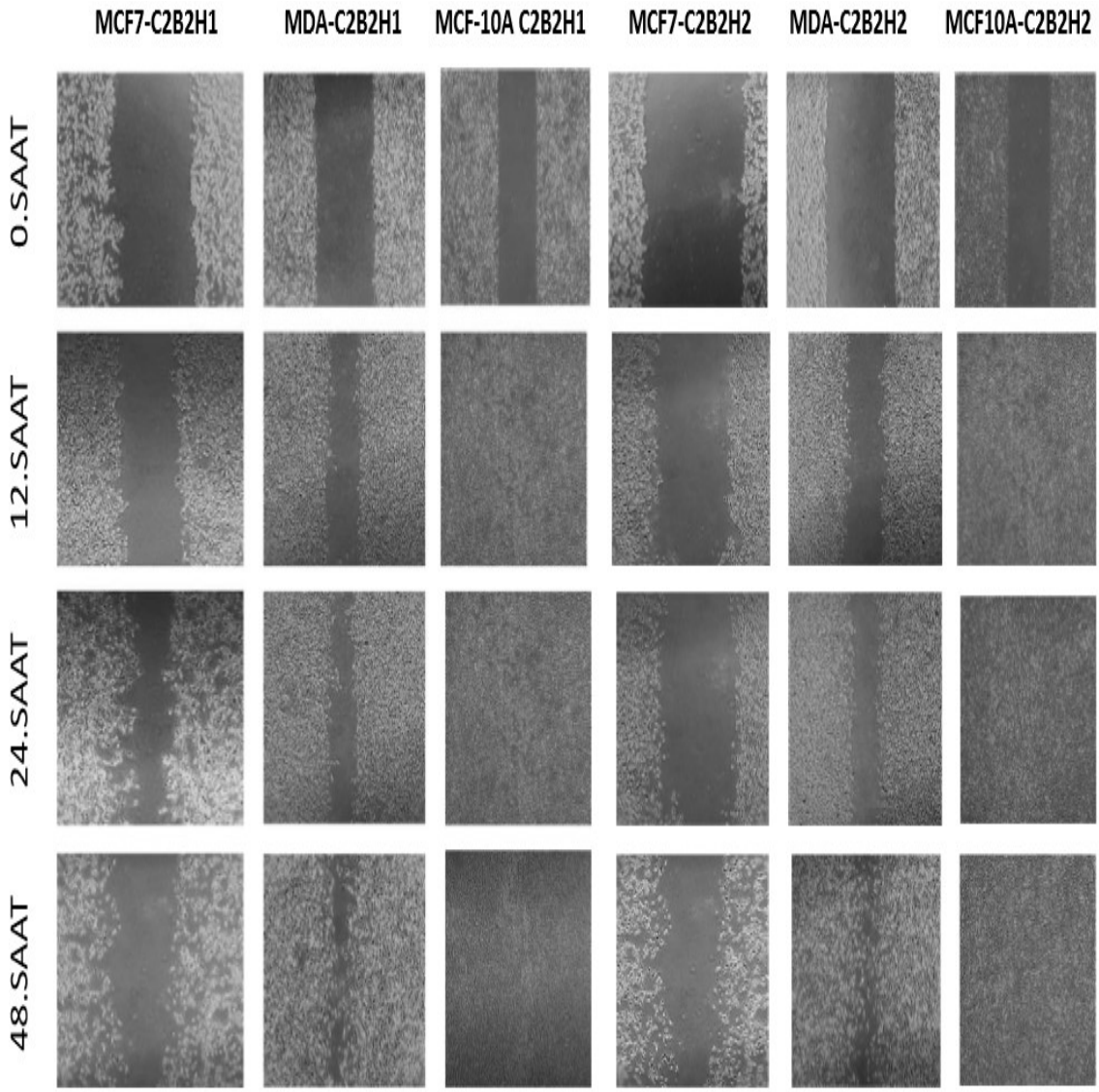
Şekil 35. Curcumin 40 µM + Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 40 µM + Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



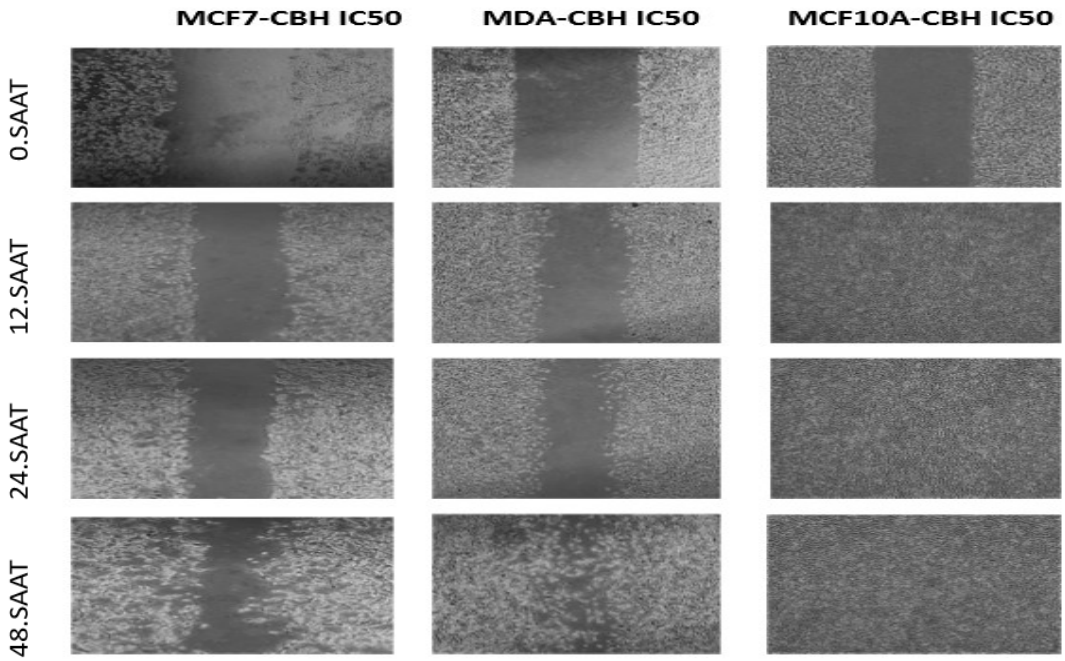
Şekil 36. Curcumin 40 µM, Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 40 µM, Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



Şekil 37. Curcumin 50 µM, Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 50 µM + Bevacizumab 250 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



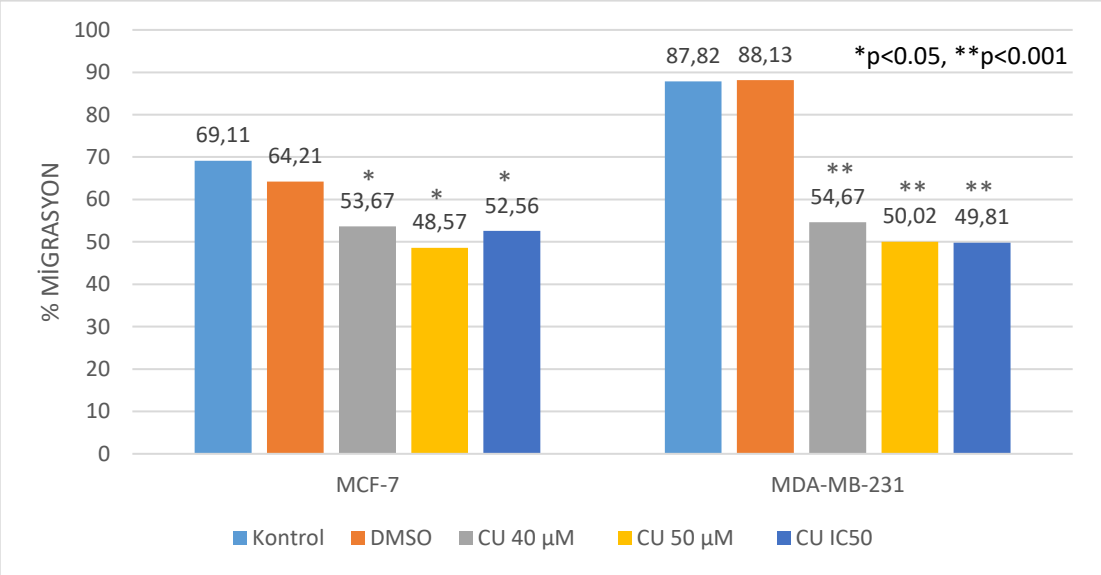
Şekil 38. Curcumin 50 µM + Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 1 mM ve curcumin 50 µM + Bevacizumab 350 µg/ml + hidroksiüre 3 mM uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri



Şekil 39. Curcumin IC50 + Bevacizumab IC50 + hidroksiüre IC50 uygulanmış MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının scratch görüntüleri

4.10. Curcuminin Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine scratch uygulaması yapıldıktan sonra 40 µM, 50 µM ve IC50 dozlarında curcumin uygulandı. MCF-10A hücreleri 12. Saatte tam kapanma gösterdi ve MCF-7 ile MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyon oranı şekil 40' daki gibidir.

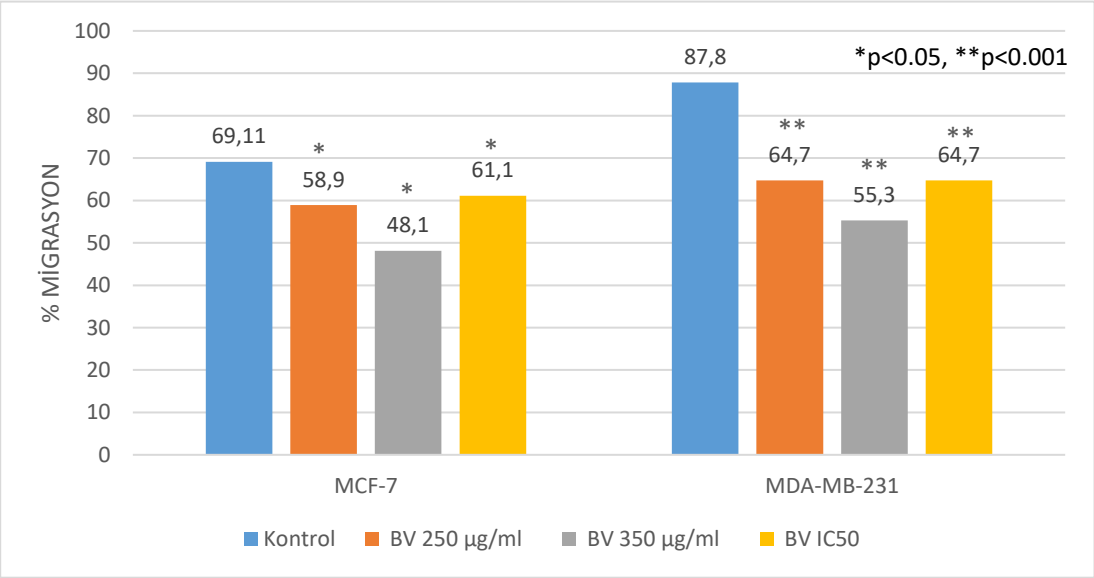


Şekil 40. Curcumin uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyonunun belirlenmesi

MCF-7 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde 50 µM curcumin grubu ve MDA-MB-231 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde IC50 (53,56 µM) curcumin grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

4.11. Bevacizumabın Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine scratch uygulaması yapıldıktan sonra 250 µg/ml, 350 µg/ml ve IC50 dozlarında Bevacizumab uygulandı. MCF-10A hücreleri 12. Saatte tam kapanma gösterdi ve MCF-7 ile MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyon oranı şekil 41' deki gibidir.

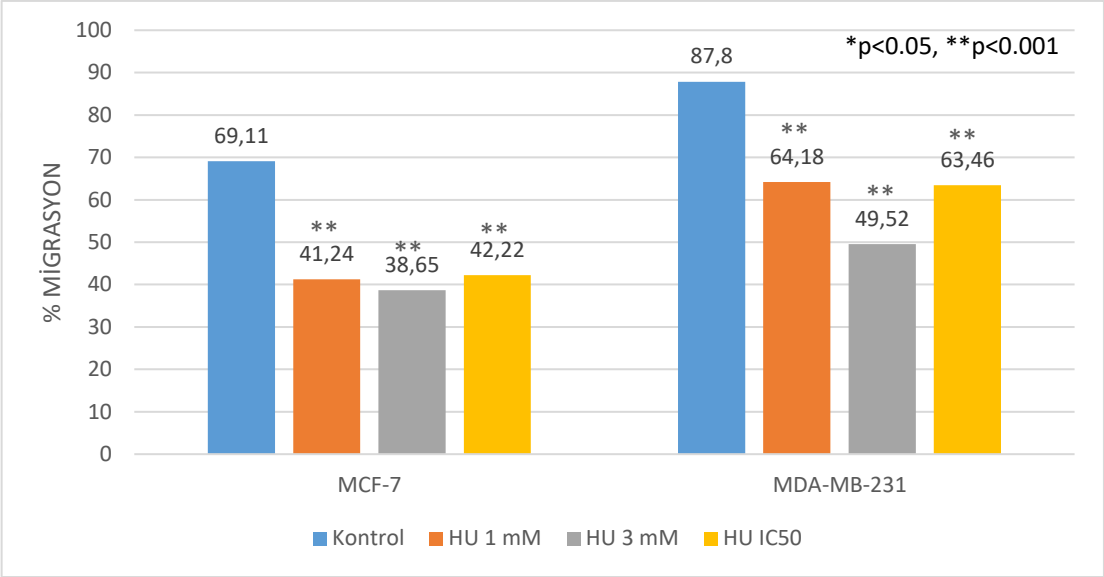


Şekil 41. Bevacizumab uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyonunun belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde 350 µg/ml Bevacizumab grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

4.12. Hidroksiürenin Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine scratch uygulaması yapıldıktan sonra 1 mM, 3 mM ve IC50 dozlarında hidroksiüre uygulandı. MCF-10A hücreleri 12. Saatte tam kapanma gösterdi ve MCF-7 ile MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyon oranı şekil 42' deki gibidir.

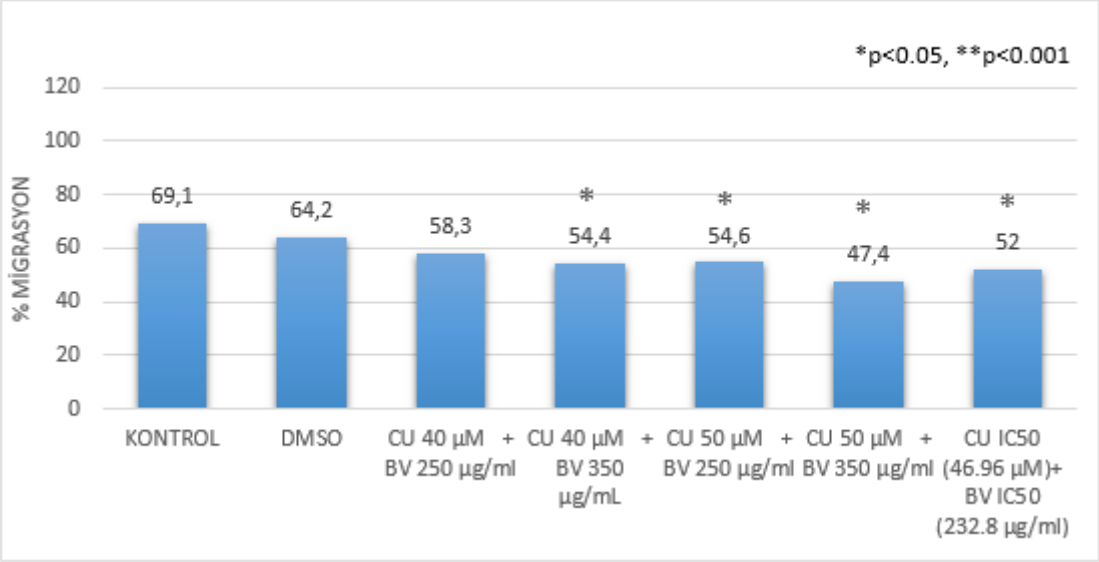


Şekil 42. Hidroksiüre uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyonunun belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde 3 mM hidroksiüre grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

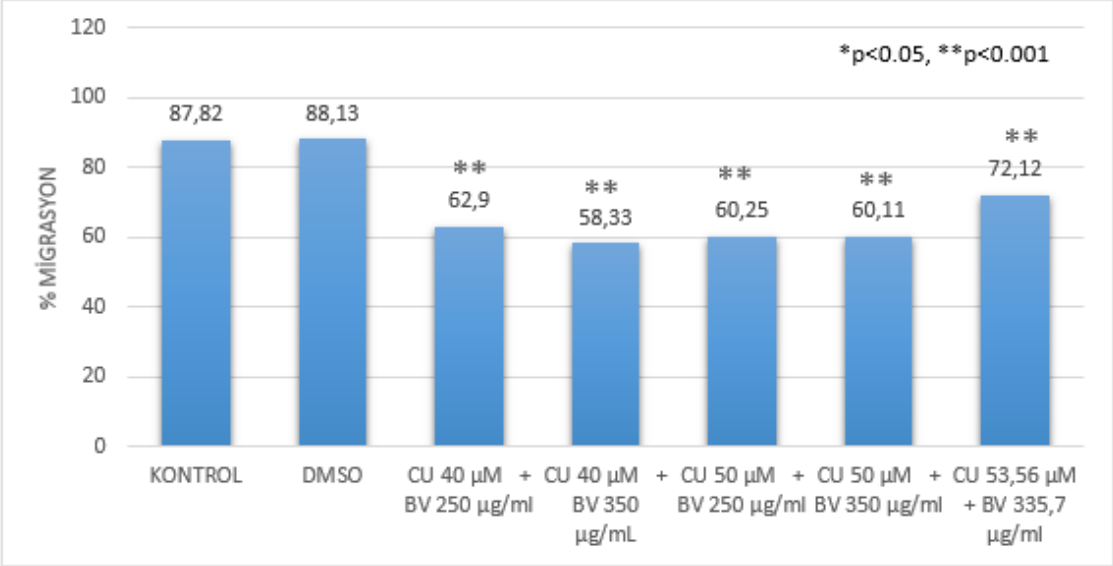
4.13. Curcumin Ve Bevacizumab Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine scratch uygulaması yapıldıktan sonra 5 farklı curcumin ve Bevacizumab kombinasyon dozları hücrelere uygulandı. MCF-10A hücreleri 12. Saatte tam kapanma gösterdi ve MCF-7 ile MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyon oranı şekil 43 ve 44' deki gibidir.



Şekil 43. Curcumin ve Bevacizumab uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MCF-7 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde curcumin 50 µM ve Bevacizumab 350 µg/mL grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

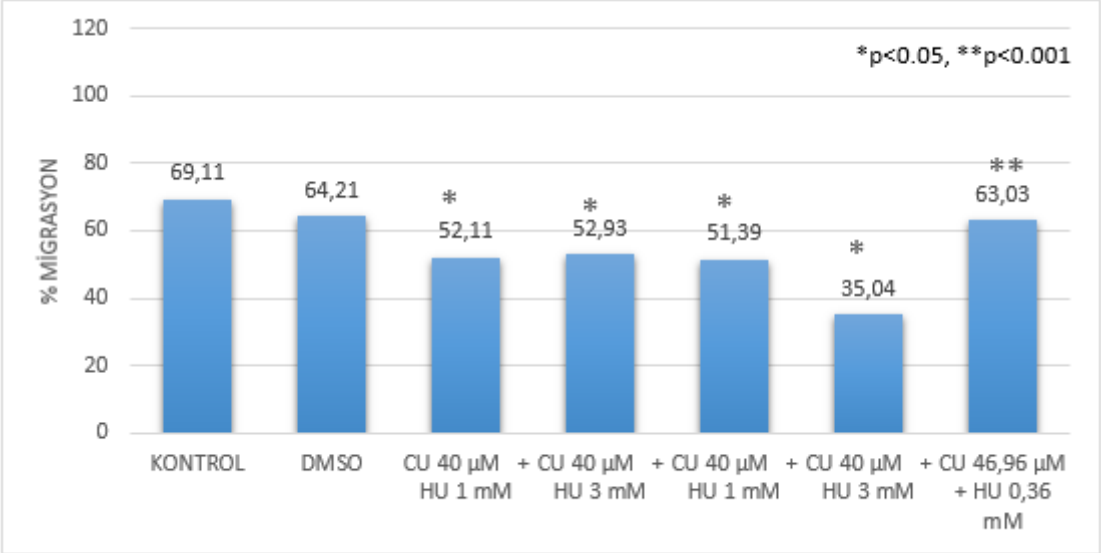


Şekil 44. Curcumin ve Bevacizumab uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MDA-MB-231 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde curcumin 40 µM ve Bevacizumab 350 µg/mL grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

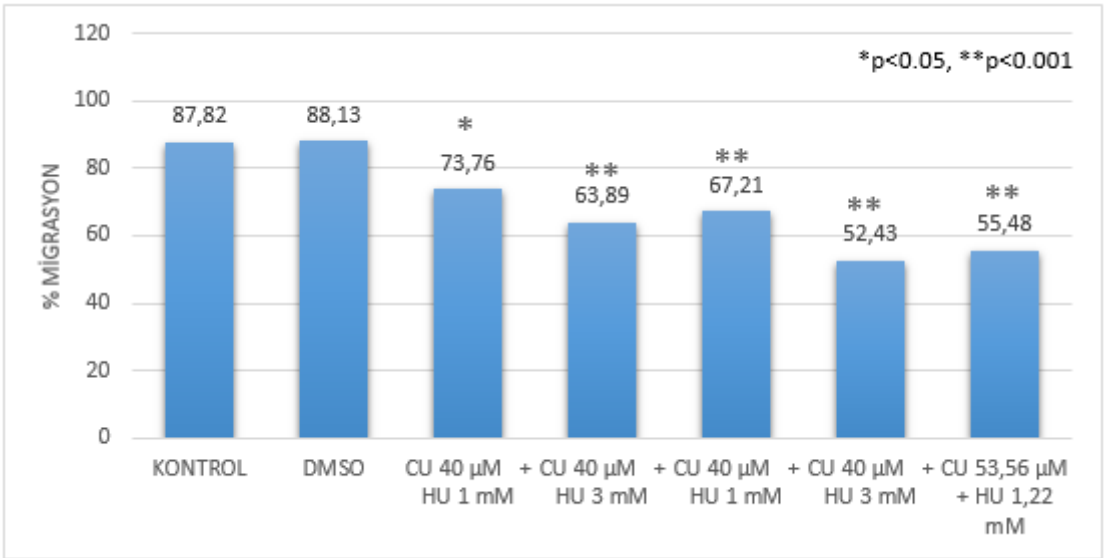
4.14. Curcumin Ve Hidroksiürenin Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine scratch uygulaması yapıldıktan sonra 5 farklı curcumin ve hidroksiüre kombinasyon dozları hücrelere uygulandı. MCF-10A hücreleri 12. Saatte tam kapanma gösterdi ve MCF-7 ile MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyon oranı şekil 45 ve 46' daki gibidir.



Şekil 45. Curcumin ve hidroksiüre uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MCF-7 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde curcumin 40 µM ve hidroksiüre 3 mM grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

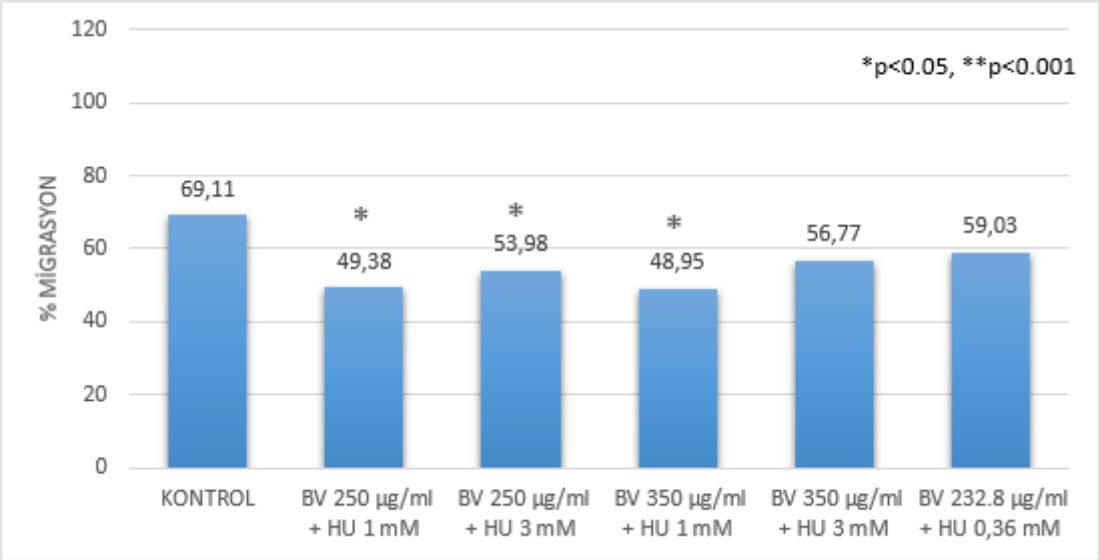


Şekil 46. Curcumin ve hidroksiüre uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MDA-MB-231 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde curcumin 40 µM ve hidroksiüre 3 mM grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

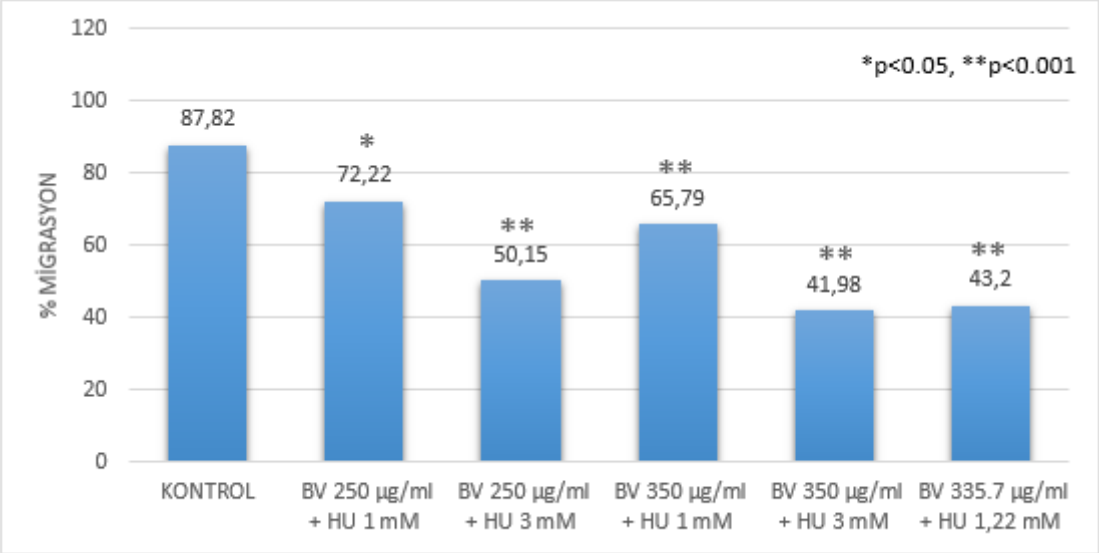
4.15. Bevacizumab Ve Hidroksiürenin Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine scratch uygulaması yapıldıktan sonra 5 farklı Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyon dozları hücrelere uygulandı. MCF-10A hücreleri 12. Saatte tam kapanma gösterdi ve MCF-7 ile MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyon oranı şekil 47 ve 48' deki gibidir.



Şekil 47. Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MCF-7 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde Bevacizumab 350 µg/mL ve hidroksiüre 1 mM grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.



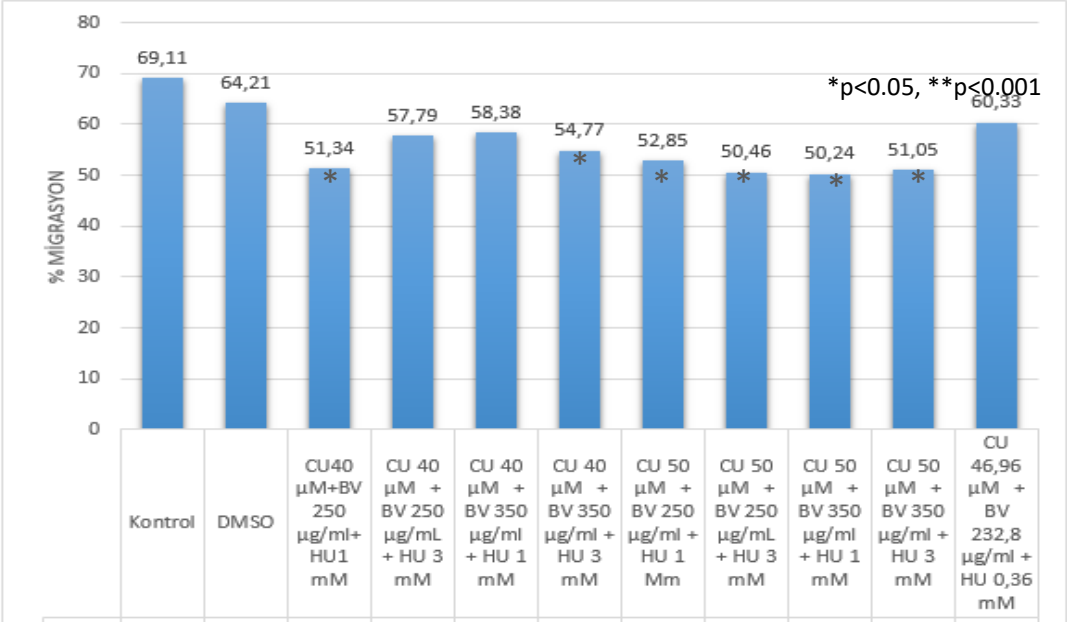
Şekil 48. Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MDA-MB-231 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde Bevacizumab 350 µg/mL ve hidroksiüre 3 mM grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

4.16. Curcumin, Bevacizumab Ve Hidroksiürenin Kombinasyonunun Hücrelerin Migrasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

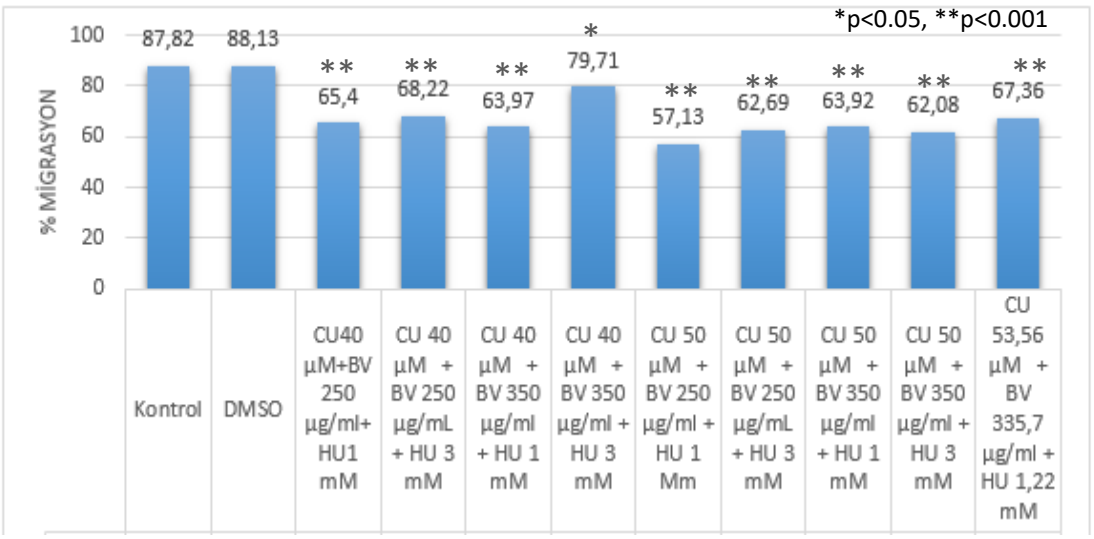
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine scratch uygulaması yapıldıktan sonra 9 farklı curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre kombinasyon dozları hücrelere uygulandı.

MCF-10A hücreleri 12. Saatte tam kapanma gösterdi ve MCF-7 ile MDA-MB-231 hücre hatlarının % migrasyon oranı şekil 49 ve 50’ deki gibidir.



Şekil 49. Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MCF-7 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MCF-7 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde curcumin 50 µM, Bevacizumab 350 µg/mL ve hidroksiüre 1 mM grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.



Şekil 50. Curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre uygulanan MDA-MB-231 hücre hattının % migrasyonunun belirlenmesi

MDA-MB-231 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde curcumin 50 µM, bevacizumab 250 µg/mL ve hidroksiüre 1 mM grubu en düşük % migrasyon oranı göstermiştir.

4.17. Kombinasyon Gruplarının Seçilmesi

Migrasyon sonucunda image-j ile yapılan hesaplamalar ile <%50 migrasyon değeri gösteren ve WST-1 sonucunda Compusyn programı ile sinerjistik kombinasyon gösteren (<1 CI) gruplar seçildi.

Tablo 26. MCF-7 hücre hattında seçilen kombinasyon grupları

Grup	**Kombinasyon İndeks Değeri (CI)**	**% Migrasyon**
CU IC50-BV IC50	0.74	51.96
CU 50 µM -HU 3 mM	0.67	35.04
BV 250 µg/ml -HU1 mM	0.62	49.38
BV 350 µg/ml -HU1 mM	0.61	48.95

Seçilen MCF-7 kombinasyon grupları curcumin 50 µM ve hidroksiüre 3 mM, bevacizumab 250 µg/mL ve hidroksiüre 1 mM ile bevacizumab 350 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM gruplarıdır.

Tablo 27. MDA-MB-231 hücre hattında seçilen kombinasyon grupları

Grup	**Kombinasyon İndeks Değeri (CI)**	**% Migrasyon**
CU 40 µM - HU1 mM	0.74	73.76
BV250 µg/ml - HU1 mM	0.50	72.22
BV350 µg/ml - HU1 mM	0.65	65.79
BV IC50- HU IC50	0.41	41.98

Seçilen MDA-MB-231 kombinasyon grubu bevacizumab IC50 (335,7 µg/mL) ve hidroksiüre IC50 (1,22 mM) kombinasyon grubudur.

MCF-10A hücre hattında sinerjistik etki ve <%50 migrasyon oranı gösteren kombinasyon grupları olmadığı için bu hücre hattında kombinasyon grubu seçilememiştir.

4.18. İzolasyon Öncesi Hücre Grupları

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarının curcumin (40 µM, 50 µM, IC50), Bevacizumab (250 µg/ml, 350 µg/ml, IC50), hidroksüre (1 mM, 3mM, IC50) olmak üzere deney grupları ve 1 tane kontrol grubu vardır. Ek olarak MCF-7' nin 3 farklı kombinasyon doz grubu (CU 50 µM + HU 3 mM, BV 250 µg/ml + HU1 mM ve BV 350 µg/ml + HU1 mM) ile birlikte toplam 13 grubu vardır. MDA-MB-231' in 1 kombinasyon doz grubu ile birlikte toplam 11 farklı grubu vardır. MCF-10A' nın kombinasyon grubu olmadığı için toplam 10 grubu vardır.

4.19. RNA Örneklerinin Kantitasyonu

72 saat inkübasyon sürelerini dolduran MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre gruplarının total RNA izolasyonu sonucu örneklerin içerdiği RNA miktarı Tablo 28, 29 ve 30'da verilmiştir.

Tablo 28. MCF-7 örneklerine ait RNA miktarları

Örnek adı	**Kons. (µg/µl)**	**Örnek adı**	**Kons. (µg/µl)**
Kontrol	448	HU 1 mM	424
CU 40 µM	451,2	HU 3 mM	448
CU 50 µM	1433,6	HU 0,36 mM (IC50)	1724
CU 46,96 µM (IC50)	1276	CU50 µM -HU 3 mM	404
BV 250 µg/ml	252	BV250 µg/ml+HU1 mM	1076
BV 350 µg/ml	178	BV350 µg/ml+HU1 mM	900
BV 232,8 µg/ml(IC50)	356		

Tablo 29. MDA-MB-231 örneklerine ait RNA miktarları

Örnek adı	**Kons. (µg/µl)**	**Örnek adı**	**Kons. (µg/µl)**
Kontrol	1020	BV 335,7 µg/mL (IC50)	831
CU 40 µM	791,2	HU1 mM	946,3
CU 50 µM	694,2	HU3 mM	669,4
CU 53,56 µM (IC50)	697,4	HU 1,22 mM (IC50)	673,1
BV 250 µg/ml	694,6	BV IC50 -HU IC50	741
BV 350 µg/ml	781		

Tablo 30. MCF-10A örneklerine ait RNA miktarları

Örnek adı	**Kons. (µg/µl)**	**Örnek adı**	**Kons. (µg/µl)**
Kontrol	4800	BV 350 µg/Ml	726,4
CU 40 µM	904	BV 380,5 µg/mL (IC50)	783
CU 50 µM	605	HU1 mM	681,6
CU 39,4 µM (IC50)	822	HU3 mM	934
BV 250 µg/ml	1888	HU 1,22 mM (IC50)	684

4.20. Gen Ekspresyon Analizleri

HIF-1α, VEGF, EPO ve *C-Raf* gen ekspresyon düzeyleri, ABI7500 (Applied Biosystems) kullanılarak belirlendi. Housekeeping gen olarak *β-aktin* kullanıldı. *HIF-1α, VEGF, EPO* ve *C-Raf* ile *β-aktin* ekspresyonları oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı.

Tablo 31. *MCF-7 örneklerine ait* HIF-1α *gen ekspresyon düzeyleri*

Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değer (Ref. Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	24,27	*HIF-1α*	26,08	1,81	1,81	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	15,81	*HIF-1α*	21,31	5,50	3,69	0,077
CU 50 µM	*β-aktin*	24,94	*HIF-1α*	23,07	-1,87	-3,67	12,758
CU IC_{50} (46,96 µM)	*β-aktin*	23,44	*HIF-1α*	23,30	2,64	0,84	0,559
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	22,52	*HIF-1α*	25,23	2,71	0,91	0,533
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	22,70	*HIF-1α*	25,14	2,44	0,63	0,646
BV IC_{50} (232,8 µg/ml)	*β-aktin*	17,52	*HIF-1α*	20,73	3,21	1,40	0,378
HU 1 mM	*β-aktin*	19,65	*HIF-1α*	22,96	3,34	1,54	0,345
HU 3 mM	*β-aktin*	20,29	*HIF-1α*	23,68	3,39	1,59	0,333
HU IC_{50} (0,363 mM)	*β-aktin*	17,89	*HIF-1α*	21,81	3,92	2,12	0,231
CU 50 µM + HU 3 mM	*β-aktin*	19,28	*HIF-1α*	22,83	3,55	1,74	0,299
BV 250 µg/ml + + HU 1 mM	*β-aktin*	19,17	*HIF-1α*	22,39	3,22	1,41	0,375
BV 350 µg/ml + + HU 1 mM	*β-aktin*	17,53	*HIF-1α*	21,47	3,94	2,13	0,228

Tablo 32. MCF-7 örneklerine ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri

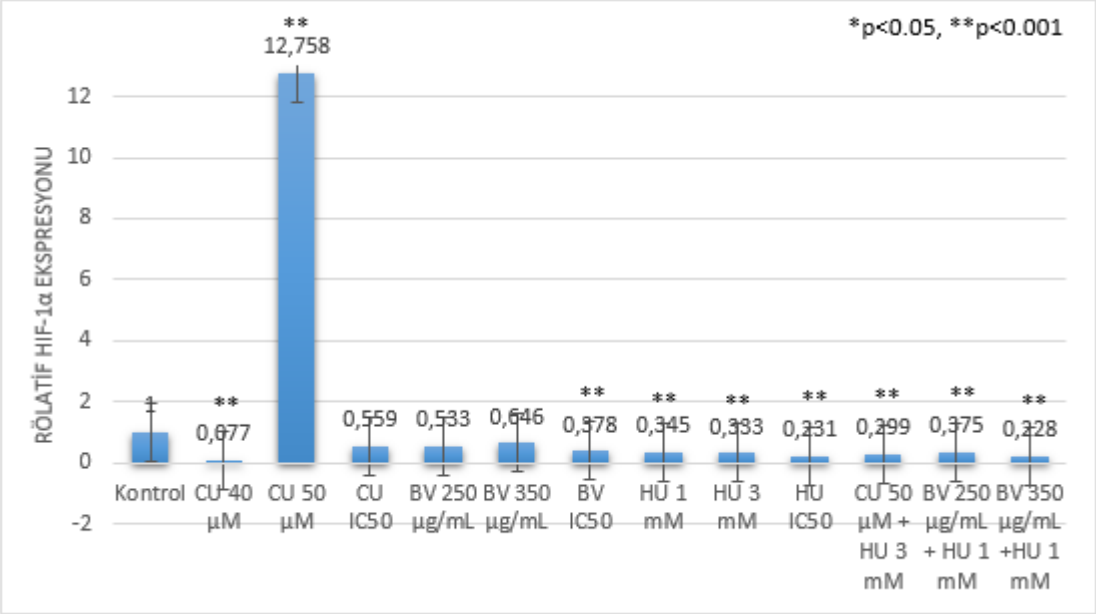
Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değer (Ref. Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	24,27	*VEGF*	34,03	9,76	9,76	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	15,81	*VEGF*	32,00	16,19	6,43	0,012
CU 50 µM	*β-aktin*	24,94	*VEGF*	33,09	8,15	-1,61	3,045
CU IC_{50} (46,96 µM)	*β-aktin*	23,44	*VEGF*	32,63	9,19	-0,57	1,481
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	22,52	*VEGF*	32,87	10,35	0,60	0,661
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	22,70	*VEGF*	33,03	10,33	0,57	0,672
BV IC_{50} (232,8 µg/ml)	*β-aktin*	17,52	*VEGF*	32,07	14,55	4,79	0,036
HU 1 mM	*β-aktin*	19,65	*VEGF*	32,49	12,88	3,12	0,115
HU 3 mM	*β-aktin*	20,29	*VEGF*	32,90	12,61	2,86	0,138
HU IC_{50} (0,363 mM)	*β-aktin*	17,89	*VEGF*	30,88	12,99	3,23	0,106
CU 50 µM + HU 3 mM	*β-aktin*	19,28	*VEGF*	31,64	12,36	2,60	0,165
BV 250 µg/ml + HU 1 mM	*β-aktin*	19,17	*VEGF*	32,31	13,14	3,38	0,096
BV 350 µg/ml + HU 1 mM	*β-aktin*	17,53	*VEGF*	32,19	14,66	4,91	0,033

Tablo 33. MCF-7 örneklerine ait EPO gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değer (Ref.Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	24,87	*EPO*	27,06	2,19	2,19	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	16,54	*EPO*	28,32	11,78	9,59	0,001
CU 50 µM	*β-aktin*	24,49	*EPO*	27,49	3,00	0,81	0,569
CU IC_{50} (46,96 µM)	*β-aktin*	24,10	*EPO*	26,81	2,71	0,52	0,697
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	23,40	*EPO*	25,94	2,54	0,35	0,785
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	23,79	*EPO*	26,10	2,64	0,46	0,729
BV IC_{50} (232,8 µg/ml)	*β-aktin*	18,21	*EPO*	26,63	8,42	6,23	0,013
HU 1 mM	*β-aktin*	20,29	*EPO*	27,91	7,62	5,43	0,023
HU 3 mM	*β-aktin*	20,90	*EPO*	27,88	6,98	4,79	0,036
HU IC_{50} (0,363 mM)	*β-aktin*	18,99	*EPO*	28,08	9,09	6,90	0,008
CU 50 µM + HU 3 mM	*β-aktin*	20,15	*EPO*	28,35	8,20	6,01	0,015
BV 250 µg/ml + HU 1 mM	*β-aktin*	19,90	*EPO*	27,66	7,89	5,71	0,019
BV 350 µg/ml + HU 1 mM	*β-aktin*	18,32	*EPO*	27,92	9,60	7,41	0,006

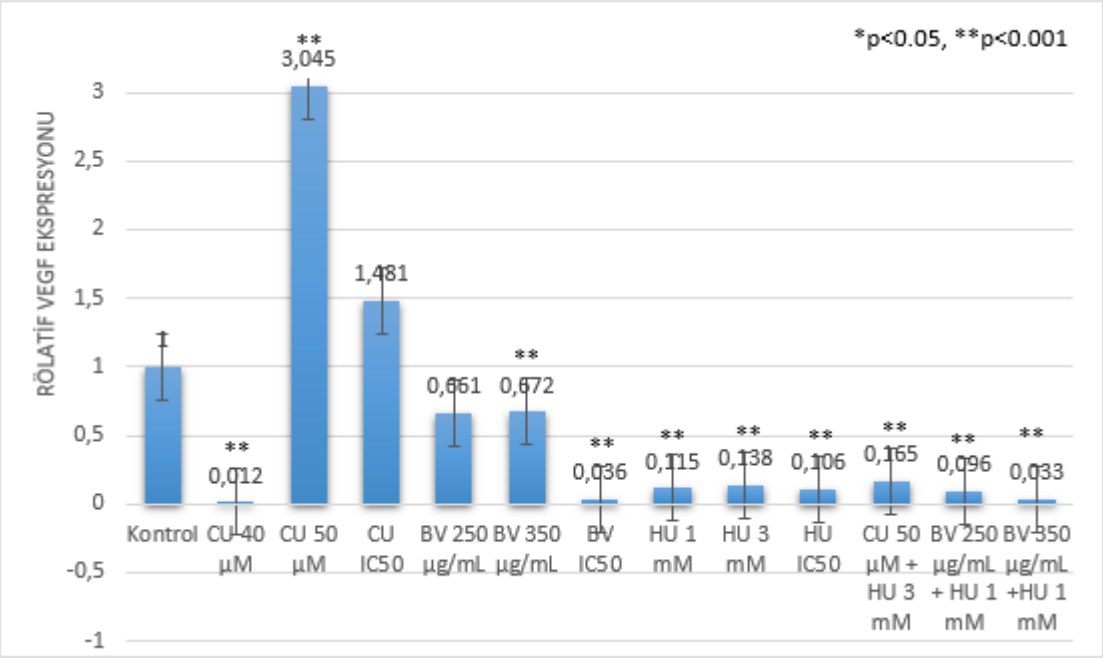
Tablo 34. MCF-7 örneklerine ait *C-Raf* gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değeri (Ref. Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	24,87	*C-Raf*	30,21	5,34	5,34	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	16,54	*C-Raf*	30,10	13,56	8,22	0,003
CU 50 µM	*β-aktin*	24,49	*C-Raf*	30,56	6,07	0,73	0,603
CU IC_{50} (46,96 µM)	*β-aktin*	24,10	*C-Raf*	30,03	5,93	0,59	0,663
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	23,40	*C-Raf*	29,13	5,73	0,39	0,761
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	23,79	*C-Raf*	29,24	5,78	0,45	0,734
BV IC_{50} (232,8 µg/ml)	*β-aktin*	18,21	*C-Raf*	29,58	11,37	6,03	0,015
HU 1 mM	*β-aktin*	20,29	*C-Raf*	31,00	10,71	5,37	0,024
HU 3 mM	*β-aktin*	20,90	*C-Raf*	30,70	9,80	4,46	0,045
HU IC_{50} (0,363 mM)	*β-aktin*	18,99	*C-Raf*	30,66	11,67	6,34	0,012
CU 50 µM + HU 3 mM	*β-aktin*	20,15	*C-Raf*	31,01	10,86	5,53	0,022
BV 250 µg/ml + HU 1 mM	*β-aktin*	19,90	*C-Raf*	30,77	10,92	5,58	0,021
BV 350 µg/ml + HU 1 mM	*β-aktin*	18,32	*C-Raf*	30,31	11,99	6,65	0,009



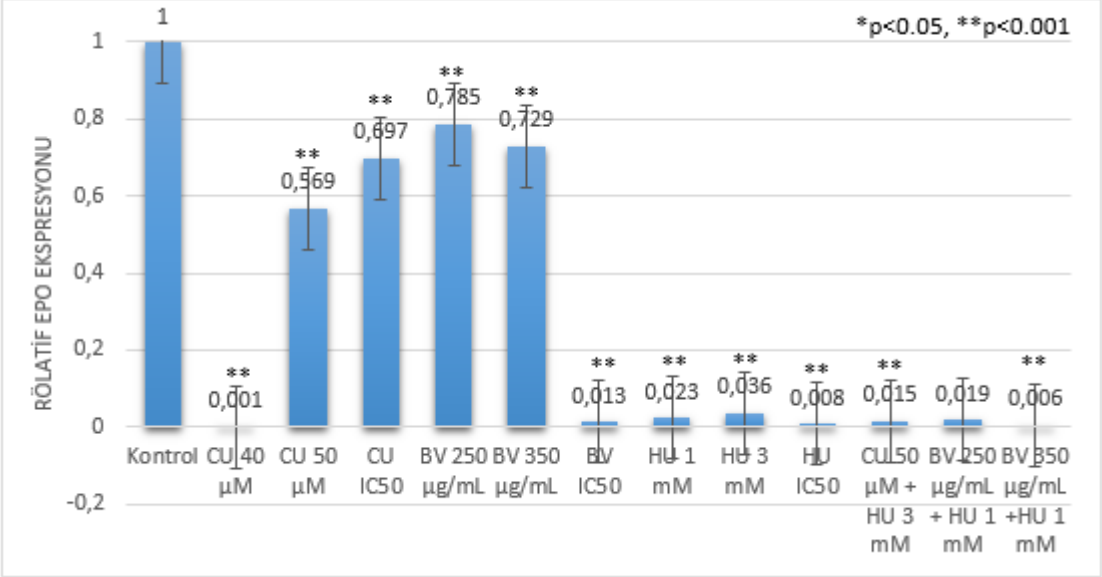
Şekil 51. MCF-7 hücre hattına ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM ve 50 µM, Bevacizumab IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50 ile üç farklı kombinasyon grubunda (curcumin 50 µM + hidroksiüre 1 mM, Bevacizumab 250 µg/mL + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 350 µg/mL + hidroksiüre 1 mM) anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



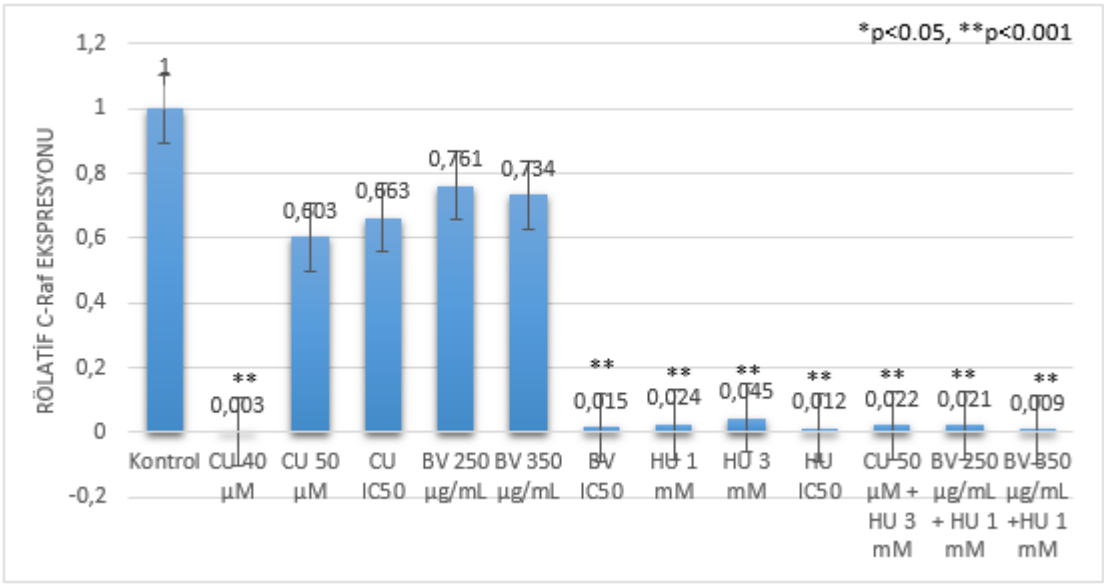
Şekil 52. MCF-7 hücre hattına ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM ve 50 µM, Bevacizumab 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50 ile üç farklı kombinasyon grubunda (curcumin 50 µM + hidroksiüre 1 mM, Bevacizumab 250 µg/mL + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 350 µg/mL + hidroksiüre 1 mM) anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



Şekil 53. MCF-7 hücre hattına ait EPO gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL, 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50 ile curcumin 50 µM + hidroksiüre 1 mM, Bevacizumab 350 µg/mL + hidroksiüre 1 mM gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).



Şekil 54. MCF-7 hücre hattına ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, Bevacizumab IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50 ile curcumin 50 µM + hidroksiüre 1 mM, Bevacizumab 250 µg/mL + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 350 µg/mL + hidroksiüre 1 mM gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).

Tablo 35. MDA-MB-231 örneklerine ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değer (Ref. Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	23,79	*HIF-1α*	25,78	1,99	1,99	1,0
CU 40 µM	*β-aktin*	13,82	*HIF-1α*	17,40	3,58	1,59	0,333
CU 50 µM	*β-aktin*	12,61	*HIF-1α*	16,88	4,27	2,27	0,207
CU IC_{50} (53.56 µM)	*β-aktin*	13,99	*HIF-1α*	16,72	12,09	10,10	0,001
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	15,47	*HIF-1α*	18,95	3,48	1,48	0,358
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	14,56	*HIF-1α*	20,00	5,44	3,45	0,092
BV IC_{50} (335.7 µg/ml)	*β-aktin*	15,55	*HIF-1α*	19,43	3,92	1,92	0,264
HU 1 mM	*β-aktin*	18,42	*HIF-1α*	20,87	2,45	0,46	0,729
HU 3 mM	*β-aktin*	14,90	*HIF-1α*	18,83	3,93	1,94	0,261
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	18,73	*HIF-1α*	21,39	2,66	0,67	0,629
BV IC_{50} (335.7 µg/ml) + HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	20,03	*HIF-1α*	22,18	2,15	0,16	0,895

Tablo 36. MDA-MB-231 örneklerine ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri

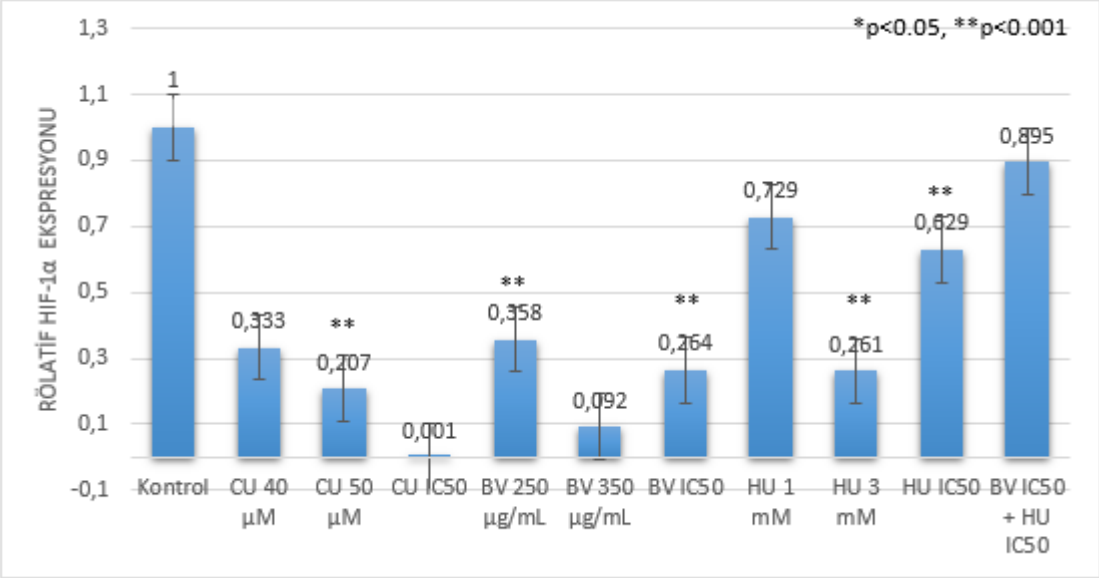
Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değer (Ref. Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	23,79	*VEGF*	34,49	10,70	10,70	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	13,82	*VEGF*	32,28	18,46	7,76	0,005
CU 50 µM	*β-aktin*	12,61	*VEGF*	31,95	19,34	8,63	0,003
CU IC_{50} (53.56 µM)	*β-aktin*	13,99	*VEGF*	32,43	18,44	7,74	0,005
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	15,47	*VEGF*	32,35	16,88	6,17	0,012
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	14,56	*VEGF*	32,54	17,98	7,28	0,001
BV IC_{50} (335.7 µg/ml)	*β-aktin*	15,55	*VEGF*	32,37	16,86	6,15	0,014
HU 1 mM	*β-aktin*	18,42	*VEGF*	33,01	14,59	3,88	0,068
HU 3 mM	*β-aktin*	14,90	*VEGF*	32,67	17,77	7,07	0,007
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	18,73	*VEGF*	32,88	14,15	3,45	0,092
BV IC_{50} (335.7 µg/ml) + HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	20,03	*VEGF*	34,03	14,00	3,78	0,073

Tablo 37. MDA-MB-231 örneklerine ait *EPO* gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değeri (Referans Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	23,79	*EPO*	28,68	4,89	4,89	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	13,82	*EPO*	29,59	15,77	10,88	0,001
CU 50 µM	*β-aktin*	12,61	*EPO*	29,47	16,86	11,97	0,0002
CU IC_{50} (53.56 µM)	*β-aktin*	13,99	*EPO*	30,03	16,04	11,15	0,0004
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	15,47	*EPO*	29,33	13,86	8,97	0,002
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	14,56	*EPO*	29,50	14,94	10,05	0,001
BV IC_{50} (335.7 µg/ml)	*β-aktin*	15,55	*EPO*	29,53	14,02	9,13	0,002
HU 1 mM	*β-aktin*	18,42	*EPO*	31,25	12,83	7,94	0,004
HU 3 mM	*β-aktin*	14,90	*EPO*	31,15	16,25	11,36	0,0003
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	18,73	*EPO*	31,50	12,77	7,88	0,004
BV IC_{50} (335.7 µg/ml)+ HU IC_{50}(1.22 mM)	*β-aktin*	20,03	*EPO*	32,49	12,46	8,05	0,004

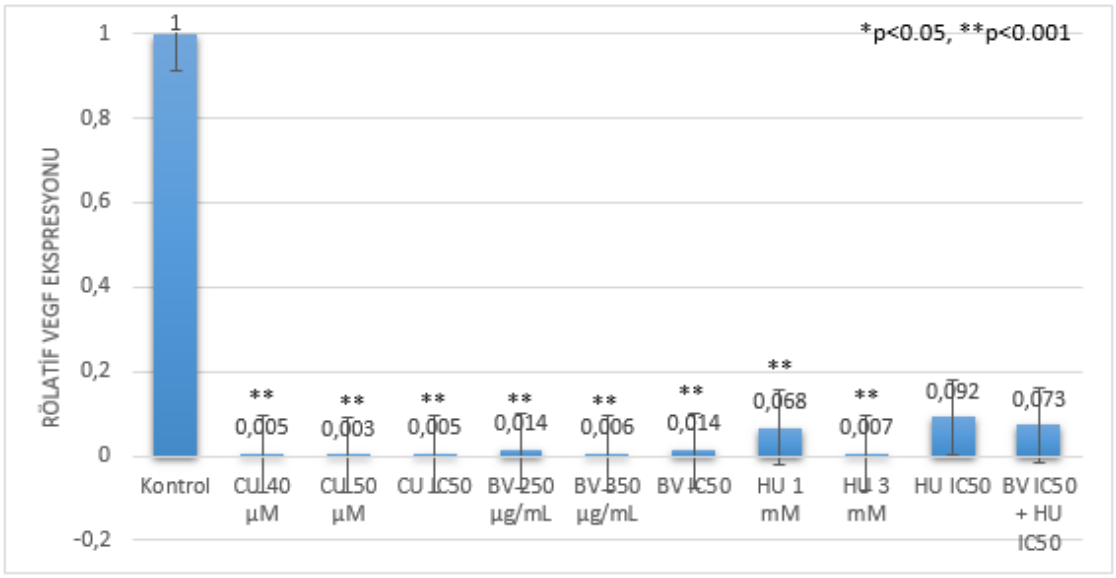
Tablo 38. MDA-MB-231 örneklerine ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değer (Ref. Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	24,36	*C-Raf*	31,97	7,45	7,45	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	10,20	*C-Raf*	24,15	13,95	6,50	0,011
CU 50 µM	*β-aktin*	11,77	*C-Raf*	25,46	13,69	6,24	0,013
CU IC_{50} (53.56 µM)	*β-aktin*	11,87	*C-Raf*	26,75	14,88	7,43	0,006
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	14,46	*C-Raf*	28,68	14,22	6,77	0,009
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	14,15	*C-Raf*	28,40	14,25	6,80	0,009
BV IC_{50} (335.7 µg/ml)	*β-aktin*	14,99	*C-Raf*	28,78	13,79	6,34	0,012
HU 1 mM	*β-aktin*	18,03	*C-Raf*	30,46	12,43	4,98	0,032
HU 3 mM	*β-aktin*	14,02	*C-Raf*	28,04	14,02	6,58	0,010
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	18,09	*C-Raf*	30,13	12,04	4,59	0,041
BV IC_{50} (335.7 µg/ml) + HU IC_{50}(1.22 mM)	*β-aktin*	20,44	*C-Raf*	32,33	11,91	4,46	0,045



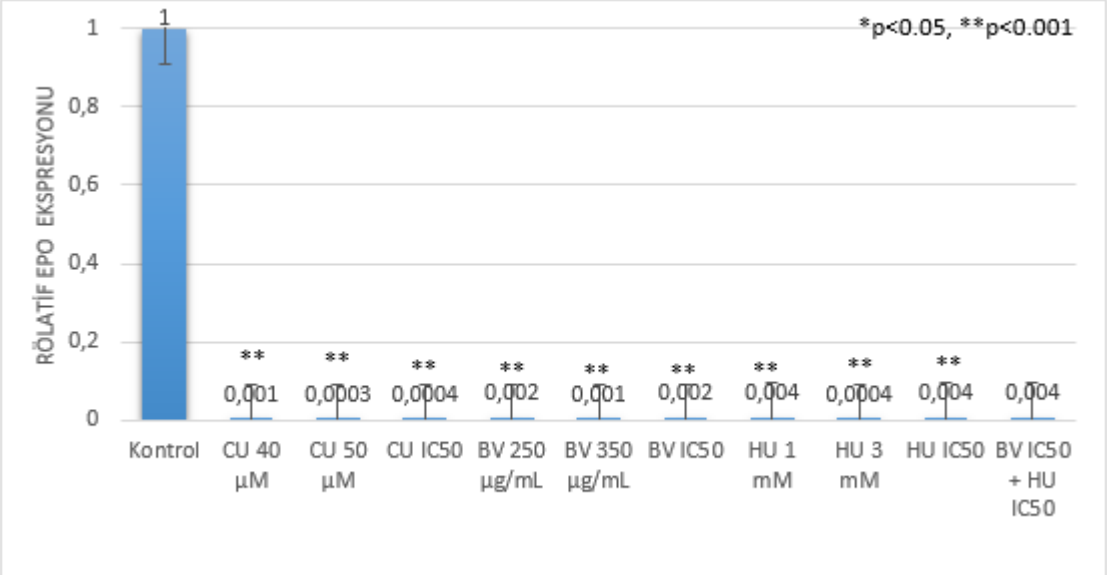
Şekil 55. MDA-MB-231 hücre hattına ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 50 µM, Bevacizumab 250 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 3 mM ve IC50 ile Bevacizumab IC50 + hidroksiüre IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).



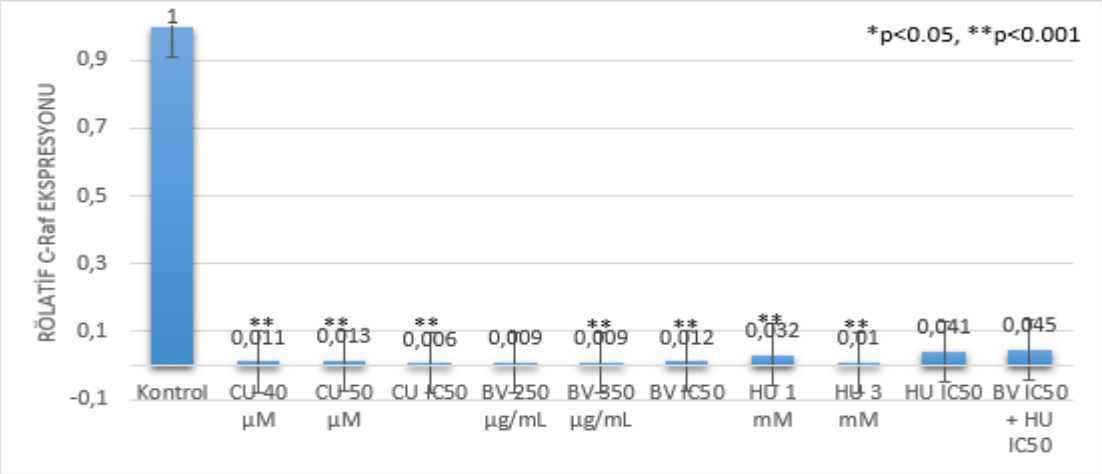
Şekil 56. MDA-MB-231 hücre hattına ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL, 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM ve 3 mM gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).



Şekil 57. MDA-MB-231 hücre hattına ait EPO gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL, 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).



Şekil 58. MDA-MB-231 hücre hattına ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM ve 3 mM gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).

Tablo 39. MCF-10A örneklerine ait HIF-1α gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Referans Gen	Ortalama CT Değeri (Referans Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değeri (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	23,65	*HIF-1α*	27,48	3,83	3,83	1,0
CU 40 µM	*β-aktin*	25,75	*HIF-1α*	24,93	-0,82	-4,64	24,991
CU 50 µM	*β-aktin*	19,78	*HIF-1α*	22,78	2,90	-0,93	1,901
CU IC_{50} (39,4 µM)	*β-aktin*	18,41	*HIF-1α*	21,15	2,74	-1,09	2,124
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	24,00	*HIF-1α*	26,50	2,50	-1,33	2,508
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	21,91	*HIF-1α*	24,91	3,00	-0,83	1,774
BV IC_{50} (380,5 µg/ml)	*β-aktin*	14,76	*HIF-1α*	19,95	5,19	1,37	0,388
HU 1 mM	*β-aktin*	24,55	*HIF-1α*	27,30	2,75	-1,08	2,109
HU 3 mM	*β-aktin*	20,43	*HIF-1α*	21,92	1,49	-2,34	5,051
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	21,67	*HIF-1α*	23,63	1,96	-1,87	3,647

Tablo 40. MCF-10A örneklerine ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri

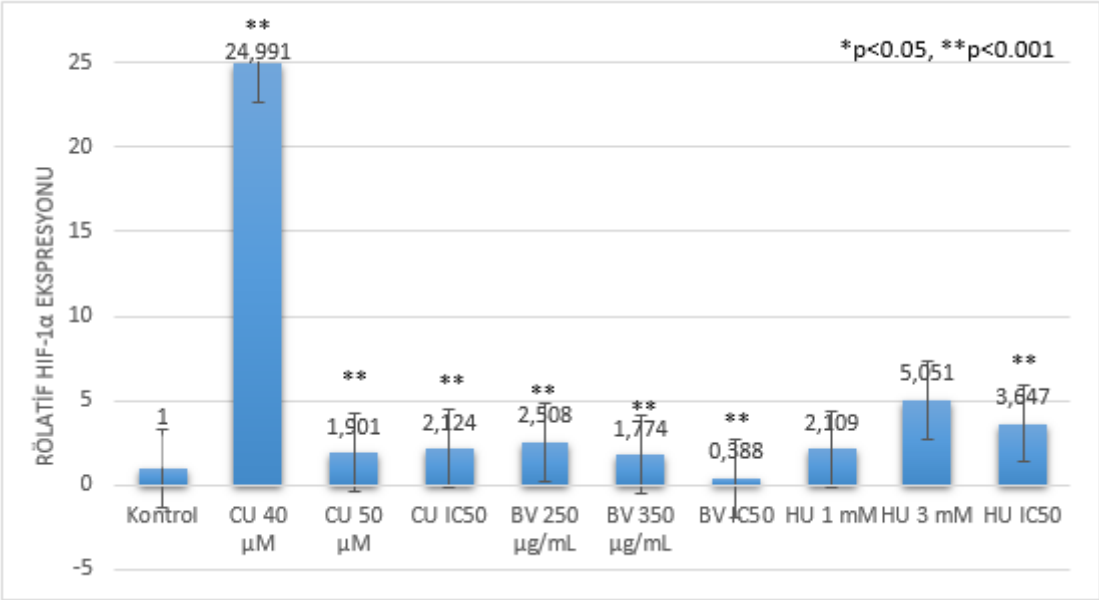
Örnek	Referans Gen	Ortalama CT Değeri (Referans Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	23,65	*VEGF*	33,44	9,79	9,79	1,000
CU 40 µM	*β-aktin*	25,75	*VEGF*	34,66	8,91	-0,88	1,836
CU 50 µM	*β-aktin*	19,78	*VEGF*	33,29	13,51	3,72	0,076
CU IC_{50} (39,4 µM)	*β-aktin*	18,41	*VEGF*	31,06	2,74	-7,05	132,208
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	24,00	*VEGF*	32,53	8,53	-1,26	2,395
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	21,91	*VEGF*	31,80	9,89	0,10	0,931
BV IC_{50} (380,5 µg/ml)	*β-aktin*	14,76	*VEGF*	31,13	16,37	6,58	0,010
HU 1 mM	*β-aktin*	24,55	*VEGF*	33,45	8,90	-0,88	1,845
HU 3 mM	*β-aktin*	20,43	*VEGF*	33,25	12,82	3,03	0,122
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	21,67	*VEGF*	34,32	12,65	2,86	0,137

Tablo 41. MCF-10A örneklerine ait *EPO* gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Ref. Gen	Ortalama CT Değeri (Ref. Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	23,65	*EPO*	27,37	3,75	3,75	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	25,75	*EPO*	31,67	5,92	2,17	0,222
CU 50 µM	*β-aktin*	19,78	*EPO*	29,12	9,34	5,59	0,021
CU IC_{50} (39,4 µM)	*β-aktin*	18,41	*EPO*	24,98	6,57	2,82	0,142
BV 250 µg/ml	*β-aktin*	24,00	*EPO*	26,73	2,73	-1,02	2,028
BV 350 µg/ml	*β-aktin*	21,91	*EPO*	25,55	3,64	-0,11	1,079
BV IC_{50} (380,5 µg/ml)	*β-aktin*	14,76	*EPO*	24,85	10,09	6,34	0,012
HU 1 mM	*β-aktin*	24,55	*EPO*	28,39	3,84	0,09	0,937
HU 3 mM	*β-aktin*	20,43	*EPO*	29,28	8,85	5,10	0,029
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	21,67	*EPO*	27,80	6,13	2,38	0,19255

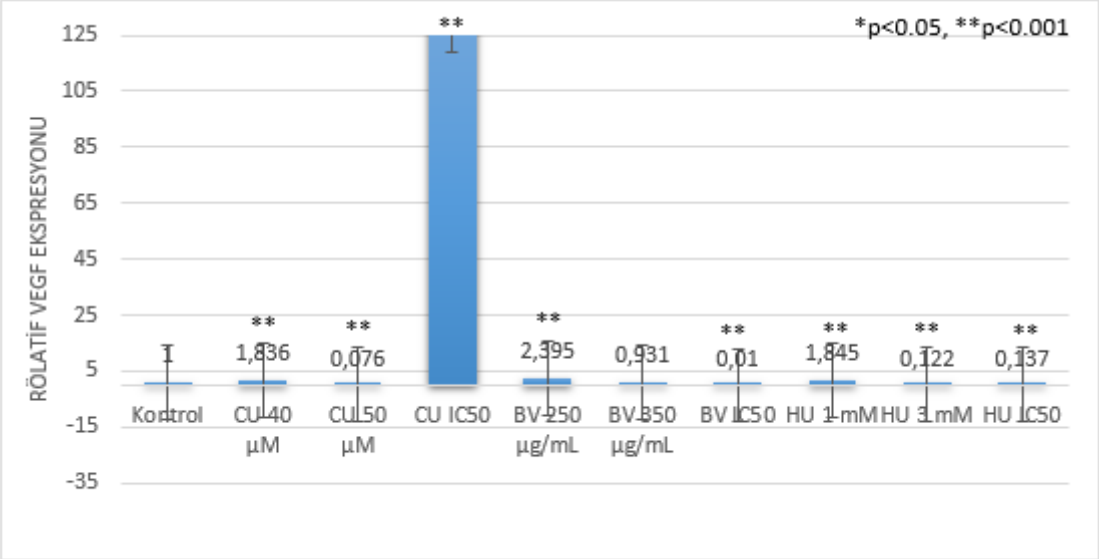
Tablo 42. MCF-10A örneklerine ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri

Örnek	Referans Gen	Ortalama CT Değeri (Referans Gen)	Hedef Gen	Ortalama CT Değer (Hedef Gen)	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	*β-aktin*	23,10	*C-Raf*	31,99	8,89	8,89	1,00
CU 40 µM	*β-aktin*	24,56	*C-Raf*	31,74	7,18	-1,70	3,257
CU 50 µM	*β-aktin*	21,07	*C-Raf*	32,32	11,25	2,37	0,194
CU IC_{50} (39,4 µM)	*β-aktin*	14,55	*C-Raf*	28,20	13,65	4,77	0,037
BV 250 µg/mL	*β-aktin*	22,41	*C-Raf*	31,74	9,33	0,44	0,737
BV 350 µg/mL	*β-aktin*	12,09	*C-Raf*	26,54	14,45	5,56	0,021
BV IC_{50} (380,5 µg/mL)	*β-aktin*	17,09	*C-Raf*	28,49	11,40	2,51	0,175
HU 1 Mm	*β-aktin*	24,88	*C-Raf*	33,80	8,92	0,03	0,979
HU 3 Mm	*β-aktin*	20,25	*C-Raf*	32,49	12,24	3,35	0,098
HU IC_{50} (1.22 mM)	*β-aktin*	22,81	*C-Raf*	31,26	8,45	-0,44	1,353



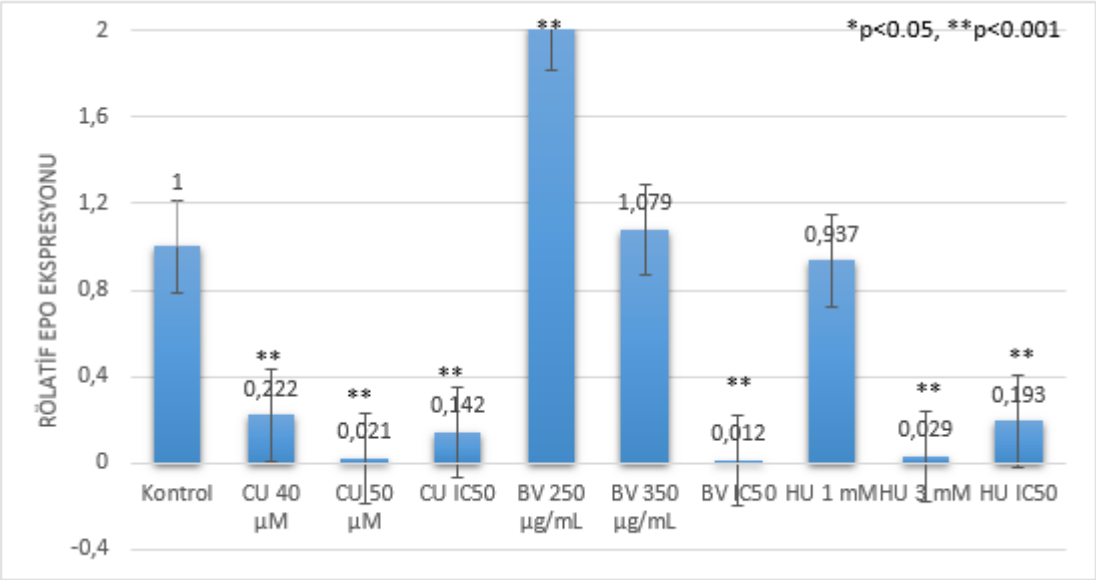
Şekil 59. MCF-10A hücre hattına ait *HIF-1α* gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL, 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).



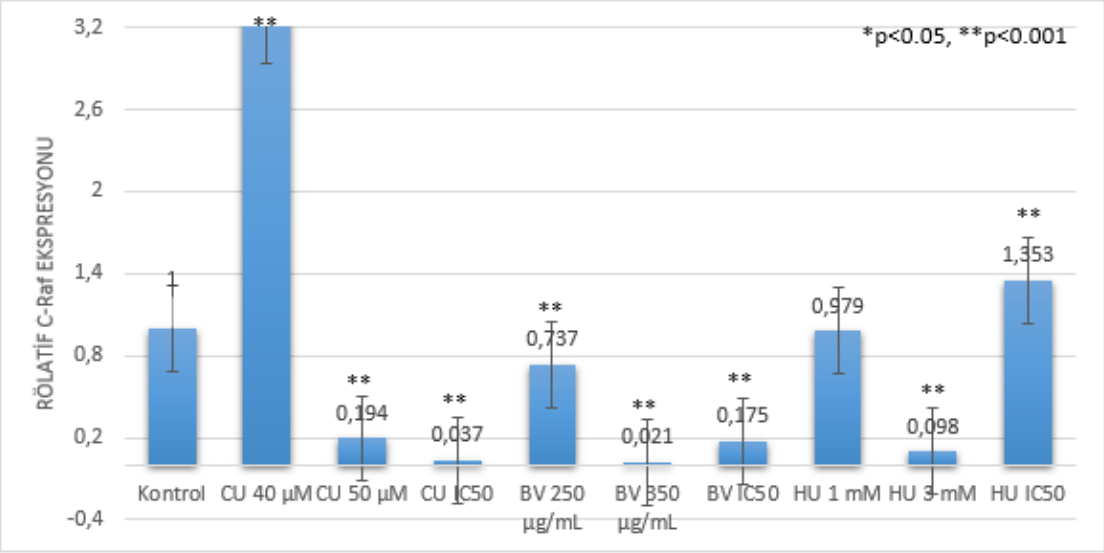
Şekil 60. MCF-10A hücre hattına ait VEGF gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).



Şekil 61. MCF-10A hücre hattına ait EPO gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 3 mM ve IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).

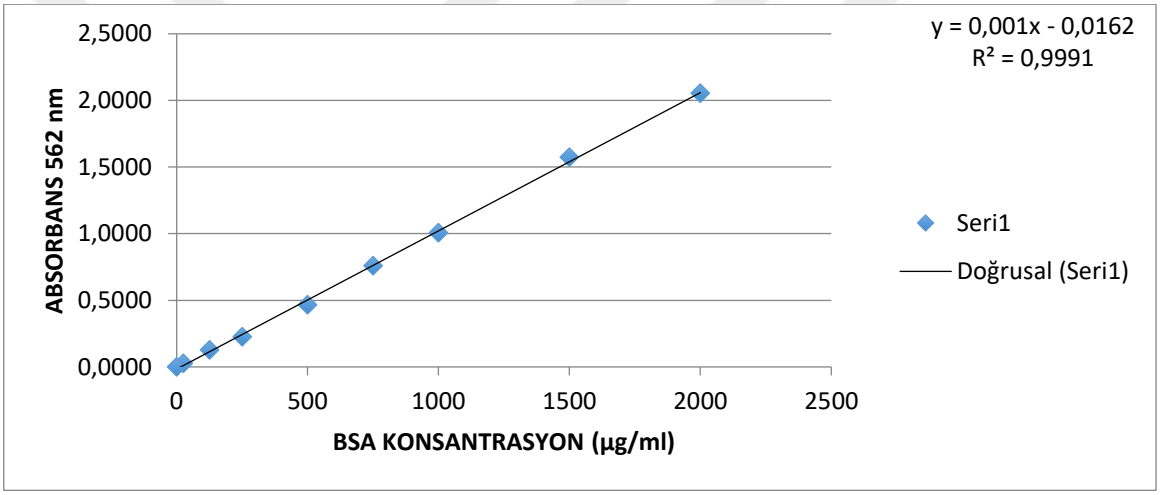


Şekil 62. MCF-10A hücre hattına ait C-Raf gen ekspresyon düzeyleri

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 3 mM ve IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).

4.1. Protein Örneklerinin Kantitasyonu

HIF-1α, VEGF, EPO, C-Raf ve kaspaz-9 protein ekspresyon düzeylerini analiz etmek için 72 saat sonunda MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin protein lizatları elde edildikten sonra BCA testi yapıldı ve şekil 67'de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kontrol ve deney gruplarının protein düzeyleri hesaplandı.



Şekil 63. BSA standart kalibrasyon eğrisi

Tablo 43. MCF-7 hücre hattı için hücre lizatı ortalama protein düzeyleri

Örnek adı	Kons. (µg/µl)	Örnek adı	Kons. (µg/µl)
Kontrol (sitoplazmik)	3,3	BV 232,8 µg/mL (IC50)	1,9
Kontrol (nükleer)	2,8	HU1 mM	2,2
CU 40 µM	2,7	HU 3 mM	2,1
CU 50 µM	2,7	HU 0,36 mM (IC50)	1,6
CU 46,96 µM (IC50)	2,4	CU50 µM -HU 3 mM	3,3
BV 250 µg/ml	3,3	BV250 µg/ml-HU1 mM	2,6
BV 350 µg/ml	2,5	BV350 µg/ml-HU1 mM	2,2

Tablo 44. MDA-MB-231 hücre hattı için hücre lizatı ortalama protein düzeyleri

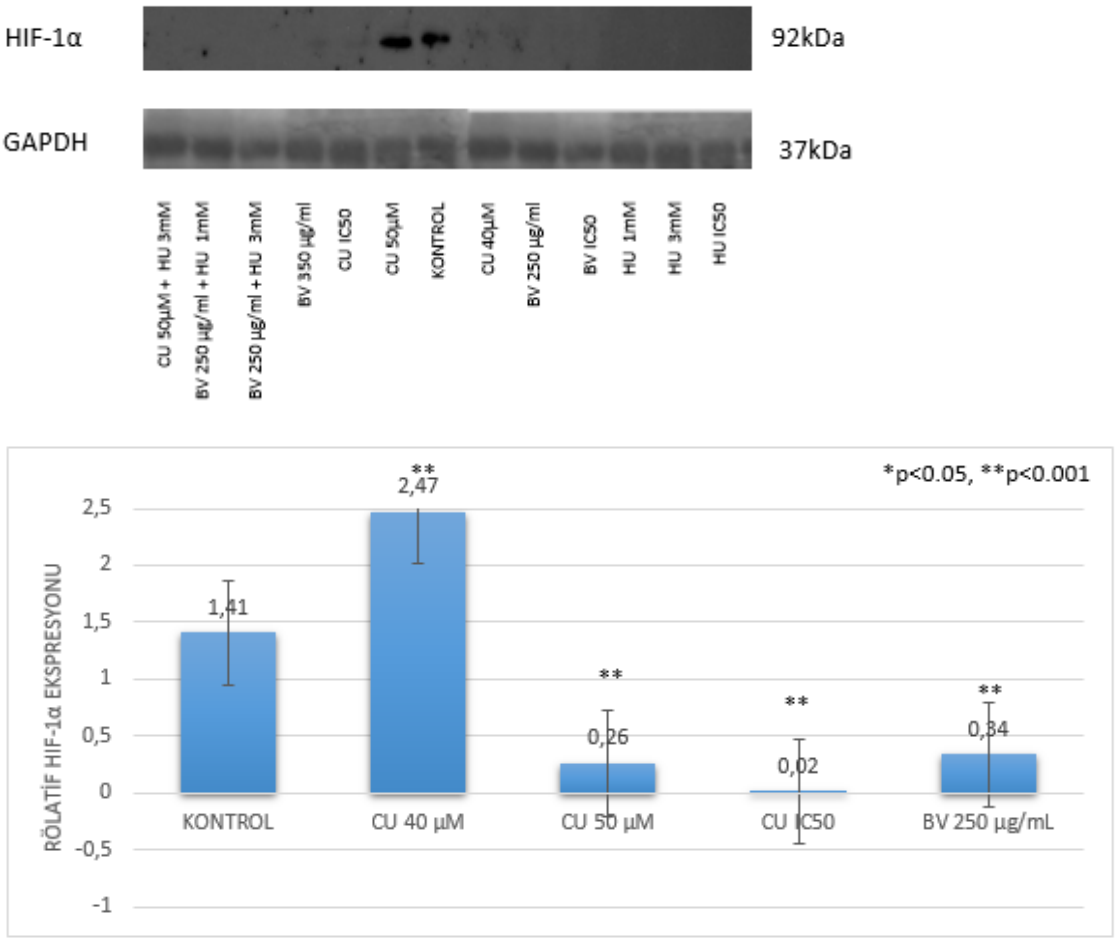
Örnek adı	**Kons. (µg/µl)**	**Örnek adı**	**Kons. (µg/µl)**
Kontrol (sitoplazmik)	2,9	BV 350 µg/ml	1,9
Kontrol (nükleer)	3,2	BV 335,7 µg/ml (IC50)	3,5
CU 40 µM	2,2	HU1 mM	1,7
CU 50 µM	1,9	HU3 mM	1,9
CU 53,56 µM (IC50)	2,1	HU 1,22 mM (IC50)	2,4
BV 250 µg/ml	1,7	BV IC50 -HU IC50	2,0

Tablo 45. MCF-10A hücre hattı için hücre lizatı ortalama protein düzeyleri

Örnek adı	**Kons. (µg/µl)**	**Örnek adı**	**Kons. (µg/µl)**
Kontrol (sitoplazmik)	2,6	BV 350 µg/ml	1,8
Kontrol (nükleer)	4,1	BV 335,7 µg/ml (IC50)	2,1
CU 40 µM	2,8	HU1 mM	2,4
CU 50 µM	2,4	HU3 mM	2,5
CU 53,56 µM (IC50)	2,8	HU 1,22 mM (IC50)	1,7
BV 250 µg/ml	1,9		

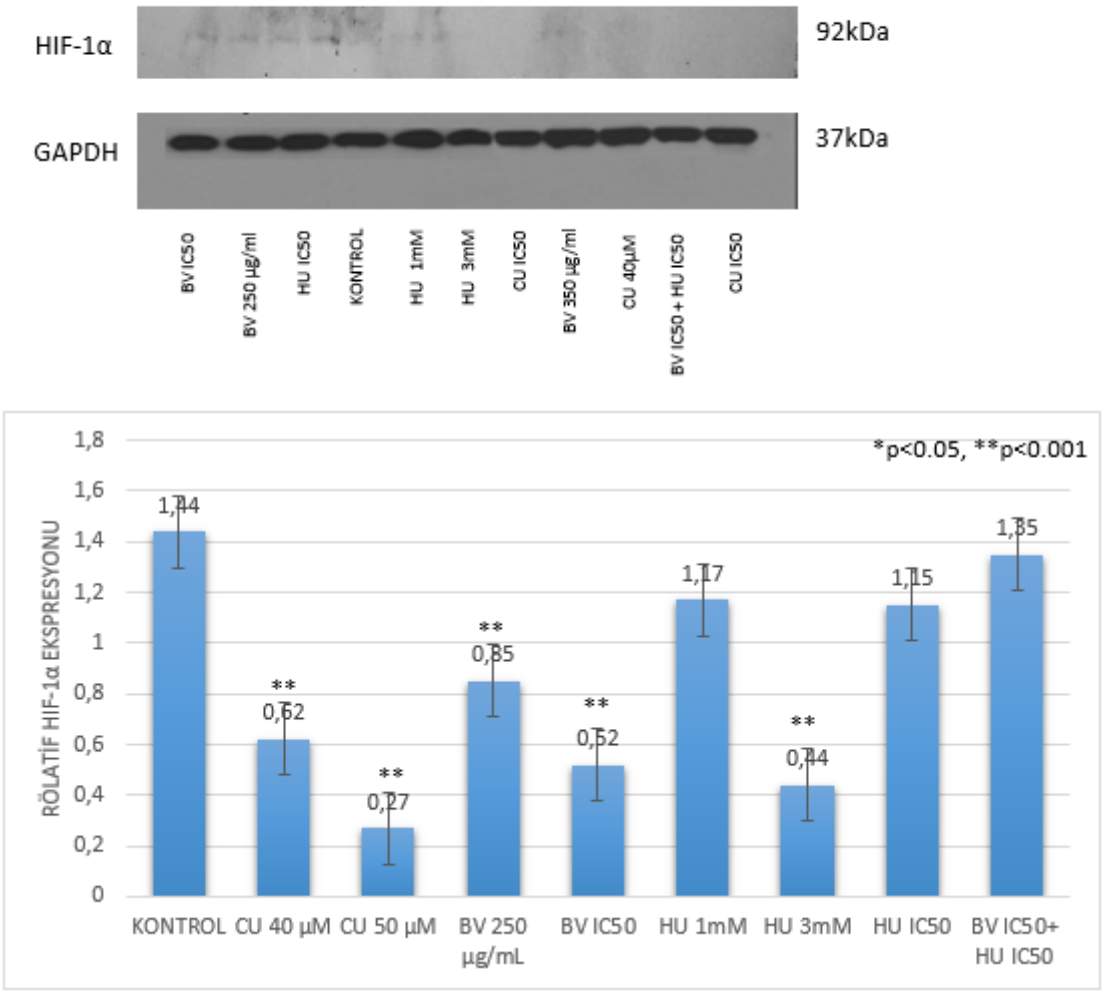
4.2. Protein Ekpresyon Analizleri

HIF-1α, VEGF, EPO, C-Raf ve kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri, western blot yöntemi ile belirlendi. Housekeeping gen GAPDH (sitoplazmik) ve TBP (nükleer) kullanıldı. HIF-1α, VEGF, EPO, C-Raf ve kaspaz-9 ile GAPDH/ TBP ekspresyonları oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı.



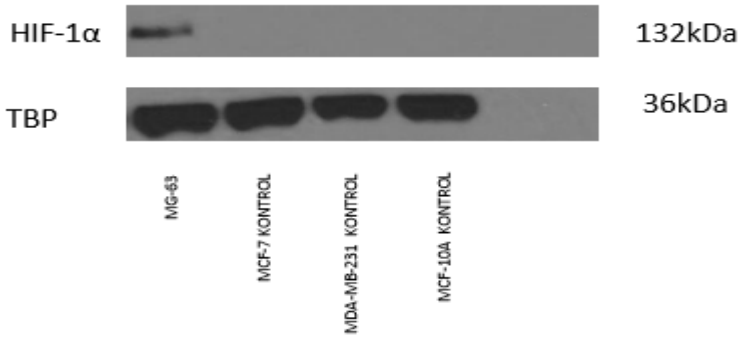
Şekil 64. MCF-7 hücrelerinde sitoplazmik HIF-1α protein ekspresyonlarının western bulguları

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



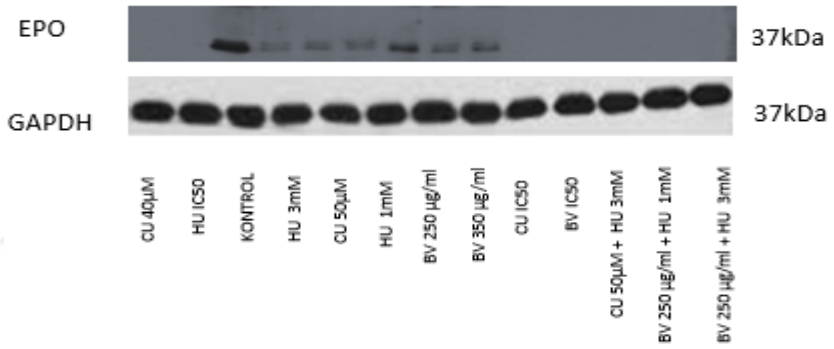
Şekil 65. MDA-MB-231 hücrelerinde sitoplazmik HIF-1α protein ekspresyonlarının western bulguları

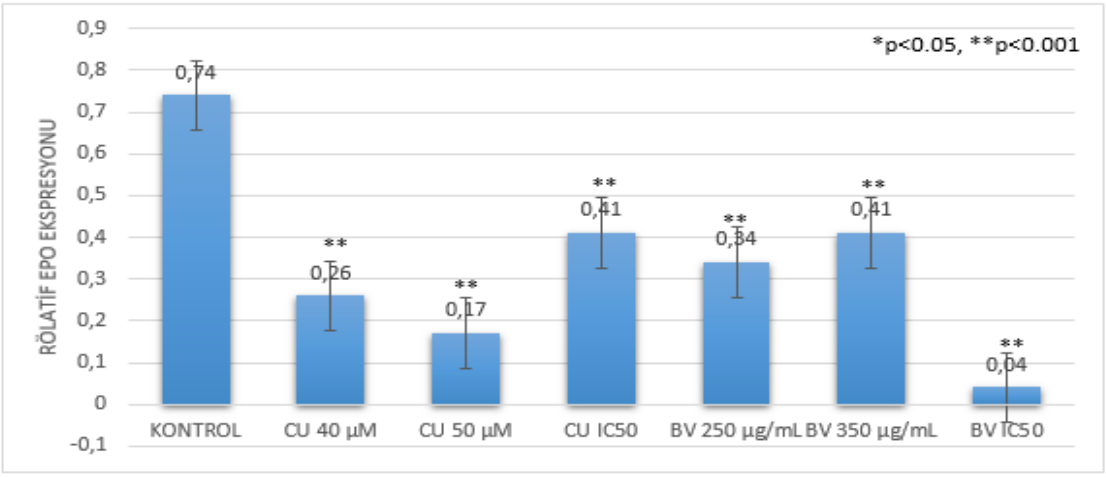
Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL, 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 3 mM gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



Şekil 66. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde nükleer HIF-1α protein ekspresyonlarının western bulguları

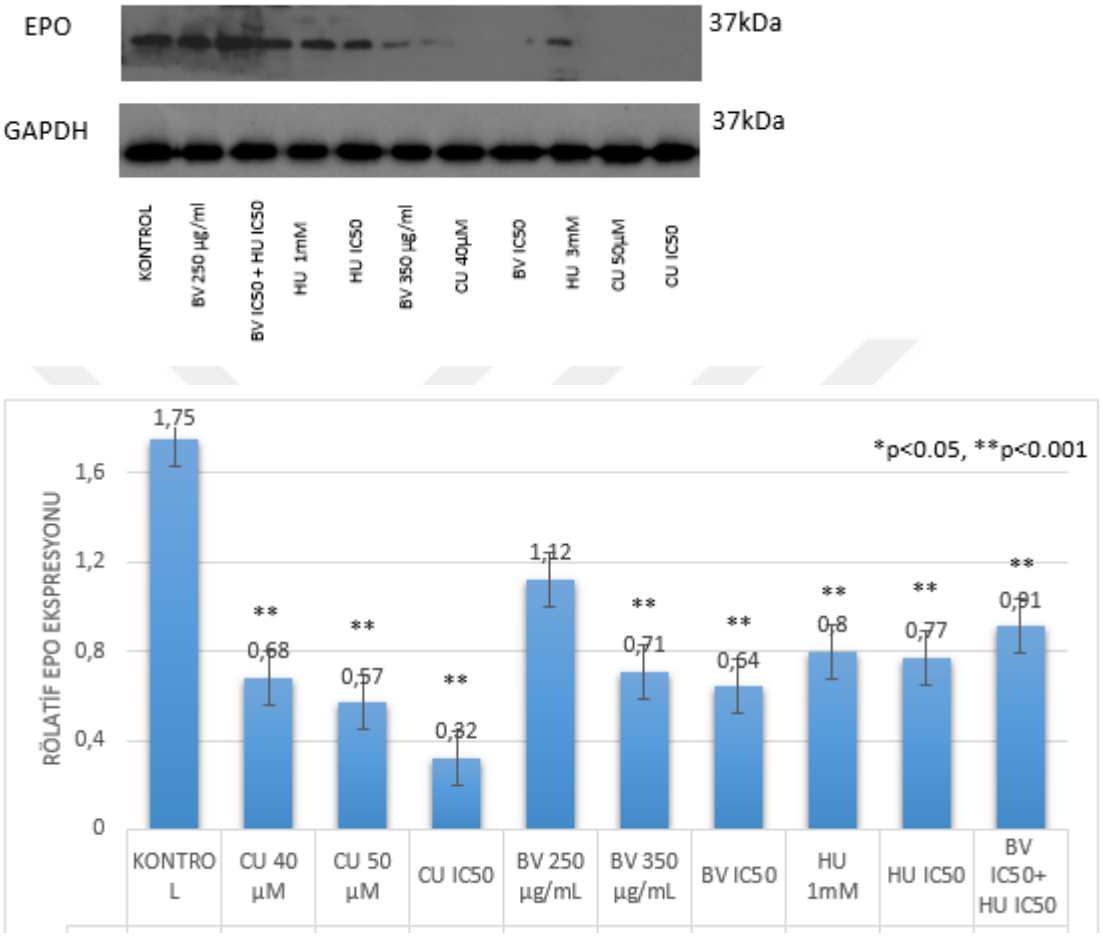
Pozitif kontrol olarak kemik kanseri hücre hattı olan MG-63 kullanıldı.





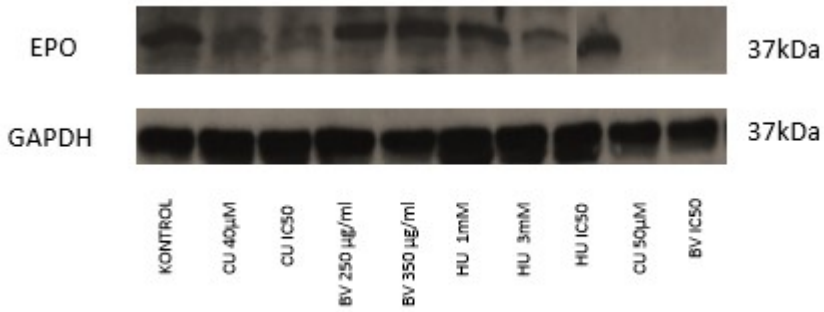
Şekil 67. MCF-7 hücrelerinde EPO protein ekspresyonlarının western bulguları

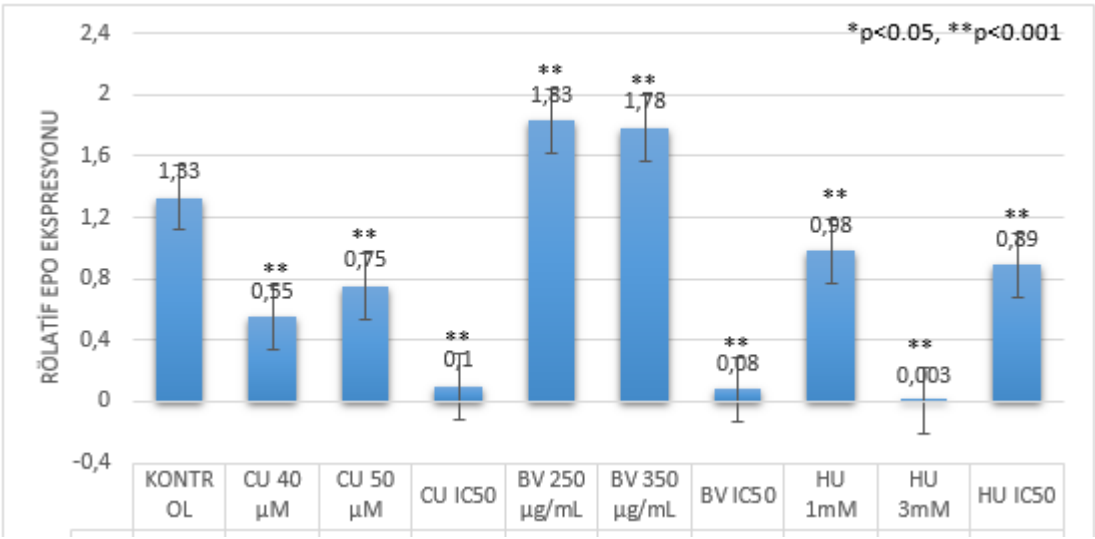
Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/ml, 350 µg/ml ve IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).



Şekil 68. MDA-MB-231 hücrelerinde EPO protein ekspresyonlarının western bulguları

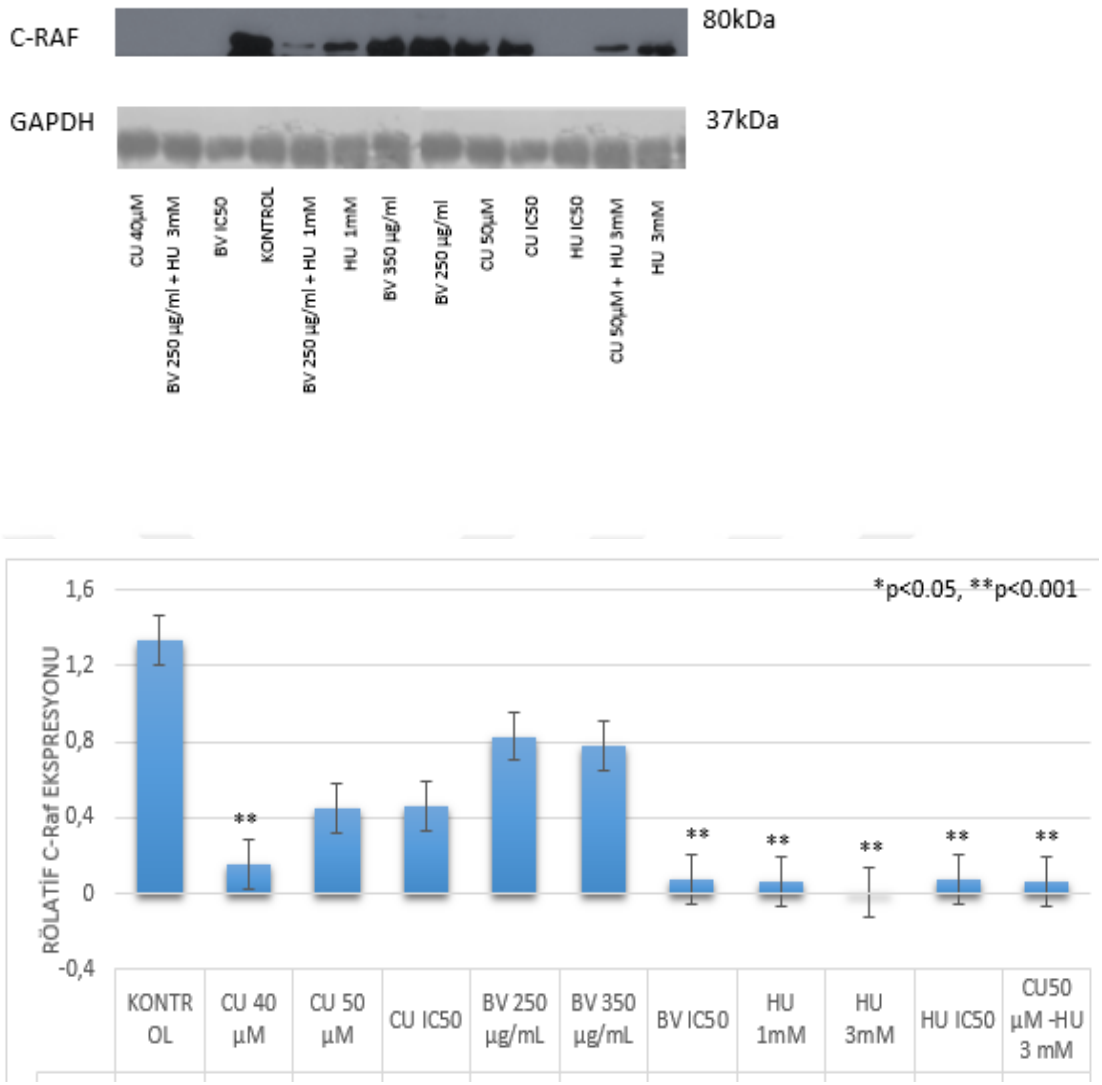
Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM ve IC50, Bevacizumab IC50 + hidroksiüre IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi (p<0,01).





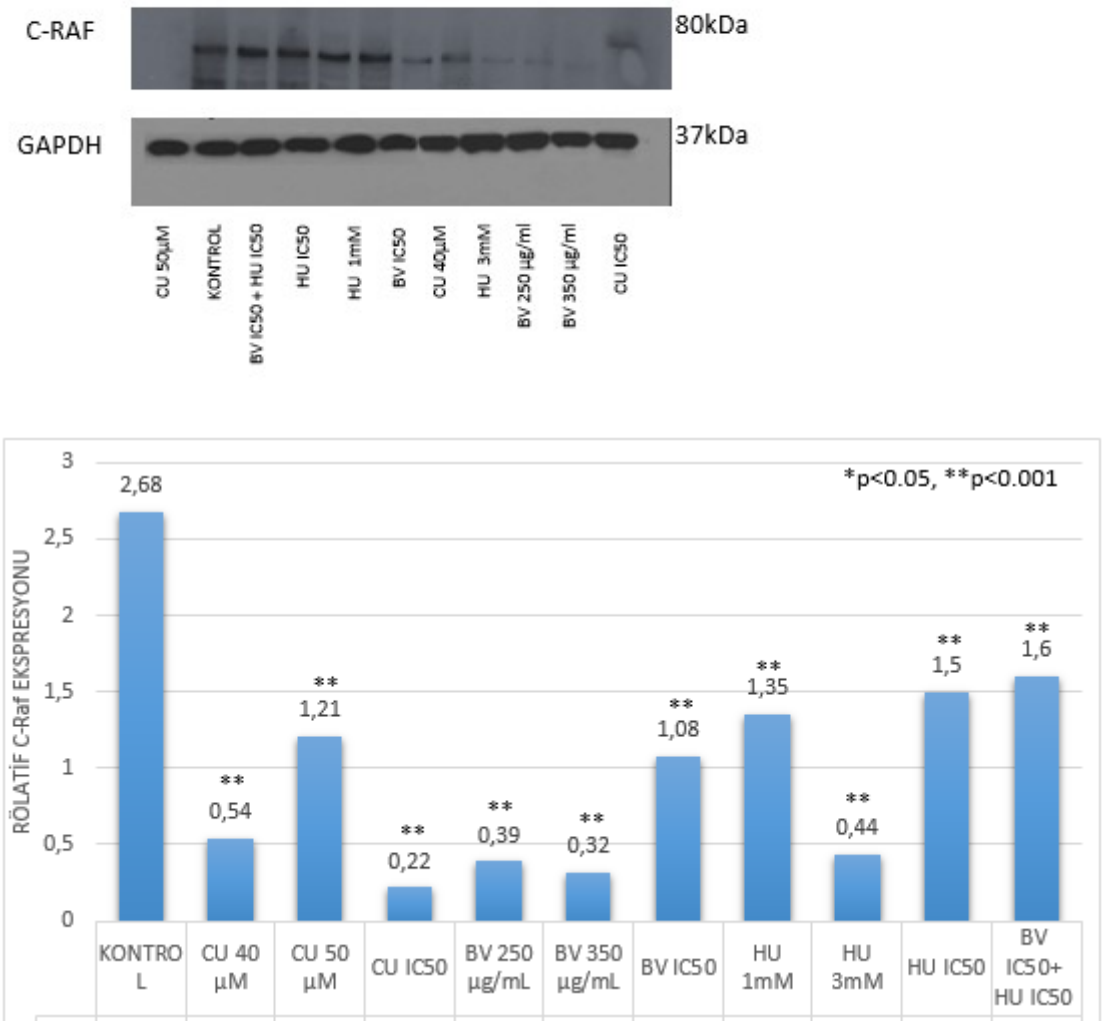
Şekil 69. MCF-10A hücrelerinde EPO protein ekspresyonlarının western bulguları

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL, 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM ve 3 mM, gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



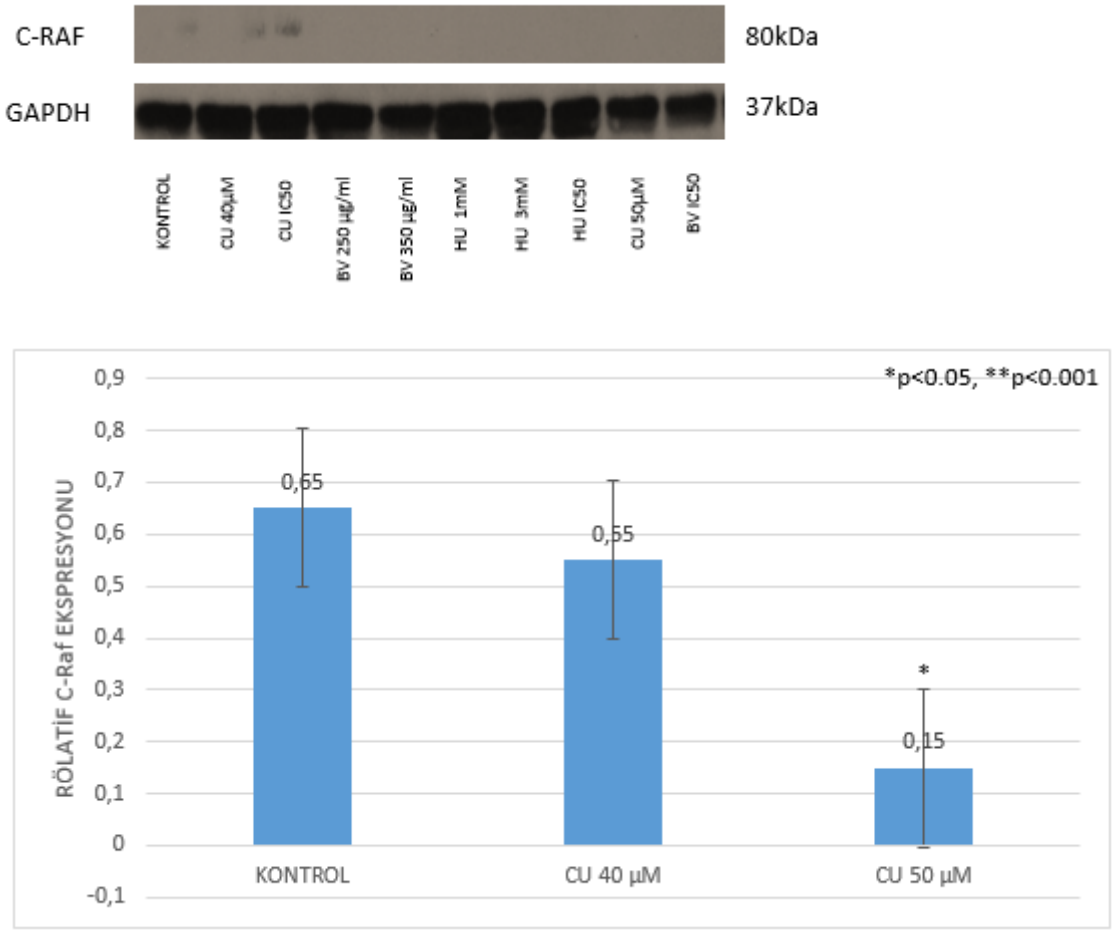
Şekil 70. MCF-7 hücrelerinde C-Raf protein ekspresyonlarının western bulguları

Kontrole göre, curcumin 40 µM, Bevacizumab IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50, curcumin 50 µM + hidroksiüre 1 mM, Bevacizumab 250 µg/mL + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 350 µg/mL + hidroksiüre 1 mM gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



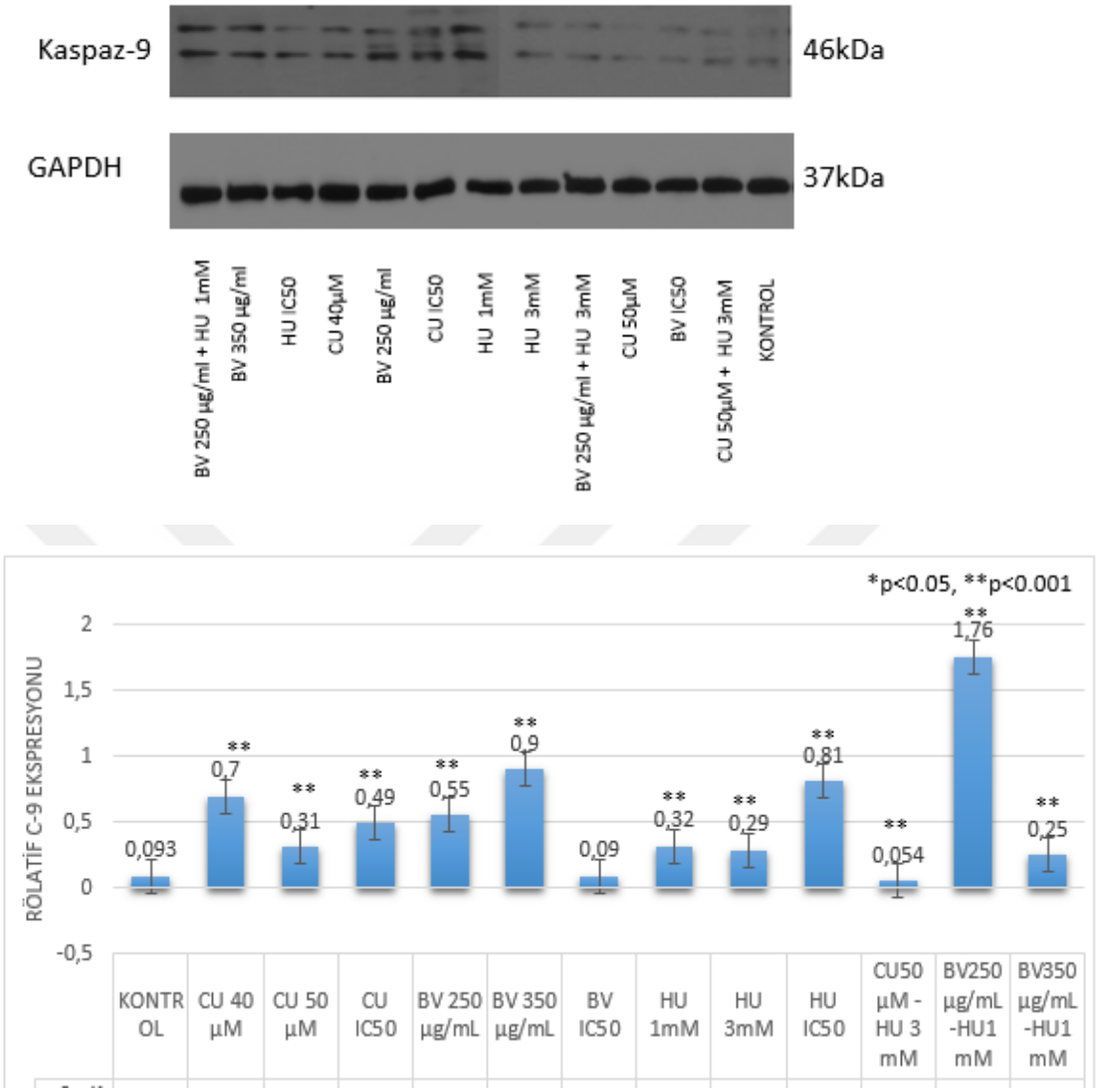
Şekil 71. MDA-MB-231 hücrelerinde C-Raf protein ekspresyonlarının western bulguları

Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL, 350 µg/mL ve IC50, hidroksiüre 1 mM, 3 Mm ve IC50, Bevacizumab IC50 + hidroksiüre IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



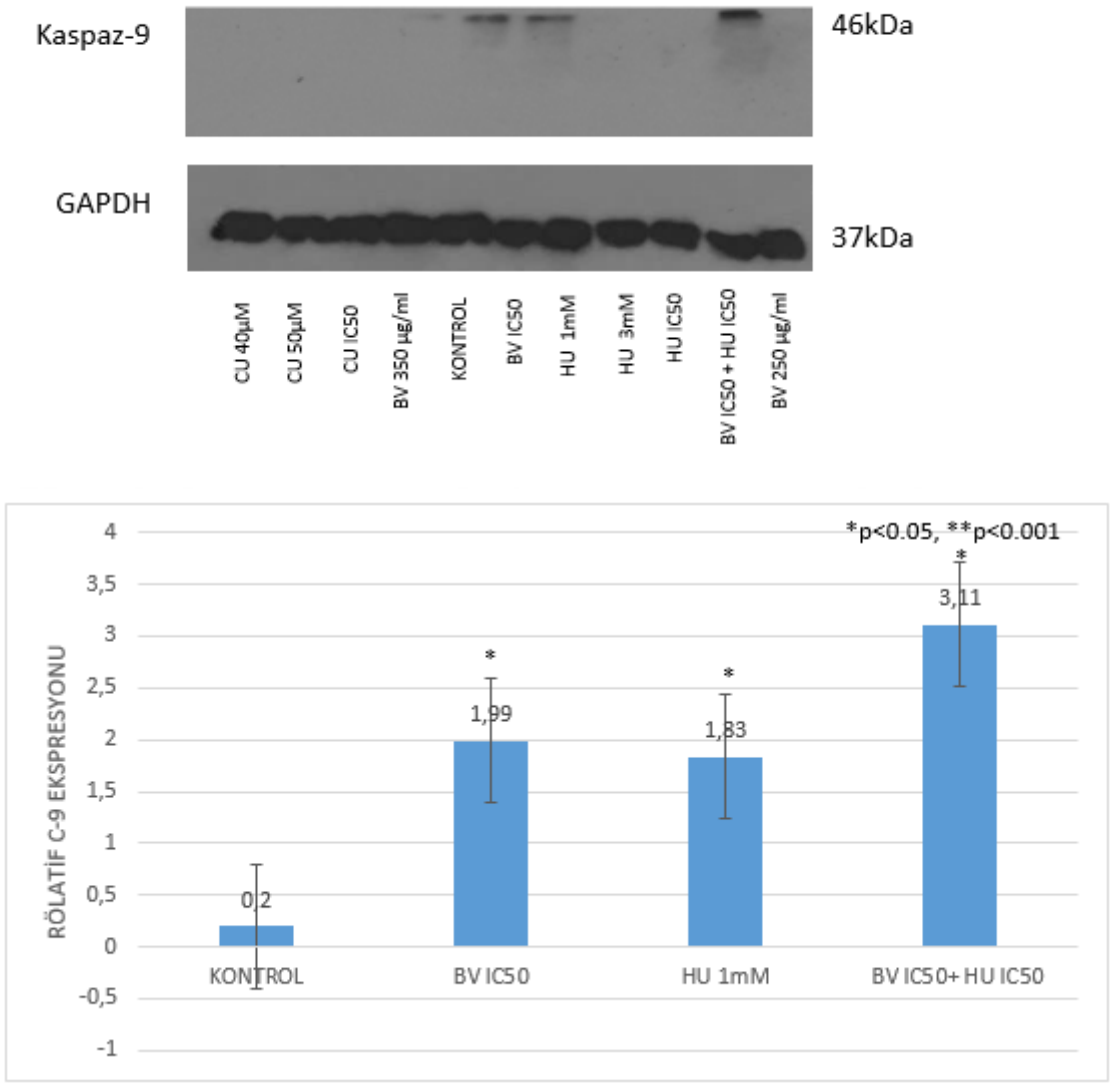
Şekil 72. MCF-10A hücrelerinde C-Raf protein ekspresyonlarının western bulguları

Kontrole göre, curcumin 50 µM grubunda anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



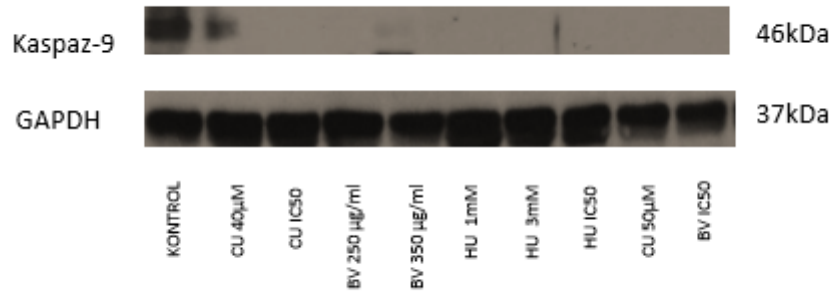
Şekil 73. MCF-7 hücrelerinde kaspaz-9 protein ekspresyonlarının western bulguları

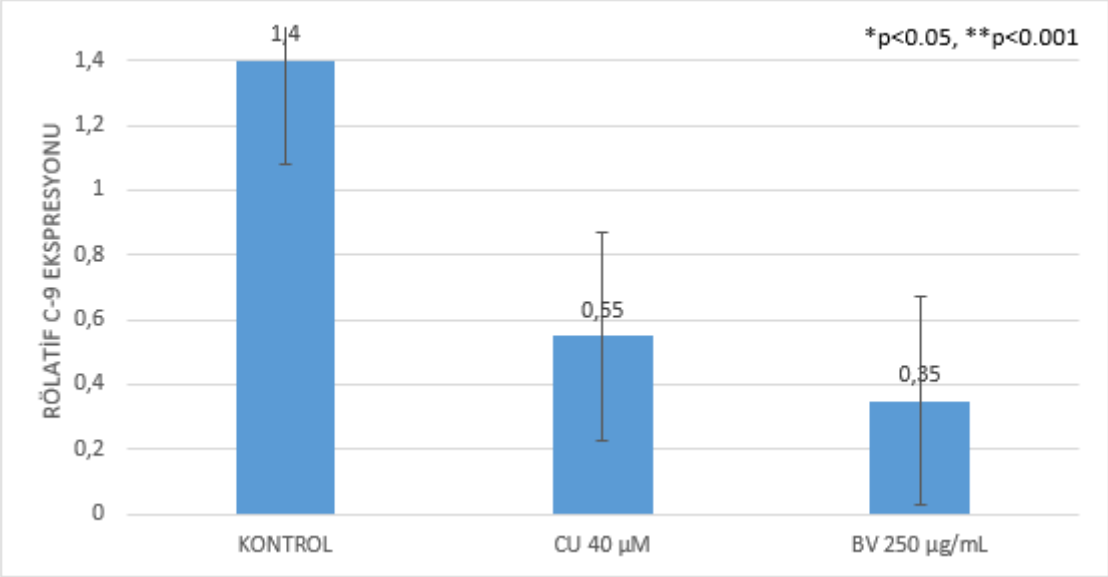
Kontrole göre, curcumin 40 µM, 50 µM ve IC50, Bevacizumab 250 µg/mL ve 350 µg/mL, hidroksiüre 1 mM, 3 mM ve IC50, curcumin 50 µM + hidroksiüre 1 mM, Bevacizumab 250 µg/mL + hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab 350 µg/mL + hidroksiüre 1 mM gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



Şekil 74. MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-9 protein ekspresyonlarının western bulguları

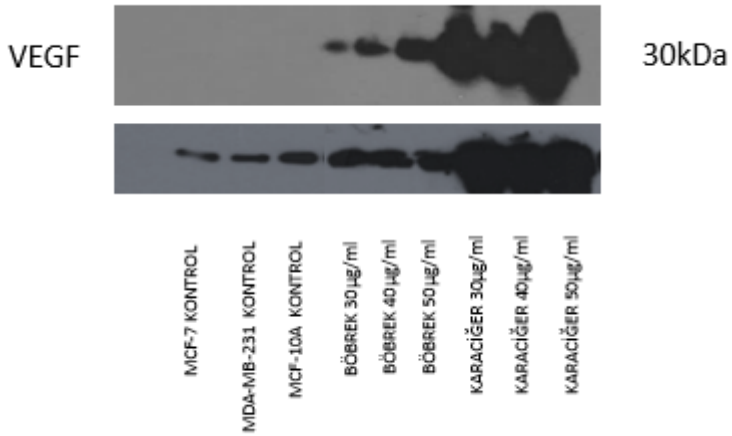
Kontrole göre, Bevacizumab IC50, hidroksiüre 1 mM ve Bevacizumab IC50 + hidroksiüre IC50 gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).





Şekil 75. MCF-10A hücrelerinde kaspaz-9 protein ekspresyonlarının western bulguları

Kontrole göre, curcumin 40 µM, Bevacizumab 250 µg/mL gruplarında anlamlı fark gözlendi ($p<0,01$).



Şekil 76. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde VEGF protein ekspresyonlarının western bulguları

VEGF görüntüleri elde edilemediği için pozitiv kontrol olarak fare karaciğer ve böbrek dokularının farklı protein konsantrasyonları kullanıldı.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda kanserden ölümün ana sebebi ve en yaygın kanser tipidir (1). Anjiyogenez kanserlerin ortak özelliğidir ve lokal tümör büyümesinde ve meme kanserinin metastazında önemli rol oynar (278,279).

Araştırmamızda iki farklı adenokarsinom hücre hatları olan MCF-7 ve MDA-MB-231 ile normal meme hücre hattı olan MCF-10A kullanılmıştır. MCF-7 Luminal-A meme tümörü alt tipi olup östrojen reseptör pozitiftir (ER+). MDA-MB-231 hücre hattı üçlü negatif olarak bilinen bazal benzeri meme tümörü alt tipidir ve östrojen reseptör negatiftir (ER-). MCF-7, MDA-MB-231 hücre hattına göre daha agresif ve kötü prognozludur. Normal meme hücre hattı olan MCF-10A insilün, epidermal büyüme faktörü (EGF) duyarlıdır ve östrojen reseptör negatiftir (ER-).

Bu çalışmada MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları üzerinde curcumin, hidroksiüre ve Bevacizumabın anjiyogenez üzerindeki düzenleyici sonuçları araştırılmıştır.

Yapılan çalışmada öncelikle WST-1 testi ile hücre canlılığı ölçülmüştür. WST-1'in hücrelere girip mitokondride formazana indirgenmesine dayanmaktadır.3 tekrarlı yapılan WST-1 testine göre 2'şer faklı dozları olan curcumin, hidroksiüre ve Bevacizumab ile muamele edilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları canlılık oranları sırasıyla 24, 48 ve 72. Saate doğru düşüş göstermiştir.

Meme kanserinde uygulanan kemoterapi, normal hücrelere de zararlı etki vermektedir. Kanser hücrelerini yok etmek için yüksek seçicilik ve düşük toksisiteli yeni doğal ajanlar bulmak kanser araştırmasında önemli alandır (280).

Curcuminin tümör hücreleri üzerinde birçok etkisinin olduğu ve bunlardan birinin de anti-anjiyogenik etki olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmada malign tümörlerde Curcuminin anjiyogenezisi baskıladığı bulunmuştur (242).

Yoysungnoen ve arkadaşları curcuminin metabolik ürünlerinden birinin in vivo olarak VEGF ve HIF-1 ekspresyonlarını etkileyerek anjiyogenezisi inhibe ettiği sonucuna varmışlardır (281). Yapılan bir diğer çalışmada, curcuminin in

vivo fare modellemesinde ve in vitro MDA-MB-231 hücreleri üzerinde anjiyogenezisi inhibe ettiği bulunmuştur (244). Ayrıca, Curcuminin hepatoselüler karsinom hücrelerinde EPO' nun ifadesini inhibe ettiği gösterilmiştir (243). Meme kanseri ile yapılan bir çalışmaya göre, Curcuminin VEGF ekspresyonunu hedefleyerek anjiyogenezi baskıladığı görülmüştür (41).

Meme hücre hatları ile (MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A) yapılan çalışmada çeşitli dozlarda bu hücrelere curcumin uygulanmıştır. 40 μM curcumin dozu ile 24 saat inkübasyondan sonra hücre hatlarının canlılık oranları sırasıyla %20, %40 ve %90 canlılık göstermiştir (267).

Singh ve arkadaşlarının curcuminin meme kanseri hücre hatları üzerindeki apoptoza etkisi araştırılmış ve 40 μM curcuminin 72 saat inkübasyonu sonunda MCF-7' nin %40 ve MDA-MB-231' in %50 canlılık; 50 μM curcuminin 72 saat inkübasyonu sonunda MCF-7' nin %30 ve MDA-MB-231' in %40 canlılık gösterdiği sonucu elde edilmiştir (268).

Curcuminin MCF-10A üzerine olan etkisini araştıran çalışmalar sınırlıdır. Buna göre çalışmamızda kullandığımız 40 ve 50 μM curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresi üzerindeki canlılık oranları inkübasyon süresi ve doz arttıkça azalma göstermiştir. MCF-10A hücresinin canlılık oranları tüm durumlarda %90 dan yukardadır ve curcumin sitotoksik değildir.

Bevacizumabın çeşitli meme kanserli hücreler üzerindeki etkinliği kanıtlanmış olup literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Hein ve arkadaşları yaptıkları araştırmada içinde meme adenokarsinom hücre hatlarının da bulunduğu 30 insan tümör hücre hattının hipoksik şartlar altında 250 μg/ml dozda bevacizumabın tümör etkinliğini incelemişler ve bevacizumabın tümör hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde etkisi olduğu sonucuna ulaşmışlardır (270).

MDA-MB-231 hücre hattının nüde ratlara inokülasyonu ile yapılan deneysel model araştırmasında bevacizumab uygulaması sonrası tümör büyümesinin ve anjiyogenezin inhibe olduğu belirtilmiştir (282).

Buna göre çalışmamızda kullandığımız 250 ve 350 µg/ml bevacizumabın MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki canlılık oranları belirlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresi üzerindeki canlılık oranları inkübasyon süresi ve doz arttıkça azalma göstermiştir.

Çalışmamızda bevacizumab meme kanserli hücre hattında sitotoksik özellik göstermiştir fakat MCF-10A normal meme hücre hattında ise yeterli toksisite sağlanamamıştır.

FDA tarafından orak hücre anemisi tedavisi için onaylanan hidroksiüre antimetabolit ilacının kanserle ilgili çalışmaları sınırlı sayıdadır ve genelde tercih edilen doz aralıkları birbirine yakındır. Boucher ve arkadaşlarının kolon karsinom hücre hatlarıyla yaptığı çalışmada uygulanan 2 mM hidroksiüre nin hücrelerin %50 ve 75' ini öldürdüğü bulunmuştur (283).

Prostat kanseri hücre hatlarıyla yapılan araştırmada hidroksiürenin hücrelerin büyümelerini geciktirdiği ve anti-tümör etkisi gösterdiği belirtilmiştir (284).

Lee ve arkadaşları hidroksiürenin meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü üzerinde etkisinin olduğunu bulmuştur (285). Kronik myeloid lösemili hastalarla yapılan bir çalışmada Hidroksiürenin non-hematolojik toksisite gösterdiği bulunmuştur (286).

Saban ve arkadaşları hidroksiüre türevlerinin kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği göstermişlerdir (287). Hidroksiürea ve anjiyogenez ile ilgili çalışmalar da literatürde mevcuttur. Bir çalışmada hidroksiürenin polisitemi ve esensiyal trombositemide anjiyogenik parametreleri değiştirdiği bulunmuştur (288). Yapılan diğer bir çalışmada hidroksiürenin in vitro olarak HUVEC'lerle birlikte kapillar benzeri yapıların oluşumunu ve in vivo fare modellemesi ile de anjiyogenezi inhibe ettiği bulunmuştur (289). Orak hücre anemili hastalarda hidroksiürenin anti-anjiyogenik etkileri incelenmiştir (290).

Çalışmamızda kullandığımız 1 mM ve 3 mM hidroksiüre dozlarının MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki canlılık oranları belirlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresi üzerindeki canlılık oranları inkübasyon süresi

ve doz arttıkça azalma göstermiştir.Çalışmamızda hidroksiüre meme kanserli hücre hattında sitotoksik özellik göstermiştir fakat MCF-10A normal meme hücre hattında ise yeterli toksisite sağlanamamıştır.

Tekli ilaç kullanımlarının ardından hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör IC50 konsantrasyon değerleri 72. saat için hesaplandı. IC50 için kullanılan graphpad programına göre en az 2 doz değeri olmalıdır (291). İlaç kombinasyon dozları hücrelerde uygulandıktan sonra WST-1 testi ile kombinasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendi. WST-1 uygulaması 3 defa tekrar edildi. İlaçların sinerjistik kombinasyonlarının saptanması tedavi etkinliğini sağlar ve toksisiteyi azaltır. Bu nedenle yapılan kombinasyonların indeksleri hesaplandı ve sinerjistik etki gösterenler işaretlendi.

Literatürde ilaç-ilaç, ilaç-doğal ajan gibi kombinasyon uygulamalarıyla ilişkili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Curcumin ve Bevacizumabın birlikte kullanımının olduğu çalışmalar sınırlı sayıdayken curcumin ve hidroksiüre, Bevacizumab ve hidroksiüre ile curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre kombine kullanımlarına literatürde rastlanmamıştır.

Bir araştırmaya göre, curcumin ve Bevacizumabın birlikte kullanımının VEGF/VEGFR/K-Ras sinyal yolağını düzenleyerek hepatoselüler karsinomayı inhibe ettiği gözlenmiştir (292). Diğer bir çalışmada, çözünebilir curcumin ve bevacizumab kombinasyonu in vivo antitümör etkisi göstermiş ve bu kombinasyonun curcuminin tekli uygulanmasına göre daha etkili olduğu vurgulanmıştır (293).

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre maddelerinin hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini incelemek için scratch assay yapıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ancak ortalamadan uzak değerler olduğu için değerlerin ortalaması 2 tekrara göre yapıldı. MCF-10A hücre hattında yapılan migrasyon deneyinde tüm gruplar 12. saatte tam migrasyon göstermiştir.MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları genel olarak kontrole göre daha az % migrasyon değeri göstermiştir.

WST-1 testinin inkübasyon süresi 72 saat iken scratch assay deneyinin ise 48 saattir. WST-1 testi yapılırken, 96 kuyucuklu hücre plağına hücreler ekildikten 24 saat sonra hücrelere belirlenen dozlarda ajanlar uygulanmış ve sonrasında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonucu absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Scratch assay için 12 kuyucuklu hücre plağına hücreler ekilmiş ve yaklaşık %70-80 konfluensiye ulaşıldıktan sonra scratch e başlanmıştır. Dolayısıyla hücreler belli bir yoğunlukta oldukları için bölündüklerinde yeterli alan olmadığından ölmektedirler. Bu nedenle scratch uygulaması 48 saat kadar inkübasyonla tamamlanmaktadır.

Migrasyon sonucunda image-j ile yapılan hesaplamalar ve WST-1 sonucunda Compusyn programı ile hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI) ile paralellik gösteren kombinasyon grupları seçildi.

Seçilen MCF-7 kombinasyon grupları curcumin 50 µM ve hidroksiüre 3 mM, Bevacizumab 250 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM ile Bevacizumab 350 µg/ml ve hidroksiüre 1 mM gruplarıdır. Seçilen MDA-MB-231 kombinasyon grubu ise Bevacizumab IC50 (335,7 µg/ml) ve hidroksiüre IC50 (1,22 mM) kombinasyon grubudur. MCF-10A hücre hattında sinerjistik etki ve <%50 migrasyon oranı gösteren kombinasyon grupları olmadığı için bu hücre hattında kombinasyon grubu seçilememiştir.

Bu grupların *HIF-1α, VEGF, EPO* ve *C-RAF* gen ekspresyonlarını değerlendirmek için Real Time PCR ve protein ekspresyonlarını değerlendirmek için western blot yöntemi ile analizleri yapıldı.

HIF-1α, VEGF, EPO ve C-Raf gen ekspresyonu analizlerinde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde en etkin down-regülasyon, MCF-10A hücresinde en etkin up regülasyonun olduğu IC50 ve kombinasyon harici gruplar curcumin 40 µM ve hidroksiüre 2 mM doz grupları olarak tespit edildi.

MDA-MB-231 hücrelerinde Bevacizumab IC50 ve hidroksiüre IC50 dozlarının birlikte kullanıldığı grubun tüm 4 farklı gen ekspresyonları, dozların ayrı ayrı kullanılmasına göre daha az down regülasyon göstermektedir. MCF-7 hücrelerinde üç farklı kombinasyon dozlarının kullanıldığı grupların tüm 4 farklı gen ekspresyonları, dozların ayrı ayrı kullanılmasına göre daha etkili down

regülasyon göstermektedir. Bu durum kombinasyonun sinerjistik etkinliğinden kaynaklandığını göstermektedir.

Western blot yapılırken *HIF-1α* için MCF-10A hücrelerinde tekrarlanabilir bantlar alınamadı.

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde nükleer *HIF-1α* ekspresyonları için tekrarlanabilir bantlar alınamadı fakat pozitif kontrol için MG-63 hücresi ile ekspresyon gösterildi. Normoksik şartlarda *HIF-1α* yolağında, sitoplazmada *HIF-1α* übikitin proteazom degradasyonuna uğrar ve nükleusa geçiş yapamaz. Hipoksik şartlarda ise nükleusa geçişi olmaktadır. Bizim çalışmamız normoksik şartlarda gerçekleştiği için sitoplazmik *HIF-1α* bandı elde edebilirken, nükleer *HIF-1α* bandı elde edilemedi. Pozitif kontrol için hipoksik şarlarda büyümüş olan MG-63 hücresinin nükleer lizatı kullanıldı.

Çalışmamız normoksik şartlar altında gerçekleştiği için nükleer *HIF-1α* bant görüntüsü alamamızın sebebi nükleer transportun gerçekleşmemesinden kaynaklanabilir. Sitoplazmik *HIF-1α* nın bir bölümü degradasyonla yıkıma uğradığı için moleküler ağırlığı 92 kDa iken, nükleerde bu 132 kDa dır. Bu da çalışmamızın normoksik şartlar altında olduğunu göstermektedir.

Kaspaz -9, apoptoz kaskadının oluşmasında rol alan bir enzimdir ve mitokondriyel yolakta mitokondriden sitokrom-c' nin salınmasıyla aktif hale geçmektedir. Çalışmamızda yan hedef olarak curcumin, hidroksiüre ve bevacizumabın apoptoz üzerindeki etkisi amaçlanmıştır ve bunun için western blot yöntemi tercih edilmiştir. Apoptozda diğer bir önemli enzim olan kaspaz-3, MCF-7 hücre hattında bulunmadığı için kaspaz-9 apoptoz analizi için belirlenmiştir.

Western blot ile kaspaz-9 analizinde, her iki meme kanser hücre hattında kaspaz-9 ekspresyonunun fazla olduğu Bevacizumab IC50 grubu ve hidroksiüre 1mM grubudur. MCF10A hücrelerinde en yüksek kaspaz-9 ekspresyonunu kontrol grubu göstermiştir ve Bevacizumab IC50 grubu ve hidroksiüre 1mM grubunda ekspresyon bandı elde edilememiştir. Bu dozların meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyebileceği ve normal meme hücresini etkilemeyeceği sonucuna varabiliriz.

VEGF' in görünür protein bantları elde edilememiştir ve bunun için pozitif kontrol (fare böbrek ve karaciğer lizatı) kullanılmıştır.

Yeni kan damarları VEGF benzeri anjiyogenik faktörlerin uyarıcı etkileri ile oluşmaktadır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) in over-ekspresyonu, meme kanseri hastalarında kötü prognozla bağlantılı bir anahtar anjiyogenez molekülüdür (294). VEGF ve reseptörlerinin etkinliğini inhibe eden ajanlar anti meme kanseri terapötik ajanları olarak fonksiyon göstermektedir (295, 296).

Baharatlar ve türevleri kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde tıbbi ajan olarak yıllardır kullanılmaktadır (297, 298). Curcumin, *Curcuma Longa* baharatında bulunan kimyasal madde olup anti-anjiyogenik özelliktedir. Ksenograft fare modeliyle yapılan çalışmada curcumin tedavisi, tümör kütlesini, proliferasyonu ve anjiyogenezi etkilediği ve MTT canlılık testi ile MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca curcumin uygulaması, pro-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunda anlamlı ölçüde azalma ve faredeki mikro-damar yoğunluğunda bir düşüş olduğu gözlenmiştir (299).

Yaptığımız çalışmada, 40 μM curcuminin normal meme hücre hattı olan MCF-10A üzerinde VEGF gen ekspresyonunu etkileyerek onun proanjiyogenik aktivatör olarak etki gösterdiği fakat 2 meme adenokarsinom hücre hatlarında ise inhibitör etkisi gösterdiği gözlenmiştir.

Tüm deneyler normoksik koşullarda yapılmıştır. Literatür bilgilerini ve bu çalışmadaki bulguları incelediğimizde, ökaryotik hücrelerde mikroçevre şartları ve hücre tiplerine göre ayrılan tümör veya tümör olmayan hücreler üzerinde curcumin, anjiyogenik inhibitör ya da aktivatör olarak rol yapar.

MCF-10A hücrelerindeki VEGF gen ekspresyonundaki artış, post-translasyonel ve post-transkripsiyonel modifikasyonun sonucu olabilir. Bazı post-transkripsiyonel düzenlemeler, HIF-1α 'nın SUMO (küçük ubikutin bağlı düzenleyici) mekanizması gibi post-translasyonel modifikasyonlarla beraber rol alabilir. SUMO proteazı HIF-1α 'nın stabilizasyonunu ve VEGF transkripsiyonunu arttırır (300-302).

Tümör büyümesi, anjiyogenezi ve metastazı VEGF gibi HIF-1α bağımlı farklı genlerin ekspresyonu ile korele haldedir. HIF-1α Ras bağımlı yolda aktive olmaktadır (146).

Eritropoezisin ana düzenleyicisi olan EPO, HIF-1α ile düzenlenmektedir (168). Curcumin tümör hücrelerinde EPO üretimini baskılar (243, 303). Curcumin uygulaması sonrası EPO' nun gen ekspresyonları 2 meme adenokarsinom ve normal meme hücre hattında down regüle durumdadır. Curcuminin tüm hücre hatlarında eritropoezisi inhibe ettiğini, bevacizumabın literatürle paralel olarak tümör hücrelerinde EPO' yu inhibe ettiği, MCF-10A da ise aktive ettiğini gözledik.

Lopes ve arkadaşları anti metabolit ajan olan hidroksiürenin VEGF (290) ve HIF-1α (291) yı baskıladığı sonucuna varmışlardır. Hidroksiüre ve EPO ile ilgili araştırma literatürde yer almamaktadır. Çalışmamızın C-Raf, VEGF EPO, HIF-1α gen ve protein analizlerinin bulgularına göre, 1 mM hidroksiürenin meme adenokarsinom hücre hatlarında ekspresyonları inhibe ederken normal meme hücre hattında inhibe edici özellikte değildir.

Sonuç olarak kullanılan curcumin, Bevacizumab ve hidroksiüre ajanları, anjiyogenezi MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-10A hücrelerine göre daha çok etkilemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın ilk bölümünde curcumin, Bevacizumab ve hidroksiürenin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin canlığını nasıl etkilediğini inceledik. Maddelerin belirlenen dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonunun, hücreler üzerinde anlamlı düzeyde etkinlik gösterdiği gözlenmiştir.

Scratch uygulamasıyla maddelerin migrasyonda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerini MCF-10A hücrelerine göre daha çok etkilediği gözlenmiştir fakat tekrar sayısının arttırılıp istatistiksel anlamlılık kazanması için deneylerin tekrarlanması önerilmektedir. Ayrıca invazyon testleriyle invazyon üzerinde maddelerin etkinliği belirlenmelidir.

PCR ve western blot analizleri gruplar üzerinde paralelik göstermektedir. Curcuminin normal meme hücre hattı olan MCF-10A üzerinde VEGF gen ekspresyonunu etkileyerek onun proanjiyogenik aktivatör olarak etki gösterdiği fakat MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında ise inhibitör etkisi gösterdiği gözlenmiştir. Western analizinde VEGF in görünür bantları elde edilemediği için VEGF protein ekspresyonu için, immünhistokimya ya da hücre tabanlı ELISA yöntemi kullanılabilir.

Apoptoz etkinliği TUNEL testi ile de değerlendirilmelidir. Ayrıca kaspaz-9 un aktifliği enzim aktive tayini ile de belirlenmelidir.

MCF-7 hücrelerindeki kombinasyon dozlarının anti-anjiyogenik etki göstermesi meme kanseri tedavisi için potansiyel alternatif olabilir.

Yolakla ilişkili diğer moleküllerin analizi bu konuya ışık tutacaktır. Ayrıca çalışma in vitro olduğu için invivo çalışmalarla desteklenmelidir. İncelenen genlerin ekspresyonları hipoksik ortamda da incelenmelidir.

Sonuç olarak kullanılan maddelerin dozları, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerini MCF-10A hücrelerine göre daha çok etkilemektedir. Bu sonuçlar bize dozların meme kanseri hücrelerinde faydalı olabileceğini düşündürdü.

Elde ettiğimiz bulguların ileri çalışmalarla desteklenerek bu alanda çalışan diğer araştırmacılara ışık tutacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61: 69–90, 2011. CrossRefMedlineGoogle Scholar

2. Weigelt B, Peterse JL, van ‘t Veer LJ: Breast cancer metastasis: markers and models. Nat Rev Cancer 5: 591–602, 2005.

3. de Castro Junior G, Puglisi F, de Azambuja E, El Saghir NS, Awada A: Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the “do ut des” paradigm). Crit Rev Oncol Hematol 59: 40–50, 2006.

4. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144: 646–674, 2011.

5. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 100: 57–70, 2000.

6. Mueller MM, Fusenig NE: Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nat Rev Cancer 4: 839–849, 2004.

7. Bergers G, Benjamin LE: Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer 3: 401–410, 2003.

8. Jain RK: Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. Science 307: 58–62, 2005.

9. Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M: Growing tumor vessels: More than one way to skin a cat – implications for angiogenesis targeted cancer therapies. Mol Aspects Med 32: 71–87, 2011.

10. Harris AL: Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. Nat Rev Cancer 2: 38–47, 2002.

11. Pugh CW, Ratcliffe PJ: Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med 9: 677–684, 2003.

12. Connolly DT: Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. J Cell Biochem 47: 219–223, 1991.

13. Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol 20: 4368–4380, 2002.

14. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. Endocr Rev 13: 18–32, 1992.
15. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(23): 12969-73.
16. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. Clin Cancer Res 2006; 12(2): 332-9.
17. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J: p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem 274:32 631–32 637, 1999.
18. Mackey, J., Gelmon, K., Martin, M., McCarthy, N., Pinter, T., Rupin, M., Youssoufian, H. 2009. ‘’TRIO-012: A multicenter, multinational, randomized, double-blind phase III study of IMC-1121B plus docetaxel vs.placebo plus docetaxel in previously untreated patients with HER2-negative, unresectable, locally recurrent or metastatic breast cancer’’, Clin. Breast Cancer, 9, 258–261.
19. Miller, K.D., Chap, L.I., Holmes, F.A., Cobleigh, M.A., Marcom, P.K., Fehrenbacher, L., Dickler, M., Overmoyer, B.A., Reimann, J.D., Sing, A.P. 2005. ‘’Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer’’, J. Clin. Oncol, 23, 792–799.
20. Thomssen C, Pierga JY, Pritchard KI, Biganzoli L, Cortes-Funes H, Petráková K ve ark. First-Line Bevacizumab-Containing Therapy for Triple Negative Breast Cancer: Analysis of 585 Patients Treated in the ATHENA Study. Oncology, 82:218–27, 2012.
21. Hehlmann, R. 2003. ‘’Current CML therapy: progress and dilemma’’, Leukemia, 17, 1010-1012.
22. Shewach, D.S., Lawrence, T.S. 2007. ‘’Antimetabolite radiosensitizers’’, J Clin Oncol, 25, 4043-4050.
23. Bimonte, S., Barbieri, A., Palma, G., Rea, D., Luciano, A., D'Aiuto, M., Arra, C., Izzo, F. 2015. ‘’Dissecting the Role of Curcumin in Tumour Growth and

Angiogenesis in Mouse Model of Human Breast Cancer'', Biomed Res Int, 2015, 878134.

24. Medina D. 1996. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. J Mammary Gland Biol Neopasia 1:5–19.

25. Beller F: Development and Anatomy the Breast. In:Mitchell Jr GW, Basset LW. The female breast and its disorders. First Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1990:1- 12

26. Cosgrove O. David, Tohno E, P. Sloane John. Ultrasound Diagnosis of Breast Diseases. First edition. London, Churchilll Livingstone , 1994; 10- 20

27. Harold E: Anatomy the Breast. In Isaacs JH, ed. Textbook Breast Disease. St. Louis: Mosby Year Book, 1992; 1- 14

28. Santen RJ, Mansel R. Benign breast disorders. N Engl J Med. 2005; 353(3): 275- 85

29. Lemone P., Burke K: M., "Medical Surgial Nursing -Criitical Thinking in Client Care", California, 1996, s 2039-2057

30. Diagnostic Surgical Pathology, 3rd edition, editor Stephen E. Sternberg 1999; pp. 122- 38.

31. McCarthy K, Carpenter SA, Georgiade GS. The breast: embryology, anatomy, and physiology. In: Georgiade NG, Georgiade GS, Riefkohl R, Eds. Aesthetic Surgery of the Breast. New York: Saunders Co, 1990: 3-17. 13.

32. Georgiade NG, Georgiade GS, Riefkohl R. Aesthetic Breast Surgery. In : McCarthy JG, Ed. Plastic Surgery. 9th ed, New York: Saunders Co.1990: 3839-3896.

33. Yalav, O. (2009). Erken Evre Meme Kanserli Hastalarda Sentinel Lenf Nodu Biyopsisinin Yeri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Adana.

34. Applic PA, Khuwaja GA, Limited SL. Bi-modal breast cancer classification system. 2004:235-242. doi:10.1007/s.

35. What Is Breast Cancer? http://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast cancer.html. Accessed January 21, 2017.

36. Bomford CK, Kunkler IH SS. Walter and Miller's Textbook of RT, Radiation Physics, Therapy and Oncology. (2 Nd Ed). 2nd ed. Churchill Livingstone Inc.;

1993.
37. Hu K, Lou L, Tian W, Pan T, Ye J, Zhang S. The Outcome of Breast Cancer Is Associated with National Human Development Index and Health System Attainment. 2016:1-9. doi:10.1371/journal.pone.0158951.
38. Türkiye kanser istatistikleri ankara, 2016. 2016.
39. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62(1):10-29. doi:10.3322/caac.20138.
40. Martin A, Weber BL. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. 2000;92(14).
41. Clavel-Chapelon F., Gerber M. Reproductive Factors and Breast Cancer Risk. Do They Differ According to Age At Diagnosis? Breast Cancer Research and Treatment; 2002, 72:107-115
42. Topuz E. Meme Kanseri Biyoloji, Tanı, Evreleme ve Tedavi. 3. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Ents. Yayınları ;1997
43. Pharoah PD, Day NE, Duffy S et al (1997) Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Int J Cancer 71:800–809
44. Clarke, C.A., Glaser, S.L., West, D.W., Ereman, R.R., Erdmann, C.A., Barlow, J.M. ve diğerleri. (2002) Breast cancer incidence and mortality trends in an affluent population: Marin County, California, USA, 1990-1999.
45. Cuzick J. Epidemiology of Breast Cancer. The Breast; 2003, 12: 405-411.
46. Breast Cancer Res, 4 (6), R13. 49 19.Hill, A.D., Doyle, J.M., McDermott, E.W.,O'Higgins, N.J. (1997) Hereditary breast cancer. Br J Surg, 84 (10), 1334-1339.
47. Stratton MR, Rahman N (2008) The emerging landscape of breast cancer susceptibility. Nat Genet 40:17–22
48. Macmahon B, Cok P, Lin TM. Age at First Birth and Cancer of the Breast.A summary of an İnternational Study Bull . Who 1970; 43: 203-12.
49. Trichopoullos D, Hsieh C, Macmahon B. Age at First Birth and Breast Cancer Risk . Int J cancer 1983; 31: 701-704.
50. Mac Mahon B, Trichopoulos D, Brown J et al. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer. Int j Cancer 1982; 29: 13-20.

51. Ozmen, V., Ozcinar, B., Karanlik, H., Cabioglu, N., Tukenmez, M., Disci, R. ve diğerleri. (2009) Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study. World J Surg Oncol, 7, 37.

52. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 18 (1), 121-131. 22.Wolff, M.S., Collman, G.W., Barrett, J.C.,Huff, J. (1996) Breast cancer and environmental risk factors: epidemiological and experimental findings. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 36, 573-596.

53. Bozfakıoğlu Y. Meme kanseri; Epidemiyoloji, Korunma ve nüks özellikleri. Editör Kalaycı G. Genel Cerrahi Cilt 1; Nobel, İstanbul 2002; pp. 557-61.

54. Remennick L.I. Preventive Behavior Among Recent Immigrants: RussianSpeaking Women and Cancer Screening in Israel. Social Science and Medicine; 1999, 48: 1669-1684.

55. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, et al. Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. Marincola FM, ed. PLoS Med. 2010;7(5):e1000279. doi:10.1371/journal.pmed.1000279.

56. Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, et al. Differential Response of Immunohistochemically Defined Breast Cancer Subtypes to Anthracycline-Based Adjuvant Chemotherapy with or without Paclitaxel. Aziz SA, ed. PLoS One. 2012;7(6):e37946. doi:10.1371/journal.pone.0037946.

57. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. J Clin Oncol. 28:3271-3277. doi:10.1200/JCO.2009.25.9820.

58. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. Clin Cancer Res. 2005;11(16).

59. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093.

60. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8418-8423. doi:10.1073/pnas.0932692100.

61. Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? J Natl Cancer Inst. 2014;106(8).
62. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. PLoS Med. 2010;7(5): e1000279.
63. Parise CA, Caggiano V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/ PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. J Cancer Epidemiol. 2014;2014: 469251.
64. Perou CM, Borresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3.
65. Adrada BE, Miranda RN, Rauch GM, et al. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: sensitivity, specificity, and findings of imaging studies in 44 patients. Breast Cancer Res Treat. 2014;147: 1-14.
66. Koçoğlu, H. “Sorular ve Cevaplarla Kanser: Kanser Üzerine Bilmeniz Gereken Herşey” (Çeviri) Speechley, Val and Rosenfield, Maxine. Ankara 2000.
67. Weigelt, B, Peterse, J.L., van ‘t Veer, L.J. 2005. ‘’Breast cancer metastasis: markers and models’’, Nat Rev Cancer, 5, 591-602.
68. Preziosi, R., Sarli, G., Paltrinieri, M. 2004. “Prognostic value of intramoral vessel density in cutaneous mast cell tumour of the dog”, Journal of Comparative Pathology, 130, 2-3, 143–151.
69. Kumar, S. 1999. ‘’Breast carcinoma: Vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis’’, Cancer Res, 59(4), 856–861.
70. Folkman, J. 2007. ‘’Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?’’, Nat Rev Drug Discov, 6, 273-286.
71. Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J: Mechanisms of metastasis. Breast Cancer Res 10(Suppl 1): S2, 2008. Google Scholar
72. Talmadge JE, Fidler IJ: AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: historical perspective. Cancer Res 70: 5649–5669, 2010. Abstract/FREE Full Text

73. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR: The biology of cancer invasion and metastasis. Adv Cancer Res 28: 149–250, 1978.
74. Poste G, Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis. Nature 283: 139–146, 1980. CrossRefMedlineGoogle Scholar
75. J. Folkman, in: V. DeVita, S. Hellman SAR. Biologic Therapy of Cancer. Philadelphia: J.B. Lippincott Co.; 1991.
76. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992;267(16):10931-10934. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375931. Accessed January 22, 2017.
77. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. J Clin Invest. 2003;111(9):1287-1295. doi:10.1172/JCI17929.
78. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000;407(6801):249-257. doi:10.1038/35025220.
79. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 2005;438(7070):932-936. doi:10.1038/nature04478.
80. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386(6626):671-674. doi:10.1038/386671a0.
81. Weis SM, Cheresh DA. review Tumor angiogenesis : molecular pathways and therapeutic targets. Nat Med. 2011;17(11):1359-1370. doi:10.1038/nm.2537.
82. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol. 2002;29(6Q):asonc02906q0015. doi:10.1053/sonc.2002.37263.
83. Fernandes AM, Hamburger AW, Gerwin BI. Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells. Cancer Lett. 1999;142(1):55-63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10424781. Accessed January 22, 2017.
84. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med. 2000;6(4):389-395. doi:10.1038/74651.
85. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 1996;86(3):353-364. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718. Accessed January 22, 2017.

86. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler P. Molecular Mediators of Angiogenesis. 2011;31(1):1-28. doi:10.1097/BCR.0b013e3181c7ed82.Molecular.

87. Brem SS, Jensem HM GP. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. Cancer. 1978:41:239–44.

88. Korkola J AM. Resistance to mammary tumorigenesis in Copenhagen rats is associated with the loss of preneoplastic lesions. Carcinogenesis. 1999:20:221–7.

89. Shekhar MPV, Werdell J TL. Interaction with endothelial cells is a prerequisite for branching ductal–alveolar morphogenesis and hyperplasia of preneoplastic human breast epithelial cells: regulation by estrogen. Cancer Res. 2000:60:439–49.

90. Lu Y, Zhang J, Beech DJ, Myers LK JL. P16 downregulates VEGF and inhibits angiogenesis in breast cancer cells. Cancer Ther. 2003:1:143–51.

91. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931. Accessed January 22, 2017.

92. Bergers G, Benjamin LE, Francisco S. TUMORIGENESIS AND THE ANGIOGENIC SWITCH. 2003;3(June):1-10. doi:10.1038/nrc1093.

93. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. , Publ online 09 May 2002; | doi101038/sj/gt/3301723. 2002;9(10). doi:10.1038/sj/gt/3301723.

94. Polverini, P.J. & Leibovich S. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. Lab Invest. 1984:51, 635-642.

95. Dunn IF, Heese O, Black PM. Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. J Neurooncol. 50(1-2):121-137. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245272. Accessed January 22, 2017.

96. Darland D DAP. Tumor Angiogenesis and Microcirculation. Marcel Dekker Inc. 2001.

97. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The Vascular

Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA. Mol Endocrinol. 1991;5(12):1806-1814. doi:10.1210/mend-5-12-1806.

98. Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, Scadden DT, Chiocca EA. Tumor Stromal-Derived Factor-1 Recruits Vascular Progenitors to Mitotic Neovasculature, where Microenvironment Influences Their Differentiated Phenotypes. Cancer Res. 2006;66(18):9054-9064. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3759.

99. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. Cell. 2006;124(2):263-266. doi:10.1016/j.cell.2006.01.007.

100. De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. Trends Immunol. 2007;28(12):519-524. doi:10.1016/j.it.2007.09.004.

101. Burrell K, Zadeh G. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis.

102. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of Angiogenesis. Annu Rev Physiol. 1991;53(1):217-239. doi:10.1146/annurev.ph.53.030191.001245.

103. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science. 1997;277(5322):55-60. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204896. Accessed January 23, 2017.

104. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell. 1996;87(7):1171-1180. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980224. Accessed January 23, 2017.

105. Rini BI, Small EJ. Biology and Clinical Development of Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy in Renal Cell Carcinoma. J Clin Oncol. 2004;23(5):1028-1043. doi:10.1200/JCO.2005.01.186.

106. Aikawa H, Takahashi H FS. Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in nonsmall cell lung cancer. Anticancer Res. 1999:19:4305-4310.

107. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and Angiogenesis:

Signaling Three-Dimensional Tumor Growth. J Investig Dermatology Symp Proc. 2000;5(1):24-33. doi:10.1046/j.1087-0024.2000.00012.x.
108. Yuan A, Yu CJ KS. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expession specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in nonsmall cell lung cancer. J Clin Oncol. 2001;19: 432-44.
109. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003;9(6):669-676. doi:10.1038/nm0603-669.
110. Grothey A, Galanis E. Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. Nat Rev Clin Oncol. 2009;6(9):507-518. doi:10.1038/nrclinonc.2009.110.
111. Ria R, Roccaro AM, Merchionne F, Vacca A, Dammacco F, Ribatti D. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. Leukemia. 2003;17(10):1961-1966. doi:10.1038/sj.leu.2403076.
112. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. Angiogenesis. 2002;5(4):237-256. doi:10.1023/A:1024532022166.
113. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. N Engl J Med. 2004;350(23):2335-2342. doi:10.1056/NEJMoa032691.
114. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2006;355(24):2542-2550. doi:10.1056/NEJMoa061884.
115. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene. 2010;29(5):625-634. doi:10.1038/onc.2009.441.
116. Avni R, Cohen B, Neeman M. Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis. NMR Biomed. 2011;24(6):569-581. doi:10.1002/nbm.1632.
117. Bahadori B, Uitz E, Mayer A, et al. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. Vasc Med. 2010;15(5):371-374. doi:10.1177/1358863X10379674.

118. Freyer JP, Sutherland RM. A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. J Cell Physiol. 1985;124(3):516-524. doi:10.1002/jcp.1041240323.
119. Freyer JP. Rates of Oxygen Consumption for Proliferating and Quiescent Cells Isolated from Multicellular Tumor Spheroids. In: Springer US; 1994:335-342. doi:10.1007/978-1-4615-2468-7_44.
120. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. Blood. 1997;90(9):3322-3331. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9345014. Accessed January 23, 2017.
121. Semenza, G.L. 1998. ‘’Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis’’, Curr Opin Genet Dev, 8, 588-594.
122. Fan, F., Schimming, A., Jaeger, D., Podar, K. 2012. ‘’Targeting the tumor microenvironment: Focus on angiogenesis’’, J. Oncol, 2012, 281261.
123. Hofer, T., Desbaillets, I., Hopfl, G., Gassmann, M., Wenger, R.H. 2001. ‘’Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy’’, FASEB J, 15, 2715-2717.
124. Harris, A.L. 2002. ‘’Hypoxia—a key regulatory factor in tumor growth’’, Nat Rev Cancer, 2, 38–47.
125. Zhong, Q., Zhou, Y., Ye, W., Cai, T., Zhang, X. 2012. ‘’Hypoxia-inducible factor 1-alpha-AA-modified bone marrow stem cells protect PC12 cells from hypoxia-induced apoptosis, partially through VEGF/PI3K/Akt/FoxO1 pathway’’, Stem Cells Dev, 21, 2703–2717.
126. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J. 2001. ‘’HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing’’, Science 292, 464–468.
127. Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J. 2002. ‘’Oxygen sensors and angiogenesis’’, Semin Cell Dev Biol, 13, 29–37.
128. Schindl, M., Schoppmann, S.F., Samonigg, H., Hausmaninger, H., Kwasny, W. 2002. ‘’Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is

associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer'', Clin Cancer Res, 8, 1831–1837.

129. Shibaji, T., Nagao, M., Ikeda, N., Kanehiro, H., Hisanaga, M. 2003. ''Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer'', Anticancer Res, 23, 4721–4727.

130. Sumiyoshi, Y., Kakeji, Y., Egashira, A., Mizokami, K., Orita, H. 2006. ''Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer'', Clin Cancer Res, 12, 5112–5117.

131. Bos, R., van der Groep, P., Greijer, A.E. 2003. ''Levels of hypoxia-inducible factor-1α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma'', Cancer, 97(6), 1573-1581.

132. Gruber, G., Greiner, R.H., Hlushchuk, R. 2004. ''Hypoxia-inducible factor 1α in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter?'', Breast Cancer Res., 6(3), R191-R198.

133. Generali, D., Berruti, A., Brizzi, M.P. 2006. ''Hypoxiainducible factor-1α-expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer'', Clin. Cancer Res, 12(15), 4562-4568.

134. Cancer Genome Atlas Network. 2012. ''Comprehensive molecular portraits of human breast tumours'', Nature, 490(7418), 61-70.

135. Semenza, G.L., 2012. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy'', Trends Pharmacol. Sci., 33(4), 207-214.

136. Peyssonnaux C, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Calothy G, Eychène A. Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2000;20(19):7068-7079. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982823. Accessed January 27, 2017.

137. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/ MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia 2004a; 18:189–218.

138. Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. J Biol Chem 1998;273:24052–24056.
139. Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. Nature 1996;383:181–185.
140. Fabian DR, Daar IO, Morrison DK. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. Mol Cell Biol 1993;13:7170–7179.
141. Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signaling by RKIP. Nature 1999;401:173–177.
142. Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signaling by dephosphosphorylation. EMBO J 2002;21:64–71.
143. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. EMBO J 1994;13:1610–1619.
144. Buolamwini, J.K. "Novel anticancer drug discovery", Current Opinion in Chemical Biology, 3, (1999) 500-509.
145. Lim, J.H., Lee, E.S., You, H.J., Lee, J.W., Park, J.W., Chun, Y.S. 2004. ‘’Ras-dependent induction of HIF-1alpha785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion’’, Oncogene, 23(58), 9427-31.
146. Yang, X.M., Wang, Y.S., Zhang, J., Li, Y., Xu, J.F., Zhu, J., Zhao, W., Chu, D.K., Wiedemann, P. 2009. ‘’Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization’’, Invest Ophthalmol Vis Sci., 50(4), 1873-9.
147. Berra, E., Milanini, J., Richard, D.E., Le Gall, M., Viñals, F., Gothié, E., Roux, D., Pagès, G., Pouysségur, J. 2000. ‘’Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia’’, Biochem Pharmacol, 60(8), 1171-8.

148. Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J., Michiels, C. 2000. ‘’ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation’’, FEBS Lett, 468(1), 53-8.
149. Hagemann, C., Gloger, J., Anacker, J., Said, H.M., Gerngras, S., Kühnel, S., Meyer, C., Rapp, U.R., Kämmerer, U., Vordermark, D., Flentje, M., Roosen, K., Vince, G.H. 2009. ‘’RAF expression in human astrocytic tumors’’, Int J Mol Med, 23(1), 17-31.
150. Said, H.M., Hagemann, C., Staab, A., Stojic, J., Kühnel, S., Vince, G.H., Flentje, M., Roosen, K., Vordermark, D. 2007. ‘’Expression patterns of the hypoxia-related genes osteopontin, CA9, erythropoietin, VEGF and HIF-1alpha in human glioma in vitro and in vivo’’, Radiother Oncol., 83(3), 398-405.
151. Schwab, L.P., Peacock, D.L., Majumdar, D., Ingels, J.F., Jensen, L.C., Smith, K.D., Cushing, R.C., Seagroves, T.N. 2012. ‘’Hypoxia-inducible factor 1α promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer’’, Breast Cancer Res, 1 4(1), R6.
152. Ghattass, K., El-Sitt, S., Zibara, K., Rayes, S., Haddadin, M.J., El-Sabban, M., Gali-Muhtasib, H. 2014. ‘’The quinoxaline di-N-oxide DCQ blocks breast cancer metastasis in vitro and in vivo by targeting the hypoxia inducible factor-1 pathway’’, Mol Cancer, 13, 12.
153. Raja, R., Kale, S., Thorat, D., Soundararajan, G., Lohite, K., Mane, A., Karnik, S., Kundu, G.C. 2014. ‘’Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1α-mediated VEGF-dependent angiogenesis’’, Oncogene, 33(16), 2053-64.
154. Hagemann, C., Rapp, U.R. 1999. ‘’Isotype-specific functions of Raf kinases’’, Exp Cell Res, 253, 34-4.
155. Peyssonnaux, C., Eychene, A.2001. ‘’The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation’’, Biol Cell, 93, 53-62.
156. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D and Kerbel RS. (1995). Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis.Cancer Metastasis Rev., 14, 263–277.
157. Kaelin, W.G., Ratcliffe, P.J. 2008. ‘’Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway’’, Mol Cell, 30(4), 393–402.

158. Hardee, M.E., Arcasoy, M.O., Blackwell, K.L., Kirkpatrick, J.P., Dewhirst, M.W. 2006. ‘’Erythropoietin biology in cancer’’, Clin Cancer Res, 12(2), 332-9.
159. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. Physiol Rev 1992; 72(2): 449-89.
160. Muta H, Funakoshi A, Baba T, Uike N, Wakasugi H, Kozuru M,et al. Gene expression of erythropoietin in hepatocellular carcinoma. Intern Med 1994; 33(7): 427-31.
161. Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. Brain Res Mol Brain Res 81: 29–42, 2000.
162. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. Blood 105: 659–669, 2005.
163. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. Crit Rev Oncol Hematol 67: 39–61, 2008.
164. Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. Mol Cell Biol 1986; 6(7): 2731-3.
165. Constantinescu, S.N., Ghaffari, S., Lodish, H.F. 1999. ‘’The erythropoietin receptor: structure, activation and intracellular signal transduction’’, Trends Endocrinol. Metab, 10, 18–23.
166. Suzuki, N., Obara, N., Yamamoto, M. 2007. ‘’Use of genemanipulated mice in the study of erythropoietin gene expression’’, Methods Enzymol., 435, 157-177.
167. Miyata, T., Suzuki, N. & van Ypersele de Strihou, C. 2013. ‘’Diabetic nephropathy: are there new and potentially promising therapies targeting oxygen biology?’’, Kidney Int., 84, 693-702.
168. Franke, K., Gassmann, M., Wielockx, B. 2013. ‘’Erythrocytosis: the HIF pathway in control’’, Blood, 122, 1122-1128.
169. Lee, W.Y., Huang, S.C., Hsu, K.F., Tzeng, C.C., Shen, W.L. 2008. ‘’Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution

during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence'', Gynecol Oncol, 108, 377–384.
170. Jelkmann, W. 2007. ''Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine'', Methods Enzymol, 435, 179.
171. Chan, W.K., Yao, G., Gu, Y.Z., Bradfield, C.A. 1999. ''Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation'', J Biol Chem, 274, 7.
172. Wright, G.L., Hanlon, P., Amin, K., Steenbergen, C., Murphy, E., Arcasoy, M.O. 2004. ''Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury'', FASEB J., 18, 1031–1033.
173. Lipsic, E., Schoemaker, R.G., van der Meer, P., Voors, A.A., van Veldhuisen, D.J., van Gilst, W.H. 2006. ''Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside'', J Am Coll Cardiol, 48, 2161–2167.
174. Kertesz, N., Wu, J., Chen, T.H., Sucov, H.M., Wu, H. 2004. ''The role of erythropoietin in regulating angiogenesis'', Dev Biol 276, 101–110.
175. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. Clin Cancer Res 2006; 12(2): 332-9.
176. Özvaran M K (2004): Malign mezotelyomada gen tedavisi. Toraks Dergisi, 5 (2): 110-115.
177. Öztürk F (2002): Apopitoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9 (2): 143-148.
178. Ulukaya E (2007): Apoptozis ders notları. Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf, Erişim tarihi: 04.05.2007.
179. Guimaraes C A, Linden R (2004): Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. Eur. J. Biochem., 271: 1638–1650.
180. Tomatır A G (2003): Apoptoz; programlı hücre ölümü. T. Klin. J. Med. Sci., 23: 499-508.
181. Erdoğan B B (2003): Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi, 4: 165-174.
182. Nagata S (1997): Apoptosis by death factor. Cell, 88: 355-365.

183. Rashed M M, Ragab N M. (2004): The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemicaly in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas. Turk. J. Haematol., 21 (3): 141-147.

184. Galle P R (1997): Apoptosis in liver disease. Journal of Hepatology, 27: 405-412

185. Wijsman J H, Jonker R R, Keijzer R, Velde C J H, Cornelisse C J, Dierendonck J H V (1993): A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ endlabeling of fragmented DNA. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41 (1): 7-12.

186. Dayan Y B, Kaveri S V, Kazatchkine M D, Shoenfeld Y (2000): Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies?. Medical Hypotheses, 55 (2): 103–108

187. Saraste A, Pulkki K (2000): Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovascular Research, 45: 528-537.

188. Öktem S, Özhan M H, Özol D (2001): Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi, 2 (1): 91-95.

189. Roshal M, Zhu Y, Planelles V (2001): Apoptosis in AIDS. Apoptosis, 6: 103–116.

190. Staley K, Blaschke A J, Chun J (1997): Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. Cell Death and Differentiation, 4: 66 -75.

191. Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, Akaike A, Honda Y, Minami M, Satoh M (1999): Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. Brain Research, 815: 11- 20.

192. Tomatır A G (2003): Apoptoz; programlı hücre ölümü. T. Klin. J. Med. Sci., 23: 499-508.

193. Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, J. Cell. Mol. Med., 7, 3, 249-257 p.

194. Pagliari, L.J., Pinkoski, M.J. and Gren D.R., 2003, Apoptosis signaling: a means to an End, Handbook of Cell Signaling, 3, 331, 431-439 p.

195. Cooper, G.M. and Hausman, R.E., 2006, Hücre Moleküler Yaklaşım, İzmir Tıp Kitapevi, İzmir, 699 s.
196. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2011. 20: 145.
197. Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sci 2001;26:61-6.
198. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem Sci 2001; 26:390-7.
199. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. et al: Tissue distribution of the death ligand TRAİL and its receptors. J Histochem Cytochem 52(6): 821-831; 2004.
200. H. Duan, K. Orth, A.M. Chinnaiyan, G.G. Poirier, C.J. Froelich, W.W. He, V.M. Dixit, ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B, J. Biol. Chem. 271 (1996) 16720±16724
201. S.M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, J. Zangrilli, N. Robertson, R.C. Armstrong, L. Wang, J.A. Trapani, K.J. Tomaselli, G. Litwack, E.S. Alnemri, The Ced-3/ interleukin 1b converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2a are substrates for the apoptotic mediator CPP32, J. Biol. Chem. 271 (1996) 27099±27106.
202. M.H. Cardone, N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, J.C. Reed, Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, Science 282 (1998) 1318±1321.
203. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem 2000;69:217-45.
204. N.A. Thornberry, Y. Lazebnik, Caspases: enemies within, Science 281 (1998) 1312±1316
205. Al-Latayfeh M, Silva PS, Sun JK, Aiello LP. Antiangiogenic therapy for ischemic retinopathies. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2:a006411.
206. Kimoto K, Kubota T. Anti-VEGF agents for ocular angiogenesis and vascular permeability. J Ophthalmol. 2012;2012:852183.

207. Park SC, Su D, Tello C. Anti-VEGF therapy for the treatment of glaucoma: a focus on ranibizumab and bevacizumab. Expert Opin Biol Ther. 2012;12:1641–1647.
208. Popescu V, Pricopie S, Totir M, et al. Clinical use of Bevacizumab in treating refractory glaucoma. J Med Life. 2015;8:8–12.
209. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. J Biochem. 2013;153:13–19.
210. Horsley MB, Kahook MY. Anti-VEGF therapy for glaucoma. Curr Opin Ophthalmol. 2010;21:112–117.
211.http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf-14.12.2015
212. Klein A, Loewenstein A. Therapeutic monoclonal antibodies and fragments: Bevacizumab. Dev Ophthalmol. 2016;55:232–245.
213. Tanne JH. FDA cancels approval for bevacizumab in advanced breast cancer. BMJ, 343:76-84, 2011.
214. Alavi SE, Esfahani MKM, Alavi F, Movahedi F, Akbarzadeh A. Drug Delivery of Hydroxyurea to Breast Cancer Using Liposomes. Ind J Clin Biochem. 2013, 28(3):299–302.
215. Hehlmann, R. 2003. ‘’Current CML therapy: progress and dilemma’’, Leukemia, 17, 1010-1012.
216. Shewach, D.S., Lawrence, T.S. 2007. ‘’Antimetabolite radiosensitizers’’, J Clin Oncol, 25, 4043-4050.
217. Kovacic, P. 2011. ‘’Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications’’, Med Hypotheses, 76(1), 24-31.
218. Naik KM, Kolli DB, Nandibewoor ST. Elucidation of binding mechanism of hydroxyurea on serum albumins by different spectroscopic studies. SpringerPlus 2014, 3:360.
219. Kinsella TJ. Radiosensitization and cell kinetics: clinical implications for S-phase-specific radiosensitizers. Semin Oncol 1992;19(Suppl 9):41-47.

220. Charache S, Terrln ML, Moore RD, Dover GJ,Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. N EnglJ Med 1995;332:1317-1322.
221. Boyd AS, Neldner KH. Hydroxyurea therapy. J Am Acad Dermatol 1991;25:518-524.
222. Klem EB. Effects of anti psoriasis drugs and metabolic inhibitors on the growth of epidermal cells in culture. J Invest Dermatol 1978; 70;27-32 11.
223. Francis AA, Blevins RD, Carrier WL, Smith DP,Regan JD. Inhibition of DNA repair in ultraviolet-irradiated human cells by hydroxyurea. Biochim Biophys Acta 1979;563:385-392.
224. Reichard, P., Ehrenberg A. 1983. ‘’Ribonucleotide reductase a radical enzyme’’, Science 221, 514-519.
225. Xue, L., Zhou B., Liu, X., Qiu, W., Jin, Z., Yen, Y. 2003. ‘’Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits’’, Cancer Res, 63, 980-986.
226. Trelinski, J. 2010. ‘’Plasma levels of angiogenic factors and circulating endothelial cells in essential thrombocythemia: correlation with cytoreductive therapy and JAK2-V617F mutational status’’, Leuk. Lymphoma, 51, 1727–1733.
227. Novelli, E.M. 2012. ‘’Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates’’, Am. J. Hematol., 87, 326–330.
228. Lopes, F.C.M. 2012. ‘’Proangiogenic effects of plasma from sickle cell disease patients and antiangiogenic effects of hydroxyurea: evaluation of invasion and proliferation of human endothelial cells and effects of hydroxyurea in amouse Matrigel plug neovascularization assay’’, Blood, 120.
229. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. Cancer Lett. 2008;267:133–64. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.025.
230. Pandya U, Saini MK, Jin GF, Awasthi S, Godley BF, Awasthi YC. Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. Toxicol Lett 2000; 115(3):195-204

231. Yan, G., Graham, K., Lanza-Jacoby, S. 2013. “Curcumin enhances the anticancer efefcts of trichostatin a in breast cancer cells”, Molecular Carcinogenesis, 52, 5, 404–411.
232. Aggarwal BB, Sethi G, Baladandayuthapani V, Krishnan S, Shishodia S. Targeting cell signaling pathways for drug discovery: an old lock needs a new key. J Cell Biochem. 2007;102:580–92. doi: 10.1002/jcb.21500.
233. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer 2005; 41 (13): 1955-1968.
234. Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C. 2003. ‘’Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies’’, Anticancer Res, 23, 363–398.
235. Shishodia, S., Sethi, G., Aggarwal, B.B. 2005. ‘’Curcumin: getting back to the roots’’, Ann. N.Y. Acad. Sci, 1056, 206–217.
236. Du, B., Jiang, L., Xia, Q., Zhong, L. 2006. ‘’Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line ht-29’’, Chemotherapy, 52, 23–28.
237. Mukhopadhyay, A., Banerjee, S., Stafford, L.J., Xia, C., Liu, M., Aggarwal, B.B. 2002. ‘’Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with downregulation of cyclin d1 expression and cdk4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation’’, Oncogene, 21, 8852–8861.
238. Mohan, R., Sivak, J., Ashton, P., Russo, L.A., Pham, B.Q., Kasahara, N., Raizman, M.B., Fini, M.E. 2000. ‘’Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase’’, B. J Biol Chem., 275(14), 10405-12.
239. Dorai, T., Cao, Y.C., Dorai, B., Buttyan, R., Katz, A.E. 2001. ‘’Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo’’, Prostate, 47(4), 293-303.
240. Shim, J.S., Kim, J.H., Cho, H.Y., Yum, Y.N., Kim, S.H., Park, H.J., Shim, B.S., Choi, S.H., Kwon, H.J. 2003. ‘’ Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin’’, Chem Biol, 10(8), 695-704.

241. Chakraborty, G.., Jain, S, Kale, S., Raja, R., Kumar, S., Mishra, R., Kundu, GC. 2008. ‘’Curcumin suppresses breast tumor angiogenesis by abrogating osteopontin-induced VEGF expression’’, Mol Med Rep, 1(5), 641-6.

242. Das, T., Sa, G., Saha, B., Das, K. 2010. ‘’Multifocal signal modulation therapy of cancer: ancient weapon, modern targets’’, Mol Cell Biochem, 336, 85-95.

243. Liang, Y., Huang, M., Lı, J., Sun, X., Jıang, X., Lı, L., Ke, Y. 2014. ‘’Curcumin inhibits vasculogenic mimicry through the downregulation of erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma-A2, phosphoinositide 3-kinase and matrix metalloproteinase-2’’, Oncology Letters, 8, 1849-1855.

244. Bimonte, S., Barbieri, A., Palma, G., Rea, D., Luciano, A., D'Aiuto, M., Arra, C., Izzo, F. 2015. ‘’Dissecting the Role of Curcumin in Tumour Growth and Angiogenesis in Mouse Model of Human Breast Cancer’’, Biomed Res Int, 2015, 878134.

245. Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11 (6): 535-540.

246. K.N.J.L. Arbiser, R. Rohan, R. van Leeuwen, M.T. Huang, C. Fisher, E. Flynn, B. HR, Curcumin is an in vivo inhibitör of angiogenesis, Mol. Med. 4 (6) (1998) 376–383.

247. B.M.A.E. Gururaj, D.A. Venkatesh, D. Marme´, B.P. Salimath, Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 297 (4) (2002) 934–942.

248. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Banerjee S, Newman RA, Bueso-Ramos CE et al. Curcumin suppresses the paclitaxel-ınduced NF-κB pathway in breast cancer cells and ınhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. Clin Cancer Res 2005; 11 (20): 7490-7498.

249. Chou, TC; Talalay, P (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors". Adv. Enzyme Regul. 22: 27–55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4. PMID 6382953.

250. Chou TC, Hayball MP. CalcuSyn for Windows: multiple-drug dose-effect analyzer and manual. Cambridge (UK): Biosoft; 1997.
251. Chou TC, Martin N. CompuSyn for drug combinations: PC Software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. Paramus (NJ): ComboSyn; 2005, (Web link: http://www.combosyn.com/ for video demonstration).
252. M. Perez, Olmeda, J. Garcia, Perez, E. Mateos et al. Invitro analysis of synergism and antagonism of different nucleoside/nucleotide analogue combinations on the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication. Journal of Medical Virology 2009; 81:211-216.
253. Hay, M. E. 1996. Defensive synergisms? Reply to Pennings. Ecology77: 1950–1953.
254. Hay, M. E., Q. E. Kappel, and W. Fenıcal. 1994. Synergisms in plant defense against herbivores: Interactions of chemistry, calcifi- cation, and plant quality. Ecology 75: 1714–1727
255. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev 2006;68:621–81, (Free web link: http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/reprint/58/3/621).
256. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res. 2010, 12: R68-10.1186/bcr2635.
257. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW: A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell. 2006, 10: 515-527. 10.1016/j.ccr.2006.10.008.
258. Kwiatkowska E, Wojtala M, Gajewska A, Soszyński M, BartoszIzabela G, Sadowska-Bartosz I. Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in

non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2016, Volume 48, Issue 1, pp 23–32.
259. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr., Brenz R, McGrath CM, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. Cancer Res. 1990;50(18):6075–86. pmid:1975513.
260. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell. 2006;10(6):515–27. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008 pmid:17157791; PubMed Central PMCID: PMC2730521.
261. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehnes FL, Feur T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVires S, Lopuk D, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazder A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer cell. 2006. 10, 515–527.
262 https://www.atcc.org/Products/All/CRL-10317.aspx
263.https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB
22.aspx?geo_country=tr
264. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=tr
265. Siwak, D.R., Shishodia, S., Aggarwal, B.B., Kurzrock, R. 2005. ‘’Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in Melanoma cells are associated with suppression of IκB Kinase and Nuclear Factor κB activity anda re ındependent of the B-Raf/Mitogen-Activated/Ekstracellular Signal-Regulated Protein Kinase Pathway and Akt Pathway’’, Cancer, 104(4), 879-90.
266. Cortez, D.2003. ‘’Caffeine inhibits checkpoint Responses without inhibiting the Ataxia- Telangiectasia- mutated (ATM) and ATM- and .Rad-3-related (ATR) Protein kinases’’, Journal of Biological Chemistry, 278(39), 37139-45.

267. Patel PB, Thakkar VR, Patel JS. "Cellular effect of curcumin and citral combination on breast cancer cells: Induction of apoptosis and cell cycle arrest". J Breast Cancer 2015, 18(3):225-234.

268. Guan F, Ding Y, Zhang Y, Zhou Y, Li M, Wang C. 2016. "Curcumin Suppresses Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Autophagy-Dependent Akt Degradation", PLoS ONE 11(1): e0146553.

269. Guatam SC, Xu YX, Pindolia KR, Janakiraman N and Chapman RA: Nonselective inhibition of proliferation of transformed and transformed cells by anticancer agent curcumin (diferuloylmethane). Biochem Pharmacol 55: 1333-1337, 1998

270. Hein M, Graver S. Tumor cell response to bevacizumab single agent therapy in vitro. Cancer cell Int. 2013;13:94.

271. Lucio-Eterovic, A.K., Piao, Y., de Groot, J.F. 2009. ‘’Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy’’, Clin Cancer Res, 15(14), 4589-99.

272. Roland CL, Dineen SP, Lynn KD, Sullivan LA, Dellinger MT, Sadegh L, Sullivan JP, Shames DS, Brekken RA. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. Mol Cancer Ther. 2009 Jul;8(7):1761-71.

273. Olmos G, Prieto A, Herráez A, Tejedor MC, Alvarez-Mon M, Diez JC. Quantitation of apoptosis induction by etoposide or hydroxyurea in mouse interleukin 3-dependent lymphoma cells. In Vivo. 2005 Mar-Apr;19(2):455-64.

274. Montano R, Chung I, Garner KM, Parry D, Eastman A. Preclinical development of the novel Chk1 inhibitor SCH900776 in combination with DNA-damaging agents and antimetabolites. Mol Cancer Ther. 2012;11:427–38. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0406.

275. Sun, C., Fukui, H., Hara, K., Zhang, X., Kitayama, Y., Eda, H., Tomita, T., Oshima, T., Kikuchi, S., Watari, J., Sasako, M., Miwa, H. 2015. ‘’FGF9 from cancer-associated fibroblasts is a possible mediator of invasion and anti-apoptosis of gastric cancer cells’’, BMC Cancer, 15(1), 333.

276. Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L. 2007. ‘’In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro’’, Nat Protoc, 2(2), 329-33.
277. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 2002; 30(9): e36
278.Miller, K.D., Dul, C.L. 2004. ‘’Breast cancer: the role of angiogenesis and antiangiogenic therapy’’, Hematol Oncol Clin North Am, 18, 1071–1086.
279. Boudreau, N., Myers, C. 2003. ‘’Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment’’, Breast Cancer Res, 5, 140–146.
280. Conforti, F., Menichini, F. 2011. ‘’Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors’’, Curr Med Chem, 18, 1137-1145.
281. Yoysungnoen, B., Bhattarakosol, P., Patumraj, S., Changtam, C. 2015. ‘’Effects of tetrahydrocurcumin on hypoxia-inducible factor-1α and vascular endothelial growth factor expression in cervical cancer cell-induced angiogenesis in nude mice’’, Biomed Res Int., 2015, 391748.
282. Bauerle T, Hilbig H, Bartling S, Kiessling F, Kersten A, Schmitt-Graff A, Kauczor HU, Delorme S, Berger MR. "Bevacizumab inhibits breast cancer-induced osteolysis, soft tissue metastasis and angiogenesis in rats as visualized by VCT and MRI. Neoplasia. 2008; 10(5):511-520.
283. Boucher PD, Ostruszla LJ, Murphy PJM, Shewach DS. "Hydroxyurea significantly anhances tumor growth delay in vivo with herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovır gene therapy". Gene Therapy. 2002,9,1023-1030.
284: Figg WD, Walls RG, Cooper MR, Thibault A, Sartor O, McCall NA, Myers CE, Samid D. "In vitro antitumor effect of hydroxyurea on hormone refractory prostate cancer cells and its potentiation by phenylbutyrate". Anticancer Drugs. 1994; 5(3):336-42.
285. Lee, P.S., Fang, J., Jessop, L., Myers, T., Raj, P., Hu, N., Wang, C., Taylor, P.R., Wang, J., Khan, J., Jasin, M., Chanock, S.J. 2014. ‘’RAD51B activity and cell cycle regulation in response to DNA damage in breast cancer cell lines’’, Breast Cancer (Auckl), 8, 135-144.

286. Jain, P., Das, V.N., Ranjan, A., Chaudhary, R., Pandey, K. 2013. ‘’Comparative study fort he efficacy, safety and quality of life in patients of chronic myeloid leukemia treated with Imatinib or Hydroxyurea’’, J Res Pharm Pract, 2(4), 156-61.

287. Saban, N., Stepanic, V., Vucinic, S., Horvatic, A., Cindric, M., Perkovic, I., Zorc, B., Orsolic, N., Mintas, M., Pavelic, K., Pavelic, S. 2013. ‘’ Antitumor Mechanisms of Amino Acid Hydroxyurea Derivatives in the Metastatic Colon Cancer Model’’, Int. J. Mol. Sci, 14, 23654-2367.

288. Medinger, M. 2009. ‘’Angiogenesis and vascular endothelial growth factor /receptor expression in myeloproliferative neoplasms: correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status’’, Br. J. Haematol, 146, 150–157.

289. Lopes, F., Ferreira, R., Albuquerque, D., Silveira, A., Costa, R., Soares, R., Costa, F., Conran, N. 2014. ‘’In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea’’, Microvascular Research 94, 106–113.

290. Lopes, F.C., Traina, F., Almeida, C.B., Leonardo, F.C., Franco- Penteado, C.F., Garrido, V.T., Colella, M.P., Soaeres. R., Olalla- Saad, S.T., Costa, F.F., Conran, N. 2015. ‘’Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea’’, Haematoligica, 100(6), 730-9.

291. http://graphpad.com/support/faqid/1356/

292. Gao JZ, Du JL, Wang YL, Li J, Wei LX, Guo MZ. "Synergistic effects of curcumin and bevacizumab on cell signaling pathways in hepatocellular carcinoma". Oncology Letters 9:295-299, 2015.

293. Yue GG, Kwok HF, Lee JK, Jiang L, Wong EC, Gao S, Wong HL, Li L, Chan KM, Leung PC, Fung KP, Zuo Z, Lau CB. " Combined therapy using bevacizumab and turmeric ethanolic extract (with absorbable curcumin) exhibited beneficial efficiancy in colon cancer mice". Pharmacol Res. 2016; 111:43-57.

294. Marty M, Pivot X. 2008. "The potential of anti-vascular endothelial growth factor therapy in metastatic breast cancer: clinical experience with anti-angiogenic agents, focusing on bevacizumab", Eur J Cancer. 44(7). 912-20.

295. Kern FG, McLeskey SW, Zhang L, Kurebayashi J, Liu Y, Ding IY, Kharbanda S, Chen D, Miller D, Cullen K, et al. 1994. "Transfected MCF-7 cells as a model for breast-cancer progression", Breast Cancer Res Treat. 31(2-3). 153-65.
296. Roland CL, Dineen SP, Lynn KD, Sullivan LA, Dellinger MT, Sadegh L, Sullivan JP, Shames DS, Brekken RA. 2009. "Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts", Mol Cancer Ther. 8(7). 1761-71.
297. Scarpa ES, Ninfali P. 2015. "Phytochemicals as Innovative Therapeutic Tools against Cancer Stem Cells", Int J Mol Sci. 16(7). 15727-42
298. Zheng J, Zhou Y, Li Y, Xu DP, Li S, Li HB. 2016. "Spices for Prevention and Treatment of Cancers", Nutrients. 8(8). pii: E495. doi: 10.3390/nu8080495
299. Ferreira LC, Arbab AS, Jardim-Perassi BV, Borin TF, Varma NR, Iskander AS, Shankar A, Ali MM, Zuccari DA. 2015. "Effect of Curcumin on Pro-angiogenic Factors in the Xenograft Model of Breast Cancer", Anticancer Agents Med Chem. 15(10). 1285-96.
300. Khaliullina H, Love NK, Harris WA. 2016. "Nutrient-Deprived Retinal Progenitors Proliferate in Response to Hypoxia: Interaction of the HIF-1 and mTOR Pathway", J Dev Biol. 4. 17.
301. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouysségur J, Brahimi-Horn. 2007. " MC.SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity", Biochem Biophys Res Commun. 360. 646-52.
302. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. 2007. "SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia", Cell. 131. 584-95.
303. Choi H, Chun YS, Kim SW, Kim MS, Park JW (2006) Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. Mol Pharmacol 70:1664–1671.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onay

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.
Sayı: 161

02.03.2015

Sayın Yard.Doç.Dr.Yasemin SOYSAL,

Kurulumuz tarafından 26.02.2015 tarih ve 1968-GOA protokol numaralı 2015/06-18 karar numarası ile görüşülen **"Curcumin ve Hidroksiürea'nın Gen Düzenleyici ve Antianjiyogenik Etkilerinin Meme Kanseri Hücre Hattında Araştırılması"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2015/06-18**	**Tarih: 26.02.2015**
	Yard.Doç.Dr.Yasemin SOYSAL'ın sorumlusu olduğu **"Curcumin ve Hidroksiürea'nın Gen Düzenleyici ve Antianjiyogenik Etkilerinin Meme Kanseri Hücre Hattında Araştırılması"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ahmet Turan IŞIK	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.2. ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

Güler GÜL

TC Kimlik No / Pasaport No:	24737138522
Doğum Yılı:	02/07/1991
Yazışma Adresi :	Eğitim mah. Ekrem Güer sok. NO:52 Funda Apt. D:5 Balçova-İzmir
Telefon :	053369480172
Faks :	
e-posta :	guler_gul56@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bil. Enstitüsü	Moleküler Tıp	3,47	2017
Türkiye	Atatürk Üniveristesi	Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	3,28	2013

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Moleküler Tıp	Bursiyer	2016-2017
IRB-Barcelona	İspanya	Barselona	Oncoloji	Ziyaretçi Araştırmacı	Temmuz-Eylül 2014
Ankara Üniversitesi	Türkiye	Ankara	Adli Tıp	Stajyer	Ağustos-Ekim 2012
Yüksek İhtisas Hastanesi	Türkiye	Ankara	Hematoloji, Biyokimya	Stajyer	Ağustos-Ekim 2010

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler onkoloji, hücre kültürü, metastaz, anjiyogenez, temel moleküler biyolojik yöntemler

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam**

			Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
