



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**3T3 EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİNDE ARSENİK İLE  
OLUŞTURULMUŞ NEOPLASTİK HÜCRE DEĞİŞİMİNE  
KURKUMİNİN ETKİLERİ**

**Büşra DEMİRCİOĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Zooloji Programı**

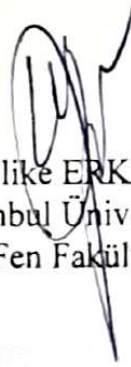
**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Melike ERKAN**

**Aralık, 2018**


**İSTANBUL**

Bu çalışma, 24.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**



Prof. Dr. Melike ERKAN(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Gül ÖZHAN  
İstanbul Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Cenk SESAL  
Marmara Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25129 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde arsenik ile oluşturulmuş neoplastik değişim üzerine kurkuminin sitotoksik ve genotoksik etkilerini açığa çıkarmak amacıyla yapılmıştır.

Lisansüstü öğrenimim boyunca emeği geçen, çalışmamın her aşamasında değerli fikirleri, bilgileri ve deneyimleri ile bana destek olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Melike ERKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilgileri ve deneyimleri ile yanımda olan, tavsiyelerinden yararlandığım sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Yasemin AYDIN'a ve Araş. Gör. Dr. Banu ORTA YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmam boyunca hem bilgileri hem de manevi destekleri ile yanımda olan sevgili çalışma arkadaşlarım Uzman Biyolog Nebahat YILDIZBAYRAK'a ve Mehmet Can PERKER'e çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan değerli annem ve babama, kardeşlerim Samet DEMİRCİOĞLU ve Tuğba DEMİRCİOĞLU'na, her zaman varlığıyla güç veren ve yanımda olan sevgili Tugay ŞİT'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2018

Büşra DEMİRCİOĞLU

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ .....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	x
ÖZET .....	xi
SUMMARY .....	xiii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>5</b>
2.1. FİBROBLAST HÜCRESİ .....	5
2.2. NEOPLASTİK HÜCRE DEĞİŞİMİ .....	9
2.3. ARSENİK .....	13
2.3.1. Arseniğin Etki Mekanizması .....	15
2.4. KURKUMİN .....	18
2.5. GENOTOKSİSİTE .....	22
2.5.1. Komet Testi .....	24
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1 KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ .....	26
3.2 HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ .....	26
3.3. ARSENİK VE TPA KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI .....	27
3.4. HÜCRE TRANSFORMASYON DENEYİ .....	27
3.4.1. Morfolojik Transformasyon Deneyi .....	28
3.4.1.1. Hücrelerin Fiksasyonu ve Giemsa Boyaması .....	30
3.5. KURKUMİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI .....	30
3.6. SİTOTOKSİSİTE .....	31
3.6.1. MTT Hücre Canlılığı Testi .....	31
3.6.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi.....	31
3.7. GENOTOKSİSİTE .....	33
3.7.1. Komet Testi .....	33
3.7.1.1. Kullanılan Hücreler .....	33

3.7.1.2. Slayt Hazırlanması .....	33
3.8. İSTATİSTİK ANALİZ .....	34
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>35</b>
4.1. HÜCRE TRANSFORMASYON DENEYİ BULGULARI .....	35
4.2. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI .....	42
4.2.1. MTT Hücre Canlılığı Testi Bulguları .....	42
4.2.2. Laktat Dehidrogenaz Enzimi Aktivitesi Bulguları .....	43
4.3. GENOTOKSİSİTE BULGULARI .....	44
4.3.1. Komet Testi Bulguları .....	44
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>69</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Şekil 2.1.1:</b> Çeşitli dokulardan izole edilen mezenşimal kök hücrelerin farklı hücrelere dönüşebilme potansiyeli (Horwitz ve diğ., 2005). .....	5
<b>Şekil 2.1.2:</b> Bağ dokuda bulunan hücreler ve fibroblast hücrelerinin diğ er bağ doku hücrelerine dönüşebilme potansiyeli (Alberts ve diğ. 2002). .....	7
<b>Şekil 2.1.3:</b> Balb/c 3T3 Embriyonik Fibroblast Hücreleri Faz-Kontrast Mikroskobu Görüntüsü (x10).....	8
<b>Şekil 2.2.1:</b> Çok adımlı karsinogenez süreci. 1) Kanserojen maddeye maruziyeti sonucunda DNA'da meydana gelen hasar. 2) Hücrelerin birden fazla kanserojen maddeye maruz kalması sonucunda DNA'da doğrudan bir hasar meydana gelmesi. 3) Malign tümör oluşumu. (Weinstein ve diğ., 1984). .....	10
<b>Şekil 2.3.1.1:</b> Arseniğ in kanserojen etki mekanizması (Sing ve diğ., 2011). .....	17
<b>Şekil 2.4.1:</b> Kurkumin, demetoksikurkumin ve bis-demetoksikurkumin kurkuminoidlerinin kimyasal yapısı (Wilken ve diğ., 2011). .....	19
<b>Şekil 2.4.2:</b> Kurkuminin terapötik aktiviteleri ve temel moleküler hedefleri. Kurkumin NF- $\kappa$ B (Nuklear faktör kappa-b), AP-1 (aktive protein-1), $\beta$ -katenin ve PPAR $\gamma$ (peroksizom proliferatör-ilişkili reseptör gama) gibi çeşitli transkripsyon faktörlerini, TGF- $\beta$ 1 (tümör büyüme faktörü- $\beta$ 1), VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), PDGF (trombosit-türevli büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü) ve reseptörü olan EGFR gibi büyüme faktörlerini, IL (interlökin), TNF- $\alpha$ (tümör nekrosis - $\alpha$ ) gibi sitokinleri düzenlemektedir (Rohanizadeh ve diğ., 2016). .....	20
<b>Şekil 2.5.1:</b> Genotoksisite mekanizması (Khambete ve Kumar, 2014). .....	23
<b>Şekil 2.5.1.1:</b> Komet testinde yer alan adımlar (Gunasekarana ve diğ., 2015). .....	25
<b>Şekil 3.4.1:</b> Morfolojik transformasyon deneyinde yer alan deney grubu ve kontrol grubu. ....	29
<b>Şekil 4.1.1:</b> Hücre transformasyon deneyi dördüncü gün. ....	36
<b>Şekil 4.1.2:</b> Hücre transformasyon deneyi on birinci gün .....	36
<b>Şekil 4.1.3:</b> Hücre transformasyon deneyi yirmi birinci gün. ....	37
<b>Şekil 4.1.4:</b> Hücre transformasyon deneyi otuz ikinci gün. ....	37
<b>Şekil 4.1.5:</b> Hücre transformasyon deneyi birinci gün. ....	38

<b>Şekil 4.1.6:</b> Hücre transformasyon deneyi otuz ikinci gün. ....	38
<b>Şekil 4.1.7:</b> Deney grubu giemsa boyaması (x50). ....	39
<b>Şekil 4.1.8:</b> Deney grubu giemsa boyaması (x32) .....	40
<b>Şekil 4.1.9:</b> Kontrol grubu giemsa boyaması (x32) .....	41
<b>Şekil 4.2.1.1:</b> Kurkuminin neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri. ....	42
<b>Şekil 4.2.2.1:</b> Kurkuminin neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesine (konsantrasyona ve zamana bağlı) etkileri (p<0,001). ....	43
<b>Şekil 4.3.1.1:</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu hücrelerinin komet görüntüsü. ....	45
<b>Şekil 4.3.1.2:</b> Kontrol grubu hücrelerinde komet görüntüsü. ....	46
<b>Şekil 4.3.1.3:</b> Kurkumin grubu komet görüntüsü. ....	47

## TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Tablo 2.2.1:</b> Neoplastik değişim geçiren hücrelerin genel özellikleri (Nicolson ve diğ., 1977). .....	12
<b>Tablo 2.3.1:</b> Çevrede yaygın olarak bulunan organik ve inorganik arsenik bileşikleri. ....	14
<b>Tablo 3.7.1.1:</b> Komet testi deney grupları. ....	33
<b>Tablo 4.3.1.1:</b> Komet testi deney gruplarında kuyruk %DNA miktarı, kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momenti karşılaştırılması. ....	44

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

### **Simgeler**                      **Açıklama**

**As**                                : Arsenik

### **Kısaltmalar**                      **Açıklama**

**AP-1**                            : Aktive protein-1

**COX-2**                        : Siklooksijenaz-2

**DMA**                            : Dimetilarsinik asit

**DMSO**                        : Dimetilsülfoksit

**EGF**                            : Epidermal büyüme faktörü

**EGFR**                        : Epidermal büyüme faktörü reseptörü

**IL-1**                            : İnterlökin-1

**IL-6**                            : İnterlökin-6

**LDH**                            : Laktat dehidrogenaz

**MMA**                            : Monometilarsinik asit

**MMP-9**                        : Matriks metallopeptidaz

**MTT**                            : 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromit

**NF-KB**                        : Nükleer Faktör kappa-B

**PDGF**                        : Trombosit-türevli büyüme faktörü

**PPAR $\gamma$**                         : Peroksizom proliferatör-ilişkili reseptör gama

**TGF- $\beta$ 1**                        : Tümör büyüme faktörü- $\beta$ 1

**TNF- $\alpha$**                         : Tümör nekrosis faktör alfa

**TPA**                            : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

**VEGF**                        : Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

## ÖZET

# 3T3 EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİNDE ARSENİK İLE OLUŞTURULMUŞ NEOPLASTİK HÜCRE DEĞİŞİMİNE KURKUMİNİN ETKİLERİ

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra DEMİRCİOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışmada, *Curcuma longa* bitkisinin etken maddesi olan kurkuminin neoplastik değişime uğramış hücreler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Fare embriyonik fibroblast hücresi olan Balb/c 3T3 hücrelerinde, arsenik maruziyeti sonucunda neoplastik hücre değişimi uyarılmıştır. Otuz iki gün süren hücre transformasyon deneyi sonrasında, neoplastik değişim geçiren hücreler kurkumin ile tedavi edilerek, hücre canlılığı, laktat dehidrogenaz enzimi aktivitesi ve DNA hasarı *in vitro* olarak gösterilmiştir.

Arsenik büyük ölçüde çevreye yayılan ve yer kabuğunda metalloïd olarak biriken toksik bir elementtir. Arsenik ve türevleri içme suyunda, besinlerde, toprak ve hava partiküllerinde bulunmaktadır. Özellikle içme suyu arsenik maruziyetinin en yaygın kaynağıdır. Arsenik Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı tarafından grup I insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır. Arseniğe maruziyet; akciğer, kan, cilt kanseri ve çeşitli cilt lezyonları ile ilişkilidir. Kanseri dünya çapında birçok insanın başlıca ölüm nedenlerinden biridir ve yeni vakaların sayısının önümüzdeki yirmi yıl içinde yaklaşık %70 oranında artması beklenmektedir. Kurkumin başta *Curcuma longa* (zerdeçal) 'nın rizomundan elde edilen polifenolik bir bileşiktir. Kurkumin, başlıca kurkuminoiddir ve bu doğal polifenolik bitki

pigmentinin antioksidan, antibakteriyel, anti-inflamatuar, analjezik ve yara iyileştirici özellikler gibi birçok fonksiyon sergilediği gösterilmiştir.

Hücre transformasyon deneyinin ilk aşamasında, Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri 10 µM arseniğe üç gün boyunca maruz bırakılmıştır. Otuz iki gün süren deneyin ikinci aşamasında ise hücreler, yedinci, on birinci, on dördüncü ve on yedinci günlerde 0,1 µM TPA'ya maruz bırakılmıştır. Deney sonunda transformasyona uğrayan hücreler kurkuminin altı farklı konsantrasyonuyla tedavi edilerek hücre canlılığı ve laktat dehidrogenaz enzimi aktivitesi belirlenmiştir. Hücre canlılığını %50 oranında azaltan konsantrasyon, komet testinde uygulanacak olan kurkumin konsantrasyonu olarak seçilmiştir. Bulgular kurkuminin neoplastik değişime uğramış hücrelerde hücre canlılığını azalttığını ve laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesini arttırarak sitotoksik bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Komet testinin sonucu ile kurkuminin bu hücrelerde DNA hasarına neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Aralık 2018, 83 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Arsenik, neoplastik hücre değişimi, kanser, kurkumin, genotoksisite

## **SUMMARY**

### **THE EFFECTS OF CURCUMIN ON ARSENIC INDUCED NEOPLASTIC CELL TRANSFORMATION IN 3T3 EMBRYONIC FIBROBLAST CELLS**

#### **M.Sc. THESIS**

**Büşra DEMİRCİOĞLU**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Biology**

**Supervisor : Prof. Dr. Melike ERKAN**

In this study, the cytotoxic and genotoxic effects of curcumin, the active ingredient of *Curcuma longa* plant, on neoplastic modified cells were investigated. In Balb/c 3T3 cells, which are mouse embryonic fibroblast cells, neoplastic cell change was induced by arsenic exposure. After 32 days of cell transformation experiment, cells undergoing neoplastic change were treated with curcumin, cell viability, lactic dehydrogenase activity and DNA damage were demonstrated *in vitro*.

Arsenic is a toxic element that spreads largely to the environment and accumulates as a metalloid in the earth's crust. Arsenic and its derivatives are found in drinking water, nutrients, soil and air particles. Especially drinking water is the most common source of arsenic exposure. Arsenic is classified by the International Agency for Research on Cancer as group I human carcinogen. Exposure to arsenic; It is associated with lung, blood, skin cancer and various skin lesions. Cancer is one of the major causes of death of many people worldwide, and the number of new cases is expected to increase by about 70% over the next twenty years.

Curcumin is a polyphenolic compound derived from the rhizome of *Curcuma longa* (turmeric). Curcumin is the main curcuminoid and has been shown to exhibit many functions such as antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, analgesic and wound healing properties.

In the first stage of the cell transformation assay, Balb/c 3T3 embryonic fibroblast cells were exposed to 10 TM arsenic for three days. In the second phase of the experiment, which lasted thirty-two days, the cells were exposed to 0.1  $\mu$ M TPA on the seventh, eleventh, fourteenth and seventeenth days. At the end of the experiment transformed cells were treated with six different doses of curcumin and cell viability and lactate dehydrogenase enzyme activity were determined. The dose which reduces the cell viability by 50% was chosen as the curcumin dose to be applied in the comet test. The results showed that curcumin decreases cell viability in neoplastic transformed cells and increases the activity of lactate dehydrogenase and shows a cytotoxic effect. As a result of the comet test, it was concluded that curcumin caused DNA damage in these cells.

December 2018, 83 pages.

**Keywords:** Arsenic, neoplastic cell transformation, cancer, curcumin, genotoxicity

## 1. GİRİŞ

Dünyada ağır metaller çok yaygın bir şekilde bulunmaktadır ve ekosistemi olumsuz yönde etkileyen zararlı etkileri bulunmaktadır. Doğada var olan ağır metallere birisi de arseniktir. Arsenik büyük ölçüde çevreye yayılan ve yer kabuğunda metalloid olarak biriken toksik bir elementtir. Doğada aşırı dozda arseniğe maruz kalan canlılarda olumsuz etkiler görülmektedir ve geçmişte birçok toplum tarafından zehir olarak da kullanılmıştır (Yu ve diğ., 2006).

Arsenik ve türevleri içme suyunda, besinlerde, toprak ve hava partiküllerinde bulunmaktadır. Özellikle içme suyu arsenik maruziyetinin en yaygın kaynağıdır (WHO, 2001). Ayrıca pestisitler, ahşap koruyucular, cam, kağıt ve yarı iletkenler gibi ticari ve endüstriyel ürünlerde de arsenik bulunmaktadır (Guanwu, 2011). Arsenik toksisitesi, milyonlarca insanı etkileyen küresel bir sağlık problemidir. Dünyada yüz milyonun üzerinde insanın, arseniğin kanserojen dozuna maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Arsenik terapötik olarak lösemi tedavisinde kullanılsa da, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından grup I insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 2004). Arseniğe maruziyet; akciğer, kan, cilt kanseri ve çeşitli cilt lezyonları ile ilişkilidir (Chen ve diğ., 1992).

Arsenik metabolizasyonu ile oluşan reaktif oksijen türleri, hücre içinde oksidatif stres oluşturarak DNA hasarına ve apoptoza neden olmaktadır (Yamaguchi ve diğ., 2016). Ayrıca arsenik, genotoksik etki göstererek kromozomal anormalliklere yol açmaktadır (Liu ve diğ., 2011). Gen ifadesinde değişikliklere neden olmakta, hücre içi sinyal iletim yollarını olumsuz yönde etkilemektedir (Benbrahim-Talla ve Waalkes, 2008). Hücre büyümesi ve çoğalmasını etkilemekte ve DNA'da oluşan hasarın tamirinde görevli olan DNA tamir sistemlerinin çalışmasını inhibe etmektedir (Ding ve diğ., 2008). Yapılan çalışmalarda, insan bronşiyal epitelyal hücrelerinde ve sıçan karaciğer epitelyal hücrelerinde kronik olarak arseniğe maruziyet sonucunda, hücrelerin büyüme hızlarının arttığı ve morfolojilerinin bozulup malign hücre karakteri kazandığı gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 1997). Ayrıca Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri ile yapılan bir çalışmada, hücreler arseniğe maruz bırakılmış ve maruziyet sonucunda arseniğin neoplastik değişimi uyardığı görülmüştür. Tüm bu etkiler, arseniğin kanserojen etkisini açıkça ortaya koymaktadır (Hong-Gyum ve diğ., 2016).

Kanser dünya çapında birçok insanın başlıca ölüm nedenlerinden biridir ve yeni vakaların sayısının önümüzdeki 20 yıl içinde yaklaşık %70 oranında artması beklenmektedir. Çeşitli risk faktörlerinden kaçınılarak önlenilmekte olan kanser, aynı zamanda erken teşhis ve doğru bir tedavi ile iyileştirilebilmektedir (Poburski ve Thierbach, 2016). Geleneksel kemoterapide, kanser hücreleri için sitotoksik olan ilaçlar kullanılmaktadır. Fakat bu yaklaşımın dezavantajı, kemoterapötik ilaçların tümör hücrelerini öldürmesinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etki göstermesidir (Sporn ve Suh, 2000).

Kanser oluşum mekanizmasında birçok hücre içi sinyal iletim yolağı etkili olmasına rağmen, antikanser ilaçlar tek bir yolağı hedef almaktadır. Bununla birlikte doğada bulunan bitki türlerinden bazıları hücre içinde birden fazla yolağı etkileyebilecek doğal bir güce sahip olan etkin maddeler içermektedir ve bu maddelerin bir kısmı kanser olmayan hücrelerde toksik bir etki yaratmamaktadır (Sa ve Das, 2008). Yapılan çalışmalarda, beslenme ve yaşam tarzındaki farklılıklardan dolayı, kanser tiplerinin görülme oranının ülkeler arasında farklılık gösterdiğine dikkat çekilmektedir (Anand ve diğ., 2008). Örneğin zerdeçal baharatının sıkça tüketildiği Güneydoğu Asya'daki ülkelere diğer ülkelere oranla çoğu kanser türünün görülme sıklığının daha düşük olduğu bildirilmiştir (Ravindran ve diğ., 2009).

Kurkumin; diflorülmetan ( $C_{21}H_{20}O_6$ ) olarak bilinen ve başta Hindistan ve Çin olmak üzere Güneydoğu Asya'ya özgü çok yıllık bir bitki olan *Curcuma longa* (zerdeçal) 'nın rizomundan elde edilen polifenolik bir bileşiktir (Ammon ve Wahl, 1991).

Zerdeçaldan elde edilen sarı renkli toz, uzun yıllar boyunca tekstil endüstrisinde ve farklı baharat karışımlarının içinde şifa verici bir madde olarak kullanılmıştır. Zerdeçalın, %3-5'ini kurkuminoidler oluşturmaktadır (Duvoix ve diğ., 2005). Kurkuminoidler; kurkumin, demetoksikurkumin, bis-demetoksikurkumin ve siklik kurkumin gibi bir grup bileşiği içermektedir (Priyadarsini, 2014). Baharatın sarı renginden sorumlu olan kurkumin, başlıca kurkuminoiddir ve bu doğal polifenolik bitki pigmentinin antioksidan, antibakteriyel, anti-inflamatuar, analjezik ve yara iyileştirici özellikler gibi birçok fonksiyon sergilediği gösterilmiştir (Niederer ve Gopfert, 1999).

Kurkumin hücre zarına nüfuz eden lipofilik bir moleküldür. Hücre içinde, tümör nekrosis faktör alfabı (TNF- $\alpha$ ), interlökin (IL)-1, IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinleri, siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi proenflamatuvar enzimleri, Nükleer Faktör kappa-B (NF-KB) gibi

enflamatuvar sitokinleri baskılayabilmektedir. Ayrıca hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenleyen genlerin ifadesini değiştirebilmektedir (Ghosh ve diğ., 2015).

Kurkumin güçlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü özelliğe sahip olduğu için, karsinogenezin başlamasını önleyici etki gösterebilmektedir (Wilken ve diğ., 2011). Kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamakta, antiapoptotik proteinlerin ifadesini inhibe ederek apoptozu uyarmaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinin metastazını ve anjiogenezi engelleyerek antikanserojen özelliğini açıkça göstermektedir (Shehzad ve diğ., 2010). Yapılan çalışmalarda kurkuminin, göğüs, akciğer, kolon, böbrek, yumurtalık, lösemi, melanoma gibi birçok hayvan ve insan hücre hattında hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (Karunagaran, 2005). Ayrıca kurkuminin, çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör hücre tiplerini öldürürken normal hücrelerde toksik bir etki göstermemesi, ilaç geliştirme çalışmaları için kurkumini cazip bir kaynak yapmaktadır (Ravindran, 2009).

Tüm bu çalışmalar doğrultusunda, Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri arseniğin kanserojen konsantrasyonuna maruz bırakılacak ve hücrelerin neoplastik değişim geçirmesi ve bu değişim sonucunda karakterlerinin bozularak malign hücre karakteri kazanmaları gözlenecektir. Oluşan malign hücreler kurkuminin belirlenen konsantrasyonlarına maruz bırakılacak ve kurkuminin hücreler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini açığa çıkarabilmek için çalışılacaktır.

Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde fibroblast hücreleri, neoplastik hücre değişimi, arsenik, kurkumin ve genotoksisite ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde laboratuvarında uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümünde belirtilmiştir.

Tezin “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışma Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine arsenik ile oluşturulmuş neoplastik hücre değişimi üzerine kurkuminin etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri kronik olarak arseniğe maruz bırakılmış ve neoplastik değişim geçirmeleri sağlanmıştır. Neoplastik değişim geçiren

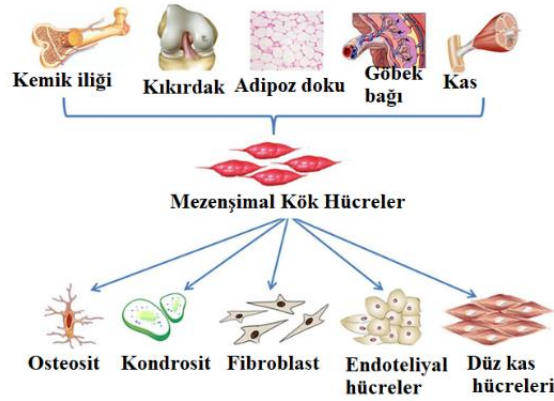
hücreler kurkuminin farklı konsantrasyonları ile tedavi edilerek hücre canlılığı, laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi ve DNA hasarı ölçülmüştür.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. FİBROBLAST HÜCRESİ

Yetişkin vücudunda birçok farklılaşmış hücre, karakteri ve kökenlendiği yere göre çeşitli ailelere ayrılmıştır. Bu ailelerden birisi de bağ doku hücreleri ailesidir. Bağ doku ailesi; fibroblastları, kıkırdak hücrelerini ve kemik hücrelerini içermektedir. Fakat bu dokuda yağ hücreleri ve düz kas hücreleri de bulunmaktadır. Bağ doku hücreleri, vücudun dinamik yapısının oluşmasından sorumludurlar ve hemen hemen her doku ve organının tamiri ve desteklenmesinde merkezi bir rol oynamaktadırlar (Sisson ve diğ., 2012)

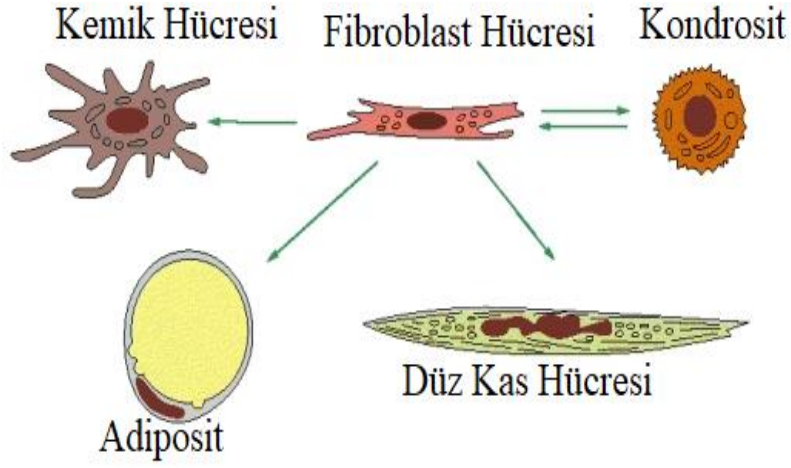
Mezenşimal kök hücreler göbek bağı, kemik iliği, kas ve adipoz doku gibi çeşitli dokulardan izole edilebilmektedir. Farklı dokulardan alınan hücrelerin hücre yüzey işaretleyicileri ve farklılaşma yetenekleri birbirinden farklılık göstermektedir. Mezenşimal kök hücreler osteosit, kondrosit ve fibroblastlar gibi farklı hücre soylarını oluşturabilmektedir (Dominici ve diğ., 2006) (Şekil 2.1.1.).



**Şekil 2.1.1:** Çeşitli dokulardan izole edilen mezenşimal kök hücrelerin farklı hücrelere dönüşebilme potansiyeli (Horwitz ve diğ., 2005).

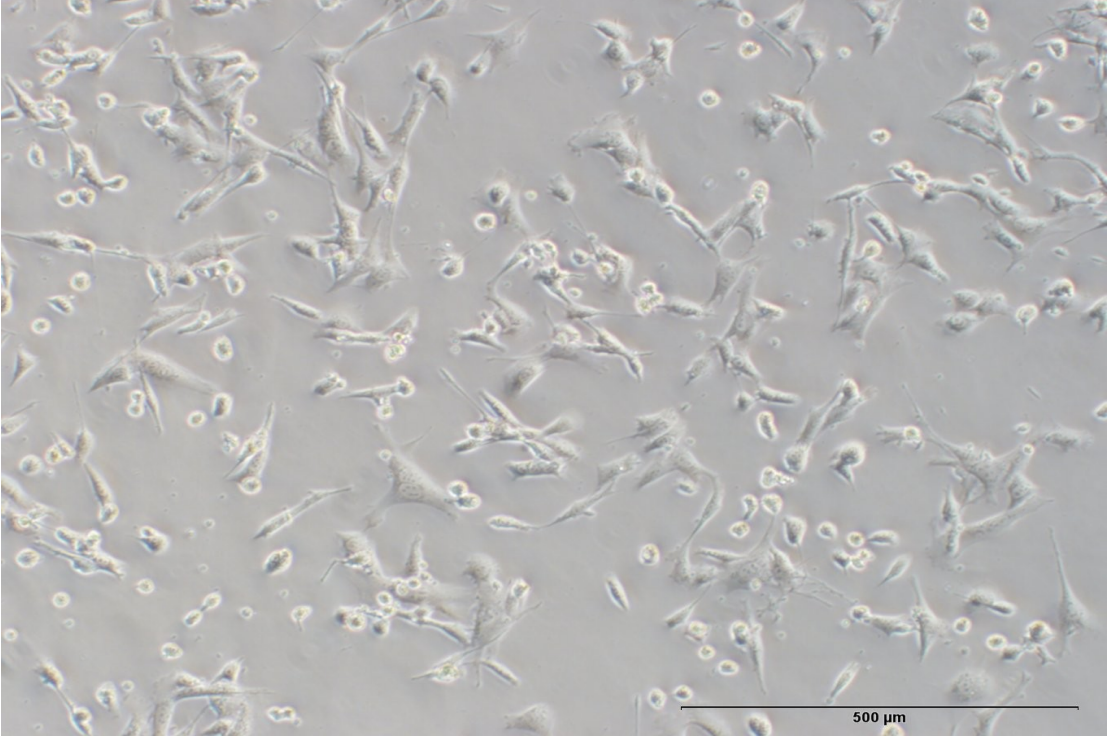
Fibroblast hücreleri düz, iğsi şekilli ve ince-uzun bir yapıya sahiptir. Hücre nukleusu yassı ve ovaldir (Tarin ve Croft, 1969). Fibroblastlar, hücre iskeleti elemanlarından olan filamentlerin yapısındaki vimentin proteinine sahip, diğer tüm bağ dokularındaki hücreler gibi primitif mezenşimden kökenlenmiş hücrelerdir. Fibroblastlar bağ doku ailesindeki hücreler arasında en az özellemiş hücrelerdir. Vücutta bağ dokuda dağılmış bir şekilde bulunurlar. Fibroblast hücreleri, kollojen yapıdaki ekstrasellüler matriks sekresyonu için özelleşmişlerdir. Katı olmayan ve tip 1 ve/veya tip 3 kollojenden zengin bir ekstrasellüler matriks salgırlar. Bir doku hasara uğradığında, hasarlı bölgenin yakınında çoğalırlar, yaraya göç ederler ve büyük miktarda kollojen matriks üreterek hasarlı dokunun tamirini sağlarlar (Tomasek ve diğ., 2002). Fibroblastların hasarlı alanda büyüebilmeleri ve tek başına yaşayabilmeleri kültür ortamında bu hücrelerin kolay bir şekilde büyüebileceğini ve hücre biyolojisi çalışmaları için neden ideal olduklarını açıklamaktadır.

Fibroblast hücreleri ayrıca bağ doku ailesinin diğer üyelerine dönüşebilme kapasitesine sahip oldukça değişken hücrelerdir (Şekil 2.1.2). Vücudun farklı bölgelerinde bulunan fibroblast hücrelerinin birbirlerinden farklı olmalarının yanı sıra bu hücreler aynı bölgede bile farklılıklar gösterebilirler (Phipps ve diğ., 1997). Olgun fibroblastların dönüşme kapasitesi daha az iken, mezenşimal hücreler olarak adlandırılan olgunlaşmamış fibroblastlar ise çeşitli olgun hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler.



**Şekil 2.1.2:** Bağ dokuda bulunan hücreler ve fibroblast hücresinin diğer bağ doku hücrelerine dönüşebilme potansiyeli (Alberts ve diğ. 2002).

Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri, 1968'de S.A. Aaronson ve G.T. Todaro tarafından Balb/c fare embriyosundan elde edilmiş olan bir hücre hattıdır (Şekil 2.1.3.) (Aaronson ve Todaro, 1968). Bu hücreler sınırsız bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Ayrıca tek tabakalı bir şekilde büyürler ve hiçbir zaman tabakalaşma göstermezler. Kültür kabının yüzeyini tamamen kapladıkları zaman kontak inhibisyonundan dolayı bölünmeleri durmaktadır (Kakunaga ve Crow, 1980).



**Şekil 2.1.3:** Balb/c 3T3 Embriyonik Fibroblast Hücreleri Faz-Kontrast Mikroskobu Görüntüsü

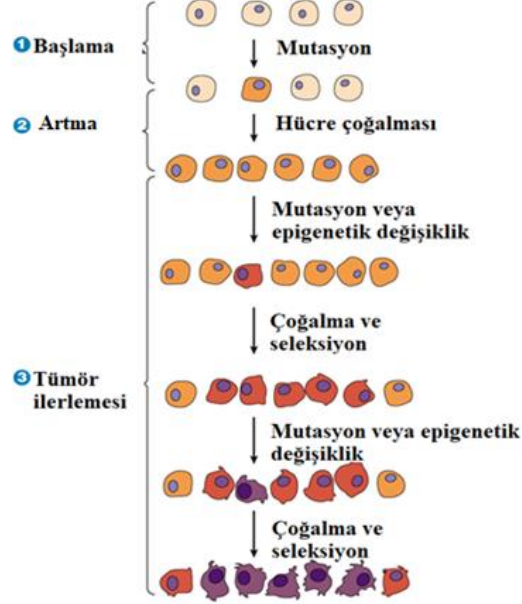
Yapılan birçok çalışmada çeşitli kimyasal maddelerin canlılar üzerinde kanserojen etkiye sahip olup olmadıklarının açığa çıkarılması amacıyla *in vitro* hücre transformasyon deneyinde Balb/c 3T3 hücre soyu kullanılmaktadır (Kakunaga, 1973). Kanserijen bir maddeye maruz bırakılan hücreler neoplastik transformasyona uğrar ve hücre popülasyonu büyümeyi durdurmaz. Anormal hücre morfolojisine sahip foci üretmek için, kontak inhibe olmuş normal hücrelerin üzerinde büyümektedirler. Transforme olmuş hücreler iğsi şekilde, çok tabakalı, yoğun ve bazofilik boyanan hücrelerdir ve ayrıca focus kenarında rastgele oryantasyon göstermektedirler (Sasaki ve diğ., 2012).

## 2.2. NEOPLASTİK HÜCRE DEĞİŞİMİ

Somatik bir hücrenin çeşitli kimyasal maddelere, radyasyona veya virüslere maruz kalması sonucunda malign hücre karakteri kazanmasına neoplastik hücre değişimi denilmektedir (Foulds, 1969). Kanser, somatik hücrelerde meydana gelen genetik bir bozukluktur (Vogelstein ve Kinzler, 2002). Somatik mutasyonlar tüm kanser tipleri için ortaktır fakat bu mutasyonların gerçekleştiği hücre tipi farklı kanser tiplerinin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bir hücrenin malign bir hücreye dönüşmesi için gerekli olan mutasyon sayısı, mutasyonların meydana geldiği spesifik genler ve mutasyonların doğası kanser oluşumu için belirleyici faktörlerdir.

Malignant tümör oluşum sürecinde çevresel faktörler ve endojenler (gen ve hormon, vb.) arasındaki kompleks etkileşimler etkili olmaktadır. Karsinogez olarak adlandırılan bu süreç birçok moleküler ve hücresel olayların etkili olduğu çok basamaklı bir süreçtir (Foulds, 1954). Karsinogenez süreci temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar, başlama, artma ve ilerleme olarak adlandırılmaktadır (Klaunig ve Kamendulis, 2004). Başlama evresinde, kanserojen bir maddeye maruz kalan hücrede tamir edilemeyen DNA hasarı ve hasarlı DNA sentezi gerçekleşir ve bunun sonucunda mutasyona uğramış bir hücre oluşmaktadır. Meydana gelen değişiklik sonucunda tek bir hücre anormal şekilde çoğalmaktadır (Cooper, 2000). Hücrede gerçekleşen bu hasar hücre çoğalması sırasında gerçekleşen spontan mutasyonlar sonucunda olabileceği gibi, kimyasal karsinojenler, radyasyon ve virüsler gibi çevresel faktörlerden de meydana gelebilmektedir (Blagosklonny, 2005). Başlama evresinin ardından, kanserojen madde, bu hücrelerin seçici klonal büyümesine neden olarak tümörün artışı meydana getirmektedir. Artma evresi olarak adlandırılan bu evrede başlama evresinde oluşan hücreler fokal bir alana genişlemektedir. Bu evrede DNA'nın yapısı doğrudan zarar görmemektedir fakat hücre bölünmesi yoluyla hücre sayısının artması ve / veya apoptotik hücre ölümünün azalması sonucunda gen ifadesinde değişiklikler meydana gelmektedir (Khambete ve Kumar, 2014). Hücre çoğalmasının sürekliliği nedeniyle ortaya çıkabilecek mutasyonların artması ise preneoplastik hücrelerde neoplasmlara neden olabilmektedir (Lutz ve Maier, 1988). Üçüncü evre ise ilerleme evresidir ve bu evrede genomda geri dönüşü olmayan bir hasar meydana gelmektedir. Bu çok adımlı süreç kemirgenlerde iyi bir şekilde tanımlanmıştır ve insanların da dahil olduğu primatlarda

da aynı sürecin meydana geldiğini gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır (Hennings, 1987) (Şekil 2.2.1).



**Şekil 2.2.1:** Çok adımlı karsinogenez süreci. 1) Kanserojen maddeye maruziyeti sonucunda DNA’da meydana gelen hasar. 2) Hücrelerin birden fazla kanserojen maddeye maruz kalması sonucunda DNA’da doğrudan bir hasar meydana gelmesi. 3) Malign tümör oluşumu. (Weinstein ve diğ., 1984).

Bu aşamalar arasındaki geçiş farklı eksojen ve endojen faktörler tarafından yönlendirilmektedir. Ayrıca her aşama farklı biyokimyasal mekanizmalar ve genetik unsurlar içermektedir. Çeşitli kanserojen maddeler, hücresel DNA’ya kovalent bağ ile bağlanarak reaktif türlerinin oluşması yoluyla karsinogenezin başlamasına neden olmaktadır.

Malignant hücrelerin oluşumu için çok güçlü genetik değişikliklerin gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu değişiklikler, hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olan onkogenlerin amplifikasyonu veya aktivasyonunu ve ayrıca hücrelerin normal sınırlarda büyümesinden sorumlu olan tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu içermektedir. Tümör hücrelerinin gelişimiyle sonuçlanan genetik değişiklikler hem internal hem de eksternal faktörlerden kaynaklanabilmektedir. İnternal faktörler içinde, nokta mutasyonu ve çerçeve kayması mutasyonu yer almaktadır. Bu mutasyonlar protein fonksiyonunda tamamen veya kısmen

kayba, kromozomal kırıklara veya yeniden düzenlenmelere, bazı DNA bazlarının iç kimyasal dengesizliğine, epigenetik değişikliklere, hormon seviyelerinde değişikliklere, metabolik süreçler ve immün sistem değişiklikleri yoluyla serbest radikallerin üretilmesine neden olabilmektedir (Bertram, 2000; American Cancer Society, 2010). Diğer yandan, viral veya bakteriyel enfeksiyonlar, iyonize veya UV radyasyon, kimyasal karsinojenlere maruziyet ve sigara kullanımı da eksternal faktörler olarak sıralanabilmektedir (Rieger, 2004). Tüm bu faktörler kanser gelişimini başlatan veya ilerleten genetik ve hücresel sistemleri değiştirmektedir (American Cancer Society, 2010).

Karsinojenik süreci başlatan ajan genellikle hücresel DNA'da hasara neden olmaktadır (Weinstein, 1981). Bazı ajanlar ise reaktif oksijen türlerini artırarak veya antioksidan enzimlerin aktivitesini azaltarak ve DNA tamir sisteminin görevini yerine getirememesine neden olarak oksidatif hasara neden olmaktadır (Klaunig ve Kamendulis, 2004). Meydana gelen oksidatif stres neoplazi sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif DNA hasarı mutajenik etki gösterebilir ve başlama evresinin gerçekleşmesine neden olabilmektedir. Ayrıca oksidatif stres, hücrenin redoks potansiyelini ve gen ifadesinin değişimini düzenleyebilir. Böylece karsinogenez sürecinin tümörün ilerlemesi evresine katılmaktadır (Benhar ve diğ., 2002).

Kanser hücreleri ile somatik bir hücre arasındaki temel fark kanser hücrelerinin aşırı çoğalma potansiyelinde olmasıdır. Kültür ortamında hücreler belirli bir sınırdan bölünmelerinin ardından bölünmelerini durdururken kanser hücreleri sınırsızca bölünmektedirler. Ökaryotik kromozomların terminal bölgesinde bulunan telomeraz enzimi hücrelerin bölünme potansiyeli için önemli bir faktördür. Somatik hücrelerde telomeraz enzimi bulunmadığından dolayı hücreler sınırlı miktarda bölünebilmektedirler (Harley, 1991).

Radyasyon, kimyasal maddeler veya virüsler ile tümör oluşumunun uyarılmasına ilişkin çalışmalar, kanserojen bir maddenin etkilerinin tekrarlanabilir şekilde gözlemlenebildiği ve nicelleştirilebildiği deneysel sistemler gerektirmektedir. Kanserojenlerin aktivitesi, sağlıklı hayvanlarda denenebilmesine rağmen, bu deneylerin ölçülmesi ve kontrolü zordur. Kültür ortamında normal hücrelerin kanserojen bir ajana maruz kaldıktan sonra malign hücrelere dönüşümünü belirlemek amacıyla geliştirilen *in vitro* hücre transformasyon deneyi ile kanser araştırmalarında büyük bir ilerleme kaydedilmiştir (Poburski ve diğ., 2016)

İlk ve yaygın olarak kullanılan hücre transformasyon deneyi focus deneyidir ve 1958’de Howard Temin ve Harry Rubin tarafından geliştirilmiştir. Focus deneyi bir kültür kabının yüzeyindeki normal hücrelerden oluşan bir arka plana karşı morfolojik olarak farklı “focus” olarak transforme edilmiş bir hücre grubunun tanınmasına dayanmaktadır. Focus deneyi transforme olmuş hücrelerin üç özelliğinden yararlanmaktadır. Bunlar; değişmiş morfoloji, kontak-inhibisyonun kaybı ve yoğunluğa bağlı büyüme inhibisyonunun kaybıdır (Temin VE Rubin, 1958) (Tablo: 2.2.1). Sonuç olarak kültür ortamında normal hücrelere göre aşırı büyüyen morfolojik olarak değişmiş hücre kolonisi oluşmaktadır. Transforme olmuş hücrelerin bazı focisi kanserojen maddeye maruziyetten sonraki bir veya iki hafta sonra belirlenebilmektedir. Bu hücrelerin uygun deney hayvanlarına aşılınması sonucunda tümör oluşturabilmeleri *in vitro* hücre transformasyon deneyini desteklemektedir (Alberts ve diğ., 2002).

**Tablo 2.2.1:** Neoplastik değişim geçiren hücrelerin genel özellikleri (Nicolson ve diğ., 1977).

<b>Büyüme Karakteristiği</b>	<b>Genetik Özellikler</b>	<b>Yapısal Değişiklikler</b>	<b>Neoplastik Özellikler</b>
Ölümsüzlük	Spontan mutasyon oranının artışı	Aktin iskeletinin değişimi	Tümörigenik
Substrattan bağımsız büyüme	Anöploidi	Hücre yüzeyi ile ilişkili fibronektinin kaybı	Anjiogenik
Kontak inhibisyonun kaybı	Proto-onkogenlerin aşırı ekspresyonu	Ekstrasellüler matriksin değişimi	Hızlanmış proteaz sekresyonu
Tek tabanın üzerinde büyüme	Tümör baskılayıcı genlerin kaybı		İnvaziv olma

### 2.3. ARSENİK

Arsenik doğada kendiliğinden var olan ve periyodik cetvelde 5A grubunda yer alan toksik bir elementtir. Atom numarası 33 ve kütle numarası 74,92'dir. Kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı metal ve ametal arasında bir karaktere sahiptir ve bu nedenle metalloid veya yarı metal olarak adlandırılmaktadır. (WHO, 2001; IARC, 2004). Bir metalloid olarak arsenik, elemental, sülfid ve karbonat formu gibi çeşitli allotropik formlarda bulunmaktadır (Henke, 2009).

Arsenik; arsenit (As+III), arsenat (As+V), elemental arsenik (As<sub>0</sub>) ve arsin (As-III) olmak üzere dört adet oksidasyon durumuna sahiptir (Sharma ve diğ., 2014). Ayrıca arseniğin birçok organik ve inorganik formları bulunmaktadır ve inorganik arsenik formları organik arsenik formlarından daha fazla toksik etkiye sahip olmaktadır (McCarty ve diğ., 2011). İnorganik arsenik formları arasında ise trivalent arsenit, pentavalent arsenattan daha fazla toksik etki göstermektedir (Mandal ve Suziki, 2002). Arseniğin çözünürlüğü ve hareketliliği büyük ölçüde pH ve oksidasyon koşullarına bağlıdır. Arsenat türleri düşük pH'da oksitlenmiş sularda bulunurken, arsenit yüksek pH'da derin deniz sularında daha fazla bulunmaktadır (Abdallah ve Gagnon, 2009; Bundschuh ve diğ., 2012, Jackson ve diğ., 2012).

Arseniğin yaygın olarak bulunan organik formları monometilarsenik asit (MMA) ve dimetilarsenik asit (DMA)'dır (Akter ve diğ., 2005). DMA çevrede bulunan ana organik arsenik formudur ve pestisitlerin ve herbisitlerin yapımında kullanılmaktadır (IARCH, 1980). Ayrıca insanların da yer aldığı bazı memelilerin idrarında inorganik arseniğin temel bir metabolitidir (Chan ve Huff, 1997). Çevrede yaygın olarak bulunan arsenik bileşikleri Tablo 2.3.1'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.3.1:** Çevrede yaygın olarak bulunan organik ve inorganik arsenik bileşikleri.

<b>İnorganik Arsenik Formları</b>	Arsenik trioksit ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), Arsenyöz asit ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ), Arsenik asit ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ), İnorganik arsenit, İnorganik arsenat, Kurşun arsenat ( $\text{PbHAsO}_4$ ), Arsenoprit ( $\text{FeAsS}$ ), Arsin ( $\text{AsH}_3$ )
<b>Organik Arsenik Formları</b>	<p>Monometilarsonik asit <math>\text{CH}_3\text{As}(\text{O})(\text{OH})_2</math></p> <p>Monometiarsenous asit <math>\text{CH}_3\text{As}(\text{OH})_2</math></p> <p>Dimetilarsinik asit <math>(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}</math></p> <p>Dimetilarsinik asit <math>(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}</math></p> <p>Trimetilarsin oksit <math>(\text{CH}_3)_3\text{AsO}</math></p> <p>Arsenobetain <math>(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{OOH}^-</math></p> <p>Bakır asetoarsenit <math>\text{Cu}_4\text{C}_4\text{H}_6\text{As}_6\text{O}_{16}</math></p>

Arseniğe maruziyet, doğal ve antropojenik yollarla gerçekleşmektedir (Ueki ve diğ., 2004). Doğal yollar arasında öncelikle içme suyu olmak üzere, arsenikle kontamine olmuş su ile sulanmış besinlerin tüketimi yer almaktadır. Pestisitler, herbisitler, çeşitli boyalar, kozmetik ürünleri, madencilik gibi alanlardan ise antropojenik olarak arseniğe maruz kalınmaktadır (Smedley ve Kinniburgh, 2002). Kronik arsenik zehirlenmesi ve arseniğin medikal kullanımı uzun yıllardan bu yana bilinmektedir. Arsenik oral olarak alınarak astım, lösemi ve diğer kanser türlerinde tedavi olarak kullanılmıştır (Leslie ve Smith, 1978).

Arseniğin insan sağlığı üzerindeki toksik etkisi, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve arsenik Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARCH) ve Ulusal Toksikite Programı (NTP) tarafından grup I insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır (WHO, 2012). İçme suyu yoluyla arseniğe uzun süreli maruziyet veya kronik arsenik maruziyeti; cilt, akciğer ve böbrek kanseri, pigmentasyon değişiklikleri, nörolojik bozukluklar, iştah kaybı ve bulantı gibi insan sağlığını ciddi derecede olumsuz yönde etkileyen rahatsızlıklara neden olmaktadır (Rahman ve diğ., 2009). Akut arsenik zehirlenmesi ise, özafagus ve karın ağrısına, kusma ve diyare gibi rahatsızlıklara neden olmaktadır (Smedley ve Kinniburgh, 2002).

Arsenik fosfata analogtur ve fosfatın bağlanabildiği yere bağlanabilmektedir fakat insanlar için gerekli elementler arasında yer almamaktadır (WHO, 2011). Suda çözünebilen inorganik arsenikler hızlı ve güçlü bir şekilde gastrointestinal sistemde emilmekte ve insanlarda büyük ölçüde DNA veya protein moleküllerine bağlanmaktadır (Zheng ve diğ., 2014). İnsan vücudunda arseniğin tahmini yarılanma ömrü dört gündür ve çok küçük konsantrasyonlarda saç, ter, deri, anne sütü ve dışkı ile atılırken, büyük bir kısmı vücuttan idrar olarak atılmaktadır (Sharma ve diğ., 2014).

### **2.3.1. Arseniğin Etki Mekanizması**

Arseniğin patojenik etki mekanizması oldukça kompleks ve multifaktöriyeldir. Hücre içinde serbest radikallerin oluşumuna yol açarak güçlü bir oksidatif stres oluşturmak, arsenik toksisitesinin temel mekanizmalarından biridir (Flora, 2011). Yapılan birçok çalışma reaktif oksijen türlerinin (ROS) indüklenmesinin arsenik toksisitesinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Arseniğe kronik olarak maruz kalan popülasyonlarda oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir (Basu ve diğ., 2005; Sampayo-

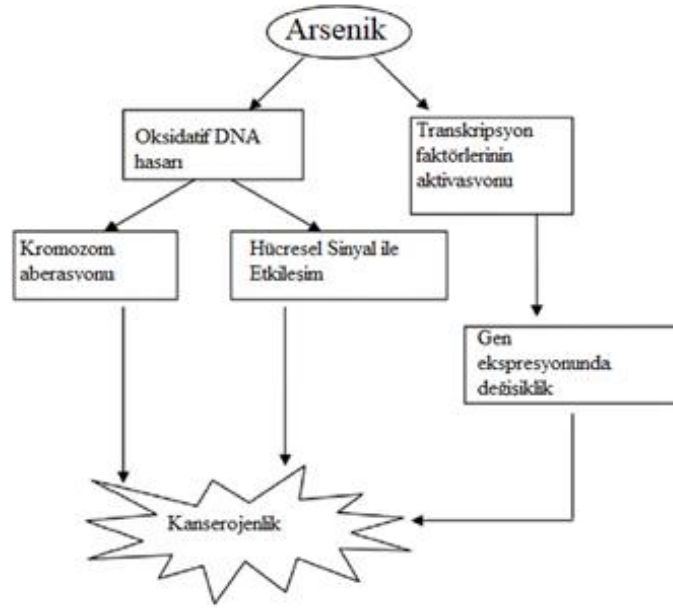
Reyes ve diğ., 2010). Ayrıca glutatyon seviyesinin azalmasına neden olmaktadır (Wu ve diğ., 2001).

Arsenikle indüklenmiş ROS oluşumu, karsinogenezde kritik rol oynayan hücre içi sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler ve transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu ile ilişkili olmaktadır (Tapio ve Grosche, 2006). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, düşük dozda arseniğe maruz kalan insanların periferik kan polimorfonükleer hücrelerinde DNA hasarının meydana geldiğini ve bu hücrelerde apoptoz miktarının arttığını göstermiştir (Pei ve diğ., 2013). Ayrıca prenatal arsenik maruziyeti kordon kanında oksidatif stresin meydana gelmesi ile ilişkilidir ve azalan timus fonksiyonu ile çocuklarda immün sistemin baskılanmasına neden olmaktadır (Ahmad ve diğ., 2012). Arsenik maruziyeti yoluyla indüklenen oksidatif stres temel olarak inorganik arsenik metabolizmasından kaynaklanmaktadır. İnorganik arseniğin biyotransformasyonu yüksek toksisiteye neden olan son ve ara ürünlerin oluşuma yol açmaktadır (Vahter ve Concha, 2001; Stayblo ve diğ., 2000).

Arseniğin; anöploidi, mikronükleus oluşumu, kromozomal bozukluklar, delesyonlar, kardeş kromatid değişimi ve DNA-protein çapraz bağlanma gibi DNA değişikliklerine neden olduğu bildirilmiştir (Gebel, 2001). Ayrıca arsenik, proteinlerin ve enzimlerin sülfhidril gruplarına olan yüksek afinitesi nedeniyle proteinlerde ve enzimlerde oksidatif hasar meydana getirebilmektedir (Hughes ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2004) ve bu nedenle birçok enzim inaktive olmaktadır (Akter ve diğ., 2005). Enzimlerde meydana gelen oksidatif hasar DNA ligasyonun engellenmesi veya DNA polimeraz  $\beta$  gibi DNA tamirinde görevli olan gen ifadesini aşağı yönde düzenleyerek DNA tamir mekanizmalarına da müdahale etmektedir (Sinha aRoy 2011).

Arsenik, hücre içi sinyal iletimini indüklemekte ve transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir (Şekil 2.3.1.1). Hücre büyümesinde, çoğalmasında, malignan transformasyonda etkili olarak tümör oluşumunu teşvik edici özelliklere sahiptir. Ayrıca, arsenik, arsenik ile ilişkili kanserin indüklenmesine neden olan çeşitli genlerin ekspresyon profilini değiştirmek için AP-1 ve NF- $\kappa$ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eden MAPK sinyal iletimini başlatmaktadır. Arseniğe kronik olarak maruz kalan hücrelerde malignan transformasyon geçirmekte ve subsattan bağımsız büyüme yeteneği kazanmaktadır (Huang ve diğ., 1999). Arsenik ile indüklenmiş malignan transformasyon mekanizmasında Akt ve ERK 1/2 gibi önemli sinyal yolları etkili olmaktadır (Ouyang ve diğ., 2006).

Sodyum arsenat ve sodyum arsenit, Syrian hamster embriyo hücrelerinde ve Balb/c 3T3 hücrelerinden konsantrasyona bağımlı bir transformasyona neden olmaktadır (Lee ve diğ., 1985b; Bertolero ve diğ., 1987) Transformasyona uğramış hücreler sitogenetik olarak analiz edildiğinde kardeş kromatitlerin değişimi ve kromozomal sapmalar gözlenmiştir ve bu hücreler farelere subkutan olarak uygulandığında tümör gelişimi meydana geldiği görülmüştür (Saffioti ve Bertolero, 1989).



Şekil 2.3.1.1: Arseniğin kanserojen etki mekanizması (Sing ve diğ., 2011).

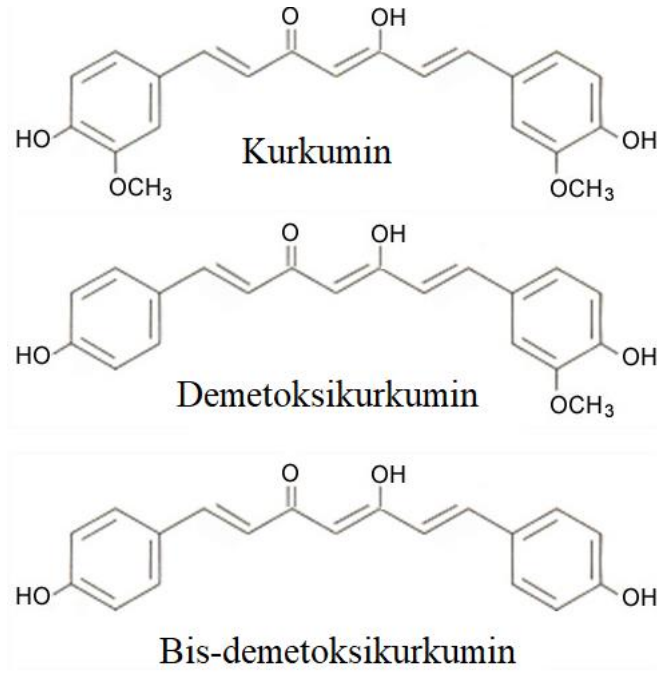
## 2.4. KURKUMİN

Çeşitli hastalıkların tedavisi için kaynak olabilecek çok sayıda bitki, hayvan, deniz organizması ve mikroorganizma türü bulunmaktadır (Cragg ve diğ., 2009; Kinghorn ve diğ., 2009). Özellikle birçok bitki türü, çeşitli kültürlerde geleneksel ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Borchardt, 2002). Örneğin Ayurveda olarak bilinen Hindistan geleneksel tıp sisteminde, kanser de dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için bitki temelli ilaçlar ve formülasyonlar kullanılmaktadır.

*Curcuma longa* yaklaşık 100 cm yüksekliğine kadar büyüeyebilen uzun ömürlü bir bitkidir. Kavisli yapraklara ve oval veya silindirik bir rizoma sahiptir (Sharma ve diğ., 2005). Hindistan, Güneydoğu Asya, Çin ve diğer Asya ülkelerinde olmak üzere tropikal bölgelerde yetişmektedir (Ravindran ve diğ., 2009)

Kurkumin, *Curcuma longa* (zerdeçal) bitkisinin rizomundan elde edilen polifenolik bir bileşiktir (Nabavi ve diğ., 2014). 1815 yılında Vogeland ve Pelletier tarafından sarı renkli bir pigment olarak keşfedilmiştir ve 2000 yılı aşkın süredir kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve patolojik hastalıklara karşı tedavi edici etkisinden dolayı Asya ülkelerinde geleneksel olarak tüketilmektedir (Ghos ve diğ., 2015; Aggarwal ve Harikumar, 2009). Kurkumin gıda maddesi olarak ve çeşitli kozmetik ürünlerinde de kullanılmıştır. Dünyanın çeşitli bölgelerinde halk arasında, uzun yıllar boyunca zerdaçal ve kurkuminoidler terapötik amaçla kullanılmıştır. Geleneksel Çin tıbbında karın ağrısı ile ilgili hastalıkları tedavi amaçlı kullanılırken, eski Hindu tıbbında burun tıkanıklığının tedavisinde de kullanılmıştır.

Zerdeçal kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin olmak üzere üç temel kurkuminoid içermektedir (Da Lazzo ve diğ., 2013) (Şekil 2.4.2). Bunlardan kurkumin başlıca kurkuminoiddir. Zerdaçalın yaklaşık %2-5'ini oluşturmaktadır ve terapötik olarak en etkili bileşenidir (Chattopadhyay ve diğ., 2004).

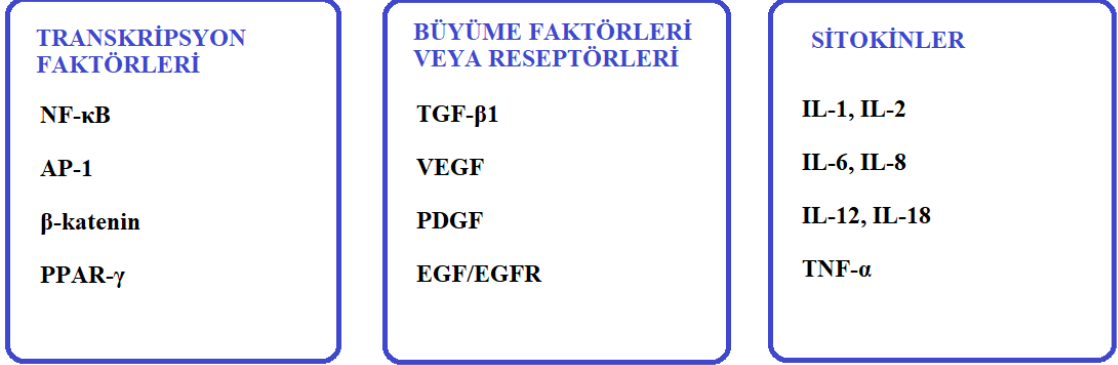


**Şekil 2.4.1:** Kurkumin, demetoksikurkumin ve bis-demetoksikurkumin kurkuminoidlerinin kimyasal yapısı (Wilken ve diğ., 2011).

Suda çözünmeyen kurkumin, dimetilsülfoksit (DMSO), etanol ve asetonda çözülebilen bir bileşiktir, erime noktası 183 0C'dir. Moleküler formülü C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> ve moleküler ağırlığı ise, 368,37 g/mol'dür (Aggarwal ve diğ., 2003). Asidik pH'da daha kararlı yapıda olan kurkumin, nötr ve bazik pH'da ise dengesizdir (Tonnesen ve Karlsen, 1985). Kurkumin enolik ve beta diketonik formda bulunmaktadır. Çözeltide enolik formda olması kurkuminin güçlü bir radikal süpürücü özelliğe sahip olmasını sağlamaktadır (Shen ve Ji, 2007).

Kurkuminin birçok biyokimyasal ve moleküler kaskadı etkilediğini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu moleküler hedefler arasında; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve onların reseptörleri, sitokinler, enzimler ve hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyen genler yer almaktadır (Goel ve diğ., 2008) (Şekil 2.4.2).

### Kurkuminin Temel Moleküler Hedefleri



### Temel Terapötik Aktiviteleri

**Anti-enflamatuvar**  
**Antioksidan**  
**Antitümöral**

**Şekil 2.4.2:** Kurkuminin terapötik aktiviteleri ve temel moleküler hedefleri. Kurkumin NF-κB (Nuklear faktör kappa-b), AP-1 (aktive protein-1), β-katenin ve PPARγ (peroksizom proliferatör-ilişkili reseptör gama) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini, TGF-β1 (tümör büyüme faktörü-β1), VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), PDGF (trombosit-türevli büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü) ve reseptörü olan EGFR gibi büyüme faktörlerini, IL (interlökin), TNF-α (tümör nekrosis -α) gibi sitokinleri düzenlemektedir (Rohanizadeh ve diğ., 2016).

Kurkumin kanserin başlama, artma ve ilerleme evrelerini inhibe ederek normal karaktere sahip olan bir hücrenin malign özellik kazanmasını, tümör oluşumuna neden olmasını ve bu hücrelerin vücudun diğer alanlarına göç etmesini durdurmaktadır (Shehzad ve diğ., 2010).

Kurkumin STAT3, NF-Kb, aktive olmuş protein-1 (AP-1), β-katenin gibi hücre proliferasyonu hücre sağkalımı, invazyon, anjiogenez, tümörögenез ve enflamasyonda yer alan çeşitli transkripsiyon faktörlerini inhibe etmektedir. Çoğu kanser türünde bu transkripsiyon faktörleri aşırı ifade edilmektedir. NF-Kb inhibisyonuyla, kurkumin Bcl-2, Bcl-Xl, siklin D1, interlökin (IL)-6, siklooksijenaz 2 (COX-2) ve matriks metalloproteinaz (MMP)-9'un yer aldığı çeşitli genlerin ifadesini baskılayarak hücre siklusunu tutuklar, proliferasyonu inhibe eder ve apoptozu indükler (Aggarwal ve diğ., 2004)

Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kurkuminin kan, beyin, meme, gastrointestinal sistem, baş ve boyun, karaciğer, pankreas, kolon, prostat, ovaryum ve cilt kanserlerinin yer aldığı çeşitli organlarda kanser hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Anand ve diğ., 2008; Kunnumakkara ve diğ., 2008). Ayrıca kurkuminin pankreas kanseri hücrelerinde Notch-1 sinyalini aşağı yönde düzenleyerek, NF-Kb aktivitesini inhibe ettiği ve hücre çoğalmasına engel olarak apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Wang ve diğ., 2006).

*In vitro* hücresel deneyler, kurkumin ile kısa süreli tedavinin insan epidermoid hücre hattı olan A431 hücrelerinde EGFR kinaz aktivitesini ve EGF'ye bağlı tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Kurkumin ayrıca, fosforilaz kinaz, protein kinaz C (PKC), protamin kinaz (cPK), otofosforilasyonla aktive protein kinaz (AK), pp60c-src tirozin kinaz dahil olmak üzere çeşitli protein kinazların aktivitesini tamamen inhibe etmektedir. Kurkumin açık bir şekilde bu yolların tümünü doğrudan ya da dolaylı olarak inhibe ederek güçlü bir antienflamatuvar ve antikanserojenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Korutla ve Kumar, 1994).

Büyüme faktörleri ve reseptörleri normal büyüme ve farklılaşma sürecinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu moleküllerin düzensiz bir şekilde ifade edilmesi, malignan değişime yol açan anormal büyüme ve gelişmeye neden olmaktadır. Kurkuminin büyüme faktörlerinin aktivitesini ve ifadesini düzenlenleyerek antiproliferative, anti-invasiv, ve antianjiogenik güce sahip olduğu gösterilmiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGFR) birçok kanser tipini oluşum mekanizmasında etkili olmaktadır ve kurkumin ana hedeflerinden biri olan EGFR sinyalini inhibe etmektedir (Lev-Ari ve diğ., 2006).

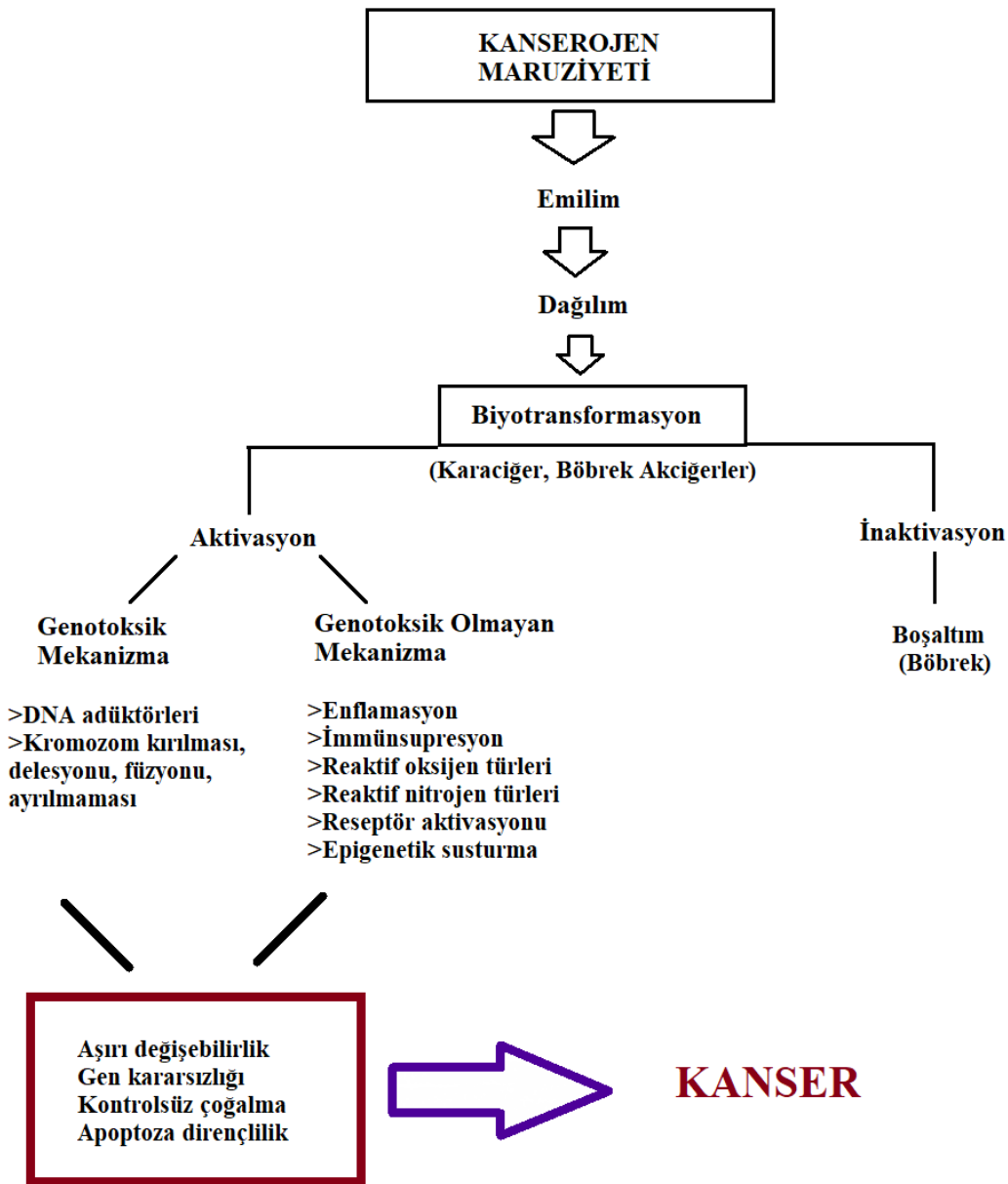
## 2.5. GENOTOKSİSİTE

Kimyasal karsinojenler, etki mekanizmalarına göre genotoksik ve genotoksik olmayan karsinojenler olarak sınıflandırılmaktadır (Ellinger-Ziegelbauer ve diğ., 2005). Genotoksisite kanserin ana nedenlerinden biridir. *In vitro* ve kısa süreli *in vivo* çalışmalarda, genotoksik karsinojenlerin DNA'da hasara neden olduğu ve kromozomal anormallikler oluşturduğu gösterilmiştir (Mathijs ve diğ., 2009). Kimyasal bir ajan, radyasyon, ağır metaller, bakteriyel ve fungal diğer toksinler genotoksin olabilmektedir. (Kastan ve Bartek, 2004; Cavalieri ve diğ., 2012). Genotoksisite ve mutajenite birbiriyle karıştırılan kavramlardır. Tüm mutajenler genotoksiktir fakat tüm genotoksik maddeler mutajenik değildir (Pechura ve Rall, 1993; Alonso ve diğ., 2006).

Genotoksinler gösterdikleri etkilere göre sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar i) karsinojenler veya kansere neden olan ajanlar ii) mutajenler veya mutasyona neden olan ajanlar, iii) teratojenler veya doğum defektine neden olan ajanlardır (Natarajan, 1993). Son yıllarda yapılan toksikolojik çalışmalar, kronik toksisite, karsinojenite, teratojenite ve mutajenite konuları üzerinde durmaktadır. Germ hücrelerinde meydana gelen DNA hasarı hücre yapısında kalıtsal değişikliklere neden olurken, somatik bir hücrede meydana gelen DNA hasarı malignan transformasyona neden olabilecek bir mutasyonun gerçekleşmesine yol açabilir (De Flora ve Izzotti, 2007). Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonların karsinogenik süreçte etkili olmasının yanı sıra insanlarda ölüme neden olan ateroskleroz ve kalp hastalıkları gibi dejeneratif hastalıkların meydana gelmesinde de önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir (Genet. Molecular Biology, 2001). Genotoksik maddeler, DNA yapısında yer alan özel lokasyonlarla veya baz sekanslarıyla etkileşime girerek çeşitli lezyonlara, kırılmalara, yanlış eşleşmelere yol açarak DNA'da hasara ve mutasyona yol açmaktadırlar (Williams, 2001). Ayrıca oksidatif hasar da genotoksik strese neden olmaktadır ve bu nedenle reaktif oksijen türlerinin DNA'ya hasar verdiği bilinmektedir (Slupphaug ve diğ., 2003). Ekzojen olarak maruz kalınan çeşitli maddelerden kaynaklı reaktif oksijen türleri endojen kaynaklı reaktif oksijen türlerinin miktarını arttırmaktadır. Hücrede bulunan serbest radikaller ve oksidanlar DNA'nın yanı sıra, lipidlerin ve proteinlerin yapısını da değiştirmektedir (Phillips ve Arlt, 2009) (Şekil 2.5.1).

Günümüzde karsinojenlerin genotoksik gücü bakteriyel gen mutasyon testi (Ames testi), Memeli mikronükleus testi, komet testi gibi *in vitro* yöntemlerle ve *in vivo* olarak uygulanan

birçok yöntemle belirlenebilmektedir (Ames ve diğ., 1973). Bu testler, büyük oranda DNA hasarının belirlenmesine veya prokaryotik ve ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarınının neden olduğu biyolojik sonuçlara dayanmaktadır (David and Volker, 2009). Genotoksisite çalışmaları hücre içinde kansere neden olabilecek mutasyonları meydana getiren çeşitli kimyasal ajanların tanımlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Seukep ve diğ., 2014).



Şekil 2.5.1: Genotoksisite mekanizması (Khambete ve Kumar, 2014).

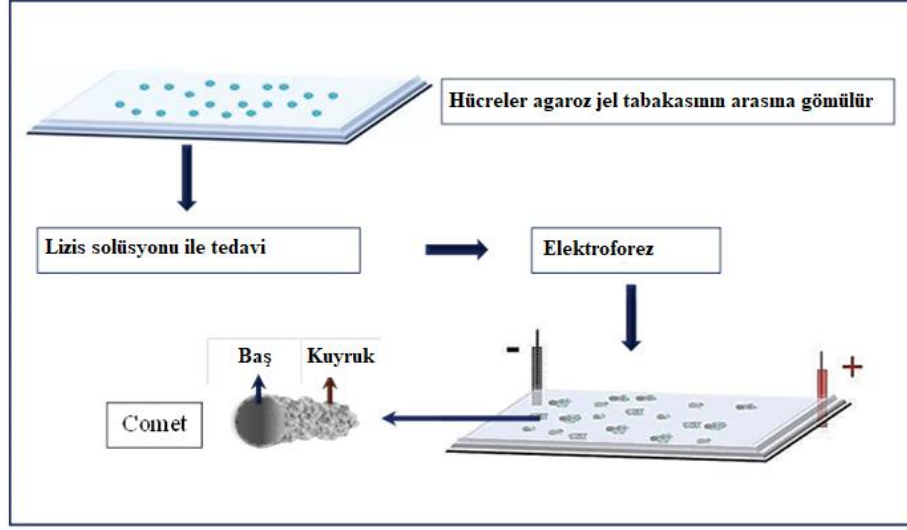
### 2.5.1. Komet Testi

Komet testi, 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan, DNA'da tek ve çift zincir kırıklarının tümünün tanımlanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir (Singh ve diğ., 1988).

*In vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilen komet testinde, DNA hasarı tek hücre seviyesinde tespit edilebilmektedir (McGregor ve Anderson, 1999). Hızlı, duyarlı ve basit bir test olmasının yanı sıra farklı hücre soyları ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilmektedir. Ayrıca radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Andrazsek ve diğ., 2014).

Bu yöntemde, hücreler mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülür ve lizis işlemine maruz bırakılır. Böylece hücre zarı parçalanır ve çekirdekte bulunan DNA serbest hale geçer. Alkali ortam nedeniyle süperkoil yapı gevşeyerek açılır ve kırıkların ortaya çıkması sağlanır. Uygulanan elektroforez ile kırılmış DNA zincirleri anoda doğru geçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturmaktadır. (Collins, 2004) (Şekil 2.5.1.1).

Komet testinin temel ilkesi, negatif yüklü hasar görmüş düşük molekül ağırlıklı DNA fragmanlarının elektroforez esnasında anoda doğru hareketi sırasında, kuyruklu yıldız kuyruğu benzeri bir iz bırakmasıdır (Tice ve diğ., 2000; Dusinska ve Collins., 2008). Hücreyi, hipertonic ve iyonik olmayan deterjanlar içeren lizis çözeltisi ile muamele etmek, hücre zarını, sitoplazmayı ve nükleozomlar da dahil olmak üzere nükleoplazmayı ortadan kaldırmaktadır (Dhawan ve diğ., 2009). Ardından nükleotid kütlesi içindeki hasar gören DNA, elektroforez işlemine tabi tutulduğunda, kuyruklu yıldız benzeri bir yapı oluşturarak anoda doğru geçmektedir. Oluşan kuyruğun ölçümü DNA hasarının derecesini göstermektedir (Nadin ve diğ., 2001).



Şekil 2.5.1.1: Komet testinde yer alan adımlar (Gunasekarana ve diğ., 2015).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri hücre transformasyon deneyi ile arseniğin kanserojen etki gösteren konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrasında hücrelerde neoplastik değişim gerçekleşmiş ve bu hücreler farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde kurkumin ile tedavi edilerek hücre canlılığı, lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen türleri spektrofotometrik olarak, genotoksisite ise komet testi ile araştırılmıştır.

#### 3.1 KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneyde kullanılan 3T3 embriyonik fibroblast hücre soyu 14-17 günlük gebe Balb/c farelerden elde edilmiş, tümorogenik olmayan bir hücre soyudur. Laboratuvarımıza ATTC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan getirilmiş olup *in vitro* koşullarda haftada bir-iki kez düzenli pasajlar yapılarak yetiştirilmektedir. Hücreler %10 Calf serum, 4,5 g/L glukoz, L-Glutamin, Sodyum Pirüvat ve PSA (Penicilin-Streptomisin-Amfoterin) ilave edilmiş DMEM kültür medyumunda, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren nemli ortamda, 37<sup>0</sup>C'de inkübe edilerek yetiştirilmektedir.

#### 3.2 HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Deneylerimizde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri kültür kapları içinde yeterli yoğunluğa ulaştıklarında haftada bir-iki defa düzenli olarak pasajları yapılmaktadır. Bu amaçla, hücreler tripsinle 37<sup>0</sup>C'de 5 dakika muamele edildikten sonra pipetaj yapılarak toplanır ve santrifüj tüpüne aktarılır. 150 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılır. Dipte bulunan hücre çökeltisi üzerine uygun kültür medyumu ilave edilerek, her deney için gerekli sayıda hücre kültürü kaplarına ekilir.

### 3.3. ARSENİK VE TPA KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Morfolojik transformasyon deneyinin başlangıç evresinde Balb/c 3T3 hücreleri üzerine uygulanan arsenik konsantrasyonu, arseniğe kronik maruziyet sonucu hücrelerde morfolojik bir değişimi uyararak kanserojen etki gösterdiği konsantrasyonlara göre hesaplanmıştır (Takahashi ve diğ., 2002).

Arsenik, serum bulundurmeyen medyum içinde uygun konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Deney grubundaki hücreler için 10  $\mu$ M olmak üzere tek bir arsenik konsantrasyonu oluşturulmuş, kontrol grubundaki hücreler ise normal hücre medyumuna maruz bırakılmıştır. Hücre transformasyon deneyinin ilerleme aşamında kullanılan TPA konsantrasyonu ise literatürde kullanılmış olan konsantrasyonlar referans alınarak DMSO'da hazırlanmıştır (Tsuchiya ve diğ., 2005).

0,1  $\mu$ M olarak tek bir TPA konsantrasyonu oluşturulmuş olup, kontrol grubundaki hücreler normal medyuma maruz bırakılmıştır.

### 3.4. HÜCRE TRANSFORMASYON DENEYİ

Hücre transformasyon deneyi, *in vitro* olarak çeşitli bileşiklerin kanserojen etkisinin olup olmadığının açığa çıkarılmasını sağlayan bir yöntemdir. (Jacobs et al., 2016; Benigni, 2014; Jaworska ve Hoffmann, 2010). Çok adımlı bir süreçten oluşan hücre transformasyon deneyi, *in vivo* karsinogenez sürecine benzer hücresel ve moleküler olaylar içermektedir (Barrett ve Ts'o, 1978; Maurici ve diğ., 2005). Hücre transformasyon deneyi sonucunda transforme olan hücrelerin, farelere aşılandığında tümörogenik bir etki ortaya çıkardıkları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. (Kakunaga, 1973; Keshava, 2000; Sasaki ve diğ., 2012a, 2012b).

*In vitro* hücre transformasyon deneyi ayrıca, çeşitli kimyasalların kanserojen etki gösterip göstermediğinin araştırılmasında kullanılan *in vivo* kemirgen deneylerinden daha hızlı sonuç vermektedir. Hücresel ve hücreler arası etkileşimler hakkında bilgi vererek genotoksik ve genotoksik olmayan bazı karsinojenlerin belirlenmesini sağlamaktadır. (OECD, 2007; Vanparys ve diğ., 2012; Jacobs ve diğ., 2016).

Hücre transformasyon deneyi, *in vitro* olarak çeşitli bileşiklerin kansorejen etkisinin olup olmadığının açığa çıkarılmasını sağlayan bir yöntemdir. (Jacobs et al., 2016; Benigni, 2014; Jaworska ve Hoffmann, 2010). Çok adımlı bir süreçten oluşan hücre transformasyon deneyi, *in vivo* karsinogenez sürecine benzer hücresel ve moleküler olaylar içermektedir (Barrett ve Ts'o, 1978; Maurici ve diğ., 2005). Hücre transformasyon deneyi sonucunda transforme olan hücrelerin, farelere aşılandığında tümörogenik bir etki ortaya çıkardıkları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. (Kakunaga, 1973; Keshava, 2000; Sasaki ve diğ., 2012a, 2012b).

*In vitro* hücre transformasyon deneyi ayrıca, çeşitli kimyasalların kanserojen etki gösterip göstermediğinin araştırılmasında kullanılan *in vivo* kemirgen deneylerinden daha hızlı sonuç vermektedir. Hücresel ve hücreler arası etkileşimler hakkında bilgi vererek genotoksik ve genotoksik olmayan bazı karsinogenlerin belirlenmesini sağlamaktadır. (OECD, 2007; Vanparys ve diğ., 2012; Jacobs ve diğ., 2016).

#### **3.4.1. Morfolojik Transformasyon Deneyi**

Uygun koşullarda çoğalan Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Tripin mavisi ile boyanan hücreler Thoma lamı yardımıyla üç kez sayılarak *in vitro* hücre transformasyon deneyi için altı kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 8.000 hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat 37°C CO<sub>2</sub>'de inkübe edilmiştir.

*In vitro* hücre transformasyon deneyi başlama ve ilerleme evresi olmak üzere iki evreden oluşmakta olup 32 gün sürmektedir. Deney grubundaki hücreler 24 saatlik inkübasyondan sonra başlama evresinde, %10 FBS, %1 PSA içeren MEM medyumunda 10 µM arseniğe üç gün maruz bırakılmışlardır. Dördüncü ve yedinci günler arasında, hücreler arsenik içermeyen taze medyumuna alınmıştır. İlerleme evresi olarak adlandırılan ikinci evrede ise, hücreler %2 FBS, %1 PSA ve 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyumuna alınmış olup, yedinci, on birinci, on dördüncü ve on yedinci günlerde 0,1 µM TPA'ya maruz bırakılmışlardır. Yirmi birinci günde ise hücreler taze medyuma alınmıştır ve bu evre otuz ikinci güne kadar haftada iki kez medyum değiştirilerek sürdürülmüştür. Kontrol grubundaki hücreler ise deney boyunca normal hücre medyumunu ile muamele edilmiştir (Şekil 3.4.1). Otuz ikinci günde Giemsa boyaması yapılarak kuyularda bulunan hücreler stereomikroskop ile incelenmiştir.

İnceleme sonrasında yaklaşık olarak 50 hücreden fazla ve 2 mm çapından büyük hücre foci değerlendirilmiştir. Ayrıca değerlendirilen bu hücrelerden, Tip III foci olarak adlandırılan, iğsi şekilde yoğun bazofilik boyanan ve temel hücre tabakasından daha farklı olarak çok tabakalı şekilde büyüeyebilen, rastgele yönelim gösteren ve foci köşelerinde invaziv olarak büyüyen hücreler transforme olmuş hücreler olarak belirlenmiştir (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985).

Maruziyet Günleri	1-3 Gün	4-7 Gün	7.Gün	11.Gün	14.Gün	17.Gün	21-32 Gün
<b>Deney Grubu</b>	%10 FBS + %1 PSA içeren MEM medyum  +  10 µM Arsenik	%10 FBS + %1 PSA içeren MEM medyum	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum  +  0,1 µM TPA	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum  +  0,1 µM TPA	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum  +  0,1 µM TPA	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum  +  0,1 µM TPA	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum
<b>Kontrol Grubu</b>	%10 FBS + %1 PSA içeren MEM medyum	%10 FBS + %1 PSA içeren MEM medyum	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum	%2 FBS + %1 PSA + 2 mg/ml insülin içeren DMEMF12 medyum

**Şekil 3.4.1:** Morfolojik transformasyon deneyinde yer alan deney grubu ve kontrol grubu.

#### **3.4.1.1. Hücrelerin Fiksasyonu ve Giemsa Boyaması**

32 gün sonunda hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra (1:1) oranında PBS/metanol karışımı ile 3 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında hücreler %100 soğuk metanol ile 10 dakika muamele edilmiş ve ardından iki kez metanol ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından, tümör oluşturma potansiyeline sahip hücrelerin tanımlanabilmesi için Giemsa boyaması yapılmıştır. Her kuyuya 1 ml olacak şekilde Giemsa boyası eklenmiştir. Ardından her kuyuya 3ml saf su eklenerek 10 dakika çalkalayıcı ile yıkama yapılmıştır ve bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır. Hava ile kurutma yapılmasının ardından kuyulardaki hücreler mikroskop ile incelenmiştir. Boyama sonrası transforme olmuş hücre focileri açık mavi renkte boyanmıştır.

### **3.5. KURKUMİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI**

Neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin maruz kalacağı kurkumin konsantrasyonları literatürde yer alan çeşitli kanser hücreleri üzerine uygulanmış kurkumin konsantrasyonları referans alınarak belirlenmiştir (Park ve diğ., 2013).

Kurkumin, DMSO içinde çözülerek uygun konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Deney grubundaki hücreler için seçilen kurkumin konsantrasyonları 5  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ve 25  $\mu$ M olarak oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki hücreler ise normal hücre medyumuna maruz bırakılmıştır. Daha sonra MTT hücre canlılığı testi sonucunda IC<sub>50</sub> konsantrasyonu belirlenmiştir. 15, 46  $\mu$ M olarak belirlenen bu konsantrasyon komet testinde kullanılmıştır.

### 3.6. SİTOTOKSİSİTE

#### 3.6.1. MTT Hücre Canlılığı Testi

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan neoplastik değişime uğramış hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT hücre canlılık testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülen kurkuminin altı farklı konsantrasyonu 24 saat uygulanarak 37°C CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deney sürelerinin tamamlanmasının ardından, her bir kuyucuğa 10 µl MTT I solüsyonu eklenmiştir ve kültür kapları MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için 4 saat 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl MTT II solüsyonu (SDS) eklenmiş ve bir gece boyunca CQ inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mossman, 1983).

#### 3.6.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi

Hücre sitoplazmasında bulunan bir enzim olan LDH, hücre zarı parçalandığında hücre içinden dış ortama geçer. Kültür ortamında hücrelerin ölümü ya da plazma zarında meydana gelen bir hasar LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır. İlk basamakta LDH laktatı piruvata çevirmektedir. Bu dönüşüm nedeniyle NAD<sup>+</sup> NADH/H<sup>+</sup>'ya indirgenmektedir. İkinci basamakta katalizör madde NADH/H<sup>+</sup> dan H<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> bir tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazan ürününe dönüşümünü gerçekleştirir. Oluşan renk miktarı, hücre zarındaki hasarın derecesiyle doğru orantılıdır. Bu yöntemde, 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. %1 HS serum içeren medyumda hazırlanmış kurkuminin altı farklı konsantrasyonu 24 saat uygulanarak 37°C CQinkübatöründe inkübe edildi. Deney süresinin tamamlanmasının ardından boya ve enzim solüsyonlarından oluşturulan kit karışımı her kuyuya 100 µl olmak üzere eklendi. 30 dakikalık inkübasyondan sonra oluşan sitotoksitesiye göre kırmızı formazan ürününün

artan renginin 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede verdiği absorbansın ölçülmesi ile sonuçlar elde edildi. Absorbans değerleri elde edildikten sonra oluşan toksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{\text{---}}{\text{---}} \times 100$$

### 3.7. GENOTOKSİSİTE

#### 3.7.1. Komet Testi

Komet testinin temel ilkesi, negatif yüklü hasar görmüş düşük molekül ağırlıklı DNA fragmanlarının elektroforez esnasında anoda doğru hareketi sırasında, kuyruklu bir yıldızın kuyruğuna benzer bir iz bırakmasıdır (Tice ve diğ., 2000; Dusinska ve Collins., 2008). Deneyde kullanılacak hücre grupları Tablo 3.7.1.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.7.1.1:** Komet testi deney grupları.

Kontrol Grubu	Pozitif Kontrol Grubu	Kurkumin Grubu
Neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri	Neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri  H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu (140 µM)	Neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri  Kurkumin grubu (15, 76 µM)

##### 3.7.1.1. Kullanılan Hücreler

Neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri 24 kuyulu kültür kaplarına 100.000 hücre yoğunluğunda ekildi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra deney grubundaki hücreler 15,46 µM kurkumin konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakıldı. DNA hasarının uyarılması için pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı. Kontrol grubundaki hücreler ise normal medyum ile muamele edildi. Maruziyet süresi tamamlandığında hücreler tripsin ile muamele edilerek kültür kaplarının yüzeyinden kaldırıldı ve santrifüj edilerek PBS ile süspansiyon edildi.

##### 3.7.1.2. Slayt Hazırlanması

%1,5 ‘lik normal erime noktasına sahip agaroz PBS içinde hazırlandı. Bu çözeltiden 80 µl alınarak lam üzerine damlatıldı. Lam üzeri lamel ile kapatılarak kurumaya bırakıldı. Ardından lamel kaldırılarak birinci agaroz tabakası tamamlandı.

20 µl hücre süspansiyonu 120 µl %0,5 düşük erime noktasına sahip agaroz ile karıştırıldı ve birinci agaroz tabakası üzerine bırakıldı. Lam lamel ile kapatılarak kurumaya bırakıldı. Ardından lamlar lizis tamponu ile bir saat süreyle muamele edildi. DNA zincirlerinin açılması için 20 dakika alkali denatürasyon ile muamele gerçekleştirildi ve yüksek pH'lı tamponda 300 mA ve 25 V'de yirmi dakika elektroforez gerçekleştirildi. Ardından lamlar nötralize edildi ve etanol ile dehidrasyon sağlandı. Hücreler DAPI ile beş dakika boyandı ve saf su ile yıkanmalarının ardından floresan mikroskopu ile incelendi.

### **3.8. İSTATİSTİK ANALİZ**

Deney gruplarında uygulanan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı ve laktat dehidrogenaz enzimi seviyesi verilerinin ve komet testinde yer alan parametrelerin Comet skor programından elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Graphpad Prism 5.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's testi uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde  $p < 0,001$  ve  $p < 0,01$  anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

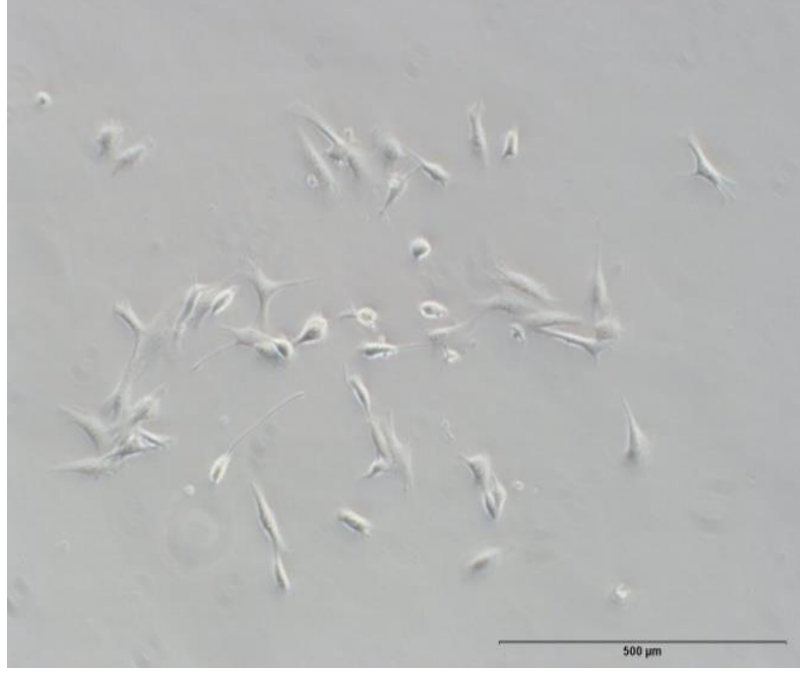
## 4. BULGULAR

### 4.1. HÜCRE TRANSFORMASYON DENEYİ BULGULARI

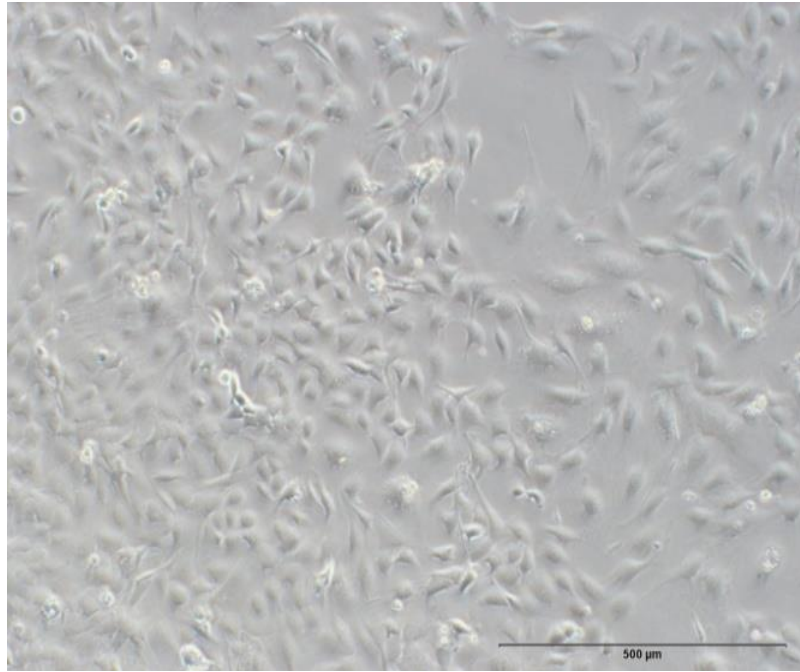
Hücre transformasyon deneyi otuz iki gün sürmüştür ve otuz iki gün sonunda, 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin arsenik ile uyarılmış morfolojik transformasyonunun gerçekleştiği görülmüştür. Hücrelerde meydana gelen neoplastik özellikteki morfolojik değişim arsenik ve TPA'ya maruz kalan deney grubunda belirgin bir şekilde görülmekteyken, kontrol grubundaki hücrelerin morfolojisinde neoplastik özellikte bir değişiklik görülmemiştir.

Transformasyon deneyinin üçüncü gününde, arseniğe maruz kalan hücrelerin sayısında azalma, morfolojik özelliklerinde ise neoplastik yönde değişim görülmüştür. Transformasyonun yedinci, on birinci, on dördüncü ve on yedinci günlerinde TPA ile muamele edilen hücrelerde ise kanser hücrelerine ait olan morfolojik özellikler ortaya çıkmış olup hücreler anormal bir büyüme göstermiştir. Hücreler yirmi birinci günden itibaren normal medyumla muamele edilmiş ve hücrelerin anormal bir şekilde sayılarını arttırarak foci denilen üst üste birikmiş kanser hücresi morfolojisine sahip hücre grupları oluşturdukları giemsa boyaması sonrasında mikroskop ile incelenerek belirlenmiştir. Deney grubunda gerçekleşen değişimler esnasında kontrol grubundaki hücrelerin büyüme potansiyellerinde ve morfolojilerinde herhangi bir değişiklik gerçekleşmemiştir.

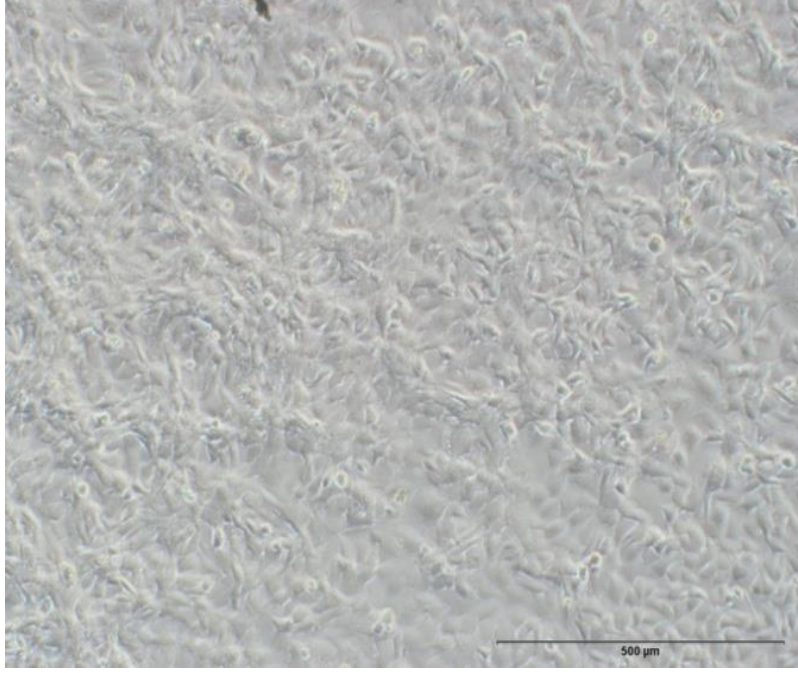
Şekil 4.1.1' de görüldüğü gibi, hücre transformasyon deneyinin dördüncü gününde hücre büyümesi normal büyüme seviyesinden yavaş gerçekleşmiştir. Deneyin on birinci gününde ise, morfolojisi neoplastik özellik kazanmaya başlamış ve büyüme hızı normal hücre büyüme hızının üzerinde bir büyüme göstermiştir (Şekil 4.1.2). Yirmi birinci günde hücrelerin normal morfolojik özelliklerini kaybederek iğsi bir şekil aldıkları ve rastgele bir yönelim gösterdikleri görülmüştür (Şekil 4.1.3). Deneyin otuz ikinci gününde tek tabakalı hücrelerin yerini üst üste birikerek foci oluşturan çok tabakalı bir hücre topluluğu oluşmuştur (Şekil 4.1.4).



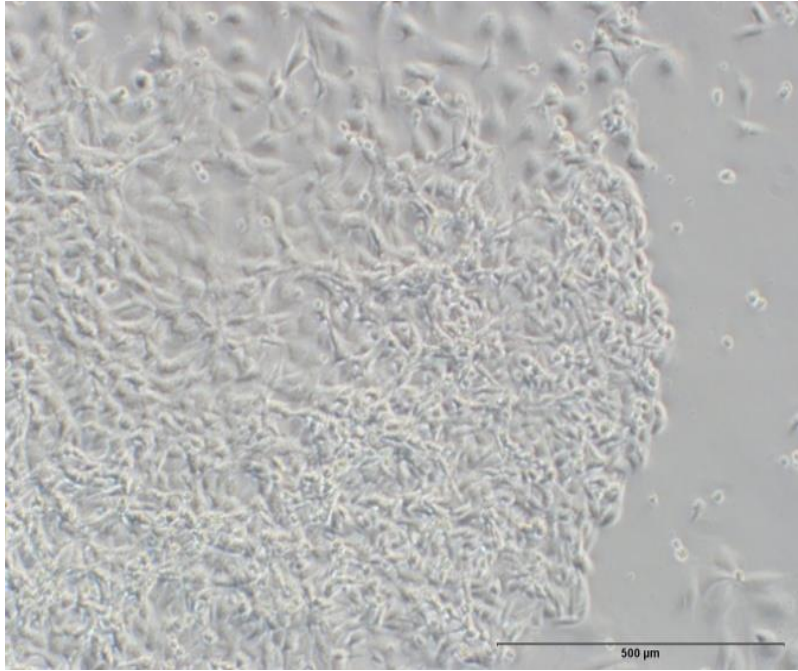
**Şekil 4.1.1:** Hücre transformasyon deneyi dördüncü gün.



**Şekil 4.1.2:** Hücre transformasyon deneyi on birinci gün



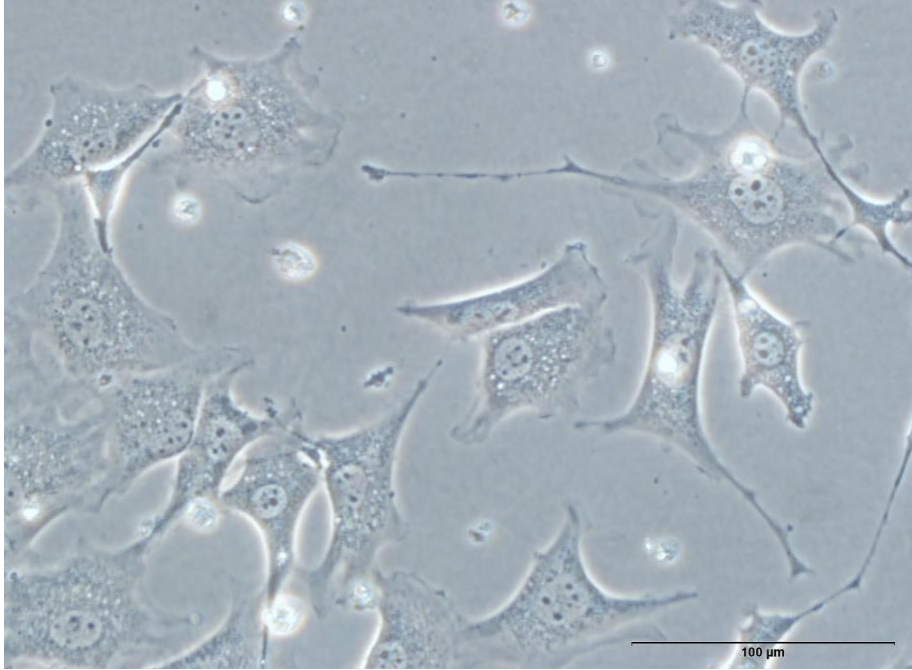
**Şekil 4.1.3:** Hücre transformasyon deneyi yirmi birinci gün.



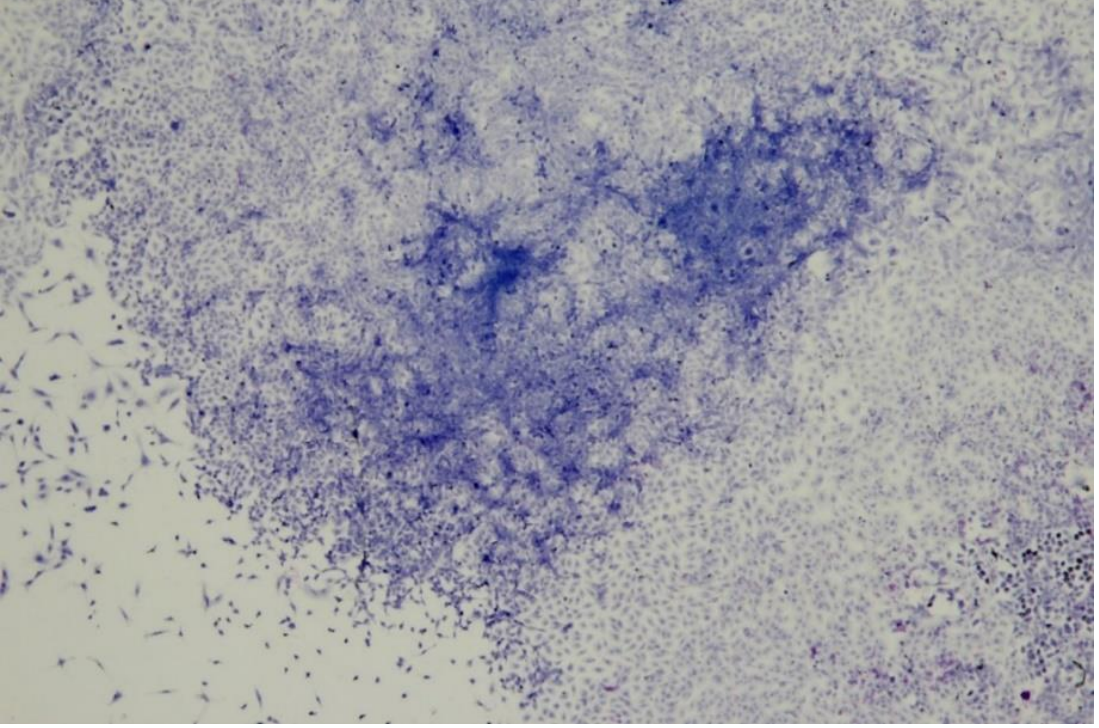
**Şekil 4.1.4:** Hücre transformasyon deneyi otuz ikinci gün.



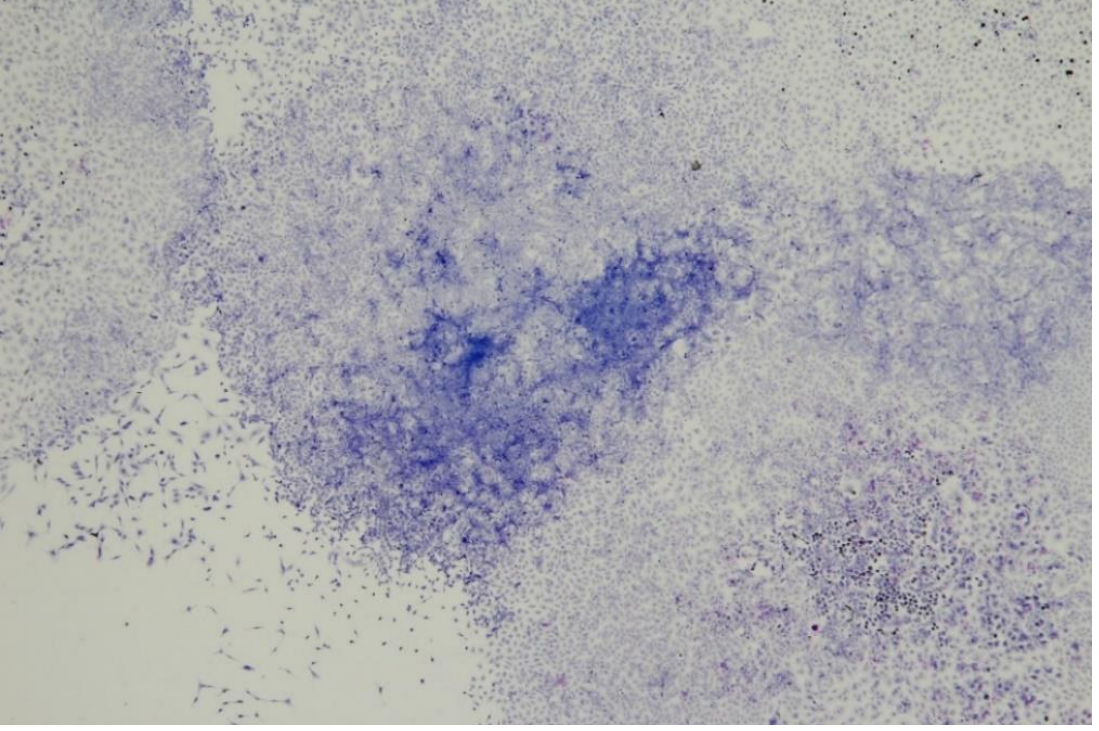
Şekil 4.1.5: Hücre transformasyon deneyi birinci gün.



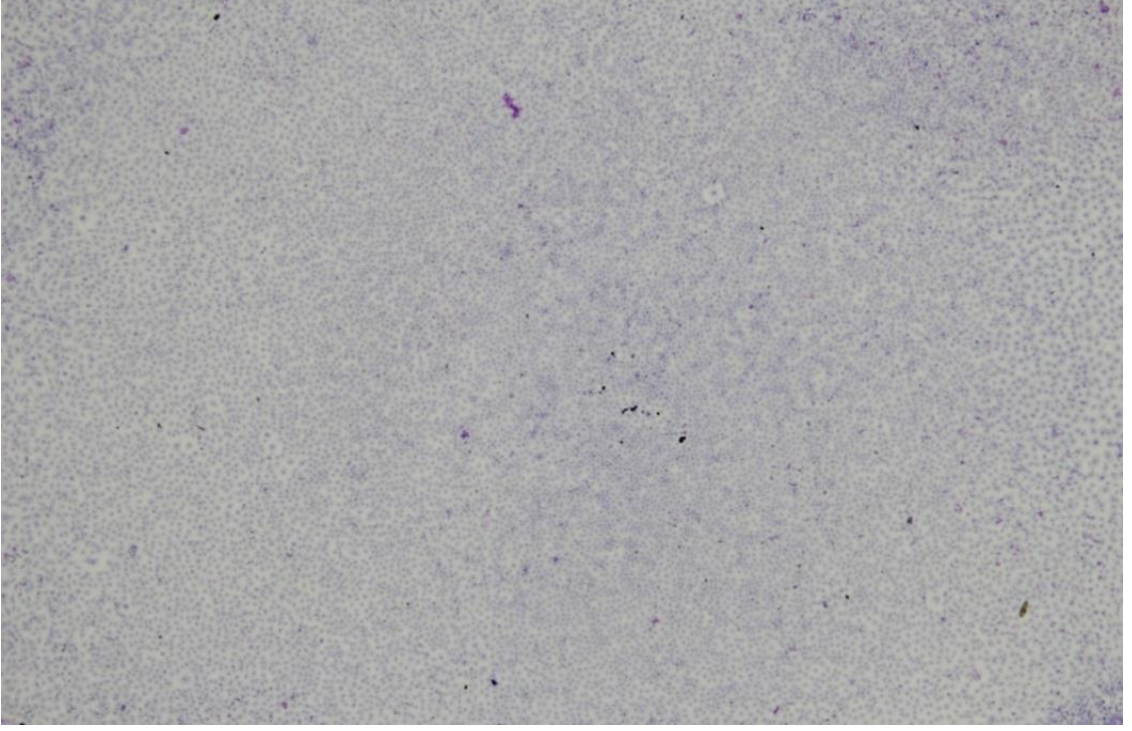
Şekil 4.1.6: Hücre transformasyon deneyi otuz ikinci gün.



**Şekil 4.1.7:** Deney grubu giemsa boyaması (x50).



**Şekil 4.1.8:** Deneş grubu giemsa boyaması (x32)

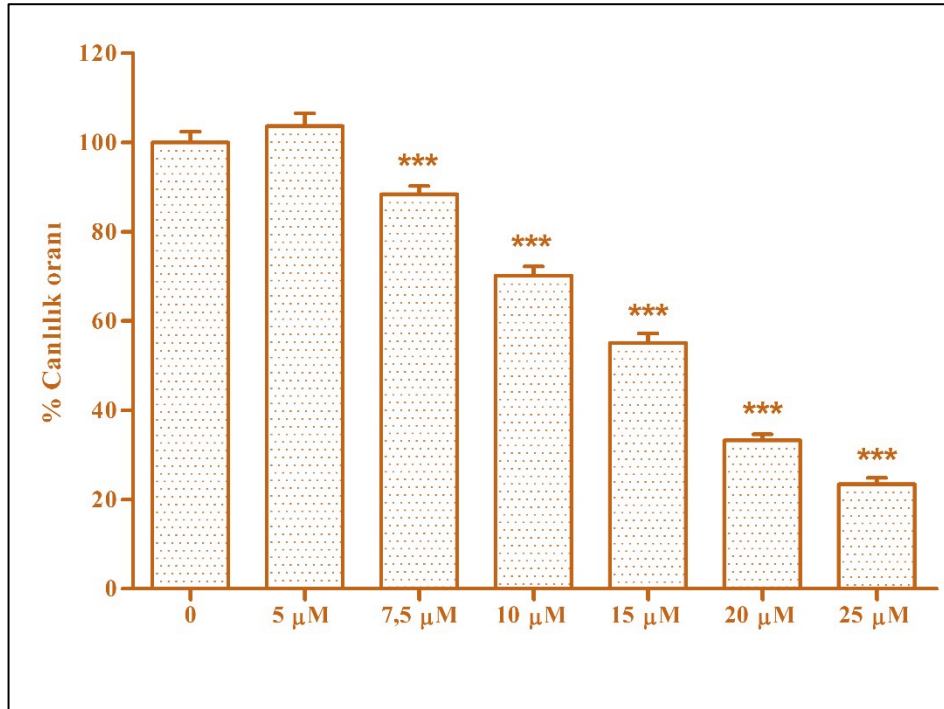


**Şekil 4.1.9:** Kontrol grubu giemsa boyaması (x32)

## 4.2. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

### 4.2.1. MTT Hücre Canlılığı Testi Bulguları

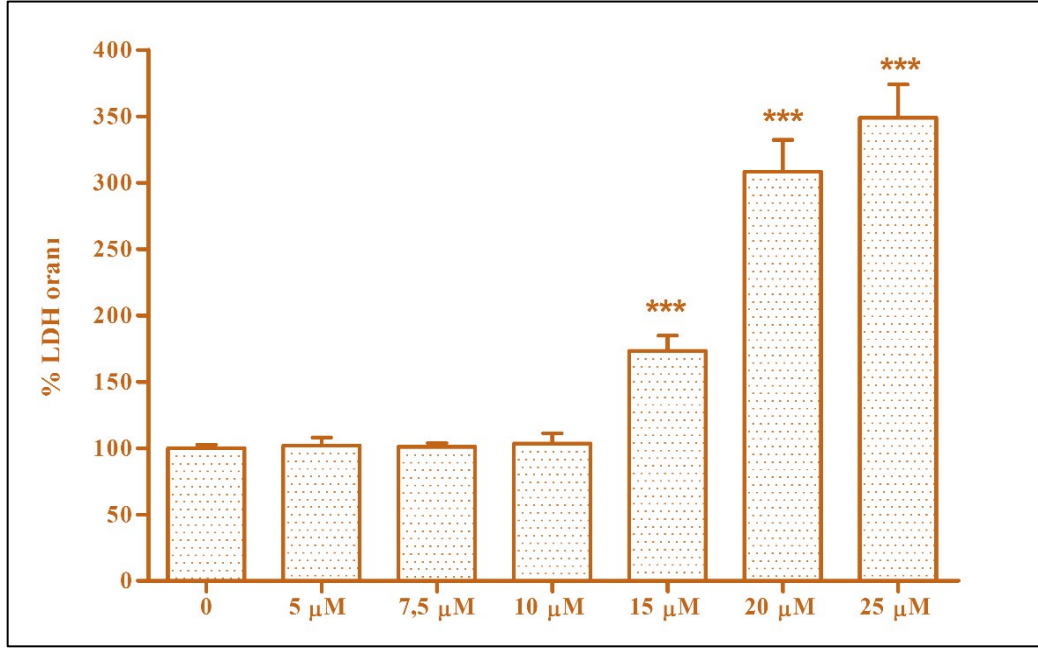
Kurkuminin altı farklı konsantrasyonunun neoplastik değişime uğramış 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine 24 saatteki etkisi MTT hücre canlılığı testi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranları şekil 4.2.1.1'de verilmiştir. Kurkuminin neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 5  $\mu$ M kurkumin konsantrasyonunda MTT değerleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunamazken, diğer konsantrasyonlarda MTT değerleri bakımından anlamlı bir azalma bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). MTT hücre canlılığı testi sonucunda kurkuminin  $IC_{50}$  değeri 15,76  $\mu$ M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2.1.1: Kurkuminin neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri.

#### 4.2.2. Laktat Dehidrogenaz Enzimi Aktivitesi Bulguları

Neoplastik değişime uğramış 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak  $\text{NADPH}^+$ 'daki azalma hızı oranına bağlı olarak hesaplanan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarı Şekil 4.2.2.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve kurkuminin altı farklı konsantrasyonu LDH miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$  10  $\mu\text{M}$  anlamlı bir farklılık bulunamazken 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında anlamlı bir artış bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.2.2.1: Kurkuminin neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesine (konsantrasyona ve zamana bağlı) etkileri ( $p < 0,001$ ).

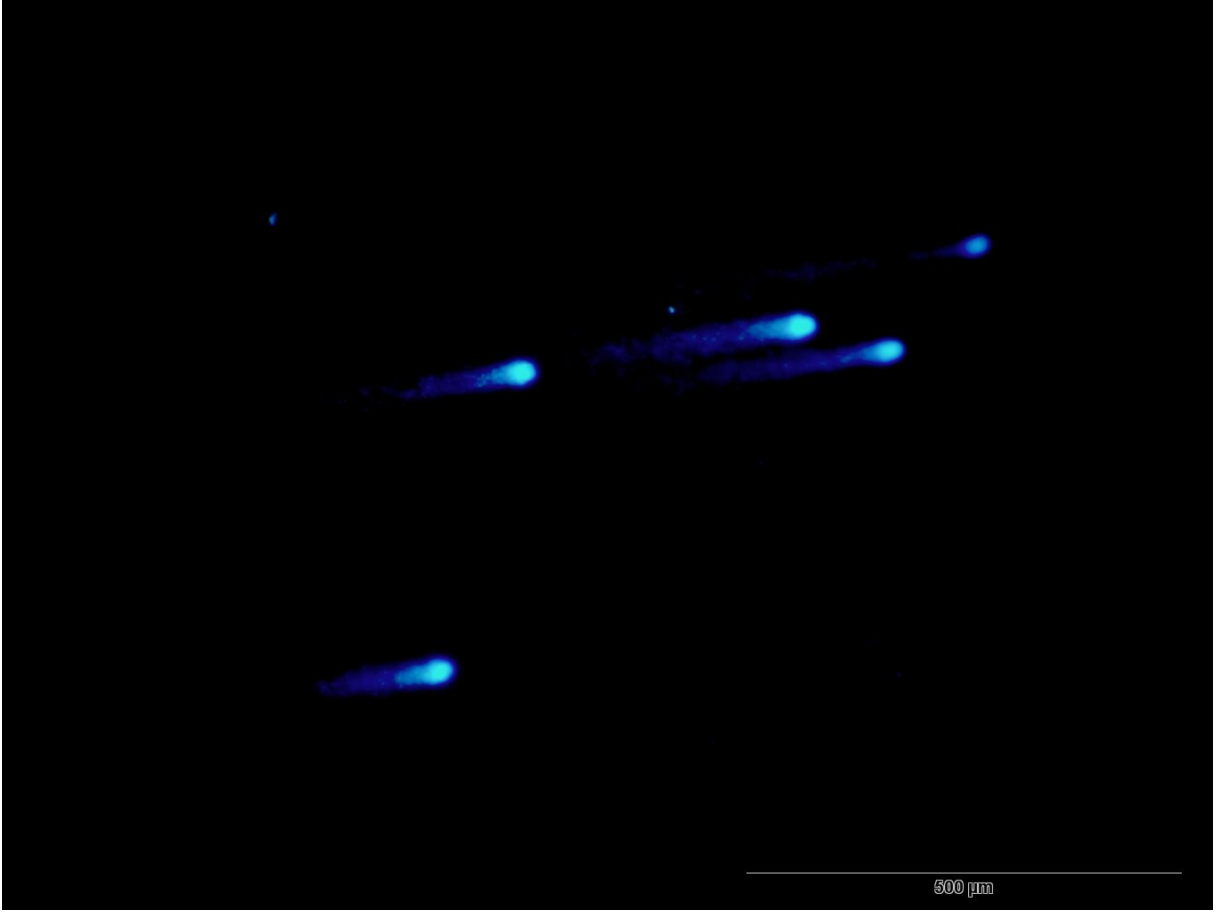
### 4.3. GENOTOKSİSİTE BULGULARI

#### 4.3.1. Komet Testi Bulguları

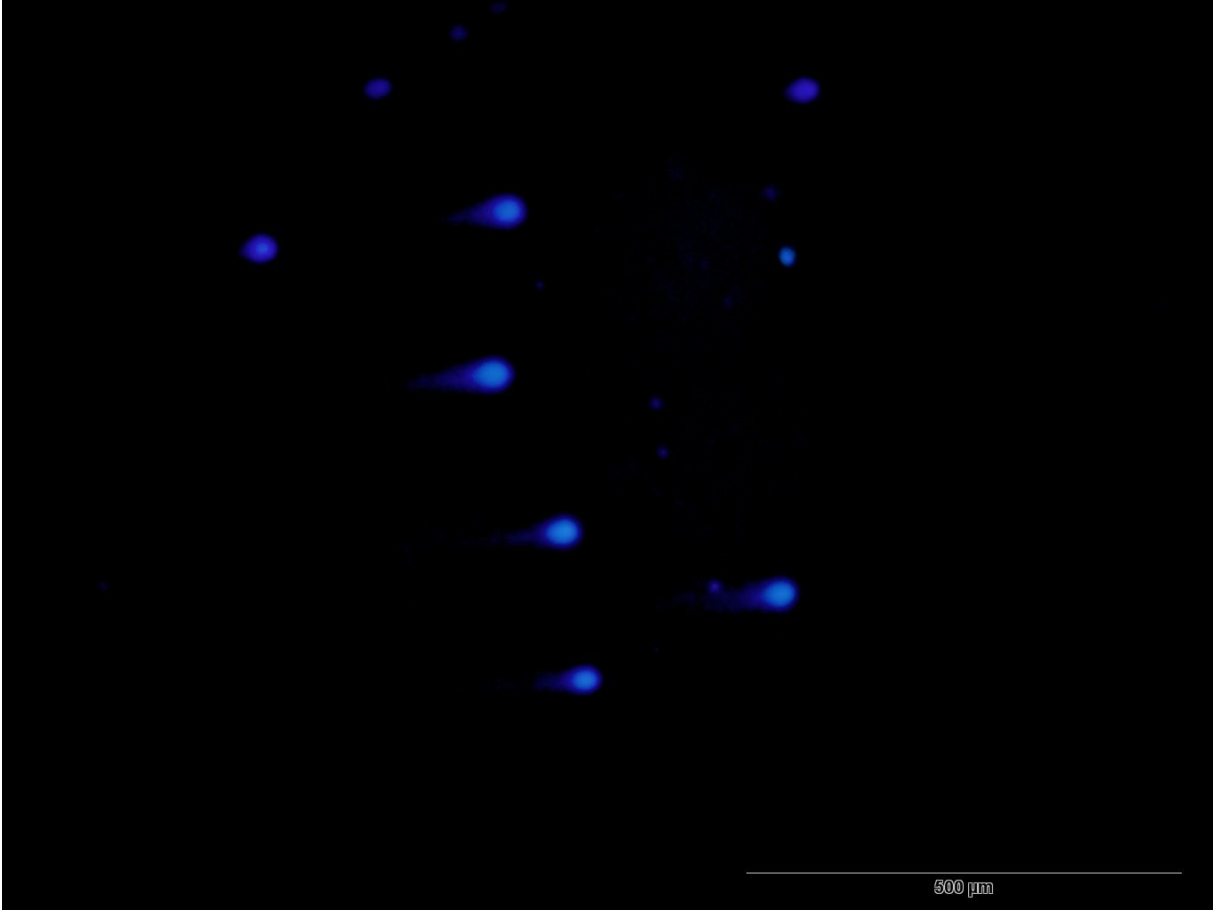
Neoplastik değişime uğramış 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde yapılan komet testi ile kurkumine maruz kalan deney grubundaki hücreler pozitif kontrol deney grubu ile karşılaştırılmıştır. Deney grupları arasında komet olarak adlandırılan kuyruklu yıldız benzeri hücre oluşumu en fazla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz kalan pozitif kontrol grubunda görülmüştür (Şekil 4.3.1.1). Kurkumine maruz kalan grup olan deney grubunda yer alan hücrelerde de komet görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.3.1.3). Kontrol grubu olan neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde ise komet oluşumu görülmemiştir (Şekil 4.3.1.2). Literatürde komet testi ile ilgili birçok parametre çalışılmıştır. Kuyruk % DNA miktarı, kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momentini bu parametrelerdendir. Kuyruk uzunluğu hücredeki DNA hasarının miktarını belirtirken, olive kuyruk momentini ise bir hücre popülasyonundaki heterojeniteyi belirtmektedir. Ayrıca kuyruk % DNA miktarı, genotoksik ajanın etkisini en iyi şekilde belirten parametredir. Deney grupları karşılaştırıldığında bu parametrelerin en yüksek seviyesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda görülürken, kurkumin grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında kurkuminin neoplastik değişim geçiren hücrelerde anlamlı bir şekilde genotoksik etki gösterdiği görülmektedir (Tablo 4.3.1.1).

**Tablo 4.3.1.1:** Komet testi deney gruplarında kuyruk %DNA miktarı, kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momentini karşılaştırılması.

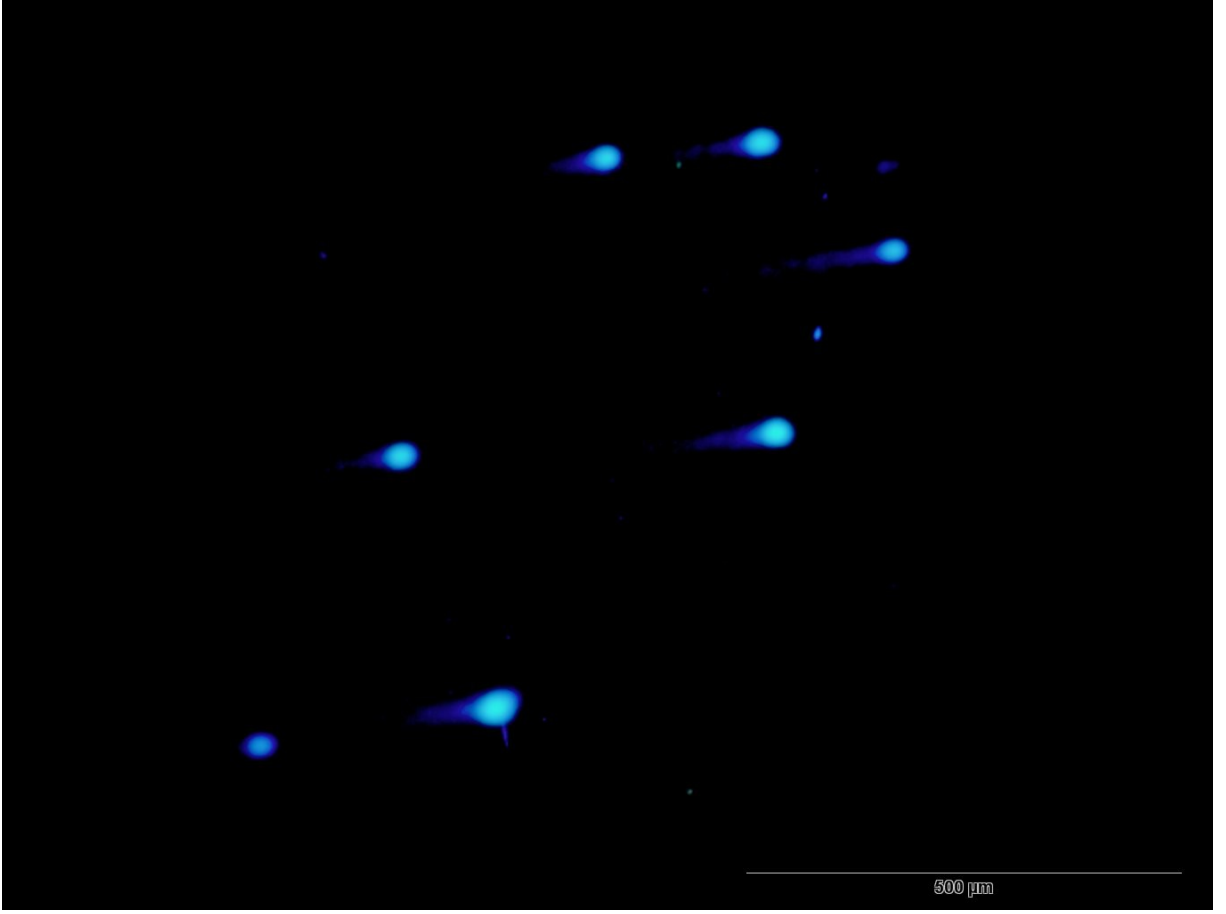
Gruplar	Kuyruk % DNA miktarı	Kuyruk uzunluğu	Olive kuyruk momentini
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	72,38 ± 1,18	95,47 ± 1,27	11,17 ± 1,63
Kontrol	31,03 ± 1,05**	57,02 ± 1,62**	3,92 ± 1,08**
Kurkumin	40,18 ± 1,15**	61,42 ± 1,08**	5,03 ± 0,96*



Şekil 4.3.1.1: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu hücrelerinin komet görüntüsü.



Şekil 4.3.1.2: Kontrol grubu hücrelerinde komet görüntüsü.



Şekil 4.3.1.3: Kurkumin grubu komet görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arsenik hücreler ve dokular üzerine çeşitli biyolojik etkileri olan bir metalloiddir (Platanias, 2009). Doğada neredeyse her yerde düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Arseniğin miktarı doğada çevresel veya antropojenik kaynaklara bağlı olarak arttığında insan sağlığı ve diğer canlıların sağlığı için bir tehdit oluşturmaktadır. (Tchounwou ve diğ., 2003). İnsanların arseniğe olan başlıca maruziyet yolu, kontamine olmuş yeraltı sularına maruziyetten kaynaklanmaktadır. Kontamine olmuş sularda yaşayan balıkların yiyecek olarak tüketimi de önemli bir sorundur (Huang ve diğ., 2015). Ayrıca doğada miktarı artan arsenik konsantrasyonu, sindirim, nefes alma ve cilde temas yollarıyla insan sağlığını büyük ölçüde tehlikeye atmaktadır ve sağlığa olan olumsuz etkileri çeşitli hastalıkların ortaya çıkışında büyük ölçüde rol oynamaktadır (Vimercati ve diğ., 2017).

İnorganik arsenik bilinen bir kanserojendir (Concha ve diğ., 1988). Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki, inorganik arsenik maruziyeti cilt, akciğer, karaciğer ve prostat kanseri gibi kanser türleri için güçlü bir risk faktörüdür (IARCH, 1980; Chen ve diğ., 1985). Solunum yoluyla maruz kalınan arseniğin başlıca olarak akciğer kanserine ait tümör oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. (Lee-Feldstein, 1983). Ayrıca arseniğe oral maruziyet sonucunda cilt kanserine neden olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Tseng ve diğ., 1968; Cebrian ve diğ., 1983). Kronik olarak arsenikle kontamine olmuş suların tüketiminin iç organlarda çeşitli kanser türlerinin oluşumuna neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu kanser türlerinin oluştuğu alanlar arasında mesane, böbrek ve karaciğer yer almaktadır (Smith ve diğ., 1992; Bates ve diğ., 1995).

İnorganik arsenik bileşikleri ayrıca, birçok hücre soyu üzerine sitotoksik ve genotoksik etki göstermektedir (Rein ve diğ., 1979; Li and Broome, 1999). Yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda arseniğe maruz kalmış olan insan fibroblast hücrelerinde kinetikor pozitif ve kinetikor negatif mikronükleinin çeşitli yönlerinin uyarıldığı gösterilmiştir (Yih ve Lee, 1999). İnorganik arseniğin patojenik etkileri karmaşık ve çok faktörlüdür. Arsenik toksisitesinin başlıca mekanizması hücrede serbest radikallerin üretilmesine neden olarak oksidatif hasar oluşturmaktır (Flora, 2011). Yapılan çalışmalarda, arseniğin DNA'da

mikronüklei, delesyon, kardeş kromatit değişimi, kromozom anomalileri gibi değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Kouser ve Javed, 2015; Rossman, 2003).

İnorganik arseniğin kanserojen etkisi göreceli olarak arttırılan yüksek dozlarda arseniğe maruz kalmış deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (Germolec ve diğ., 1997). Metillenmiş bir arsenik metaboliti olan dimetilarsinik asit (DMMA) ile yapılan bir çalışmada, bu arsenik türünün bir tümör arttırıcı gibi hareket ettiği gösterilmiştir (Wanibuchi ve diğ., 1996, Yamanaka ve diğ., 1996). Çeşitli *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki, arsenik kromozomal bozulma ve DNA tamiri inhibisyon testlerinde pozitif sonuç vermiştir (Rossman, 2003).

Chen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sıçan karaciğer epitelyal hücrelerini 18 hafta süreyle arseniğin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. Maruziyet sonucunda hücrelerin kanser hücresi özelliği kazanarak malignant transformasyona uğradı görülmüştür (Chen ve diğ., 2001). Yapılan başka bir çalışmada WPE kök hücreleri 10 hafta boyunca 5 µM arseniğe maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrasında hücreler kontak inhibisyon yeteneklerini kaybetmişlerdir. Ayrıca hücrelerin invaziv olma yetenekleri artmıştır ve matriks metalloproteinaz-9 sekresyonu ise yüksek miktarda artmıştır (Tokar ve diğ., 2009). Tümörogenik olmayan insan keratinosit hücre soyu HaCaT hücreleri yirmi sekiz hafta 100 Nm inorganik arsenite maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrası hücrelerde malignant transformasyon meydana gelmiştir. Ve transformasyon geçiren hücreler farelere enjekte edildiğinde agresif bir skuamöz hücre karsinoması oluşturmuşlardır (Pi ve diğ., 2008).

Arseniğin neoplastik hücre değişimini uyarıcı etkisi, çeşitli hücre soyları ve dokular üzerinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır. İn vitro hücre transformasyon deneylerinde, inorganik arsenik bileşikleri, Syrian hamster embriyo hücrelerinde koloni deneyinde transformasyonu uyarmıştır (Lee ve diğ., 1985). Balb/c 3T3 hücreleri kullanılarak yapılan foci oluşumu deneyinde de inorganik arseniğin transformasyonu uyardığı görülmüştür (Landolp, 1994). Transformasyon deneylerinde arsenik bileşikleri transformasyonu başlatıcı bir etki göstermiştir. Transformasyonun artan evresinde TPA eklendiğinde hücre transformasyonu konsantrasyona bağlı olarak önemli derecede artış göstermiştir (Toshiyuki ve diğ., 2005).

Zhao ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, TRL 1215 sıçan karaciğer hücreleri sekiz hafta 0,5  $\mu\text{M}$  arseniğe kronik olarak maruz bırakmışlardır. Maruziyet sonucunda hücreler transformasyona uğramış ve morfolojik yapılarında neoplastik özelliklere sahip değişmeler meydana gelmiştir (Zhao ve diğ., 1997). Stueckle ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, BEAS-2B akciğer epitelyal hücreleri altı ay boyunca kronik olarak arseniğe maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrasında hücre çoğalması, koloni oluşumu, hücrelerin invazyon yeteneği ve *in vivo* tümör oluşturma potansiyelleri kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda arseniğe maruz kalan grupta yer alan hücrelerde reaktif oksijen türlerinin miktarının arttığı görülmüştür. Bu artışın kanser oluşumunu başlatıcı yönde etkili olduğu belirlenmiştir (Stueckle ve diğ., 2012). İnsan epidermal prostat hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, hücreler 5 $\mu\text{M}$  arseniğe maruz bırakılmıştır ve hücrelerin transformasyon evreleri incelenmiştir ve yirmi dokuz haftalık maruziyet sonucunda hücrelerin malignan transformasyon geçirdiği görülmüştür (Achanzar ve diğ., 2002).

Yapılan bu çalışmada, Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri otuz iki gün süren hücre transformasyon deneyinin başlangıç aşamasında 10  $\mu\text{M}$  arseniğe maruz bırakılmıştır. Deneyin ikinci aşamasında ise 0,1  $\mu\text{M}$  TPA'ya maruz bırakılarak neoplastik değişimin arttığı gözlenmiştir. Deney grubundaki hücreler kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırıldığında ise, deney grubundaki hücrelerin normal morfolojik özelliklerini kaybederek malign hücre karakterlerini kazandığı ve hızlı bölünme göstererek üst üste birikmiş hücre topluluklarını oluşturdukları görülürken kontrol grubundaki hücrelerde herhangi bir morfolojik değişim ve bölünme hızında farklılık görülmemiştir. Bu sonuç Toshuyiki ve diğerlerinin (2005) yaptığı çalışma ile uyum göstermektedir.

Kanser dünyada yaygın olarak görülen bir hastalıktır. (Ma ve Yu, 2006). Hastalığın oluşum nedeninin büyük bir kısmında genetik faktörler etkili olurken, çevresel faktörler, sigara ve alkol tüketimi ve beslenme alışkanlıkları da hastalığın oluşmasında önemli bir role sahiptir (Anand ve diğ., 2008). Doğa zengindir ve dünyanın birçok yerinde bitkilerden türetilen çok sayıda bileşiğin kanser tedavisinde etkili olabileceğine dikkat çekilmektedir. Ayrıca bu doğal bileşikler kemoterapik ilaçlara oranla daha düşük seviyede toksik olmaktadır.

Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin rizomundan elde edilen yağda çözünebilen bir bileşiktir. Geçmişten günümüze besin maddesi olarak tüketilen zerdeçalın etken maddesidir ve

antienflamatuvar, antioksidan, serbest radikalleri süpürücü etkisi gibi birçok sağlığı olumlu yönde etkileyebilecek özelliklere sahiptir (Gupta ve diğ., 2013). Günümüzde yapılan klinik denemeler göstermiştir ki, kurkumin insan vücudunda tolere edilebilir ve güvenli bir bileşiktir (Gupta ve diğ., 2013). Ayrıca *in vitro* çalışmalar kurkuminin özellikle akciğer kanseri olmak üzere birçok kanser hücre soyunda büyümeyi baskıladığını göstermiştir (Liu ve diğ., 2016; Watson ve diğ., 2010; Chang ve diğ., 2012). Kurkumin kanser hücrelerinde hücre döngüsünün tutulmasını indükler ve apoptoz aracılı hücre ölümünü sağlamaktadır (Kang ve diğ., 2015; Han ve diğ., 2016; Xia ve diğ., 2014).

Literatürde neoplastik değişime uğramış Balb/c 3T3 hücrelerinde kurkuminin hücre canlılığına etkisi üzerine yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat çeşitli kanser hücre soylarında kurkuminin hücre canlılığını azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, 253JB-V ve KU7 mesane kanseri hücreleri 10-25  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyonları arasında kurkumin ile tedavi edilmişlerdir. Tedavi sonrasında kurkuminin hücre büyümesini inhibe ettiği ve ayrıca apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Chadalapaka ve diğ., 2008). Mesane kanser hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, MTT testi, Transwell testi ve flow sitometri testi ile kurkuminin hücre büyümesi, apoptoz ve migrasyon üzerine etkisi değerlendirilmiştir ve western blot analizi ile ilgili mekanizmalar incelenmiştir. Çalışma sonucunda kurkuminin T24 mesane karsinoma hücreleri ve 5637 insan mesane karsinoma hücrelerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca kurkuminin hücre göçünü inhibe ettiği ve metalloproteinaz sinyal yolağını baskılayarak mesane kanserinde apoptozu uyardığı *in vitro* olarak doğrulanmıştır (Shi ve diğ., 2017). A549 insan akciğer adenokarsinoma hücre soyunda yapılan bir çalışmada, MTT deneyi ile hücrelerin canlılığı ölçülmüştür. Konsantrasyona ve zamana bağlı olarak kurkumin tedavisini takiben bu hücrelerde hücre canlılığı inhibe olmuştur (Liu ve diğ., 2007).

A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soyları hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hücreler farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda kurkumin ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında kurkumin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini inhibe etmiştir. LC50 konsantrasyonu ise 50 ve 40  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Pillia ve diğ., 2004). HT29 kolan kanseri hücre soyunda yapılan bir çalışmada, hücreler (0-75 $\mu\text{M}$ ) kurkumin ile 6,12,24,48 ve 72 saat tedavi edilmiştir. Tedavi sonucunda MTT hücre canlılığı testi ile kurkuminin hücre büyümesine olan etkisi değerlendirilmiştir. Ve deney sonucunda hücre büyümesini en etkili

şekilde inhibe eden kurkumin konsantrasyonu ve zamanı 70  $\mu\text{M}$  ve 72 saat olarak bulunmuştur (Goel ve diğ., 2001). CR ovaryum kanseri hücre soyunda yapılan bir çalışmada, hücreler (0-50  $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonlarda kurkumin ile 48 saat tedavi edilerek hücre çoğalması MTT hücre canlılığı testi ile değerlendirilmiştir. Deney sonucunda IC50 konsantrasyonu 20  $\mu\text{M}$  olarak bulunarak kurkuminin bu hücrelerde hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Weir ve diğ., 2007).

MCF-7 and MDA-MB-23 meme kanseri hücre soylarında yapılan bir çalışmada, hücreler (1-75  $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonlarda kurkumin ile 24 saat tedavi edilmiştir. MTT hücre canlılığı testi yapılarak bu test sonucunda MCF7 hücreleri için IC50 konsantrasyonu 35  $\mu\text{M}$  olarak bulunurken, MDA-MB-23 hücreleri için IC50 konsantrasyonu 30  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (Prasad ve diğ., 2009).

Yapılan başka bir çalışmada, BxPC-3 ve PANC-1 pankreas hücre soyları 1-3 gün boyunca 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ve 15  $\mu\text{M}$  kurkumin ile tedavi edilmiştir. MTT hücre canlılığı testinin sonucu göstermiştir ki kurkumin bu konsantrasyonlarda konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini inhibe etmektedir (Wang ve diğ., 2006). Özafagus kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hücreler 5-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında kurkumin ile 24 saat tedavi edilmişlerdir. Tedavi sonucunda hücre canlılığının önemli derecede azaldığı MTT hücre canlılığı testi ile görülmüştür (O'Sullivan-Coyne ve diğ., 2009).

Yapılan bu çalışmada Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin arsenikle uyarılmış neoplastik değişimi üzerine kurkuminin sitotoksik ve genotoksik etkisi incelenmiştir. MTT hücre canlılığı testi ile kurkuminin hücreler üzerine sitotoksik etki göstererek hücre canlılığını azaltığının görülmesi ve kurkuminin kontrol grubundaki hücrelere kıyasla laktat dehidrogenaz aktivitesinin artırması yukarıdaki çalışmalarla uyum göstermektedir.

İnsan astroglioma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, kurkuminin TPA ile uyarılmış PKC aktivitesini inhibe ettiği ve AP-1 ve MMP9 seviyesini ise aşağı yönde düzenlediği gösterilmiştir (Woo ve diğ., 2005). Tiwari ve Rao (2010) yaptıkları bir çalışmada, arsenik ve floride maruz bırakılmış olan insan periferik kan hücrelerini 1.7  $\mu\text{M}$  kurkumin ile tedavi etmişlerdir ve kurkuminin etkili bir şekilde arsenik florid toksisitesini azalttığını göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, insan HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde 10-25  $\mu\text{M}$  kurkumin endoplazmik retikulumdan  $\text{Ca}^{2+}$  salınımını inhibe ederek PKC

aktivasyonunun inhibisyonunu sağlamıştır (Dyer ve diğ., 2002; Wang ve diğ., 2006). Prust ve Das'ın yaptıkları bir çalışmada, kurkuminin servikal kanseri hücrelerinde AP-1'in ifadesini aşağı yönde düzenlediği gösterilmiştir (Prusty ve diğ., 2005). Yapılan başka bir çalışmada, insan hepatosit L02 hücrelerinde frolozidon kaynaklı DNA hasarı oluşturulmuştur. Kurkuminle ön tedavi edilen hücrelerde frolozidon kaynaklı oksidatif stresin azaldığı gösterilerek kurkuminin koruyucu etkisi öne çıkarılmıştır. Ayrıca komet deneyi ile kurkuminin frolozidon kaynaklı DNA hasarını konsantrasyona bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Dai ve diğ., 2016). Kolon kanseri hücreleri olan kolo 205 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, kurkuminin kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla apoptozu uyardığı görülmüştür. Kurkuminin bu hücrelerde konsantrasyona ve zaman bağlı olarak sitotoksiteyi ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Su ve diğ., 2005). HepG2 karaciğer karsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücreler, 0, 2.5, 5, 10, 20, ve 40 µg/ml kurkumine 1 saat maruz bırakılmıştır. Deney sonucunda kurkuminin HepG2 hücrelerinde DNA zincir kırıklarına neden olduğu görülmüştür (Cao ve diğ., 2006). Yapılan başka bir çalışmada, sıçan periferel lenfosit hücreleri sipermetrin ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında hücrelerde komet testi ile çeşitli parametreler incelenmiştir. Sipermetrine maruz kalan hücrelerde kontrol grubuna göre kuyruk uzunluğunun önemli derecede arttığı görülmüştür. Kurkumin ile tedavi edilen hücreler ile sipermetrine maruz kalan hücrelerin kuyruk uzunluğu karşılaştırıldığında ise, kurkumin ile tedavi edilen hücrelerde kuyruk uzunluğunun azaldığı görülmüştür (Sankar ve diğ., 2010). İnsan akciğer karsinoma hücresi olan A-549 hücresinde yapılan bir çalışmada, hücreler 0, 5, 10, 30 ve 50 µM kurkumin konsantrasyonları ile 24 saat tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında hücrelerde komet testi ile DNA hasarı incelenmiştir. Deney sonucunda kurkuminin A-549 hücrelerinde DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonda kurkumin uzun bir komet kuyruğunu oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (Lin ve diğ., 2008).

Yapılan bu çalışmada, komet testi ile kurkuminin neoplastik değişime uğramış hücreler üzerinde genotoksik etkisi incelenmiştir. Kurkumine maruz kalan hücreler kontrol grubundaki hücrelerle kıyaslanmış ve bu hücrelerde DNA hasarının belirteci olan komet oluşumunun pozitif kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırılarak doğrulanması yukarıdaki çalışmalarla uyum göstermektedir.

HCT116 kolorektal karsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hücreler 50 µM konsantrasyonda kurkumin ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonrası yapılan komet testi ile kurkuminin önemli derecede DNA hasarına neden olarak ve hücrelerde komet kuyruğunun oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Lu ve diğ., 2011).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, kronik arsenik maruziyetinin Balb/c 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde neoplastik değişimi uyararak hücrelerin malign hücre karakteri kazanmasına neden olduğu görülmüştür. Otuz iki gün süren hücre transformasyon deneyinde, 10 µM arseniğin neoplastik değişimi başlattığı ve TPA'nın bu değişimi arttırıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir. Neoplastik değişime uğrayan bu hücrelerin, kurkumin ile çeşitli konsantrasyonlarda tedavi edilmesi sonucunda, hücre canlılığında anlamlı bir şekilde azalma görülmesi ve laktat dehidrogenaz enzim aktivitesinde ise anlamlı bir artış görülmesi kurkuminin antikanserojen etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca komet testi ile kurkuminin neoplastik değişime uğramış hücreler üzerine genotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak günlük yaşamımızda kronik olarak maruz kaldığımız arseniğin, kanser oluşumunu başlatıcı etkisi ve fitokimyasal bir madde olan kurkuminin tedavi edici yönde etki ettiği belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aaronson, S.A. and Todaro, G.J., 1968, Development of 3T3 - like lines from Balb/c mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40, *Journal of Cellular Physiology*, 72 (2), 141-148.
- Achanzar, W.E., Brambila, E.M., Diwan, B.A., Webber, M.M., Waalkes, M.P., 2002, Inorganic arsenite-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells, *Journal of the National Cancer Institute*, 94 (24), 1888-1891.
- Aggarwal, B.B. and Harikumar, K.B., 2009, Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41 (1), 40-59.
- Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C., 2003, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research*, 23 (1/A), 363-398.
- Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J.N., Aggarwal, B.B., 2004, Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor -  $\kappa$ B signaling, *International Journal of Cancer*, 111 (5), 679-692.
- Ahmad, K., Bhatti, I.A., Muneer, M., Iqbal, M., Iqbal, Z., 2012, Removal of heavy metals (Zn, Cr, Pb, Cd, Cu and Fe) in aqueous media by calcium carbonate as an adsorbent, *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 2, 48-53.
- Akter, K.F., Owens, G., Davey, D.E., Naidu, R., 2005, Arsenic speciation and toxicity in biological systems, *In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 97-149.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002, *Fibroblasts and their transformations: the connective-tissue cell family*, Molecular Biology of the Cell 4th. Edition, New York: Garland Science; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26902/>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002, *The Molecular Basis of Cancer-Cell Behavior*, Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26902/>
- Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E., 1973, An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (3), 782-786.
- Ammon, H. P., Wahl, M. A. 1991, Pharmacology of *Curcuma longa*, *Planta Medica*, 57 (01), 1-7.

- Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B., 2008, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharmaceutical Research*, 25 (9), 2097-2116.
- Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., 2008, Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution, *Cancer Letters*, 267 (1), 133-164.
- Andraszek, K., Banaszewska, D., Czubaszek, M., Wójcik, E., Szostek, M., 2014, Comparison of different chromatin staining techniques for bull sperm, *Archives Animal Breeding*, 57 (1), 1-15.
- Basu, A., Som, A., Ghoshal, S., Mondal, L., Chaubey, R.C., Bhilwade, H.N., Rahman, M.M., Giri, A.K., 2005, Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India, *Toxicology Letters*, 159 (1), 100-112.
- Bates, M.N., Smith, A.H., Cantor, K.P., 1995, Case-control study of bladder cancer and arsenic in drinking water, *American Journal of Epidemiology*, 141 (6), 523-530.
- Benbrahim-Tallaa, L. and Waalkes, M.P., 2007, Inorganic arsenic and human prostate cancer, *Environmental Health Perspectives*, 116 (2), 158-164.
- Benhar, M., Engelberg, D., Levitzki, A., 2002, ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer, *EMBO Reports*, 3 (5), 420-425.
- Bertolero, F., Pozzi, G., Sabbioni, E., Saffiotti, U., 1987, Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation, *Carcinogenesis*, 8 (6), 803-808.
- Bertram, J.S., 2000, The molecular biology of cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, 21 (6), 167-223.
- Blagosklonny, M.V., 2005, Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention, *Cell Death and Differentiation*, 12 (6), 592.
- Blasiak, J., Trzeciak, A., Kowalik, J., 1999, Curcumin damages DNA in human gastric mucosa cells and lymphocytes, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 18 (4), 271-276.
- Bundschuh, J., Litter, M.I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H.B., Jean, J.S., Liu, C.W., Lopez, D., Armienta, M.A., Guilherme, L.R. Cuevas, A.G., 2012, One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries, *Science of the Total Environment*, 429, 2-35.
- Cao, J., Jia, L., Zhou, H.M., Liu, Y., Zhong, L.F., 2006, Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells, *Toxicological Sciences*, 91 (2), 476-483.

- Carter, S.B., 1967, Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature*, 213 (5073), 261.
- Chadalapaka, G., Jutooru, I., Chintharlapalli, S., Papineni, S., Smith, R., Li, X., Safe, S., 2008, Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells, *Cancer Research*, 68 (13), 5345-5354.
- Chan, P.C. and Huff, J., 1997, Arsenic carcinogenesis in animals and in humans: mechanistic, experimental, and epidemiological evidence, *Journal of Environmental Science & Health Part C*, 15 (2), 83-122.
- Chang, C.C., Fu, C.F., Yang, W.T., Chen, T.Y., Hsu, Y.C., 2012, The cellular uptake and cytotoxic effect of curcuminoids on breast cancer cells, *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 51 (3), 368-374.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U. and Banerjee, R.K., 2004, Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications, *Current Science Bangalore*, 87, 44-53.
- Chen, C.J., Chen, C.W., Wu, M.M. and Kuo, T.L., 1992, Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water, *British Journal of Cancer*, 66 (5), 888.
- Chen, H., Liu, J., Merrick, B.A., Waalkes, M.P., 2001, Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: applications of cDNA microarray technology, *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 30 (2), 79-87.
- Collins, A.R., 2004, The comet assay for DNA damage and repair, *Molecular Biotechnology*, 26 (3), 249.
- Concha, G., Vogler, G., Lezcano, D., Nermell, B. and Vahter, M., 1998, Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development, *Toxicological Sciences*, 44 (2), 185-190.
- Cooper GM., 2000, *The Development and Causes of Cancer, The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition, Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., 2009, Impact of natural products on developing new anti-cancer agents, *Chemical Reviews*, 109 (7), 3012-3043.
- Croft, C.B., 1969, Ultrastructural features of wound healing in mouse skin, *Journal of Anatomy*, 105, 189-190.
- Dai, C., Li, D., Gong, L., Xiao, X., Tang, S., 2016, Curcumin ameliorates furazolidone-induced DNA damage and apoptosis in human hepatocyte L02 cells by inhibiting ROS production and mitochondrial pathway, *Molecules*, 21 (8), 1061.
- Da-Lozzo, E.J., Moledo, R.C.A., Faraco, C.D., Ortolani-Machado, C.F., Bresolin, T.M.B., Silveira, J.L.M., 2013, Curcumin/xanthan-galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility, *Carbohydrate Polymers*, 93 (1), 279-284.

- Dawson, D.W. and Bury, H.P.R., 1961, The significance of Howell-Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears, *Journal of Clinical Pathology*, 14 (4), 374-380.
- De Flora, S. and Izzotti, A., 2007, Mutagenesis and cardiovascular diseases: molecular mechanisms, risk factors, and protective factors, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 621 (1), 5-17.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009, Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models, *Cell Biology and Toxicology*, 25 (1), 5-32.
- Ding, W., Hudson, L.G., Sun, X., Feng, C., Liu, K.J., 2008, As (III) inhibits ultraviolet radiation-induced cyclobutane pyrimidine dimer repair via generation of nitric oxide in human keratinocytes, *Free Radical Biology and Medicine*, 45 (8), 1065-1072.
- Dominici, M.L.B.K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8 (4), 315-317.
- Dusinska, M. and Collins, A.R., 2008, The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions, *Mutagenesis*, 23 (3), 191-205.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., Diederich, M., 2005, Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin, *Cancer Letters*, 223 (2), 181-190.
- Dyer, J.L., Khan, S.Z., Bilmen, J.G., Hawtin, S.R., Wheatley, M., Michelangeli, F., 2002, Curcumin: a new cell-permeant inhibitor of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, *Cell Calcium*, 31 (1), 45-52.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Stuart, B., Wahle, B., Bomann, W., Ahr, H.J., 2005, Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 575 (1), 61-84.
- Faulds L., 1969, Neoplastic Development. B, Vol. 1, London, Academic Press.
- Feldstein, A.L., 1983. Arsenic and respiratory cancer in humans: follow-up of copper smelter employees in Montana. *Journal of the National Cancer Institute*, 70 (4), 601-609.
- Fenech, M., 2008, The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage, *In Environmental Genomics*, 185-216.
- Flora, S.J., 2011, Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility, *Free Radical Biology and Medicine*, 51 (2), 257-281.
- Foulds, L., 1954, The experimental study of tumor progression: a review, *Cancer Research*, 14 (5), 327-339.

- Gebel, T.W., 2001, Genotoxicity of arsenical compounds, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203 (3), 249-262.
- Germolec, D.R., Spalding, J., Boorman, G.A., Wilmer, J.L., Yoshida, T., Simeonova, P.P., Bruccoleri, A., Kayama, F., Gaido, K., Tennant, R., Burleson, F., 1997, Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 386 (3), 209-218.
- Ghosh, S., Banerjee, S., Sil, P.C., 2015, The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update, *Food and Chemical Toxicology*, 83, 111-124.
- Goel, A., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., 2008, Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic, *Biochemical pharmacology*, 75(4), 787-809.
- Gunasekarana, V., Raj, G.V., Chand, P., 2015, A comprehensive review on clinical applications of comet assay, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9 (3), GE01.
- Gupta, S.C., Kismali, G., Aggarwal, B.B., 2013, Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy, *Biofactors*, 39 (1), 2-13.
- Gupta, S.C., Patchva, S., Aggarwal, B.B., 2013, Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials, *The AAPS journal*, 15 (1), 195-218.
- Han, X., Deng, S., Wang, N., Liu, Y., Yang, X., 2016, Inhibitory effects and molecular mechanisms of tetrahydrocurcumin against human breast cancer MCF-7 cells, *Food and Nutrition Research*, 60 (1), 30616.
- Harley, C.B., 1991, Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb, *Mutation Research/DNAging*, 256 (2-6), 271-282.
- Henke, K., 2009, *Arsenic: environmental chemistry, health threats and waste treatment*, John Wiley & Sons, United Kingdom, ISBN: 978-0-470-02758-5.
- Hennings, H., 1987, Tumor promotion and progression in mouse skin. In: *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*, Vol. 1. Role of Genetic and Epigenetic Changes (J. C. Barrett, Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 59-71.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S. and Keating, A., 2005, Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 7 (5), 393-395.
- Huang, C., Ma, W.Y., Li, J., Goranson, A., Dong, Z., 1999, Requirement of Erk, but not JNK, for arsenite-induced cell transformation, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (21), 14595-14601.
- Huang, L., Wu, H., Kuijp, T.J., 2015, The health effects of exposure to arsenic-contaminated drinking water: a review by global geographical distribution, *International Journal of Environmental Health Research*, 25 (4), 432-452.

- Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S., Thomas, D.J., 2011, Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective, *Toxicological Sciences*, 123 (2), 305-332.
- IARC, 2004, Arsenic in drinking-water, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 267.
- IARC/NCI/EPA Working Group, 1985, Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1980, IARC Monographon Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Suppl., 23–29
- Jackson, B.P., Taylor, V.F., Karagas, M.R., Punshon, T., Cottingham, K.L., 2012, Arsenic, organic foods, and brown rice syrup, *Environmental Health Perspectives*, 120 (5), 623.
- Kakunaga, T. and Crow, J.D., 1980, Cell variants showing differential susceptibility to ultraviolet light--induced transformation, *Science*, 209 (4455), 505-507.
- Kakunaga, T., 1973, A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from BALB/3T3, *International Journal of Cancer*, 12 (2), 463-473.
- Kang, J.H., Kang, H.S., Kim, I.K., Lee, H.Y., Ha, J.H., Yeo, C.D., Kang, H.H., Moon, H.S., Lee, S.H., 2015, Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin, *Experimental Biology and Medicine*, 240 (11), 1416-1425.
- Karunagaran, D., Rashmi, R., Kumar, T.R., 2005, Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy, *Current Cancer Drug Targets*, 5 (2), 117-129.
- Kastan, M.B. and Bartek, J., 2004, Cell-cycle checkpoints and cancer, *Nature*, 432 (7015), 316.
- Khambete, N. and Kumar, R., 201, Carcinogens and cancer preventors in diet, *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4 (1), 4.
- Kim, H.G., Shi, C., Bode, A.M. and Dong, Z., 2016, p38 $\alpha$  MAPK is required for arsenic - induced cell transformation, *Molecular Carcinogenesis*, 55 (5), 910-917.
- Kinghorn, A.D., Chin, Y.W., Swanson, S.M., 2009, Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms, *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 12 (2), 189.
- Klaunig, J.E. and Kamendulis, L.M., 2004, The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-267.
- Kousar, S. and Javed, M., 2015, Diagnosis of metals induced DNA damage in fish using comet assay, *Pakistan Veterinary Journal*, 35 (2), 168-172.

- Kunnumakkara, A.B., Anand, P., Aggarwal, B.B., 2008, Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins, *Cancer Letters*, 269 (2), 199-225.
- Landolph, J.R., 1994, Molecular mechanisms of transformation of C3H/10T1/2 Cl 8 mouse embryo cells and diploid human fibroblasts by carcinogenic metal compounds, *Environmental Health Perspectives*, 102 (suppl 3), 119-125.
- Lee, T.C., Huang, R.Y., Jan, K.Y., 1985, Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 148 (1), 83-89.
- Lee, T.C., Oshimura, M., Barrett, J.C., 1985, Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture, *Carcinogenesis*, 6 (10), 1421-1426.
- Leslie, L.M. and Smith, R.K., 1978, The effect of vertical stability on tornadogenesis, *Journal of the Atmospheric Sciences*, 35 (7), 1281-1288.
- Lev-Ari, S., Starr, A., Vexler, A., Karaush, V., Loew, V., Greif, J., Fenig, E., Aderka, D., Ben-Yosef, R., 2006, Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity, *Anticancer Research*, 26 (6B), 4423-4430.
- Li, G., Lee, L.S., Li, M., Tsao, S.W., Chiu, J.F., 2011, Molecular changes during arsenic - induced cell transformation, *Journal of Cellular Physiology*, 226 (12), 3225-3232.
- Lin, S.S., Huang, H.P., Yang, J.S., Wu, J.Y., Hsai, T.C., Lin, C.C., Lin, C.W., Kuo, C.L., Wood, W.G., Chung, J.G., 2008, DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade-and mitochondrial-dependent pathway, *Cancer Letters*, 272 (1), 77-90.
- Liu, D., You, M., Xu, Y., Li, F., Zhang, D., Li, X., Hou, Y., 2016, Inhibition of curcumin on myeloid-derived suppressor cells is requisite for controlling lung cancer, *International Immunopharmacology*, 39, 265-272.
- Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., Ma, W., Yang, D., Yang, A. and Yu, Y., 2017, Curcumin induced autophagy anticancer effects on human lung adenocarcinoma cell line A549, *Oncology Letters*, 14 (3), 2775-2782.
- Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T.K., 2001, Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (4), 1643-1648.
- Lu, J.J., Cai, Y.J., Ding, J., 2011, Curcumin induces DNA damage and caffeine-insensitive cell cycle arrest in colorectal carcinoma HCT116 cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 354 (1-2), 247-252.

- Lutz, W.K. and Maier, P., 1988, Genotoxic and epigenetic chemical carcinogenesis: one process, different mechanisms, *Trends in Pharmacological Sciences*, 9 (9), 322-326.
- Ma, X. and Yu, H., 2006, Global burden of cancer, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 79, 85- 94.
- Mandal, B.K. and Suzuki, K.T., 2002, Arsenic round the world: a review, *Talanta*, 58 (1), 201-235.
- Mathijs, K., Brauers, K.J., Jennen, D.G., Boorsma, A., Van Herwijnen, M.H., Gottschalk, R.W., Kleinjans, J.C., Van Delft, J.H., 2009, Discrimination for genotoxic and nongenotoxic carcinogens by gene expression profiling in primary mouse hepatocytes improves with exposure time, *Toxicological Sciences*, 112 (2), 374-384.
- McGregor, D. and Anderson, D., 1999, DNA damage and repair in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* as indicators of exposure to carcinogens, *IARC Scientific Publications*, (146), 309.
- Nabavi, S.F., Daglia, M., Moghaddam, A.H., Habtemariam, S., Nabavi, S.M., 2014, Curcumin and liver disease: from chemistry to medicine, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13 (1), 62-77.
- Nadin, S.B., Vargas–Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2001, A silver staining method for single-cell gel assay, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49 (9), 1183-1186.
- Natarajan, A.T., 1993, Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations, *Environmental Health Perspectives*, 101 (Suppl 3), 225.
- Nicolson, G.L., Brunson, K.W., Fidler, I.J., 1977, Tumor cell surfaces: some characteristics of neoplastic cells that determine states of transformation and malignancy, *Acta Histochemica Et Ctochemica*, 10 (1), 114-133.
- Niederau, C. and Göpfert, E., 1999, The effect of chelidonium-and turmeric root extract on upper abdominal pain due to functional disorders of the biliary system. Results from a placebo-controlled double-blind study, *Medizinische Klinik* (Munich, Germany: 1983), 94 (8), 425-430.
- O'Sullivan-Coyne, G., O'sullivan, G.C., O'Donovan, T.R., Piwocka, K., McKenna, S.L., 2009, Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells, *British Journal of Cancer*, 101 (9), 1585.
- Ouyang, W., Li, Q. Ma, C. Huang, 2006, Essential roles of PI-3K/Akt/IKKbeta/ NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells, *Carcinogenesis*, 27, 864–873.
- Park Park, W., Amin, A.R., Chen, Z.G., Shin, D.M., 2013, New perspectives of curcumin in cancer prevention, *Cancer Prevention Research*, 6 (5), 387-400.
- Phillips, D.H. and Arlt, V.M., 2009, Genotoxicity: damage to DNA and its consequences, *In Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 87-110.

- Pi, J., Diwan, B.A., Sun, Y., Liu, J., Qu, W., He, Y., Styblo, M., Waalkes, M.P., 2008, Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2, *Free Radical Biology and Medicine*, 45 (5), 651-658.
- Pillai, G.R., Srivastava, A.S., Hassanein, T.I., Chauhan, D.P., Carrier, E., 2004, Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin, *Cancer Letters*, 208 (2), 163-170.
- Platanias, L.C., 2009, Biological responses to arsenic compounds, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (28), 18583-18587.
- Poburski, D. and Thierbach, R., 2016, Improvement of the BALB/c-3T3 cell transformation assay: a tool for investigating cancer mechanisms and therapies, *Scientific Reports*, 6, 32966.
- Prasad, C.P., Rath, G., Mathur, S., Bhatnagar, D., Ralhan, R., 2009, Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, *Chemico-biological Interactions*, 181 (2), 263-271.
- Priyadarsini, K., 2014, The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent, *Molecules*, 19 (12), 20091-20112.
- Prusty, B.K. and Das, B.C., 2005, Constitutive activation of transcription factor AP1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP - 1 activity in HeLa cells by curcumin, *International Journal of Cancer*, 113 (6), 951-960.
- Rahman, F., Chowdhury, S., Rahman, M. M., Ahmed, D., & Hossain, A., 2009, Antimicrobial resistance pattern of gram-negative bacteria causing urinary tract infection, *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (1), 44-50.
- Rasool, A., Xiao, T., Baig, Z. T., Masood, S., Mostofa, K. M., Iqbal, M., 2015, Co-occurrence of arsenic and fluoride in the groundwater of Punjab, Pakistan: source discrimination and health risk assessment, *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (24), 19729-19746.
- Ravindran, J., Prasad, S., Aggarwal, B.B., 2009, Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?, *The AAPS Journal*, 11 (3), 495-510.
- Reddenna, L., Venkatesh, P., Kumar, K.S., Reddy, A.S.K., 2017, Genotoxicity, *PharmaTutor*, 5 (9), 22-34.
- Rohanizadeh, R., Deng, Y., Verron, E., 2016, Therapeutic actions of curcumin in bone disorders, *BoneKEy Reports*, 5.
- Rossmann, T.G., 2003, Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533 (1-2), 37-65.
- Sa, G. and Das, T., 2008, Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death, *Cell Division*, 3 (1), 1.

- Shehzad, A., Wahid, F., Lee, Y.S., 2010, Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials, *Archiv der Pharmazie*, 343 (9), 489-499.
- Saffiotti, U. and Bertolero, F., 1989, Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells by metals and the quest for induction of a metastatic phenotype, *Biological Trace Element Research*, 21(1), 475.
- Sampayo-Reyes, A., Hernández, A., El-Yamani, N., López-Campos, C., Mayet-Machado, E., Rincón-Castañeda, C.B., Limones-Aguilar, M.D.L., López-Campos, J.E., de León, M.B., González-Hernández, S., Hinojosa-Garza, D., 2010, Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults, Influence of GSTO1 and AS3MT polymorphisms, *Toxicological Sciences*, 117 (1), 63-71.
- Sankar, P., Telang, A.G., Manimaran, A., 2010, Curcumin protects against cypermethrin-induced genotoxicity in rats, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30 (3), 289-291.
- Sasaki, K., Bohnenberger, S., Hayashi, K., Kunkelmann, T., Muramatsu, D., Phrakonkham, P., Poth, A., Sakai, A., Salovaara, S., Tanaka, N., Thomas, B.C., 2012, Recommended protocol for the BALB/c 3T3 cell transformation assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 744 (1), 30-35.
- Savage, J.R., 1988, A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations, *Mutation Research Letters*, 207 (1), 33-36.
- Schmid, W., 1975, The micronucleus test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31 (1), 9-15.
- Seukep, A.J., Noumedem, J.A., Djeussi, D.E., Kuete, V., 2014, Genotoxicity and Teratogenicity of African Medicinal Plants, *In Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 235-275.
- Shakoor, M.B., Niazi, N.K., Bibi, I., Rahman, M.M., Naidu, R., Dong, Z., Shahid, M., Arshad, M., 2015, Unraveling health risk and speciation of arsenic from groundwater in rural areas of Punjab, Pakistan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12 (10), 12371-12390.
- Sharma, A.K., Tjell, J.C., Sloth, J.J., Holm, P.E., 2014, Review of arsenic contamination, exposure through water and food and low cost mitigation options for rural areas, *Applied Geochemistry*, 41, 11-33.
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005, Curcumin: the story so far, *European Journal of Cancer*, 41 (13), 1955-1968.
- Shen, L. and Ji, H.F., 2007, Theoretical study on physicochemical properties of curcumin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67 (3-4), 619-623.

- Shi, J., Zhang, X., Shi, T., Li, H., 2017, Antitumor effects of curcumin in human bladder cancer *in vitro*, *Oncology Letters*, 14 (1), 1157-1161.
- Singh, A.P., Goel, R.K., Kaur, T., 2011, Mechanisms pertaining to arsenic toxicity, *Toxicology International*, 18 (2), 87.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175 (1), 184-191.
- Sinha, D. and Roy, M., 2011, Antagonistic role of tea against sodium arsenite-induced oxidative DNA damage and inhibition of DNA repair in Swiss albino mice, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 30 (4).
- Sisson, T.H., Maher, T.M., Ajayi, I.O., King, J.E., Higgins, P.D., Booth, A.J., Sagana, R.L., Huang, S.K., White, E.S., Moore, B.B., Horowitz, J.C., 2012, Increased survivin expression contributes to apoptosis-resistance in IPF fibroblasts, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3 (6A), 657.
- Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E., 2003, The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531 (1), 231-251.
- Smedley, P.L. and Kinniburgh, D.G., 2002 A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters, *Applied Geochemistry*, 17 (5), 517-568.
- Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M.N., Goeden, H.M., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H.M., Wood, R., Kosnett, M.J., Smith, M.T., 1992, Cancer risks from arsenic in drinking water, *Environmental Health Perspectives*, 97, 259-267.
- Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., Phipps, R.P., 1997, Fibroblasts as sentinel cells Synthesis of chemokines and regulation of inflammation, *The American Journal of Pathology*, 151 (2), 317.
- Sporn, M.B. and Suh, N., 2000, Chemoprevention of cancer, *Carcinogenesis*, 21 (3), 525-530.
- Stueckle, T.A., Lu, Y., Davis, M.E., Wang, L., Jiang, B.H., Holaskova, I., Schafer, R., Barnett, J.B., Rojanasakul, Y., 2012, Chronic occupational exposure to arsenic induces carcinogenic gene signaling networks and neoplastic transformation in human lung epithelial cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261 (2), 204-216.
- Su, C.C., Lin, J.G., Li, T.M., Chung, J.G., Yang, J.S., Ip, S.W., Lin, W.C., Chen, G.W., 2006, Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca<sup>2+</sup> and the activation of caspase-3, *Anticancer Research*, 26 (6B), 4379-4389.
- Tapio, S. and Grosche, B., 2006, Arsenic in the aetiology of cancer, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 612 (3), 215-246.

- Tchounwou, P.B., Patlolla, A.K., Centeno, J.A., 2003, Invited reviews: carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure—a critical review, *Toxicologic Pathology*, 31 (6), 575-588.
- Temin, H.M. and Rubin, H., 1958, Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture, *Virology*, 6 (3), 669-688.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (3), 206-221.
- Tiwari, H. and Rao, M.V., 2010, Curcumin supplementation protects from genotoxic effects of arsenic and fluoride, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5), 1234-1238.
- Tokar, E.J., Diwan, B.A., Waalkes, M.P., 2009, Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype, *Environmental Health Perspectives*, 118(1), 108-115.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A., 2002, Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3 (5), 349.
- Tønnesen, H.H. and Karlsen, J., 1985, Studies on curcumin and curcuminoids, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 180 (5), 402-404.
- Tsuchiya, T., Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Tokunaga, H., Sakimoto, K., Ando, M., Umeda, M., 2005, Inorganic arsenic compounds and methylated metabolites induce morphological transformation in two-stage BALB/c 3T3 cell assay and inhibit metabolic cooperation in V79 cell assay, *Toxicological Sciences*, 84 (2), 344-351.
- Ueki, K., Kondo, T., Tseng, Y.H., Kahn, C.R., 2004, Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the Mouse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 10422–10427.
- Vahter, M. and Concha, G., 2001, Role of metabolism in arsenic toxicity, *Pharmacology and Toxicology: MiniReview*, 89 (1), 1-5.
- Vimercati, L., Gatti, M.F., Gagliardi, T., Cuccaro, F., De Maria, L., Caputi, A., Quarato, M., Baldassarre, A., 2017, Environmental exposure to arsenic and chromium in an industrial area, *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (12), 11528-11535.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W., 2002, The genetic basis of human cancer, McGraw-Hill Professional; 2 edition, New York.
- Wang, X., Wang, Q., Ives, K.L., Evers, B.M., 2006, Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells, *Clinical Cancer Research*, 12 (18), 5346-5355.

- Wang, Y.C., Chaung, R.H., Tung, L.C., 2004, Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines, *Aquatic Toxicology*, 69 (1), 67-79.
- Wang, Z., Zhang, Y., Banerjee, S., Li, Y., Sarkar, F.H., 2006, Retracted: Notch - 1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells, *Cancer*, 106 (11), 2503-2513.
- Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Chen, H., Yoshida, K., Endo, G., Hori, T., Fukushima, S., 1996, Promoting effects of dimethylarsinic acid on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, 17 (11), 2435-4239.
- Watson, Jane L., Anna Greenshields, Richard Hill, Ashley Hilchie, Patrick W. Lee, Carman A. Giacomantonio, David W. Hoskin., 2010, Curcumin - induced apoptosis in ovarian carcinoma cells is p53- independent and involves p38 mitogen- activated protein kinase activation and downregulation of Bcl- 2 and survivin expression and Akt signaling, *Molecular Carcinogenesis*, 13-24.
- Weinstein, I.B., 1981, Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis, *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry*, 17 (2), 99-120.
- Weir, N.M., Selvendiran, K., Kutala, V.K., Tong, L., Vishwanath, S., Rajaram, M., Tridandapani, S., Anant, S., Kuppusamy, P., 2007, Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK, *Cancer Biology and Therapy*, 6 (2), 178-184.
- WHO., 2001, Arsenic and arsenic compounds, Environmental health criteria 224, 2nd Ed World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilken, R., Veena, M.S., Wang, M.B., Srivatsan, E.S., 2011, Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma, *Molecular Cancer*, 10 (1), 12.
- Williams, G.M., 2001, Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment, *Toxicology*, 166 (1-2), 3-10.
- Woo, M.S., Jung, S.H., Kim, S.Y., Hyun, J.W., Ko, K.H., Kim, W.K., Kim, H.S., 2005, Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335 (4), 1017-1025.
- Xia, Y.Q., Wei, X.Y., Li, W.L., Kanchana, K., Xu, C.C., Chen, D.H., Chou, P.H., Jin, R., Wu, J.Z., Liang, G., 2014, Curcumin analogue A501 induces G2/M arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (16), 6893-6898.
- Yamaguchi, Y., Madhyastha, H., Madhyastha, R., Chojjookhuu, N., Hishikawa, Y., Pengjam, Y., Nakajima, Y., Maruyama, M., 2016, Arsenic acid inhibits proliferation of skin

fibroblasts, and increases cellular senescence through ROS mediated MST1-FOXO signaling pathway, *The Journal of Toxicological Sciences*, 41 (1), 105-113.

Yamanaka, K., Ohtsubo, K., Hasegawa, A., Hayashi, H., Ojhi, H., Kanisawa, M., Okada, S., 1996, Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline 1-oxide in the lungs of mice, *Carcinogenesis*, 17, 767–770.

Yırtıcı, Ü., 2007, *Tartrazinin Cyprinus carpio'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Yu, H.S., Liao, W.T., Chai, C.Y., 2006, Arsenic carcinogenesis in the skin, *Journal of Biomedical Science*, 13 (5), 657-666.

Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P., Waalkes, M.P., 1997, Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (20), 10907-10912.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Büşra Demircioğlu
Doğum Yeri	Beykoz
Doğum Tarihi	20.03.1992
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05557098368
E-Posta Adresi	busraademircioglu@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Zooloji