T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KURKUMİN VE YENİ NESİL ULTRASOL KURKUMİNİN NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTI (N1E-115) ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

SONGÜL YENİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET YABAŞ

EDİRNE-2022

SONGÜL YENİ'nin hazırladığı "**KURKUMİN VE YENİ NESİL ULTRASOL KURKUMİNİN NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTI (N1E-115) ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ	……
Üye: Prof. Dr. Suat ERDOĞAN	……
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ	……

Tez Savunma Tarihi: 25/11/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

25/11/2022
Songül YENİ

Yüksek Lisans Tezi

Kurkumin ve Yeni Nesil Ultrasol Kurkuminin Nöroblastoma Hücre Hattı (N1E-115) Üzerine Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Çocukluk çağı kanseri nöroblastoma, sempatik sinir sistemi hücrelerinde ortaya çıkan solid bir tümördür ve çocuklarda görülen kanser türlerinin yaklaşık %6-7'sini oluşturmaktadır. Nöroblastoma gelişiminde hücre içi ve hücre dışı birçok protein ve sinyal yolağı rol oynamaktadır. Nöroblastoma tedavisinde kullanılan konvansiyonel kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahalelere ek olarak son yıllarda immünoterapi ve protein hedefli tedavi yöntemleri de uygulanmaktadır. Bu yöntemlere ilave olarak özellikle tedavi sonrasında ortaya çıkabilecek yan etkileri azaltmak için bitkisel kaynaklı uygulamalar da önemli bir çalışma alanı olmuştur. Kurkumin zerdeçaldan elde edilen ve anti-inflamatuar, antibiyotik, anti-diyabetik ve anti-kanser özellikleri tanımlanmış bitkisel bir bileşiktir. Yapılan çalışmalar kurkuminin transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, inflamatuar mediyatörleri ve sitokinleri, hücre döngüsü proteinleri, enzimleri, protein kinazları ve apoptotik proteinleri dahil birçok biyolojik hedefleri ve hücresel yolakları etkileyebilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Fakat düşük çözünürlük ve emilim gibi dezavantajlara sahip olmak ile birlikte, bu eksikliklerin giderilmesi için çeşitli formülasyonlar geliştirilmektedir. Yakın zamanda geliştirilen bu bileşiklerden olan yeni nesil ultrasol kurkuminin (next generation ultrasol curcumin, NGUC), rat plazmasında kurkumine göre yaklaşık olarak 65 kat daha fazla bulunduğu raporlanmış ve bundan dolayı daha etkili olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada sahip olduğu avantajlarından dolayı NGUC'un N1E-115 nöroblastoma hücreleri üzerine etkileri kurkumin ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* araştırılmıştır. N1E-115 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda kurkumin ve NGUC uygulanmış ve hücrelerin proliferasyonu MTT testi ile belirlenmiştir. 48 saatlik madde uygulamasından sonra elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 200, 100 ve 50 μM kurkumin uygulamalarının N1E-115 hücrelerinin canlılığını yaklaşık olarak %50 oranında azalttığı gözlemlenmiştir. 25 μM konsantrasyondaki kurkumin uygulamasının N1E-115 hücrelerinin canlılığını %40 oranında azalttığı bulunmuştur. Benzer şekilde, 200 μM NGUC uygulaması hücre canlılığını yaklaşık olarak %45 oranında azaltırken, 100 μM NGUC uygulaması hücre canlılığını %33'lük bir oranda azaltmıştır. Flow sitometrik analizler, düşük konsantrasyonlardaki kurkuminin N1E-115 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini gösterirken, daha yüksek konsantrasyonlardaki NGUC apoptozu tetiklemiştir. Kurkumin uygulanan gruptaki saf kurkumin oranı %95 ve NGUC içerisinde %20 oranında kurkumin bulunduğundan, saf kurkuminoid oranı (95/20) açısından 4,75 kat fark bulunmaktadır. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar bu bağlamda değerlendirildiğinde NGUC'un kurkumine oranla daha iyi bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan mekanistik analizler kurkumin ve NGUC'un N1E-115 hücrelerinde hücre döngüsünde, NFκB ve apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan proteinleri kodlayan bazı genlerin mRNA ekspresyonları üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkilerinin olmadığını ortaya koymuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, kurkumin ve NGUC'un N1E-115 nöroblastoma hücrelerinin üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiş, her iki maddenin de hücreler üzerinde farklı konsantrasyonlarda sitotoksik bir etkiye sahip olduğu literatürde ilk kez gösterilmiştir. Her ne kadar yapılan mekanistik analizler tam olarak bir sinyal yolağı üzerine etkisini net olarak ortaya koyamasa da sonuçlar her iki maddenin hücrelerde apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Gelecekte yapılacak hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, kurkumin ve NGUC'un nöroblastoma hastalarında konvansiyonel tedavi yöntemlerine ilave olarak yan etkileri azaltabilecek doğal bir bileşik olarak kullanılabilirliğini ortaya koyacaktır.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 91

Anahtar Kelimeler : Nöroblastoma, Kurkumin, NGUC, Apoptoz, Kanser

Master Thesis

Comparative Investigation of the Effects of Curcumin and New Generation Ultrasol Curcumin on a Neuroblastoma Cell Line (N1E-115)

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Neuroblastoma is a type of solid tumors in childhood arising from the cells of the sympathetic nervous system and constitutes approximately 6-7% of the cancer types observed in children. Many intracellular and extracellular proteins and signaling pathways play a critical role in the development of neuroblastoma. In addition to conventional chemotherapy, radiotherapy and surgery used for the treatment of neuroblastoma, immunotherapy and protein-targeted treatment approach have been applied in recent years. Besides these methods, natural substances have also been subject to many studies specially to reduce the side effects that may occur after conventional treatments. Curcumin is a natural compound derived from turmeric and has anti-inflammatory, antibiotic, anti-diabetic and anti-cancer properties. Studies have shown that curcumin has the potential to affect many biological targets and cellular pathways, including transcription factors, growth factors, inflammatory mediators and cytokines, cell cycle proteins, enzymes, protein kinases and apoptotic proteins. However, curcumin has some disadvantages such as low solubility, bioavailability and absorption, thus different formulations are being developed to overcome these problems. A study has recently reported that the new generation ultrasol curcumin (NGUC), which is one of these recently developed compounds, is found to be approximately 65 times more

bioavailable in rat plasma than curcumin, suggesting that NGUC may be more effective than curcumin.

In this study, therefore, the effects of NGUC and curcumin on N1E-115 neuroblastoma cells were comparatively investigated *in vitro*. N1E-115 cells were treated with different concentrations of curcumin and NGUC and the proliferation of cells was determined by MTT assay. Our findings revealed that after 48h incubation period the treatment of N1E-115 cells with 200, 100 and 50 μM curcumin reduced cell viability by approximately %50 compared to control cells. Moreover, curcumin administration at a concentration of 25 μM caused 40% reduction in the viability of N1E-115 cells. Similarly, while 200 μM NGUC administration caused approximately %45 reduction in the cell viability, 100 μM NGUC treatment caused %33 reduction. Flow cytometric analysis of cells treated with curcumin and NGUC showed that while low concentrations of curcumin induced apoptosis in N1E-115 cells, higher concentrations of NGUC were required to induce apoptosis. Given that the rate of pure curcumin is 95% in the curcumin-administered group and 20% in NGUC, there is a 4.75-fold difference in pure curcumin ratio (95/20) between NGUC and curcumin. When the results of this study are evaluated in this context, NGUC can be suggested to have a better effect than curcumin. The further analysis by qPCR revealed that curcumin and NGUC did not have statistically significant effects on mRNA expression of genes encoding proteins involved in cell cycle, NFκB pathway and apoptosis in N1E-115 cells.

In conclusion, in this thesis, the effects of curcumin and NGUC on N1E-115 neuroblastoma cells were examined comparatively, and our results demonstrate for the first time that both substances have a cytotoxic effect on cells at different concentrations. Although the mechanistic analysis could not clearly reveal any effects on a specific signaling pathway, the results showed that both substances triggered apoptosis, leading to cell death. Further research is needed to reveal the use of curcumin and NGUC as a natural compound that can reduce side effects of conventional treatment methods in neuroblastoma patients.

Year : 2022

Number of Pages : 91

Keywords : Neuroblastoma, Curcumin, NGUC, Apoptosis, Cancer

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinden tezin son aşamasına gelene kadar bana yol gösteren, yoğun temposu arasında değerli vaktini ayırarak destek ve yardımlarını esirgemeyen, üniversiteye başladığım günden beri tecrübeleriyle ışık tutan, yüksek lisans tezim boyunca karşılaştığım gerek hayat konusunda gerekse deneyler konusunda beni her zaman destekleyen, bir elini sürekli omuzumda hissettiğim Tez Danışmanım Saygıdeğer Hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ'a,

Laboratuvar çalışmalarımın başlangıcından sonuna kadar gerek planlamada gerekse motivasyonum düştüğünde bana destek veren ve yardımlarını esirgemeyen, deneylerime başladığımda bir acemi iken bilgilerini bana öğreterek iyi bir deneyim kazanmamı sağlayan ve laboratuvardaki deneylerde gözü kapalı bana güvenen Öğr. Gör. Dr. Ayten BOSTANCI'ya,

Yüksek lisansımın başından sonuna kadar yanımda olan ve desteğini her an hissettiğim çalışma arkadaşım Hilal SAMAST'a,

Deneylerim boyunca her an ve her konuda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yalçın KAYA'ya, Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ'ye, Öğr. Gör. Emrah AKPINAR'a, Arş. Gör. Burak TATLISES'e ve tez süresince desteklerini hissettiğim ve keyifli vakitler geçirmemi sağlayan Genetik ve Biyomühendislik bölümü tüm yüksek lisans öğrencilerine, bu çalışmada kullanılan kurkumin ve NGUC'u bize temin eden Prof. Dr. Kazım ŞAHİN (Fırat Üniversitesi) ve Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya (Fırat Üniversitesi),

Bu tez çalışmasını 2021/28 proje numarası ile destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) Birimi'ne,

Beni bu günlere getiren ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vii

TEŞEKKÜR x

SİMGELER DİZİNİ xiv

KISALTMALAR DİZİNİ xvi

ŞEKİLLER DİZİNİ xix

ÇİZELGELER DİZİNİ xxi

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

BÖLÜM 2 4

GENEL BİLGİLER 4

2.1. Kanser 4

2.1.1. Kanserin Tanımı 4

2.1.2. Kanserin Nedenleri 6

2.1.3. Kanser Oluşumunda Rol Oynayan Gen Grupları 7

2.1.4. Dünyada ve Türkiye'de Kanser Epidemiyolojisi 11

2.1.5. Çocukluk Çağı Kanserleri 13

2.1.6. Nöroblastoma 14

2.1.6.1. Moleküler Patogenez 16

2.1.6.2. Tedavi Yöntemlerine Genel Bakış 17

2.2. Kurkumin 18
2.2.1. Yapısı 18
2.2.2. Etkileri 21
2.2.3. Potansiyel Etki Mekanizmaları 22
2.2.4. Kurkumin ve Nöroblastoma 24
BÖLÜM 3 27
MATERYAL VE METOT 27
3.1. Materyal 27
3.1.1. Hücre Hattı 27
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar 27
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler 28
3.2. Metot 29
3.2.1. Hücre Kültürü 29
3.2.2. NGUC'un Hazırlanışı ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması 30
3.2.3. MTT Yöntemi ile Canlılık Tayini 30
3.2.4. Flow Sitometri ile Apoptotik Hücrelerin Tayini 31
3.2.5. Revers-Transkriptaz PCR 32
3.2.5.1. Total RNA İzolasyon Prosedürü 33
3.2.5.2. cDNA Sentezi 34
3.2.5.3. Gerçek Zamanlı PCR 35
3.2.6. İstatistiksel Analiz 39
BÖLÜM 4 40
BULGULAR 40
4.1. Kurkumin ve NGUC Uygulaması N1E-115 Hücrelerinin Proliferasyonlarını Azaltır 40
4.2. Kurkumin ve NGUC Uygulaması N1E-115 Hücrelerinde Apoptozu Uyarır 43

4.3. Kurkumin ve NGUC Uygulamasının N1E-115 Hücrelerinde Hücre Döngüsü, NFκB ve Apoptoz Yolaklarında Rol Oynayan Genlerin mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkisi 50

BÖLÜM 5 52

TARTIŞMA 52

KAYNAKLAR 58

ÖZGEÇMİŞ 69

SİMGELER DİZİNİ

α	:	Alfa
As	:	Arsenik
Cu	:	Bakır
β	:	Beta
Hg	:	Cıva
dk	:	Dakika
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
Δ	:	Delta
Cd	:	Kadminyum
CO_2	:	Karbondioksit
Cr	:	Krom
Pb	:	Kurşun
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
mg	:	Miligram
mg/kg	:	Miligram/kilogram
ml	:	Mililitre
µg/ml	:	Mililitre başına düşen mikrogram
nM	:	Nanometre
sn	:	Saniye
°C	:	Santigrat derece
cm^2	:	Santimetre kare

U/gün : Unit/gün

KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	:	Serin/treonin protein kinaz B
AP-1	:	Aktivatör protein-1
Bax	:	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	:	B hücreli lenfoma-2
Bcl-xl	:	B-cell lymphoma-extra large
cDNA	:	Komplementer DNA
CHD5	:	Kromodomain-helikaz-DNA bağlayıcı protein 5
COX-2	:	Cyclooxygenase-2
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DMEM	:	Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium
dNTP	:	Deoksi-Nükleotit trifosfat
DPBS	:	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECM	:	Hücre dışı matriks
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
ELAM-1	:	Endotelyal lökosit yapışma molekülü-1
EMT	:	Epitel mezenkimal geçiş
Erk	:	Extracellular signaling regulated kinase
F Primer	:	Forward primer
F12	:	Ham's F-12 Nutrient Mixture
FBS	:	Fetal bovin serum
GTP	:	Guanozin trifosfat
IC50	:	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
ICAM-1	:	Hücre içi adhezyon molekülü-1
IKKα/β	:	IκB kinaz α/β

IL-1β	:	İnterlökin 1 beta
IL-6	:	İnterlökin-6
K-Ras	:	Kirsten sıçan sarkom virüsü
M.Ö.	:	Milattan önce
MCP-1	:	Monosit kemoatraktan protein-1
MMP-3	:	Matriks metalloproteinaz-3
MMP-9	:	Matriks metalloproteinaz-9
mRNA	:	Mesajcı ribonükleik asit
MRP	:	Çoklu ilaca dirençle ilgili protein
mTOR	:	Mechanistic target of rapamycin kinase
MTT	:	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MYCN	:	Temel sarmal döngü sarmal proteini 37
NFκB	:	Nüklear faktör kappa b
N1E-115	:	Fare nöroblastoma hücre hattı
NGUC	:	Yeni nesil ultrasol kurkumin
P21	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1
P27	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27 kip1
P53	:	Tümör baskılayıcı protein 53
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
Ph Kromozomu	:	Philadelphia kromozomu
PI	:	Propidyum iyodür
PI3K	:	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PS	:	Fosfotidilserin
PTEN	:	Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
R primer	:	Reverse primer
RB1	:	Retinoblastoma 1 geni
RNA	:	Ribonükleik asit
RSV	:	Respiratuar sinsisyal virüs
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
STAT3	:	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör alfa

TÜTAGEM	:	Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi
VCAM-1	:	Vasküler yapışma molekülü-1
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bir Kanser Hücresinin Gelişimi 5
Şekil 2.2. Proto-onkogen aktivasyonuna yol açan farklı mutasyon mekanizmaları ..…..8
Şekil 2.3. 2019 yılında dünya çapında, 70 yaşından küçük ölümlerin nedeni olarak kanserin ülkelere göre sıralaması……...….12
Şekil 2.4. Dünya çapında yaygın olarak görülen ilk 10 kanser türü……...12
Şekil 2.5. 2020 yılında Türkiye genelinde görülen en yaygın 10 kanser türü……..…...13
Şekil 2.6. 0-14 yaş arası çocuklarda görülen kanserlerin yüzde dağılımları……...14
Şekil 2.7. Rozet yapısını oluşturmuş nöroblastoma hücreleri…..……...16
Şekil 2.8. Kurkuminoidlerin yapısı..…….……..19
Şekil 2.9. Kurkuminin farmasötik ve biyoaktif özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar..20
Şekil 3.1. MTT testinde kullanılan plakaların 48 saatlik inkübasyon sonrası görüntüleri31
Şekil 3.2. Kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra hücrelerin Picoreal cihazında elde edilen amplifikasyon görüntüsü…….……..39
Şekil 4.1. Kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinin canlılıkları……42
Şekil 4.2. N1E-115 hücrelerine uygulanan kurkumin ve NGUC'un IC50 değerleri…..43
Şekil 4.3. Düşük konsantrasyonlardaki kurkumin N1E-115 hücrelerinde apoptozu tetiklerken, daha yüksek konsantrasyonlardaki NGUC apoptozu tetiklemek için gereklidir……..45
Şekil 4.4. Kurkumin uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için kapılama stratejileri ve her bir örnek için analizin ayrı ayrı gösterilmesi…..46
Şekil 4.5. NGUC uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için kapılama stratejileri ve her bir örnek için analizin ayrı ayrı gösterilmesi…...48

Şekil 4.6. Kurkumin ve NGUC uygulamasının N1E-115 hücrelerinde hücre döngüsünde, NFκB ve apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan genlerin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. RNA miktarları ve saflıkları……...33
Çizelge 3.2. cDNA mix protokolü/PCR mix bileşenleri…….34
Çizelge 3.3. PCR koşulları……..……..…35
Çizelge 3.4. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri..……..……36
Çizelge 3.5. Real time PCR mix bileşenleri……38
Çizelge 4.1. Kurkumin ve NGUC uygulamasından 48 saat sonra N1E-115 hücrelerinde canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesi……...47

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kanser, yaşamımızda yaygın bir şekilde karşılaştığımız hastalıklardan biridir. Kalıtılan genlerdeki mutasyonlar ve yaşam kalitesi ve biçimine bağlı olarak maruz kalınan çevresel faktörlerin sebep olduğu diğer kromozomal değişimler kanser oluşum riskini artırmaktadır. Kanser oluşumda DNA tamir mekanizmalarında rol oynayan genler, hücre döngüsü düzenleyicileri ve apoptoz yolağındaki proteinleri kodlayan genler gibi birçok gen grubu önemli rol oynamaktadır (Park & Han, 2019). Mutasyonların birikmesi ve DNA tamir mekanizmalarının işlevini yerine getirmemesi sonucunda tümör hücresi adı verilen kontrolsüz çoğalan hücreler oluşmaktadır (Yokuş & Çakır, 2012).

Dünyada ölüm nedenlerine bakıldığında kanser, ikinci sırada yer almaktadır (Yıldırım Öztürk & Uyar, 2021) ve her yıl yaklaşık 10 milyon insan kanser nedeni ile yaşamını kaybetmektedir (Özdoğan, 2021). Kanserlerin yaklaşık %0,5-4,6'sı çocukluk çağı kanserleridir ve 18 yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir. Her yıl üç binden fazla çocuğa kanser tanısı konulmaktadır (Muslu & Kolutek, 2018). Çocuklarda, lösemi başta olmak üzere beyin ve omurilik tümörleri, lenfoma ve nöroblastoma gibi kanserlere, diğer kanser türlerine göre daha sık rastlanılmaktadır (Yılmaz Bal, 2000). Teknolojinin gelişmesi ve buna bağlı olarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesiyle çocuklarda görülen kanserlerdeki iyileşme oranı %80'in üzerindedir (Vural & Karaman, 2014).

Nöroblastoma, sinir hücresi kaynaklı bir kanser türüdür ve hızlı yayılım göstermektedir (Zhai, Brockmuller, Kubatka, Shakibaei & Busselberg, 2020). Embriyonik ve fetüs döneminde sinir hücrelerinde meydana gelen hasarlar sonucu nöroblastoma görülebilmektedir (Rad, 2022). Bu nedenle bebeklerde ve beş yaş altı çocuklarda sıkça tespit edilmektedir ("Neuroblastoma - Childhood: Introduction," 2021). Çocuklarda görülen kanserlerin %6-7'sini kapsamaktadır (Nakagawara vd., 2018). Nöroblastoma moleküler düzeyde, 1p36 delesyonu gibi kromozomal kayıplar ve 17p insersiyonu gibi kromozomal kazanımlar sonucu ortaya çıkabilmektedir (Van Roy vd., 2009). Kemoterapi ve radyasyon tedavisi gibi yöntemlerle nöroblastoma hastaları iyileştirilmektedir (Zafar vd., 2021). Kullanılan bu tedavi yöntemlerinin hastayı iyileştirebildiği raporlanmıştır ancak bazı yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca kemoterapi tedavisi gören hastalarda kemoterapötik ilaçlara karşı direnç oluşması gözlemlenmiştir (Colon & Chung, 2011). Dolayısıyla bilim insanları alternatif tedavi yöntemleri geliştirmiş ve bu tedavilerin yanı sıra immünoterapi, retinoik asit ve mTOR inhibitörleri gibi hedefe özgü terapötik yöntemler de geliştirilmiştir (Colon & Chung, 2011). Ayrıca son zamanlarda, bitki ekstraktlarından elde edilen etken maddeler ve/veya yardımcı maddeler uygun şekilde formülüze edilmiş ve kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel ilaçların dezavantajlarını ve yan etkilerini azaltmak amacıyla birçok çalışmaya konu olmuştur.

Zerdeçal, yüz yıllardır sadece bitkisel bir besin olarak değil aynı zamanda anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar ve anti-kanser olarak ayurveda tıbbında da kullanılan bir bitkidir (Arun & Nalini, 2002). Kurkumin, demethoxycurcumin ve bisdemethoxycurcumin gibi kurkuminoidler olarak adlandırılan biyoaktif polifenolik bileşikler zerdeçalın içerisinde bulunan ve tıbbi tedavide başarılı sonuçlar veren bileşiklerdir (Hewlings & Kalman, 2017). Bunların içerisinden kurkuminin birçok hastalığa karşı olumlu etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak ortaya konmuştur (Kotha & Luthria, 2019). Yapılan birçok çalışmada kurkuminin anti-kanser, antibiyotik, anti-diyabetik, anti-inflamatuar ve yaşlanma karşıtı bir ajan olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Zhai vd., 2020). Kurkumin bazı metal iyonlarıyla kompleksler oluşturabildiğinden Alzheimer, depresyon ve artrit gibi hastalıklarda terapötik ajan olarak kullanımı mümkün olabilmektedir (Oguzturk vd., 2012). Yine birçok hücre içi ve hücre dışı sinyal yolaklarında rol oynayan proteinleri etkileyerek tümör oluşumunu, metastazı

ve anjiyogenezi modüle ettiği de gösterilmiştir (Kotha & Luthria, 2019). Ayrıca kurkumin anti-hiperglisemik ve anti-hiperlipidemik etkisi ile kan şekerini ve hemoglobin düzeyini düzenlediği ortaya konmuştur (Arun & Nalini, 2002). Dahası kurkumin güçlü bir NFκB inhibitörüdür ve nöroblastoma hücrelerinin hayatta kalma oranını önemli ölçüde azaltmıştır (Aravindan, Madhusoodhanan, Ahmad, Johnson & Herman, 2008). Kurkumin, apoptozu uyarmakta ve hücre döngüsünü düzenlemekte, proliferatif sinyal yollarında rol alan proteinlerin ekspresyonlarını azaltmakta, hücre göçünü engellemekte ve hücresel glikoz metabolizmasını düzenlemektedir (Zhai vd., 2020).

Kurkumin suda çözünmemekte ve sadece etanol, aseton, dimetil sülfoksit (DMSO) gibi solventlerde çözünmektedir (Kotha & Luthria, 2019). Ayrıca kurkumin organizmada zayıf bağırsak emilimi ve çözünürlük göstermekte ve düşük pH içeren ortamlarda bozulmaktadır ((Kharat, Du, Zhang & McClements, 2017). Bu özellikler kurkuminin yukarıda bahsedilen avantajlarını kısıtlamaktadır. Bu tarz limitasyonları bertaraf etmek için farklı kurkumin formülleri geliştirilmiştir (Gagliardi vd., 2020) Bunlardan biri de yakın zamanda geliştirilen ve yeni nesil ultrasol kurkumin (next generation ultrasol curcumin, NGUC) olarak adlandırılan bileşiktir (Yabas vd., 2021). Kimyasal yapısında yapılan bazı modifikasyonlar sonucunda geliştirilen NGUC'un rodent plazmasında 64,7 kat daha fazla bulunduğu raporlanmış ve buna bağlı olarak yüksek biyoyararlanım gösterebileceği düşünülmüştür (Yabas vd., 2021).

Literatürde yapılan çalışmalar kurkuminin nöroblastoma da dahil farklı kanser türlerinde etkili olabileceğini göstermiştir (Hewlings & Kalman, 2017). Fakat farklı nöroblastoma hücre hatlarında çalışılsa da kurkuminin N1E-115 hücre hattı üzerine olan etkileri henüz bilinmemektedir. Yine yakın zamanda geliştirilen ve kurkumine göre avantajları olan NGUC'un potansiyel etkisi daha önce hiçbir kanser türünde çalışılmamıştır. Dolayısıyla, bu tezin amacı, kurkumin ve NGUC'un N1E-115 nöroblastoma hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini ve potansiyel etki mekanizmalarını karşılaştırmalı olarak araştırmaktır.

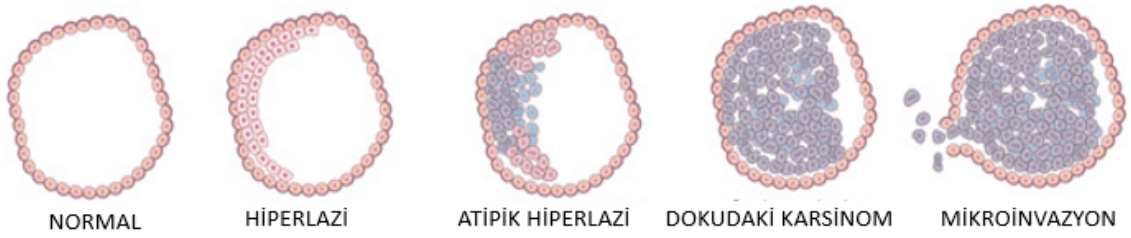
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanserin Tanımı

Kanser kelimesi, tümörü tanımlamak için ilk defa Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Tanımlanması M.Ö. 3000 yıllarına kadar uzanan kanser, insan ve hayvanlarda çok sık görülen bir hastalıktır. Hücrelerin bölünmesi ve proliferasyon dengesi, genlerin kontrolü altında olduğundan kanser temel olarak genlerle ilişkilidir (Baykara, 2016). Basitçe, genlerimizde meydana gelen mutasyonların ve/veya epigenetik değişikliklerin sonucu hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması olarak tanımlanabilir (Şekil 2.1). Fakat bunun altında yatan mekanizmalar karmaşık ve araştırılmaya halen daha açıktır. Hücre içi homeostazını kaybeden hücreler, immün sistemden kaçarak tümör oluşumunu başlatabilirler. Kontrolsüz çoğalan bu hücreler tek bir dokuda oluşabileceği gibi uzaktaki diğer dokuları da etkileyerek vücuda yayılabilir. İnsanda ortaya çıkabilecek birçok kanser türü olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.1. Bir kanser hücresinin gelişimi. Bir hücrede biriken mutasyonlar, hücrenin normalden daha fazla çoğalmasına neden olmaktadır. Bölünen hücre kümesi başka mutasyonlarla tümör hücrelerine dönüşmektedir. Zamanla çoğalan tümör hücreleri bazen başka doku ve organlara da yayılmaktadır (Nature Education, 2010).

Kromozomlar üzerinde oluşabilecek problemler hücreleri direkt olarak etkileyebilmektedir. Genlerde oluşan hasarlar DNA tamir mekanizmalarıyla onarılsa bile her zaman başarı sağlanamamaktadır. Bunun sonucunda da hatalı veya eksik proteinler sentezlenir ve hücrelerin normal işlevi bozulabilir. Bununla birlikte DNA metilasyonu, DNA asetilasyonu, kromatin düzenlenmesi gibi genin işlevinin değişmesine neden olan epigenetik faktörler de kanser oluşumunda rol oynamaktadır (İzmirli, 2013). Teknolojinin gelişmesiyle bu epigenetik değişimler bazı durumlarda kanserin erken teşhisinde kullanılabilmektedir. Örneğin CpG adalarındaki DNA hipermetilasyonu erken tanıda bir belirleyici olarak kullanılabilmektedir (İzmirli, 2013).

Farklı kanser türlerinin spesifik özelliklere sahip olabileceği bilinmektedir, ancak genel olarak kanser hücrelerinin temel özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

- Normal hücrelerin çoğalması ihtiyaca ve gelen sinyallere bağlı iken, kanser hücresi kendi sinyallerini oluşturarak kontrolsüz bir şekilde çoğalmaktadır.
- Kanser hücreleri, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sinyallerine karşı duyarsızdırlar.
- Normal hücreler gibi olgun, spesifik özelliklere sahip ve çok çeşitli hücreler değillerdir.
- Kanser hücreleri istilacı hücrelerdir. Uzaktaki bir organa ve dokulara yayılabilmektedir (metastaz).
- Kanser hücreleri ihtiyaç duyduğu besin ve oksijenleri karşılamak için yeni damar oluşumunu (anjiyogenez) tetikleyebilmektedirler (Aykan, 2015; "Cancer Cells," 2020).

2.1.2. Kanserin Nedenleri

Kanser multifaktöriyel bir hastalıktır. Kalıtımsal olarak aktarılacağı gibi maruz kalınan düşük miktarda da olsa radyasyon, hava kirliliği, ağır metaller/toksinler, kuru gıdalarda, kuruyemişlerde ve baharatlarda yanlış saklama koşullarında oluşan ve biriken aflatoksinler, güneş ışınlarına uzun süre maruz kalmak, deterjanların sürekli tene veya solunumuna maruziyeti, hepatit B ve C gibi virüsler ve daha birçok etkenin DNA'da meydana getireceği mutasyonlar da kansere neden olabilmektedir. Bu kanserojenlerin listesi her geçen gün uzamaktadır. Kanser nedeni olarak kalıtım yaklaşık %15'lik bir paya sahipken çevresel kanserojenler %85-90'lık bir orana sahiptir (Aykan, 2015).

Bahsedilen çevresel kanserojenlere bir kez maruz kalmak kansere neden olmayabilir, ancak tekrarlanan maruziyetler sonucu DNA'da meydana gelebilecek mutasyonların birikmesine neden olmaktadır. Örneğin, sigaranın içindeki benzopiren gibi kimyasallar, akciğerlerde birikerek DNA'daki guanine bağlanmaktadır. Replikasyon sırasında benzopiren bağlanmış guanin, timin olarak algılanmakta ve GC-AT dönüşümüne neden olmaktadır (Yokuş & Çakır, 2012). Sonucunda ise *KRAS* proto-onkogeninde ve hücre bölünmesinde rol alan *TP53* geninde mutasyonlara neden olarak akciğer hücrelerinin kontrolsüz bölünmesi ve tümör oluşumuna neden olmaktadır (Yokuş & Çakır, 2012). Üreme hücrelerinde (germline) meydana gelen mutasyonlar bir sonraki jenerasyona aktarılmaktadır. Vücut hücrelerinde (somatik) meydana gelen mutasyonlar ise sadece o bireyi ilgilendirir ve gelecek nesillere aktarılmaz. Kısacası; ebeveynlerden alınan genler, yaşam tarzı ve kansorejenlere maruz kalmak gibi faktörlerin bileşimi kanser oluşumunu tetikleyebilmektedir (Yokuş & Çakır, 2012).

DNA hasarları kanser araştırmalarda oldukça önemlidir, fakat kanser nedenini tek bir gen ile ilişkilendirmek doğru olmayabilir. Zira birden fazla gen ve çevresel faktörlerin etkileşimi kansere neden olmaktadır (Özdoğan, 2020). Yukarıda da bahsedildiği gibi genlerden aktarılan bilgi çevresel faktörlerle kıyaslandığında, kanser oluşumunda daha az etkisi olduğu bilinmektedir (Yokuş & Çakır, 2012). Ancak lösemi, retinoblastoma, göğüs ve yumurtalık kanseri gibi bazı kanserlerde kalıtımsal yatkınlık olduğu gösterilmiştir (Yokuş & Çakır, 2012). Yine çalışmalar, kolorektal kanserin yaklaşık %15'inin katılım kaynaklı olduğunu ileri sürmektedir (Kinzler & Vogelstein, 1996).

Epstein-Barr virüsü (EBV) veya insan T-Lenfotropik virüs gibi DNA veya RNA virüsleri de kansere neden olabilmektedir ve bu virüslere onkovirüs denmektedir. 1911 yılında ilk kanser yapıcı virüs keşfedilmiştir. Francis Peyton Rous, hastalıklı tavuktan aldığı hücreleri sağlıklı tavuklara aktardığında bir tür kas hücreleri tümörü olan sarkoma tümörü oluştuğunu gözlemlemiştir ve kansere neden olan faktörün virüs olduğunu tespit etmiştir. Rous Sarkoma Virüsü (RSV) olarak adlandırılan bu onkovirüsün genomunda ilk onkogen (Src onkogeni) tanımlanmıştır (Ryu, 2016). İnsanda tümör oluşumuna dolaylı ya da doğrudan neden olan virüsler genetik materyal olarak DNA veya RNA içerebilmektedir. Retrovirüsler genomlarını konakçı genomuna entegre ederek onkogenleri ve/veya tümör baskılayıcı genleri etkileyerek doğrudan kanser oluşumuna neden olmaktadırlar. Ayrıca onkovirüsler kronik enflamasyon ve enfeksiyonlarla konakçıda mutasyon oluşumuna neden olarak dolaylı yoldan da kansere neden olabilmektedirler (Ryu, 2016).

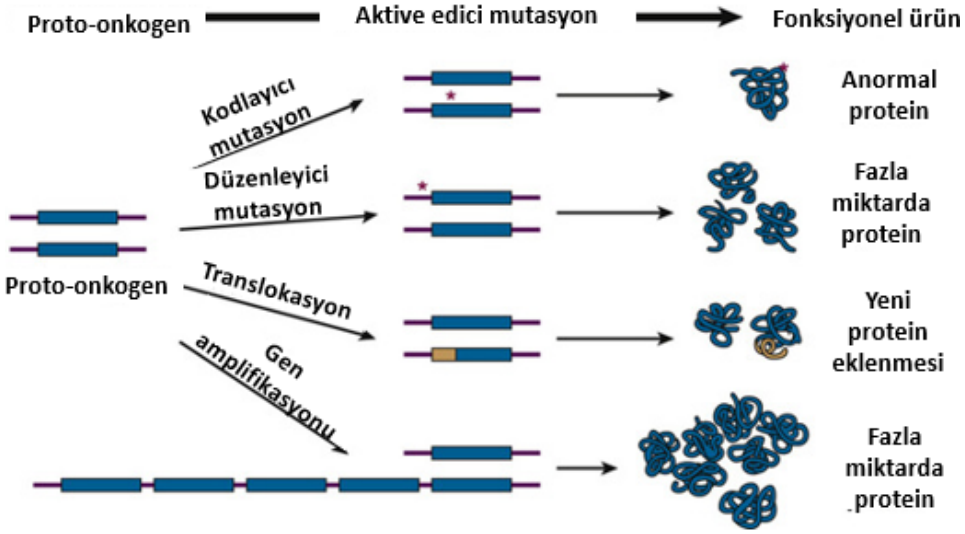
2.1.3. Kanser Oluşumunda Rol Oynayan Gen Grupları

Kanser oluşumunda rol oynayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler en bilinen ve araştırılan iki büyük gen grubudur (Park & Han, 2019).

Proto-onkogenler; hücresel sinyal iletiminde rol alan proteinler, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri gibi birçok proteinin sentezinden sorumlu genlerdir (Kontomanolis vd., 2020). Normal fizyolojik koşullarda hücre çoğalmasını ve büyümesini sağlıklı bir şekilde yürüten proto-onkogenler, mutasyonlar, gen ifadesinde oluşan yanlışlar ve kromozomal yeniden düzenlenme gibi hatalar nedeniyle sürekli aktif olan onkogenlere dönüşerek kanser oluşumunu tetiklemektedirler (Çefle, 2009). Proto-onkogenler, kromozomal mutasyonlar, nokta mutasyonları ve protein yapısal yeniden düzenlenmesi gibi anormal işlev kazancı (gain-of-function) yoluyla onkogenik aktivasyon gerçekleşmektedir (Şekil 2.2) (Park & Han, 2019). Örneğin, kronik miyoloid lösemide, Philadelphia (Ph) kromozomundaki translokasyon, BCR-ABL1 onkoproteininin oluşumuna ve buna bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz şekilde büyümesine yol açmaktadır (Park & Han, 2019). Bir başka fonksiyon arttırıcı mutasyon, hücrelerin sitoplazmik sinyal ağlarında rol oynayan Ras proteinlerinin sentezinden sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlardır. Hücrelerin hayatta kalması ve çoğalmalarından sorumlu Ras genlerindeki mutasyonlar, GTP'nin Ras proteinine

bağlanmasını engelleyerek Ras'ın yapısal aktivasyonuna yol açmaktadır (Bos, 1989). Sonuçta, hücre çoğalmalarının durdurulamaması, artmış büyüme faktörü ekspresyonu ve programlanmış hücre ölüm mekanizmasının kontrol kaybı kanser oluşumunu tetiklemektedir (Kontomanolis vd., 2020). Bu, hiperproliferatif gelişimsel bozukluklar kanser ile ilişkilendirilmektedir. Ras izoformlarından biri olan *KRAS* kanserlerde en sık mutasyona uğramış izoformdur ve özellikle pankreas kanseri olgularının %90'ında görülmektedir (Forbes vd., 2011). Kromozomal translokasyonla aktive olan *MYC* onkogeni ise; Burkitt Lenfoma, küçük hücreli akciğer kanseri, pankreas kanseri ve meme kanseri gibi kanser türlerinde aşırı eksprese edilmektedir (Felsher & Bishop, 1999).

Onkogenlere ek olarak, hücrenin normal büyümesinde ve farklılaşmasında büyük rol oynayan ve kanser gelişimini engelleyen tümör baskılayıcı genler bulunmaktadır. Proto-onkogenlerin aksine bu genler, normal hücrede çoğalmayı ve büyümeyi baskılayan proteinleri kodlamaktadırlar. Herhangi bir hasar durumunda DNA tamir mekanizmalarını başlatmaktadırlar. DNA'da oluşan hata, tamir mekanizmaları ile onarılmazsa programlanmış hücre ölüm mekanizmasını tetikleyerek hücreleri apoptoza yönlendirmektedirler (Kontomanolis vd., 2020). Dolayısıyla, bu genlerde meydana gelecek ve fonksiyon kaybına (loss-of-function) neden olacak hatalar da kansere neden olabilecektir.



Şekil 2.2. Proto-onkogen aktivasyonuna yol açan farklı mutasyon mekanizmaları. Proto-onkogenler; protein fonksiyonunu değiştiren bir amino asit değişikliğine yol açan tek nokta mutasyonu, bir onkogenin ekspresyonunu arttıran mutasyonlar veya translokasyonlar, onkogenik özelliklere sahip yeni bir ürün sentezlenmesine neden olan bir kromozom translokasyonu ve aşırı miktarda gen ürününe yol açan gen amplifikasyonu ile onkogene dönüşebilirler (basicmadicalkey.com'dan alınmıştır).

Onkogenlerde tek bir allelin mutasyona uğraması aktivasyona yol açarken, tümör baskılayıcı genlerin eksikliği veya her iki allelindeki işlev kaybı, hücrelerin kontrolü kaybetmesine ve kanser oluşumuna neden olmaktadır (Chial, 2008; Pazarbaşı & Kasap, 2003). Tümör baskılayıcı genler ilk olarak kalıtsal bir göz kanserinde gözlemlenmiştir (Chial, 2008). Retinoblastoma 1 (*RB1*) geni hücre döngüsünde negatif düzenleyici olarak işlev gören RB proteinini kodlamaktadır (Chau & Wang, 2003). RB proteini, hücre bölünmesini engellemek ve hücre ölümünü düzenlemek için birçok proteinle iş birliği yapmaktadır, dolayısıyla birçok kanser türü ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Hinds & Weinberg, 1994). Bir başka tümör baskılayıcı gen *TP53*'dür ve gen onarımını düzenleyen p53 proteinini kodlamaktadır. p53 proteini hücrelerin apoptoza teşvik edilmesinden sorumlu olduğu için kanser olgularının büyük bir kısmında *TP53* geninde mutasyon bulunmaktadır (Eldridge, 2020). Teknoloji geliştikçe tanımlanan tümör baskılayıcı genlerin sayısı da artmıştır ve 1200'den fazla tümör baskılayıcı gen olduğu tahmin edilmektedir (Zhao, Kim, Mitra, Zhao & Zhao, 2016).

Bazı durumlarda, tümör baskılayıcı proteinler ile onkogen proteinleri arasında antagonist bir ilişki söz konusudur. Tümör baskılayıcı gen ürünü olan proteinler onkogenlerin ürünleri tarafından uyarılan aynı hücre düzenleyici yolakları etkileyebilmektedir. PTEN proteini bu ilişkinin tipik bir örneğidir (Cooper, 2000). PTEN bir lipid fosfataz olup fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfat (PIP_3) gibi fosfatidilinositidleri defosforile eder. PTEN, PIP_3'ü defosforile ederek hücre büyümesi ve hayatta kalması gibi hücresel davranışların düzenlenmesinde önemli rol oynayan AKT sinyalleşmesini yani onkogen olarak hareket edebilen AKT ve PI3K'ın aktivitesini engellemektedir. PTEN'in inaktivasyonu veya kaybı, artmış PIP_3 seviyesi, AKT aktivasyonu ve apoptozun inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. Buna bağlı olarak da tümör gelişimi tetiklenmektedir (Chu & Tarnawski, 2004; Cooper, 2000).

Kanser oluşumunda gözlenen anti-apoptotik genlerin aşırı ekspresyonu ve pro-apoptotik genlerin inaktivasyonu, kanser hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmemesine neden olmaktadır. Örneğin B-hücreli lenfoma 2 (*BCL2*) geni programlanmış hücre ölümünü inhibe eden veya indükleyen Bcl-2 ailesi düzenleyici proteinlerini kodlamaktadır (Kelly & Strasser, 2020; Otake vd., 2007). Kanserli hücrelerde Bcl-2 proteininin artmış ekspresyonu görülmektedir. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinde gerçekleşen mutasyonlar, tümör baskılayıcı özelliklerini

kaybetmelerine neden olmaktadır (Yip & Reed, 2008). Bu ailenin bir üyesi olan Bcl-2-associated X protein (Bax), p53 adlı tümör baskılayıcı protein tarafından indüklenerek hücreleri apoptoza yönlendirmektedir (Brady & Gil-Gomez, 1998).

Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin hatasız bölünmesi, bir dizi kontrolün, karmaşık mekanizmaların ve proteinlerin görev aldığı kompleks bir aşamadır. Hücre bölünmesi G1, S ve G2 fazlarından oluşmaktadır. Hatasız hücre bölünmesi için bu fazlar arasında belirli kontrol noktaları ve hücre bölünmesini düzenleyen proteinler bulunmaktadır (Malumbres & Barbacid, 2009). Hücre döngüsü düzenlenmesi; hücre bölünmesinde rol alan proteinlerin fosforilasyonu ve defosforilasyonunu sağlayan siklin bağımlı kinazların kontrolü ve DNA replikasyonu ve kromozom ayrılması gibi kritik olaylarda kusurları algılayan hücre döngüsü kontrol noktalarıyla sağlanmaktadır (Collins, Jacks & Pavletich, 1997). Kanser hücrelerinde kontrolsüz büyüme, hücre döngüsü kontrolünün belirli noktalarının bozulması veya kusurlu olması sonucunda gerçekleşmektedir (Matthews, Bertoli & de Bruin, 2022). Mutasyonlar, kanser hücrelerinin S fazına girmesini sağlamakta ve hücre döngüsü çıkışını engellemektedir. İnterfaz safhasında DNA hasarı oluşmasıyla p53 proteini hücre döngüsü ilerlemesini engelleyen proteinler üretmek için DNA'ya bağlanmaktadır. Bu proteinlerden biri de p21'dir. p53 proteini p21 proteinin ekspresyonunu indüklemektedir. p21 siklin bağlı kinazları inhibe ederek DNA replikasyonunu ve mitozu inaktive etmektedir (Collins vd., 1997). p21, farklı kanser türlerinde farklı etkiler göstermektedir. Yapılan çalışmalarda p21 eksik farelerde, hematopoetik, epitelyal ve endotel tümör oluşumunda duyarlılık gözlemlenmiştir (Martin-Caballero, Flores, Garcia-Palencia & Serrano, 2001). Aynı zamanda p21'in tümör baskılayıcı rolü de belirtilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde p21'in aşırı ekspresyonu apoptozu indüklemekte ve tümör hacmini azaltmaktadır (Eastham vd., 1995). p53 aynı zamanda apoptoz mekanizmasını başlatmaktadır. Tümörlerin %50'sinden fazlasında p53 proteininde kusur bulunmaktadır (Collins vd., 1997).

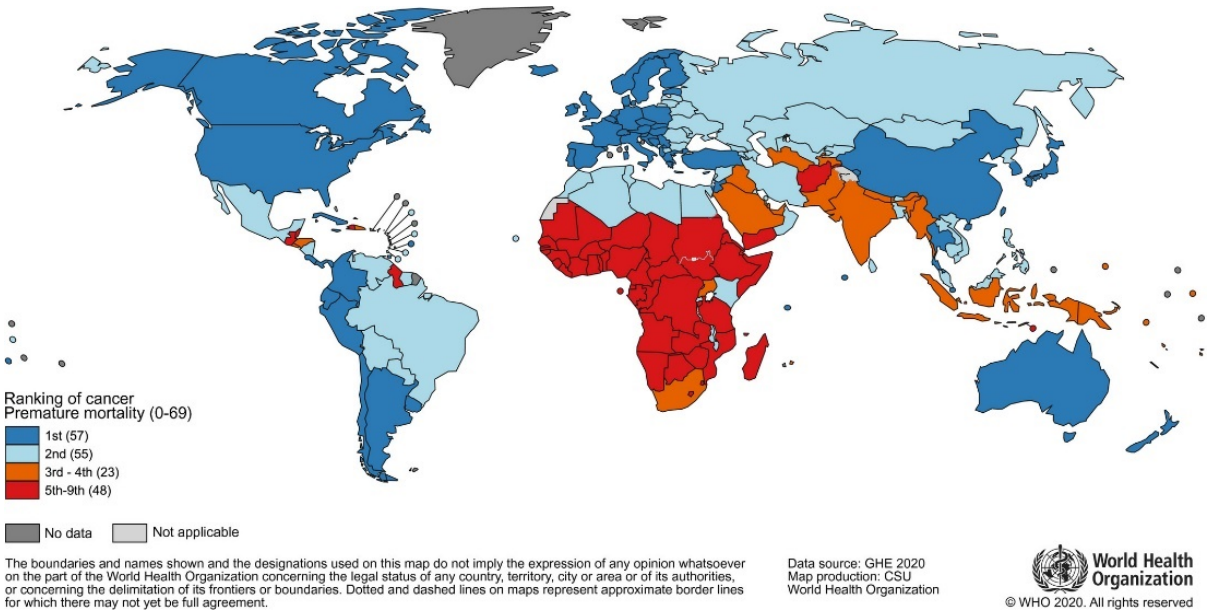
Birçok kanser türünde anormal aktivasyon gösteren PI3K/AKT yolağı, hücrelerin hayatta kalmasında ve çoğalmasında rol oynamaktadır (Porta, Paglino & Mosca, 2014). Yolağın artan aktivitesi tümörün ilerlemesine ve kanser tedavisine direnci geliştirmektedir (Fumarola, Bonelli, Petronini & Alfieri, 2014). İnsanda PI3K yolağının birçok bileşeninde germline veya somatik olarak meydana gelen mutasyonlar çeşitli

kanser türlerine neden olmaktadır (Liu, Cheng, Roberts & Zhao, 2009). PI3K/AKT yolağı, downstream hedefinde olan *FASLG* ve *BCL2L11* gibi pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu aktive ederek apoptoza aracılık ettiği bilinmektedir (Luo, Manning & Cantley, 2003). Ayrıca AKT, IKK'nin fosforilasyonu yoluyla NFκB'yi dolaylı olarak aktive ederek hücrelerin hayatta kalmasını teşvik edebilmektedir (Luo vd., 2003).

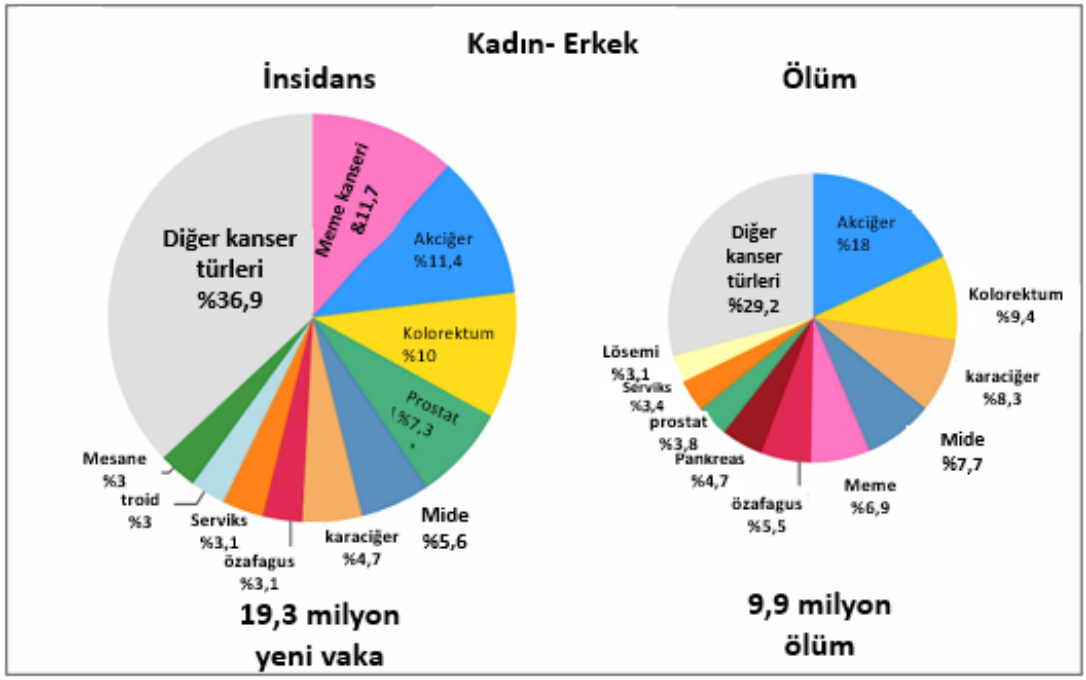
2.1.4. Dünyada ve Türkiye'de Kanser Epidemiyolojisi

Kanserojenlerin hızlıca artması bir sebep olarak gösterilecek olunursa, kanser; insidansı ve ölüm oranı sadece ülkemizde değil dünya çapında hızlıca artmaktadır (Şekil 2.3). Her yıl dünyada yaklaşık 18 milyon kişinin yakalandığı kanser, 10 milyona yakın kişinin ölümüne sebep olmaktadır (WHO, 2020). Kanser, sosyoekonomik, yaş, cinsiyet, dil, din, ırk ayırımı yapmadan her insanı etkileyebilecek bir hastalıktır ve tedavisi maddi ve manevi yönden uzun süreli mücadele gerektirmektedir (Özdoğan, 2021).

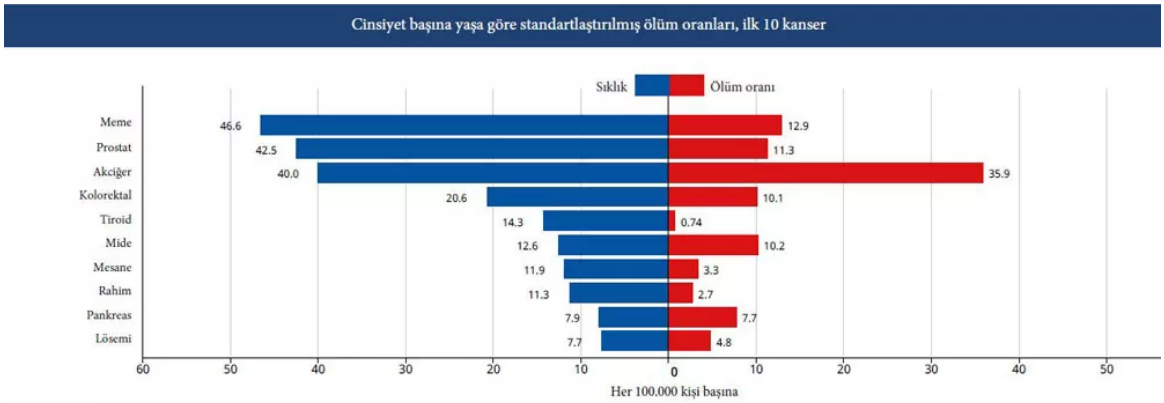
Kanser, sadece genetik yatkınlık ile ilişkili bir hastalık türü değil; tütün kullanımı, solunan hava ve yaşanılan çevre koşulları gibi diğer faktörlerin de rol oynadığı ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölümlere en çok neden olan multifaktöriyel bir hastalık türüdür ("Türkiye Kanser Kontrol Programı," 2016). Dünyada her 11 kadından biri ve her 8 erkekten biri kansere yakalanmaktadır (Özdoğan, 2021). Sırasıyla; akciğer, kolorektum, mide, meme, karaciğer, özafagus, tiroid, prostat, pankreas ve non-hodgkin lenfoma kanser türleri dünya çapında en sık görülen türlerdir (Şekil 2.4). Türkiye'de ise yaygın kanser türleri neredeyse aynıdır ve en yaygın kanser türlerinde ilk üç sırada göğüs kanseri, mesane kanseri ve kolorektal kanser bulunmaktadır (Şekil 2.5) (WHO, 2020).



Şekil 2.3. 2019 yılında dünya çapında, 70 yaşından küçük ölümlerin nedeni olarak kanserin ülkelere göre sıralaması. Her bir gruplamada temsil edilen ülke sayısı sol alt köşede gösterilmektedir (Dünya Sağlık Örgütü'nün internet sitesinden alınmıştır).



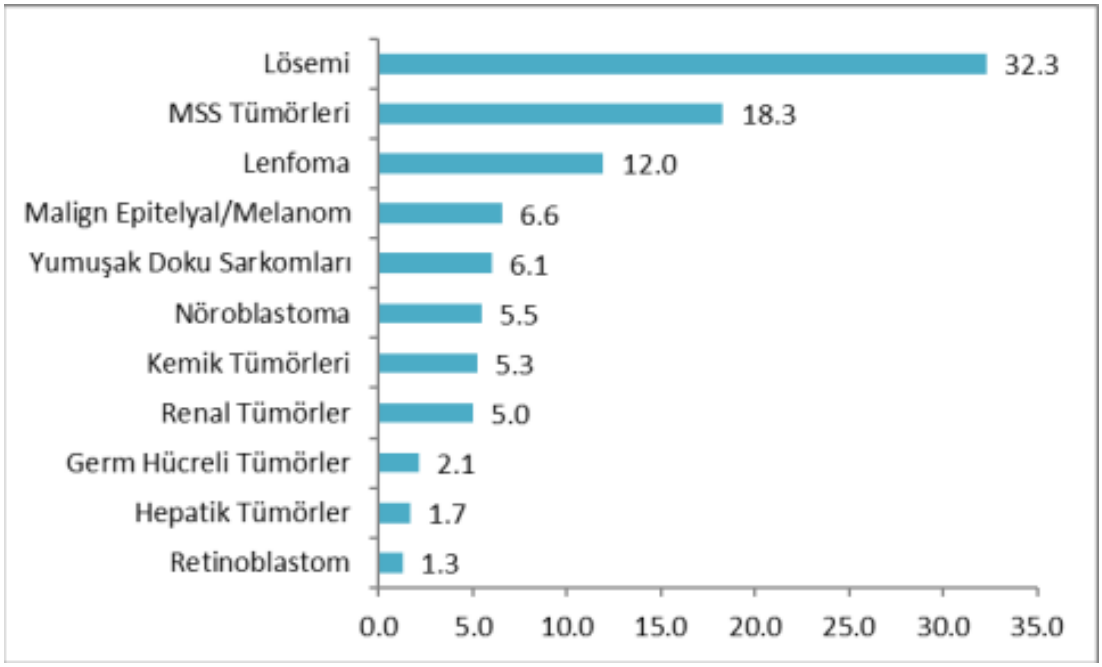
Şekil 2.4. Dünya çapında yaygın olarak görülen ilk 10 kanser türü. 2020 yılında dünyada 19 milyonun üstünde kanser vakaları ve 9 milyondan fazla kansere bağlı ölüm görülmüştür (Sung vd., 2021).



Şekil 2.5. 2020 yılında Türkiye genelinde görülen en yaygın 10 kanser türü. Kanser türüne bağlı ölüm oranında meme kanseri %12'lik dilim ile ilk sıradadır ((Özdoğan, 2021)'dan alınmıştır).

2.1.5. Çocukluk Çağı Kanserleri

On sekiz yaş altı çocuklarda görülen çocukluk çağı kanserleri, tüm kanserlerin yaklaşık %0,5-4,6'sını kapsamaktadır. Her yıl üç binden fazla çocuğa kanser tanısı konulmakta ve her üç dakikada bir çocuk, kanser nedeni ile yaşamını yitirmektedir (Muslu & Kolutek, 2018). En sık 5 yaş altındaki ve 10-15 yaş aralığındaki çocuklarda görülmektedir (TKD, 2018). Ülkemizde kansere bağlı ölümler, hastalığa bağlı çocuk ölümlerinde üçüncü sırada yer almaktadır (Vural & Karaman, 2014). Çocuklarda görülen en sık kanser türleri yetişkinlerde görülenlerden farklıdır. Lösemi, beyin ve omurilik tümörleri, nöroblastoma, lenfoma ve Wills tümörü gibi kanser türleri çocuklarda karşılaşılan en sık kanser türleri arasındadır (Şekil 2.6) ve embriyonik ve mezenşimal dokulardan köken almaktadırlar (Yılmaz Bal, 2000).



Şekil 2.6. 0-14 yaş arası çocuklarda görülen kanserlerin yüzde dağılımları. (Türkiye Birleşik Veri Tabanından alınmıştır, 2016).

2.1.6. Nöroblastoma

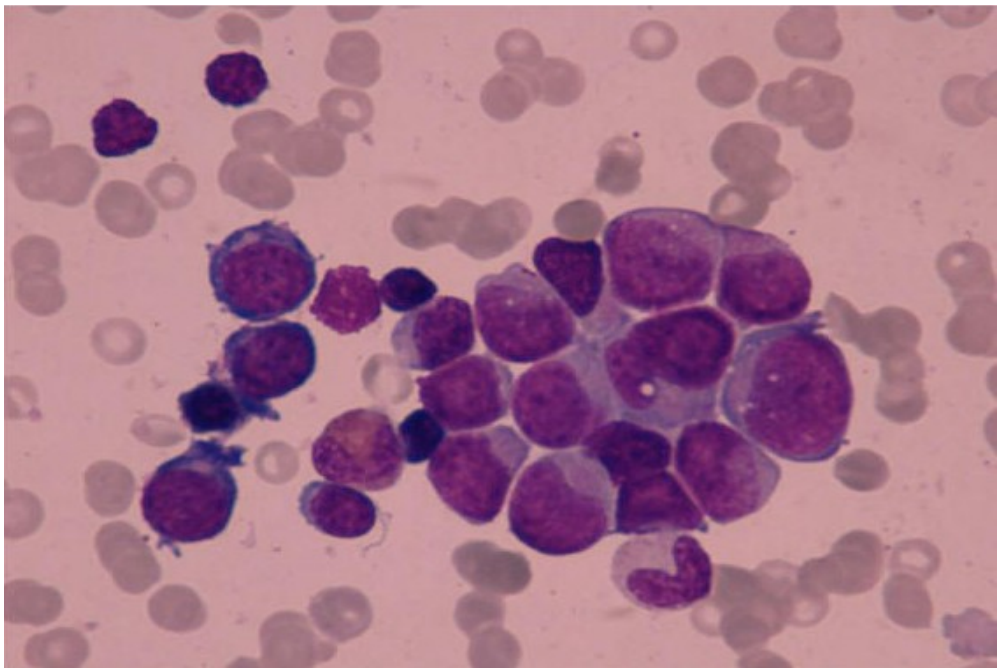
Nöroblastlar, embriyodaki olgunlaşmamış sinir hücreleridir. Olgunlaşarak adrenal bezlerin merkezinde bulunan sinir hücrelerine veya adrenal medulla hücrelerine farklılaşmaktadırlar (Colon & Chung, 2011). Nöroblastlarda meydana gelen hasarlar sonucu normal olgunlaşamadığı durumlarda, eğer vücut hasarlı hücreleri elimine edemezse, nöroblastom ortaya çıkabilmektedir (Society, 2021). Nöro; sinir hücresini ifade ederken, blastoma; olgunlaşmamış veya gelişmekte olan hücrelerde başlayan kanseri tanımlamaktadır. En beş yaşından küçük çocuklarda görülmektedir ve çocukluk çağı kanserlerinin %6-7'sini kapsamaktadır. Doğumdan önce fetüste oluşabilmektedir. Doğumdan sonra, sinir hücresine farklılaşmış ve kansere dönüşmeyen nöroblast kümeleri görülebilmektedir. Ancak normal olarak olgunlaşmayan bu kümeler tümör kitleleri oluşturarak büyümeye devam etmektedir. Nöroblastoma, karaciğer, lenf nodülleri ve akciğer gibi vücudun diğer doku ve/veya organlarına yayıldığı zaman fark edilmektedir (Zafar vd., 2021).

Nöroblastoma, embriyo veya fetüsün sinir hücrelerinin erken formlarında başlayan sempatik sinir sistemi kaynaklı solid bir tümör türüdür. Sempatik sinir sistemi;

beyin, omurilik ve buralardan vücudun her yerine yayılan sinirleri kapsamaktadır. Omuriliğin her iki tarafından uzanan sinir ağı, ağ boyunca belirli konumlarda kümelenmiş ganglion hücreleri ve adrenal bezlerin medullasında bulunan sinir benzeri hücreler sempatik sinir sistemini kapsamaktadır (Rad, 2022). Nöroblastomalar sinir sistemi ağının herhangi bir yerinde bulunabilmektedir. Nöroblastomanın en yaygın kökeni böbreküstü adrenal bezlerdir ("Neuroblastoma - Childhood: Introduction," 2021). Karında gelişir ve adrenal bezlere lokalize olmaktadır (Zafar vd., 2021). Boyunda, göğüste veya pelviste omurgaya yakın ganglion hücrelerinden de köken almaktadır. Nadir de olsa yayılımı çok fazla olduğu için klinikte kökeni tam belirlenemediği olgular da bulunmaktadır (Society, 2021). Bazen daha büyük çocuklarda ve ergenlik çağındaki çocuklarda da görülebilmektedir ("Neuroblastoma - Childhood: Introduction," 2021). Düşük ve orta riskli nöroblastoma hastalarında sağkalım neredeyse %100 iken yüksek riskli hastalarda %50'yi geçmemektedir (Nakagawara vd., 2018). Düşük riskli nöroblastoma hastası olan çocuklarda spontan tümör gerilemesi görülmektedir. Orta riskli hastalara kemoterapi tedavisi uygulanmakta ve eğer tümör kitlesi varsa cerrahi olarak çıkarılarak alınmaktadır. Yüksek riskli nöroblastoma hastalarında, yüksek doz kemoterapi tedavisi, otolog kök hücre nakli veya immünoterapi yoluyla tedavi sağlanmaktadır. Ancak, yaklaşık iki yıllık aradan sonra tümörün nüksetme olasılığı bulunmaktadır (Society, 2021). Bununla birlikte çocuklarda yüksek tümör heterojenliği, ilaç direnci gelişimine ve şiddetli toksisiteye neden olabilmektedir (Zafar vd., 2021).

Nöroblastoma, biyolojik, klinik, genetik ve morfolojik heterojenite sergileyen ve başarılı evresel tedavi geliştirmeyi zorlaştıran karmaşık bir kanserdir (Nakagawara vd., 2018). Tümör biyolojisini anlamak ve daha etkili tedaviler geliştirmek için nöroblastomanın büyümesinde ve gelişmesinde rol oynayan genetik değişiklikler veya normal olarak çalışmayan, bozulmuş hücre içi veya hücre dışı sinyal yolaklarını ortaya çıkarmak için uzun yıllardır çalışmalar yapılmaktadır (Zafar vd., 2021). Örneğin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı nöroblastoma hücrelerinde diğer kanser hücrelerinde olduğu gibi sağkalımı destekleyen bir yolaktır ve AKT fosforilasyonu nöroblastoma dokularında yüksektir (Boller vd., 2008). Nöroblastomada, beyin kaynaklı nörotrofik faktörün, tümör hücrelerini PI3K yolu aracılığıyla kemoterapinin neden olduğu apoptozdan koruduğu gösterilmiştir (Jaboin, Kim, Kaplan & Thiele, 2002).

Nöroblastoma hücreleri, bazen kemik iliğine metastaz yaparak, orada rozet adı verilen küçük topluluklar oluşturmaktadır (Şekil 2.7). Lenfositlerden biraz daha büyüktür ve çekirdek/sitoplazma oranı daha yüksektir. Buna karşılık kromatin yapısı lösemi blastlarına benzerdir (Köroğlu, 2013).



Şekil 2.7. Rozet yapısını oluşturmuş nöroblastoma hücreleri ((Köroğlu, 2013)'den alınmıştır).

2.1.6.1. Moleküler Patogenez

Nöroblastoma, kromozomal kayıplar ve kazanımlar içermektedir. Tam kromozomal kayıplar olumlu bir prognoz ile ilişkilidir ve hiperdiploidi ile sonuçlanmaktadır. Buna karşılık kromozomal kayıplar veya segmental olarak sapmalar, *MYCN* geninin amplifikasyonu ve daha kötü sonuçlar oluşturma eğiliminde olan bölgesel kazançlar veya delesyonlar ile ilişkilidir (Van Roy vd., 2009). 1p36 delesyonu, tümörlerin yaklaşık %70'inde gözlemlenmiştir ve ayrıca lokalize tümörleri olan hastalarda artmış tekrar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kim & Chung, 2006). Kromozomda 1p36 bölgesi, sinir sisteminde eksprese edilen *CHD5* genidir. Bu gen sinir sisteminde hücresel çoğalmayı, yaşlanmayı ve apoptozu kontrol etmektedir. Nöroblastomada bu genin ekspresyonu düşüktür (Colon & Chung, 2011). Yapılan bir çalışmada nöroblastoma

hücrelerine *CHD5* geni transfekte edildiğinde koloni oluşturma ve tümör büyümesinde azalma gözlenmiştir (Fujita vd., 2008).

Nöroblastomada yaygın olarak gözlemlenen genetik anomalilerinden biri de 17q kazanımıdır ve hastaların yaklaşık %80'inde görülmektedir (Colon & Chung, 2011). Genellikle kromozom 1p ve kromozom 11q arasında dengesiz translokasyon olmaktadır. Triploidiye yakın tümörlerde fazladan 17. kromozom kazanımı görülmektedir ve iyi prognoz ile ilişkilidir. Diplodiye yakın tümörlerde dengesiz 17q kazanımı karakteristiktir ve kötü prognoz ile sonuçlanmaktadır (Bown vd., 1999; Van Roy vd., 2009). 11q delesyonu birincil nöroblastoma hastalarının yaklaşık %15-22'sinde tanımlanmıştır (Colon & Chung, 2011). Genellikle *MYCN* proto-onkogen amplifikasyonu bulunmayan ve sağlam kromozom 1p bulunan yüksek evreli tümörlerde gözlenmiştir (Attiyeh vd., 2005). 3p kaybı ise 11q kaybıyla birlikte gözlemlenmektedir ve *MYCN* amplifikasyonu ya da 1p delesyonu olmayan tümörlerde ortaya çıkmaktadır. Nöroblastoma onkogenezinde 3p kaybı daha yaşlı nöroblastoma hastalarında gözlemlendiği için geç gerçekleşen bir olay olduğu düşünülmektedir (Vandesompele vd., 2005).

2.1.6.2. Tedavi Yöntemlerine Genel Bakış

Genellikle birçok kanser türünde olduğu gibi, kemoterapi, radyoterapi ve tümörün cerrahi olarak çıkarılması nöroblastoma hastalarını da tedavi etmek için kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (Zhai vd., 2020). Birçok agresif nöroblastoma türü kemoterapötik ajanlara karşı direnç göstererek hastalığın nüksetme oranını arttırmaktadır (Colon & Chung, 2011). İlaç direnci gösteren nöroblastoma hücrelerinde çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (multidrug resistance-associated protein) ifade eden klonlar gözlemlenmiştir (Peaston vd., 2001). Tedavi türü hastanın risk grubuna bağlıdır. Tek tedavi olarak kemoterapi (indüksiyon kemoterapisi) kullanılan hastalarda tümör yükü azaltılarak, tümörün etkisinin ortadan kalkması amaçlanmaktadır. İndüksiyon kemoterapisi, bazı siklofosfamid, doksorubisin, sisplatin, karboplatin, etoposid, topotekan, ifosfamid ve vinkristin gibi kanser ilaçlarının kombinasyonlarından oluşmaktadır (Yalcin, Kremer, Caron & van Dalen, 2010). Ancak bu kombinasyonlar büyüme geriliğine, endokrinopatiye ve ikincil malignitelerin oluşumuna yol açabilmektedir (Yalcin vd., 2010). Yüksek riskli hastalarda indüksiyon kemoterapisi ve cerrahi müdahale sonrasında radyasyon tedavisi uygulanmaktadır. Bu tür tedavi yaklaşık

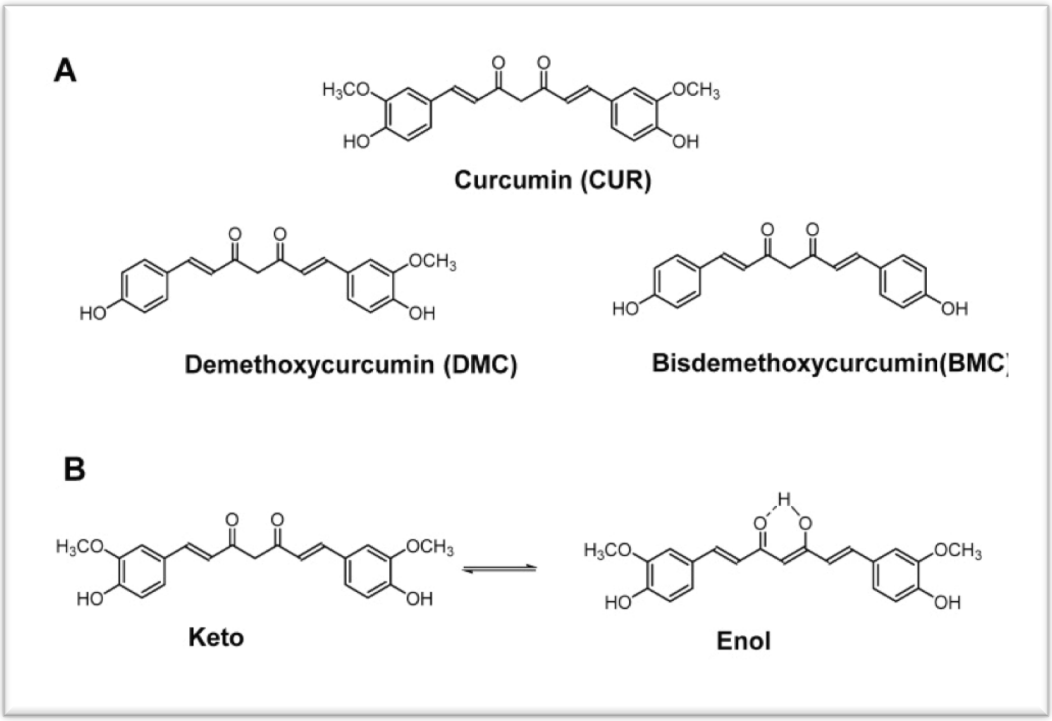
%10'dan daha az oranda tümörün nüksetme olasılığıyla sonuçlanmaktadır (Yalcin vd., 2010). Radyasyon tedavisi, vertebra hasarı, büyümenin durması ve skolyoza yol açabilir (Modak & Cheung, 2010). Tümörün yerleşimine, boyutuna, invazivliğine ve metastazına bağlı olarak cerrahi tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Toplam tedavi süresi bir yılı bulmakta ve çoğu tedavi yüksek doz kemoterapi uygulanmasıyla tamamen yok edilemeyen minimal ve çıkarılamayacak kadar küçük olan tümörlerden kaynaklı başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir (Colon & Chung, 2011). Tanı anındaki yaş, klinik seyrin önemli bir göstergesidir. Örneğin, 18 aylıktan küçük bebeklerde kendiliğinden gerilemenin görülme olasılığı daha yüksektir veya tek başına cerrahi müdahale ile başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir. Buna karşılık, daha büyük çocukların çoklu tedavi ve sitotoksik tedavilere dirençli agresif tümörlere sahip olma olasılığı daha yüksektir (Newman vd., 2019). Mevcut tedavilerin yanında retinoik asit, mTOR inhibitörleri, Aurora A kinaz, TrkB inhibitörleri ve immünoterapi gibi terapötik yöntemler geliştirilmiştir (Colon & Chung, 2011). Bahsedilen bu tedavi yöntemlerine ilave olarak, bitkisel ürünlerden elde edilen ekstraktlar ve etken maddeler de kanser tedavilerinde özellikle konvansiyonel yöntemlerin meydana getirdiği yan etkileri azaltma noktasında kullanılmaya başlanmış ve umut verici sonuçlar elde edilmektedir.

2.2. Kurkumin

2.2.1. Yapısı

Genellikle Hindistan'da kullanılan köri baharatlarından olan zerdeçal, biyoaktif kurkuminoidler içerdiğinden son yıllarda büyük ilgi görmektedir ve çeşitli hastalıkların tedavisinde ilave bir ajan olarak birçok çalışmada test edilmiştir (Amalraj, Pius, Gopi & Gopi, 2017). Zerdeçal çok uzun zamandan beri sadece köri baharatı yapımında değil, doğal boya maddesi olarak kozmetikte ve tekstilde, böcek kovucu ve anti-mikrobiyal bir ajan olarak farklı amaçlarla da kullanılmıştır (Moghadamtousi vd., 2014). Güneydoğu Asya, Latin Amerika ve Çin dahil olmak üzere dünyanın çeşitli yerlerinde yetiştirilmektedir (Amalraj vd., 2017). Ayurveda tıbbında zerdeçal, yara iyileşmesi, solunum problemleri, karaciğer ve dermatolojik bozukluklar gibi birçok tıbbi amaçlar için kullanılmıştır (Kotha & Luthria, 2019). Zerdeçal; kurkumin, demethoxycurcumin ve bisdemethoxycurcumin gibi kurkuminoidler olarak adlandırılan biyoaktif polifenolik bileşikler içermektedir (Şekil 2.8A) (Hewlings & Kalman, 2017).

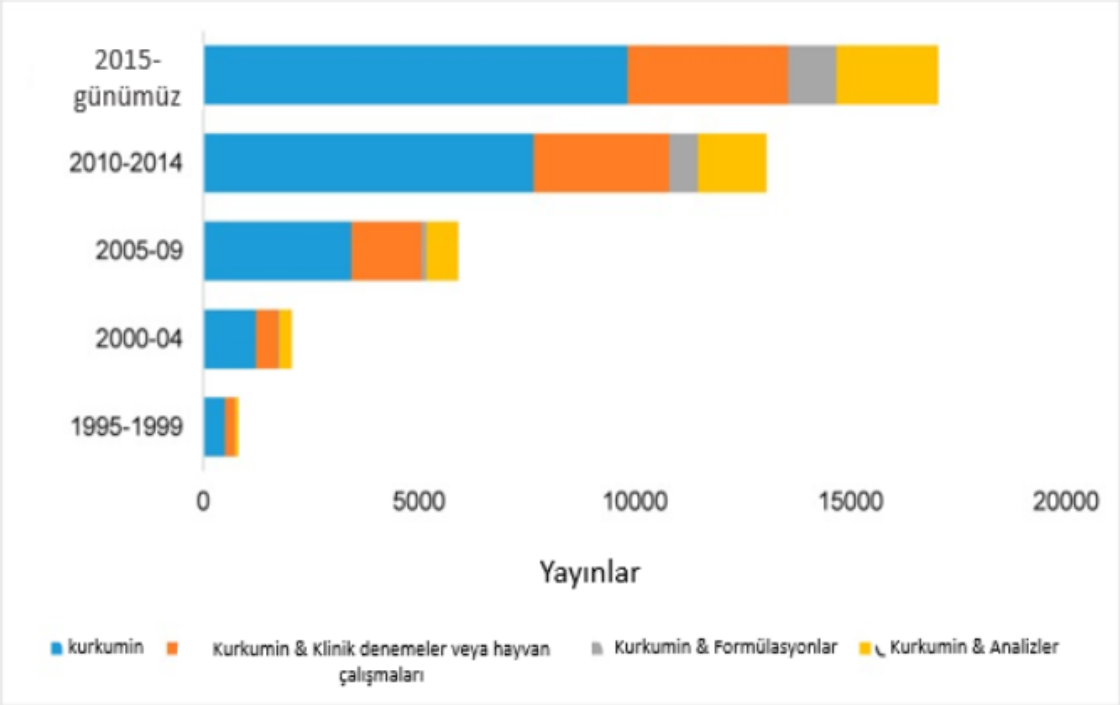
Kimyasal olarak zerdeçal, yaklaşık %70 karbonhidrat, %13 nem, %6 protein, %6 uçucu yağlar (phellandrene, sabinene, cineol, borneol, zingiberene ve seskiterpenler), %5 yağ, %3 mineral (potasyum, kalsiyum, fosfor, demir ve sodyum), %3–5 kurkuminoidler ve eser miktarda vitamin (B1, B2, C ve niasin) içermektedir (Priyadarsini, 2014).



Şekil 2.8. Kurkuminoidlerin yapısı. (A) Kurkuminoidlerin kimyasal formülü. (B) Kurkuminin iki tautomerik formu (Hewlings & Kalman, 2017).

Kurkumin (1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-dion), polifenol bir bileşiktir. İlk olarak 1842'de Vogel ve Pelletier tarafından *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından izole edilmiş ve 1845 yılında Vogel Jr tarafından ilk kez saflaştırılmıştır (Prasad, Gupta, Tyagi & Aggarwal, 2014). Kurkuminin, -keto ve -enol olmak üzere iki tautomerik formu bulunmaktadır (Şekil 2.8B). Oda sıcaklığında, nötr ve asidik pH'lı sulu ortamlarda çözünmemektedir. Buna karşılık metanol, etanol, aseton ve DMSO gibi solventlerde çözünmektedir. Nötr ve asidik ortamda keto formunda, alkali koşullarda ise enol formunda bulunmaktadır (Kotha & Luthria, 2019; Payton, Sandusky & Alworth, 2007). Kurkumin hidrojen atomu alıcısı, Michael alıcısı ve metal şelatör olmak üzere üç aktif bölgeye sahiptir. Metal şelatör bölgesi, birkaç metal iyonu ile kompleksler oluşturur ve bu özelliği Alzheimer, kanser, depresyon ve artrit gibi

hastalıklarda terapötik bir ajan olarak kullanım için büyük umut vadetmektedir (Agarwal, Goel & Behari, 2010). Kurkumin, bakır (Cu), krom (Cr), arsenik (As), cıva (Hg), kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) gibi ağır metallerle stabil kompleksler oluşturarak ağır metal kaynaklı toksisiteyi (oksidatif stres) azaltmaktadır (Agarwal vd., 2010; Amalraj vd., 2017; Garcia-Nino & Pedraza-Chaverri, 2014; Oguzturk vd., 2012; Shukla, Khanna, Khan & Srimal, 2003; Yadav, Lomash, Samim & Flora, 2012). Yine anti-kanser, antibiyotik, anti-diyabetik, anti-inflamatuar ve yaşlanma karşıtı bir ajan olarak *in vitro*, *in vivo* çalışmalarda ve klinik tedavilerde denenmiştir. Kurkuminin çeşitli hastalıklarda terapötik bir ajan olarak kullanımı ile ilgili çalışmalar hızla artmaktadır (Şekil 2.9). Bununla birlikte, kurkuminin sulu ortamda düşük çözünürlüğü, zayıf biyoyararlanımı ve emilimi gibi sınırlamaları bulunmaktadır (Kotha & Luthria, 2019).



Şekil 2.9. Kurkuminin farmasötik ve biyoaktif özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar. Kurkumin ile yapılan araştırmalar 1995'den beri in vitro ve in vivo olarak hızla artmaktır (Kotha & Luthria, 2019).

2.2.2. Etkileri

Kurkuminin; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, inflamatuar mediyatörleri ve sitokinleri, hücre döngüsü proteinlerini, enzimleri, protein kinazları ve apoptotik proteinleri dahil çeşitli biyolojik hedefleri ve hücresel yolakları etkilediği gösterilmiştir (Kotha & Luthria, 2019; Prasad vd., 2014). Örneğin, kurkumin, hücre sağkalımı ve sitokin üretimi gibi bazı hücresel işlevlere etki eden transkripsiyon faktörü NFκB'nin aktivasyonunu inhibe edebilir (Kotha & Luthria, 2019). Tümör baskılayıcı, kaspaz yolları, protein kinaz ve ölüm reseptörü yolları dahil olmak üzere çoklu sinyal yollarını düzenleyerek tümör büyümesini modüle edebilir (Kotha & Luthria, 2019).

Kurkumin, diyabetik ratlarda kandaki glikoz ve glikozile hemoglobin düzeyini azaltmakta ve anti-hiperglisemik ve anti-hiperlipidemik etki gösterebilmektedir (Arun & Nalini, 2002; Pivari, Mingione, Brasacchio & Soldati, 2019). Yapılan bir çalışmada, kurkumin (90 mg/kg vücut ağırlığı) ve insülin (1 U/gün vs. 4 U/gün) ikili tedavisinin kan şekerini, karaciğer ve böbrek hasarının biyolojik göstergelerini azalttığını, lipid profilini ve hepatik antioksidan seviyesini iyileştirdiği göstermiştir (Gutierres vd., 2019). Kurkuminin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi de bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim seviyelerinin normalleştirilmesi yoluyla lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Pivari vd., 2019). Yapılan araştırmalar, düzensiz inflamatuar yolakların kanser de dahil olmak üzere çok sayıda kronik hastalıkta önemli rol oynadığını göstermektedir (Shanmugam vd., 2015). Hayvan diyabet modelleri üzerinde yapılan bazı çalışmalar, kurkumin uygulamasının serumdaki tümör-nekroz faktör-alfa (TNF-α), interlökin (IL)-6, ve MCP-1 gibi inflamatuar faktörlerin ekspresyonunu azalttığını ve NFκB sinyal yolunu baskılayarak inflamasyona karşı savunma yaptığını göstermiştir (Jain, Rains, Croad, Larson & Jones, 2009).

Kanserin başlamasında ve ilerlemesinde hücre içi ve hücre dışı birçok sinyal yolağının, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin, onkogenlerin aşırı ekspresyonun etkisi bulunmaktadır (Hausman, 2019). Farklı kimyasal özellikleri ile kurkumin, kanserin başlaması ve ilerlemesinde aktif olarak yer alan çok sayıda hücre dışı ve hücre içi molekül ile etkileşime girerek kanserin ilerlemesini engelleyebilmektedir (Zhai vd., 2020).

2.2.3. Potansiyel Etki Mekanizmaları

Tümör progresyonu ile ilgili olan, transkripsiyon faktörü aktivatör protein (AP)-1, mitojenik, anti-apoptotik ve pro-anjiyojenik sinyalleri aktive eden kanserle ilgili genleri ifade ettiği bilinmektedir. Gliomalarda yüksek AP-1 ekspresyon seviyesi görülmektedir ve kısmen artan kemo-direnç ve radyo-direnç ile ilişkilidir (Karin, Liu & Zandi, 1997). Kurkuminin insan ve sıçan glioma hücrelerinde kemoterapiye direnci baskıladığı ve AP-1 ve NFκB sinyal yolaklarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Dhandapani, Mahesh & Brann, 2007). Kurkumin, AP-1 transkripsiyon faktörünün baskılanması yoluyla LnCaP prostat kanseri hücrelerinin hidrojen peroksit ile uyarılan proliferasyonunu ortadan kaldırdığı, ayrıca; rahim ağzı kanseri hücrelerinde AP-1 ekspresyonunu azalttığı, dolayısıyla, kurkumin tarafından protein kinaz C aktivitesinin inhibisyonu, ERK-AP-1-MMP-9 yoluyla pro-anjiyojenik sinyalleşmeyi bozarak tümörlerdeki neovaskülarizasyonu inhibe edebildiği gözlemlenmiştir (Karin vd., 1997).

Memelilerde beş farklı üyeden oluşan NFκB, DNA transkripsiyonunu, sitokin üretimini ve hücrelerin hayatta kalmasını kontrol eden bir protein kompleksidir (Chaturvedi, Sung, Yadav, Kannappan & Aggarwal, 2011). Büyüme faktörleri, oksidatif stres indükleyicileri, virüsler, gram-negatif bakteri ürünleri, mitojenler, pro-inflamatuar sitokinler ve morötesi ışık, hidrojen peroksit gibi çevresel faktörler, kemoterapötik ajanlar ve gama radyasyonu dahil çok sayıda ajan tarafından aktive edilebilmektedir (Chaturvedi vd., 2011). TNF-α ve IL-1β gibi pro-inflamatuar sitokinler tarafından aktive edilen IκB'ler hem IKKα hem de IKKβ tarafından fosforile edilebilmektedir. Fosforile edilmiş NFκB daha sonra çekirdeğe göç etmekte ve apoptozu baskılayan ancak hücre proliferasyonunu ve transformasyonunu, invazyonunu, metastazını, kemorezistansını, radyo-direncini ve anjiyogenezi indükleyen çeşitli onkojenik genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır (Shanmugam vd., 2015; Shen & Tergaonkar, 2009). 1995 yılında Singh ve Aggarwal kurkuminin, NFκB aktivitesini baskılayarak anti-inflamatuar etki gösterdiğini raporlamışlardır (Singh & Aggarwal, 1995). Yıllar içinde yapılan çalışmalar, kurkuminin NFκB upstream kinazlarını, IKKα ve IKKβ'yı, insan akciğer epitel hücrelerinde sigara dumanı kaynaklı NFκB aktivasyonunu ve ayrıca baş ve boyun kanseri, multipl miyelom ve mantle hücreli lenfomada meydana gelen aktivasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir (Shanmugam vd., 2015).

Bir dizi onkogenik sinyal yolu ile ilişkili olan, çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin hücre içi sinyal iletim yollarını kontrol eden; Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü (STAT) 3, kanser tedavisinde hedef molekül olarak büyük ilgi görmektedir (Siveen vd., 2014). Baş ve boyun kanseri, lösemiler, lenfomalar ve multipl miyelom gibi çoklu kanserlerde rol oynamıştır (Shanmugam vd., 2015). Normal fizyolojik koşullar altında, STAT3 hücrelerin hayatta kalmasına ve büyümesine katkıda bulunur ve Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarını arttırarak apoptozu engellemektedir (Yip & Reed, 2008). STAT3 ayrıca VEGF ekspresyonunu aktive ederek anjiyogenezi arttırmaktadır (Zou vd., 2020). Bharti ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile kurkuminin IL-6 ile indüklenen STAT3 fosforilasyonunu ve bunun sonucunda multipl miyelom hücrelerinde STAT3 nükleer translokasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (Bharti, Donato & Aggarwal, 2003).

TNF-α'nın tümörün başlamasına, ilerlemesine ve metastaza aracılık ettiği gösterilmiştir (Sethi, Sung, Kunnumakkara & Aggarwal, 2009). TNF-α'nın pro-inflamatuar etkileri, öncelikle NFκB'yi aktive etmesinden kaynaklanmaktadır. Hemen hemen tüm hücre tipleri, TNF-α'ya maruz kaldıklarında, hücre adezyon molekülleri, inflamatuar sitokinler, kemokinler ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz gibi inflamatuar genlerin ekspresyonuna yol açan NFκB'yi aktive etmektedir. TNF-α ayrıca çoğu tümör hücresi için bir büyüme faktörü olarak işlev görmektedir (Sethi, Sung & Aggarwal, 2008; Sethi vd., 2009). Kurkuminin hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası TNF-α ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Kumar, Dhawan, Hardegen & Aggarwal, 1998). Kurkuminin, hücre içi yapışma molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre yapışma molekülü-1 (VCAM-1) ve endotelyal lökosit yapışma molekülü-1 (ELAM-1) gibi TNF-α ile indüklenen yapışma molekülleri ekspresyonunu etkilediği ve yapışmayı inhibe ettiği gösterilmiştir (Kumar vd., 1998).

Kurkumin ayrıca p21, siklin D1, p53 gibi diğer hücresel moleküllerin ekspresyonu üzerinde de etki göstermiştir. Nöroblastoma hücre hatlarında, kurkumin uygulaması geçici olarak p53 ekspresyonunu yukarı regüle ettiği ve p53'ün nükleer translokasyonunu indüklediği, ardından p21 ve Bax ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Liontas & Yeger, 2004). Meme epitelyal karsinoma hücrelerinde, kurkuminin p53'ü yukarı regüle ederek apoptozu indüklediği, başka bir çalışmada ise, çoklu tümör hücre dizilerinde

sikline bağımlı kinaz inhibitörleri p21 ve p27'yi yukarı regüle ettiği rapor edilmiştir (Shanmugam vd., 2015).

2.2.4. Kurkumin ve Nöroblastoma

Nöroblastoma, nöral progenitör hücrelerden kaynaklı bir kanser türüdür. Karın ve böbreküstü bezi çevresinin yanı sıra merkezi sinir sisteminde ve pelviks bölgesinde de görülmektedir (Society, 2021). Nöroblastomanın oluşturduğu risk; görülme yaşına, inflamasyon ve protein agregasyonuna, tümörün oluştuğu bölgeye, genetik yatkınlığa ve metastaz derecesine bağlıdır (Zafar vd., 2021). Başlıca risk faktörlerinden biri, nöroblastoma tümör oluşumunu destekleyen *MYCN* amplifikasyonudur (Felsher & Bishop, 1999). Noröblastomada risk faktörleri, genetik değişimler ve potansiyel tedavi yöntemleri *in vitro*, fare ve insan modellerinde çalışılmaktadır. Bahsedildiği gibi nöroblastoma için tedaviler, cerrahi müdahale ve kemoterapi gibi geleneksel kanser tedavilerini içermektedir. Bunun yanı sıra kök hücre tedavisi ve immünoterapi gibi tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır (Zhai vd., 2020). Bu tedavi yöntemleri nöroblastomayı tamamen ortadan kaldırmayı amaçlasa da oluşturduğu, toksisite ve miyelosupresyon, potansiyel olarak zararlı yan etkilere neden olabilmektedir. Bu tedavilerin getirdiği dezavantajlar, bitkisel bileşenlerin anti-kanser özelliklerinin araştırıldığı çalışmaların sayısının artmasına neden olmuştur (Baker vd., 2010). Doğal maddeler, çoğu diyetle alınan doğal olarak oluşan kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşiklerin bazıları, kanseri önlemeyi ve kanser tedavisini desteklemektedir. Örneğin flavonoidler, hücre dışı matris (ECM) proteinlerinin modülasyonu, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) inhibisyonu ve kanser hücresi metabolizmasının inhibisyonu yoluyla kanseri baskılayabilmektedir (Samec vd., 2020). Kötü huylu nöroblastoma hücreleri kemoterapi ve radyasyon tedavisine karşı direnç göstermektedir. Tümörlerde NFκB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin yukarı regülasyonu, bu artan dirençten kısmen sorumludur (Zhai vd., 2020). Farklı nöroblastoma hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalar, güçlü ve doğal NFκB inhibitörü olan kurkuminin kanser hücrelerinin hayatta kalmasını önemli ölçüde azalttığını ve radyasyon tedavisi ile kombinasyon halinde insan nöroblastoma hücrelerinde apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlediğini raporlamıştır (Aravindan vd., 2008). Özellikle, çeşitli tümör hücrelerinde p53'e bağlı hücre ölümünü spesifik ve etkili bir şekilde aktive edebilmektedir (Jee, Shen, Tseng, Chiu & Kuo, 1998).

İn vitro ve *in vivo* yapılan çalışmalar, kurkuminin nöroblastoma hücre hatları üzerinde; apoptozun indüklenmesi ve hücre döngüsünün baskılanması, proliferatif sinyal yollarının aşağı regülasyonu, hücre göçünün engellenmesi ve hücresel glukoz metabolizmasının bozulması gibi bir dizi onkolojik etkiyi uyardığını göstermektedir (Zhai vd., 2020).

Kanserli hücrelerde, serin-treonin kinaz AKT, NFκB, nükleer faktör kappa hafif zincir geliştiricisi, Bcl-2 ve Survivin gibi proliferatif ve hayatta kalma efektörleri aktifken, apoptotik efektörler sitokrom C, p53 ve kaspazlar baskılanmaktadır. Kurkumin, apoptozu tetiklemek ve hücre döngüsünün durmasını arttırmak için nöroblastomadaki hücre içi sinyal mekanizmalarını değiştirmektedir (Jee vd., 1998). Kurkumin, AKT ve NFκB sinyal yolaklarının aşağı regülasyonu, mitokondriyal disfonksiyonun indüklenmesi, p53'ün yukarı regülasyonu ve kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozu teşvik etmektedir (Zhai vd., 2020).

Kurkumin PTEN'in ekspresyonunu arttırarak AKT'nin aşağı regülasyonuna ve dolayısıyla sitozolden çekirdeğe AKT geçişini azaltmaktadır (Fumarola vd., 2014). AKT'nin aşağı regülasyonu; NFκB'nin aşağı regülasyonuna, proapoptotik mitokondriyal protein Bad'in yukarı regülasyonuna ve sitozolden mitokondriye translokasyonunun uyarılmasına, bunun sonucunda Bim ve Fas-L'nin yukarı regülasyonu ve Kaspaz 8'in aktivasyonu gibi bir dizi olayları etkilemektedir (Picone vd., 2014). Kurkumin ayrıca mitokondriyal zarı depolarize ederek Bcl-2'nin aşağı regülasyonuna ve bununla birlikte proapoptotik Bax'ın yukarı regülasyonuna neden olmaktadır (Kalashnikova vd., 2017). Kurkumin, bu ve bunun gibi apoptoz ile ilişkili birçok proteini düzenleyerek tümör hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Kurkumin ayrıca p21 ve p27 proteinlerinin up-stream yolundaki proteinleri etkileyerek hücre döngüsünün durmasını sağlamaktadır (Namkaew, Jaroonwitchawan, Rujanapun, Saelee & Noisa, 2018).

Bahsedilen bu pozitif etkilerine rağmen kurkumin, zayıf biyoyararlanımı olan doğal bir bileşiktir. Bağırsaklardaki emilimi düşük, fizyolojik pH durumunda, özellikle bağırsaklarda, bozunum gösterebilmekte ve zayıf çözünürlüğü bulunmaktadır (Wahlstrom & Blennow, 1978). Bunun gibi dezavantajlarının üstesinden gelebilmek için peperin gibi adjuvanların kullanımı, nanopartiküllerin kullanımı ve lipozomlar ve fosfolipitlerin kullanımı gibi birçok yaklaşım sağlanmıştır ve yeni formülasyonlar geliştirilmiştir (Gagliardi vd., 2020). Bunlardan biri de yeni nesil ultrasol kurkumin (Next

generation ultrasol curcumin, NGUC)'dir (Yabas vd., 2021). Araştırmacılar, biyoyararlanımı arttırmak için standardize edilmiş %95'lik kurkuminoid özütünü, asitleştiriciler, monogriseritler ve fosfolipidler ile birlikte izopropil alkol içerisinde çözdürmüş ve daha sonra solüsyona tokoferol, orta-zincir trigriserit yağı ve hipomelloz eklenerek yeni bir formülasyon geliştirmişlerdir (Yabas vd., 2021). Kullanılan yardımcı maddelerden fosfolipitler ve monogliseritler çözünürlüğü ve bağırsak emilimini artırmak için, asitleştiriciler ince bağırsağın alkali pH'ında kurkuminin mikroçevresini korumak için ve orta-zincir trigriserit yağı ve hipomellozu ise biyoyararlanımı artırmak için kullanılmıştır (Yabas vd., 2021). Bu bileşik kullanılarak yapılan bir *in vivo* çalışmada NGUC'un, rodent plazmasında kurkumine oranla 64,7 kat daha fazla olduğunu gösterilmiştir ve ince bağırsağın alkali pH'ına dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (Yabas vd., 2021). Ayrıca, NGUC uygulamasının ratlarda deneysel olarak oluşturulmuş diz osteoartrit modelinde iyileştirici etkisi olduğunu raporlamışlardır. Bu etkinin, IL-1β, TNF-α ve MMP-3 dahil olmak üzere pro-inflamatuar mediyatörleri ve NFκB, COX-2 gibi önemli faktörleri regüle ederek gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir (Yabas vd., 2021). Yine yakın zamanda yapılan bir çalışmada, NGUC uygulaması ratlarda egzersiz performansını artırmış ve kas hasarını azaltmıştır (Sahin vd., 2021).

Özellikle artmış biyoyararlanım özelliğinden ötürü NGUC, kurkumine göre daha etkili bir bileşik olabilme potansiyeline sahiptir. Dahası NGUC'un potansiyel etkileri hiçbir kanser türünde çalışılmamıştır. Dolayısıyla, bu tezde NGUC'un N1E-115 nöroblastoma hücre hattı üzerine olan potansiyel etkileri kurkumin ile karşılaştırmalı olarak literatürde ilk kez araştırılmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında kullanılan N1E-115 (ATCC, CRL-2263) fare nöroblastoma hücre hattı Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (TÜTAGEM) alınarak kültürü ve devam çalışmaları aşağıdaki gereçler ve yöntemler kullanılarak Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma, Lot: RNBJ06117)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Ref: 41966-029)
Penicilin/Streptomisin (Gibco, Ref:15140-112)
L-Glutamin (Gibco, Ref: 25030-024)
%0.25 Tripsin-EDTA (Gibco, Ref: 25200-056)
Fetal Bovine Serum (FBS) Premium Heat İnactivated (Cegrogen, Cat No: A0500-3030)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X (DPBS) (ThermoFisher-Gibco-by life Technologies, Ref: 14190-094)
Dimethyl Sulfoxide (Sigma, D8418)

FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit with PI (BioLegend, Cat#640914)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat# 4368814)

RNA Mini Kit (İnvitrogen by Thermo Fisher Scientific, Cat No: 12183018A)

%99 Ethanol Absolute (Isolab)

DNAase/RNAase içermeyen su (Invitrogen)

Cyber Green Master mix (Applied Biosystems by Life Technologies)

Ultrapure™ Distiled Water (İnvitrogen, Ref: 10977-035)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Karbondioksitli inkübatör (Heal Force)

Hassas terazi (Shimadzu, ATX224)

Vortex (Biosan Vortex V-1 plus)

Mikroplaka okuyucu (Allsheng, AMR-100)

Mikroskop (Motic)

Biyo-güvenlik kabini (Alpina)

Flow sitometri (Attune Acoustic Focusing Cytometer, Applied Biosystems)

Santrifüj (Gyrozen, 1730R)

Santrifüj (Gyrozen, 624R)

T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

Real time qPCR, Picoreal 96 (Thermo Fisher)

Nanodrop (NaNoQ, OPTIZEN)

Otomatik pipet seti (DLAB)

Çok kanallı pipet (Lambda, Corning)

Steril kültür kapları, 25 cm^2, 75 cm^2 (NEST)

96 kuyucuklu hücre kültür kabı (NEST)

Hücre proliferasyon ölçüm kiti (MTT) (Biomatik, Katalog No: A-3338-56)

5 ml ve 10 ml serolojik pipet (NEST)

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü

1:1 oranında karıştırılan DMEM ve F-12 içerisine %1 L-glutamin, %1 penicilin/streptomicin ve yaklaşık %6 oranında FBS eklenerek hazırlanan besiyeri hücrelerin kültüründe kullanılmıştır.

TÜTAGEM'de -150°C'de kriyotüplerde saklanan N1E-115 fare nöroblastoma hücreleri 37°C'deki su banyosunda ısıtılarak çözdürülmüştür. Hücreler 15 ml'lik tüplere alınarak üzerine 37°C'ye ısıtılmış 5-6 ml besiyeri eklenmiştir ve 1250 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı kısım atılmıştır ve oluşan pellete 4 ml besiyeri eklenip 25 cm^2'lik flasklara yaydırılmıştır. Mikroskopta kontrol edilerek inkübatöre bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyondan sonra hücreler %80-90'lık alanı kapladığı için küçük flasktan büyük 75 cm^2'lik flaska alınmıştır. Bunun için önce medyum yavaşça uzaklaştırılmıştır. Ölü hücreleri uzaklaştırmak içinse flask 1-2 ml DPBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelere 2-4 ml Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 5 dk. bekletilmiştir. Tripsin aktivitesini inhibe etmek için FBS'li besiyeri eklenerek 15 ml'lik tüpe alınmıştır. 1250 rpm'de 2 dk. santifüj edilmiştir ve santrifüj sonrası üst kısım atılarak üzerine 5 ml taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler resüspanse edilmiştir ve 1 ml hücre alınarak içerisinde 10 ml besiyeri bulunan 75 cm^2'lik flasklara ekilmiştir. Hücrelerin dağılımı mikroskop altında kontrol edilmiştir ve 37°C'de %5'lik CO_2 ve nem içeren inkübatöre bırakılmıştır.

Kültürü sürdürmek için hücrelerin besi ortamı 2-3 günde bir tazelenmiştir. Mikroskopla yapılan gözlemlerle hücrelerin yüzeyi kaplama oranına göre (yaklaşık %90) pasajlanmasına karar verilmiş ve her bir pasajlama işlemi aşağıda verilen yöntemle yapılmıştır.

Hücrelerin bulunduğu flasklardan besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 3 ml DPBS ile yıkandıktan sonra 2-4 ml Tripsin-EDTA eklenip inkübatörde 5 dk. inkübe edilmiştir. Hücrelerin süspanse hale geldiği mikroskop ile kontrol edildikten sonra tripsin aktivitesini inhibe etmek için FBS'li besiyeri eklenerek 15 ml'lik tüpe alınmıştır ve 1250 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Üst kısım dikkatli bir şekilde atılmıştır. Daha sonra hücreler 4-5 ml besiyeri ile resüspanse edildikten sonra yeterli sayıda hücre için 2 flaska

ekim yapılmıştır. İnkübatöre bırakılmıştır ve hücre sayısı yeterli düzeye gelince deneylerde kullanılmıştır.

3.2.2. NGUC'un Hazırlanışı ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

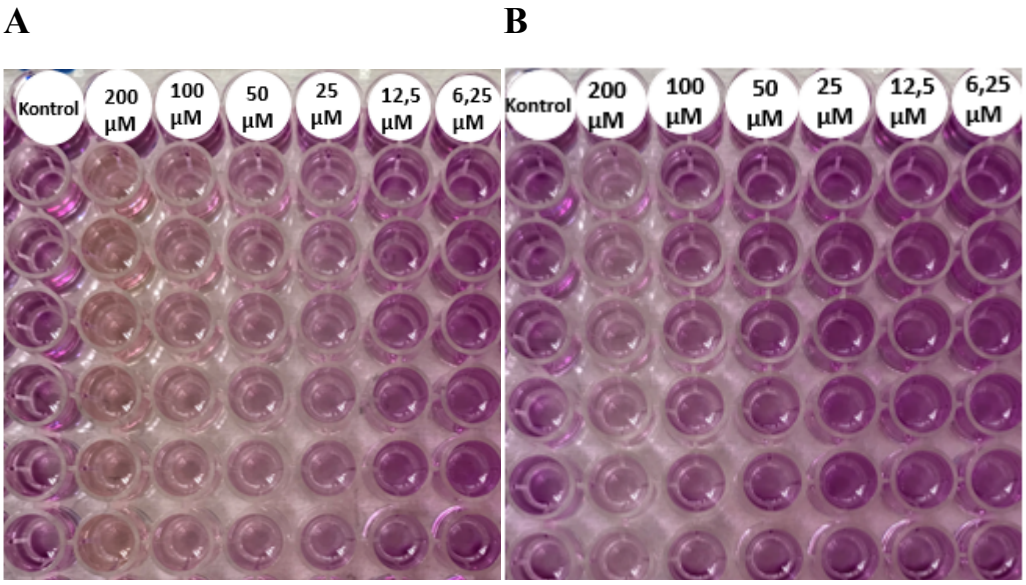
NGUC için, standardize edilmiş %95'lik kurkuminoid özütü, asitleştirici, monogriseritler ve fosfolipidler ile birlikte izopropil alkol içerisinde 55-60°C'de 40 dakika boyunca çalkanarak çözdürülmüştür. Solüsyon 40°C'ye soğutulmuş ve içerisine tokoferol, orta-zincir trigriserit yağı ve hipomelloz eklenerek 45 dakika boyunca çalkanarak homojen bir solüsyon elde edilmiştir. Bileşik daha sonra kurutularak sarımsı-turuncu bir toz elde edilmiştir (Yabas vd., 2021). Bu işlemler Hindistan'da yapılmış olup NGUC toz halinde laboratuvarımıza gönderilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan kurkumin ve NGUC'un molekül ağırlıkları aynıdır (368,38 gram/mol). Bu yüzden stok ve uygulama dozları hazırlanırken aynı hesaplamalar kullanılmıştır. Aynı miktarda kurkumin ve NGUC tartılmış ve hücrelere uygulandığında son konsantrasyonu %1 olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülerek ana stok hazırlanmıştır. Daha sonra seri dilüsyon yöntemi ile 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM ve 6,25 µM olacak şekilde uygulama dozları ayarlanmıştır. Kontrol grubu için hücreler ile muamele edildiğinde son konsantrasyonu %1 DMSO içeren besiyeri kullanılmıştır.

3.2.3. MTT Yöntemi ile Canlılık Tayini

Yetmiş beş cm^2'lik flasklara ekilen hücreler yeterli büyüme gösterdikten sonra daha önce bahsedildiği şekilde tripsinize edilmiştir. Santrifüjden sonra resüspanse hale getirilerek tek bir plaka için gerekli olan besiyeri üzerine eklenerek hücre küvetine alınmıştır. Hücreler, besiyeri içeresinde her bir kuyucuğa 180 µl olacak şekilde düz tabanlı 96-kuyucuklu plakalara çok kanallı otomatik pipet ile ekilmiştir. Hücrelerin plaka yüzeyine tutunmaları için duplikasyon sürelerine yani hücrelerin iki katına çıkma süresine göre yaklaşık 24 saat beklenilmiştir. İnkübasyondan sonra kurkumin ve NGUC belirlenen konsantrasyonlarda ve %10 DMSO (kuyucuğa eklendiği zaman konsantrasyonu %1 olmaktadır) her bir kuyuya 20 µl olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır ve 37°C'de %5 CO_2 inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra 5 mg/ml MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 20 µl eklenmiştir. Hücreler 2-4 saat inkübe edildikten sonra

kuyucuklardaki besiyeri ve MTT solüsyonun tamamı mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara 180 µl DMSO eklenmiştir. Kuyucuklardaki renk değişimi meydana geldikten sonra (Şekil 3.1), Allsheng AMR-100 plaka okuyucu ile 492 nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri % canlılık olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubundan elde edilen değer %100 canlılık olarak alınmıştır ve diğer dozlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır ve her bir doz için hücre sağ kalım-ölüm oranı hesaplanmıştır. Kontrol ve 8 adet doz, 6 tekerrürlü olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Deney farklı zamanlarda en az 3 kez tekrarlanarak elde edilen sonuçların tutarlılığı kanıtlanmıştır.



Şekil 3.1. MTT testinde kullanılan plakaların 48 saatlik inkübasyon sonrası görüntüleri. N1E-115 hücrelerine belirtilen konsantrasyonlarda (A) kurkumin ve (B) NGUC uygulaması sonrasında hücrelerde formazan kristallerinin canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimiyle indirgenmesi sonucunda oluşan renk değişimi.

3.2.4. Flow Sitometri ile Apoptotik Hücrelerin Tayini

Sağlıklı hücrelerde fosfatidilserin (PS) hücre zarının iç yüzeyinde bulunmaktadır. Apoptoza uğrayan bir hücrede asimetrik lipid kompozisyonu bozulur ve normalde hücre zarının iç kısmında bulunan PS, plazma zarının dış kısmına transloke olmaktadır. Annexin-V, PS için yüksek afinite, özgüllük ve duyarlılık göstermektedir, dolayısıyla erken apoptozun bir belirteci olarak kullanılabilmektedir. Apoptotik hücreleri tespit

etmek için Annexin-V boyaması sadece canlı hücreler ve doku üzerinde yapılırken, Promidium Iodide (PI) gibi belirteçler, plazma ve nükleer membranların bütünlüğünün kaybı ile karakterize edilen nekrotik veya geç apoptotik hücreleri saptamak için kullanılmaktadır (Rieger, Nelson, Konowalchuk & Barreda, 2011). Bu çalışmada FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit with PI (Biolegend, Cat#640914) kullanılarak canlı/ölü hücreleri ayırt edilmiştir.

Hücrelere madde uygulaması yapıldıktan ve 48 saatlik inkübasyondan sonra hücreler tripsinizasyon işlemi ile süspanse hale getirilerek 1500 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Hücreler daha sonra bir kez flow sitometri yıkama solüsyonu (PBS+%2 FBS) ile ve bir kez de 1X Annexin-V binding buffer ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiştir. 1X Annexin-V binding buffer içerisinde; Annexin-V 1/20 oranında ve PI 1/10 oranında dilüe edilerek antikor kokteyli hazırlanmıştır. Flow sitometri cihazının kompanzasyonu için kontrol grupları oluşturulmuştur (1-Hiçbir boya ile boyanmamış, sadece hücreler, 2-sadece Annexin-V ile boyanan hücreler ve 3-sadece PI ile boyanan hücreler). Hazırlanan antikor kokteyli madde uygulanan ve daha sonra yıkanarak pellet haline getirilen hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücreler oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 20 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 1X Annexin-V binding buffer ile yıkanarak santrifüj edilmiştir ve yine 1X Annexin-V binding buffer ile resüspanse edilerek en geç 2 saat içerisinde flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Hazırlanan kontrol grupları ile cihaz kompanzasyon ayarları yapıldıktan sonra her bir örnek ayrı ayrı analiz edilerek veriler alınmıştır. Daha sonra elde edilen veriler Flow Jo (Tree Star) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.5. Revers-Transkriptaz PCR

Belirlenen dozlarda kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra hücrelerde hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerini tespit etmek için; RNA Mini Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Cat No: 12183018A) kullanılarak hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Sonrasında High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat# 4368814) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Total RNA İzolasyon Prosedürü

RNA'lar, üretici firma tarafından tavsiye edilen protokole uygun lizat hazırlığı, genomik DNA'nın uzaklaştırılması, RNA saflaştırması, kolon yıkaması ve RNA elüsyonu aşamaları ile aşağıda detaylandırıldığı şekilde izole edilmiştir.

1) Hücreler belirlenen dozlarda kurkumin ve NGUC ile 48 saat inkübe edilmiştir.
2) İnkübasyon sonrası plakalardaki besiyeri dökülerek 1-2 ml DPBS ile yıkanmıştır.
3) Plakaların üzerine 350 µl kit içerisinde bulunan Buffer RL (lizis buffer) eklenmiştir. 5 dk. bekletilmiştir ve hücrelerin plaka tabanından kalkması sağlanmıştır.
4) Hücreler bir toplama tüpüne aktarılarak 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
5) Her bir 100 µl hücre süspansiyonu için 60 µl %96'lık etanol eklenmiştir.
6) RNA toplama tüpü ve saflaştırma kolonu hazırlandı ve etanollü hücre süspansiyonundan 600 µl tüpün tam ortasına eklenmiştir. 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
7) Ardından 400 µl wash A solüsyonu kolona eklenerek 14.000 rpm'de 1dk. santrifüj edilmiştir.
8) 6. Basamak iki kez daha tekrar edilerek kolonun yıkanması sağlanmıştır. Son olarak hiçbir solüsyon koymadan tekrar aynı değerlerde santrifüj edilmiştir.
9) İçerisinde RNA bulunan kolon temiz bir elüsyon tüpüne yerleştirilmiştir ve 50 µl elution solution A eklenmiştir. 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
10) RNA elüsyon tüpüne alınmıştır ve nanodrop (NaNoQ, OPTIZEN)'da 260-280 nm UV absorbans değerinde 2 µl yüklenerek okunmuştur. İzolasyonu yapılan hücrelerden elde edilen RNA miktarları RNA içermeyen ultra saf su (Sigma) ile eşitlenmiştir.
11) Örneklerden izole edilen RNA'lar bir sonraki analize kadar -80 °C'de saklanmıştır.

RNA'ların miktarları ve saflık miktarları Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. RNA miktarları ve saflıkları

	N1E-115	
Grup	**RNA miktarı µg/µl**	**RNA saflıkları**
Kontrol 1	165,5	2,11
Kontrol 2	165	2,13

Kontrol 3	124,8	2,07
Kurkumin 10 µM	120,1	2,08
Kurkumin 10 µM	133,9	2,04
Kurkumin 10 µM	105,1	2,15
NGUC 10 µM	192	2,17
NGUC 10 µM	309,9	2,16
NGUC 10 µM	273,1	2,13
NGUC 40 µM	360,5	2,18
NGUC 40 µM	153,5	2,08
NGUC 40 µM	138,4	1,86

3.2.5.2. cDNA Sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, tek bir 20 µl'lik reaksiyonda 2 µg'a kadar toplam RNA'nın tek iplikli cDNA'ya kantitatif dönüşümü için gerekli tüm bileşenleri (10x RT tamponu, 10x Random Primerler, 25x dNTP mix, MultiScribe™ Ters Transkriptaz) içermektedir.

Protokole göre, RNA'lardan 10 µl (2µg) ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protokolüne uygun olarak hazırlanan cDNA karışımından (Çizelge 3.2) 10 µl olmak üzere toplamda 20 µl PCR mikrosantrifüj tüplerine eklenmiştir. Çizelge 3.3'te detayları verilen koşullarda PCR yapılmıştır. T-100 Thermal Cycle PCR cihazına uygun şartlar sağlanarak cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA'lar -80 C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. cDNA mix protokolü/PCR mix bileşenleri

cDNA PCR mix bileşenleri (µl)	**1 örnek için Reaksiyon Hacmi (µl)**
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP mix	0,8

10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™Reverse Transcriptase	1,0
Nuclease-free Water	4,2
Toplam reaksiyon	10

Çizelge 3.3. PCR koşulları

Adımlar	**Sıcaklık**	**Zaman**
Adım 1	25 °C	10 dakika
Adım 2	37 °C	120 dakika
Adım 3	85 °C	5 dakika

3.2.5.3. Gerçek Zamanlı PCR

Kontrol hücreleri ve madde uygulanan gruplar arasındaki gen ifadesi farklılıklarını belirlemek için yapılan qPCR için Picoreal™ 96 real time PCR cihazı kullanılmıştır. Yukarıda açıklandığı şekilde elde edilen cDNA'lar SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak 96 kuyucuklu plakalarda spesifik primerler ile çoğaltılmıştır. Analizden elde edilen piklere ait Ct değerleri gen ifadelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Değerler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Housekeeping gen olarak β-actin kullanılmıştır. Gen ifadelerinin belirlenmesinde Çizelge 3.4'te verilmiş olan 15-23 baz çifti uzunluğunda 11 adet primerin Forward ve Reverse primer karışımları hazırlanmıştır. Bu tez kapsamında;

- NFκB sinyal yolağı için; NFκB, IKB-α, PI3K, AKT
- Apoptotik yolak için; Bcl-2, Bax, Kaspaz 8, Kaspaz 3
- Hücre döngüsü için; p21, p27, p53 proteinleri kodlayan genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri test edilmiştir.

Çizelge 3.4. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri

(Bostanci, 2021).

Gen ailesi Housekeeping gen	**Gen adı**	**Baz dizisi**	
β-actin	Human gene and protein abbreviation ACTB/ACTB	Forward Reverse	5’ CTTTGGGCGGAAGACAGGTC 3’ 5’ TTATTGGCGGCTGTGTAAGA 3’

Gen ailesi Hücre döngüsü sinyal yolağı	**Gen adı**	**Baz dizisi**	
P21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	Forward Reverse	5’GGAAGACCATGTGGACCTGT 3’ 5’GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA 3’
P27	Cyclin-dependent kinase inhibitör p27 kip1	Forward Reverse	5’GCCCTCCCCAGTCTCTCTTA 3’ 5’TCAAAACTCCCAAGCACCTC 3’
P53	Tumor Protein 53	Forward Reverse	5’CACGAGCGCTGCTCAGATAGC 3’ 5’ACAGGCACAAACACGCACAAA 3’

Gen ailesi NFκB sinyal yolağı	**Gen adı**	**Baz dizisi**	
NFκB	Nuclear factor kappa B	Forward Reverse	5'AACAGAGAGGATTTCGTTTCCG 3' 5'TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT3'
IKB-α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Forward Reverse	5'CTCCGAGACTTTCGAGGAAATAC3' 5'GCCATTGTAGTTGGTAGCCTTCA3'
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases	Forward Reverse	5'GATTGGTTCTTTCCTGTCTCTG3' 5'CCACAAATATCAATTTACAACC3'
AKT	Serine/Threonine Kinase 1	Forward Reverse	5'TCTATGGCGCTGAGATTGTG3' 5'CTTAATGTGCCCGTCCTTGT3'

Gen ailesi Apoptoz sinyal yolağı	**Gen adı**	**Baz dizisi**	
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	Forward Reverse	5'CAGCTGCACCTGACG3' 5'ATGCACCTACCCAGC3'
Bax	Bcl-2 associated X	Forward Reverse	5'ATGGACGGGTCCGGGGAG3' 5'TCAGCCCATCTTCTTCCA3'
Caspase 3	Caspase 3	Forward Reverse	5'TCTATGGCGCTGAGATTGTG3' 5' CTGTACCAGACCGAGATGTCA 3'

Caspase 8	Caspase 8	Forward Reverse	5'AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC3' 5'GCTGCTTCTCTCTTTTGCTGAA3'

96 kuyucuklu qPCR plakalara primer mix, SYBR Green qPCR Mastermix ve cDNA reaksiyon bileşenlerinden eklenmiştir (Çizelge 3.5). Üzerine naylon kaplama (strip) çekilerek Picoreal™ Thermo cihazında analiz edilmiştir.

Çizelge 3.5. Real time PCR mix bileşenleri

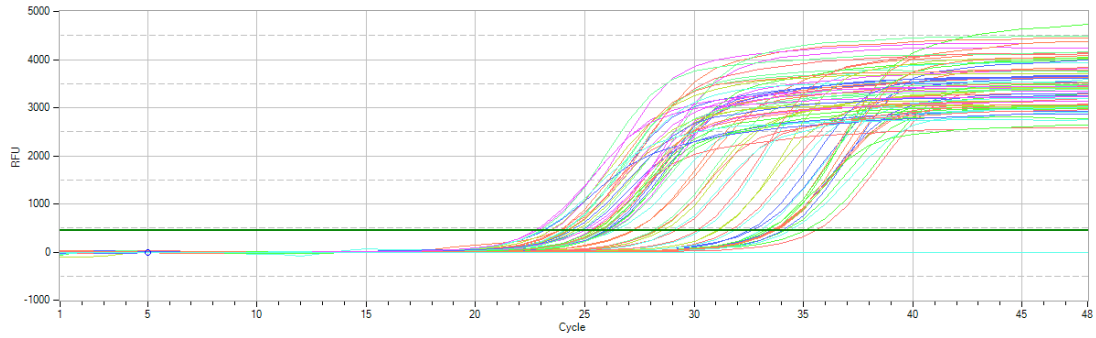
RT-PCR mix bileşenleri (µl)	**1 örnek için Reaksiyon Hacmi (µl)**
Primer mix (F-R)	2,0
cDNA	2,0
Syber Green PCR Master Mix	5,0
Nuclease-free Water	1,0
Toplam reaksiyon	10

RT-PCR döngüsü:

Enzimlerin tutunması ve Denatürasyon: 1 döngü 50 ºC 2 dk. ve 95 ºC 7 dk.

48 döngü

- Denatürasyon: 95 ºC 5 sn
- Annealing (Primer eşleşmesi): 60 ºC 5 sn
- Elongasyon (Primer uzaması): 60 ºC 30 sn aşamaları ile DNA'lar çoğaltılmış ve Şekil 3.2'deki gibi bir amplifikasyon eğrisi elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra hücrelerin Picoreal cihazında elde edilen amplifikasyon görüntüsü.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Örneklerin istatistiksel analizleri, GraphPad Prism 5 programı kullanılarak One-Way ANOVA testi ve sonrasında Tukey post testi ile yapılmış ve $P<0.05$ olduğunda anlamlı farklılıklar olduğu kabul edilmiştir. Aynı şekilde, GraphPad Prism 5 programı kullanılarak MTT sonuçlarından maddelerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. Kurkumin ve NGUC Uygulaması N1E-115 Hücrelerinin Proliferasyonlarını Azaltır

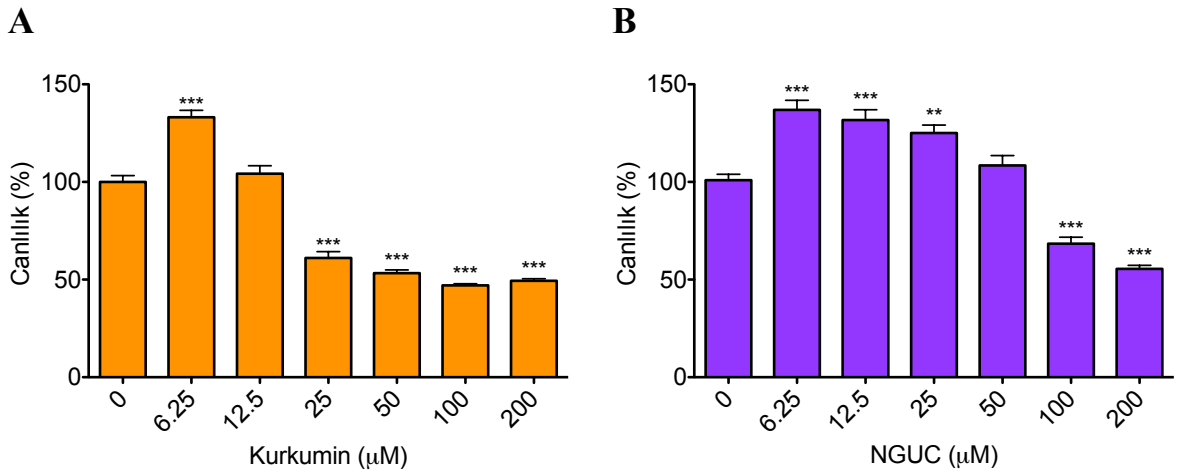
Kurkuminin N1E-115 hücreleri üzerine doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisinin belirlenmesi için, kurkumin farklı dozlarda N1E-115 nöroblastoma hücrelerine uygulanmıştır ve sitotoksik etkisi MTT analiziyle değerlendirilmiştir. İlk yapılan denemelerde hücrelere 6,25-200 μM arasındaki dozlarda madde uygulanmıştır ve sonrasında 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. MTT analizi sonucunda 24 saatlik denemede kurkuminin etkisinin sınırlı olduğu gözlemlenmiştir. N1E-115 hücrelerin iki katına çıkma süresi (doubling time) yaklaşık olarak 20-22 saat olduğu için bu denemelerde sonuç gözlenmemesi muhtemeldir. Dolayısıyla diğer denemelerde aynı dozlar uygulanarak 48 saatlik uygulama sonrası analiz yapılmıştır. Metot kısmında açıklandığı gibi 96-kuyucuklu plakalara ekilen hücrelere, her bir doz kendi içerisinde 6 tekrarlı olacak şekilde farklı dozlarda kurkumin uygulanmıştır. Kurkumin uygulanmış N1E-115 hücreleri 48 saat 37°C'de %5'lik CO_2 inkübatörde inkübe edildikten sonra MTT testi yapılmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere hiçbir madde uygulanmamış fakat kuyucuklardaki son konsantrasyonu %1 olan DMSO uygulanmıştır. Kontrol grubu verileri baz alınarak MTT sonucu ortaya çıkan değerler yüzdelik üzerinden hesaplanmıştır. Kırk sekiz saatlik madde uygulamasından sonra elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 200, 100 ve 50 μM kurkumin uygulamalarının N1E-

115 hücrelerinin canlılığını yaklaşık olarak %50 oranında azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.1A). Benzer şekilde, 25 µM konsantrasyondaki kurkumin uygulamasının N1E-115 hücrelerinin canlılığını %40 oranında azalttığı bulunmuştur (Şekil 4.1A). 12,5 µM konsantrasyondaki kurkumin uygulaması hücreler üzerinde herhangi bir etki göstermezken, 6,25 µM konsantrasyondaki kurkuminin N1E-115 hücrelerinin proliferasyonlarını artırıcı bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1A). GraphPad programı kullanılarak yapılan analizde kurkumin için IC_{50} değeri 78,56 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2A). Elde ettiğimiz bu sonuçların literatürde farklı nöroblastoma hücre hatlarıyla yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Zhai vd., 2020).

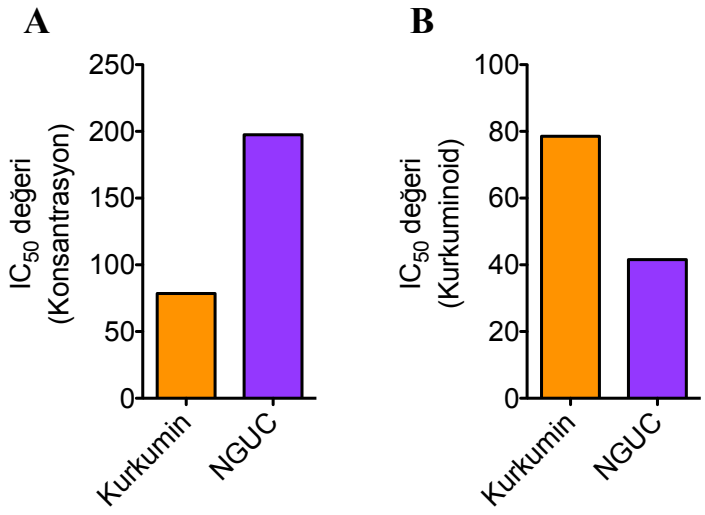
Sonraki aşamada, kurkumin ile benzer şekilde, N1E-115 hücreleri 6,25-200 µM arasındaki dozlarda NGUC ile muamele edilmiştir. 96-kuyucuklu plakalara, her bir doz kendi içerisinde 6 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Madde uygulanmış N1E-115 hücreleri 48 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığı MTT testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 200 µM NGUC uygulamasının hücre canlılığını yaklaşık olarak %45 oranında azalttığı bulunmuştur (Şekil 4.1B). Benzer şekilde 100 µM NGUC uygulamasının N1E-115 hücrelerinin canlılıklarını %33'lük bir oranda azaltmıştır (Şekil 4.1B). 50 µM konsantrasyondaki NGUC uygulaması hücreler üzerinde herhangi bir etki göstermezken, daha düşük dozlarda (25, 12,5 ve 6,25 µM) uygulanan NGUC'un N1E-115 hücrelerinin proliferasyonlarını artırıcı bir etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.1B). Bu etkiler NGUC formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan diğer bazı bileşenlerin yalnız başına veya sinerjistik etkilerinden kaynaklanıyor olabilmesi muhtemeldir. Yine GraphPad programı kullanılarak yapılan analizde NGUC için IC_{50} değeri 197,50 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2A).

Elde edilen sonuçlar maddelerin uygulandığı konsantrasyon (molarite) açısından değerlendirildiğinde, kurkuminin NGUC'a göre N1E-115 hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu engellediğini göstermiştir (Şekil 4.1). Ancak belirtilmelidir ki kurkumin uygulanan grupta saf kurkuminoid oranı %95 iken, NGUC içerisinde sadece %20 oranında kurkuminoid bulunmaktadır (Yabas vd., 2021). Oranlama yapıldığında (95/20) saf kurkumin içeriği açısından 4,75 kat fark bulunmaktadır. Uygulanan maddelerdeki kurkuminoid içeriğinin eşitlenmesi için NGUC'un IC_{50}'si 4,75'e bölündüğünde 41.58 değeri çıkmaktadır (Şekil 4.2B). N1E-115 hücrelerine

uygulanan maddelerin içerdiği kurkuminoidler eşitlendiğinde NGUC'un daha düşük bir IC_{50} değerine sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2B). Dolayısıyla, elde edilen sonuçlar bu bağlamda değerlendirildiğinde NGUC'un kurkumine oranla N1E-115 hücrelerinde daha iyi bir sitotoksisiteye sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.1. Kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinin canlılıkları. 96-kuyucuklu plakalara ekilen eşit sayıdaki N1E-115 hücreleri belirtilen konsantrasyonlarda (A) kurkumin ve (B) NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra hücrelerdeki canlılık MTT testi ile tespit edilmiştir. Veriler kontrol grubuna göre %'lik olarak hesaplanmıştır. Grafikler üç farklı deneyden elde edilen sonuçların birleştirilmesi ile oluşturulmuş ve her bir deneyde elde edilen veriler kontrol grubuna göre oranlanmıştır. Deneylerin her birinde uygulanan her bir doz için n=6 olup değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Örneklerin istatistiksel analizleri One-Way ANOVA testi ve sonrasında Tukey post testi ile yapılmıştır. **P<0.01, ***P<0.001.



Şekil 4.2. N1E-115 hücrelerine uygulanan kurkumin ve NGUC'un IC_{50} değerleri. MTT deneylerinden elde edilen sonuçlar GraphPad programı ile analiz edilmiş ve uygulanan maddelerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. (A) Aynı konsantrasyonda (molarite) uygulanan kurkumin ve NGUC'un IC_{50} değerleri ve (B) Kurkuminoid içeriğinin eşitlenmesi için NGUC IC_{50}'si 4,75'e bölünerek (95/20) elde edilen IC_{50} değerleri gösterilmektedir.

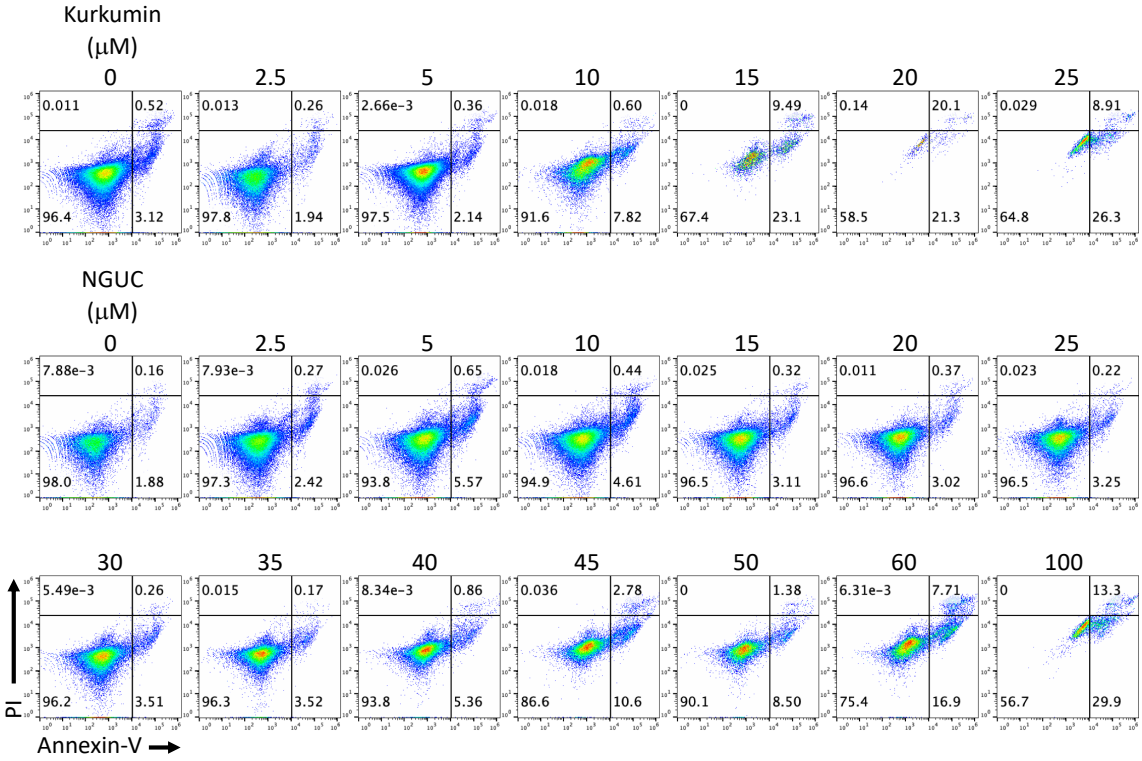
4.2. Kurkumin ve NGUC Uygulaması N1E-115 Hücrelerinde Apoptozu Uyarır

MTT analizinden elde edilen sonuçlar kurkumin ve NGUC'un belirli konsantrasyonlarda N1E-115 hücrelerini öldürebilme potansiyelleri olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Bir sonraki aşamada kurkumin ve NGUC'un hücrelerde apoptozu tetikleyip tetiklemediği test edilmiştir. Metot kısmında bahsedildiği gibi N1E-115 hücreleri farklı dozlarda kurkumin ve NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra Annexin-V ve PI boyaları ile işaretlenmiştir ve flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen veriler daha sonra FlowJo programı ile analiz edilmiştir. Yapılan birçok deneme sonrası kurkumin için 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM ve 25 µM; NGUC için ise 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM, 45 µM, 50 µM, 60 µM, 100 µM dozları uygulandıktan sonra analizler yapılmıştır. MTT deneylerinde olduğu gibi, 0 µM (kontrol) değeri kurkumin ve NGUC uygulanmayan fakat kuyucuklardaki son konsantrasyonu %1 olan DMSO'yu ifade etmektedir.

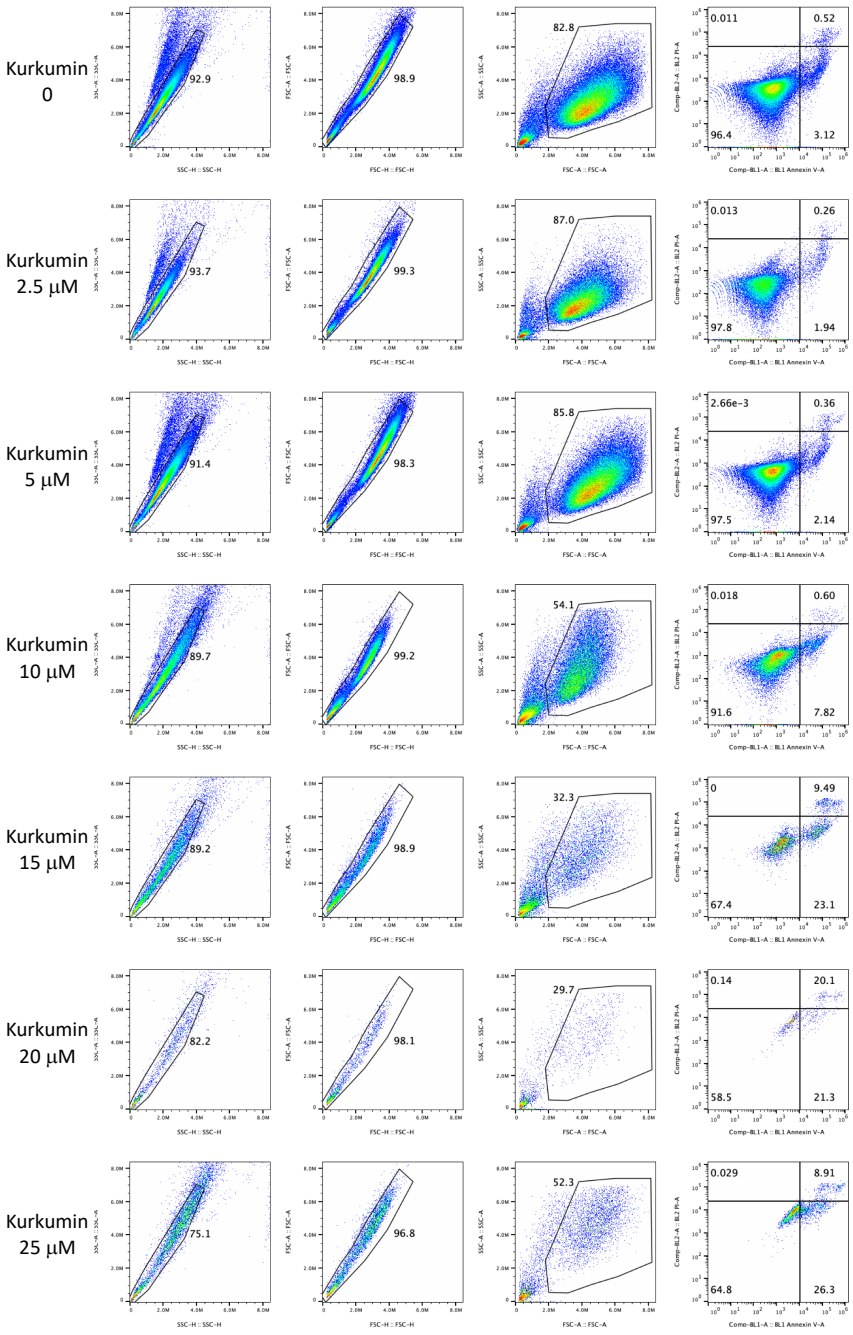
Elde edilen sonuçlara göre 2,5 µM ve 5 µM kurkumin uygulanan hücrelerde herhangi bir etki gözlenmemiştir (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1). Fakat 10 µM kurkumin

uygulamasının Annexin-V^{-}PI^{-} canlı hücre popülasyonunda dikkate değer bir düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1). 2,5 µM ve 5 µM kurkumin uygulaması sonrası hücrelerdeki Annexin-V^{-}PI^{-} canlı hücre oranı yaklaşık olarak %98 iken bu oran 10 µM kurkumin uygulaması sonrasında %92'ye düşmüştür (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1). Dahası 10 µM kurkumin uygulaması sonrasında Annexin-V^{+}PI^{-} apoptotik hücre popülasyonunda bir artışın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1). Daha dikkat çekici veri ise SSC (hücrelerin granülitesi) vs. FSC (hücrelerin büyüklüğü) analizinde elde edilmiştir. 2,5 µM ve 5 µM kurkumin uygulaması sonrası hücrelerdeki SSC vs. FSC kapılaması oranı yaklaşık olarak %86 iken bu oran 10 µM kurkumin uygulaması sonrasında %54'e düşmüştür (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1). Yine 15 µM ve daha fazla konsantrasyonlardaki kurkumin uygulamalarının N1E-115 hücrelerinde apoptozu önemli ölçüde tetiklediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1).

NGUC'un N1E-115 hücreleri üzerinde apoptotik etkisini incelemek için yapılan değerlendirmede ise 2,5-25 µM arası konsantrasyonlardaki NGUC uygulamasının benzer sonuçlar verdiği ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark edilebilir bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3, 4.5 ve Çizelge 4.1). Fakat 30 µM NGUC uygulamasından sonra özellikle SSC vs. FSC kapılaması oranında bir azalma olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.1). Hem Annexin-V^{-}PI^{-} canlı hücre oranında hem de SSC vs. FSC kapılaması oranındaki azalma 40 µM ve daha fazla dozda NGUC uygulamalarından sonra elde edilmiştir (Şekil 4.3, 4.5 ve Çizelge 4.1). MTT sonuçları ile tutarlı olacak şekilde, kurkumin ve NGUC karşılaştırıldığında kurkumin dozlarının yaklaşık 3,5-4 kat fazla NGUC dozu ile eşdeğer bir şekilde apoptozu tetiklediği gözlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve Çizelge 4.1). Elde edilen sonuçlar hücrelere uygulanan konsantrasyonlar açısından değerlendirildiğinde kurkuminin NGUC'a göre daha düşük konsantrasyonlarda N1E-115 hücrelerinde apoptozu tetiklediği gözlenmiştir. Ancak, uygulanan maddelerin içerisindeki saf kurkuminoid oranı açısından (kurkuminde %95 ve NGUC'da %20) değerlendirildiğinde, NGUC'un kurkumine göre daha etkili olduğu söylenebilmektedir.



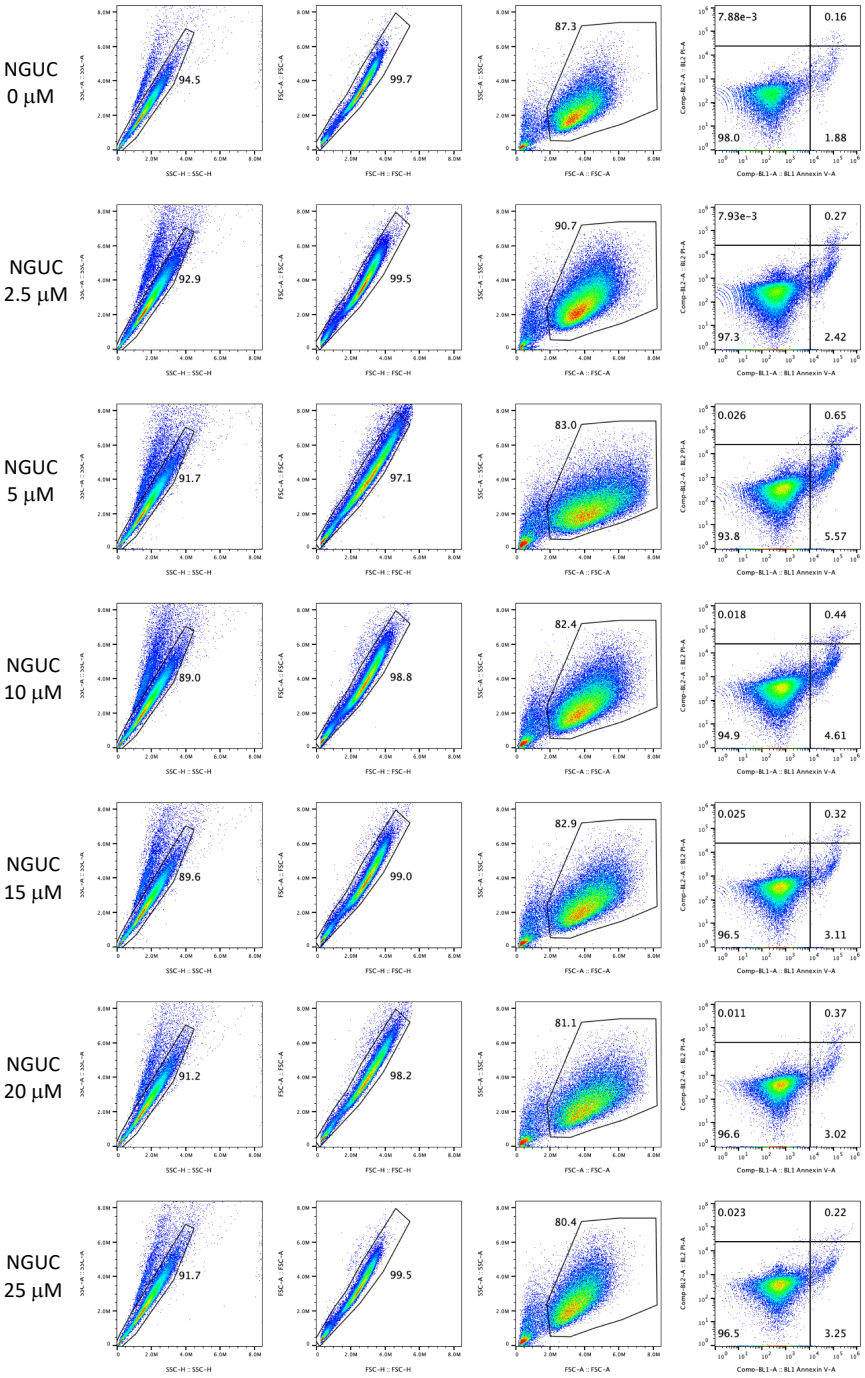
Şekil 4.3. Düşük konsantrasyonlardaki kurkumin N1E-115 hücrelerinde apoptozu tetiklerken, daha yüksek konsantrasyonlardaki NGUC apoptozu tetiklemek için gereklidir. Eşit sayıdaki N1E-115 hücreleri belirtilen konsantrasyonlardaki kurkumin ve NGUC ile 48 saat muamele edilmiş ve hücreler Annexin-V ve PI boyaları ile işaretlendikten sonra flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak Şekil 4.4'da kapılama stratejisine göre analiz edilmiş ve analizlerde canlı hücreler Annexin-$V^{-}PI^{-}$, erken (early) apoptotik hücreler Annexin-$V^{+}PI^{-}$ ve geç (late) apoptotik/nekrotik hücreler Annexin-$V^{+}PI^{+}$ olarak belirlenmiştir. Her bir alandaki sayılar o alanda bulunan hücrelerin yüzdesini ifade etmektedir.



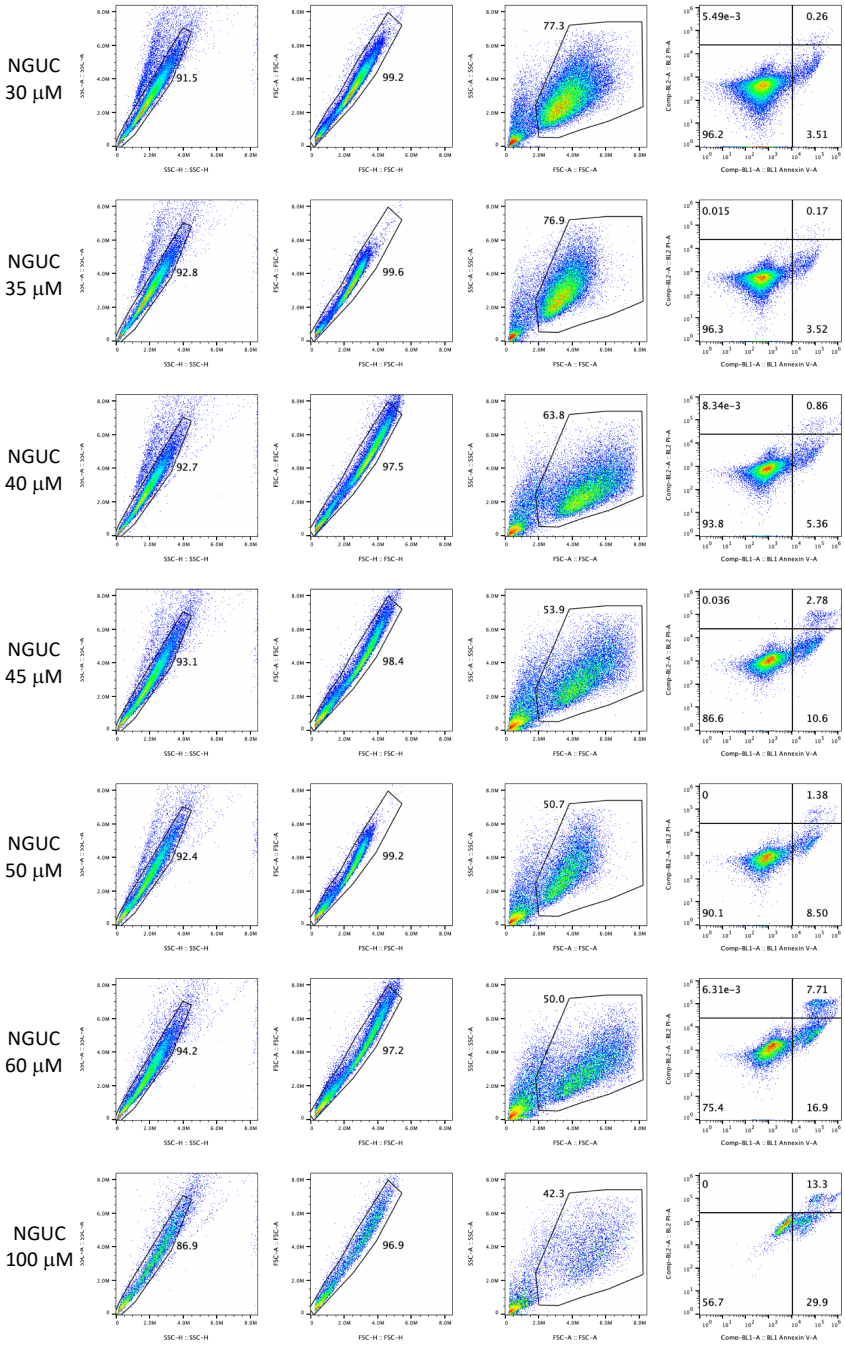
Şekil 4.4. Kurkumin uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için kapılama stratejileri ve her bir örnek için analizin ayrı ayrı gösterilmesi. Eşit sayıdaki N1E-115 hücreleri belirtilen konsantrasyonlardaki kurkumin ile 48 saat muamele edilmiş ve daha sonra flow sitometri cihazında analizi yapıldıktan sonra elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hücreler ilk önce SSC-A (Side scatter-Area) vs SSC-H (Side scatter-Height) (soldan birinci panel) ve FSC-A (Forward scatter-Area) vs FSC-H (Forward scatter-Height) (soldan ikinci panel) profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs FSC-A (soldan üçüncü panel) profillerine göre hücreler seçilmiş ve seçilen bu hücrelerde Annexin-V ve PI analizi (soldan dördüncü panel) yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Kurkumin ve NGUC uygulamasından 48 saat sonra N1E-115 hücrelerinde canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesi

	Uygulanan Dozlar	SSC vs. FSC kapılaması	Canlı Hücreler (%)	Apoptotik Hücreler (%)	Nekrotik Hücreler (%)
Kurkumin	0	82,8	96,4	3,12	0,26
	2,5 μM	87,0	97,8	1,94	0,36
	5 μM	85,8	97,5	2,14	0,60
	10 μM	54,1	91,6	7,82	8,49
	15 μM	32,3	67,4	23,10	9,49
	20 μM	29,7	58,5	21,30	20,10
	25 μM	52,3	64,8	26,30	8,91
NGUC	0	87,3	98,0	1,88	0,16
	2,5 μM	90,7	97,3	2,42	0,27
	5 μM	83,0	93,8	5,57	0,65
	10 μM	82,4	94,9	4,61	0,44
	15 μM	82,9	96,5	3,11	0,32
	20 μM	81,1	96,6	3,02	0,37
	25 μM	80,4	96,5	3,25	0,22
	30 μM	77,3	96,2	3,51	0,26
	35 μM	76,9	96,3	3,52	0,17
	40 μM	63,8	93,8	5,36	0,86
	45 μM	53,9	86,6	10,60	2,78
	50 μM	50,7	90,1	8,50	1,38
	60 μM	50,0	75,4	16,90	7,71
	100 μM	42,3	56,7	29,90	13,30



Şekil 4.5. NGUC uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için kapılama stratejileri ve her bir örnek için analizin ayrı ayrı gösterilmesi. Eşit sayıdaki N1E-115 hücreleri belirtilen konsantrasyonlardaki NGUC ile 48 saat muamele edilmiş ve daha sonra flow sitometri cihazında analizi yapıldıktan sonra elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hücreler ilk önce SSC-A (Side Scatter-Area) vs SSC-H (Side Scatter-Height) (soldan birinci panel) ve FSC-A (Forward Scatter-Area) vs FSC-H (Forward Scatter-Height) (soldan ikinci panel) profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs FSC-A (soldan üçüncü panel) profillerine göre hücreler seçilmiş ve seçilen bu hücrelerde Annexin-V ve PI analizi (soldan dördüncü panel) yapılmıştır.



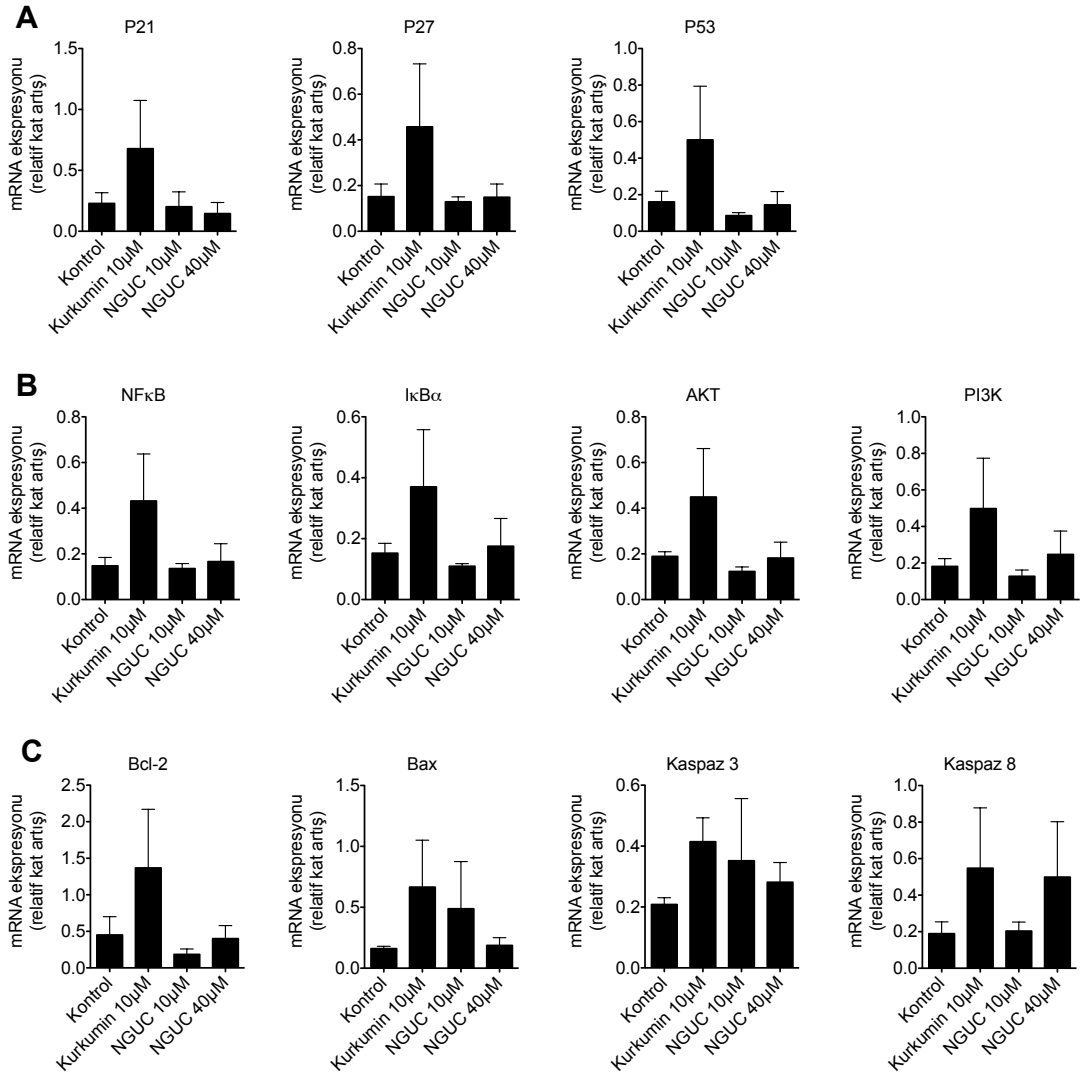
Şekil 4.5. (devamı) NGUC uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için kapılama stratejileri ve her bir örnek için analizin ayrı ayrı gösterilmesi. Eşit sayıdaki N1E-115 hücreleri belirtilen konsantrasyonlardaki NGUC ile 48 saat muamele edilmiş ve daha sonra flow sitometri cihazında analizi yapıldıktan sonra elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hücreler ilk önce SSC-A (Side Scatter-Area) vs SSC-H (Side Scatter-Height) (soldan birinci panel) ve FSC-A (Forward Scatter-Area) vs FSC-H (Forward Scatter-Height) (soldan ikinci panel) profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs FSC-A (soldan üçüncü panel) profillerine göre hücreler seçilmiş ve seçilen bu hücrelerde Annexin-V ve PI analizi (soldan dördüncü panel) yapılmıştır.

4.3. Kurkumin ve NGUC Uygulamasının N1E-115 Hücrelerinde Hücre Döngüsü, NFκB ve Apoptoz Yolaklarında Rol Oynayan Genlerin mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkisi

Kurkumin ve NGUC uygulamasının N1E-115 nöroblastoma hücrelerinde sitotoksisite ve apoptozu tetiklediği bulunduktan sonra, bir sonraki aşamada bu etkileri hangi mekanizma veya mekanizmalar aracılığı ile yapabildiği test edilmiştir. Bunun için kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinde hücre döngüsü, NFκB ve apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan bazı hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri test edilmiştir. N1E-115 hücreleri, kurkumin ve NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra cDNA'lar sentezlenerek kontrol ve madde uygulanan gruplarda gerçek zamanlı PCR yöntemi ile hedef genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

İlk önce hücre döngüsünde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonları test edilmiştir. Kurkumin uygulamasından sonra N1E-115 hücrelerinde p21, p27 ve p53 proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.6A). Benzer şekilde hem 10 uM hem de 40 uM NGUC uygulamasının N1E-115 hücrelerinde p21, p27 ve p53 proteinlerini kodlayan genlerin mRNA ekspresyonlarında kontrol grubuna oranla belirgin bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.6A).

Sonraki aşamada kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra NFκB ve apoptoz sinyal yolaklarında bulunan bazı genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Kurkumin uygulanan hücrelerde test edilen genlerin ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.6B ve 4.6C). Hücrelere NGUC uygulanması sonrasında yapılan analizler de benzer sonuçlar vermiştir ve test edilen genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.6B ve 4.6C). Bu sonuçlar kurkumin ve NGUC'un N1E-115 hücrelerinde bu çalışmada test edilen genlerin mRNA seviyeleri üzerine belirgin bir etkisinin olmadığını ileri sürmektedir.



Şekil 4.6. Kurkumin ve NGUC uygulamasının N1E-115 hücrelerinde hücre döngüsünde, NFκB ve apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan genlerin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi. Eşit sayıdaki N1E-115 hücreleri 10 μM kurkumin, 10 μM ve 40 μM NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. Sonrasında (A) hücre döngüsünde, (B) NFκB ve (C) apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan bazı genlerin ekspresyonları qPCR ile belirlendi. Elde edilen sonuçlar referans gen olan β-actin ifadesine göre normalize edilmiştir. Sonuçlar bir kez yapılan deneyden elde edilmiş olup uygulanan her bir doz için n=3'tür. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Kanser yaş grubu fark etmeksizin her insanda görülebilmektedir. Fakat çocuklarda ortaya çıkan kanser türleri yetişkin bireylerde görülen kanser türlerinden farklılık gösterebilmektedir. Çocuklarda görülen kanserler, tüm kanserlerin %0,5-4,6'sını oluşturmakta ve özellikle 5 yaşın altındaki çocuklarda ve 10-15 yaş aralığında görülmektedir. Nöroblastoma da bunlardan biridir ve çocuklarda görülen kanserlerin yaklaşık %6-7'sini kapsamaktadır (Muslu & Kolutek, 2018). Bir tür sinir hücreleri kaynaklı olan nöroblastoma, özellikle embriyonik dönemde ortaya çıkmakta ve en sık bebeklerde veya beş yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir. Sempatik sinir sistemi kaynaklı olduğu için sinir ağı boyunca ortaya çıkabilmektedir. En çok böbreküstü bezlerde ve karın bölgesinin üst tarafında görülmektedir (Zafar vd., 2021). Nöroblastoma tedavisinde geleneksel cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Bilim insanları geçmişten bugüne birçok insanın hayatına mal olmuş kansere karşı etkili tedavi yöntemleri geliştirmek için gerek kimyasal gerek radyolojik teknikler kullanmışlardır. Doğada bulunan bitkilerden elde edilen çeşitli ekstraktlar da konvansiyonel tedavi yöntemlerine ilave olarak çoğu hastalığın tedavisinde istenmeyen yan etkileri azaltmada kullanılmakta ve umut vadeden sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri de zerdeçaldan elde edilen kurkumin özütüdür. Polifenolik bir bileşik olan kurkumin, başlarda anti-inflamatuar ve kozmetikte yaşlanma karşıtı olarak kullanılırken

gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalarla anti-diyabetik ve anti-kanser özellikleri ile de birçok bilim insanı tarafından ilgi görmüş ve etkisi çeşitli kanser modellerinde *in vitro* ve *in vivo* çalışılmıştır (Zhai vd., 2020). Yapılan çalışmalarda, kurkuminin hücre içi ve hücre dışı birçok sinyal yolağındaki transkripsiyon ve büyüme faktörlerini, inflamatuar mediyatörleri ve sitokinleri, hücre döngüsü proteinlerini, enzimleri, protein kinazları ve apoptotik proteinleri gibi hücrelerin yaşamı için elzem olan birçok proteini etkileyebildiği gösterilmiştir (Kotha & Luthria, 2019).

Kurkuminin ortaya konmuş olumlu etkilerine rağmen sulu ortamda düşük çözünürlüğü, zayıf biyoyararlanımı ve farmakokinetik profilleri gibi sınırlamaları bulunmaktadır (Kotha & Luthria, 2019). Bu yüzden kurkumin için çeşitli adjuvanlar ve formülasyonlar geliştirilmiştir (Gagliardi vd., 2020) Yakın zamanda geliştirilen ve yeni nesil ultrasol kurkumin (Next Generation Ultrasol Curcumin, NGUC) olarak adlandırılan yeni bir formülasyonun normal kurkumine göre rat plazmasında 64,7 kat daha fazla bulunduğu, dolayısıyla yüksek biyoyararlanımı olabileceği düşünülmüştür (Yabas vd., 2021). NGUC'un iyileştirici etkileri deneysel olarak oluşturulmuş diz osteoartrit modelinde gösterilmiştir (Yabas vd., 2021). Dahası NGUC ratlarda egzersiz performansını artırmış ve kas hasarını azaltmıştır (Sahin vd., 2021). Kurkumine göre avantajlarından dolayı bu tez kapsamında N1E-115 nöroblastoma hücrelerinde NGUC'un etkileri kurkumin ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Literatürde farklı nöroblastoma hücre hatları kullanılarak kurkuminin etkileri çalışılmış ve farklı dozlar kullanılarak kurkuminin bu hücrelerde sitotoksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin yapılan bir çalışmada kurkumin Bex genlerini regüle ederek N2A hücrelerinde anti-kanser özelliği göstermiştir (Sidhar & Giri, 2017). Yine Freudlsperger ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Lan-5, SK-N-SH ve Kelly nöroblastoma hücrelerinde en fazla sitotoksisiteyi 100 μM kurkumin dozunda görmüşlerdir (Freudlsperger, Greten & Schumacher, 2008). 2020 yılında yapılan bir çalışmada ise Lan-5 nöroblastoma hücre hattı kullanılmış ve 200, 100 ve 50 μM konsantrasyondaki kurkumin uygulamasının hücre ölümünü tetiklediğini tespit etmişlerdir (Caruso Bavisotto vd., 2020). Benzer şekilde bu çalışmada ilk olarak hücre kültüründe çoğaltılan hücreler farklı konsantrasyonlarda kurkumin ile muamele edilerek MTT analizi ile sitotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Diğer nöroblastoma hücre hatlarındaki etkilerine benzer şekilde, kurkuminin N1E-115 hücrelerinde hücre canlılığını

belirli dozlarda (200, 100, 50 ve 25 μM) önemli ölçüde azalttığı literatürde ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Dolayısıyla hem literatürdeki diğer çalışmalar hem de bu tez çalışması, kurkuminin farklı nöroblastoma hücre hatlarında sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

Benzer şekilde, N1E-115 nöroblastoma hücreleri farklı konsantrasyonlardaki NGUC ile de muamele edilmiş ve sitotoksik etki MTT analizi ile tespit edilmiştir. Biyoyararlanımı daha fazla olduğu için (Yabas vd., 2021) kurkuminden daha az konsantrasyonda kullanılacak NGUC'un daha etkili olacağı varsayılmıştır. Kurkumin ile aynı konsantrasyonda NGUC uygulamalarından sonra yapılan analizde ortaya çıkan sonuç, %55'e yakın ölüm oranı ancak 200 μM olan en yüksek NGUC konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. Yine 100 μM NGUC uygulamasında %30'dan fazla sitotoksik etki gözlemlenmiş ve daha az konsantrasyonlarda kullanılan NGUC, N1E-115 hücreleri üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Bu sonuçlar kurkumin gibi NGUC'un da belirli dozlarda nöroblastoma hücreleri üzerine sitotoksik etkileri olduğunu açıkça ortaya çıkarmıştır. Ancak konsantrasyon açısından NGUC'un etkisi kurkumine oranla daha az olmuştur.

Yapılan çalışmalar kurkuminin hücrelerde apoptozu tetikleyerek hücrelerde sitotoksisiteyi arttırdığı gözlenmiştir (Freudlsperger vd., 2008). Kurkumin ve NGUC'un N1E-115 hücrelerinde sitotoksisiteyi arttırdığı gösterildikten sonra, hücrelerin apoptotik yolak üzerinden hücre ölümünü gerçekleştirip gerçekleştirmediği bu çalışmada da test edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalara benzer olarak her iki madde farklı dozlarda N1E-115 hücrelerinde apoptozu uyarmıştır. Ancak MTT analizlerine benzer şekilde, aynı konsantrasyonlarda uygulandığında kurkuminin NGUC'a göre daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Kanser multifaktöriyel bir hastalıktır. İçsel ve dışsal birçok yolakta rol oynayan proteinler, sitokinler ve sinyal molekülleri kanser hücrelerinde, normal sağlıklı hücrelerden farklı olarak, ekspresyonları artmakta veya azalmaktadır. Yapılan birçok çalışma, kurkuminin farklı sinyal yolaklarını etkileyerek kanser hücrelerinde sitotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Kurkumin nöroblastoma hücrelerinde apoptozun ve hücre döngüsünün durmasını sağlamak için Kaspas 8, Bcl-2, NFκB ve AKT gibi hücre içi sinyal mekanizmalarında rol oynayan proteinleri etkilemektedir

(Kalashnikova vd., 2017; Zhai vd., 2020). Bu çalışmada yapılan mekanistik analizlerde kurkumin uygulanan hücrelerde hücre döngüsü, NFκB sinyal yolağı ve apoptotik sinyal yolağında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon düzeyleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Benzer şekilde NGUC uygulamasının da aynı genler üzerine bir etkisi gözlenmemiştir. Literatürde diğer nöroblastoma hücre hatları ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan farklı olan bu bulgular dört ihtimal ile açıklanabilir. (I) Kurkumin ve NGUC uygulamasının N1E-115 hücrelerinde test edilen genlerin üzerine herhangi bir etkisi yoktur ve bu çalışmada test edilmeyen ve aynı sinyal yolaklarında rol oynayan diğer genler üzerinden etki göstermektedir. (II) Bu çalışmada tek doz kurkumin (10 μM) ve iki farklı doz NGUC (10 ve 40 μM) kullanılarak hücrelerde hücre döngüsü, NFκB sinyal yolağı ve apoptotik sinyal yolağında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Dolasıyla kullanılan dozların maddelerin etki etme limitlerinin altında kalmış olması istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlenmemiş olmasını açıklayabilir. Nitekim MTT sonuçlarında kurkumin için 25 μM, NGUC için ise 100 μM'dan daha düşük konsantrasyonlarda etki görülmemiştir. Benzer şekilde apoptotik hücrelerin belirlendiği flow sitometrik analizlerde kurkumin için 15 μM, NGUC için ise 50 μM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda etki görülmeye başlanmıştır. Her ne kadar gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi deneylerinde, literatürde kullanılan dozlar seçilse de bu dozlar N1E-115 hücreleri için bu çalışmada yapılan deneylerde yetersiz kalmış olabilir. (III) Sitotoksisite gözlenen dozlarda araştırılan genler ekspres edilse dahi, mRNA seviyesinde retardasyona uğratılabilecekleri ve böylelikle hücrelerin apoptoz sinyallerinden kaçabileceği de muhtemeldir. Çünkü nöroblastoma epigenetiksel regülasyon mekanizmaları tarafından da önemli bir şekilde yönetilir. Hücrelerin blastom özellikte olmaları da bizlere farklılaşmaya ve kaçış mekanizmalarını kullanmaya açık olduğunu düşündürtmektedir. (IV) Son olarak kurkumin ve NGUC'un N1E-115 hücrelerini farklı ölüm yolakları üzerinden etkileyebilmeleri de muhtemeldir. Zira son yıllarda yapılan çalışmalar hücrelerin homeostazı sağlamak için farklı ölüm mekanizmalarını kullanabildiklerini göstermiştir. Örneğin intrinsik ve ekstrinsik yolakların aktivasyonu sonucu hücreler apoptoza uğrayabilecekleri gibi nekroptoz, ferroptoz, piroptoz, entoz, partanatoz ve siklofilin D aracılı hücre ölüm mekanizmaları da bulunmaktadır (Nirmala & Lopus, 2020). Dolayısıyla, kurkumin ve NGUC'un belirtilen bu yolakların biri veya birkaçı üzerinden

de N1E-115 hücrelerinin ölümünü tetiklemesi muhtemeldir. Gelecek çalışmalarda hem kurkumin hem de NGUC farklı dozlarda uygulandıktan sonra bu çalışmada test edilen genlere ilave olarak diğer yolaklarda rol oynayan genlerin de ekspresyon düzeylerinin test edilmesiyle bu maddelerin N1E-115 nöroblastoma hücrelerinde sitotoksisite ve apoptozu hangi yolaklar üzerinden tetiklediği daha net bir biçimde ortaya konmalıdır.

Bu çalışmanın amaçlarından biri de kurkumin ve NGUC'un etkilerinin karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi ve NGUC'un kurkumine göre daha etkili olup olmadığının test edilmesidir. Sonuçlarımız kurkuminin NGUC'a göre daha düşük konsantrasyonlarda etki ettiğini göstermiştir. Ancak önemle belirtilmelidir ki, bu çalışmada her ne kadar maddeler hücrelere aynı konsantrasyonlarda uygulandıysa da kullanılan kurkumin ve NGUC içerisindeki saf kurkuminoid oranı birbirinden farklıdır. Kurkumin uygulanan gruptaki saf kurkuminoid oranı %95 iken, NGUC içerisinde sadece %20 oranında kurkuminoid bulunmaktadır (Yabas vd., 2021). Her iki maddede bulunan saf kurkuminoid oranlaması yapıldığında (95/20) arada 4,75 kat fark bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlar bu bağlamda değerlendirildiğinde NGUC'un kurkumine oranla biraz daha iyi bir etkiye sahip olabileceği söylenebilir. Nitekim oranlama yapıldıktan sonra elde edilen NGUC'un IC_{50} değeri kurkuminden daha az olmuştur. Fakat yine de NGUC'un etkisi, daha önce yapılan çalışmalardan (Sahin vd., 2021; Yabas vd., 2021) elde edilen sonuçlara göre beklenilenin altında kalmıştır. Ancak unutulmamalıdır ki, daha önce yapılan çalışmalarda NGUC ratlara oral olarak verilmiş ve etkisi *in vivo* olarak test edilmiştir. Bu çalışmada ise, N1E-115 fare nöroblastoma hücre hattını kullanılarak NGUC'un etkisi *in vitro* olarak test edilmiştir. Her ne kadar hücre kültürü canlı organizmayı taklit etse de elde edilen sonuçlar her zaman fizyolojik olarak geçerli olmayabilmektedir. Ayrıca her ne kadar NGUC'un biyobulunurluğu kurkumine oranla artsa da formülasyon sırasındaki konformasyonel değişimler *in vitro* etkisini azaltmış olabilir. Yine fizyolojik şartlarda ortaya çıkan metabolitlerin de *in vitro* ortamdakinden farklı olabileceği ve bunların sonuçları etkileyebileceği de muhtemeldir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında kurkumin ve NGUC'un N1E-115 nöroblastoma hücrelerinin üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiş, her iki maddenin de hücreler üzerinde farklı konsantrasyonlarda sitotoksik bir etkiye sahip olduğu literatürde ilk kez gösterilmiştir. Her ne kadar yapılan mekanistik analizler tam olarak bir sinyal yolağı üzerine etkisini net olarak ortaya koymasa da sonuçlar her iki maddenin hücrelerde

apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne neden olduğunu açıkça göstermiştir. Bu çalışmaya ilave olarak gelecekte yapılacak hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, kurkumin ve NGUC'un nöroblastoma hastalarında konvansiyonel tedavi yöntemlerine ilave olarak yan etkileri azaltabilecek doğal bir bileşik olarak kullanılabilirliğini ortaya koyacaktır.

KAYNAKLAR

Agarwal, R., Goel, S. K., & Behari, J. R. (2010). Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *J Appl Toxicol, 30*(5), 457-468.

Amalraj, A., Pius, A., Gopi, S., & Gopi, S. (2017). Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives - A review. *J Tradit Complement Med, 7*(2), 205-233.

Aravindan, N., Madhusoodhanan, R., Ahmad, S., Johnson, D., & Herman, T. S. (2008). Curcumin inhibits NFkappaB mediated radioprotection and modulate apoptosis related genes in human neuroblastoma cells. *Cancer Biol Ther, 7*(4), 569-576.

Arun, N., & Nalini, N. (2002). Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr, 57*(1), 41-52.

Attiyeh, E. F., London, W. B., Mosse, Y. P., Wang, Q., Winter, C., Khazi, D., McGrady, P. W., Seeger, R. C., Look, A. T., Shimada, H., Brodeur, G. M., Cohn, S. L., Matthay, K. K., Maris, J. M., & Children's Oncology, G. (2005). Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med, 353*(21), 2243-2253.

Aykan, F. (2015). Kanser Oluşum Mekanizmaları. 28 Mayıs 2021 tarihinde http://farukaykan.com/tag/proto-onkogen/ adresinden erişildi.

Baker, D. L., Schmidt, M. L., Cohn, S. L., Maris, J. M., London, W. B., Buxton, A., Stram, D., Castleberry, R. P., Shimada, H., Sandler, A., Shamberger, R. C., Look, A. T., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Matthay, K. K., & Children's Oncology, G. (2010). Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med, 363*(14), 1313-1323.

Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. doi:10.5505/bsbd.2016.93823.

Bharti, A. C., Donato, N., & Aggarwal, B. B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol, 171*(7), 3863-3871.

Boller, D., Schramm, A., Doepfner, K. T., Shalaby, T., von Bueren, A. O., Eggert, A., Grotzer, M. A., & Arcaro, A. (2008). Targeting the phosphoinositide 3-kinase isoform p110delta impairs growth and survival in neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res, 14*(4), 1172-1181.

Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res, 49*(17), 4682-4689.

Bostanci, A. (2021). *Glioblastoma ve Nöroblastoma Tip Beyin Tümör Hücre Serileri Üzerinde Temozolomid ile Paklitaksel, Melatonin ve Ergosterol İle Oluşturulan Kombine Terapilerinin Etkisi*. (Yayımlanmamış doktora tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A. D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G., Speleman, F., Nicholson, J., Bernheim, A., Betts, D. R., Vandesompele, J., & Van Roy, N. (1999). Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med, 340*(25), 1954-1961.

Brady, H. J., & Gil-Gomez, G. (1998). Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol, 30*(6), 647-650.

Cancer Cells. (2020, 1 Haziran 2020). 25 Mayıs 2021 tarihinde https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/cancer-cells adresinden erişildi.

Caruso Bavisotto, C., Marino Gammazza, A., Lo Cascio, F., Mocciaro, E., Vitale, A. M., Vergilio, G., Pace, A., Cappello, F., Campanella, C., & Palumbo Piccionello, A. (2020). Curcumin Affects HSP60 Folding Activity and Levels in Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci, 21*(2).

Chaturvedi, M. M., Sung, B., Yadav, V. R., Kannappan, R., & Aggarwal, B. B. (2011). NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene, 30*(14), 1615-1630.

Chau, B. N., & Wang, J. Y. (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer, 3*(2), 130-138.

Chial, H. (2008). Tumor Suppressor (TS) Genes and the Two-Hit Hypothesis. 14 Haziran 2021 tarihinde https://www.nature.com/scitable/topicpage/tumor-suppressor-ts-genes-and-the-two-887/ adresinden erişildi.

Chu, E. C., & Tarnawski, A. S. (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit, 10*(10), RA235-241.

Collins, K., Jacks, T., & Pavletich, N. P. (1997). The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A, 94*(7), 2776-2778.

Colon, N. C., & Chung, D. H. (2011). Neuroblastoma. *Adv Pediatr, 58*(1), 297-311.

Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach. Tumor Suppressor Genes.* (S. M. S. Associates Ed. 2. ed.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9894/ adresinden erişildi.

Çefle, K. (2009). Kanser Genetiği. *Klinik Gelişim, 22*. http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/9.pdf adresinden erişildi.

Dhandapani, K. M., Mahesh, V. B., & Brann, D. W. (2007). Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *J Neurochem, 102*(2), 522-538.

Eastham, J. A., Hall, S. J., Sehgal, I., Wang, J., Timme, T. L., Yang, G., Connell-Crowley, L., Elledge, S. J., Zhang, W. W., Harper, J. W., & et al. (1995). In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res, 55*(22), 5151-5155.

Eldridge, L. (2020). Why Tumor Suppressor Genes Are Important in Cancer. tarihinde https://www.verywellhealth.com/what-are-tumor-suppressor-genes-2249209 adresinden erişildi.

Felsher, D. W., & Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell, 4*(2), 199-207.

Forbes, S. A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C. Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., Teague, J. W., Campbell, P. J., Stratton, M. R., & Futreal, P. A. (2011). COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res, 39*(Database issue), D945-950.

Freudlsperger, C., Greten, J., & Schumacher, U. (2008). Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of NFkappaB. *Anticancer Res, 28*(1A), 209-214.

Fujita, T., Igarashi, J., Okawa, E. R., Gotoh, T., Manne, J., Kolla, V., Kim, J., Zhao, H., Pawel, B. R., London, W. B., Maris, J. M., White, P. S., & Brodeur, G. M. (2008). CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst, 100*(13), 940-949.

Fumarola, C., Bonelli, M. A., Petronini, P. G., & Alfieri, R. R. (2014). Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol, 90*(3), 197-207.

Gagliardi, S., Morasso, C., Stivaktakis, P., Pandini, C., Tinelli, V., Tsatsakis, A., Prosperi, D., Hickey, M., Corsi, F., & Cereda, C. (2020). Curcumin Formulations and Trials: What's New in Neurological Diseases. *Molecules, 25*(22).

Garcia-Nino, W. R., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem Toxicol, 69*, 182-201.

Gutierres, V. O., Assis, R. P., Arcaro, C. A., Oliveira, J. O., Lima, T. F. O., Beretta, A., Costa, P. I., Baviera, A. M., & Brunetti, I. L. (2019). Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Phytother Res, 33*(4), 976-988.

Hausman, D. M. (2019). What Is Cancer? *Perspect Biol Med, 62*(4), 778-784.

Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods, 6*(10).

Hinds, P. W., & Weinberg, R. A. (1994). Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev, 4*(1), 135-141.

İzmirli, M. (2013). Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi, 20(1)*, 48-51. https://jag.journalagent.com/vtd/pdfs/VTD_20_1_48_51.pdf adresinden erişildi.

Jaboin, J., Kim, C. J., Kaplan, D. R., & Thiele, C. J. (2002). Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res, 62*(22), 6756-6763.

Jain, S. K., Rains, J., Croad, J., Larson, B., & Jones, K. (2009). Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. *Antioxid Redox Signal, 11*(2), 241-249.

Jee, S. H., Shen, S. C., Tseng, C. R., Chiu, H. C., & Kuo, M. L. (1998). Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol, 111*(4), 656-661.

Kalashnikova, I., Mazar, J., Neal, C. J., Rosado, A. L., Das, S., Westmoreland, T. J., & Seal, S. (2017). Nanoparticle delivery of curcumin induces cellular hypoxia and ROS-mediated apoptosis via modulation of Bcl-2/Bax in human neuroblastoma. *Nanoscale, 9*(29), 10375-10387.

Karin, M., Liu, Z., & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol, 9*(2), 240-246.

Kelly, G. L., & Strasser, A. (2020). Toward Targeting Antiapoptotic MCL-1 for Cancer Therapy. *Annual Review of Cancer Biology.* 10 Eylül 2022 tarihinde https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033510 adresinden erişildi.

Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., & McClements, D. J. (2017). Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. *J Agric Food Chem, 65*(8), 1525-1532.

Kim, S., & Chung, D. H. (2006). Pediatric solid malignancies: neuroblastoma and Wilms' tumor. *Surg Clin North Am, 86*(2), 469-487, xi.

Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell, 87*(2), 159-170.

Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res, 40*(11), 6009-6015.

Kotha, R. R., & Luthria, D. L. (2019). Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules, 24*(16).

Köroğlu, A. (2013). Nöroblastoma Hücreleri. 25 Şubat 2022 tarihinde http://kanbilim.com/?p=406 adresinden erişildi.

Kumar, A., Dhawan, S., Hardegen, N. J., & Aggarwal, B. B. (1998). Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Pharmacol, 55*(6), 775-783.

Liontas, A., & Yeger, H. (2004). Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. *Anticancer Res, 24*(2B), 987-998.

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery, 8*(8), 627-644.

Luo, J., Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell, 4*(4), 257-262.

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer, 9*(3), 153-166.

Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Garcia-Palencia, P., & Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res, 61*(16), 6234-6238.

Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol, 23*(1), 74-88.

Medicine, G. F. (2016). Activated Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. 10 Ağustos 2022 tarihinde https://basicmedicalkey.com/basis-of-cancer/ adresinden erişildi.

Modak, S., & Cheung, N. K. (2010). Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat Rev, 36*(4), 307-317.

Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int, 2014*, 186864.

Muslu, L., & Kolutek, R. (2018). Çocukluk Çağı Kanserleri ve Sağlık Okuryazarlığı. *Güncel Pediatri, JCP 2018;16(3):117-132*.

Nakagawara, A., Li, Y., Izumi, H., Muramori, K., Inada, H., & Nishi, M. (2018). Neuroblastoma. *Jpn J Clin Oncol, 48*(3), 214-241.

Namkaew, J., Jaroonwitchawan, T., Rujanapun, N., Saelee, J., & Noisa, P. (2018). Combined effects of curcumin and doxorubicin on cell death and cell migration of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim, 54*(9), 629-639.

Neuroblastoma - Childhood: Introduction. (2021). 13 Şubat 2022 tarihinde https://www.cancer.net/cancer-types/neuroblastoma-childhood/statistics adresinden erişildi.

Newman, E. A., Abdessalam, S., Aldrink, J. H., Austin, M., Heaton, T. E., Bruny, J., Ehrlich, P., Dasgupta, R., Baertschiger, R. M., Lautz, T. B., Rhee, D. S., Langham, M. R., Jr., Malek, M. M., Meyers, R. L., Nathan, J. D., Weil, B. R., Polites, S., Madonna, M. B., & committee, A. C. (2019). Update on neuroblastoma. *J Pediatr Surg, 54*(3), 383-389.

Nirmala, J. G., & Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol, 36*(2), 145-164.

Oguzturk, H., Ciftci, O., Aydin, M., Timurkaan, N., Beytur, A., & Yilmaz, F. (2012). Ameliorative effects of curcumin against acute cadmium toxicity on male reproductive system in rats. *Andrologia, 44*(4), 243-249.

Otake, Y., Soundararajan, S., Sengupta, T. K., Kio, E. A., Smith, J. C., Pineda-Roman, M., Stuart, R. K., Spicer, E. K., & Fernandes, D. J. (2007). Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood, 109*(7), 3069-3075.

Özdoğan, M. (2020). Mutasyon Nedir? Nasıl Kanserleşmeye Neden Olur? 25 Mayıs 2021 tarihinde https://www.drozdogan.com/mutasyon-nedir-nasil-kanserlesmeye-neden-olur/ adresinden erişildi.

Özdoğan, M. (2021). Türkiye Kanser İstatistikleri 2020. 15 Şubat 2022 tarihinde https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/ adresinden erişildi.

Park, J. W., & Han, J. W. (2019). Targeting epigenetics for cancer therapy. *Arch Pharm Res, 42*(2), 159-170.

Payton, F., Sandusky, P., & Alworth, W. L. (2007). NMR study of the solution structure of curcumin. *J Nat Prod, 70*(2), 143-146.

Pazarbaşı, A., & Kasap, M. (2003, ARŞİV 2003; 12: 328). Kanser Genetiği. *Dergipark*.

Peaston, A. E., Gardaneh, M., Franco, A. V., Hocker, J. E., Murphy, K. M., Farnsworth, M. L., Catchpoole, D. R., Haber, M., Norris, M. D., Lock, R. B., & Marshall, G. M. (2001). MRP1 gene expression level regulates the death and differentiation response of neuroblastoma cells. *Br J Cancer, 85*(10), 1564-1571.

Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Messina, E., Scafidi, V., & Di Carlo, M. (2014). Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of AKT and Foxo3a nuclear translocation. *Free Radic Res, 48*(12), 1397-1408.

Pivari, F., Mingione, A., Brasacchio, C., & Soldati, L. (2019). Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Nutrients, 11*(8).

Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol, 4*, 64.

Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2014). Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnol Adv, 32*(6), 1053-1064.

Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules, 19*(12), 20091-20112.

Rad, A. (2022, 20 Ocak 2022). Sympathetic nervous system. 13 Şubat 2022 tarihinde https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/sympathetic-nervous-system adresinden erişildi.

Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*(50).

Ryu, W.-S. (2016). *Molecular virology of human pathogenic viruses*: Academic Press. adresinden erişildi

Sahin, E., Orhan, C., Erten, F., Er, B., Acharya, M., Morde, A. A., Padigaru, M., & Sahin, K. (2021). Next-Generation Ultrasol Curcumin Boosts Muscle Endurance and Reduces Muscle Damage in Treadmill-Exhausted Rats. *Antioxidants (Basel), 10*(11).

Samec, M., Liskova, A., Koklesova, L., Samuel, S. M., Zhai, K., Buhrmann, C., Varghese, E., Abotaleb, M., Qaradakhi, T., Zulli, A., Kello, M., Mojzis, J., Zubor, P., Kwon, T. K., Shakibaei, M., Busselberg, D., Sarria, G. R., Golubnitschaja, O., & Kubatka, P. (2020). Flavonoids against the Warburg phenotype-concepts of

predictive, preventive and personalised medicine to cut the Gordian knot of cancer cell metabolism. *EPMA J, 11*(3), 377-398.

Sethi, G., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci, 13*, 5094-5107.

Sethi, G., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2009). Targeting TNF for Treatment of Cancer and Autoimmunity. *Adv Exp Med Biol, 647*, 37-51.

Shanmugam, M. K., Rane, G., Kanchi, M. M., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., Tan, B. K., Kumar, A. P., & Sethi, G. (2015). The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules, 20*(2), 2728-2769.

Shen, H. M., & Tergaonkar, V. (2009). NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis, 14*(4), 348-363.

Shukla, P. K., Khanna, V. K., Khan, M. Y., & Srimal, R. C. (2003). Protective effect of curcumin against lead neurotoxicity in rat. *Hum Exp Toxicol, 22*(12), 653-658.

Sidhar, H., & Giri, R. K. (2017). Induction of Bex genes by curcumin is associated with apoptosis and activation of p53 in N2a neuroblastoma cells. *Sci Rep, 7*, 41420.

Singh, S., & Aggarwal, B. B. (1995). Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem, 270*(42), 24995-25000.

Siveen, K. S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A. P., Tan, B. K., Sethi, G., & Bishayee, A. (2014). Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta, 1845*(2), 136-154.

Society, A. C. (2021). What is Neuroblastoma? 13 Şubat 2022 tarihinde https://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/about/what-is-neuroblastoma.html adresinden erişildi.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin, 71*(3), 209-249.

TKD, T. K. D. (2018). Çocukluk Çağı Kanserleri. 02 Şubat 2022 tarihinde https://m.turkkanserdernegi.org/tr/kanser-turleri/153/cocukluk-cagi-kanserleri.html adresinden erişildi.

Türkiye Kanser Kontrol Programı. (2016)

Van Roy, N., De Preter, K., Hoebeeck, J., Van Maerken, T., Pattyn, F., Mestdagh, P., Vermeulen, J., Vandesompele, J., & Speleman, F. (2009). The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Med, 1*(7), 74.

Vandesompele, J., Baudis, M., De Preter, K., Van Roy, N., Ambros, P., Bown, N., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Combaret, V., Lastowska, M., Nicholson, J., O'Meara, A., Plantaz, D., Stallings, R., Brichard, B., Van den Broecke, C., De Bie, S., De Paepe, A., Laureys, G., & Speleman, F. (2005). Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol, 23*(10), 2280-2299.

Vural, S., & Karaman, S. (2014). Çocukluk Çağı Kanserlerine Eşlik Eden Belirti ve Bulgular. *Dergipark*.

Wahlstrom, B., & Blennow, G. (1978). A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 43*(2), 86-92.

WHO. (2020). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. 15 Şubat 2022 tarihinde https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death adresinden erişildi.

Yabas, M., Orhan, C., Er, B., Tuzcu, M., Durmus, A. S., Ozercan, I. H., Sahin, N., Bhanuse, P., Morde, A. A., Padigaru, M., & Sahin, K. (2021). A Next Generation Formulation of Curcumin Ameliorates Experimentally Induced Osteoarthritis in Rats via Regulation of Inflammatory Mediators. *Front Immunol, 12*, 609629.

Yadav, A., Lomash, V., Samim, M., & Flora, S. J. (2012). Curcumin encapsulated in chitosan nanoparticles: a novel strategy for the treatment of arsenic toxicity. *Chem Biol Interact, 199*(1), 49-61.

Yalcin, B., Kremer, L. C., Caron, H. N., & van Dalen, E. C. (2010). High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane Database Syst Rev*(5), CD006301.

Yıldırım Öztürk, E. N., & Uyar, M. (2021). GLOBALCON 2012 ve 2018 Verileri üzerinden Dünya'da, Avrupa'da ve Türkiye'de En Sık Görülen Beş Kanser Türünün Değerlendirilmesi *DergiPark*.

Yılmaz Bal, H. (2000). Çocukluk Çağı Kanserleri. *Dergipark, 16 (I): 91-105. 2000.*

Yip, K. W., & Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene, 27*(50), 6398-6406.

Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1(2)*, 7-18. http://acikerisim.dicle.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11468/4842/Kanser%20Biyokimyas%c4%b1.pdf?sequence=1&isAllowed=y adresinden erişildi.

Zafar, A., Wang, W., Liu, G., Wang, X., Xian, W., McKeon, F., Foster, J., Zhou, J., & Zhang, R. (2021). Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev, 41*(2), 961-1021.

Zhai, K., Brockmuller, A., Kubatka, P., Shakibaei, M., & Busselberg, D. (2020). Curcumin's Beneficial Effects on Neuroblastoma: Mechanisms, Challenges, and Potential Solutions. *Biomolecules, 10*(11).

Zhao, M., Kim, P., Mitra, R., Zhao, J., & Zhao, Z. (2016). TSGene 2.0: an updated literature-based knowledgebase for tumor suppressor genes. *Nucleic Acids Res, 44*(D1), D1023-1031.

Zou, S., Tong, Q., Liu, B., Huang, W., Tian, Y., & Fu, X. (2020). Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer, 19*(1), 145.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Songül
Soyadı: YENİ

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans : (2019-devam ediyor) Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Lisans : (2015-2019) Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

Lise : (2011-2015) Çorlu Kız Teknik Lisesi, Kimya Teknolojisi

İş Deneyimleri

(2022-devam ediyor) Koçak Farma, Steril Likid Üretim Uzmanı, Çerkezköy, Tekirdağ

Stajlar

(2018) Moleküler Tıp, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul

(2017) Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Edirne

(2013) Çevre Laboratuvarı, Marmara Laboratuvar ve Çevre Analizleri, Çorlu, Tekirdağ

Projeler

1. Beyin kanseri hücrelerinde irisinin etkilerinin araştırılması – Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen Lisans Öğrenci Projesi.

2. Hepatoselüler karsinom hücrelerinde asprosinin etkilerinin araştırılması – Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen Lisans Öğrenci Projesi.
3. Kurkumin ve yeni nesil ultrasol kurkuminin nöroblastoma hücre hattı (N1E-115) üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi – Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen Yüksek Lisans Tez Projesi.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Çalışmalar (Sözlü Sunum)

1. **Songul YENI**, Hilal SAMAST, Ayten BOSTANCI, Mehmet YABAS. "Comparative investigation of the effects of curcumin and new generation ultrasol curcumin on a neuroblastoma cell line" 4th International Agricultural, Biological & Life Science Conference (AGBIOL 2022), 29-31 August 2022, Edirne, Turkey

   Bu tez kapsamında elde edilen bazı veriler, 29-31 August 2022 tarihleri arasında Edirne'de düzenlenen 4. Uluslararası Tarım, Biyoloji ve Yaşam Bilimleri Konferansı'nda (4th International Agricultural, Biological & Life Science Conference, AGBIOL 2022) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

2. Hilal SAMAST, **Songul YENI**, Ayten BOSTANCI, Mehmet YABAS. "Comparative investigation of the effects of curcumin and new generation ultrasol curcumin on a glioma cell line" 4th International Agricultural, Biological & Life Science Conference (AGBIOL 2022), 29-31 August 2022, Edirne, Turkey.