

VAROL GÜLER

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2024



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KURKUMİN VE ÖZGÜN KURKUMİN ANALOGLARININ
GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE APOPTOZ VE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

VAROL GÜLER

DANIŞMAN
PROF. DR. SACİDE PEHLİVAN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Varol Güler

AÇIKLAMA:

Kişisel Verileri Koruma Kurulu'nun 24/09/2020 tarihli ve 2020/722 sayılı toplantısında “Açık Erişim Sisteminde ıslak imzalı evrakların yayımlanması uygulamasının ilgili kişilere ait ıslak imzalı belgeleri içermeyecek şekilde güncellenmesi” Kararı üzerine tezlerde kişisel verilerin olmadan yüklenmesi uygulamasına başlanmıştır.

İTHAF

Aileme ve Gizem'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bana bu projeyi yapma fırsatını veren ve sunduğu imkânlarla projemi tamamlamamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Sacide Pehlivan'a özel bir teşekkür sunmak istiyorum.

Projemizde kullandığımız kurkumin analoglarını sentezleyerek çalışmamıza katkı sağlayan İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Kimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Dr. Öğr. Ü. Funda Özkök ve Prof. Dr. Nihal Onul'a teşekkür ederim.

Projemizin yürütülmesi sürecinde değerli görüşleriyle çalışmamıza katkı sağlayan İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Başak Günçer ve Öğr. Gör. Dr. Bilge Özerman Edis'e teşekkür ederim.

Doktora eğitim sürecinde tüm katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarıma ve öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Proje sürecindeki yardımları için Yasemin başta olmak üzere değerli lab arkadaşlarım Ceren ve Sevde'ye teşekkür etmek istiyorum.

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma görevlisi arkadaşlarım ve saygıdeğer hocalarıma doktora eğitimi sürecinde verdikleri destek ve katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Lisans eğitimimin başlangıcından itibaren daima dayanışma içinde olduğum ve desteklerini her fırsatta gösteren arkadaşlarım Naci ve Mevlüt'e teşekkür ederim.

Son olarak, tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen aileme ve birlikte büyüdüğüm hayatımın diğer yarısı eşim Gizem'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39220

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER.....	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET.....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glioblastoma Multiform (GBM).....	3
2.1.1. GBM'ye Genel Bakış.....	3
2.1.2. GBM'de Glioma Kök Hücreleri.....	4
2.2. GBM’de Alternatif Tedavilere Olan İhtiyaç.....	5
2.2.1. Mevcut Kemoradyasyon Tedavilerinin Sınırlamaları.....	5
2.2.2. Glioma Kök Hücrelerini Hedeflemenin Önemi.....	6
2.3. Potansiyel Bir Terapötik Ajan Olarak Kurkumin.....	6
2.3.1. Kurkuminin Özellikleri.....	6
2.3.1.1. Anti-enflamatuar Özellikler.....	7
2.3.1.2. Antioksidatif Özellikler.....	8
2.3.1.3. Antimikrobiyal Özellikler.....	8
2.3.1.4. Antikanser Özellikleri.....	9
2.3.2. Kanser Tedavisinde Kurkumin.....	10
2.3.2.1. Kurkumin'in Çeşitli Kanser Türlerindeki Etkinliğine İlişkin Çalışmalar.....	10
2.3.2.2. Kurkumin'in GBM Üzerindeki Etkilerine İlişkin Spesifik Bulgular.....	11
2.4. Doğal Kurkumin ile İlgili Zorluklar ve Kurkumin Türevleri.....	14
2.4.1. Biyoyararlanım ve Etkinlik Sorunları.....	14
2.4.1.1. Emilim ve Metabolizma.....	14
2.4.1.2. Hızlı Sistemik Eliminasyon.....	14

2.4.2. Kurkumin Türevleri	15
2.4.2.1. Yapısal Değişiklikler.....	15
2.4.2.2. Nanoformülasyonlar.....	16
2.4.2.3. Ön İlaç (Pro-Drug) Yaklaşımları	17
2.4.2.4. Kurkumin Analogları	17
2.5. Projenin Amacı	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereçler.....	19
3.1.1. Cihazlar	19
3.1.2. Ticari Kitler.....	20
3.1.3. Kimyasallar	20
3.1.4. Hücre Kültürü Malzemeleri	21
3.1.5. Hücre Hatları.....	21
3.1.6. Primerler.....	21
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Hücre Kültürü Yöntemleri	22
3.2.1.1. Hücre Canlandırma	22
3.2.1.2. Hücre Pasajlama.....	23
3.2.1.3. Hücre Dondurma.....	23
3.2.1.4. Hücre Canlılık Testi	24
3.2.2. DCFH-DA Boyama ile ROS Analizi	25
3.2.3. AO/PI Dual Boyama ile Apoptoz Analizi.....	27
3.2.4. “Wound Healing Assay” (Scratch) Tekniği ile Hücre Migrasyon Analizi.....	28
3.2.5. Hedef Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR) ile Analizi.....	28
3.2.5.1. Hücrelerden Total RNA elde edilmesi.....	28
3.2.5.2. cDNA Sentezi.....	28
3.2.5.3. mRNA Anlatım Analizleri (Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	29
3.2.6. Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı Analizi.....	29
3.2.6.1. Hücrelerden Total DNA elde edilmesi.....	29
3.2.6.2. mtDNA Kopya Sayısı Analizi.....	30
3.2.7. İstatiksel Analiz.....	30

4. BULGULAR.....	32
4.1. Hücre Canlılığı Analizleri.....	32
4.1.1. Saf Kurkumin ve Kurkumin analoglarının (Analog1, 2 ve 3) Hücre Canlılığına Etkisi	32
4.1.2. Saf Kurkumin ve Kurkumin Analoglarının U87 üzerindeki Etkinliğinin Karşılaştırılması	36
4.1.3. Temozolomid (TMZ) Maddesinin U87 Hücre Canlılığına Etkisinin Standardizasyonu	39
4.1.4. TMZ ve Analog2'nin Sinerjik Etkisinin Araştırılması	41
4.2. Saf Kurkumin ve Analog2 etkisinde U87 hücrelerinde ROS değişimi	42
4.3. Analog2 Molekülünün U87 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi.....	43
4.4. Analog2 Etkisinde U87 Metastatik Değişimler	45
4.5. Analog-2 Etkisinde U87 Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Gen Ekspresyon Değişimleri.....	48
4.6. Kurkumin ve Analog2'nin U87 Hücreleri Mitokondriyal DNA (mtDNA) Kopya Sayısı üzerindeki Etkileri.....	49
5. TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	77

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Proje kapsamında kullanılan cihazlar	19
Tablo 3-2: Proje kapsamında kullanılan ticari kitler	20
Tablo 3-3: Proje kapsamında kullanılan kimyasallar	20
Tablo 3-4:Proje kapsamında kullanılan hücre kültürü malzemeleri.....	21
Tablo 3-5: Proje kapsamında kullanılan primerler	22
Tablo 4-1: TMZ ve Analog2 moleküllerinin kombine uygulaması sonucu elde edilen ilaç etkileşim tablosu	41




ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Glioma kök hücrelerinde tedavi yanıtı (Pasqualetti et al. 2023).....	4
Şekil 2-2: Kurkuminin biyolojik özellikleri.....	7
Şekil 2-3: Kurkuminin antikanser mekanizmaları (Wang et al. 2020).	10
Şekil 2-4:Kurkuminin biyoyararlanımını geliştirmede kullanılan yöntemler (Mobahat et al. 2023).	15
Şekil 3-1: Temsili floresan intensite karşılaştırması.....	26
Şekil 3-2: AO/PI ikili boyaması sonucu temsili hücre görüntüleri.....	27
Şekil 4-1: Analog1 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.	33
Şekil 4-2: Analog1 etkisinde U87 ve HUVEC hücre canlılığı değişimi.	34
Şekil 4-3:Analog2 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.	34
Şekil 4-4: Analog2 etkisinde U87 ve HUVEC hücre canlılığı değişimi.	35
Şekil 4-5: Analog3 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.	36
Şekil 4-6: Analog3 etkisinde U87 ve HUVEC hücre canlılığı değişimi.	36
Şekil 4-7:Analog1, Analog2, Analog3 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.....	37
Şekil 4-8:Analog1, Analog2, Analog3 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücresi mikroskop görüntüleri.....	38
Şekil 4-9: U87 hücrelerinde Saf Kurkumin, Analog1, Analog2 ve Analog3 inhibitör konsantrasyon (IC) grafiği.	39
Şekil 4-10: TMZ etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.	40
Şekil 4-11:U87 hücrelerinde TMZ inhibitör konsantrasyon (IC) grafiği	40
Şekil4-12: DCF-DA boyama ile hücre içi oksidatif stres seviyelerinin değerlendirilmesi.	43
Şekil 4-13: AO/PI dual boyama ile apoptotik hücrelerin analizi.....	44
Şekil 4-14: U87 Hücrelerinde apoptoz belirteçlerinin mRNA düzeyinde değişimi.	45
Şekil 4-15: Analog2'nin U87 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisinin yara kapanma testi ile analizi.....	46
Şekil 4-16: U87 Hücrelerinde metastaz belirteçlerinin mRNA düzeyinde değişimi.....	47
Şekil 4-17: U87 Hücrelerinde onkogenlerin mRNA düzeyinde değişimi.	48
Şekil 4-18:U87 Hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin mRNA düzeyinde değişimi. .	49
Şekil 4-19: U87 Hücrelerinde mtDNA kopya sayısı değişimi.	50

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µL:	Mikrolitre
mL:	Mililitre
ng:	Nanogram
µg:	Mikrogram
mg:	Miligram
nm:	Nanogram
µm:	Mikrometre
mm:	Milimetre
µM:	Mikromolar
mM:	Milimolar
RPM:	Revolution per minute
OD:	Optical Density
Ct:	Cycle of threshold
GBM:	Glioblastoma Multiform
GSC:	Glioma Kök Hücresi
U87:	Glioblastoma Hücre Hattı
HUVEC:	İnsan umbilikal ven endotelyal hücreleri
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS:	Fetal Bovine Serum
PBS:	Phosphate-buffered Saline
TMZ:	Temozolomid
DCFH-DA:	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
AO:	Akridine Turuncusu
PI:	Propidium iyodür
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
MTT:	(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
Casp3:	Kaspaz-3
Bcl-2:	B-cell leukemia 2

Bax:	Bcl-2 associated protein x
MMP-2:	Matrix Metalloprotease Protein 2
MMP-9:	Matrix Metalloprotease Protein 9
NF- κ B:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
c-MYC:	Cellular myelocytomatosis oncogene
CCND1:	Cyclin D1
CDKN1A:	Cyclin dependent kinase 1 (p21)
Ki67:	Kiel 67 Protein
HGB:	Human Globulin Gene
mtDNA:	Mitokondriyal DNA



ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM), agresif ve sınırlı tedavi seçenekleri olan bir kanser türüdür. Bu çalışmada, Analog1, Analog2 ve Analog3 isimli kurkumin türevleri U87 glioblastoma hücre hattı ve insan umbilikal ven endotelial hücreleri (HUVEC) üzerinde potansiyel bir anti-tümör ajan olarak araştırılmıştır.

Analiz ettiğimiz üç analog arasında en yüksek anti-tümör potansiyeline sahip olan Analog2'nin, U87 üzerindeki etkisi ayrıntılı testler aracılığıyla değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı MTT deneyi kullanılarak değerlendirildi ve DCFH-DA (2',7'-diklorodihidroflorescein diasetat) kimyasalı ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı analiz edilmiştir. Apoptoz indüksiyonu Akridin Turuncu/Propidyum İyodür ikili boyama ile incelenirken, migrasyon yara iyileşme testi kullanılarak analiz edilmiştir. RNA ekspresyonundaki ve mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısındaki değişiklikleri incelemek için kantitatif gerçek zamanlı PCR kullanılmıştır.

Analog2 uygulaması, yüksek ROS seviyelerinin eşlik ettiği U87 hücre proliferasyonunda önemli bir inhibisyon göstermiştir. Molekül anti-migrasyon etkileri sergilemiş, apoptozu tetiklemiş ve TMZ ile sinerji göstererek U87 hücrelerini daha az dirençli hale getirmiştir. Moleküler analiz, kanser belirteçlerinin (Ki67, c-MYC, CYDD1) aşağı regülasyonunu ve RNA düzeyinde tümör baskılayıcı p53'ün yukarı regülasyonunu ortaya koymuştur. Ek olarak, migrasyon ile ilgili genler (NFκB, MMP-2, MMP-9) Analog2 uygulanan hücrelerde azalmış ekspresyon göstermiştir. Apoptoz yolağı aktivasyonu, RNA düzeyinde artan kaspaz-3 ekspresyonu ve yüksek Bax/Bcl-2 oranı ile doğrulanmıştır. Bunlara ek olarak kanser prognozunda etkili olduğunu düşündüğümüz mtDNA kopya sayısında kayda değer azalma tespit edilmiştir.

Analog2 proliferasyon, migrasyon ve apoptozu etkileyerek güçlü anti-tümör etkiler göstermektedir. Ayrıca TMZ ile kombine edildiğinde terapötik potansiyeli artırmaktadır. Bu sonuçlar, Analog2'nin kanser tedavisi için umut vaat ettiğini vurgulamakta ve klinik kullanıma dönüştürülme mekanizmaları hakkında daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler : Glioblastoma, İlaç direnci, Kurkumin, Apoptoz, Oksidatif Stres

Güler, V. (2024). Kurkumin ve Özgün Kurkumin Analoglarının Glioblastoma Hücrelerinde Apoptoz ve Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39220

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) poses a significant oncological challenge due to its aggressiveness and limited treatment options. This study investigates curcumin derivatives named Analog1, Analog2 and Analog3 as potential anti-tumour agents against U87 glioblastoma cells. We evaluated the effect of Analog2, which has the highest anti-tumour potential among the analogues we analysed, on U87 cells through various assays. Proliferation was evaluated using MTT assay and the increase of reactive oxygen species (ROS) was analysed by DCFH-DA assay. Apoptosis induction was examined by Acridine Orange/Propidium Iodide double staining, while migration was analysed using the wound healing assay. Quantitative real-time PCR was used to examine changes in RNA expression and mitochondrial DNA (mtDNA) copy number. Analog2 treatment showed a significant inhibition of U87 cell proliferation accompanied by high ROS levels. The molecule exhibited anti-migration effects, induced apoptosis and synergised with TMZ, making U87 cells less resistant. Molecular analysis revealed down-regulation of cancer markers (Ki67, c-MYC, CYDD1) and up-regulation of tumour suppressor p53 at the RNA level. In addition, migration-related genes (NF κ B, MMP-2, MMP-9) showed decreased expression in Analog2-treated cells. Apoptosis pathway activation was confirmed by increased caspase-3 expression at RNA level and high Bax/Bcl-2 ratio. In addition, a significant decrease in mtDNA copy number, which is thought to be effective in cancer prognosis, was detected. Analog2 shows strong anti-tumour effects by affecting proliferation, migration and apoptosis. It increases the therapeutic potential when combined with TMZ. These results highlight the promise of Analog2 for cancer therapy and warrant further investigation into the mechanisms of its translation into clinical use.

Key Words: Glioblastoma, Drug resistance, Curcumin, Apoptosis, Oxidative stress

Güler, V. (2024). The Effects of Curcumin and Novel Curcumin Analogs on Apoptosis and Oxidative Stress in Glioblastoma Cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Ph.D. Thesis. İstanbul.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 39220

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastoma multiforme (GBM), yüksek derecede malignitesi, agresif doğası ve kötü prognozu ile bilinen zorlu bir beyin kanseri türüdür. Onkolojideki kapsamlı araştırma ve ilerlemelere rağmen, GBM için tedavi seçenekleri sınırlı ve büyük ölçüde etkisiz kalmaktadır. Cerrahi rezeksiyon, radyasyon tedavisi ve kemoterapi dahil olmak üzere standart tedavi yaklaşımları, yüksek nüks oranları ve önemli yan etkilerle birlikte genellikle yalnızca geçici bir rahatlama sağlamaktadır. Temozolomid (TMZ), GBM için en yaygın kullanılan kemoterapötik ajandır; ancak etkinliği glioblastoma hücrelerinde hızlı direnç gelişimi nedeniyle sıklıkla engellenmektedir. Sonuç olarak, GBM hücrelerini etkili bir şekilde hedefleyebilecek, direnç mekanizmalarının üstesinden gelebilecek ve hasta sonuçlarını iyileştirebilecek yeni terapötik ajanlara acil ihtiyaç vardır.

Curcuma longa bitkisinin rizomundan elde edilen doğal bir polifenolik bileşik olan kurkumin, anti-enflamatuar, antioksidan ve antikanser etkileri de dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik özellikleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Umut verici terapötik potansiyeline rağmen, kurkuminin klinik uygulaması zayıf biyoyararlanımı, hızlı metabolizması ve fizyolojik koşullarda düşük stabilitesi ile sınırlı kalmıştır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için araştırmacılar, gelişmiş farmakokinetik özelliklere ve artan antikanser etkinliğine sahip çeşitli kurkumin türevleri geliştirmişlerdir.

Bu çalışma, üç yeni kurkumin türevinin (Analog1, Analog2 ve Analog3) U87 glioblastoma hücrelerine karşı antikanser potansiyelini araştırmaktadır. Ön tarama Analog2'nin üç analog arasında en yüksek anti-tümör aktivitesini sergilediğini göstermiştir. Bu nedenle, çalışmamız Analog2'nin GBM hücreleri üzerindeki etkilerini hangi mekanizmalarla gösterdiğini aydınlatmaya odaklanmıştır.

Bu çalışmanın birincil amacı, Analog2'nin U87 glioblastoma hücrelerine karşı potansiyel bir anti-tümör ajan olarak etkinliğini değerlendirmektir. Antikanser aktivitesinin altında yatan moleküler mekanizmalar ve TMZ gibi mevcut kemoterapötik ajanlarla sinerji oluşturma potansiyeli araştırılmıştır.

İlk olarak, Analog2'nin MTT testi kullanarak U87 glioblastoma hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirilmiş ve sonuçlar sağlıklı kontrol hücresi HUVEC üzerindeki etkisi ile karşılaştırılmıştır. Ardından, DCFH-DA (2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat) kimyasalı kullanarak Analog2 uygulanan U87 hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerindeki artışı analiz edilmiş ve ROS oluşumunu Analog2'nin sitotoksik etkileri ile ilişkilendirilmiştir.

Daha sonra Akridin Turuncusu/Propidyum İyodür ile çift boyama yapılarak Analog2 uygulanan U87 hücrelerinde apoptoz indüksiyonunu incelenmiş ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) kullanarak apoptozla ilişkili genlerin (kaspaz-3, Bax, Bcl-2) ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Analog2'nin U87 hücreleri üzerindeki anti-migrasyon etkilerini araştırmak için, yara iyileşme testi (wound healing test) kullanılmış ve Analog2 uygulanan hücrelerde migrasyonla ilgili genlerin (NFκB, MMP-2, MMP-9) ekspresyonunu değerlendirilmiştir.

Ayrıca, Analog2 tedavisine yanıt olarak kanser belirteçlerinin (Ki67, c-MYC, CYDD1) ve tümör baskılayıcı p53'ün RNA ekspresyonundaki değişiklikleri analiz edilmiştir. Ek olarak, Analog2'nin kanser prognozundaki potansiyel rolünü göz önünde bulundurarak mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısı üzerindeki etkisi de incelenmiştir.

Bu hedeflere ulaşarak, Analog2'nin anti-tümör özelliklerinin ve GBM tedavisindeki potansiyel uygulamasının kapsamlı bir şekilde anlaşılması amaçlanmıştır. Bu araştırma, glioblastoma için daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin önünü açabilir ve sonuçta hastalar için prognozu ve yaşam kalitesini iyileştirebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glioblastoma Multiform (GBM)

2.1.1. GBM'ye Genel Bakış

Glioblastoma Multiforme (GBM), tüm intrakraniyal neoplazmların yaklaşık %15'ini ve astrositik tümörlerin %60-75'ini oluşturan, yetişkinlerde görülen primer beyin tümörlerinin en agresif ve yaygın şeklidir (Ostrom et al. 2021). Hızlı büyüme ve çevresindeki beyin dokusuna yaygın infiltrasyon eğilimi ile karakterize edilen GBM, önemli tedavi zorlukları ortaya çıkarmakta ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. Cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi agresif multimodal tedavi yaklaşımlarına rağmen GBM'li hastalar için medyan sağkalım süresi yaklaşık 14-16 aydır (Tan et al. 2020).

GBM'nin klinik yönetimi, hem hücresel hem de moleküler düzeyde oldukça heterojen doğası nedeniyle engellenmektedir. Histolojik olarak GBM nekroz, vasküler proliferasyon ve belirgin hücresel/nükleer atipi ile işaretlenir (Guo et al. 2023). Genomik çalışmalar, reseptör tirozin kinaz (RTK)/RAS/PI3K yolağı, p53 yolağı ve retinoblastoma (RB) yolağı dahil olmak üzere çeşitli kilit sinyal yollarında sık değişiklikler tespit etmiştir (Han et al. 2021). Bu değişiklikler GBM hücrelerinin agresif davranışına ve terapötik direncine katkıda bulunur.

GBM öncelikle yetişkinleri etkiler ve en yüksek insidans 45 ila 70 yaşları arasında görülür. Yaklaşık 1,6:1 erkek-kadın oranı ile hafif bir erkek baskınlığı vardır. GBM'nin kesin etiolojisi büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, genetik yatkınlık (örn. Li-Fraumeni sendromu, nörofibromatozis), iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma ve bazı çevresel faktörler dahil olmak üzere çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır (Grochans et al. 2022; Pellerino et al. 2022).

Yeni teşhis edilen GBM için standart tedavi, maksimum güvenli cerrahi rezeksiyonu takiben radyoterapi ile eşzamanlı adjuvan temozolomid (TMZ) kemoterapisini içerir. Bu agresif müdahalelere rağmen, GBM'nin infiltratif doğası genellikle tam cerrahi çıkarımı engeller ve rezidüel tümör hücreleri hızlı hastalık nüksüne katkıda bulunur. Ayrıca, TMZ ve diğer kemoterapötik ajanlara karşı direnç

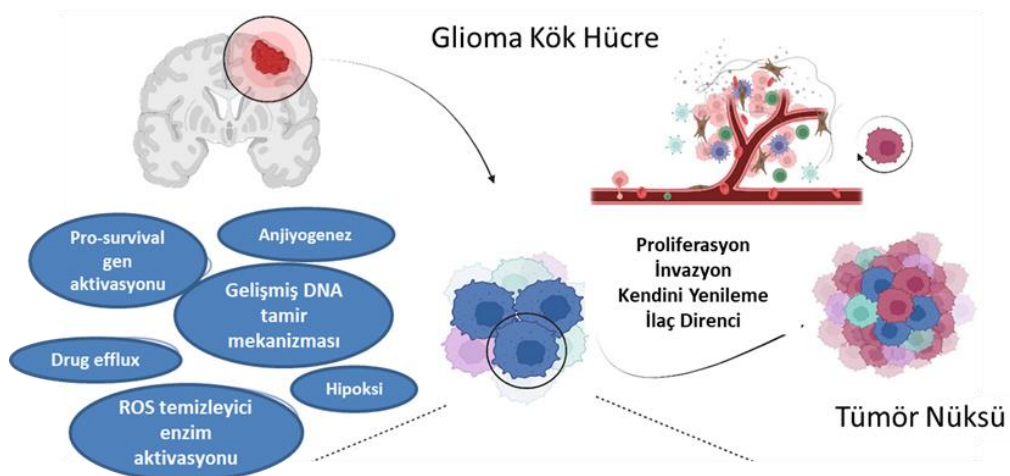
gelişimi, etkili GBM yönetiminde önemli bir engel olmaya devam etmektedir (Gilard et al. 2021).

2.1.2. GBM'de Glioma Kök Hücreleri

Son araştırmalar, GBM'nin patogeneğinde ve terapötik direncinde glioma kök hücrelerinin (GSC'ler) önemli rolünü vurgulamıştır. Glioma başlatıcı hücreler olarak da adlandırılan GSC'ler, kendini yenileme, çoğalma ve tümörijenik potansiyel dahil olmak üzere kök hücre benzeri özelliklere sahip tümör hücrelerinin bir alt popülasyonudur (Prager et al. 2020). Bu hücrelerin GBM heterojenitesine, tedavi direncine ve nüksüne katkıda bulunduğu inanılmaktadır.

GSC'ler normal nöral kök hücrelerle kök hücre belirteçlerinin (örn. CD133, Nestin, Sox2) ifadesi ve in vitro nörosferler oluşturma yeteneği gibi birkaç temel özelliği paylaşır (Mitchell et al. 2021). Bununla birlikte, GSC'lerin kök benzeri durumlarını korumak ve tümör büyümesini teşvik etmek için kritik olan Notch, Hedgehog ve Wnt gibi belirli sinyal yollarını tercihen aktive ettikleri gösterilmiştir (Biserova et al. 2021).

GBM tümörleri, farklı fenotipik ve genotipik profillere sahip çeşitli hücre tiplerini içeren, oldukça heterojen bir yapıya sahiptir. GSC'ler tümör içinde çeşitli hücre popülasyonlarına yol açarak bu heterojenliğe önemli ölçüde katkıda bulunur. Bu intratümöral çeşitlilik, farklı hücre popülasyonları tedaviye farklı yanıtlar verebileceğinden, terapötik müdahale için büyük bir zorluk teşkil etmektedir (Lan et al. 2017).



Şekil 2-1: Glioma kök hücrelerinde tedavi yanıtı (Pasqualetti et al. 2023).

GSC'lerin GBM'deki en önemli etkilerinden biri, tedavi direncindeki rolleridir. GSC'ler, farklılaşmış tümör hücrelerine kıyasla radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavilere karşı doğal olarak daha dirençlidir. Bu direnci açıklamak için gelişmiş DNA hasarı yanıtı, kemoterapötik ilaçların artan akımı (drug efflux) ve GSC'nin bakımını ve hayatta kalmasını destekleyen hipoksik bir mikro çevre dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar belirlenmiştir (Şekil 2-1) (Alves et al. 2021).

2.2. GBM'de Alternatif Tedavilere Olan İhtiyaç

GBM en ölümcül ve tedaviye dirençli kanserlerden biri olmaya devam etmektedir. GBM'nin agresif doğası ve mevcut tedavilerin sınırlı etkinliği, yeni kemoterapötik yaklaşımlara duyulan acil ihtiyacın altını çizmektedir. Cerrahi tekniklerdeki ilerlemelere, yeni radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarının geliştirilmesine rağmen, hasta sonuçları son yıllarda önemli ölçüde iyileşmemiştir (Tan et al. 2020).

2.2.1. Mevcut Kemoradyasyon Tedavilerinin Sınırlamaları

GBM için mevcut standart tedavi, maksimum güvenli cerrahi rezeksiyonu ve ardından radyasyon tedavisi ile eşzamanlı ve adjuvan temozolomid (TMZ) kemoterapisini içerir. Bu tedavi yaklaşımı bir miktar fayda sağlasa da, genel prognoz yaklaşık 14-16 aylık sağkalım söz konusudur (Janjua et al. 2021).

GBM, heterojenliği ve tedaviye karşı içsel direnci ile karakterizedir. Tümör hücreleri, DNA onarım enzimi O6-metilguanin-DNA metiltransferazın (MGMT) aktivasyonu da dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla birincil kemoterapötik ajan olan TMZ'ye karşı hızla direnç geliştirir. MGMT, TMZ'nin neden olduğu DNA hasarını onarır ve böylece sitotoksik etkinliğini azaltır (Singh et al. 2021b). Ek olarak, GBM hücreleri kemoterapi direncine daha fazla katkıda bulunan güçlü DNA hasarı yanıt yolları sergiler (Cruz et al. 2022).

Kan-beyin bariyeri (KBB) GBM tedavisinde bir başka önemli zorluk teşkil etmektedir. Birçok kemoterapötik ajan KBB'yi etkili bir şekilde geçemez, bu da beyinde terapötik olmayan konsantrasyonlara neden olur ve potansiyel etkinliklerini sınırlar. TMZ KBB'yi geçebilmesine rağmen, hızlı direnç gelişimi nedeniyle terapötik etkisi genellikle yetersiz kalmaktadır (Mo et al. 2021).

2.2.2. Glioma Kök Hücrelerini Hedeflemenin Önemi

Son çalışmalar, GBM içinde glioma kök hücreleri (GSC'ler) olarak bilinen ve tümör bakımı, ilerlemesi ve nüksünde kritik bir rol oynayan bir tümör hücresi alt popülasyonu tanımlamıştır. GSC'ler kendini yenileme, çoğalma ve tümör başlatma yeteneği gibi kök hücre benzeri özellikler sergiler ve bu da onları terapötik müdahaleler için çok önemli bir hedef haline getirir (Prager et al. 2020).

GSC'lerin GBM'nin geleneksel tedavilere karşı direncine önemli ölçüde katkıda bulunduğuna inanılmaktadır. Gelişmiş DNA onarım yeteneklerine, artmış ilaç akış kapasitesine sahiptirler ve farklılaşmış tümör hücrelerine kıyasla radyasyon kaynaklı hasara karşı daha dirençlidirler. Bu direnç kısmen spesifik hayatta kalma yollarının aktivasyonundan ve GSC'lerin tedavilerin sitotoksik etkilerinden kaçmasına izin veren sakin bir durumun sürdürülmesinden kaynaklanmaktadır (Alves et al. 2021).

Tümör mikroçevresindeki hipoksik koşullar, GSC'lerin hayatta kalmasını ve sürdürülmesini daha da artırır. Hipoksi, HIF'leri stabilize eder ve bu da köklülüğü, hayatta kalmayı ve istilayı teşvik eden transkripsiyonel programları aktive eder. Bu nedenle, hipoksik nişi ve bu koşullar altında aktive edilen yolları hedeflemek, GSC'leri ortadan kaldırmak ve terapötik sonuçları iyileştirmek için umut verici bir stratejidir (Papale et al. 2020).

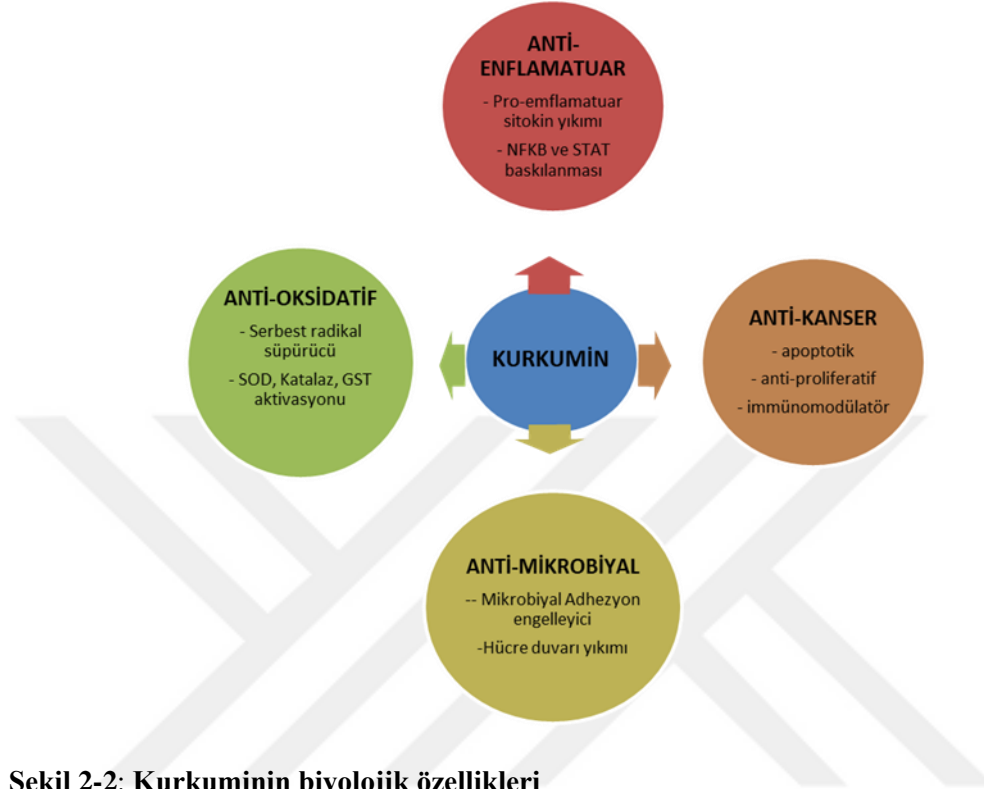
GSC'lerin karmaşıklığı ve esnekliği göz önüne alındığında, aynı anda birden fazla yolu hedef alan kombinasyon tedavilerinin daha etkili olması muhtemeldir. Hedefe yönelik tedavilerin kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilerle birleştirilmesi, direnç mekanizmalarının üstesinden gelinmesine ve tümör büyümesi üzerinde daha iyi kontrol sağlanmasına yardımcı olabilir (Tang et al. 2021).

2.3. Potansiyel Bir Terapötik Ajan Olarak Kurkumin

2.3.1. Kurkuminin Özellikleri

Curcuma longa (zerdeçal) bitkisinden elde edilen kurkuminoid grubunda yer alan kurkumin, çok çeşitli farmakolojik özellikleri nedeniyle önemli ölçüde dikkat çeken biyoaktif bir bileşiktir. Canlı sarı rengiyle bilinen kurkumin, yüzyıllardır Asya'da geleneksel tıp tedavi yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Jyotirmayee and Mahalik 2022). Modern bilimsel araştırmalar, bu biyokimyasal ürünün anti-enflamatuar,

antioksidatif, antimikrobiyal ve antikanser özelliklerini vurgulayarak geleneksel kullanımlarının çoğunu doğrulamıştır (Şekil 2-2) (Urošević et al. 2022).



Şekil 2-2: Kurkuminin biyolojik özellikleri

2.3.1.1. Anti-enflamatuar Özellikler

Kronik enflamasyon, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların iyi bilinen bir öncüsüdür. Kurkumin'in anti-enflamatuar etkilerine öncelikle enflamatuar yolların inhibisyonu aracılık eder. DNA transkripsiyonunu, sitokin üretimini ve hücre sağkalımını kontrol eden bir protein kompleksi olan nükleer faktör-kappa B'nin (NF- κ B) aktivitesini inhibe eder (Li et al. 2021). NF- κ B, glioblastoma da dahil olmak üzere birçok kanser türünde genellikle yapısal olarak aktiftir, tümör büyümesini ve apoptoza direnci teşvik eder (Soukhtanloo et al. 2020).

Kurkumin, çoklu moleküler yolları modüle ederek çeşitli enflamatuar hastalıklarda önemli anti-enflamatuar etkiler gösterir. İnflamatuar bağırsak hastalığında (IBD) kurkumin, NOD benzeri reseptör pyrin domain içeren 3 (NLRP3) inflamazom ve nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) yollarını inhibe ederek IL-1 β ve TNF- α gibi enflamatuar sitokinlerin üretimini azaltır ve kolit semptomlarını hafifletir (Sanuelly Da Paz Martins et al. 2023). Artrit için, kurkuminin NF- κ B ve Aktivatör Protein 1 (AP-1) sinyal yollarını inhibe etmesi, eklem iltihabı ve kıkırdak bozulması için çok önemli olan

IL-1 β , TNF- α ve matris metaloproteinazlar gibi pro-enflamatuar aracların seviyelerinin azalmasına yol açar (Mohammadian Haftcheshmeh et al. 2020). Ateroskleroz için, kurkuminin NF- κ B aracılı NLRP3 ekspresyonunu inhibe etme yeteneği, arter duvarlarında vasküler inflamasyonu ve lipid birikimini azaltmaya yardımcı olarak hastalın ilerlemesini hafifletir (Singh et al. 2021a). COVID-19'da kurkumin, IL-6 ve IL-1 β gibi pro-enflamatuar sitokinlerin seviyelerini düşürerek sitokin fırtınasını azaltır, potansiyel olarak hasta sonuçlarını iyileştirir ve semptomların Őiddetini azaltır (Peter et al. 2021). Bu moleküler etkileşimler, kurkuminin çeşitli enflamatuar hastalıkların yönetiminde geniş terapötik potansiyelinin altını çizmektedir.

2.3.1.2. Antioksidatif zellikler

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) retimi ile vücudun bunları detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizlikten kaynaklanan oksidatif stres, kanser patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Kurkumin, serbest radikalleri temizleyerek ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak antioksidatif etkiler gösterir (Seriner et al. 2022).

Kurkuminin antioksidatif özelliklerini, kimyasal yapısı itibariyle yapısındaki hidrojen atomlarının donasyonu ve serbest radikalleri etkisizleŐtirmesi ile gösterir. Bu durum, kurkuminin özellikle stres koşulları altında veya γ -radyasyon gibi zararlı ajanlara maruz kalmanın ardından beyin, karaciğer ve böbrekler gibi dokularda lipid peroksidasyonunu ve oksidatif hasarı azaltma yeteneğini gösteren çalışmalarda kanıtlanmıŐtır (UroŐevi et al. 2022).

2.3.1.3. Antimikrobiyal zellikler

Kurkumin, önemli antimikrobiyal özellikler de dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik aktiviteleriyle tanınmaktadır. Araştırmalar, kurkuminin bakteriler, virüsler ve mantarlar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı inhibitör etkiler sergilediğini göstermiştir (Trigo- gutierrez et al. 2021).

Kurkumin, bakteriyel hücre zarlarını bozarak, biyofilm oluşumunu engelleyerek ve bakteriyel hücre sinyal yollarına müdahale ederek hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkinlik göstermiştir (Hamzah et al. 2020). Ek olarak, kurkumin geleneksel antibiyotiklerin etkinliğini artırabilir ve bakteriyel enfeksiyonlarda adjuvan tedavi olarak potansiyel kullanımını düŐündürür (Wray et al. 2021).

Antiviral aktivite açısından, kurkumin viral replikasyonu inhibe eder ve konakçı hücrel tepkileri modüle eder. İnfluenza virüsü, hepatit C virüsü ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi virüslere karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Kurkumin, virüsün hücreye girişine, replikasyonuna ve protein sentezine müdahale ederek onu antiviral tedavi için umut verici bir aday haline getirir (Jennings and Parks 2020; Ardebili et al. 2021).

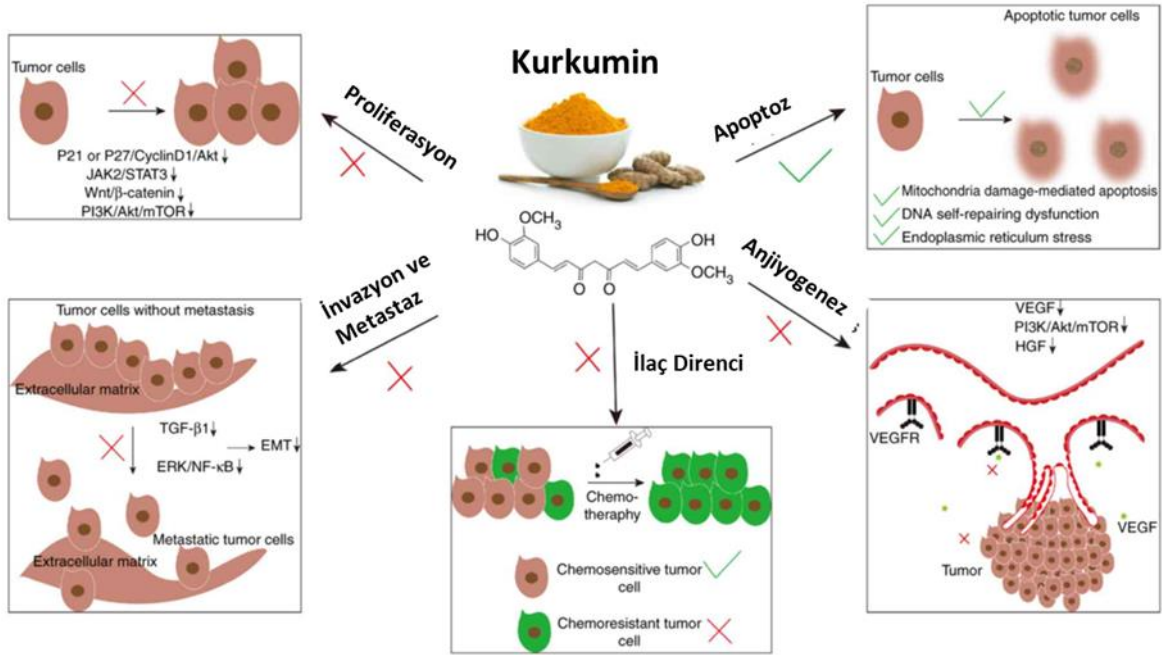
Kurkuminin antifungal fonksiyonu, özellikle *Candida* türlerinde mantar hücre zarı bütünlüğünü bozduğu ve mantar virülansı için çok önemli olan hif gelişimini engellediği gösterilmiştir. Ayrıca, kurkuminin antifungal etkileri, geleneksel antifungal ajanlarla birlikte kullanıldığında güçlendirilebilir (Azari et al. 2021).

Kurkuminin geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesi, klinik ortamlarda çeşitli potansiyel uygulamaların önünü açmaktadır. Kurkumin bazlı formülasyonlar, yara iyileşmesinde topikal uygulamaların yanı sıra enfeksiyonların tedavisinde sistemik kullanım için de geliştirilebilir (Salehi et al. 2021).

2.3.1.4. Antikanser Özellikleri

Kurkumin'in antikanser özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve kanser hücrelerinde kurkumin uygulamasında proliferasyon, anjiyogenez, invazyon, metastaz, ilaç direnci ve apoptoz dahil olmak üzere birçok aşamasına müdahale etme potansiyelini ortaya koymuştur (Şekil 2-3). Kurkumin, kanser hücrelerinde hem intrinsik hem de ekstrinsik yollar aracılığıyla apoptozu indükler. Apoptozun merkezi uygulayıcıları olan kaspazları aktive eder ve Bax gibi pro-apoptotik proteinleri aktive ederken Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinleri baskılar (Tomeh et al. 2019).

Ayrıca kurkumin, tümörlerin büyüme ve metastaz için ihtiyaç duyduğu yeni kan damarı oluşumu süreci olan anjiyogenezi inhibe eder. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi anjiyojenik faktörlerin ifadesini baskılar (Wang and Chen 2019). Kurkumin ayrıca hücre döngüsünü çeşitli aşamalarda, özellikle de hücre bölünmesi için kritik olan G2/M aşamasında durdurarak kanser hücresi proliferasyonunu bozar (Ye et al. 2021).



Şekil 2-3: Kurkuminin antikanser mekanizmaları (Wang et al. 2020).

2.3.2. Kanser Tedavisinde Kurkumin

Kurkuminin kanser tedavisindeki terapötik potansiyeli çok sayıda prelinik ve klinik çalışma ile doğrulanmıştır. Çok hedefli yaklaşımı onu kolorektal, meme, pankreas ve glioblastoma dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisi için umut verici bir aday haline getirmektedir.

2.3.2.1. Kurkumin'in Çeşitli Kanser Türlerindeki Etkinliğine İlişkin Çalışmalar

Kurkuminin antikanser etkinliği, farklı kanser türlerinde yapılan çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. En ölümcül malignitelerden biri olan pankreas kanserinde kurkumin, NF-κB ve STAT3 gen regülasyonu ile hücre sağkalımı ve radyoterapi hassasiyeti ile ilgili kritik sinyal yollarını hedef alarak kanser hücrelerinin büyümesini engeller (Schwarz et al. 2020). Akut myeloid lösemi kurkumin, AKT yolunu inhibe ederek apoptozu indükler ve böylece hücre sağkalım sinyallerini bozar (Zhou et al. 2021). Akciğer kanserinde, kurkumin ile yapılan çalışmalar özellikle ROS artışı ile beraber pro-apoptotik moleküllerin artışının sağlanması ile ilaç direncinde azalmanın gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Chen et al. 2020; Wu et al. 2022). Kolorektal kanserde kurkuminin hücre çoğalmasını engellediği, apoptozu indüklediği ve Wnt/β-katenin yoloğunu modüle ederek metastazı baskıladığı gösterilmiştir (Al Moubarak et al. 2021). Ayrıca başka bir çalışmada kolorektal kanserde, siklooksijenaz-2'nin (COX-2) baskılanması ve prostaglandin E2 (PGE2) sentezi inhibisyonu ile inflamasyon ve kanser

ilerlemesinde kritik oynadığı gösterilmiştir (Moriyuki et al. 2010). Prostat kanserinde, kurkuminin TRAIL-R1/DR4 ve TRAIL-R2/DR5 reseptörlerinin ekspresyonunun artışı ve NF-KB yolağının inhibisyonu sağlayarak hücreleri apoptoza duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Termini et al. 2020). Ayrıca, rahim ağzı kanserinde kurkumin, anti-apoptotik BCL-2 ve BCL-xL proteinlerinin inhibisyonunun yanı sıra pro-apoptotik BAX ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) aktivasyonu yoluyla apoptozu teşvik eder. Bu çeşitli moleküler etkileşimler, kurkuminin çok yönlü bir antikanser ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Meme kanserinde, kurkumin tümör baskılayıcı p53 ve pro-apoptotik protein BAX'ı aktive ederken, aynı zamanda mitokondriden sitokrom c salınımını teşvik ederek apoptozu daha da indükler (Anggia Paramita et al. 2022). Bunun yanı sıra meme kanserinde kurkumin, paklitaksel ve doksorubisin gibi geleneksel kemoterapötiklerin etkinliğini artırarak, tedavi için gerekli dozun azaltılabileceğini ve dolayısıyla yan etkilerin azaltılabileceğini göstermiştir (Farghadani and Naidu 2022). Bu çalışmalar, kurkuminin geniş spektrumlu antikanser aktivitesini ve standart tedavilerin etkinliğini artırmak için adjuvan bir tedavi olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

2.3.2.2. Kurkumin'in GBM Üzerindeki Etkilerine İlişkin Spesifik Bulgular

Glioblastoma Multiforme (GBM), agresif yapısı ve geleneksel tedavilere karşı direnci nedeniyle tedavisi en zor kanserlerden biridir. Kurkuminin GBM üzerindeki etkileri üzerine yapılan araştırmalar, kurkuminin GBM patogenezinde yer alan birden fazla yolu hedefleyebileceğini düşündüren umut verici sonuçlar göstermiştir.

2.3.2.2.1. Proliferasyonun Engellenmesi ve Apoptozun İndüklenmesi

Kurkuminin GBM hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve çeşitli mekanizmalar yoluyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Saeed ve ark. yürüttüğü bir çalışmada Kurkumin GBM'de sıklıkla aşırı eksprese edilen ve kötü prognozla ilişkili olan epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) baskılayarak hücre proliferasyonunun azalmasına ve kemoterapiye duyarlılığın artmasına yol açtığı belirtilmiştir (Saeed et al. 2022).

Glioblastoma hücre hatlarında yapılan diğer bir çalışmada, hücre büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenlenmesinden sorumlu PI3K-Akt-mTOR sinyal yolağının Kurkumin tarafından baskılandığı sonuç olarak hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Maiti et al. 2019).

Son çalışmalar, kurkuminin glioblastoma üzerindeki apoptotik etkisini vurgulayarak, bu agresif beyin tümörüne karşı terapötik bir ajan olarak potansiyelini göstermiştir. Örneğin, GBM hücre hatlarında yapılan çalışmalar kurkuminin ROS artışı ile beraber apoptozu indükleyen pro-apoptotiklerin (Bax, Bam) seviyesinin artışı, apoptozu baskılayan anti-apoptotiklerin (Bcl-2, Bcl-XL) seviyesinin azalışını ve apoptozun uygulayıcıları proteazların aktivasyonunu (kaspaz-3, -8 ve -9) sağladığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (Kuo et al. 2023; Razali et al. 2024).

2.3.2.2.2.Kemoterapötik Etkinliğin Artırılması

GBM tedavisindeki önemli zorluklardan biri, standart kemoterapötik ajan olan temozolomide (TMZ) karşı direnç gelişmesidir. Kurkumin'in GBM hücrelerinin TMZ'ye duyarlılığını artırdığı ve böylece etkinliğini geliştirdiği gösterilmiştir. Bu sinerjik etkiye, TMZ direncine katkıda bulunan MGMT ve diğer DNA onarım mekanizmalarının baskılanması aracılık eder (Sun et al. 2023).

Bu çalışmada, kurkuminin sentetik bir analogu olan pentagamavunon-1'in (PGV-1) en agresif beyin tümörlerinden biri olan glioblastomda bevasizumab direncinin üstesinden gelme potansiyeli araştırılmaktadır. Çalışmada, immün infiltrasyon analizi PGV-1'in glioblastoma karşı immün yanıtı artırabileceğini göstermiştir. Bulgular, PGV-1'in glioblastom tedavisinde bevacizumabın etkinliğini artırmak için yardımcı bir tedavi olarak potansiyelini vurgulamaktadır (Hermawan and Putri 2021).

2.3.2.2.3.Migrasyon ve İnvazyonun Üzerine Etkileri

GBM oldukça invazivdir ve tümör hücreleri çevre beyin dokusuna sızarak cerrahi rezeksiyonu zorlaştırır. Kurkumin, glioblastoma hücrelerinin migrasyonunu, metastazını ve invazyonunu inhibe etmede önemli bir potansiyel göstermiştir. Son çalışmalar, kurkumin ve türevlerinin bu süreçleri etkileme mekanizmalarını aydınlatmıştır. Bir kurkumin analogu olan demetoksikurkuminin (DMC), kanser hücresi sağkalımı ve metastazında çok önemli bir rol oynadığı bilinen PI3K/Akt yolağını inhibe ederek GBM hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve istilasını baskıladığı bulunmuştur (Su et al. 2021).

Bir başka çalışmada, bir kurkumin türevi olan hidrazinobenzoilcurcumin'in (HBC) glioblastoma kök benzeri hücreler üzerindeki etkileri araştırılmış ve HBC'nin Ca²⁺/kalmoldulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) yolunu hedefleyerek bu hücrelerin

kök benzeri özelliklerini, göçünü ve istilasını engellediği gösterilmiştir (Shin et al. 2019).

2.3.2.2.4.Glioma Kök Hücrelerinin Hedeflenmesi

Glioma kök hücreleri (GSC'ler) GBM nüksünde ve tedaviye dirençte önemli bir rol oynamaktadır. Kurkumin, kök hücre özelliklerinin korunması için gerekli olan Notch ve Hedgehog sinyal yollarını inhibe ederek GSC'leri hedef alır (Palermo et al. 2019). Bu etki sadece tümörlerdeki kök hücre popülasyonunu azaltmakla kalmaz, aynı zamanda onları geleneksel tedavilere karşı hassaslaştırarak potansiyel olarak nüks olasılığını azaltır. Kurkumin, tümör nüksü ve geleneksel tedavilere direnç için çok önemli olan CD133(+) GBM kök hücrelerini hedefleyip ortadan kaldırarak glioma kök hücrelerini önemli ölçüde etkilemektedir. Çalışma, kurkuminin CD133(+) kök hücrelerinde önemli bir ölçüde azalmaya neden olduğunu vurgulamaktadır (Mukherjee et al. 2018).

2.3.2.2.5.Tümör Mikroçevresinin Modülasyonu

Kurkumin, glioblastomda yaygın olan hipoksik koşullar altında tümör mikroçevresinin modüle edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Tümörlerdeki hipoksi, düşük oksijen seviyelerine karşı hücrel yanıtın önemli bir düzenleyicisi olan hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α 'nın (HIF-1 α) stabilizasyonuna ve aktivasyonuna yol açarak anjiyogenezi, metabolik adaptasyonu ve hücre sağkalımını teşvik eder. Kurkumin, HIF-1 α aktivitesini inhibe ederek anjiyogenez için çok önemli olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi HIF-1 α -hedefli genlerin baskılanmasına neden olur. Bu baskılama, tümörü besleyen yeni kan damarlarının oluşumunu azaltarak tümörün büyüme ve yayılma kabiliyetini etkili bir şekilde bozar (Sahebkar et al. 2023).

Kurkumin, tümörle asosiye mikroglia/makrofajları (TAM) tümörü destekleyen M2 tipinden tümörisidal M1 tipine yeniden polarize ederek glioblastoma (GBM) tümör mikroçevresini (TME) önemli ölçüde modüle eder ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) indüksiyonu yoluyla aktive edilmiş doğal öldürücü (NK) hücrelerin dahil olmasını kolaylaştırır. NK hücreleri M2-ilişkili proteinlerin (STAT3, ARG1, IL-10) baskılanmasına ve M1-ilişkili proteinlerin (STAT1, iNOS) indüklenmesine katkıda bulunarak daha enflamatuvar ve tümörisidal bir ortamı teşvik ettiğinden, anti-tümör yanıtını arttırmak için çok önemlidir (Mukherjee et al. 2018).

2.4. Doğal Kurkumin ile İlgili Zorluklar ve Kurkumin Türevleri

Terapötik özelliklerine rağmen, kurkuminin klinik uygulaması, zayıf biyoyararlanımı nedeniyle önemli ölçüde engellenmektedir. Bu bölümde, doğal kurkuminin biyoyararlanımı ve aktivitesini çevreleyen sorunlar ele alınmakta ve terapötik potansiyelini artırmayı amaçlayan kurkumin türevlerinin geliştirilmesi incelenmektedir.

2.4.1. Biyoyararlanım ve Etkinlik Sorunları

Kurkuminin düşük biyoyararlanımı, etkili klinik kullanımının önündeki en kritik engellerden biridir. Biyoyararlanım, dolaşıma giren ve aktif bir etkiye sahip olabilen bir ilacın veya maddenin oranını ifade eder. Kurkuminin biyoyararlanımının düşük olmasına çeşitli faktörler katkıda bulunur ve bu da terapötik etkinliğini etkiler (Joshi et al. 2023).

2.4.1.1. Emilim ve Metabolizma

Oral uygulama üzerine, kurkumin gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emilir. Çalışmalar, yutulan kurkuminin sadece küçük bir kısmının plazmada tespit edilebildiğini ve bunun da minimum emilime işaret ettiğini göstermiştir (Sohn et al. 2021). Kurkuminin hidrofobik yapısı, gastrointestinal sistemin sulu ortamında çözünmesini engelleyerek emilimini daha da azaltır.

Kurkumin emildikten sonra karaciğer ve bağırsak mukozasında kapsamlı bir metabolizmaya uğrar. Hızla kurkumin glukuronid ve kurkumin sülfat gibi çeşitli metabolitlere dönüştürülür ve bunlar daha sonra safra ve idrarla atılır (Adiwidjaja et al. 2017). Bu metabolitlerin ana bileşikten biyolojik olarak daha az aktif olduğuna ve dolayısıyla kurkuminin genel terapötik potansiyelini azalttığına inanılmaktadır.

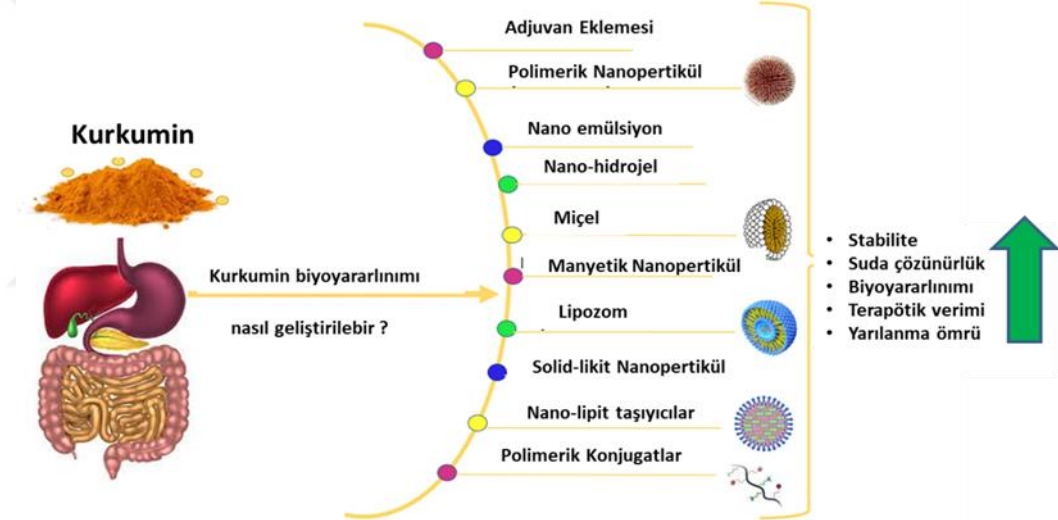
2.4.1.2. Hızlı Sistemik Eliminasyon

Kurkumin kan dolaşımında kısa bir yarılanma ömrü ile hızlı sistemik eliminasyon sergiler. Kurkumin, geniş terapötik potansiyeline rağmen, hızlı sistemik eliminasyonu nedeniyle klinik uygulamalarda önemli zorluklarla karşılaşmaktadır. Oral uygulama üzerine, kurkumin hızlı metabolizmaya ve sistemik klirens uğrayarak düşük biyoyararlanıma yol açar. Khajehpour ve ark. (2023) tarafından yapılan bir çalışma, kurkuminin insan vücudundaki yarı ömrünün belirgin şekilde kısa olduğunu ve tek başına tüketildiğinde yaklaşık 2,2 saatlik bir yarı ömre sahip olduğunu vurgulamıştır.

Bununla birlikte, piperin ilavesi, hızlı metabolizmasını ve klirensini inhibe ederek kurkuminin yarı ömrünü önemli ölçüde 4,5 saate uzatmış ve böylece biyoyararlanımını artırmıştır (Khajeh pour et al. 2023). Bu modifikasyonlar, klinik ortamlarda kurkuminin istenen terapötik etkilerini elde etmek için çok önemlidir. Sonuç olarak, kurkuminin terapötik olarak etkili plazma konsantrasyonlarına ulaşmak ve bu konsantrasyonları korumak zordur.

2.4.2. Kurkumin Türevleri

Doğal kurkumin ile ilişkili biyoyararlanım ve aktivite sorunlarının üstesinden gelmek için araştırmacılar kurkumin türevlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bu türevler, terapötik etkinliğini korurken veya geliştirirken kurkuminin farmakokinetik özelliklerini geliştirmek için tasarlanmıştır (Şekil 2-4).



Şekil 2-4:Kurkuminin biyoyararlanımını geliştirmede kullanılan yöntemler (Mobahat et al. 2023).

2.4.2.1. Yapısal Değişiklikler

Kurkumin türevlerinin geliştirilmesindeki birincil stratejilerden biri yapısal modifikasyonları içerir. Araştırmacılar, kurkuminin kimyasal yapısını değiştirerek çözünürlüğünü, stabilitesini ve biyoyararlanımını iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Örneğin, polar grupların eklenmesi veya diğer moleküllerle konjugasyon gibi modifikasyonlar araştırılmıştır. Örneğin, polivinil alkolün (PVA) kurkumin ile birleştirilmesi çözünürlüğünü ve stabilitesini önemli ölçüde artırır. Bu yaklaşım sadece kurkuminin sulu çözeltilerdeki süspansiyonunu ve fotostabilitesini iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda hücresel alımını ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini

de artırır (Kang et al. 2024). Bir başka çalışmada, kurkuminin biyoyararlanımını önemli ölçüde artıran bir formülasyon oluşturmak için niyozomlarla birlikte doğal derin çözücüler kullanılmıştır. Bu yöntem, yüksek hapsedme verimliliği ve gelişmiş stabilite ile sonuçlanmış ve kurkuminin etkinliğini uzun süreler boyunca koruyan kontrollü bir salım sistemi sağlamıştır (Bashkeran et al. 2024). Ek olarak, modifiye nişasta kullanılarak amorf kurkumin nanokompozitlerinin geliştirilmesi, çözünürlük ve stabilitede önemli gelişmeler göstermiştir. Çözücü içermeyen bir yöntemle hazırlanan bu nanokompozitler, gelişmiş çözünme oranları ve geçirgenlik göstererek kurkumini kanser tedavisinde daha etkili hale getirmiştir (Chen et al. 2024). Bu çalışmalar, kurkuminin farmakokinetik özelliklerini geliştirmek için kimyasal modifikasyonların ve gelişmiş formülasyon tekniklerinin potansiyelinin altını çizmekte ve böylece tıbbi tedavilerde uygulanabilirliğini genişletmektedir.

2.4.2.2. Nanoformülasyonlar

Nanoformülasyonlar, kurkuminin biyoyararlanımını artırmak için umut verici bir başka yaklaşımı temsil etmektedir. Kurkuminin nanopartiküller, lipozomlar veya miseller içinde kapsüllenmesi, onu hızlı metabolizmadan koruyabilir ve emilimini kolaylaştırabilir. Bu nanoformülasyonlar, kurkuminin çözünürlüğünü ve stabilitesini artırarak hedef dokulara daha iyi iletilmesini sağlar (Mobahat et al. 2023; Mousavi et al. 2023).

Hong ve ark. yaptığı çalışmada folat reseptörlerini aşırı eksprese eden kanser hücrelerine hedeflenmeyi artırmak için folik asit (FA) ile konjuge edilmiş β -siklodekstrin (β -CD) nanopartikülleri kullanmıştır. Nanopartiküller, folat reseptörü aracılı endositoz yoluyla etkili hücresel alım sergilemiş ve in vivo tümör dokularında önemli birikim göstererek minimum yan etkiyle gelişmiş antitümör etkinliği sağlamıştır (Hong et al. 2021).

Başka bir çalışmada kurkuminin eksozomlarda kapsüllenecek, kan-beyin bariyerini (KBB) geçme ve iltihaplı dokuları hedef alma konusundaki doğal yeteneklerinden yararlandı. Bu kurkumin yüklü eksozomlar (Ex-cur), serbest kurkumin ile karşılaştırıldığında iskemik beyin bölgelerinde önemli ölçüde gelişmiş stabilite ve birikim göstermiştir. Bu dağıtım sistemi, serebral iskemi tedavisinde ve potansiyel olarak diğer nöroprotektif uygulamalarda kurkuminin klinik faydasını arttırmak için umut vaat edici sonuçlar ortaya çıkarmıştır (He et al. 2020).

2.4.2.3. Ön İlaç (Pro-Drug) Yaklaşımları

Ön ilaç yaklaşımları, vücut içinde aktif forma metabolik dönüşüm geçiren bir bileşik oluşturmak için kurkuminin modifiye edilmesini içerir. Bu strateji, kurkuminin çözünürlüğünü ve emilimini artırarak daha yüksek biyoyararlanıma ve gelişmiş terapötik etkilere yol açabilir (Najjar and Karaman 2019). Ön ilaç yaklaşımları, önemli terapötik potansiyeli ile bilinen ancak zayıf çözünürlük ve hızlı metabolik bozunma ile engellenen bir bileşik olan kurkuminin biyoyararlanımını artırmak için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Örneğin, kurkumin diethyl disuccinate ve kurkumin diethyl diglutarate gibi ester bağlantılı ön ilaçlar, daha iyi emilim ve terapötik etkinliği kolaylaştırarak artan stabilite ve çözünürlük göstermiştir. Bu gelişmeler, ön ilaç stratejilerinin, doğal sınırlamalarının üstesinden gelerek kurkuminin klinik uygulanabilirliğini önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir (Jithavech et al. 2022).

2.4.2.4. Kurkumin Analogları

Kurkumin analogları, kurkuminin yapısını ve işlevini taklit eden ancak gelişmiş farmakokinetik özelliklere sahip bileşiklerdir. Bu analoglar, kurkuminin sınırlamalarını ele alırken biyolojik aktivitesini korumak için tasarlanmıştır. Kurkumin analogları, özellikle kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde doğal kurkumin üzerindeki gelişmiş terapötik etkinlikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Son çalışmalar, bu analogların kurkuminin biyoyararlanımını, stabilitesini ve etki gücünü nasıl geliştirdiğini göstermiştir (Mbese et al. 2019).

Örneğin, kurkumin-pirazol türevlerinin nanokatalizörler kullanılarak sentezlenmesinin gelişmiş antioksidan aktiviteler sergilediği gösterilmiştir ve bu da gelişmiş terapötik uygulamalar için potansiyel olduğunu düşündürmektedir (Kamrani et al. 2024). Ayrıca, üçlü negatif meme kanserinde (TNBC) kanser kök benzeri hücrelerin inhibe edilmesinde kurkumin analoglarının kullanımı araştırılmıştır. TL3 gibi türevler, TNBC hücrelerine karşı spesifik sitotoksikite ve doksorubisin ve sisplatin gibi kemoterapötik ajanlarla sinerjik etkiler göstererek genel antikanser etkinliğini artırmıştır (Ros et al. 2024). Ayrıca, curcumin-BF2 ve iyotlu-curcumin-BF2 analogları, hidrofobik etkileşimleri ve çözünürlüğü artırarak ve böylece fibril oluşumunu önleyerek Parkinson hastalığında rol oynayan bir süreç olan α -sinüklein fibrilasyonunu inhibe etmede etkili olmuştur (Tinku et al. 2024). Bu bulgular, kurkumin analoglarının doğal kurkuminin

sınırlamalarının üstesinden gelme potansiyelinin altını çizmekte ve çeşitli tıbbi uygulamalarda iyileştirilmiş terapötik sonuçlar sunmaktadır.

2.5. Projenin Amacı

Genel bilgilerde belirtildiği üzere GBM kemoterapi ve radyoterapi direnci gösteren bir kanser türü olmak üzere bu hastalığın tedavisi alternatif stratejiler gerektirmektedir. Alternatif bir tedavi stratejisi olarak kurkumin anti-kanser potansiyeli sayısız çalışmayla gösterilmiş bir moleküldür. Kurkuminin anti-kanser potansiyeline rağmen tedavi aşamasındaki en büyük handikapı biyoyararlanımının oldukça düşük olmasıdır. Bu noktada farmakolojik profilini iyileştirmek için kurkuminin kimyasal yapısı değiştirilerek kurkumin analogları geliştirilmiştir. Projemizde Analog1, Analog2 ve Analog3 isimli üç yeni kurkumin türevinin GBM üzerindeki anti-kanser potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk aşamada bu üç analog arasında anti-kanser potansiyeli en yüksek olan molekül belirlenip, ikinci aşamada bu molekülün kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmalarının ayrıntılı analizler ile aydınlatılması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

Proje kapsamında kullanılan cihazlar, cihazların markaları ve kullanım amaçları Tablo 3-1’de listelenmiştir.

Tablo 3-1: Proje kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka	Kullanım Amacı
Laminar Flow Kabin	Nüve	Hücre Kültürü
İnkübatör	Nüve	Hücre Kültürü
Su Banyosu	İsolab	Hücre Kültürü
Santrifüj	Beckman Coulter	Hücre Kültürü
Işık Mikroskobu	SO-IF Invert	Hücre Kültürü
Floresan Mikroskop	Zeiss, Axiovision	ROS, Apoptoz ve Migrasyon Analizi
Mikroplate Okuyucu	Thermo Scientific Multiskan	MTT analizi
Spektrofotometre	Thermo Scientific NanoDrop	DNA/RNA konsantrasyon ölçümü
PCR cihazı	Applied Biosystems QuantStudio 5	RNA ekspresyon çalışmaları
-80 Dondurucu	Nüve	Hücre Dondurma ve Malzeme Stok

3.1.2. Ticari Kitler

Proje kapsamında kullanılan ticari kitler ve markaları Tablo 3-2’de listelenmiştir.

Tablo 3-2: Proje kapsamında kullanılan ticari kitler

Kit	Marka
RNA izolasyon	Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus w/ TRI Reagent®
cDNA Sentez	SensiFAST cDNA Synthesis Kit
Kantitatif PCR Kit	SensiFAST SYBR No-ROX Kit
DNA izolasyon	Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit

3.1.3. Kimyasallar

Proje kapsamında kullanılan kimyasallar ve markaları Tablo 3-3’te listelenmiştir.

Tablo 3-3: Proje kapsamında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Marka
DCFH-DA	Sigma-Aldrich (D6883)
Akridine Turuncusu	Invitrogen (A1301)
Propidium iyodür	Biotium (40017)
Dimetil Sülfoksit	Merck (Culture Grade) (D2650)
MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)	Neofroxx (1334)
Saf Kurkumin	Merck (820354)
Kurkumin Analogları (Analog 1,2 ve 3)	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Bölümü’nde sentezlenmiştir.

3.1.4. Hücre Kültürü Malzemeleri

Proje kapsamında kullanılan Hücre kültürü malzemeleri ve markaları Tablo 3-4'te listelenmiştir.

Tablo 3-4:Proje kapsamında kullanılan hücre kültürü malzemeleri

Malzeme	Marka
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN Biotech (p04-3590)
Penicillin-Streptomisin	PAN Biotech (p04-7100)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAN Biotech p04-36500
Trypsin-EDTA	Sigma (T4049)

3.1.5. Hücre Hatları

Projemizde U87 glioblastoma ve HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) olmak üzere iki tip hücre hattı kullanılmıştır. U87-MG olarak da bilinen U87 hücre hattı, bilimsel araştırmalarda kullanılan bir insan hücre hattıdır. Bir tür beyin kanseri olan malign glioma kaynaklanır. ATCC (American Type Culture Collection) katoloğunda HTB-14 kodu ile yer almaktadır. HUVEC biyoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir tür hücre hattıdır. İnsan göbek kordonundan alınan damarların endotelinden izole edilirler. ATCC katoloğunda CRL-1730 kodu ile yer almaktadır.

3.1.6. Primerler

Proje kapsamında kullanılan primerler ve sekansları Tablo 3-5'te listelenmiştir.

Tablo 3-5: Proje kapsamında kullanılan primerler

Hedef	Forward (5'->3')	Reverse (5'->3')
ACTB (Actin)	CGAGCACAGAGCCTCGCCTT	ACATGCCGGAGCCGTTGTCCG
Casp3	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	GCATCGACATCTGTACCAGACC
Bcl-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
Bax	ATGGACGGGTCCGGGGAGCA	CCCAGTTGAAGTTGCCGTCA
MMP9	GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC	CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT
MMP2	AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA	CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
NFKB1	GCAGCACTACTTCTTGACCACC	TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC
c-MYC	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG
Ki67	GAAAGAGTGGCAACCTGCCTTC	GCACCAAGTTTTACTACATCTGCC
CCND1	TCTACACCGACAACCTCCATCCG	TCTGGCATTTTGGAGAGGAAGTG
TP53	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
CDKN1A (P21)	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
mtDNA	CCCTAAAACCCGCCACATCT	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT
HGB	GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA	CCTTGATACCAACCTGCCAG

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Yöntemleri

Projemizin başlangıç aşamasında elimizde mevcut bulunan ve gereçler bölümünde tanımı yapılmış olan insan glioblastoma (U87) ve İnsan Göbek Damarı Endotel (HUVEC) hücre hatlarının kültür çalışması aşağıda belirtilen yöntemlerle yapılmıştır.

3.2.1.1. Hücre Canlandırma

- Dondurulmuş hücreleri çözmek için hücre tiplerine ait birer adet kriyovial sıvı nitrojen deposundan çıkarılmış ve hızla 37°C su banyosuna aktarıldı.
- Flakon, içeriği tamamen çözülene kadar, tipik olarak 1-2 dakika içinde nazikçe döndürülmüştür. Çözülmenin ardından kriyovialin dışı %70 etanol ile dekontamine edildi.

- Hücre süspansiyonu daha sonra 10 mL önceden ısıtılmış kültür ortamı içeren (DMEM) konik bir tüpe aktarılmış ve kriyoprotektan (DMSO) etkili bir şekilde seyreltilmiştir.
- Süspansiyon 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler peletlendi ve kriyoprotektan içeren süpernatantın uzaklaştırıldı.
- Hücre peleti uygun hacimde taze kültür ortamında yeniden süspanse edildi ve 10 cm'lik petri kültür plakasına aktarıldı.
- Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş bir inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonra, kalan kriyoprotektan ve canlı olmayan hücreleri uzaklaştırmak için ortam değiştirildi.
- Süreç boyunca hücre tutunması ve morfolojisi mikroskop kullanılarak izlenmiştir. Gerekirse, hücre canlılığı tripan mavisi dışlama veya alternatif bir canlılık tahlili kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.2. Hücre Pasajlama

- 10 cm'lik petri plaklara ekilmiş U87 ve HUVEC hücre hatları inkübatörde %5 CO₂ ve 37 °C ortamda çoğaltıldı.
- Plak üzerindeki hücre yoğunluğunun %90'a ulaştığı durumda hücre için pasaj işlemi gerçekleştirildi.
- Pasaj işlemi için öncelikle hücre üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyi 4 ml PBS ile yıkandı.
- Hücrelerin plak yüzeyinden enzimatik yolla ayrılması için 1 ml Tripsin-EDTA (%0.25) eklendi ve inkübatörde 5 dk bekletildi.
- Tripsin-EDTA inaktivasyonu ve hücrelerin toplanabilmesi için hücreler üzerine 5 ml DMEM eklendi ve 15 ml'lik tüplere alındı.
- Tripsin-EDTA kalıntısının uzaklaştırılması amacıyla hücreler 15 ml'lik tüp içerisinde 1500 RPM'de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrası üst kısımdaki besi yeri uzaklaştırıldı ve canlı hücre pelleti taze besi yeri ile sulandırılıp yeni plaklara ekildi.

3.2.1.3. Hücre Dondurma

- Hücrelerin dondurulması işleminde yukarıda belirtilen yöntem hücrelerin tekrar ekilmesi adımına kadar birebir uygulandı.
- Santrifüj adımından sonra hücreler bu sefer içerisinde %10 DMSO, %20 FBS içeren taze besi yeri ile sulandırılıp dondurulmak üzere kypotüplere bölüştürüldü.
- Hücrelerin kristalleşme ile zarar görmeden dondurulması amacıyla 1 gün -80 °C'de tutulduktan sonra sıvı azota alınarak aşamalı dondurma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.1.4. Hücre Canlılık Testi

Uygulanan madde etkisinde hücre canlılığı, hücrel metabolik aktiviteyi ölçen kolorimetrik bir teknik olan MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. MTT testi, hücre canlılığını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir biyolojik deney yöntemidir. Hücrelerin metabolik aktivitesini yansıtan bir reaksiyonla çalışır. Test, canlı hücrelerin sarı tetrazolyum tuzu MTT'yi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) mitokondriyal süksinat dehidrojenazın etkisiyle mor formazan kristallerine indirgeme yeteneğine dayanmaktadır. MTT hücrelere girer ve daha sonra sadece metabolik olarak aktif hücrelerde aktif olan bu enzim tarafından indirgenerek formazan kristallerinin oluşmasına neden olur. İnkübasyonun ardından kristaller DMSO gibi çözüldürücü bir ajan kullanılarak parçalanır ve formazanın çözeltiye salınması sağlanır. Formazan kristallerinin yoğunluğu hücre canlılığının bir göstergesidir ve bu yoğunluk spektrofotometrik yöntemlerle ölçülerek örneklerin absorbans değerleri hücre canlılığı ile ilişkilendirilir (Ghasemi et al. 2021).

Saf Kurkumin, kurkumin analogları (Analog1,2 ve 3) ve TMZ maddelerinin hücre canlılığı etkisinin analiz edilebilmesi için MTT yöntemi kullanıldı. MTT analizi için hücrelere farklı doz aralıklarında (dozlar her madde için sonuçlar kısmında belirtilmiştir) saf kurkumin, özgün kurkumin analogları (Analog1, 2 ve 3) ve TMZ uygulandı. Uygulama sonrası 48. Saatte MTT analizi ile hücre canlılıkları test edildi. Kullanılan bütün moleküller DMSO'da çözüldükten sonra besi yerinde seyreltilmiştir. DMSO'nun potansiyel sitotoksitesini hesaba katmak için, ilgili DMSO konsantrasyonunu (etken moleküller olmadan) içeren kontrol kuyuları dahil edilmiş ve DMSO'nun sitotoksik etkisi her molekülün (Analog1, 2, 3 ve TMZ) etkisinden çıkarılmıştır. Sonraki aşamada maddelerin %50 öldürücü dozu olan IC50 (half maximal inhibitory concentration) değerleri doza bağımlı canlılık üzerinden lineer regresyon yöntemi ile belirlenmiştir. Uygulama aşağıdaki adımlarda gerçekleştirildi;

Hücrelerin 96 kuyuluk plakaya ekimi;

- İnkübatorde büyümekte olan U87 ve HUVEC hücreleri yukarıda belirtilen yöntemlerle tripsinize edilip buldukları plakadan kaldırıldıktan sonra sayılıp MTT analizi yapılacak olan 96 kuyuluk plakaya kuyu başına 100 µl besi yerinde 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi.

MTT stok çözeltisi hazırlanması;

- MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] analizi için uygun olan 12 mM stok çözeltisi 5mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde hazırlandı ve 20 µm çaplı selüloz asetat filtreden geçirildi. Stok solüsyonu -20 derecede ışıktan korunacak şekilde muhafaza edildi.

0. Saat

- U87 ve HUVEC hücrelerine değişen konsantrasyonlarda ayrı ayrı saf kurkumin (5µM-75µM), Analog1(5µM-75µM) ve TMZ(0.2mM-1.5mM) maddeleri uygulandı. Her bir doz için analiz 4'er kez yapılarak ortalaması alındı.

48. Saat

- 96 kuyu plakada ekili ve madde uygulanmış olan hücre üzerindeki besi yerleri uzaklaştırıldı.
- Hücreler üzerine 1.2 mM MTT solüsyonu içerecek şekilde 100'er µl taze besi yeri konuldu ve 3 saat 37 °C %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası kuyu içerisindeki besi yerleri uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin ürettiği formazan kristallerinin çözülmesi için kuyulara 100 µl DMSO eklendi ve orbital çalkalayıcıda 15 dk kristallerin çözülmesi beklendi. MTT kimyasalının ışığa duyarlı olmasından dolayı inkübasyon öncesi plaka alüminyum folyo ile kaplandı.
- İnkübasyon sonrası plaka okuyuculu spektrofotometrede 540 ve 590 nm dalga boylarında absorbans ölçümü yapıldı.

3.2.2. DCFH-DA Boyama ile ROS Analizi

DCFH-DA (2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat) testi, hücrelerdeki reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesini tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Test, hücre geçirgen DCFH-DA'nın hücrelere girmesiyle başlar, burada hücre içi esterazlar diasetat gruplarını parçalayarak floresan olmayan ve hücre tarafından tutulan DCFH'ye (2',7'-diklorodihidrofloresein) dönüştürür. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve peroksinitrit gibi ROS varlığında DCFH, oldukça floresan bir bileşik olan DCF (2',7'-diklorofloresein) oluşturmak üzere oksitlenir. ROS seviyeleriyle korelasyon gösteren DCF'nin floresan yoğunluğu, floresan mikroskobu, akış sitometrisi veya floresan plaka okuyucu gibi çeşitli tespit yöntemleri kullanılarak ölçülebilir. DCFH-DA'nın genel bir ROS göstergesidir ve spesifik ROS türleri arasında ayırım yapmaz. Çalışmamızda

kurkumin/kurkumin analogları uygulanmış hücrelerde ROS seviyeleri DCFH-DA boyaması ile analiz edilmiştir (Kim and Xue 2020).

ROS analizi için öncelikle U87 hücreleri 24 kuyulu plakalara ($5,0 \times 10^4$ /kuyu) eşit şekilde ekilmiş ve hücreler daha sonra standart koşullar altında (37°C , %5 CO_2) 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra U87 hücreleri çeşitli dozlarda (dozlar her madde için sonuçlar kısmında belirtilmiştir) saf kurkumin ve kurkumin analogu ile muamele edilmiş ve 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. DMSO içinde hazırlanan DCF-DA (20mM) stok çözeltisi PBS ile 0.1 mM final konsantrasyona seyreltildi ve hücrelere uygulandı. Daha sonra hücreler 37°C 'de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve 467-498 nm eksitasyon ve 513-556 nm emisyon aralığında bir filtre kullanılarak floresan mikroskop (Zeiss, Axiovision) altında incelendi. Uyguladığımız madde dozuna bağlı olarak yeşil floresans özellikteki artışa paralel olarak ROS üretiminin artmış olduğu tespiti yapılmış ve intensite analizi ile ROS miktar değişimi hesaplanmıştır.

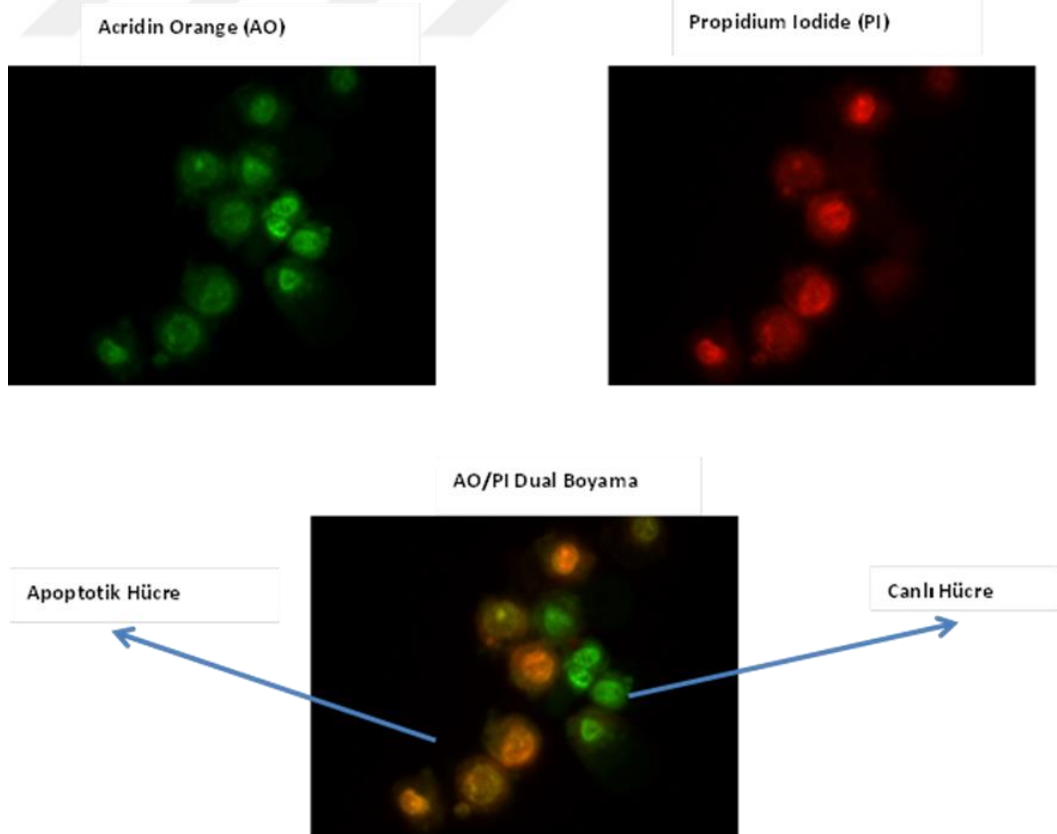
ROS miktarındaki değişimin analizi için her bir kuyuda farklı bölgelerden ortalama 100 hücrenin intensiteleri ayrı ayrı Zen 2.3 Blue Edition yazılımı ile analiz edilip hesaplandı. Aşağıda belirli bölgelerden elde edilmiş temsili görüntüler yer almaktadır.



Şekil 3-1: Temsili floresan intensite karşılaştırması

3.2.3. AO/PI Dual Boyama ile Apoptoz Analizi

AO/PI ikili boyama tekniği, apoptoz tayini amacıyla saf kurkumin (30uM) ve Analog2 (6uM) etkisindeki U87 hücreleri üzerinde uygulandı. Kısaca, hücreler, yaklaşık 10.0000 hücre/oyuk yoğunlukta 12-well plate ekildi. Uygulanan madde ile 48 saat inkübasyonun ardından hücreler tripsinize edildi ve 25 uL hücre süspansiyonları cam slaytlara aktarıldı. Hücre süspansiyonlarına 1 uL AO/PI boyama solüsyonu (100 ug/mL AO ve 100 ug/mL PI içeren bir boya karışımı) ilave edildi ve ardından numuneler bir lamel ile kapatıldı. Hücre morfolojisi, AO/PI eklenmesinden sonra bir floresan mikroskobu altında incelendi (AO:500nm eksitasyon, 530nm emisyon; PI: 510nm eksitasyon, 595nm emisyon). İstatistiksel analiz için mikroskop altında 3 farklı bölgeden az 200 hücre sayıldı ve canlı apoptotik hücre oranları belirlendi. Bu boyama yönteminin prensibinde hem canlı hem de ölü hücreler AO ile boyanırken, PI sadece zar bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücreleri boyar. Canlı hücreler eşit şekilde yeşil görünürken, erken apoptotik hücreler çekirdeklerinde yeşil noktalar gösterir. Geç apoptotik hücreler turuncu boyanır ve yoğunlaştırılmış ve/veya sıklıkla parçalanmış çekirdekler gösterir (Ude et al. 2022).



Şekil 3-2: AO/PI ikili boyaması sonucu temsili hücre görüntüleri

3.2.4. “Wound Healing Assay” (Scratch) Tekniği ile Hücree Migrasyon Analizi

In vitro wound healing assay analizi, hücre migrasyonunu incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, hücre tek tabakası (monolayer) üzerinde scratch olarak adlandırılan yeni bir yapay boşluk yaratıldığında, yeni oluşturulan boşluğın kenarındaki hücrelerin boşluğu kapatmak için açıklığa doğru hareket edeceği gözlemine dayanmaktadır. Hücrelerin migrasyonu yeni hücre-hücre bağlantıları yeniden kuruluncaya kadar devam eder. Temel adımlar, tek tabakalı hücreler üzerinde bir “çizik” oluşturulmasını, çizici kapatmak için başlangıçta ve hücre göçü sırasında düzenli aralıklarla görüntülerin alınmasını ve hücre göçü hızını belirlemek için görüntülerin karşılaştırılmasını içerir (Martinotti and Ranzato 2019).

Buna göre hücre migrasyonu Analog2 etkisinde dozlara bağlı olarak madde uygulanmamış kontrol hücre ile karşılaştırılarak analiz edildi. Migrasyon analizi için mikroskop görüntüleri 0, 12 ve 24. Saatte alındı.

3.2.5. Hedef Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR) ile Analizi

3.2.5.1. Hücrelerden Total RNA elde edilmesi

Hücrelerden total RNA elde edilmesi, Trizol bazlı bir ticari kit kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, hücreler 1x PBS ile iki defa yıkandıktan sonra tripsin aracılığıyla kültür kabından ayrılarak toplandı ve mikrosantrifüj tüplerine alındı. +4°C’de 5000 x g’de 5 dakika santrifüjlenerek enzim ve solüsyon uzaklaştırıldı. 0.75-1 ml Trizol ajanı kullanılarak homojenize edildi. Metodolojide belirtilen yönergeler izlenerek faz ayrımları gerçekleştirildi ve sonunda tüpte çözünmüş halde total RNA elde edildi. Total RNA’nın konsantrasyonu “40xOD260xseyreltme faktörü” formülüne göre belirlendi. RNA saflığı OD260/OD280 oranına bakılarak tespit edilip, oranı 1.8-2 arasında olan örnekler cDNA sentezi için uygun kabul edildi. Örnekler alikotlanarak uzun dönem saklama koşulu olan -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.2. cDNA Sentezi

İşlem RNA degradasyonunu önlemek amacıyla reaksiyon karışımı RNaz içermeyen steril kabin ortamında ve buz üzerinde hazırlanmıştır. Karışıma sırasıyla 0.3 ug total RNA, 4 ul 5X tampon çözelti, 1 ul ters transkriptaz enzimi eklenip toplam hacim ultra steril su (MiliQ-water) ile 20ul’ye tamamlandı. cDNA sentezi termal döngü cihazında belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Koşullar: 25 °C’de 10 dk (primer bağlanması),

42 °C’de 15 dk (ters transkripsiyon), 85 °C’de 5 dk (inaktivasyon). Elde edilen cDNA - 20°C saklanmıştır.

3.2.5.3. mRNA Anlatım Analizleri (Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Hedef genlerin ifadeleri gerçek zamanlı kantitatif PCR tekniği ile MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) yönergeleri çerçevesinde belirlendi (Bustin et al. 2009). Tasarlanan gene özgü primer çiftleri ve PCR koşulları her gene özgü PCR reaksiyonu için ayrıca optimize edildi. Sentezlenen cDNA ile gerçek zamanlı PCR ifade analizleri yapıldı. PCR için Sybr Green floresan boya ve polimeraz enzimi içeren master mix karışımı kullanılarak reaksiyonlar toplam 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Kantitatif PCR deneyi 3 teknik replika ve bağımsız 3 biyolojik replika olarak tasarlandı. Normalizasyonda referans gen olarak B-actin kullanıldı. Ölçümler, belirtilen koşullarda ABI (QuantStudio 5) marka cihazda yapıldı. PCR koşulları: 95°C 10 dakika, [95°C 15 saniye denatürasyon, 60°C 30 saniye bağlanma, 72°C 40 saniye uzama] (40 döngü), 95°C 60 saniye denatürasyon ve erime eğrisi analizi olacak şekilde ayarlandı. Sonuçlar “QuantStudio 5-Analysis Software v1.4.1” yazılımıyla analiz edildi. Cihazın verdiği Ct (eşik döngüsü) değerleri $2-\Delta\Delta Ct$ formülü üzerine yerleştirilerek gen ifadeleri referans gen ifadelerine göre karşılaştırıldı ve gen ifadelerindeki değişim RNA düzeyinde belirlendi (Adams 2020). Elde edilen sonuçlar tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilip istatistiksel olarak anlamlılığı incelendi.

3.2.6. Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı Analizi

Analog-2 ve kurkumin uygulanmış U87 hücrelerinde mtDNA kopya sayısı değişimlerinin incelemesi kantitatif PCR (QPCR) yöntemi ile yapıldı.

3.2.6.1. Hücrelerden Total DNA elde edilmesi

Hücrelerden total DNA elde edilmesi, ticari kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) kullanılarak kitin öngördüğü protokol ile gerçekleştirildi. Öncelikle hücreler tripsinize edilerek hücre plağından toplanmış ve santrifüj işlemi sonrasında PBS ile süspansiyon edilmiştir. 5×10^6 hücre 1500 rpm hızında tekrar santrifüje edilerek pelet elde edilmiştir. Elde edilen pelet, 200 µl PBS içinde yeniden süspansiyon edildikten sonra üzerine 20 µl proteinaz K eklenmiştir. Sonraki aşamada karışıma 200 µl AL (*lyse buffer*, lizis tampon) tamponu eklenmiştir. Karışım vortekslenerek homojenize edildikten sonra

56°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 200 µl etanol (96–100%) eklenerek karışım tekrar vorteksle karıştırılmıştır. Elde edilen karışım, spin kolonuna aktarılmış ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda kolondan geçerek kolona bağlı toplama tüpünde biriken atık uzaklaştırılmıştır. Kolona 500 µl AW1(*wash buffer1*, yıkama tamponu1) tamponu eklenmiştir. Sonrasında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tekrar kolondan geçen atık uzaklaştırıldıktan sonra kolona 500 µl AW2 (*wash buffer2*, yıkama tamponu2) tamponu eklenerek 13,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Atık ve toplama tüpü atıldıktan sonra spin kolon, steril (nuclease free) 1.5 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır. DNA elüsyonu, spin kolonun ortasına 200 µl AE tamponu eklenerek gerçekleştirilmiş, bu işlem oda sıcaklığında (15–25°C) 1 dakika inkübasyon ve 13.000 RPM hızında 1 dakika santrifüj ile tamamlanmıştır.

3.2.6.2. mtDNA Kopya Sayısı Analizi

mtDNA kopya sayısı, literatür araştırması sonucu kullanılan tekniklerden kantitatif gerçek zamanlı PCR tabanlı bir yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Longchamps et al. 2020). mtDNA bölgesinin amplifikasyonu için mtDNA ND1 geni primeri tasarlanmıştır. mtDNA kopya sayısı belirlenirken ND1 geninin normalizasyonu için genomik DNA'da bulunan insan globülin geni (HGB) amplifikasyonu yapılmıştır. ND1 ve HGB genlerine spesifik primer dizileri Tablo 3-5'te yer almaktadır. PCR için Sybr Green floresan boya ve polimeraz enzimi içeren master mix karışımı kullanılarak reaksiyonlar toplam 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Ölçümler, belirtilen koşullarda ABI (QuantStudio 5) marka cihazda yapıldı. PCR koşulları: 95°C 10 dakika, [95°C 15 saniye denatürasyon, 60°C 30 saniye bağlanma, 72°C 40 saniye uzama] (40 döngü), 95°C 60 saniye denatürasyon ve erime eğrisi analizi olacak şekilde ayarlandı. Sonuçlar "QuantStudio 5-Analysis Software v1.4.1" yazılımıyla analiz edildi. Cihazın verdiği Ct (eşik döngüsü) değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak mtDNA kopya sayısı değişimi hesaplandı.

3.2.7. İstatiksel Analiz

Sonuçlar en az üç bağımsız deneyin ortalama \pm standart sapması (SD) olarak gösterilmiştir. IC50 değerlerini lineer regresyon yöntemi ile belirlenmiştir. qRT-PCR verilerinde istatistiksel anlamlılık tek yönlü ANOVA analizi (qRT-PCR zamana bağlı ifade analizi) ile belirlenmiştir. Tüm analizlerde p değerinin 0.05'ten küçük olması

istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve belirlenen p değerleri sütun çubuk grafiklerinde *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ sembolleriyle belirtilmiştir.



4. BULGULAR

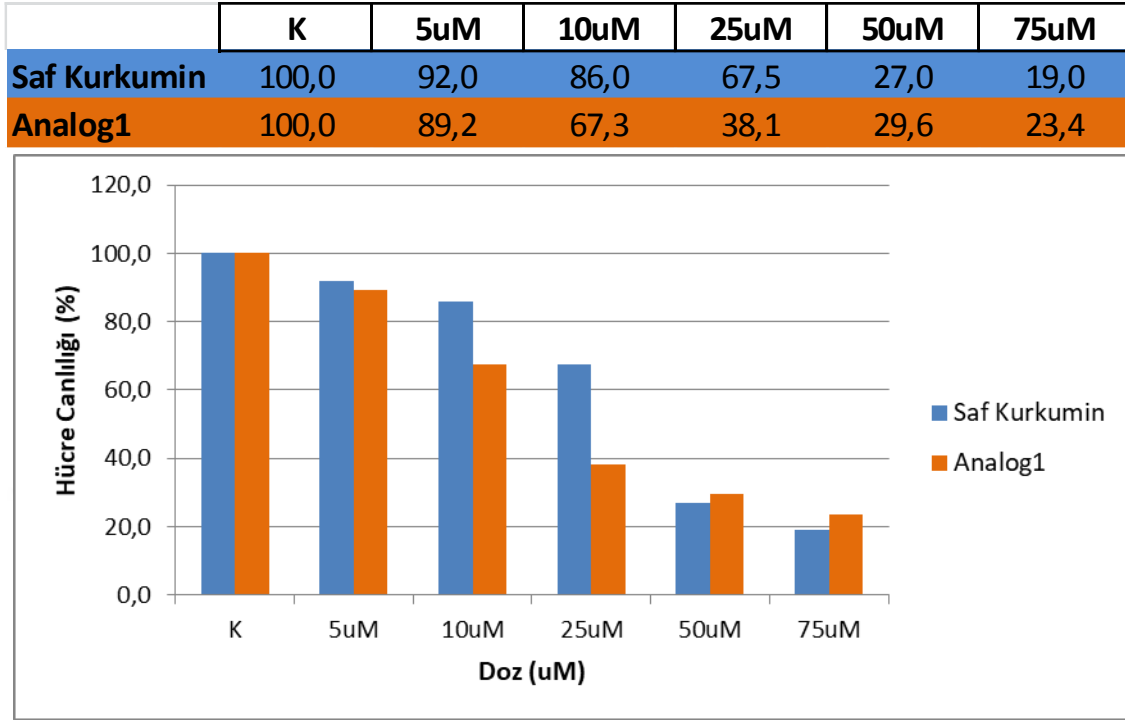
4.1. Hücre Canlılığı Analizleri

4.1.1. Saf Kurkumin ve Kurkumin analoglarının (Analog1, 2 ve 3) Hücre Canlılığına Etkisi

Projemizdeki ilk hedefimiz, saf kurkumin ve analoglarının U87 glioblastoma hücreleri ve HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Bu bileşiklerin U87 hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirerek, en güçlü anti-kanser aktivitesine sahip analogu belirlenmesi amaçlandı. Ek olarak, toksisitelerini ve seçiciliklerini belirlemek için bu bileşikler sağlıklı bir kontrol görevi gören HUVEC hücreleri üzerinde test ettik. Amaç, sadece glioblastoma hücrelerine karşı önemli etkinlik göstermekle kalmayıp aynı zamanda sağlıklı hücelere karşı düşük toksisiteyi koruyan ve böylece terapötik gelişim için potansiyel bir aday belirleyen bir kurkumin analogu bulmaktır.

Saf kurkumin ve özgün analoglarının hücre üzerindeki etkileri incelemek için referans dozlar literatür araştırmaları sonucu 0 ile 75 uM aralığında çalışmak üzere belirlendi (Wang et al. 2020; Zoi et al. 2021b).

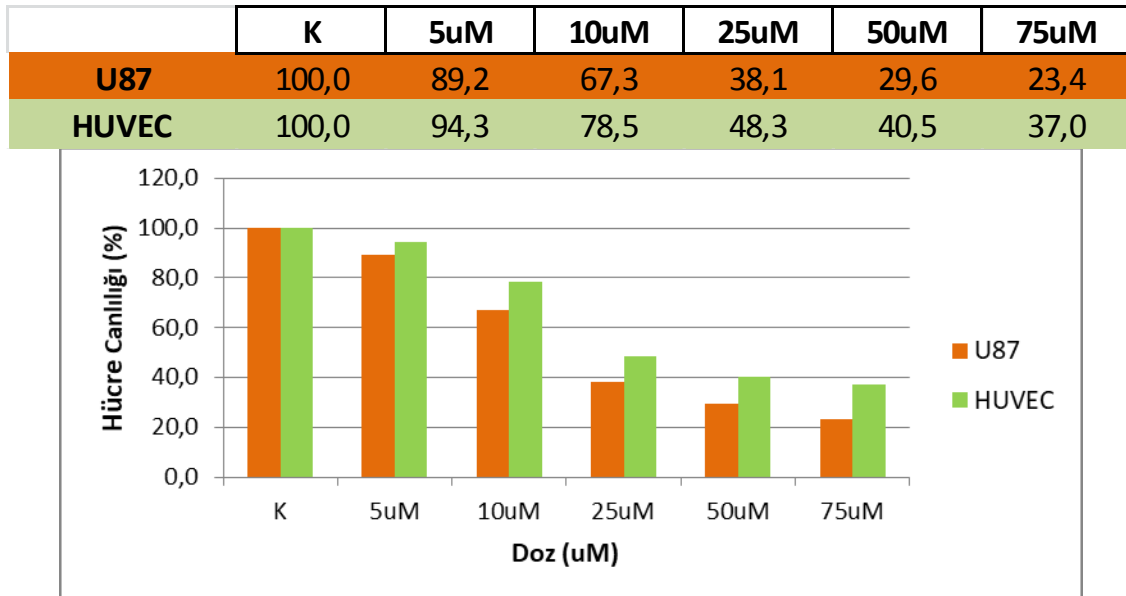
İlk deneyimizde final konsantrasyonları 0 ile 75 uM aralığında değişen saf kurkumin ve Analog1 maddeleri U87 ve HUVEC hücrelerine uygulandı. 48 saat inkübasyon sonucu yapılan MTT analizinde hücre canlılık oranları Şekil 4-1'de belirtilen şekilde elde edildi. Şekil 4-1'de gösterildiği üzere Analog1 maddesi, saf kurkumin ile kıyaslandığında optimal dozda U87 kanser hücreleri üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4-1: Analog1 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen Analog1 ve Saf Kurkumin madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

Analog1'in sağlıklı hücreler üzerindeki toksisite etkisini incelemek için yaptığımız analizde U87 hücre canlılığına etkisinin sağlıklı kontrol hücre grubu HUVEC'e oranla daha fazla olduğu tespit edilmiş olup kanser hücreleri üzerinde seçici bir etki olduğu görülebilmektedir (Şekil 4-2).

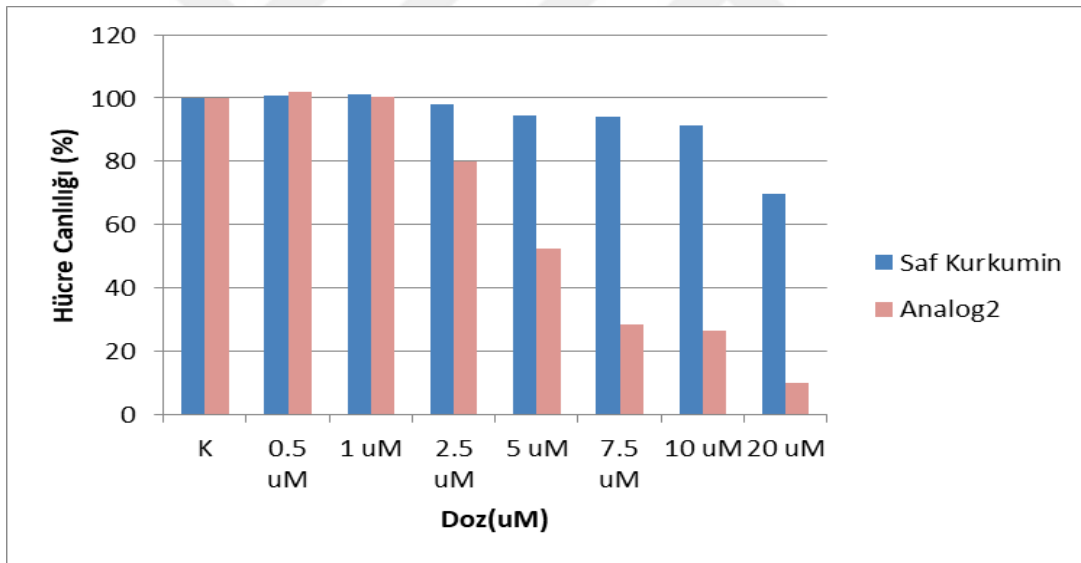


Şekil 4-2: Analog1 etkisinde U87 ve HUVEC hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen Analog1 madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

İkinci deneyimizde final konsantrasyonları 0 ile 75 uM aralığında değişen saf kurkumin ve Analog2 maddeleri U87 ve HUVEC hücrelerine uygulandı. 48 saat inkübasyon sonucu yapılan MTT analizinde 10-75 uM arası konsantrasyonlarda Analog2 madde uygulanmış hücrelerde canlılık oranları % 0-10 düzeyinde görüldü. Dolayısıyla düzgün bir doz/canlılık grafiği elde etmek ve uygun bir IC50 oranı belirlemek amacıyla Analog2 madde uygulaması 0-20 uM aralığında yeniden yapıldı ve Şekil 4-3'te belirtilen canlılık oranları tespit edildi.

	K	0.5 uM	1 uM	2.5 uM	5 uM	7.5 uM	10 uM	20 uM
Saf Kurkumin	100	100,7	101,1	98,2	94,5	94,2	91,3	69,6
Analog2	100,0	102,1	100,4	80,1	52,5	28,5	26,4	9,8

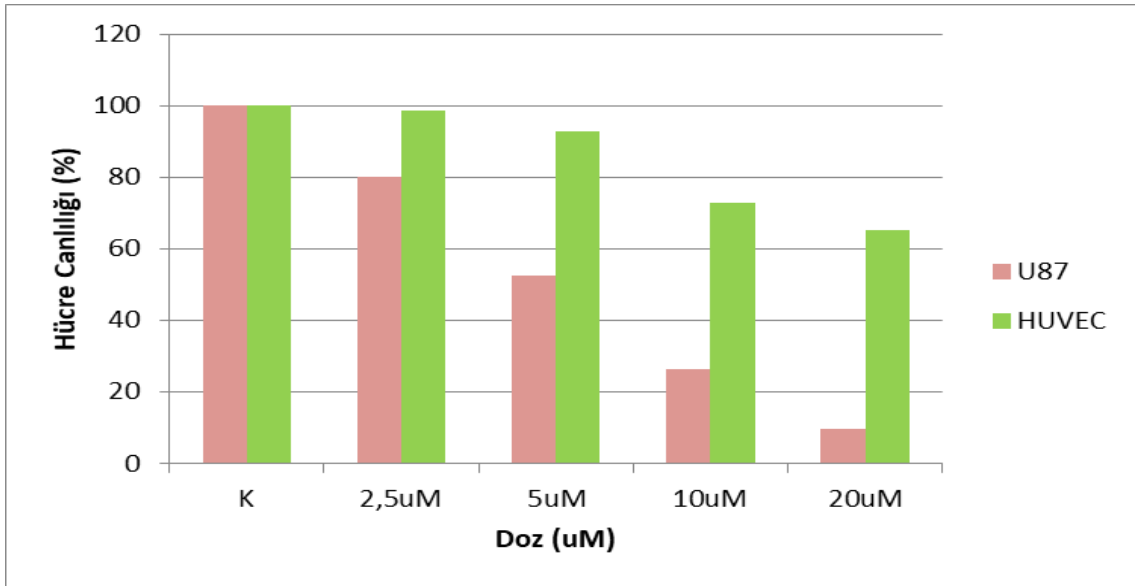


Şekil 4-3: Analog2 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen Analog2 ve Saf Kurkumin madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

Analog2'nin sağlıklı hücreler üzerindeki toksisite etkisini incelemek için yaptığımız analizde U87 hücre canlılığına etkisinin sağlıklı kontrol hücre grubu HUVEC'e oranla daha fazla olduğu tespit edilmiş olup kanser hücreleri üzerinde seçici bir etki olduğu görülebilmektedir (Şekil 4-4).

	K	2,5uM	5uM	10uM	20uM
U87	100	80,05	52,47	26,36	9,82
HUVEC	100	98,5	92,7	72,9	65,4

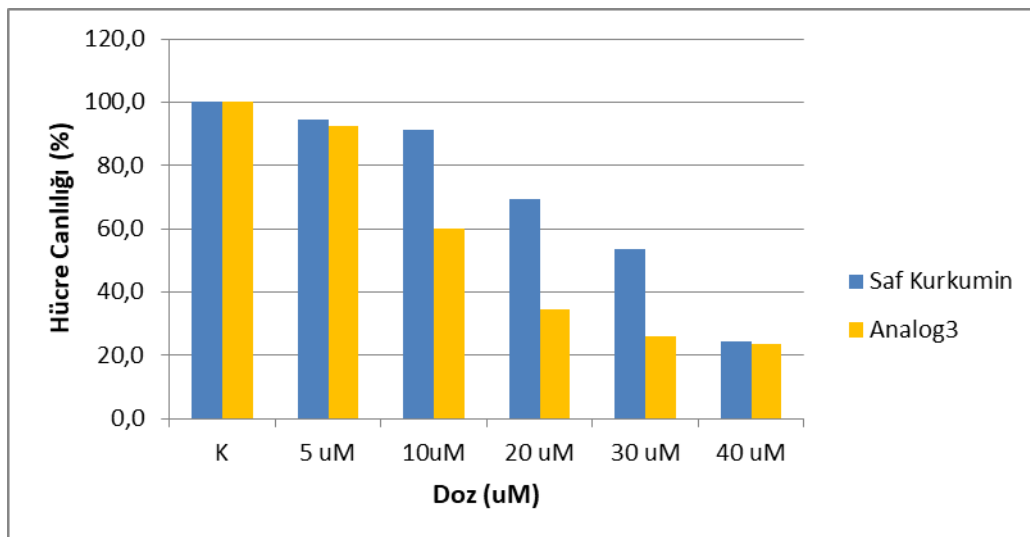


Şekil 4-4: Analog2 etkisinde U87 ve HUVEC hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen Analog2 madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

Üçüncü deneyimizde final konsantrasyonları 0 ile 40 uM aralığında değişen saf kurkumin ve Analog3 maddeleri U87 hücrelerine uygulandı. 48 saat inkübasyon sonucu yapılan MTT analizinde Şekil 4-5'te belirtilen canlılık oranları tespit edildi.

	K	5 uM	10uM	20 uM	30 uM	40 uM
Saf Kurkumin	100,0	94,5	91,3	69,6	53,4	24,3
Analog3	100,0	92,3	60,2	34,6	26,2	23,7

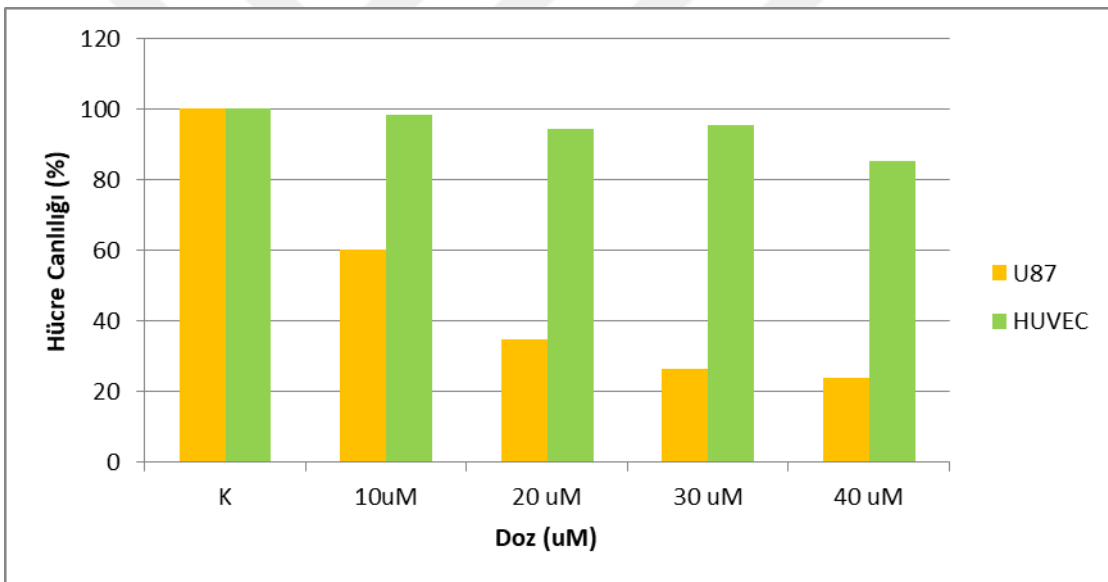


Şekil 4-5: Analog3 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen Analog3 ve Saf Kurkumin madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

Analog3'ün sağlıklı hücreler üzerindeki toksisite etkisini incelemek için yaptığımız analizde U87 hücre canlılığına etkisinin sağlıklı kontrol hücre grubu HUVEC'e oranla daha fazla olduğu tespit edilmiş olup kanser hücreleri üzerinde seçici bir etki olduğu görülebilmektedir (Şekil 4-6).

	K	10uM	20 uM	30 uM	40 uM
U87	100	60,2	34,6	26,2	23,7
HUVEC	100	98,4	94,4	95,4	85,2

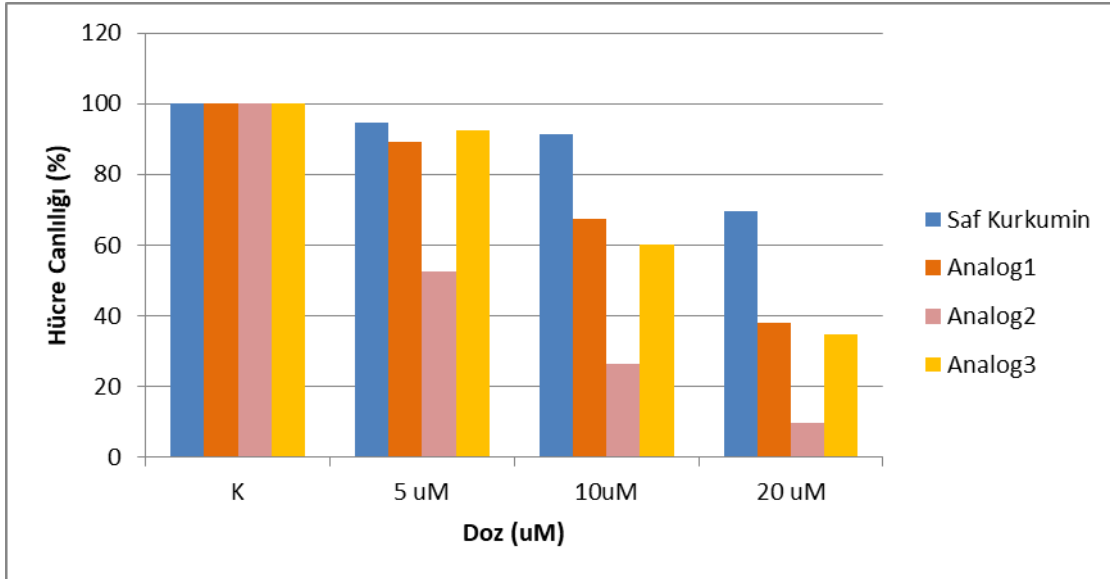


Şekil 4-6: Analog3 etkisinde U87 ve HUVEC hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen Analog3 madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

4.1.2. Saf Kurkumin ve Kurkumin Analoglarının U87 üzerindeki Etkiliğinin Karşılaştırılması

Projemizde U87 kanser hücreleri üzerindeki anti-tümör özelliklerini karakterize etmek amacıyla sentezlenen kurkumin analogları ayrı deney setlerinde analiz edildi. Saf kurkumin ve kurkumin analoglarının aynı dozlarda (5 uM, 10 uM ve 20 uM) U87 hücreleri üzerindeki karşılaştırmalı olarak Şekil 4-7'de gösterilmiştir.

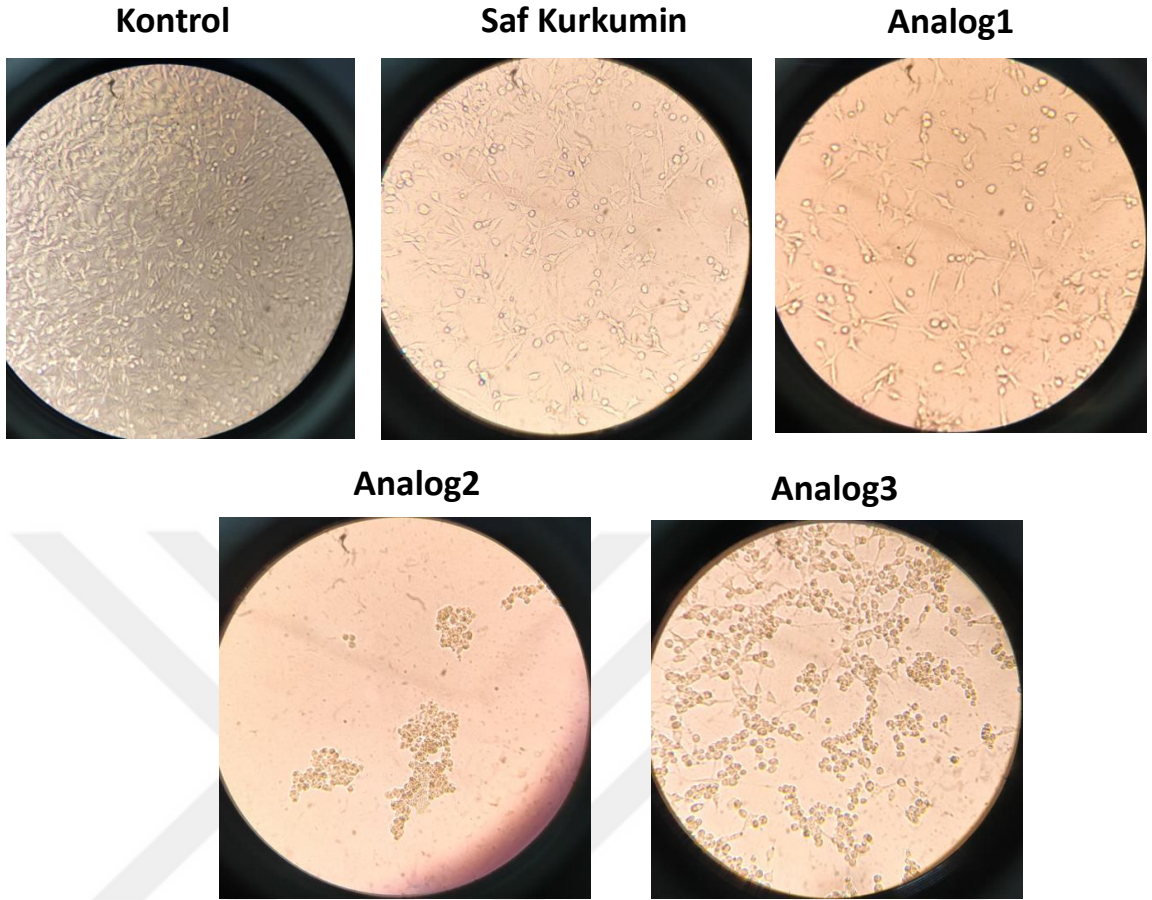


Şekil 4-7: Analog1, Analog2, Analog3 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen Analog1, Analog2, Analog3 ve Saf Kurkumin madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

Şekil 4-7'deki grafiğe göre tüm kurkumin analogları U87 üzerinde saf kurkuminden daha fazla öldürücü etki göstermiştir. Analoglar arasındaki etkiyi kıyasladığımızda Analog2 kayda değer bir şekilde diğer iki analogdan daha fazla öldürücü etki göstermiştir. 5 uM gibi düşük bir dozda Analog2 yaklaşık olarak %50 öldürücü etki gösterirken saf kurkumin ve diğer analoglar %5-10 arasında değişen bir etki gösterebilmiştir. 10 ve 20 uM - dozlarda Analog2 sırasıyla %70 ve %90 etkilere ulaşırken diğer analoglar (Analog1 ve 3) sadece 20 uM dozda %50 öldürücü etkinin üzerine çıkabilmiştir. Saf kurkumin ise etki olarak en zayıf molekül olup 10 ve 20 uM dozda yaklaşık %10 ve %30 etki gösterebilmiştir.

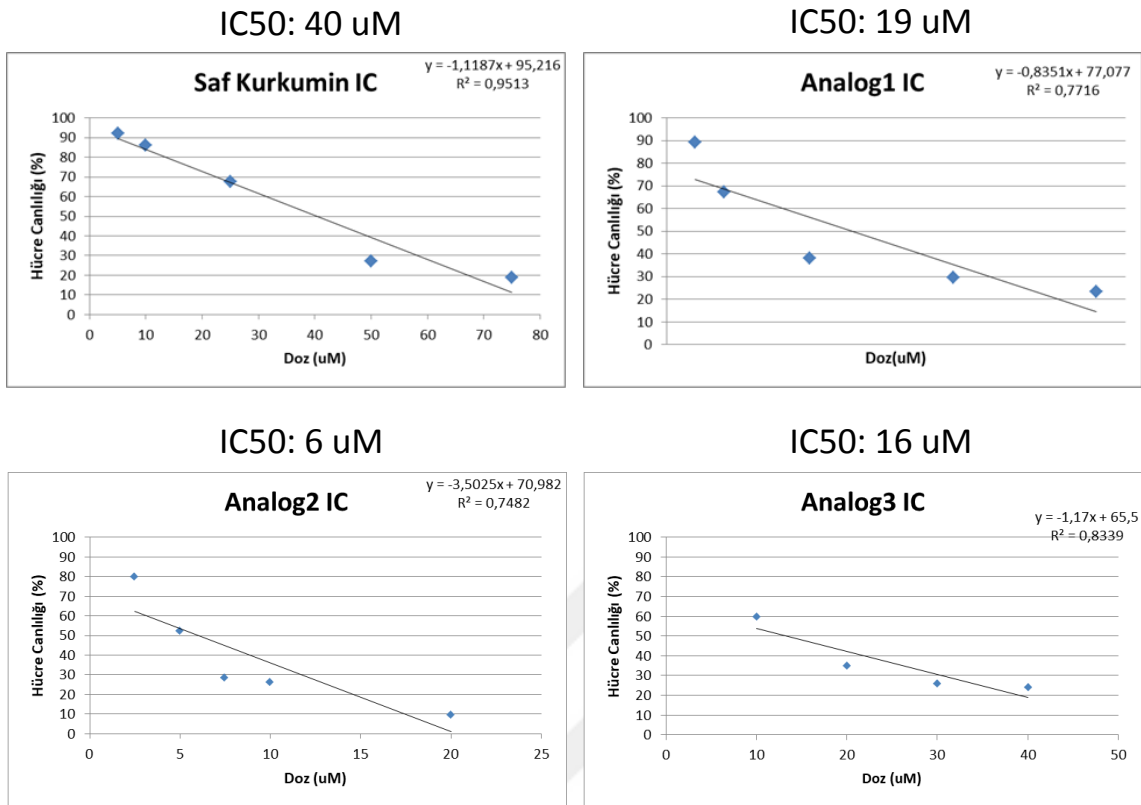
MTT analizi ile elde edilen hücre canlılığı verileri morfolojik olarak mikroskop verileri ile desteklenmiştir. Aşağıda gösterilen 20 uM dozda madde uygulanmış hücrelerin canlılığına bakıldığında Analog1 uygulanmış örnekteki hücre miktarı saf kurkumin uygulanmış olana kıyasla oldukça azdır. Bununla birlikte saf kurkumin uygulanmış hücreler kontrole kıyasla sadece hücre sayısında bir azalma göstermekle birlikte hayatta kalan hücreler sağlıklı bir morfolojiye sahiptir. Analog1 uygulanmış hücreler ise morfolojik olarak uzantılarını kaybetmiş daha yapısı bozulmuş bir görüntüdedir (Şekil 4-8).



Şekil 4-8:Analog1, Analog2, Analog3 ve Saf Kurkumin etkisinde U87 hücresi mikroskop görüntüleri.

Hücreler 48 saat boyunca 20 uM Analog1, Analog2, Analog3 ve Saf Kurkumin madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Hücre görüntüleri 48. saat sonunda ışık mikroskopunda 20x objektif ile görüntülenmiştir.

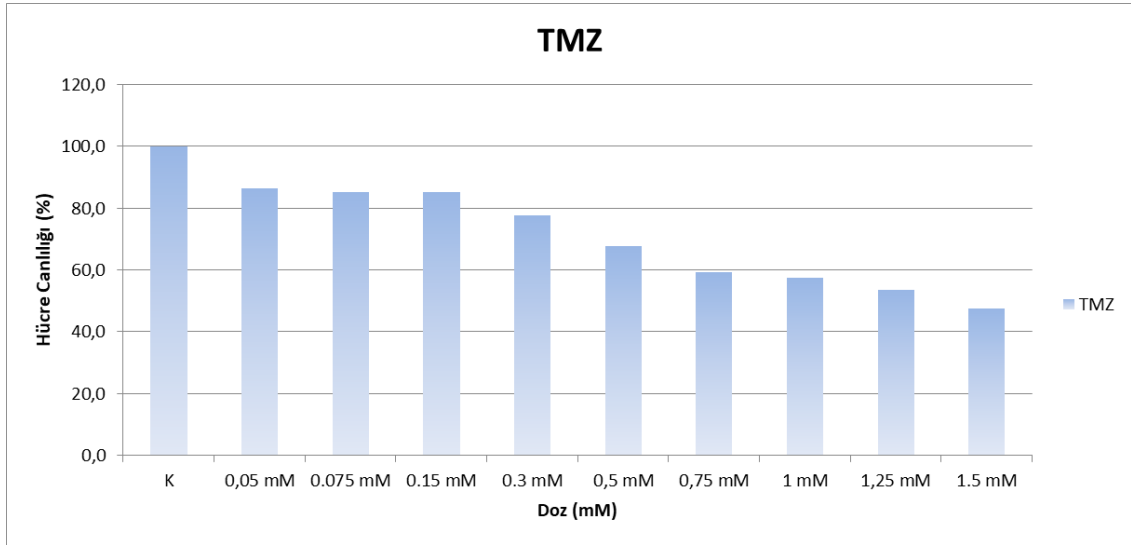
Çalışmada, saf kurkumin ve kurkumin analoglarının U87 glioblastoma hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT deneyi kullanılarak değerlendirildikten sonra lineer regresyon hesaplama yöntemiyle her bir molekül için yarı-maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri belirlenerek bir dizi sitotoksik etki ortaya çıkarılmıştır (Şekil 4-9). Analog2, 6 μ M IC50 değeri ile en güçlü anti-proliferatif aktiviteyi sergilemiş ve diğer bileşiklere kıyasla hücre canlılığını azaltmada daha yüksek bir etkinliğe işaret etmiştir. Analog1 ve Analog3, sırasıyla 19 μ M ve 16 μ M IC50 değerleri ile orta düzeyde sitotoksikite göstermiştir. Buna karşılık, saf kurkumin 40 μ M IC50 ile en düşük etkiyi göstermiştir.



Şekil 4-9: U87 hücrelerinde Saf Kurkumin, Analog1, Analog2 ve Analog3 inhibitör konsantrasyon (IC) grafiği.

4.1.3. Temozolomid (TMZ) Maddesinin U87 Hücre Canlılığına Etkisinin Standardizasyonu

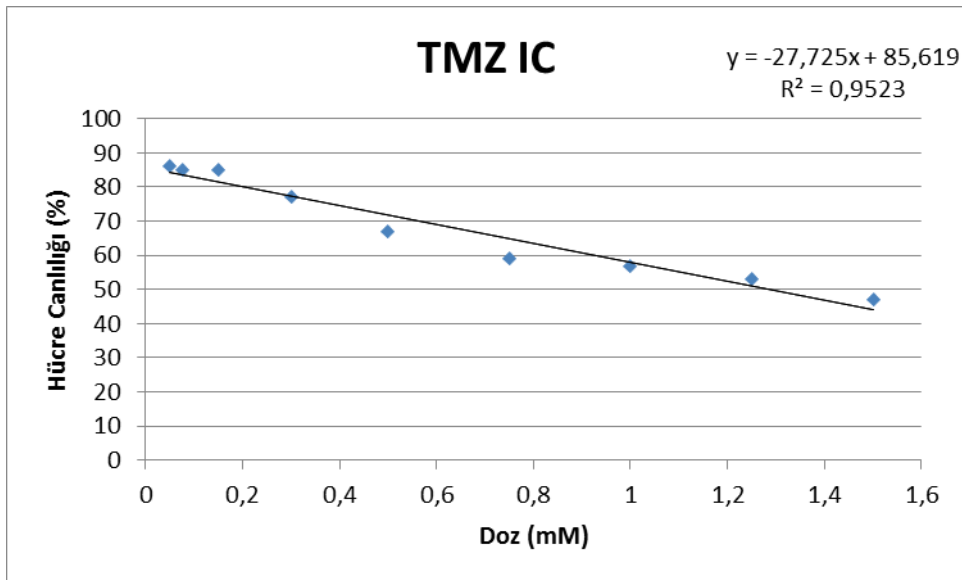
Temozolomid (TMZ) maddesi uygulaması için yapılan literatür araştırmasında U87 hücrelerinde IC50 değerleri 0.75- 1 mM arasında değişen veriler gözlemlenmiştir (Yuan et al. 2022; Drljača et al. 2022). Bu verileri göz önüne aldığımızda deneyimizde final konsantrasyonları 0.1-1.5 mM aralığında değişen TMZ maddesi U87 hücrelerine uygulandı. 48 saat inkübasyon sonucu yapılan MTT analizinde hücre canlılık oranları Şekil 4-10'da belirtilen şekilde elde edilmiştir.



Şekil 4-10: TMZ etkisinde U87 hücre canlılığı değişimi.

Hücreler 48 saat boyunca belirtilen TMZ madde konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 48. saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı değişimleri incelenmiştir. Sütunlarla ifade edilen hücre canlılığı yüzdesi üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

Şekil 4-10'de gösterildiği üzere artan konsantrasyona bağımlı olarak hücre ölümleri gözlemlenmiştir. MTT analizi sonrası dozlara bağlı ölüm yüzdeleri dağılım grafiğinde yorumlanıp lineer regresyon işlemi ile U87 hücrelerinde 48. Saatte %50 öldürücü etkiye karşılık gelen doz 1.28 mM olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-11).



Şekil 4-11:U87 hücrelerinde TMZ inhibitör konsantrasyon (IC) grafiği

4.1.4. TMZ ve Analog2'nin Sinerjik Etkisinin Araştırılması

Glioblastoma tedavisinde kullanılan TMZ ilacının Analog2 ilaç etkileşimlerini test etmek amacıyla U87 hücrelerinde U87 hücrelerinde kombine uygulaması yapıp hücre canlılığı değişimleri MTT testi ile analiz edildi. Kombine uygulamada 0,25 mM TMZ sırasıyla 1.5, 3, 4.5 ve 6 uM Analog2 ile U87 hücrelerine uygulandı ve uygulamadan sonra 48. Hücre canlılığı analiz edildi. Kombine uygulamada etkiyi karşılaştırmak amacıyla bu maddeler ayrı ayrı aynı dozda hücrelere uygulandı. Elde edilen hücre canlılıkları "Bliss Bağımsız Modeli" kullanılarak ilaç etkileşimleri sinerjik, katkılı veya antagonist olarak değerlendirildi. Tablo 4.1'de gösterildiği üzere 0,25 mM TMZ 1.5, 3 ve 4.5 uM Analog2 dozları ile kombinasyonda hücreler üzerinde sinerjik etki görülürken 6 uM dozu ile kombinasyonda antagonist etki gözlemlenmiştir.

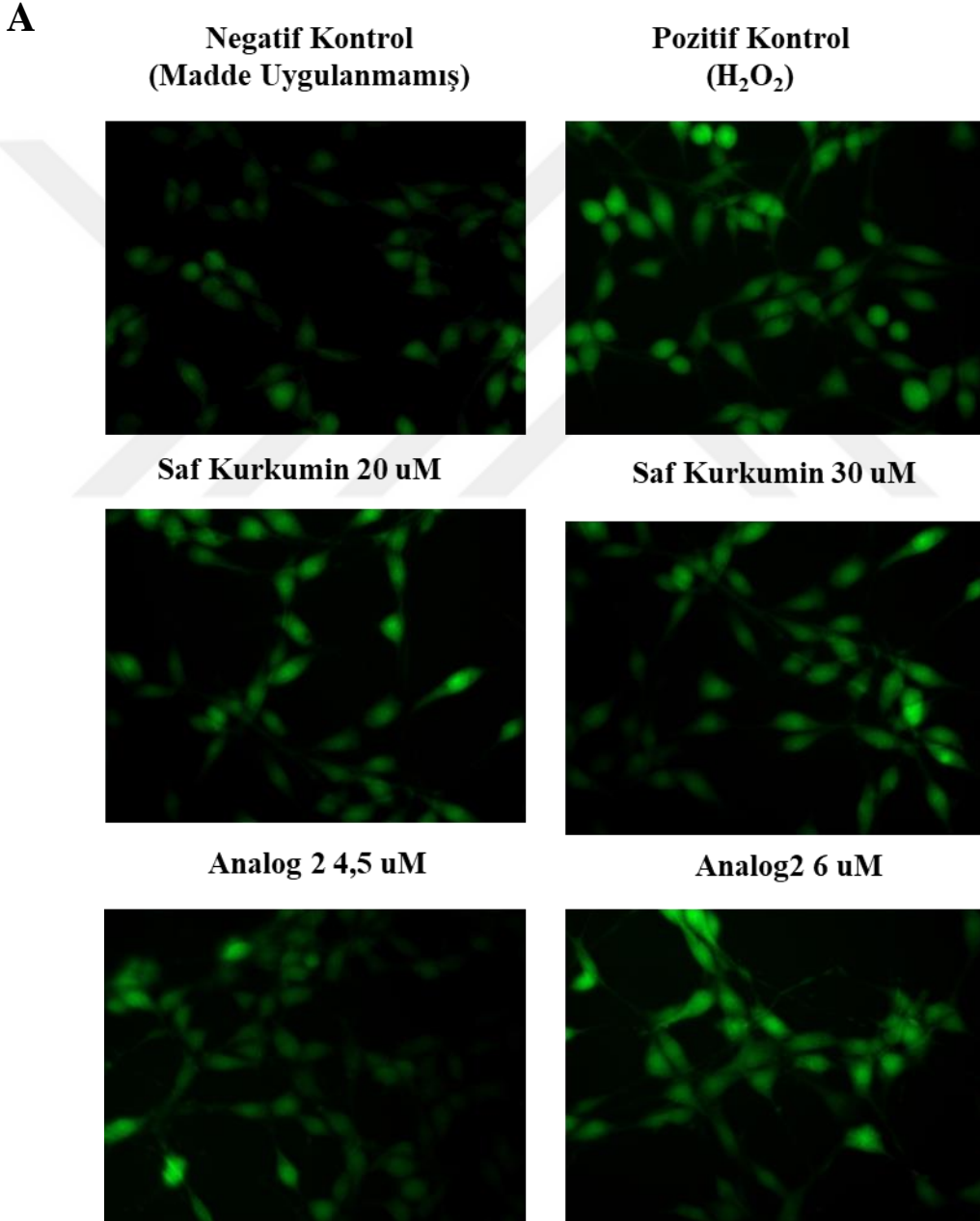
Tablo 4-1: TMZ ve Analog2 moleküllerinin kombine uygulaması sonucu elde edilen ilaç etkileşim tablosu

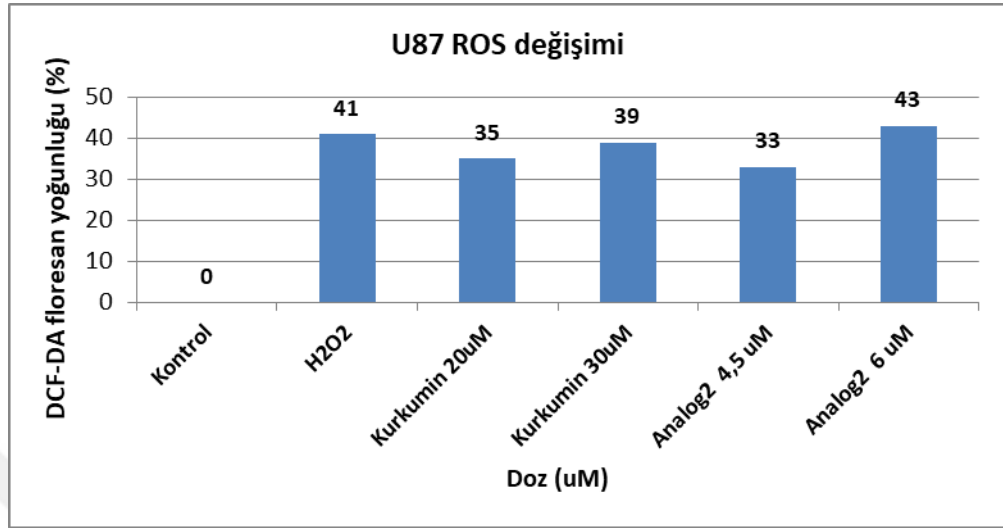
	1,5 uM A2 + TMZ	3 uM A2+ TMZ	4.5 uM A2 + TMZ	6 uM A2+ TMZ
Beklenen Etki (%)	11	15,45	19,9	58,17
Gözlemlenen Etki (%)	14	26	28	44,5
İlaç Etkileşimi	Sinerjik	Sinerjik	Sinerjik	Antagonist

4.2. Saf Kurkumin ve Analog2 etkisinde U87 hücrelerinde ROS değişimi

İntensite analizleri sonucunda madde uygulanmamış kontrol hücreye kıyasla saf kurkumin (doz 20-30uM) uygulanmış hücrelerde ROS miktarı % 35 ve %39; Analog2 (doz 4.5-6uM) uygulanmış hücrelerde ROS miktarı sırasıyla yaklaşık olarak %33 ve %43 kat artış göstermiştir.

Ayrıca pozitif kontrol olarak 100uM H₂O₂ uygulanmış hücrelerde kontrole kıyasla ROS artışı yaklaşık olarak %41 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-1).



B

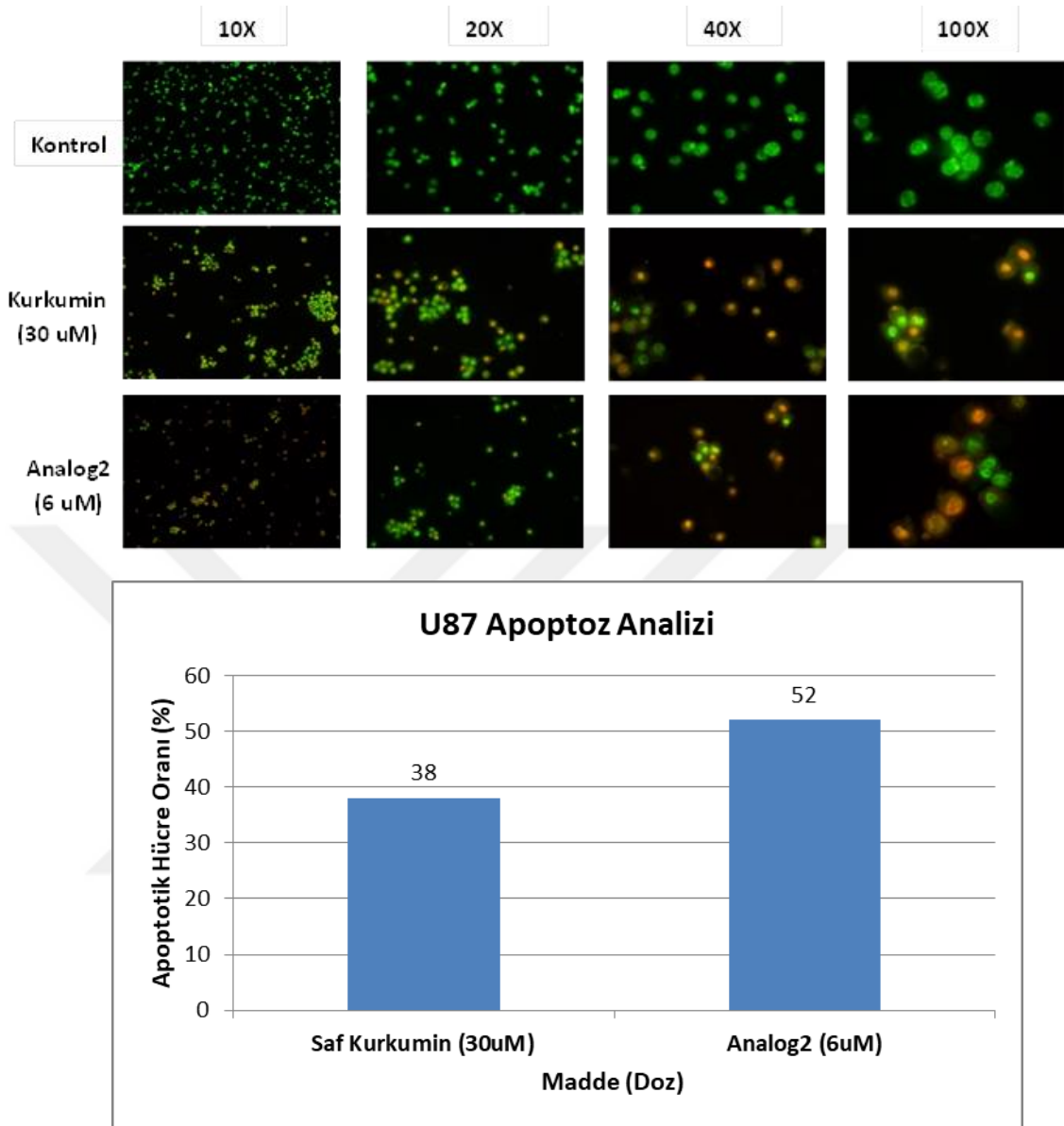
şekil 4-12: DCF-DA boyama ile hücre içi oksidatif stres seviyelerinin değerlendirilmesi.

A. DCF-DA ile boyanmış U87 hücrelerinin floresan görüntüsü. (467-498nm eksitasyon ve 513-556nm emisyon)

B. Göreceli ROS üretimi kat değişiklikleri histogramı. Histogramlar, U87 hücre hattında DCF-DA floresan yoğunluğundaki değişiklikleri göstermektedir. Pozitif kontrol olarak hücre içi ROS üretimini indüklemek için hücelere 1 saat süreyle H2O2 (100 μ M) uygulanmıştır. Sonuçlar en az üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunulmuştur.

4.3. Analog2 Molekülünün U87 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi

Akridin Turuncusu (Acridin Orange-AO)/Propidyum İyodür (PI) çift boyama tekniği apoptoz tayini için U87 hücrelerinde uygulanmıştır. Bu boyama yönteminin prensibi, hem canlı hem de ölü hücrelerin AO ile boyanması, PI'nin ise sadece membran bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücreleri boyamasıdır. Geç apoptotik hücreler turuncu renkte boyanır ve yoğunlaşmış ve/veya sıklıkla parçalanmış çekirdekler gösterir. Boyama sonucunda floresan mikroskobundan elde edilen yaklaşık 220 görüntü analiz edildikten sonra saf kurkumin (30uM) ve Analog2 (6uM) etkisi altındaki apoptotik hücre oranları şekil 4-13'te gösterilmiştir.



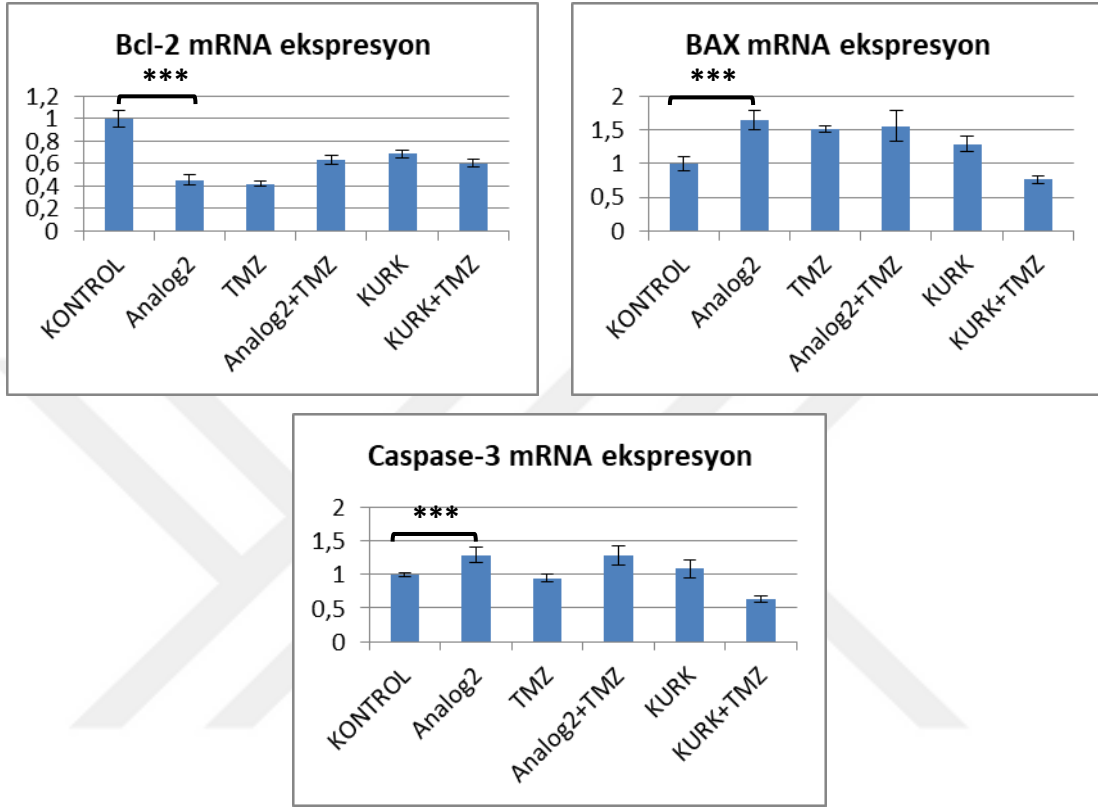
Şekil 4-13: AO/PI dual boyama ile apoptotik hücrelerin analizi.

A. AO/PI ile boyanmış U87 hücrelerinin floresan görüntüsü. (AO:500nm eksitasyon, 530nm emisyon; PI: 510nm eksitasyon, 595nm emisyon)

B. Apoptotik hücre değişiklikleri histogramı. Histogramlar, U87 hücre hattında AO/PI ile boyanmış apoptotik U87 hücrelerinin yüzdelere göstermektedir. Sonuçlar en az üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunulmuştur.

Boyama sonucunda floresan mikroskobundan elde edilen yaklaşık 220 görsel incelendikten sonra; Saf kurkumin (30uM) ve Analog2 (6uM) etkisinde apoptotik hücre oranları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Buna göre kurkumin etkisinde oran %38 iken Analog2 etkisinde bu oran %52'dir (Şekil 4-13).

Floresan görüntüleme ile apoptozun belirlenmesi, apoptotik belirteçlerin mRNA seviyelerindeki değişikliklerle desteklenmiştir. Buna göre, madde uygulanan hücrelerde Bax ve Caspase3 seviyeleri artarken Bcl-2 seviyesi azalmıştır (Şekil 4-14).



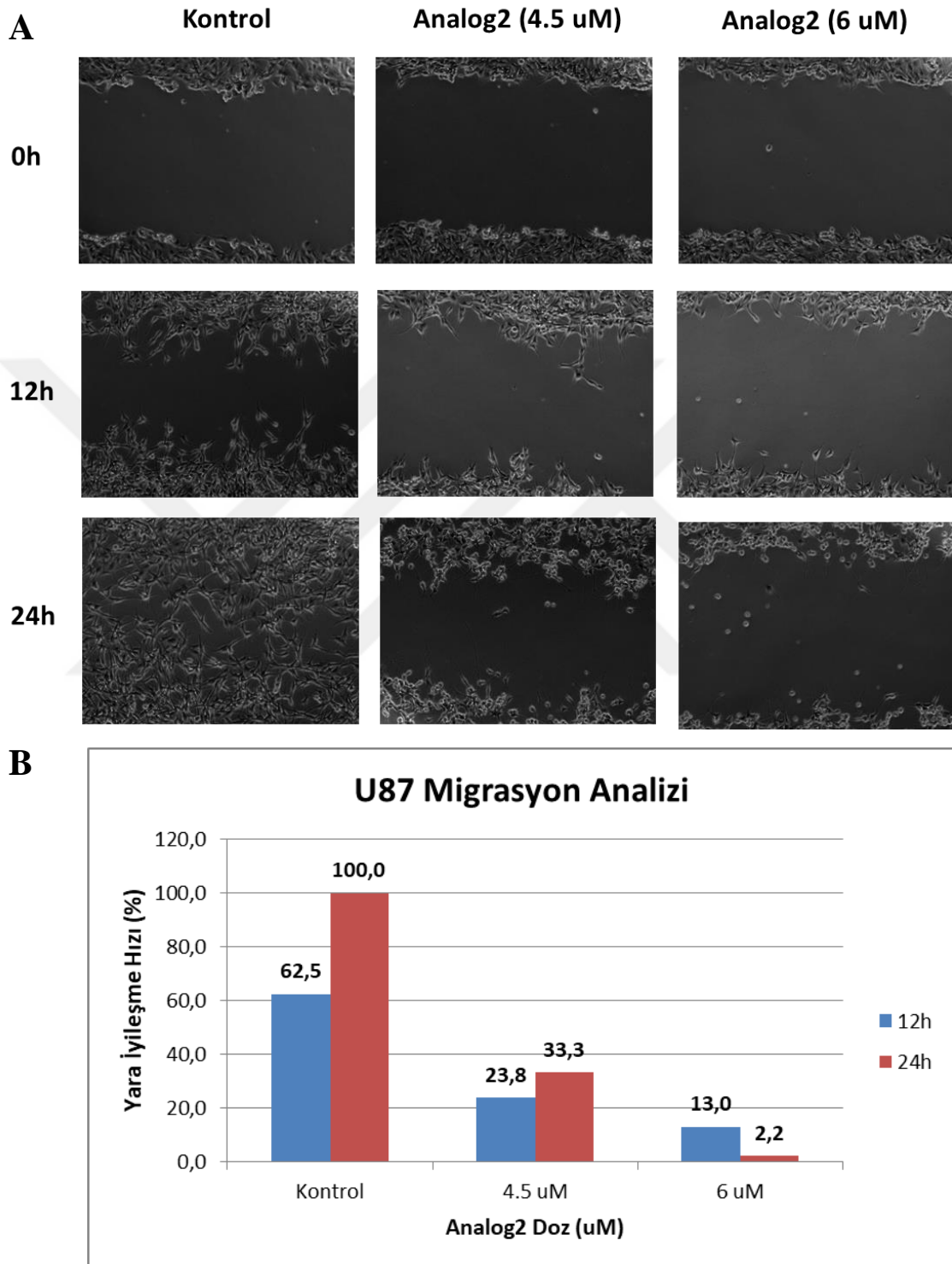
Şekil 4-14: U87 Hücrelerinde apoptoz belirteçlerinin mRNA düzeyinde değişimi.

Analog2, TMZ, Analog2+TMZ, KURK ve KURK+TMZ uygulanmış U87 hücreleri madde uygulamasından 48 saat sonra RNA izolasyonu için işleme tabi tutulmuştur. Bcl-2, BAX ve Caspase-3 genlerinin mRNA değişimleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Gen ifade seviyeleri B-actin ile normalize edilmiştir. Veriler 2 replikadan elde edilen ortalama \pm S.D'yi göstermektedir. KURK: Saf Kurkumin, TMZ: Temozolomid.

4.4. Analog2 Etkisinde U87 Metastatik Değişimler

U87 hücrelerinin uygulanan maddeye göre metastatik fonksiyonları morfolojik olarak mikroskopi ile incelenmiş olup elde edilen sonuçlar hücre metaztasında etkili proteinlerin mRNA düzeyinde ifade değişimleri ile desteklenmiştir. Hücre migrasyon analizinde grafikte ifade edildiği üzere kontrol hücreleri ilk 12 saat içinde yarayı yaklaşık olarak %62; 24. saatte tamamen kapatmıştır. Buna karşılık Analog2 uygulanmış hücrelere baktığımızda 4.5 uM'da ilk 12 saat içinde yaklaşık %23; 24.

Saatte %33 kapatmıştır. 6uM'da ise 12. Saatte %13 kapanma görünürken sonraki 12 saat doza bağımlı hücre ölümüne bağlı olarak yara genişliği artmıştır (Şekil 4-15).

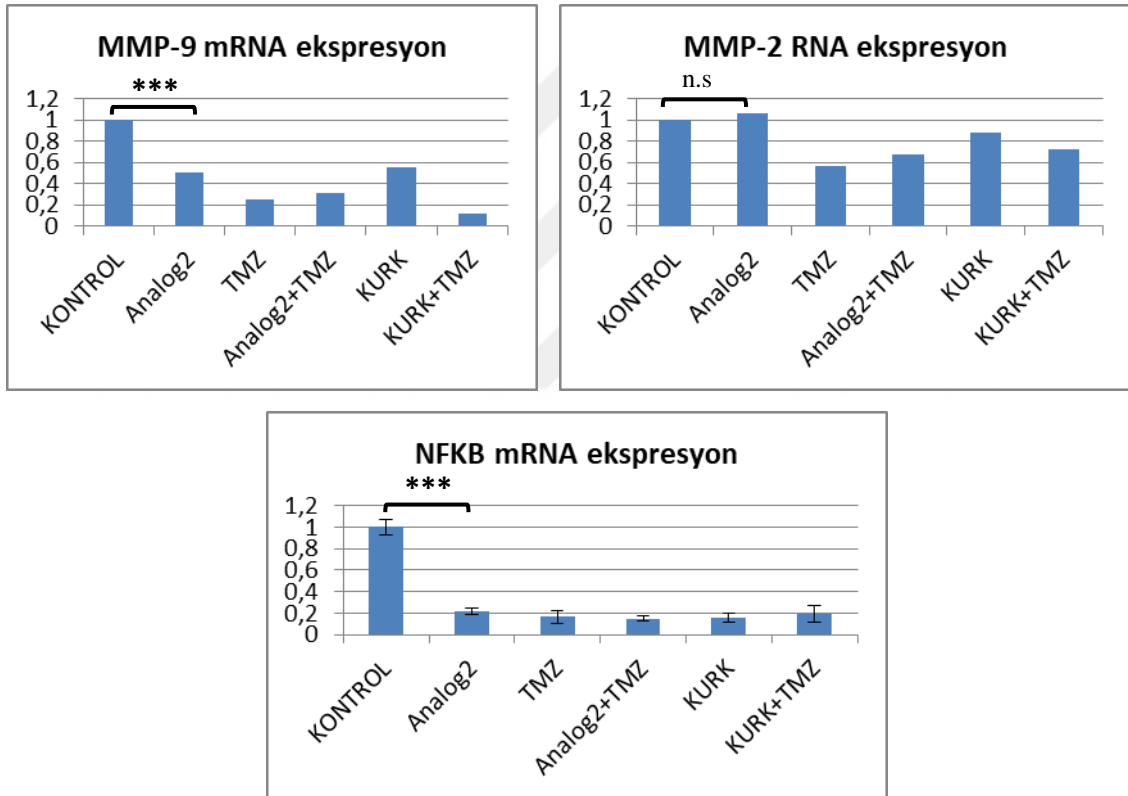


Şekil 4-15: Analog2'nin U87 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisinin yara kapanma testi ile analizi.

A. Her bir numunenin yara kapanması, çizik sonrası 0, 24 ve 48. saatlerde dijital kamera ile birleştirilmiş ters mikroskop kullanılarak aynı noktanın görüntüleri çekilerek izlenmiştir.

B. Hücre migrasyonu görüntü sonuçları üzerinde istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Çubuklardaki her bir veri noktası, üç ayrı ve bağımsız deneyden elde edilen ortalamayı temsil etmektedir

Mikroskop görüntülemesiyle hücre göçünün belirlenmesi, metastaz belirteçlerinin mRNA seviyelerindeki değişikliklerle desteklenmiştir. Sonuç olarak, madde uygulanan hücrelerde metastazda rol oynayan bir proteaz olan MMP-9'un ekspresyonunda önemli bir azalma gözlenirken, MMP-2 ekspresyonu etkilenmemiştir. Ayrıca, bu proteazların ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörü NFKB seviyesi de tedaviye bağlı olarak kayda değer bir düşüş göstermiştir (Şekil 4-16).

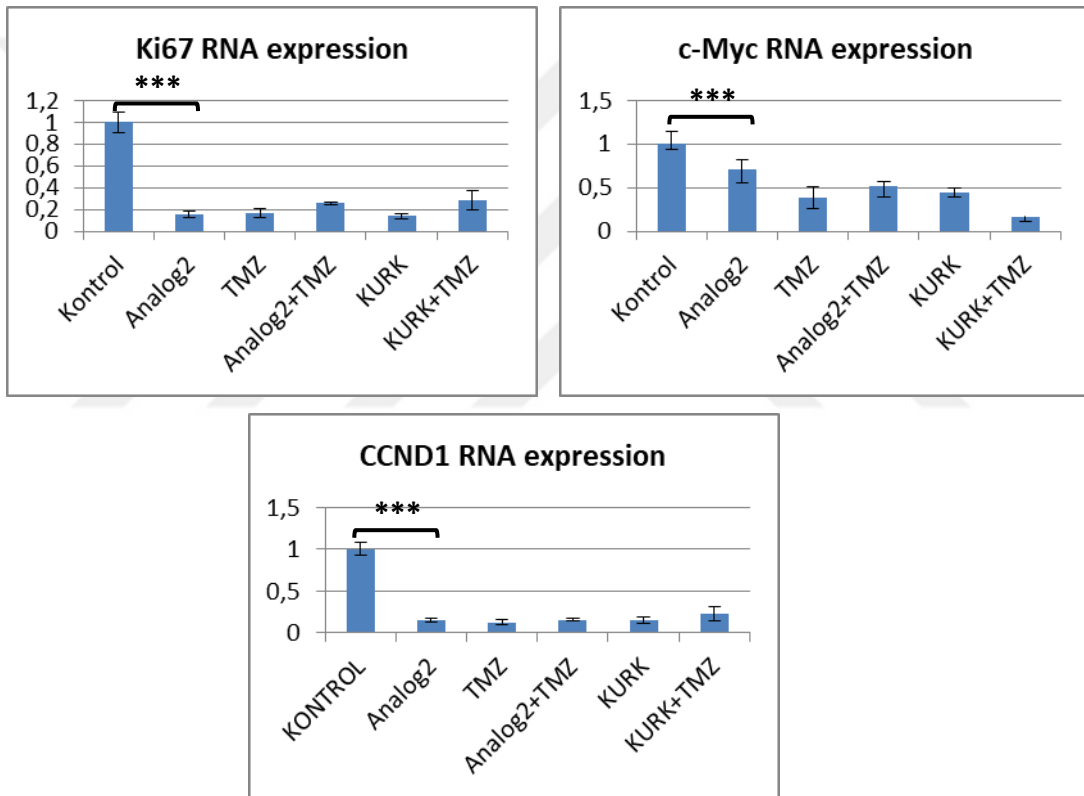


Şekil 4-16: U87 Hücrelerinde metastaz belirteçlerinin mRNA düzeyinde değişimi.

Analog2, TMZ, Analog2+TMZ, KURK ve KURK+TMZ uygulanmış U87 hücreleri madde uygulamasından 48 saat sonra RNA izolasyonu için işleme tabi tutulmuştur. MMP-9, MMP-2 ve NFKB genlerinin mRNA değişimleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Gen ifade seviyeleri B-actin ile normalize edilmiştir. Veriler 2 replikadan elde edilen ortalama \pm S.D'yi göstermektedir. KURK: Saf Kurkumin, TMZ: Temozolomid.

4.5. Analog-2 Etkisinde U87 Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Gen Ekspresyon Değişimleri

Bu çalışmada, Analog2 kurkumin analogunun U87 glioblastoma hücrelerindeki önemli onkogenlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri araştırıldı. Literatürde glioblastoma gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilen Ki67, c-MYC ve CCND1 genleri seçilerek mRNA düzeyinde ekspresyon değişiklikleri incelenmiştir. Sonuçlarımız, Analog2, TMZ ve saf kurkumin uygulanmış U87 hücrelerinde bu onkogenlerin ekspresyon seviyelerinde madde uygulanmamış kontrollere kıyasla önemli bir düşüş olduğunu göstermektedir (Şekil 4-17).

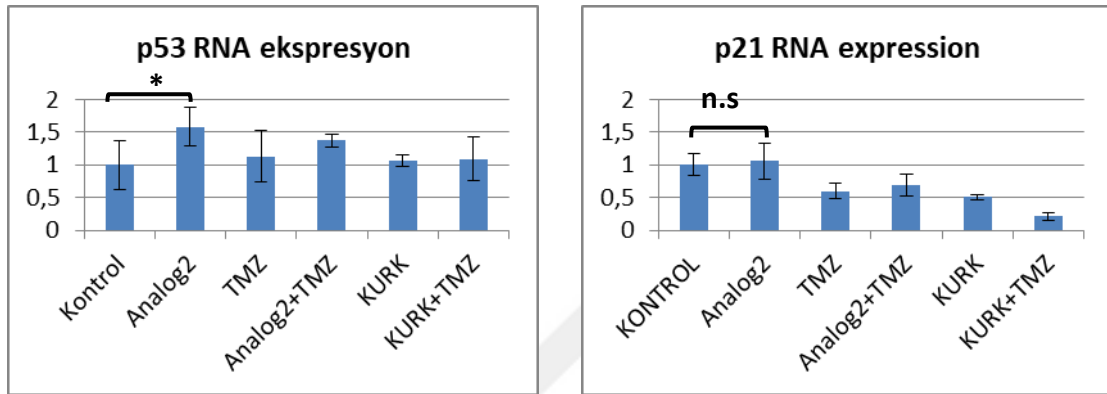


Şekil 4-17: U87 Hücrelerinde onkogenlerin mRNA düzeyinde değişimi.

Analog2, TMZ, Analog2+TMZ, KURK ve KURK+TMZ uygulanmış U87 hücreleri madde uygulamasından 48 saat sonra RNA izolasyonu için işleme tabi tutulmuştur. Ki67, c-MYC ve CCND1 genlerinin mRNA değişimleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Gen ifade seviyeleri B-actin ile normalize edilmiştir. Veriler 2 replikadan elde edilen ortalama \pm S.D'yi göstermektedir. KURK: Saf Kurkumin, TMZ: Temozolomid.

Analog2'nin onkogen ekspresyonu üzerindeki etkisi ile birlikte antitümör özelliğini pekiştirmek amacıyla U87 glioblastoma hücrelerindeki önemli tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri analiz edildi. Analog2 ile birlikte saf

kurkumin ve TMZ uygulaması yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı. Spesifik olarak, p53 ve p21'in mRNA ekspresyon değişikliklerini araştırıldı. Sonuçlarımız, Analog2 uygulanmış U87 hücrelerinde, madde uygulanmayan kontrollere kıyasla p53 ifadesinde önemli bir artış olduğunu ortaya koyarken, p21 ifadesinde önemli bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4-18).

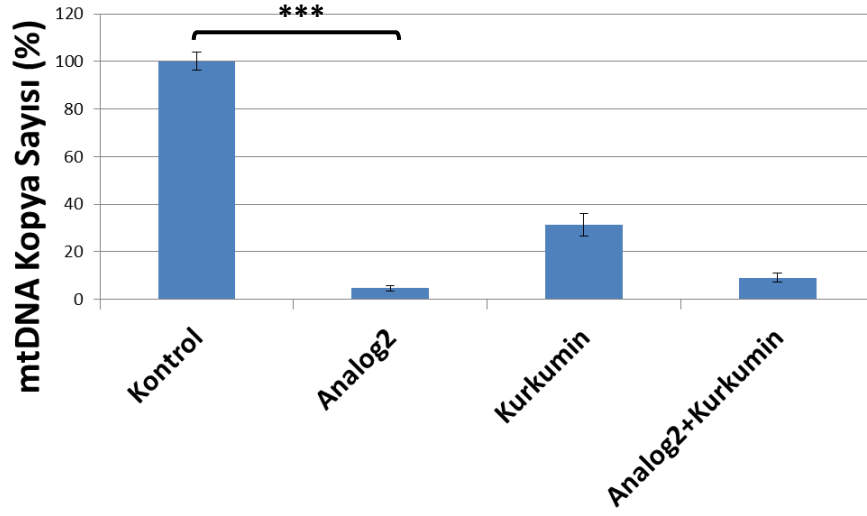


Şekil 4-18:U87 Hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin mRNA düzeyinde değişimi.

Analog2, TMZ, Analog2+TMZ, KURK ve KURK+TMZ uygulanmış U87 hücreleri madde uygulamasından 48 saat sonra RNA izolasyonu için işleme tabi tutulmuştur. p53 ve p21 genlerinin mRNA değişimleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Gen ifade seviyeleri B-actin ile normalize edilmiştir. Veriler 2 replikadan elde edilen ortalama \pm S.D'yi göstermektedir. KURK: Saf Kurkumin, TMZ: Temozolomid.

4.6. Kurkumin ve Analog2'nin U87 Hücreleri Mitokondriyal DNA (mtDNA) Kopya Sayısı üzerindeki Etkileri

Çalışmamızda kurkumin ve Analog2'nin U87 glioblastoma hücrelerinde mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı. Sonuçlar, tedavi edilmemiş kontrol hücrelerine kıyasla hem kurkumin hem de Analog2 ile tedavi edilen hücrelerde mtDNA kopya sayısında önemli bir azalma olduğunu gösterdi. Spesifik olarak, Analog2 tedavisi mtDNA kopya sayısında %95'lik bir azalmaya neden olurken, kurkumin tedavisi %70'lik bir azalmaya yol açmıştır (Şekil 4-19). Bu bulgular, her iki bileşiğin de mitokondriyal fonksiyon ve biyogenez üzerinde derin bir etki gösterdiğini ve Analog2'nin daha belirgin bir etki sergilediğini ortaya koymaktadır (Şekil 4-19).



Şekil 4-19: U87 Hücrelerinde mtDNA kopya sayısı değişimi.

Analog2, Kurkumin, ve Analog2+Kurkumin uygulanmış U87 hücreleri madde uygulamasından 48 saat sonra DNA izolasyonu için işleme tabi tutulmuştur. mtDNA amplifikasyonları qRT-PCR ile ölçülmüştür. Amplifikasyon seviyeleri insan globülin geni (HGB) ile normalize edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Glioblastoma (GBM) son derece agresif bir beyin kanseri türüdür ve kötü bir prognozla karakterize edilir. Modern terapötik yaklaşımlardaki ilerlemelere rağmen GBM, kesin tedavisi olmayan ve oldukça kötü bir prognoza sahip ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir (Ostrom et al. 2021). Araştırmalar, GBM tedavisindeki zorlukların tümör nüksü, kemoterapi ve radyasyona direnç ve tümör içinde önemli fenotipik değişkenlik gibi sorunlara katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu faktörler, glioblastomun kötü huylu özelliklerini daha geniş bir ölçekte etkili bir şekilde hedefleyebilecek ve azaltabilecek yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesine duyulan acil ihtiyacın altını çizmektedir (Prager et al. 2020). Bu zorluklara ek olarak, tümörün çevre beyin dokusuna sızma yeteneği cerrahi rezeksiyonu zorlaştırmakta ve GBM'nin doğal direnç mekanizmalarının ve heterojenliğinin üstesinden gelebilecek yenilikçi tedavi stratejilerine olan ihtiyacı daha da vurgulamaktadır (Tan et al. 2020).

Kurkumin molekülü ile yapılmış sayısız çalışma bu molekülün birden fazla moleküler yolu modüle ederek meme, kolon, prostat ve beyin kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarının büyümesini engelleyebileceğini ortaya koymuştur. Spesifik olarak, kurkuminin kanser hücresi çoğalması, apoptoz, anjiyogenez, metastaz ve immün yanıt düzenlemesine müdahale ettiği gösterilmiştir (Zoi et al. 2021a).

Kurkuminin umut verici antikanser özelliklerine rağmen, biyoyararlanımı oldukça sınırlıdır. Kurkumin'in zayıf sulu çözünürlüğü, hızlı metabolizması ve hızlı sistemik eliminasyonu, sınırlı biyoyararlanımına katkıda bulunan başlıca faktörlerdir (Abadi et al. 2022). Kurkuminin düşük biyoyararlanımı terapötik etkinliğini önemli ölçüde etkilemekte, plazma ve dokularda terapötik seviyelere ulaşmak için yüksek dozların kullanılmasını gerektirmekte, bu da potansiyel yan etkilere ve hasta uyumu sorunlarına yol açabilmektedir (Joshi et al. 2023). Ayrıca, Popovic ve arkadaşları (2024) tarafından yapılan sistematik incelemeler, kurkuminin terapötik etkilerinin, değişken biyoyararlanımı nedeniyle klinik çalışmalara genellikle yeterince yansıtılmadığını vurgulamaktadır. İnceleme, sistematik analizlerin kurkumin formülasyonlarının biyoyararlanım varyasyonlarını nadiren dikkate aldığını ve bunun da tutarsız terapötik sonuçlara yol açtığını vurgulamaktadır (Bučević Popović et al. 2024). Bu nedenle,

kurkuminin biyoyararlanımını iyileştirmek, terapötik potansiyelinden tam olarak yararlanmak, daha tutarlı ve etkili klinik sonuçlar sağlamak için çok önemlidir.

Farmakolojik profilini iyileştirmek için kurkuminin kimyasal yapısı değiştirilerek kurkumin analogları geliştirilmiştir. Bu modifikasyonlar, bileşiğin metabolik bozulmaya karşı direncini, hücresel alımını ve kan-beyin bariyeri (BBB) gibi biyolojik engelleri aşma yeteneğini arttırabilir (Rodrigues et al. 2021; Chelimela et al. 2024).

Bu çalışmada, üç farklı kurkumin analogunun (Analog1, Analog2 ve Analog3) U87 glioblastoma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini, doğal kurkumin ile karşılaştırarak değerlendirmiştir. Ayrıca, bu analogların kanser hücreleri üzerindeki seçiciliğini göstermek amacıyla bu moleküller aynı dozda sağlıklı hücre hattı olan insan umbilikal ven endotelial hücreleri (HUVEC) üzerinde denenmiş ve sonuçlar toksisite analizi için karşılaştırılmıştır.

Hücre canlılığı analizinde ilk olarak Analog1, U87 hücrelerinde 5 μ M'dan başlayarak kayda değer öldürücü göstermiş ve düşük dozlarda doğal kurkumin ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak, bu artan öldürücü etki, konsantrasyonun 25 μ M'yi aşmasıyla azalmaya başlamış ve doz bağımlı bir etki olduğunu göstermiştir (Şekil 4-1). Analog1, U87 hücrelerine üzerinde HUVEC hücrelerine göre daha sitotoksik olsa da, kanser hücrelerine yönelik seçiciliği beklenenden düşük olmuş, bu da özellikle yüksek dozlarda potansiyel yan etkiler ve hedef dışı toksisite konusunda anti-tümör potansiyelini azaltmıştır (Şekil 4-2).

Diğer bir molekülümüz Analog2, hücre canlılığı testlerinde U87 hücreleri üzerinde 2.5 μ M gibi düşük bir dozda bile kayda değer bir etki göstermiştir. Doğal kurkumin ile karşılaştırıldığında doğal kurkuminin %5 etki gösterdiği dozlarda Analog2 %70 sitotoksik öldürücü etki göstererek aktivite konusunda doğal kurkumini anlamlı ölçüde geride bırakmıştır (Şekil 4-3). Aynı zamanda, Analog2 kanser hücrelerine yönelik yüksek seçicilik göstermiş ve U87 hücreleri üzerinde %50 sitotoksik etki gösterdiği dozlarda, HUVEC hücreleri üzerindeki toksisite sadece %8 olarak ölçülmüştür (Şekil 4-4). Kanser hücreleri üzerindeki yüksek seçicilik ve sağlıklı hücreler üzerinde düşük toksisite Analog2'yi anti-tümör potansiyeli açısından son derece umut verici bir aday olarak konumlandırmaktadır.

Son olarak Analog3, özellikle 40 μM 'a kadar olan dozlarda U87 hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etki göstermiş ve doğal kurkuminden daha etkili olmuştur. Ancak, Analog1'de olduğu gibi, bu avantaj daha yüksek dozlarda azalmıştır (Şekil 4-5). Buna rağmen, Analog3 de Analog2'ye benzer şekilde yüksek kanser hücresi seçiciliği göstermiş ve sağlıklı hücelere zarar vermeden glioblastoma hücrelerini etkili bir şekilde hedef alabileceğini düşündürmüştür (Şekil 4-6).

Genel olarak, bulgular, hem Analog2 hem de Analog3'ün güçlü ve seçici anti-glioblastoma ajanları olarak büyük potansiyele sahip olduğunu, Analog2'nin ise düşük dozlarda olağanüstü etkinliği ve üstün seçiciliği ile öne çıktığını göstermektedir. Bu moleküllerin aynı dozda hücre üzerindeki etkilerini mikroskopik olarak incelediğimizde Analog2'nin diğer moleküllere kıyasla hem hücre sayısında kayda değer bir azalışa sebep olduğu hem de hücre morfolojisini gözle görülebilir şekilde etkilediği gözlemlenebilir (Şekil 4-8). Bu, Analog2'nin gelişmiş farmakokinetik özelliklere sahip olabileceğini, tümör hücrelerinde daha iyi dağıtım ve tutma sağlayarak gelişmiş sitotoksitoye yol açabileceğini düşündürmektedir.

Analog2'nin U87 hücre canlılığını azaltmada gözlenen üstün etkinliği, kurkumine kıyasla gelişmiş antikanser aktivitesi bildiren kurkumin analogları üzerine yapılan önceki çalışmalarla tutarlıdır. Örneğin, birkaç kurkumin türevinin daha güçlü antiproliferatif etkilere sahip olduğu, apoptozu indüklediği ve GBM dahil olmak üzere çeşitli kanser modellerinde göç ve istilayı inhibe ettiği gösterilmiştir (Rodrigues et al. 2021; Mohamadian et al. 2022). Analog2'nin gücündeki bu artış, stabilitesini ve hücre hedefleriyle etkileşimini artıran yapısal modifikasyonlara bağlanabilir.

Analog2'nin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini göz önüne aldığımızda diğer analoglara göre farmakokinetik olarak anti-tümör potansiyeli daha yüksek olmasından ötürü projemizde bu molekül üzerinde yoğunlaşmaya karar verilmiştir. Analog2'nin anti-tümör özelliklerini gösterdiği mekanizmaları aydınlatmak amacıyla sırasıyla U87 hücreleri üzerinde ilaç direncine, oksidatif stres ve apoptoza, hücre migrasyonuna, kanser yolağında onkojen ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonuna olan etkileri incelenmiştir.

Analog2'nin anti-tümör özelliklerini aydınlatmadaki ilk aşamada, GBM tedavisinde temel bir ilaç olan Temozolomid (TMZ) ile kombine uygulamada U87 hücreleri üzerindeki sinerjik etkileri incelenmiştir. TMZ glioblastoma tedavisinde

hastalar için kritik, ancak sınırlı bir hayatta kalma süresi sağlamaktadır. Fakat TMZ'nin etkinliği, tümör hücrelerinde gelişen direnç mekanizmaları tarafından sıklıkla engellenmektedir. Bu direnç mekanizmaları, tümör hücrelerinde gelişmiş DNA onarım yolları ve hayatta kalma sinyal ağlarının aktivasyonu gibi süreçlerle yönlendirilir (Singh et al. 2021b; Cruz et al. 2022). Bu direnç mekanizmaları, TMZ'nin terapötik potansiyelini önemli ölçüde sınırlamakta ve direncin üstesinden gelmek veya hafifletmek için kombine ilaç stratejilerine yönelik araştırmaların devam etmesine yol açmaktadır. Umut verici yaklaşımlardan biri, TMZ'nin antitümör aktivitesini sinerjik etkileşimler yoluyla artırabilecek yeni ajanlarla birleştirilmesidir.

Bu çalışmada, Analog2 ile TMZ kombine uygulama ile belirli dozlarda U87 hücrelerine uygulandı ve uygulama sonrası hücre canlılıkları analiz edildi. Hücre canlılığı deneyinde elde edilen veriler Bliss Bağımsızlık Modeli kullanılarak moleküllerin sinerjik etki durumları analiz edildi. Sonuçlar, Analog2 ve TMZ arasındaki doz bağımlı bir ilişkiyi ortaya koyarak, antitümör aktivitesinin modülasyonunda bu iki ajan arasındaki etkileşimi gösterdi. Özellikle, 0.25 μM TMZ ile 1.5 μM Analog2'nin kombinasyonu, beklenenden %3 daha büyük bir etki yaratarak, düşük Analog2 konsantrasyonlarında mütevazı ama anlamlı bir sinerjik etkileşim olduğunu gösterdi (Tablo 4-1). Bu sinerji, TMZ'nin 3 μM Analog2 ile kombinasyonunda artarak beklenen etkinin %11 üzerinde bir iyileşme sağladı ve bu durum, terapötik sinerji için potansiyel olarak optimal bir doz aralığına işaret etti (Tablo 4-1). Ancak, Analog2'nin konsantrasyonunun 4.5 μM 'ye çıkarılması, sinerjiyi hafifçe azaltarak %8'e düşürdü ve 6 μM Analog2'nin TMZ ile kombinasyonu, beklenen eklemeli etkiye kıyasla etkinlikte %6'lık bir azalma ile sonuçlandı (Tablo 4-1). Bu bulgular, Analog2'nin belirli konsantrasyonlarda TMZ'nin antitümör etkilerini artırabileceğini, ancak daha yüksek dozların azalan getiriler veya hatta antagonistik etkileşimlere yol açabileceğini göstermektedir. Bu durum, Analog2'nin TMZ ile kombinasyonunda terapötik potansiyelini en üst düzeye çıkarmak için dozlama stratejisinin optimize edilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Elde ettiğimiz bulgular kurkuminin GBM tedavisindeki ilaç direnci ile ilgili çalışmalarla örtüşmektedir. Bu konudaki önemli bir çalışmada, glioblastoma tedavisinde TMZ'nin terapötik etkilerini artırmada kurkuminin etkisi detaylı bir şekilde ortaya konmuştur. Çalışma, kurkuminin, hem in vitro hem de in vivo olarak, glioblastoma

hücrelerini TMZ'ye duyarlı hale getirebileceğini, apoptozu teşvik ederek ve reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek göstermiştir. Ayrıca, kurkumin ve TMZ kombinasyonunun, tek başına uygulanan tedavilere kıyasla AKT/mTOR sinyal yolunu daha etkili bir şekilde bozduğu bulunmuştur. Bu bulgular, kurkuminin, glioblastoma tedavisinde TMZ'nin etkinliğini artırmak için umut verici bir yardımcı ajan olarak etki edebileceğini öne sürmektedir (Yin et al. 2014). Walker ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışma, kurkuminin apoptozu indükleyerek, tümör hücresi proliferasyonunu azaltarak ve normal hücreleri oksidatif stresten koruyarak glioblastoma tedavisinin iki temel dayanağı olan temozolomid ve radyasyon tedavisinin etkilerini artırma yeteneğini vurgulamıştır (Walker et al. 2021).

Çalışmamızın ikinci aşamasında kurkumin etkisinde hücre ölüm mekanizmalarında temel parametrelerden biri olan reaktif oksijen türleri (ROS) artışı analiz edilmiştir. ROS, süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi oksijen içeren kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Düşük seviyelerde ROS, normal hücrel sinyalizasyon ve homeostaz için gereklidir; ancak, aşırı ROS üretimi oksidatif strese yol açarak DNA, proteinler ve lipitler gibi hücrel bileşenlere zarar verebilir.

Kurkumin, hücrelerinde ROS seviyelerini hücre durumuna bağlı olarak farklı yönde etkileyebilir. Bazı durumlarda, Kurkumin bir antioksidan olarak davranarak ROS seviyelerini düşürür ve normal hücreleri oksidatif hasardan korur. Ancak kanser hücrelerinde kurkumin, paradoksal olarak ROS üretimini artırabilir ve yüksek ROS seviyeleri hücrel antioksidan kapasiteyi aşarak oksidatif hasara ve apoptoza yol açabilir (Cheung and Vousden 2022).

Bu aşamada, Analog2'nin, saf kurkumin ile karşılaştırmalı olarak reaktif oksijen türleri indükleyicisi açısından rolünü değerlendirerek U87 hücreleri üzerindeki anti-tümör etkilerini değerlendirdik. Bulgularımız, hem saf kurkuminin hem de Analog2'nin bu hücrelerdeki ROS seviyelerini anlamlı ölçüde yükselttiğini ve anti-tümör aktiviteleri için potansiyel bir mekanizma önerdiğini göstermektedir.

Bulgularımız saf kurkuminin ROS seviyelerini 20 μ M konsantrasyonda %35 ve 30 μ M'de %39 oranında artırdığını göstermektedir (Şekil 4-12). Buna karşılık Analog2, 4,5 μ M'de %33 ve 6 μ M'de %43 artışla önemli ölçüde daha düşük dozlarda ROS'ta karşılaştırılabilir bir artış üretmiştir (Şekil 4-12). Referans olarak, pozitif kontrol olarak

kullanılan 100 μM H_2O_2 ile muamele, ROS'ta %41'lik bir artışa yol açarak deneysel koşullarımızın güvenilirliğini doğrulamıştır (Şekil 4-12). Bu bulgular, ROS'un oksidatif stresi indükleyerek lipid membran değişikliklerine ve lipid peroksidasyonunun artmasına yol açarak özellikle kanser hücrelerinde hücre ölüm mekanizmalarını tetikleyebileceğine dair önceki çalışmalarla uyumludur (Wu et al. 2022; Liu et al. 2023).

Çalışmamız, kurkuminin gibi Analog2'nin pro-oksidan olarak hareket edebileceğini, ROS üretimini artırabileceğini ve böylece glioblastoma hücrelerinde apoptozu potansiyel olarak teşvik edebileceğini göstermektedir. Analog2'nin saf kurkumine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda ROS indükleme yeteneğini gösteren sonuçlar özellikle dikkat çekicidir. Bu, Analog2'nin daha güçlü bir ROS indükleyicisi olabileceğini ve bunun da antitümör ajan olarak etkinliğini artırabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, kurkumin türevlerinin kurkuminin kendisinden daha fazla biyoaktivite ve etki gösterebileceğini belirten çalışmalarla desteklenmektedir (Gupta et al. 2020). Son çalışmalar, kurkumin ve analoglarının glioblastoma hücrelerinde reaktif oksijen türlerini indüklemeye etkili olduğunu ve böylece anti-tümör etkilerine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Kurkumin yüklü niosom nanopartikülleri (CM-NP) üzerine yapılan bir çalışmada, bu nanopartiküllerin U87 glioblastoma hücrelerinde ROS seviyelerini önemli ölçüde artırdığı, bu durumun apoptozun artmasına ve NF- κ B ve STAT3 gibi tümör progresyonu ile ilişkili belirteçlerin inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir (G et al. 2023). Başka bir araştırmada, modern fotodinamik tedavide kurkuminin rolü vurgulanmış; kurkumin yüklü lipid nanopartiküllerinin, ışıkla birlikte uygulandığında glioblastoma hücrelerinde önemli oksidatif stres oluşturduğu ve tümör hücre ölümüne katkıda bulunduğu bulunmuştur (Schulze et al. 2023). Ayrıca, kurkumin analogları FLDP-5 ve FLDP-8'in glioblastoma hücrelerinde ROS'dan bağımsız mekanizmalarla hücre ölümünü indüklediği, mitokondriyal membran potansiyelini etkili bir şekilde azalttığı ve apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (Razali et al. 2024). Bu bulgular, kurkumin ve türevlerinin, ROS indüksiyonu ve diğer apoptotik yolları içeren mekanizmalar aracılığıyla glioblastomanın yönetiminde terapötik potansiyelini vurgulamaktadır.

Yüksek ROS seviyesi hücre ölüm yollarında apoptozun indüklenmesinde temel faktörlerden biridir. Analog2 ve saf kurkumin etkisinde U87 hücrelerindeki ROS seviye değişimlerini takiben AO/PI dual boyama sonrası floresan mikroskopi

görüntülemesi ile apoptotik hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4-13A). Yaptığımız analize göre 30 uM saf kurkumin uyguladığımız hücrelerde apoptotik hücre oranı % 38 iken, 6 uM Analog2 uygulanmış hücrelerde bu oran %52 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-13B). Analog2 ile muamele edilen U87 hücrelerinde apoptoz oranlarında gözlenen artış, saf kurkumine kıyasla ROS'u indüklemedeki etkisi ile orantılıdır. ROS apoptozun iyi bilinen araçlarıdır ve yüksek seviyeleri kanser hücrelerinde hücre ölüm yollarını tetikleyebilir. Yüksek ROS seviyeleri hücresel bileşenlerde oksidatif hasara yol açarak mitokondriyal disfonksiyon, sitokrom C salınımı ve kaspazların aktivasyonu yoluyla intrinsik apoptotik yolları başlatabilir (Gao et al. 2020; Sahoo et al. 2022). Önceki çalışmalar, kurkuminin ROS aracılı mekanizmalar yoluyla çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediğini göstermiştir (Rainey et al. 2020). Bulgularımız, Analog2'nin daha yüksek ROS seviyelerini indükleyerek glioblastoma hücrelerinde apoptozu teşvik etmede daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, Analog2'nin saf kurkumine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda apoptozu indüklemedeki daha yüksek gücü, Analog2'nin hücresel hedeflerle gelişmiş etkileşimler ile daha iyi hücresel alımlara sahip olabileceğini ve daha etkili pro-apoptotik sinyale yol açabileceğini düşündürmektedir. Analog2'nin apoptoz üzerinde gözlemlenen etkileri, kurkumin ve analoglarının ROS üretimi, p53 aktivasyonu ve pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin modülasyonu dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla apoptozu teşvik ettiği gösterilen literatürle uyumludur (Rainey et al. 2020; Kah et al. 2023).

Floresan görüntüleme ile apoptozun belirlenmesi, apoptotik belirteçlerin mRNA seviyelerindeki değişikliklerle desteklenmiştir. Buna göre, madde uygulanan hücrelerde Bax ve Caspase3 seviyeleri artarken Bcl-2 seviyesi azalmıştır (Şekil 4-14). Çalışmamızda gözlemlenen apoptotik belirteçlerdeki değişiklikler, intrinsik apoptotik yolların katılımına dair daha fazla kanıt sağlamaktadır. Bax ve Caspase-3'ün ekspresyon artışı ile birlikte Bcl-2'nin ekspresyonunun azalması, Analog2'nin mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu teşvik ettiğini göstermektedir. Bu durum, kurkumin ve analoglarının kanser hücrelerinde intrinsik apoptotik yolları aktive ettiğinin gösterildiği literatürle tutarlıdır (Rainey et al. 2020).

Kuo ve arkadaşları (2023) tarafından yapılan bir çalışma, optimize edilmiş lipopolimerlerde kapsüllenen kurkuminin apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörlerini

önemli ölçüde baskıladığını ve kaspaz-3 seviyelerini artırdığını, böylece glioblastoma multiforme (GBM) hücrelerinde apoptozu teşvik ettiğini göstermiştir (Kuo et al. 2023). LN-18 insan glioblastoma hücrelerinde uygulanan kurkumin hem ekstrinsik hem de intrinsik apoptotik yolları aktive ederek, öncelikle miRNA-21'in baskılanması ve kaspaz-3, -8 ve -9'un aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Razali et al. 2024).

Çalışmamızda, çeşitli maddelerle muamele edilen U87 hücrelerinin metastatik yetenekleri mikroskop altında morfolojik değişiklikleri gözlemlenerek değerlendirildi. Ayrıca belirlenen morfolojik değişimler, metastazda rol oynayan proteinlerin mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilerek desteklendi. Analog2 ve saf kurkumin moleküllerinin U87 üzerindeki metastatik fonksiyonlara etkisini inceleme aşamasında hücrelerin büyütüldüğü besi yeri serumu %10'dan %1'e düşürülerek kitlesel tümörlerde olduğu gibi besin yetersizliği ve hipoksik koşulları taklit eden tümör mikroçevresine benzer bir ortam yaratılmaya çalışılmıştır. Bu uygulama ile hücreleri bölünmelerini engellemek migrasyona teşvik etmek amaçlanmıştır. Böylelikle uyguladığımız moleküllerin migrasyona olan etkisi daha etkin bir şekilde analiz edilebilmiştir. Hücre migrasyonu analizi hücre kültürü tekli katmanı (monolayer) üzerinde bir çizik oluşturulup bu boşluğun hücrelerin migrasyonu ile doldurulması (yara iyileşme testi) üzerinden yapılmıştır (Şekil 4-15A). Hücre migrasyonu deneyine göre, kontrol hücreleri ilk 12 saat içinde yaranın yaklaşık %62'sini doldurmuş ve 24 saat içinde tamamen kapanmasını sağlamıştır (Şekil 4-15B). Buna karşılık, Analog2 ile muamele edilen hücreler, 12 saat içinde yaranın yaklaşık %23'ünü 4,5 μM 'de ve %33'ünü 6 μM 'de kapatarak önemli ölçüde azalmış migrasyon sergilemiştir (Şekil 4-15B). Özellikle, 6 μM konsantrasyonda, yara kapanması 12 saat sonra %13'e düşmüş ve ardından doza bağlı hücre ölümüne bağlı olarak genişlemiştir (Şekil 4-15B).

Bu sonuçlar Analog2'nin kanser hücrelerindeki metastatik potansiyelin önemli bir göstergesi olan hücre migrasyonu üzerindeki etkisini yansıtmaktadır. Migrasyon hızında gözlenen azalma, Analog2'nin hücre hareketini kontrol eden mekanizmalara müdahale edebileceğini ve glioblastoma hücrelerinin metastazında rol oynayan sinyal yollarını bozabileceğini düşündürmektedir. Analog2 etkisinde U87 hücrelerinin migrasyon kapasitelerindeki değişimler, metastaz belirteçlerinin mRNA seviyelerindeki değişikliklerle desteklenmiştir. PCR analizi sonucunda elde ettiğimiz verilere göre

Analog2 molekülü uygulanmış hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla MMP-9 ekspresyon seviyesinde %50 ve NF κ B ekspresyon seviyesinde ise kayda değer bir biçimde %80 civarında bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4-16). Fakat Analog2 etkisinde MMP-2 ekspresyon seviyesinde bir azalma tespit edilememiştir (Şekil 4-16).

Elde ettiğimiz verilerle tutarlı olarak kurkumin analogu olan bisdemethoxycurcumin'in (BDMC), NF- κ B gibi temel sinyal yollarını baskılayarak ve tümör metastazı için kritik olan matris metaloproteinazları MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunu azaltarak glioblastoma hücrelerinin göçünü ve istilasını önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (Hsia et al. 2022).

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) hücre dışı matriksi bozarak kanser hücresi istilasını ve metastazı kolaylaştıran enzimlerdir. Özellikle MMP-9, glioblastoma hücrelerinin agresif davranışlarında rol oynayarak invazif yeteneklerine katkıda bulunur (Chen et al. 2022; Su et al. 2023). Analog2 uygulanan hücrelerde MMP-9 ekspresyonundaki önemli azalma, bu bileşiğin glioblastoma hücrelerinin invaziv potansiyelini inhibe edebileceğini ve potansiyel olarak metastatik yayılımlarını sınırlayabileceğini düşündürmektedir.

Nükleer faktör kapp B (NF κ B), enflamasyon, bağışıklık, hücre çoğalması ve hayatta kalma ile ilgili çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Kanserde, NF κ B genellikle yapısal olarak aktive olur ve tümör ilerlemesini ve metastazı teşvik eder. Kurkumin türevleri ile yapılan çalışmalarda glioblastoma hücrelerinde madde etkisinde ekspresyonunda azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Soukhtanloo et al. 2020; Chen et al. 2022). Analog2 ile muamele edilen hücrelerde NF κ B seviyelerindeki kayda değer düşüş, bu bileşiğin kanser hücresi migrasyonu ve istilasında yer alan kilit yolları baskılayabileceğini ve hücre migrasyonu gözlenen inhibisyonu için mekanik bir temel sağladığını göstermektedir (Şekil 4-16).

Analog2 tarafından hücre göçünün engellenmesi ve metastazla ilişkili belirteçlerin azaltılması, Analog2'nin anti-metastatik bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır. MMP-9 ekspresyonundaki önemli azalma, Analog2'nin hücre dışı matrisin bozulmasına müdahale edebileceğini ve böylece glioblastoma hücrelerinin invazif davranışını engelleyebileceğini göstermektedir (Şekil 4-16).

Analog2 ile muamele edilen hücrelerde MMP-2 ekspresyonu üzerinde etki olmaması, bu bileşiğin glioblastoma hücre invazyonunda yer alan spesifik MMP'leri seçici olarak hedeflediğini düşündürmektedir (Şekil 4-16).

Kurkumin, çeşitli kanser türlerinde antiproliferatif etkileri nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Kurkuminin çeşitli onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu modüle ettiği ve böylece kanser hücresi proliferasyonunu ve sağkalımını bozduğu bilinmektedir (Wang et al. 2021b). Bu çalışmada, Analog2'nin U87 glioblastoma hücrelerindeki anahtar onkogenlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini araştırıldı. Özellikle, glioblastoma ilerlemesinde kritik öneme sahip Ki67, c-MYC ve CCND1 genlerinin mRNA düzeyinde değişimleri analiz edildi. Bulgularımız, Analog2, TMZ ve saf kurkumin uygulanan U87 hücrelerinde, madde uygulanmamış kontrollere kıyasla bu onkogenlerin mRNA ekspresyonunda önemli bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. mRNA ekspresyonlarında azalma ortalama olarak Ki67 ve CCND1'de kayda değer bir şekilde %85 civarında iken, c-MYC'te ise %30 civarında anlamlı ama daha mütevazı bir değerdedir (Şekil 4-17).

Ki67 hücresele proliferasyonun iyi bilinen bir belirteçidir. Analog2 uygulamasını takiben ekspresyonunun azalması, bu bileşiğin glioblastoma hücre büyümesini inhibe ettiği potansiyel bir mekanizmaya işaret etmektedir. Benzer antiproliferatif etkiler, çeşitli kanser modellerinde Ki67 ekspresyonunu azalttığı bildirilen kurkumin ile de gözlenmiştir (Sandhiutami et al. 2021; Farghadani and Naidu 2021).

Proto-onkogen c-MYC hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz ve hücresele dönüşümde kritik rol oynar. Azalmış c-MYC ekspresyonu gözlemimiz, kurkuminin kanser hücrelerinde c-MYC'yi baskılama yeteneğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (Ashrafizadeh et al. 2020; Jabbari et al. 2022). Bu baskılanma önemlidir, çünkü c-MYC aşırı ekspresyonu genellikle glioblastoma hastalarında kötü prognoz ve agresif tümör davranışı ile ilişkilidir.

Siklin D1'i kodlayan CCND1, hücre döngüsünün G1/S geçişinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Analog2 uygulanan hücrelerde CCND1 ekspresyonundaki önemli azalma, potansiyel hücre döngüsü durmasına işaret ederek bu kurkumin analogunun antiproliferatif etkilerini daha da desteklemektedir. Bu bulgu, kurkumin ve türevlerinin Siklin D1 de dahil olmak üzere siklinlerin ekspresyonunu

modüle ederek hücre döngüsünün durmasına neden olabileceğini gösteren çalışmalarla desteklenmektedir (Ashrafizadeh et al. 2020; Bagherian et al. 2020).

Ki67, c-MYC ve CCND1 ekspresyonunda gözlenen azalma, Analog2'nin antikanser etkilerini birden fazla yol üzerinden gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu genlerin ekspresyonunun baskılanması muhtemelen hücresel proliferasyonun azalmasına ve tümör büyümesinin sınırlandırılması için çok önemli olan hücre döngüsünün durmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

Analog2'nin antitümör özelliklerini pekiştirmek için, U87 glioblastoma hücrelerinde anahtar tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini inceledik ve bu sonuçları saf kurkumin ve TMZ uygulanmış hücreler ile karşılaştırdık. Özellikle p53 ve p21'in mRNA ekspresyon değişikliklerine odaklandık. Bulgularımız, Analog2 uygulanan U87 hücrelerinde, kontrollere kıyasla p53 ifadesinde %58 gibi önemli bir artış olduğunu gösterirken, p21 ifadesinde ise kayda değer bir değişiklik olmadığını göstermiştir (Şekil 4-18).

Analog2 uygulamasının ardından p53'te gözlemlenen ekspresyon azalması, kurkumin ve analoglarının tümör baskılayıcı genler üzerindeki etkilerine ilişkin mevcut literatürle uyumludur. "Genomun koruyucusu" olarak bilinen p53, hücre döngüsünün durması, apoptoz ve DNA onarımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Kurkuminin daha önce çeşitli kanser hücre hatlarında p53 ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak hücre çoğalmasını engellediği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Anggia Paramita et al. 2022; Li et al. 2022). Çalışmamızda gözlemlenen p53 ekspresyonundaki artış, Analog2'nin antikanser etkilerini benzer mekanizmalar yoluyla gösterebileceğini düşündürmektedir. Tümör baskılanmasında p53'ün merkezi rolü göz önüne alındığında, bu genin ekspresyonundaki artış, Analog2'nin antikanser etkilerini uyguladığı kilit bir mekanizma olabilir.

Buna karşın, sonuçlarımız Analog2 uygulaması üzerine p21 ifadesinde önemli bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Bu bulgu, p21'in p53'ün aşağı yönlü bir hedefi olduğu ve hücre döngüsünün durmasına aracılık etmek için p53 aktivasyonuna yanıt olarak tipik olarak ifadesinin arttığı göz önüne alındığında ilgi çekici bir sonuç olabilmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda p21 ekspresyonunda artış olmaması, Analog2'nin p53 yolaklarını p21 içermeyen bir şekilde etkileyebileceğini veya U87 glioblastoma hücrelerinde başka düzenleyici mekanizmaların devrede olabileceğini

düşündürmektedir. Bu dinamiği tam olarak anlamak için ilgili spesifik yollar ve düzenleyici yollar hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Kurkuminin, çeşitli kanser hücre hatlarında mitokondriyal fonksiyonu etkilediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Çalışmalar, kurkuminin mitokondriyal disfonksiyonu indükleyerek apoptozun aktivasyonuna ve kanser hücresi proliferasyonunun inhibisyonuna yol açabileceğini bildirmiştir (Rainey et al. 2020; Wang et al. 2021a). Bulgularımız bu çalışmalarla tutarlı olmakla birlikte kurkumin ve Analog2 uygulanan U87 hücrelerinde mtDNA kopya sayısında önemli bir azalma olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre Analog2 uygulanmış hücreler madde uygulanmamış kontrol hücre ile kıyaslandığında mtDNA kopya sayısında yaklaşık olarak %95 azalma tespit edilmiştir (Şekil 4-19). Kurkumin uygulanmış hücrelerde ise kopya sayısındaki azalış yaklaşık olarak %70 civarında gözlemlenmiştir (Şekil 4-19). Bu azalma, kurkuminin genel antikanser etkilerine katkıda bulunabilecek mitokondriyal hasarın veya bozulmuş mitokondriyal biyogenezin göstergesi olabilir.

Analog2 uygulanan hücrelerde gözlenen mtDNA kopya sayısındaki anlamlı azalma, bu analogun mitokondriyal fonksiyon üzerinde kurkuminden daha güçlü bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Analog2'nin artan etkisi, biyoyararlanımını, stabilitesini veya mitokondriyal hedeflerle etkileşimini artıran yapısal modifikasyonlardan kaynaklanıyor olabilir. Önceki çalışmalar, kurkumin analoglarının bu tür modifikasyonlar nedeniyle gelişmiş antikanser aktivitesi sergileyebileceğini öne sürmüştür (Alhasawi et al. 2022). mtDNA kopya sayısındaki %95'lik azalma, mitokondriyal homeostazda önemli bir bozulmaya işaret eder ve bu da ciddi metabolik strese ve hücre ölümüne karşı artan duyarlılığa yol açabilir.

Hem kurkumin hem de Analog2 ile muamele edilen hücrelerde gözlenen mtDNA kopya sayısındaki azalma çeşitli mekanizmalara bağlanabilir. Potansiyel mekanizma oksidatif stresin indüklenmesidir. Hem kurkumin hem de analoglarının kanser hücrelerinde ROS üretimini artırarak mitokondriyal hasara ve apoptotik yolların aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (Wang et al. 2021a). Kurkumin ve Analog2 etkisinde U87 hücrelerinde tespit ettiğimiz ROS artışı bu mekanizmayı desteklemektedir (Şekil 4-12). Ayrıca apoptoz dışında mtDNA kopya sayısındaki önemli azalma, mtDNA ve proteinlerde ROS kaynaklı hasardan ve ardından mitofaji

yoluyla hasarlı mitokondrinin seçici olarak parçalanmasından kaynaklanabilir (Zhang et al. 2023).

Bu çalışmada elde edilen bulgular, GBM tedavisinde kullanılan mevcut terapötik yaklaşımların sınırlamaları ve bu tedavilere karşı gelişen direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek için yeni stratejilerin gerekliliğini vurgulamaktadır. Saf kurkuminin düşük biyoyararlanımı ve terapötik etkinliğindeki sınırlamalar dikkate alındığında, bu molekülün kimyasal yapısında yapılan modifikasyonlarla geliştirilen kurkumin analoglarının, özellikle Analog2'nin, GBM tedavisinde umut verici adaylar olarak öne çıktığı görülmektedir.

Analog2, glioblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, düşük dozlarda bile gösterdiği yüksek etkinlik ve sağlıklı hücreler üzerindeki sınırlı toksisitesi ile dikkat çekmiştir. Analog2'nin, TMZ gibi standart GBM tedavileriyle sinerjik etkiler gösterdiği, ROS üretimini artırarak apoptozu indüklediği ve hücrel proliferasyon ve metastatik potansiyeli baskıladığı bulguları, bu molekülün antitümör potansiyelini daha da güçlendirmektedir.

Çalışmamız, Analog2'nin kurkumin türevleri arasında kurkumin ile karşılaştırıldığında önemli farmakokinetik özelliklere sahip olabileceğini ve GBM tedavisinde etkili bir antikanser ajanı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, Analog2'nin klinik öncesi ve klinik çalışmalarda daha ayrıntılı araştırılması, GBM tedavisinde daha etkili ve güvenli tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abadi AJ, Mirzaei S, Mahabady MK, et al (2022) Curcumin and its derivatives in cancer therapy: Potentiating antitumor activity of cisplatin and reducing side effects. *Phyther Res* 36:189–213. <https://doi.org/10.1002/PTR.7305>
- Adams G (2020) A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *Biochem (Lond)* 42:48–53. <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Adiwidjaja J, McLachlan AJ, Boddy A V. (2017) Curcumin as a clinically-promising anti-cancer agent: pharmacokinetics and drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 13:953–972. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1360279>
- Al Moubarak A, El Joumaa M, Slika L, et al (2021) Curcumin-Polyallylhydrocarbon Nanocapsules Potently Suppress 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colorectal Cancer in Mice by Inhibiting Wnt/ β -Catenin Pathway. *Bionanoscience* 11:518–525. <https://doi.org/10.1007/S12668-021-00842-5/FIGURES/3>
- Alhasawi MAI, Aatif M, Muteeb G, et al (2022) Curcumin and Its Derivatives Induce Apoptosis in Human Cancer Cells by Mobilizing and Redox Cycling Genomic Copper Ions. *Mol* 2022, Vol 27, Page 7410 27:7410. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217410>
- Alves AL V., Gomes INF, Carloni AC, et al (2021) Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. *Stem Cell Res Ther* 2021 121 12:1–22. <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02231-X>
- Anggia Paramita D, Hermansyah D, Anggia Paramita D, et al (2022) Regulation of p53 and survivin by Curcuma longa extract to caspase-3 dependent apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Med Glas* 19:189–196. <https://doi.org/10.17392/1453-22>
- Ardebili A, Pouriayevali MH, Aleshikh S, et al (2021) Antiviral Therapeutic Potential of Curcumin: An Update. *Mol* 2021, Vol 26, Page 6994 26:6994. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26226994>
- Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Mohamamdinejad R, et al (2020) Curcumin Therapeutic

- Modulation of the Wnt Signaling Pathway. *Curr Pharm Biotechnol* 21:1006–1015. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200305115101>
- Azari B, Zahmatkesh Moghadam S, Zarrinfar H, et al (2021) Antifungal Activity of Curcuminoids and Difluorinated Curcumin Against Clinical Isolates of *Candida* Species. *Adv Exp Med Biol* 1328:123–129. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73234-9_8
- Bagherian A, Mardani R, Roudi B, et al (2020) Combination Therapy with Nanomicellar-Curcumin and Temozolomide for In Vitro Therapy of Glioblastoma Multiforme via Wnt Signaling Pathways. *J Mol Neurosci* 70:1471–1483. <https://doi.org/10.1007/S12031-020-01639-Z/METRICS>
- Bashkeran T, Harun A, Umakoshi H, et al (2024) Enhanced Curcumin Delivery and Stability through Natural Deep Eutectic Solvent-Based Niosomes. *J Mol Liq* 409:125446. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2024.125446>
- Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I (2021) Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells* 2021, Vol 10, Page 621 10:621. <https://doi.org/10.3390/CELLS10030621>
- Bučević Popović V, Karahmet Farhat E, Banjari I, et al (2024) Bioavailability of Oral Curcumin in Systematic Reviews: A Methodological Study. *Pharmaceuticals* 17:164. <https://doi.org/10.3390/PH17020164/S1>
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.112797>
- Chelimela N, Alavala RR, Satla SR (2024) Curcumin - Bioavailability Enhancement by Prodrug Approach and Novel Formulations. *Chem Biodivers* 21:. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202302030>
- Chen C, Wang Z, Fu H, et al (2024) Enhanced bioavailability of curcumin amorphous nanocomposite prepared by a green process using modified starch. *Int J Biol Macromol* 270:. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.132210>
- Chen CJ, Shang HS, Huang YL, et al (2022) Bisdemethoxycurcumin suppresses human brain glioblastoma multiforme GBM 8401 cell migration and invasion via

- affecting NF- κ B and MMP-2 and MMP-9 signaling pathway in vitro. *Environ Toxicol* 37:2388–2397. <https://doi.org/10.1002/TOX.23604>
- Chen Y, Hong C, Chen X, Qin Z (2020) Demethoxycurcumin increases the sensitivity of cisplatin-resistant non-small lung cancer cells to cisplatin and induces apoptosis by activating the caspase signaling pathway. *Oncol Lett* 20:. <https://doi.org/10.3892/OL.2020.12072>
- Cheung EC, Vousden KH (2022) The role of ROS in tumour development and progression. *Nat Rev Cancer* 22:280–297. <https://doi.org/10.1038/S41568-021-00435-0>
- Cruz JVR, Batista C, Afonso B de H, et al (2022) Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers* 2022, Vol 14, Page 3203 14:3203. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14133203>
- Drljača J, Popović A, Bulajić D, et al (2022) Diazepam diminishes temozolomide efficacy in the treatment of U87 glioblastoma cell line. *CNS Neurosci Ther* 28:1447–1457. <https://doi.org/10.1111/CNS.13889>
- Farghadani R, Naidu R (2022) Curcumin as an Enhancer of Therapeutic Efficiency of Chemotherapy Drugs in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2022, Vol 23, Page 2144 23:2144. <https://doi.org/10.3390/IJMS23042144>
- Farghadani R, Naidu R (2021) Curcumin: Modulator of Key Molecular Signaling Pathways in Hormone-Independent Breast Cancer. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 3427 13:3427. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13143427>
- G T, A M, G R, et al (2023) Niosomal Curcumin Inhibited Gliomagenesis-Related Markers in U87 Cell Line. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2817911/V1>
- Gao L, Loveless J, Shay C, Teng Y (2020) Targeting ROS-Mediated Crosstalk Between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *Adv Exp Med Biol* 1260:1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42667-5_1
- Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021) The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 12827 22:12827. <https://doi.org/10.3390/IJMS222312827>
- Gilard V, Tebani A, Dabaj I, et al (2021) Diagnosis and management of glioblastoma: A

- comprehensive perspective. *J Pers Med* 11:258.
<https://doi.org/10.3390/JPM11040258/S1>
- Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, et al (2022) Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers* 2022, Vol 14, Page 2412 14:2412.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS14102412>
- Guo X, Gu L, Li Y, et al (2023) Histological and molecular glioblastoma, IDH-wildtype: a real-world landscape using the 2021 WHO classification of central nervous system tumors. *Front Oncol* 13:1200815.
<https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1200815/BIBTEX>
- Hamzah H, Hertiani T, Pratiwi SUT, et al (2020) The biofilm inhibition and eradication activity of curcumin againsts polymicrobial biofilm. *BIO Web Conf* 28:04001.
<https://doi.org/10.1051/BIOCONF/20202804001>
- Han S, Wang PF, Cail HQ, et al (2021) Alterations in the RTK/Ras/PI3K/AKT pathway serve as potential biomarkers for immunotherapy outcome of diffuse gliomas. *Aging (Albany NY)* 13:15444. <https://doi.org/10.18632/AGING.203102>
- He R, Jiang Y, Shi Y, et al (2020) Curcumin-laden exosomes target ischemic brain tissue and alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ROS-mediated mitochondrial apoptosis. *Mater Sci Eng C* 117:111314.
<https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111314>
- Hermawan A, Putri H (2021) Systematic analysis of potential targets of the curcumin analog pentagamavunon-1 (PGV-1) in overcoming resistance of glioblastoma cells to bevacizumab. *Saudi Pharm J* 29:1289–1302.
<https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2021.09.015>
- Hong W, Guo F, Yu N, et al (2021) A novel folic acid receptor-targeted drug delivery system based on curcumin-loaded β -cyclodextrin nanoparticles for cancer treatment. *Drug Des Devel Ther* 15:2843–2855.
https://doi.org/10.2147/DDDT.S320119/ASSET/A8C560DD-38AA-482F-A661-DD8C0CBC5004/ASSETS/GRAPHIC/DDDT_A_12184172_F0006_C.JPG
- Hsia TC, Peng SF, Chueh FS, et al (2022) Bisdemethoxycurcumin Induces Cell Apoptosis and Inhibits Human Brain Glioblastoma GBM 8401/Luc2 Cell Xenograft Tumor in Subcutaneous Nude Mice In Vivo. *Int J Mol Sci* 23:.

<https://doi.org/10.3390/IJMS23010538>

- Jabbari N, Ghoran SH, Semsari H, et al (2022) Gemini Curcumin Suppresses Gastric Cancer AGS Cell Proliferation Through Modulation of lncRNA CCAT2 and c-Myc Genes. Turkish J Pharm Sci 19:239. <https://doi.org/10.4274/TJPS.GALENOS.2021.03502>
- Janjua TI, Rewatkar P, Ahmed-Cox A, et al (2021) Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. Adv Drug Deliv Rev 171:108–138. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.01.012>
- Jennings MR, Parks RJ (2020) Curcumin as an Antiviral Agent. Viruses 2020, Vol 12, Page 1242 12:1242. <https://doi.org/10.3390/V12111242>
- Jithavech P, Suwattananuruk P, Hasriadi, et al (2022) Physicochemical investigation of a novel curcumin diethyl γ -aminobutyrate, a carbamate ester prodrug of curcumin with enhanced anti-neuroinflammatory activity. PLoS One 17:e0265689. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0265689>
- Joshi SD, Chavan RR, Jadhav AS, et al (2023) A Review of Different Approaches for Improving Curcumin Bioavailability. J Drug Deliv Ther 13:238–244. <https://doi.org/10.22270/JDDT.V13I12.6267>
- Jyotirmayee B, Mahalik G (2022) A review on selected pharmacological activities of Curcuma longa L. Int J Food Prop 25:1377–1398. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2082464>
- Kah G, Chandran R, Abrahamse H (2023) Curcumin a Natural Phenol and Its Therapeutic Role in Cancer and Photodynamic Therapy: A Review. Pharm 2023, Vol 15, Page 639 15:639. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15020639>
- Kamrani SN, Sharifzadeh B, Barazandehdoust M, Mirmasoudi SS (2024) Synthesis and evaluation of biological activity of novel curcumin-pyrazole derivatives using KSF@Ni and $[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp-SO}_3\text{H}]$ nanocatalysts. J Indian Chem Soc 101:101193. <https://doi.org/10.1016/J.JICS.2024.101193>
- Kang S, Kim M, Kim H, Hong J (2024) Enhancement of Solubility, Stability, Cellular Uptake, and Bioactivity of Curcumin by Polyvinyl Alcohol. Int J Mol Sci 25:.. <https://doi.org/10.3390/IJMS25116278>

- Khajeh pour S, Blanton C, Ghimire B, Aghazadeh-Habashi A (2023) Development of a rapid, sensitive, and selective LC–MS/MS method for quantifying curcumin levels in healthy human urine: Effect of pepper on curcumin bioavailability. *Food Sci Nutr* 11:7732–7741. <https://doi.org/10.1002/FSN3.3691>
- Kim H, Xue X (2020) Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *JoVE (Journal Vis Exp)* 2020:e60682. <https://doi.org/10.3791/60682>
- Kuo YC, Yen MH, De S, et al (2023) Optimized lipopolymers with curcumin to enhance AZD5582 and GDC0152 activity and downregulate inhibitors of apoptosis proteins in glioblastoma multiforme. *Biomater Adv* 154:. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2023.213639>
- Lan X, Jörg DJ, Cavalli FMG, et al (2017) Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nat* 2017 5497671 549:227–232. <https://doi.org/10.1038/nature23666>
- Li F, Xu Y, Li X, et al (2021) Triblock copolymer nanomicelles loaded with curcumin attenuates inflammation via inhibiting the nf- κ b pathway in the rat model of cerebral ischemia. *Int J Nanomedicine* 16:3173–3183. <https://doi.org/10.2147/IJN.S300379>
- Li P, Pu S, Lin C, et al (2022) Curcumin selectively induces colon cancer cell apoptosis and S cell cycle arrest by regulates Rb/E2F/p53 pathway. *J Mol Struct* 1263:133180. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2022.133180>
- Liu C, Rokavec M, Huang Z, Hermeking H (2023) Curcumin activates a ROS/KEAP1/NRF2/miR-34a/b/c cascade to suppress colorectal cancer metastasis. *Cell Death Differ* 30:1771–1785. <https://doi.org/10.1038/S41418-023-01178-1>
- Longchamps RJ, Castellani CA, Yang SY, et al (2020) Evaluation of mitochondrial DNA copy number estimation techniques. *PLoS One* 15:e0228166. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0228166>
- Maiti P, Scott J, Sengupta D, et al (2019) Curcumin and Solid Lipid Curcumin Particles Induce Autophagy, but Inhibit Mitophagy and the PI3K-Akt/mTOR Pathway in Cultured Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/IJMS20020399>

- Martinotti S, Ranzato E (2019) Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol* 2109:225–229. https://doi.org/10.1007/7651_2019_259
- Mbese Z, Khwaza V, Aderibigbe BA (2019) Curcumin and Its Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Prostate, Colon and Breast Cancers. *Mol* 2019, Vol 24, Page 4386 24:4386. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234386>
- Mitchell K, Troike K, Silver DJ, Lathia JD (2021) The evolution of the cancer stem cell state in glioblastoma: emerging insights into the next generation of functional interactions. *Neuro Oncol* 23:199–213. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAA259>
- Mo F, Pellerino A, Soffietti R, Rudà R (2021) Blood–Brain Barrier in Brain Tumors: Biology and Clinical Relevance. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 12654 22:12654. <https://doi.org/10.3390/IJMS222312654>
- Mobahat M, Sadroddiny E, Nooshabadi VT, et al (2023) Curcumin-loaded human endometrial stem cells derived exosomes as an effective carrier to suppress alpha-synuclein aggregates in 6OHDA-induced Parkinson's disease mouse model. *Cell Tissue Bank* 24:75–91. <https://doi.org/10.1007/S10561-022-10008-6/METRICS>
- Mohamadian M, Ahmadi SS, Bahrami A, Ferns GA (2022) Review on the Therapeutic Potential of Curcumin and its Derivatives on Glioma Biology. *Neurochem Res* 2022 4710 47:2936–2953. <https://doi.org/10.1007/S11064-022-03666-1>
- Mohammadian Haftcheshmeh S, Khosrojerdi A, Aliabadi A, et al (2020) Immunomodulatory Effects of Curcumin in Rheumatoid Arthritis: Evidence from Molecular Mechanisms to Clinical Outcomes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 179:1–29. https://doi.org/10.1007/112_2020_54
- Moriyuki K, Sekiguchi F, Matsubara K, et al (2010) Curcumin Inhibits the Proteinase-Activated Receptor-2–Triggered Prostaglandin E2 Production by Suppressing Cyclooxygenase-2 Upregulation and Akt-Dependent Activation of Nuclear Factor- κ B in Human Lung Epithelial Cells. *J Pharmacol Sci* 114:225–229. <https://doi.org/10.1254/JPHS.10126SC>
- Mousavi SM, Hosseindoost S, Mahdian SMA, et al (2023) Exosomes released from U87 glioma cells treated with curcumin and/or temozolomide produce apoptosis in naive U87 cells. *Pathol - Res Pract* 245:154427.

<https://doi.org/10.1016/J.PRP.2023.154427>

Mukherjee S, Fried A, Hussaini R, et al (2018) Phytosomal curcumin causes natural killer cell-dependent repolarization of glioblastoma (GBM) tumor-associated microglia/macrophages and elimination of GBM and GBM stem cells. *J Exp Clin Cancer Res* 37:. <https://doi.org/10.1186/S13046-018-0792-5>

Najjar A, Karaman R (2019) The prodrug approach in the era of drug design. *Expert Opin Drug Deliv* 16:1–5. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1553954>

Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, et al (2021) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro Oncol* 23:iii1–iii105. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB200>

Palermo R, Ghirga F, Piccioni MG, et al (2019) Natural Products Inspired Modulators of Cancer Stem Cells-specific Signaling Pathways Notch and Hedgehog. *Curr Pharm Des* 24:4251–4269. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190111124822>

Papale M, Buccarelli M, Mollinari C, et al (2020) Hypoxia, Inflammation and Necrosis as Determinants of Glioblastoma Cancer Stem Cells Progression. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 2660 21:2660. <https://doi.org/10.3390/IJMS21082660>

Pasqualetti F, Miniati M, Gonnelli A, et al (2023) Cancer Stem Cells and Glioblastoma: Time for Innovative Biomarkers of Radio-Resistance? *Biol* 2023, Vol 12, Page 1295 12:1295. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12101295>

Pellerino A, Caccese M, Padovan M, et al (2022) Epidemiology, risk factors, and prognostic factors of gliomas. *Clin Transl Imaging* 10:467–475. <https://doi.org/10.1007/S40336-022-00489-6/METRICS>

Peter AE, Sandeep B V., Rao BG, Kalpana VL (2021) Calming the Storm: Natural Immunosuppressants as Adjuvants to Target the Cytokine Storm in COVID-19. *Front Pharmacol* 11:583777. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.583777/BIBTEX>

Prager BC, Bhargava S, Mahadev V, et al (2020) Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends in Cancer* 6:223–235. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2020.01.009>

- Rainey NE, Moustapha A, Petit PX (2020) Curcumin, a Multifaceted Hormetic Agent, Mediates an Intricate Crosstalk between Mitochondrial Turnover, Autophagy, and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2020:3656419. <https://doi.org/10.1155/2020/3656419>
- Razali NSC, Lam KW, Rajab NF, et al (2024) Curcumin piperidone derivatives induce caspase-dependent apoptosis and suppress miRNA-21 expression in LN-18 human glioblastoma cells. *Genes Environ Off J Japanese Environ Mutagen Soc* 46:. <https://doi.org/10.1186/S41021-023-00297-Y>
- Rodrigues FC, Kumar NA, Thakur G (2021) The potency of heterocyclic curcumin analogues: An evidence-based review. *Pharmacol Res* 166:105489. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2021.105489>
- Ros M, Riesco-Llach G, Polonio-Alcalá E, et al (2024) Inhibition of Cancer Stem-like Cells by Curcumin and Other Polyphenol Derivatives in MDA-MB-231 TNBC Cells. *Int J Mol Sci* 25:7446. <https://doi.org/10.3390/IJMS25137446/S1>
- Saeed MEM, Yücer R, Dawood M, et al (2022) In Silico and In Vitro Screening of 50 Curcumin Compounds as EGFR and NF- κ B Inhibitors. *Int J Mol Sci* 23:3966. <https://doi.org/10.3390/IJMS23073966/S1>
- Sahebkar A, Zahedi M, Izadi HS, et al (2023) The effect of curcumin on hypoxia in the tumour microenvironment as a regulatory factor in cancer. *Arch Med Sci* 19:1616–1629. <https://doi.org/10.5114/aoms/171122>
- Sahoo BM, Banik BK, Borah P, Jain A (2022) Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 22:215–222. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210608095512>
- Salehi B, Rodrigues CF, Peron G, et al (2021) Curcumin nanoformulations for antimicrobial and wound healing purposes. *Phyther Res* 35:2487–2499. <https://doi.org/10.1002/PTR.6976>
- Sandhiutami NMD, Arozal W, Louisa M, et al (2021) Curcumin Nanoparticle Enhances the Anticancer Effect of Cisplatin by Inhibiting PI3K/AKT and JAK/STAT3 Pathway in Rat Ovarian Carcinoma Induced by DMBA. *Front Pharmacol* 11:603235. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.603235/BIBTEX>

- Sanuelly Da Paz Martins A, de Cerqueira Alves M, Roberto Pimentel De Araújo O, et al (2023) Curcumin in inflammatory bowel diseases: Cellular targets and molecular mechanisms. *Biocell* 47:2547–2566. <https://doi.org/10.32604/BIOCELL.2023.043253>
- Schulze J, Schöne L, Ayoub AM, et al (2023) Modern Photodynamic Glioblastoma Therapy Using Curcumin- or Parietin-Loaded Lipid Nanoparticles in a CAM Model Study. *ACS Appl Bio Mater* 6:5502–5514. https://doi.org/10.1021/ACSABM.3C00695/SUPPL_FILE/MT3C00695_SI_001.PDF
- Schwarz K, Dobiasch S, Nguyen L, et al (2020) Modification of radiosensitivity by Curcumin in human pancreatic cancer cell lines. *Sci Reports* 2020 10:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60765-1>
- Seriner R, Dağlıoğlu K, Coşkun G, Bilgin R (2022) Examination of the effect of curcumin in experimental liver damage created by diethylnitrosamine in Swiss albino mice to superoxide dismutase and catalase activities and glutathione, malondialdehyde, and advanced oxidation protein products levels. *Biotechnol Appl Biochem* 69:1217–1225. <https://doi.org/10.1002/BAB.2198>
- Shin HJ, Lee S, Jung HJ (2019) A curcumin derivative hydrazinobenzoylcurcumin suppresses stem-like features of glioblastoma cells by targeting Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Cell Biochem* 120:6741–6752. <https://doi.org/10.1002/JCB.27972>
- Singh L, Sharma S, Xu S, et al (2021a) Curcumin as a Natural Remedy for Atherosclerosis: A Pharmacological Review. *Mol* 2021, Vol 26, Page 4036 26:4036. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26134036>
- Singh N, Miner A, Hennis L, Mittal S (2021b) Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist* 4:17. <https://doi.org/10.20517/CDR.2020.79>
- Sohn SI, Priya A, Balasubramaniam B, et al (2021) Biomedical applications and bioavailability of curcumin—an updated overview. *Pharmaceutics* 13:2102. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13122102/S1>
- Soukhtanloo M, Mohtashami E, Maghrouni A, et al (2020) Natural products as

- promising targets in glioblastoma multiforme: a focus on NF- κ B signaling pathway. *Pharmacol Reports* 72:285–295. <https://doi.org/10.1007/S43440-020-00081-7/METRICS>
- Su RY, Hsueh SC, Chen CY, et al (2021) Demethoxycurcumin Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of Human Brain Glioblastoma Multiforme GBM 8401 Cells via PI3K/Akt Pathway. *Anticancer Res* 41:1859–1870. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.14952>
- Su SC, Hsin CH, Lu YT, et al (2023) EF-24, a Curcumin Analog, Inhibits Cancer Cell Invasion in Human Nasopharyngeal Carcinoma through Transcriptional Suppression of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression. *Cancers (Basel)* 15:1552. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15051552/S1>
- Sun J, Xing J, Tan R, et al (2023) [Curcumol reverses temozolomide resistance in glioma cells by regulating the UTX/MGMT axis]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 43:1697–1705. <https://doi.org/10.12122/J.ISSN.1673-4254.2023.10.07>
- Tan AC, Ashley DM, López GY, et al (2020) Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin* 70:299–312. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21613>
- Tang X, Zuo C, Fang P, et al (2021) Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. *Front Oncol* 11:701291. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.701291/BIBTEX>
- Termini D, Den Hartogh DJ, Jaglanian A, Tsiani E (2020) Curcumin against Prostate Cancer: Current Evidence. *Biomol* 2020, Vol 10, Page 1536 10:1536. <https://doi.org/10.3390/BIOM10111536>
- Tinku, Shaikh SA, Priyadarsini IK, Choudhary S (2024) Inhibition of α -Synuclein fibrillation by curcumin and difluoro boron derivatized curcumin complexes in aqueous environment. *J Mol Liq* 405:125063. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2024.125063>
- Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X (2019) A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 1033 20:1033. <https://doi.org/10.3390/IJMS20051033>

- Trigo- gutierrez JK, Vega- chacón Y, Soares AB, Mima EG de O (2021) Antimicrobial Activity of Curcumin in Nanoformulations: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 7130 22:7130. <https://doi.org/10.3390/IJMS22137130>
- Ude A, Afi-Leslie K, Okeke K, et al (2022) Trypan Blue Exclusion Assay, Neutral Red, Acridine Orange and Propidium Iodide. *Cytotox - Underst Cell Damage Response*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.105699>
- Urošević M, Nikolić L, Gajić I, et al (2022) Curcumin: Biological Activities and Modern Pharmaceutical Forms. *Antibiot* 2022, Vol 11, Page 135 11:135. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11020135>
- Walker BC, Adhikari S, Mittal S (2021) Therapeutic Potential of Curcumin for the Treatment of Malignant Gliomas. *Gliomas* 139–150. <https://doi.org/10.36255/EXONPUBLICATIONS.GLIOMAS.2021.CHAPTER8>
- Wang H, Xu Y, Sun J, Sui Z (2021a) The Novel Curcumin Derivative 1g Induces Mitochondrial and ER-Stress-Dependent Apoptosis in Colon Cancer Cells by Induction of ROS Production. *Front Oncol* 11:644197. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.644197/BIBTEX>
- Wang H, Zhang K, Liu J, et al (2021b) Curcumin Regulates Cancer Progression: Focus on ncRNAs and Molecular Signaling Pathways. *Front Oncol* 11:660712. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.660712/BIBTEX>
- Wang TY, Chen JX (2019) Effects of Curcumin on Vessel Formation Insight into the Pro- and Antiangiogenesis of Curcumin. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2019:1390795. <https://doi.org/10.1155/2019/1390795>
- Wang Y, Lu J, Jiang B, Guo J (2020) The roles of curcumin in regulating the tumor immunosuppressive microenvironment (Review). *Oncol Lett* 19:3059–3070. <https://doi.org/10.3892/OL.2020.11437/HTML>
- Wray R, Iscla I, Blount P (2021) Curcumin activation of a bacterial mechanosensitive channel underlies its membrane permeability and adjuvant properties. *PLOS Pathog* 17:e1010198. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1010198>
- Wu MF, Huang YH, Chiu LY, et al (2022) Curcumin Induces Apoptosis of Chemoresistant Lung Cancer Cells via ROS-Regulated p38 MAPK

- Phosphorylation. *Int J Mol Sci* 2022, Vol 23, Page 8248 23:8248.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23158248>
- Ye Z, Chen D, Zheng R, et al (2021) Curcumin induced G2/M cycle arrest in SK-N-SH neuroblastoma cells through the ROS-mediated p53 signaling pathway. *J Food Biochem* 45:e13888. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13888>
- Yin H, Zhou Y, Wen C, et al (2014) Curcumin sensitizes glioblastoma to temozolomide by simultaneously generating ROS and disrupting AKT/mTOR signaling. *Oncol Rep* 32:1610–1616. <https://doi.org/10.3892/OR.2014.3342/HTML>
- Yuan F, Zhang S, Sun Q, et al (2022) Hsa_circ_0072309 enhances autophagy and TMZ sensitivity in glioblastoma. *CNS Neurosci Ther* 28:897–912.
<https://doi.org/10.1111/CNS.13821>
- Zhang L, Qiu L, Xu S, et al (2023) Curcumin induces mitophagy by promoting mitochondrial succinate dehydrogenase activity and sensitizes human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells to radioiodine treatment. *Toxicol Vitro* 93:105669.
<https://doi.org/10.1016/J.TIV.2023.105669>
- Zhou H, Ning Y, Zeng G, et al (2021) Curcumin promotes cell cycle arrest and apoptosis of acute myeloid leukemia cells by inactivating AKT. *Oncol Rep* 45:.
<https://doi.org/10.3892/OR.2021.7962>
- Zoi V, Galani V, Lianos GD, et al (2021a) The Role of Curcumin in Cancer Treatment. *Biomed* 2021, Vol 9, Page 1086 9:1086.
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9091086>
- Zoi V, Galani V, Vartholomatos E, et al (2021b) Curcumin and Radiotherapy Exert Synergistic Anti-Glioma Effect In Vitro. *Biomedicines* 9:.
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9111562>

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KURKUMİN VE ÖZGÜN KURKUMİN ANALOGLARININ GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

ORJİNALLIK RAPORU

%7

BENZERLİK ENDEKSİ

%6

İNTERNET KAYNAKLARI

%5

YAYINLAR

%3

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%2

2

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%1

3

Türkkan, Özge. "Sambucus Nigra L. Türünün
in Vitro Yara İyileştirici Etkisinin
Değerlendirilmesi", Marmara Üniversitesi
(Turkey), 2023

Yayın

<%1

4

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

5

Submitted to (school name not available)

Öğrenci Ödevi

<%1

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%1

7

www.ncbi.nlm.nih.gov

İnternet Kaynağı

<%1