T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KURKUMİN VE YENİ NESİL ULTRASOL KURKUMİNİN GLİOMA HÜCRE HATTI (C6) ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

HİLAL SAMAST

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi MEHMET YABAŞ

EDİRNE-2023

HİLAL SAMAST'ın hazırladığı "**KURKUMİN VE YENİ NESİL ULTRASOL KURKUMİNİN GLİOMA HÜCRE HATTI (C6) 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: 20/01/2023

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.

20/01/2023

Hilal SAMAST

Yüksek Lisans Tezi

Kurkumin ve Yeni Nesil Ultrasol Kurkuminin Glioma Hücre Hattı (C6) Üzerine Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Glioblastoma dünyada birçok yetişkin insanı etkileyen agresif ve ölümcül beyin tümörlerinden biridir. Konvansiyonel tedavi yaklaşımları; radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi gibi yöntemleri içermektedir. Bu yöntemlerin dışında özellikle bazı bitkisel ekstraktların etkileri, konvansiyonel tedavi yöntemler ile birlikte kanser dahil birçok hastalığın tedavisinde test edilmektedir. En çok çalışılan doğal bitkisel bileşiklerden biri de zerdeçaldan elde edilen ve antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-mikrobiyal ve anti-kanser aktivitelere sahip olduğu gösterilen kurkumindir. Ancak suda çözünememesi, düşük bağırsak emilimi gibi dezavantajları biyoyararlanımını azaltmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek için birçok kurkumin formülasyonu geliştirilmektedir. Bu formülasyonlardan biri olan Yeni Nesil Ultrasol Kurkuminin (Next Generation Ultrasol Curcumin, NGUC) normal kurkuminle karşılaştırıldığında rat plazmasında 64.7 kat daha fazla biyobulunur olduğu raporlanmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada NGUC ve kurkuminin C6 glioma hücre hattı üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

C6 hücrelerine farklı dozlarda kurkumin ve NGUC uygulanarak 48 saat inkübe edildikten sonra hücre proliferasyonu MTT analizi ile tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza göre 200μM kurkumin uygulamasından sonra C6 hücrelerindeki canlılık oranı %63,

100μM kurkumin uygulamasından sonra canlılık oranı %50, 50μM kurkumin uygulamasından sonra canlılık oranı %58 ve 25μM kurkumin uygulamasından sonra ise canlılık oranı %75 olarak gözlenmiştir. Diğer taraftan 200μM ve 100μM NGUC uygulamasından sonra C6 hücrelerindeki canlılık oranı kontrol grubu ile kıyaslandığında yaklaşık %70 olarak gözlemlenmiş ve daha düşük konsantrasyonlardaki NGUC uygulamaları hücrelerde herhangi bir sitotoksisiteye neden olmamıştır. Flow sitometrik analizler hem kurkuminin hem de NGUC'un farklı dozlarda C6 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini ortaya koymuştur. Ancak benzer oranda apoptotik hücre tetiklenmesi için NGUC'un kurkumine oranla daha yüksek konsantrasyonda kullanılması gerektiği bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan standart kurkumin içerisindeki saf kurkuminoid oranı %95 iken bu oran NGUC'ta %20'dir (95/20=4,75 kat fark). Bulgularımız bu açıdan irdelendiğinde NGUC'un kurkumine oranla benzer bir etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir. Kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra elde edilen C6 hücrelerinde hücre döngüsü, NFκB ve apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan bazı genlerin mRNA ifadeleri test edilmiş ve her iki bileşiğin de istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında hem kurkumin hem de NGUC'un C6 glioma hücrelerinin proliferasyonlarını azaltıcı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca her iki bileşik C6 hücrelerinde apoptozu tetiklemiş, ancak test edilen bazı hedef genlerin mRNA ifade düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Ayrıca beklenilenin aksine NGUC'un etkisinin kurkumin ile karşılaştırıldığında sınırlı olduğu bulunmuştur.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 70

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

Master Thesis

Comparative Investigation of Curcumin and Next-Generation Ultrasol Curcumin on a Glioblastoma (C6) Cell Line

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Glioblastoma is one of the most aggressive brain tumours that affects many adult people around the world. Conventional therapy includes radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy and others that have been applied in the clinics. In addition to these approaches, some herbal extracts have been tested for the treatment of many diseases, including cancer by their ability to reduce the side effects of conventional treatments. Curcumin, derived from turmeric, is one of the most studied natural herbal sources and is thought to have antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and anti-cancer activities. However, disadvantages such as insoluble in water and low intestinal absorption reduce its bioavailability and effects. In order to overcome these limitations, many attempts have been made to develop new curcumin formulations. The Next Generation Ultrasol Curcumin (NGUC), a recently developed curcumin formulation, has been reported to be 64.7 times more bioavailable in rat plasma than standard curcumin. Therefore, in this study, the effects of curcumin and NGUC on C6 glioma cell line were comparatively investigated.

C6 cells were treated with different concentration of curcumin and NGUC for 48 hours, and cell proliferation was determined by the MTT test. We found that the cell viability in C6 cells was 63% after 200μM curcumin treatment, 50% after 100μM

curcumin treatment, 58% after 50μM curcumin treatment, and 75% after 25μM curcumin treatment. On the other hand, treatment of C6 cells with 200μM and 100μM NGUC resulted in approximately 70% cell viability compared to the control group. NGUC administration at lower concentrations did not cause any cytotoxicity in C6 cells. Flow cytometric analysis revealed that both curcumin and NGUC induce apoptosis in C6 cells at different doses. However, a higher concentration of NGUC was needed to induce apoptosis in C6 cells. It should be noted that while the pure curcuminoid rate in standard curcumin is 95%, this is 20% in NGUC (95/20=4.75 fold difference). Therefore, when our findings are discussed in this context, it can be proposed that NGUC has a similar or even slightly better effect than curcumin on C6 cells. Moreover, incubation of C6 cells with curcumin and NGUC did not exhibit any effects on the mRNA expressions of target genes involved in cell cycle, NFκB and apoptosis signaling pathways.

In conclusion, the results of this thesis exhibited that both curcumin and NGUC have an anti-proliferative effect on C6 glioma cells. In addition, both compounds induced apoptosis in C6 cells, but did not cause any change in mRNA expressions of some of the target genes tested in this study. Despite its advantages over standard curcumin, the effect of NGUC was found to be similar to curcumin.

Year : 2023

Number of Pages : 70

Keywords : Glioma, Curcumin, NGUC, Apoptosis, Cancer

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve bu tezin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ'a,

Tez çalışma süresince deneyimlerini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, sabırla her konuda yardımcı olan ve deneysel açıdan özgüvenimi geliştiren Öğr. Gör. Dr. Ayten BOSTANCI'ya,

Her zaman yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşım Songül YENİ'ye,

Bu çalışmada kullanılan kurkumin ve NGUC'u bize temin eden Prof. Dr. Kazım ŞAHİN (Fırat Üniversitesi) ve Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya (Fırat Üniversitesi),

Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Hocalarım Sayın Prof. Dr. Yalçın KAYA'ya, Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ'ye, Öğr. Gör. Emrah AKPINAR'a, Arş. Gör. Burak TATLISES'e ve diğer öğretim üyelerine ve tüm Genetik ve Biyomühendislik Bölümü yüksek lisans öğrencilerine,

Bu tez çalışmasını 2021/27 proje numarası ile destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) Birimi'ne,

Akademik hayatıma başladığım andan itibaren desteğini esirgemeyen, bu yaşıma kadar beni her türlü konuda maddi ve manevi olarak destekleyen ve üzerimde büyük emekleri olan aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER ix

SİMGELER DİZİNİ xi

KISALTMALAR DİZİNİ xii

ŞEKİLLER DİZİNİ xiv

ÇİZELGELER DİZİNİ xvi

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

BÖLÜM 2 4

2.1. Kanserin Tanımı 4

2.1.1. Kanserin Nedenleri 5

2.1.2. Kanser Hücresinin Özellikleri 7

2.2. Beyin Kanseri 9

2.2.1. Glioma…. 10

2.3. Kurkumin 12

BÖLÜM 3 16

MATERYAL ve METOT 16

3.1. Materyal…. 16

3.2. Metot…….....….17
3.2.8. İstatistiksel Analiz..... 30
BÖLÜM 4 31
BULGULAR 31
BÖLÜM 5 42
TARTIŞMA 42
KAYNAKLAR..... 47
ÖZGEÇMİŞ 53

SİMGELER DİZİNİ

dk. : Dakika

L : Litre

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

mg : Miligram

mg/kg : Miligram/kilogram

ml : Mililitre

µg/ml : Mililitre başına düşen mikrogram

mM : Milimolar

nM : Nanometre

sn : Saniye

°C : Santigrat derece

cm^2 : Santimetre kare

KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: American Type Culture Collection
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma gene-2
Caspase	: Kaspaz
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CO_2	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
FSC-A	: Forward scatter-Area
FSC-H	: Forward scatter-Height
IC50	: Hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonu
IL	: İnterlökin
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
MTT	: 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür
NGUC	: Yeni Nesil Ultrasol Kurkumin (Next Generation Ultrasol Curcumin)
P53	: Tümör protein 53
qPCR	: Quantitative PCR
RB1	: Retinoblastoma 1
RNA	: Ribonükleik asit

rpm	: Dönme hızı
SSC-A	: Side scatter-Area
SSC-H	: Side scatter-Height
STAT-3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
TGF-β	: Transforming Growth Factor-Beta
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TP53	: Tümör protein 53
TÜTAGEM	: Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2020 yılında <70 Yaşında Ölüm Nedeni Olarak Kanser Ulusal Sıralaması.....5

Şekil 2.2. Kansere giden yola genel bakış……..…...6

Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin belirgin özellikleri……..……..…9

Şekil 2.4. Kurkuminin olumlu etkileri farklı hastalıklarda gösterilmiştir…….…....13

Şekil 3.1. Kültürü yapılan glioma (C6) hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü…18

Şekil 3.2. Seri dilüsyon yöntemi ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki kurkumin ve NGUC'un 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş olan hücrelere uygulanması…….…...….20

Şekil 3.3. MTT testinde kullanılan plakaların 48 saatlik inkübasyon sonrası görüntüleri……..……..…...21

Şekil 3.4. Kurkumin ve NGUC uygulamasından sonra C6 hücrelerin Picoreal cihazında elde edilen amplifikasyon görüntüsü……29

Şekil 4.1. C6 hücrelerinin kurkumin ve NGUC uygulamasından 48 saat sonraki canlılıkları……32

Şekil 4.2. Kurkumin ve NGUC IC50 değerlerinin karşılaştırılması……..……...33

Şekil 4.3. Kurkumin ve NGUC farklı konsantrasyonlarda C6 hücrelerinde apoptozu tetikler……..35

Şekil 4.4. Kurkumin uygulamasından sonra C6 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için kapılama stratejileri …….…36

Şekil 4.5. NGUC uygulamasından sonra C6 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için kapılama stratejileri……..…38

Şekil 4.6. C6 hücrelerinde RT-PCR yöntemi ile hedef genlerin mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi deney bulguları……..41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflık miktarları……...…..24

Çizelge 3.2. cDNA Mix Protokolü/ PCR Mix Bileşenleri……...…25

Çizelge 3.3. PCR Koşulları…….…..…25

Çizelge 3.4. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri……..…26

Çizelge 3.5. Real time PCR mix bileşenleri…….…....29

Çizelge 4.1. C6 hücreleri farklı konsantrasyonlarda kurkumin ve NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra Annexin-V ve PI kiti ile boyanmış ve flow sitometri cihazında analizi……..……..…37

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İnsan hücreleri, hücre bölünmesi adı verilen bir süreçle vücudun ihtiyaçlarına karşı büyüyüp çoğalarak yeni hücreler oluşturmaktadır. Bu oluşum sırasında hücreler bazı etkenlere maruz kalarak hasar gördüklerinde, eğer hasar onarılamaz ise, apoptoz denilen hücre ölüm mekanizması ile yok olurlar ve bu hücrelerin yerini sağlıklı hücreler alır. Düzenli çalışan bu sistem farklı sebeplerden dolayı bozulabilmekte ve normal bölünme özelliğini kaybetmiş veya hasar almış hücreler çoğalmamaları gerekirken kontrolsüz olarak çoğalabilmekte ve sonuçta kanser ortaya çıkabilmektedir (Cuşkun, 2019). Toplumda sıkça karşılaşılan ve genetik bir hastalık olan kanserin temel nedeni olarak DNA'yı etkileyen bazı hasarların (mutasyonların) genlerin yapısını bozmaya, normal fonksiyonlarını kaybetmesine, dolayısıyla normal hücrelerin anormal hücrelere dönüşmesine ve bu hücrelerin kontrolsüz bölünmesine neden olmasıdır. DNA'mız her gün birçok fiziksel ve kimyasal etmenlere maruz kalarak zarar görmektedir. Her ne kadar DNA hasarlarına karşı vücudumuzun geliştirmiş olduğu ve oluşan hasarları tamir etmesini sağlayan onarım mekanizmaları olsa da zamanla farklı faktörlere maruziyetin artmasıyla beraber DNA'da hasarlar düzeltilememeye başlar. Oluşan mutasyonların onarılamaması ve dolayısıyla bu mutasyonların birikmesi sonuçta hücrenin kontrolsüz bölünmesine sebep olur ki bu olay vücudun her yerinde oluşabilmektedir (Özdoğan, 2021).

Glioma beyin ve omurilikte oluşan ve yetişkinlerde en yaygın görülen beyin tümörüdür. Gliomalar, sinir hücrelerini çevreleyen ve onların çalışmasına yardımcı olan yapışkan destekleyici hücrelerde (glial hücreler) başlamaktadır. Bir glioma, konumuna ve büyüme hızına bağlı olarak beyin fonksiyonlarını etkileyebilmekte ve yaşamı tehdit edebilmektedir (Cahill & Turcan, 2018). Glioma, muhtemelen glial bir orijine sahip, yetişkinlerde en sık görülen primer beyin tümörüdür. Gliomageneze dahil olan moleküler mekanizmalar ve sinyal yolakları hakkındaki edinilen bilgiler son on yılda büyük ölçüde artmasına rağmen, yüksek dereceli glioma, kötü prognozlu ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir. Gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) malignite ölçeğine göre I'den IV'e kadar derecelendirilmektedir (Jiang & Uhrbom, 2012). Yüksek dereceli gliomaların tedavisi için, oral sitotoksik DNA-alkilleyici bir kemoterapi olan temozolamid kullanılmaktadır. Temazolamid ile eş zamanlı radyasyon tedavisi sağ kalımı arttırmaktadır (Stupp vd., 2005). Cerrahi, radyoterapi ve alkile edici ajan kemoterapisi hala tedavinin temel dayanak noktası olsa da tümörün içsel baskın sinyal yolaklarına ve antijenik tümör profillerine dayalı bireysel olarak uyarlanmış stratejiler sonucu iyileştirebilmektedir (Weller vd., 2015). İmmün kontrol noktası inhibisyonuna veya aktif hücresel immünoterapiye dayalı çeşitli tedavi yöntemlerinin etkinliği geliştirilmektedir. Spesifik olarak glioma ile ilişkili anormal genleri ve yolakları hedefleyen yeni bileşikler geliştirilmekte ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Yine VEGF reseptörü, EGFR, MET veya PI3K gibi onkojenik sinyal yolaklarını hedef alan kombinasyonel ilaç yaklaşımlarının, hastaya özgü mutasyon profillerinden elde edilen verilere dayalı olarak tümör büyümesi üzerinde sinerjistik etkiler vaat eden araştırmalar yapılmaktadır (Weller vd., 2015). Bilim insanları mevcut tedavilerin yan etkilerini azaltma yönünde birçok çalışma yapmaktadır. Doğanın faydalarından yararlanmak için bitkisel kaynaklı araştırmalar da hızla yaygınlaşmaktadır.

Kurkumin, ana vatanı Hindistan olan Curcuma longa L. bitkisinden elde edilmektedir. Antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser gibi birçok olumlu etkisi gösterilmiş olan kurkumin kokusu olmayan, ısıya dayanıklı ve molekül formülü $C_{21}H_{20}O_6$ olan bir bileşiktir. Suda çözünmeyen kurkumin dimetil sülfoksit (DMSO), aseton ve etanol gibi çözücülerde çözünmektedir (Sharma vd., 2005). Yapılan birçok çalışmada kurkuminin farklı kanser hücrelerinin büyümesini engellediği gösterilmiştir. Güvenilir olması, maliyetinin düşüklüğü ve yapılan çalışmalarla gösterilmiş olumlu etkilerinden

dolayı doğal yöntemle elde edilen kurkumin, sofralarda ve doğal gıda takviyesi olarak uzun zamandan beri kullanılmaktadır.

Olumlu etkilerine rağmen, özellikle suda çözünmemesi kurkuminin biyoyararlanımını kısıtlamaktadır. Ek olarak, kurkuminin etkinliği fizyolojik pH'da azalır ve bağırsak emilimi oldukça düşüktür. Kurkuminin biyoyararlanımını artırmak için piperin, lipozomlar, nanopartiküller ve fosfolipit kompleksleri gibi birçok kurkumin formülasyonu denenmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Yeni Nesil Ultrasol Kurkumin (NGUC) adı verilen yeni bir kurkumin formülasyonunun biyoyararlanımı artırdığı gösterilmiştir. Yeni geliştirilen NGUC, kurkuminin suda çözünürlüğünü iyileştirmek ve onu bağırsak alkali pH koşullarında bozulmadan koruyarak bağırsak emilimini kolaylaştırmak için formüle edilmiş ve normal kurkumine oranla sıçan plazmasında yaklaşık 65 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Yabas vd., 2021). NGUC uygulaması ratlarda egzersiz performansını artırarak kas hasarını azaltmıştır (Sahin vd., 2021).

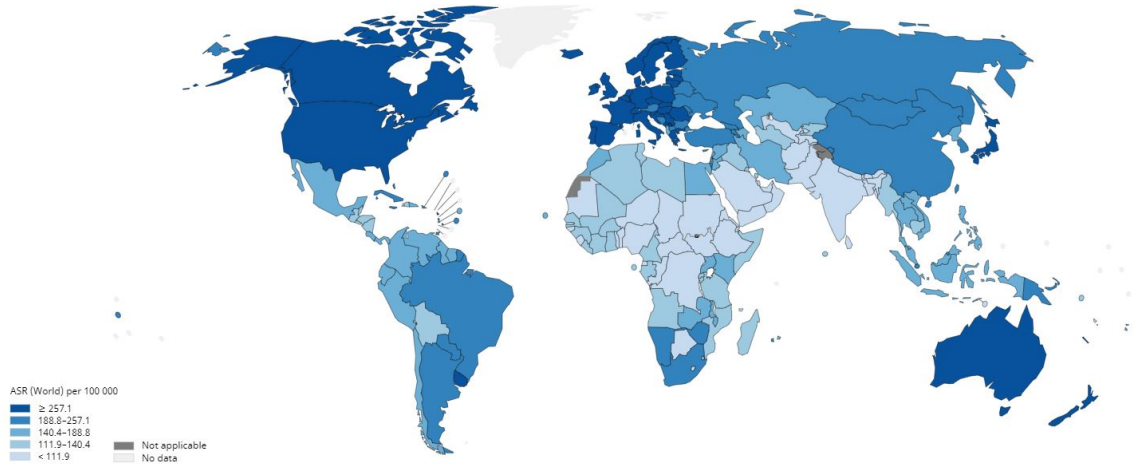
NGUC'un bahsedilen olumlu etkilerinden dolayı kurkumine oranla fizyolojik olarak daha etkili bir bileşik olma ihtimali yüksektir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında NGUC'un glioma (C6) hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkileri ve potansiyel etki mekanizmaları kurkumin ile karşılaştırmalı olarak literatürde ilk kez incelenmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı

Genetik hastalıkların en komplike ve yaygın görülenlerinden biri olan kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve sonuçta vücuda klonal yayılımı olarak tanımlanabilir (Baykara, 2016). Kanser vücudumuzun herhangi bir bölümünde ortaya çıkabilen hücrelerin anormal bir şekilde kontrolsüz olarak bölünmesidir. Kanser hücreleri, kötü huylu tümörler veya tümör hücreleri şeklinde adlandırılmaktadır. Kanser türleri kaynaklandığı dokunun adına göre örneğin akciğer hücrelerinde başladıysa akciğer kanseri olarak tanımlanmaktadır (Davis, 2021). Ülkemizde kadınlarda en yaygın kanser türleri meme kanseri başta olmak üzere, rahim (uterus), tiroit, kolorektal ve akciğer kanseri iken erkeklerde ise en çok gözlemlenen kanser türleri prostat, akciğer, mesane, kolorektal ve mide kanseridir (Kurulu, 2019). Kanser, kardiyovasküler hastalıklar birlikte dünyada başlıca ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer alır ve yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilemektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 2020 yılında <70 Yaşında Ölüm Nedeni Olarak Kanser Ulusal Sıralaması (Özdoğan, 2020).

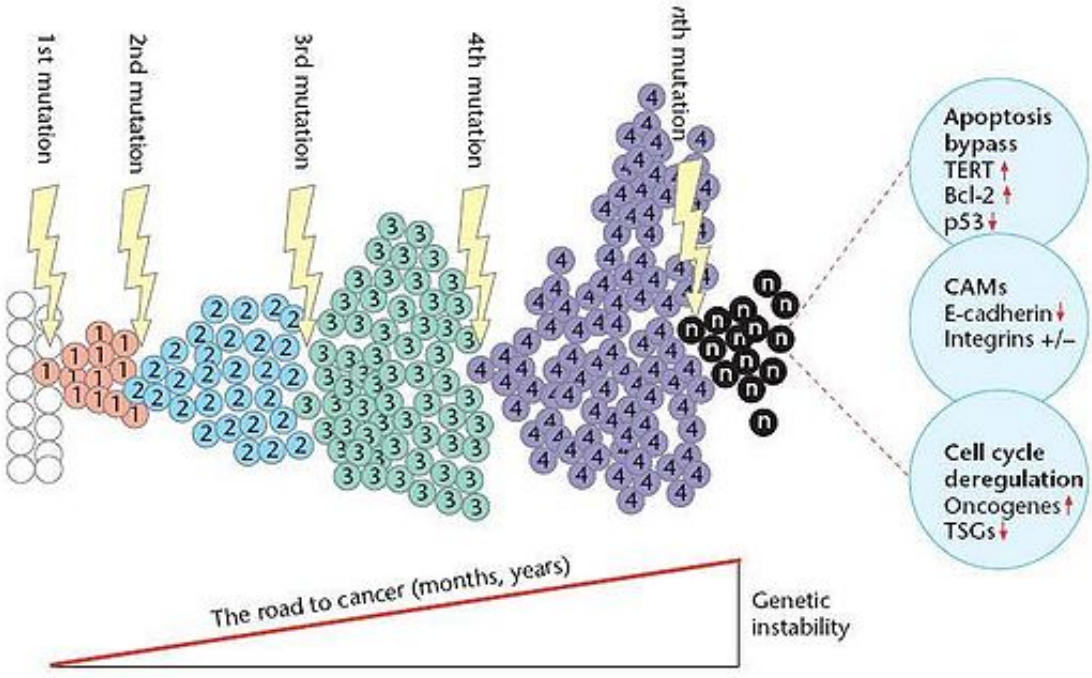
2.1.1. Kanserin Nedenleri

Kanserin temel nedeni, DNA'da meydana gelen mutasyonların birikmesiyle genlerin normal işlevlerini kaybetmesi ve normal olmayan bir şekilde hücrelerin kontrol olmadan bölünmesine neden olmasıdır (Özdoğan, 2021). Günlük hayatta maruz kaldığımız çevresel faktörler (sigara, yiyecekler, şişmanlık, hormonlar, virüsler, tatlandırıcılar, renklendirici kimyasal maddeler, gıda katkı maddeleri, yiyeceklerin pişirilme şekilleri gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar gibi) ve vücutta endojen olarak üretilen metabolik ürünlerin neden olabileceği birçok etken DNA'mızda hasar meydana getirebilme potansiyeline sahiptir. Organizmada bu hasarları onaracak olan DNA tamir mekanizmaları geliştirilmiştir. Fakat bazı durumlarda DNA'daki hasarlar düzeltilemez ve sonuç olarak hücre anormal bölünmeye başlayarak kontrolsüz çoğalır. Özellikle hücre bölünmesi, apoptoz ve tamir mekanizmaları gibi sistemlerde rol oynayan proteinlerin sentezinden sorumlu olan genlerdeki mutasyonlar kanser oluşumunu tetiklemektedir.

Normal hücrede, biyolojik süreçleri düzenleyen, normal hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını kontrol eden ve proto-onkogen olarak isimlendirilen genler vardır. Proto-onkogenler, büyüme faktörleri, hücresel sinyallerin dönüştürücüleri ve nükleer transkripsiyon faktörleri olarak işlev görebilir. Bu genlerde meydana gelen bazı değişiklikler, kanser hücrelerinde genleri aktifleştirilmiş onkogenlere dönüşebilir ve hücrelerde onkogenler oluştuğunda ise hücre çoğalmaya devam eder. Hücreleri kontrol

mekanizmalarından kaçtığı ve sonsuza kadar bölünme yeteneği kazandığı bu oluşum zamanla birçok genetik değişikliğin birikmesiyle ortaya çıkan çok adımlı bir süreçtir (Şekil 2.2) (Bommer & Perrow, 2014). Karsinogenez, hücrelerin maruz kaldığı kimyasal, fiziksel, biyolojik ve/veya genetik saldırıların herhangi birinin veya bir kombinasyonunun etkisinden kaynaklanabilir. Genetik değişiklikler, geçişler, transversiyonlar, delesyonlar, kromozomal tekrar düzenlemeler, gen amplifikasyonu ve mutasyonlar dahil olmak üzere tanımlanan hemen hemen her olası mutasyon tipiyle kanıtlanmıştır (Pitot, 1993).

Birçok kanser türü doku kütleleri ile katı tümörler oluşturabilmektedir. Yakınındaki dokuya yayılıp sızabilen tümörler metastaz yapabilen kötü huylu tümörler olarak adlandırılır. Bu hücreler lenf sistemini ve/veya kan yolunu kullanarak vücudun başka bir yerine gidip kaynağından uzakta yeni tümörler oluşturabilmektedir. Kötü huylu olmayan (iyi huylu) tümörler ise yayılmadıkları için dokuları istila etmez. Bazı büyük iyi huylu tümörler gelişebilir ve iyi huylu tümör olmasına rağmen beyin gibi bazı spesifik dokularda yaşamı tehdit edebilmektedir. Cerrahi olarak alınan kötü huylu tümörler tekrar geri büyüyebilmektedir (Roy & Saikia, 2016).



Şekil 2.2. Kansere giden yola genel bakış. Mutasyonların birikmesiyle hücreler kendi özelliklerini kaybetmektedir. Özellikle tümör baskılayıcı genlerin ve DNA onarım genlerinin işlevini kaybetmesiyle kanser oluşumu tetiklenmektedir (Bommer & Perrow, 2014).

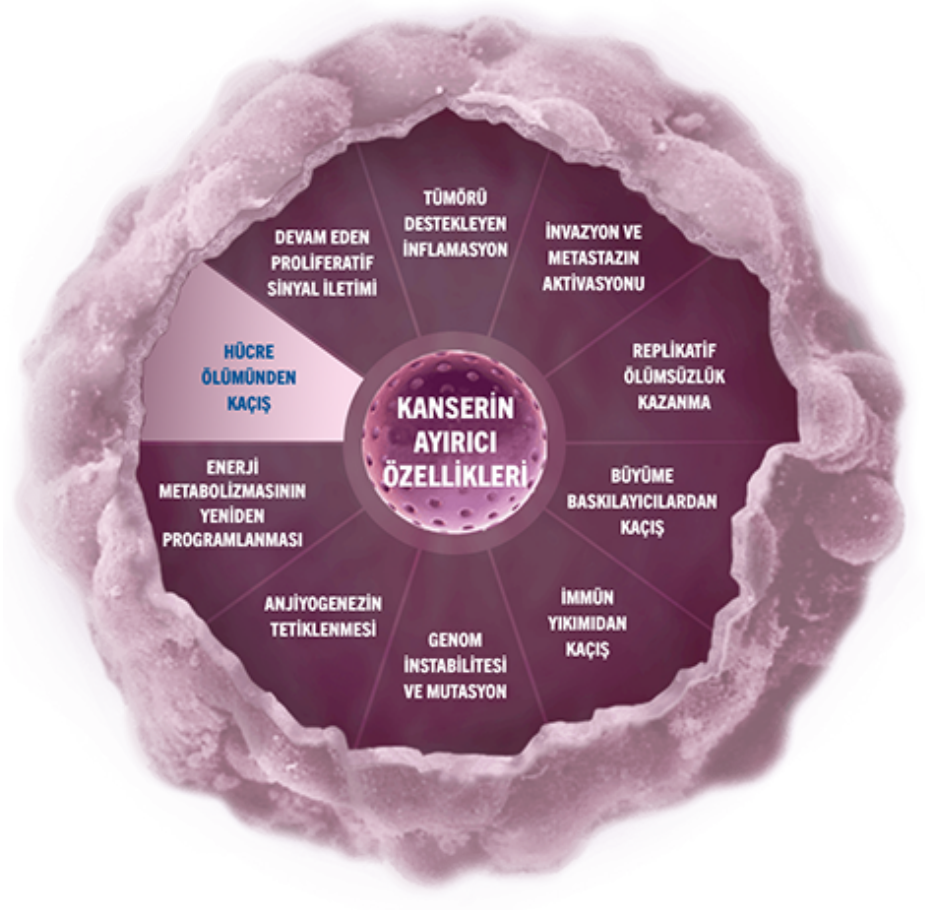
Genel olarak kanser 4 evreli bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin normal hücrelerden ayırt edilebildiği evre ilk evredir. Bölgesel kanser hücrelerinden oluşan tümörün operasyon ile alınması ile tam bir tedavi mümkün olabilmektedir. Tümör büyüklüğü arttığında ikinci evre kabul edilir. Kanser hücreleri lenf düğümleri sayesinde çevre organlara yayılma eğilimi göstermektedir. Tümör kan veya lenf yoluyla çevre bölgelere doğru yayılmaya başlamışsa üçüncü evre kabul edilmektedir. Dördüncü evre, son evre ise en tehlikeli evredir tümörler vücudun diğer uzak bölgelerine yayılmaktadır (Küçükoğlu vd., 2013).

2.1.2. Kanser Hücresinin Özellikleri

Her ne kadar bazı kanser türleri kendilerine spesifik özelliklere sahip olsalar da genel olarak tüm kanser hücrelerinin sahip olduğu özellikler bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir.

- Büyüme faktörlerinin kendisine ait olması: Hücreler dışardan gelen büyüme faktörleri sayesinde çoğalmaktadırlar. Kanser hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu bu hücreler büyüme faktörlerini kendi üreterek çoğalabilmektedir (Kok & Yu, 2020).
- Büyümeyi kısıtlayıcı faktörlerden kurtulma: Homeostaz denilen iç dengeyi sağlamak için normal hücreler dış ortamdan aldığı sinyaller sayesinde büyümelerini durdurmaktadırlar. Kanser hücreleri sinyallerin alındığı reseptörleri bozarak sistemden kaçmış olmaktadırlar (Kok & Yu, 2020).
- İmmün sisteminden kaçma: Vücudun kendi hücreleri "yabancı olmayan-self" proteinleri yüzeylerinde taşımaktadır ve bu sayede bağışıklık sistemi tarafından tanınmazlar. Kanser hücreleri de bu gibi proteinleri yüzeylerinde ifade ederek bağışıklık sisteminden kaçmaktadır (Özdoğan, 2021).
- Sınırsız bölünebilme yeteneği: Kök hücreler dışındaki hücrelerimiz sınırlı sayıda bölünme yeteneğine sahiptir. Bölünürken hücreler bir zaman sonra yaşlılık dönemine girer ve telomerlerin kısalmasına sebep olmaktadır. Kanser hücreleri telomeraz adı verilen enzimlerinin aktivitesi artırarak telomer kısalmasını engellemekte ve böylece sınırsız çoğalabilme yeteneğine sahip olmaktadırlar (Kok & Yu, 2020).

- Farklı doku ve organları istila etme (Metastaz): Normal hücrelerin kanser hücrelerden farkı bulundukları bölgeden ayrılmamalarıdır. Kanser hücreleri belirli bir büyüklüğüne eriştiğinde metastaz adı verilen bir sistemle farklı doku ve organları istila edebilmektedirler. Hücrelerin birbirlerine temas etmesini sağlayan genlerdeki mutasyonlar metastazı etkilemektedir (Yokuş & Çakır, 2017).
- Anjiyogenez (yeni damar oluşturma): Yeni damar oluşumu genellikle yetişkin bireylerde çok azdır. Kan damarları sayesinde hücrelerimiz ihtiyaçlarını karşılayabilmektedirler. Kanser hücreleri sınırsız, çok hızlı bir şekilde büyüyüp bölündüklerinden damar oluşturma yeteneğiyle besin ve oksijen ihtiyacını karşılarlar (Özdoğan, 2021).
- Gen yapısında zararlar (mutasyonlar): DNA hasarları birikerek kanser oluşumuna sebep olmaktadır. Özellikle DNA tamirinde görevli enzimlerin etkilerinin kaybolması gen yapısındaki bozulmaların artmasını tetiklemektedir (Özdoğan, 2021).
- Apoptozdan kaçabilme: Sağlıklı hücrelerimizde DNA hasar gördüğünde tümör baskılayıcı genler hücrelerin çoğalmasını engelleyerek DNA onarım mekanizmalarını başlatmaktadır. DNA'da meydana gelen zarar tamir edilemezse bu hücreler apoptoz ile ortadan kaldırılmaktadır. Kanser hücreleri direnç göstererek apoptozdan kaçma özelliğine sahiptir (Yokuş & Çakır, 2017).
- Farklı enerji kullanabilme (Warburg etkisi): Metabolizmadaki değişikliklerin, hücrenin enerji ihtiyacını, aynı derecede önemli olan makromoleküler yapı taşları ihtiyacı ve redoks dengesinin korunması ile dengelediği açık hale gelmektedir (Cairns vd., 2011).



Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin belirgin özellikleri (Özdoğan, 2021).

2.2. Beyin Kanseri

Genellikle tedavisi olmayan kanserler beyin kanserleridir. Yapılan laboratuvar çalışmalarında alınan hücreler, kök hücre özelliklerine sahip bir kanser hücresi alt kümesine dayanan bir hiyerarşi olarak organize edildiğini güçlü bir şekilde öne sürmektedir. Bu hücrelerin artık geleneksel tedaviye dirençli olduğu ve farklılaşma tedavisine yanıt verdiği gösterilmiştir (Dirks, 2008). Çocuklarda beyne metastaz oldukça az olduğundan, glioblastoma multiforme (GBM) ve meningiomalar erişkinlerde daha sık görülürler (Hacıyakupoğlu vd., 2014). Beyin tümörleri iyi huylu veya kötü huylu; birincil veya ikincil olarak görülebilmektedir (Hill vd., 2002).

Birincil beyin tümörleri beyin hücreleri ve yapılarından köken alarak gelişmektedir (Armstrong & Gilbert, 2000). Beyin içerisinde lenfatik ağ olmadığından farklı dokulara göçü, serebral kan dolaşımı ve beyin omurilik sıvısı aracılığıyla nadiren görülmektedir (Hill vd., 2002). Beyin zarlarından, nöroepitelyal dokulardan, hipofiz ve ilgili yapılardan,

kraniyal sinirlerden, germ hücrelerinden kaynaklanan tümörler birincil beyin tümörlerini kapsamaktadır (Perkins & Liu, 2016). Bireylerde lokal ve sistemik etkisi göstererek nörolojik, bilişsel sorunlara neden olmaktadır ve bireyin yaşamını etkilemektedir (Catt vd., 2008). Glioblastoma, Primer Santral Sinir Sistemi Lenfoması, meningioma gibi tümörler birincil beyin tümörleri arasında yer almaktadır.

İkincil beyin tümörleri ise, vücudun farklı doku veya organlarından köken alıp beyne metastaz yaparak gelişim göstermektedirler, metastatik beyin tümörleri olarak da bilinmektedirler (Armstrong & Gilbert, 2000). Özellikle göğüs kanser, kolon kanser, pankreas kanser ve akciğer kanser kan dolaşımı aracılığıyla beyin dokularına yayılarak ikincil beyin tümörüne neden olmaktadır (Armstrong & Gilbert, 2000).

İyi huylu beyin tümörleri yavaş büyümektedir ve sınırları belirlidir. Nadiren diğer bölümlere yayılmaktadır. Kafatası içinde sınırlı bir bölgede gelişim göstererek çevre dokulara baskı yapmaktadır, kan dolaşımını bozarak lokal belirtilere neden olmaktadır (Camp & Dawn, 2016; Hill vd., 2002). İyi huylu beyin tümörlerden farklı olarak malign beyin tümörleri hızlı büyüme göstermektedirler ve invaziftirler. Beyin dokularına veya spinal kord etrafına hızlı yayılım göstermektedirler (Dorsey vd., 2020). Kötü huylu birincil beyin tümörleri, tüm kanserlerin %2'sini oluşturmaktadır ve tipik olarak glial hücrelerden kaynaklanmaktadır (Miranda vd., 2017). Kötü huylu beyin tümörlerinde tedavi; radyoterapi, kemoterapi ve semptomatik tedavi ile maksimum cerrahi rezeksiyondan oluşmaktadır. Buna rağmen, kötü huylu beyin tümörlerinin birkaç ay içinde nüksetme olasılığı fazladır (Aparicio-Blanco & Torres-Suarez, 2018).

2.2.1. Glioma

Beyin ve omurilikte oluşan bir tümör türü olan gliomalar, sinir hücrelerini çevreleyen ve onların çalışmasına yardımcı olan yapışkan destekleyici hücrelerde (glial hücreler) başlamaktadır (Ludwig & Kornblum, 2017). Gliomalar, tümörde yer alan glial hücre tipine ve ayrıca tümörün zaman içinde nasıl davranacağını ve en olası tedavilerin işe yarayacağını tahmin etmeye yardımcı olabilecek tümörün genetik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Gliomalar, erişkinlerde en sık görülen malign beyin tümörlerinin %81'ini temsil eden en yaygın primer malign beyin tümörlerdir (Ostrom vd., 2014). Gliomalar, glial veya öncü hücrelerden kaynaklanan ve astrositom içeren tümörlerdir (Ostrom vd., 2013). Başladıkları glial hücre tipine göre gruplandırılmış üç ana tip glioma

vardır. Bazı gliomalar birden fazla hücre tipi içermektedir. Her bir glioma türünü, ne kadar hızlı büyüdüklerine ve diğer özelliklerine bağlı olarak düşük, orta veya yüksek dereceli olarak sınıflandırılmaktadırlar (Ostrom vd., 2014).

Gliomalar beyin fonksiyonlarını etkiler ve bulundukları yere ve büyüme hızına bağlı olarak hayatı tehdit edebilir. Glioma her yaştan insanda ortaya çıkabilir, ancak erkek erişkinlerde daha sık görülür (Reddy, 2018). Semptomları genellikle baş ağrısı, nöbetler, mide bulantısı ve kusma iştah kaybı, görme veya işitme sorunları, baş dönmesi ve yürüme güçlüğü gibi denge sorunları, konuşma bozukluğu, zayıflık veya felç gibi kas veya sinir sistemi sorunları, ruh hali, kişilik veya davranış değişiklikleri olabilmektedir (Pichardo, 2020).

Gliomalar oldukça yaygın görülmesine rağmen tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Yaygın tedavi yöntemleri; tümörün cerrahi olarak çıkarılması, radyasyon tedavisi, yüksek enerjili X-ışınları veya diğer radyasyonların kullanılmasıdır. (Pichardo, 2020). Ayrıca, tümörleri küçültmek için kullanılabilecek hedefe yönelik tedavi yöntemleri de bulunmaktadır. Tümörlerin büyümesine yardımcı olan belirli proteinleri hedef alması nedeniyle kemoterapiden farklı çalışır. Ayrıca, semptomları ve nörolojik işlevi iyileştirmek için destekleyici tedavi, tümörün neden olduğu beyindeki şişmeyi azaltmak için kortikosteroidlerin kullanımı ve nöbetleri kontrol etmek veya önlemek için antikonvülzanların kullanımı da diğer seçenekler arasındadır (Pichardo, 2020). Son zamanlarda, alternatif elektrik alanı tedavisi de normal hücrelere zarar vermeden tümördeki hücreleri hedeflemek için kullanılmaktadır (Pichardo, 2020).

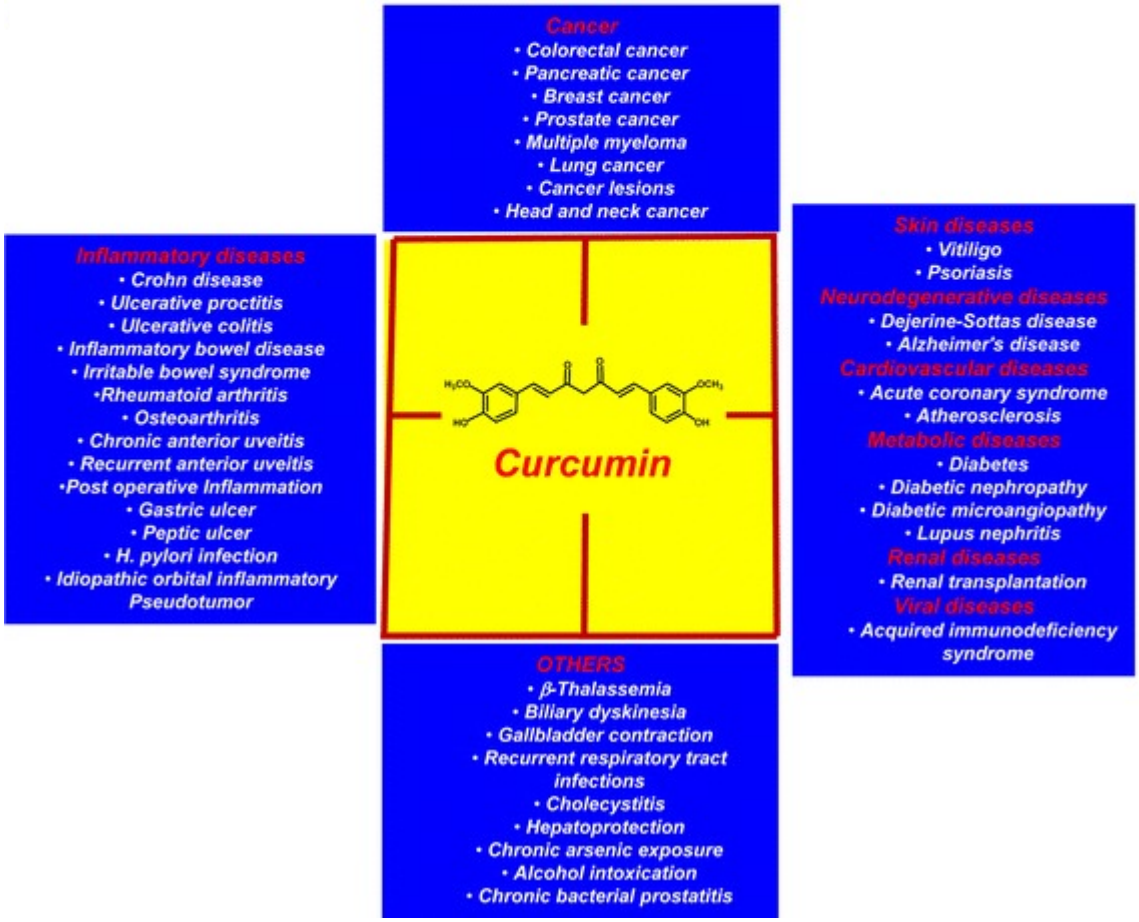
Bu yöntemlere ilave olarak özellikle kullanılan konvansiyonel tedavi yöntemlerinin yan etkilerini azaltabilecek potansiyele sahip olabilmelerinden dolayı bitkisel kaynaklı ilave doğal bileşiklerin alınması da son yıllarda yaygınlaşmaktadır. Baharatlar ve şifalı bitkiler de dahil olmak üzere 35.000'den fazla bitki türü, azaltılmış yan etkilerle çok sayıda tedavi edici özelliğe sahip olduklarına inanıldığından dünya çapında yaygın olarak tüketilmektedir (Wan Mohd Tajuddin vd., 2019). Son yıllarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, bu tarz bileşiklerin kanser hücrelerinde proliferasyonu engellediği, apoptozu indüklediği, epigenetik değişiklikler ve mikro RNA ekspresyonunun düzenlenmesi gibi mekanizmalar yoluyla farklı kanser türleri üzerinde anti-kanser etkiler gösterdiğini rapor etmişlerdir.

2.3. Kurkumin

Zerdeçal, biyoaktif kurkuminoidler (kurkumin, demethoxycurcumin ve bisdemethoxycurcumin) içerdiğinden son yıllarda büyük ilgi gören Hindistan kökenli bir köri baharatıdır (Kotha & Luthria, 2019). Kurkuminoidlerin nispeten kolay izolasyonu ve potansiyel etkileri zerdeçalın terapötik kullanımına olan ilgiyi artırmıştır (Nelson vd., 2017). Zerdeçalın aktif bileşenlerinden olan kurkumin, sarı veya turuncu renkli olup zerdeçal bitkisinin kökünden elde edilmiştir (Aggarwal vd., 2007). Kurkumin molekül formülü $C_{21}H_{20}O_6$ ve moleküler ağırlığı 368.38 g/mol'dür olan ve zerdeçalın %3-5'ini oluşturan bir bileşiktir. Suda çözünmeyen kurkumin, aseton, DMSO ve etanol gibi solventlerde çözünebilir (Giordano & Tommonaro, 2019).

Kurkuminin antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-viral, anti-bakteriyel ve anti-fungal aktivitelere sahip olduğu ve bununla birlikte şeker, alerjik reaksiyonlar, artrit, demans, Alzheimer hastalığı ve diğer kronik hastalıklara karşı etkili bir potansiyele sahip olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Şekil 2.4) (Aggarwal vd., 2007). Birçok faydasının keşfedilmesinden sonra kanser alanında da son zamanlarda birçok çalışma yapılmış ve hem tedavi hem de kemoprevensiyon açısından bazı anti-kanser özellikleri birçok laboratuvar ve klinik çalışmada gösterilmiş ve bu etkileri farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirebileceği rapor edilmiştir (Şekil 2.4) (Unlu vd., 2016). Örneğin, kurkumin HCT-116 ve metastatik kolorektal kanser hücre dizilerinde çoğalma önleyici aktivite göstermiştir (Calibasi-Kocal vd., 2019). Ayrıca, Garcea ve arkadaşları kurkumin uygulamasının M(1)G protein seviyelerinde azalma ile sonuçlandığını, COX-2 protein seviyelerinin ise malign kolorektal dokuda değişmediğini bildirmişlerdir. Dahası, kurkumin tedavisinin kolorektal kanser hastalarının tümör hücrelerinde P53 seviyelerini aşırı eksprese ettiğini ve bunun da apoptozu desteklediğini bildirmiştir (Garcea vd., 2005). Kim ve arkadaşları (Kim vd., 2002) kurkuminin baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom kanseri (HNSCC) hastalarında ajan olarak etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada, kurkuminin bazı inflamatuar sitokinleri (TNF-α, IKKβ kinaz, IL-6 ve IL-8 gibi) baskıladığı bulunmuştur. Kurkumin ayrıca protein kinaz (PK)A, fosforilaz kinaz (PhK), rapamisinin memeli hedefi (mTOR) ve mitojenle aktive olan protein kinazlar dahil olmak üzere protein kinazların aktivitesini de baskılayabilir. MAPK'ler hücre büyümesi,

çoğalması, bölünmesi, hayatta kalma ve ölümün düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel tepkilerde önemli roller oynamaktadır (Ghosh vd., 2015).



Şekil 2.4. Kurkuminin olumlu etkileri farklı hastalıklarda gösterilmiştir (Gupta vd., 2013).

Ayrıca kurkumin, STAT-3, EGFR, FOXO3a, Ökaryotik Başlatma Faktörleri (eIF'ler) ve TGF-β gibi çeşitli moleküler hedeflerin modülasyonu yoluyla akciğer kanseri hücrelerinde anti proliferatif etkisi göstermiştir (Wan Mohd Tajuddin vd., 2019). Dahası kurkumin ve analoglarının, ROS üretimini artırarak A549 ve H460 insan akciğer kanseri hücrelerinde FOXO3a ekspresyonunu arttırdığı, ardından siklin D1 seviyesini düşürürken p21, p27 ve Bim dahil olmak üzere FOXO3a hedef genlerinin ekspresyonunu yükselttiği gösterilmiştir (Unlu vd., 2016).

Kurkuminin farklı organ sistemlerindeki faydaları, çeşitli nörolojik hastalıklar ve beyin kanser modellerinde de kapsamlı olarak çalışılmıştır. Kurkumin, birçok

nörodejeneratif hastalıkta yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonunu doğrudan bağlayan ve sınırlayan, aynı zamanda inflamatuar sistemin homeostazını koruyan, beyinden toksik agregatların temizlenmesini artıran, serbest radikalleri temizleyen, demiri şelatlayan ve antioksidan tepki elemanlarını indükleyen pleiotropik bir moleküldür (G. S. Bhat vd., 2019). Kurkuminin antiproliferatif etkileri, NFκB, Akt ve Wnt/β katenin gibi farklı moleküler yolaklarla ilişkilidir (Komal vd., 2019). Mohajeri ve ark. multipl sklerozun deneysel bir otoimmün ensefalomiyelit modeli üzerinde olumlu etkileri olan polimerize nano-kurkuminin anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerini ve indüklenmiş miyelin onarım mekanizmalarını göstermiştir (Mohajeri vd., 2015). Yine kurkuminin U87-MG insan GBM hücrelerinde p21'i ERK ve c-JUN N-terminal protein kinaz sinyali yoluyla aktive ettiği gösterilmiştir (Choi vd., 2008). Aoki ve ark. kurkuminin, rapamisin (mTOR)/p70S6K'nın protein kinaz B (AKT)/memeli hedefinin baskılanması ve U87-MG ve U373MG insan malign glioma hücrelerinde hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK1/2) yollarının aktivasyonu bir fosfataz ve tensin homologu (PTEN) mutasyonu yoluyla otofajiyi indüklediğini göstermiştir (Aoki vd., 2007). Senft ve ark. insan primer ve tekrarlayan GBM'den hücre hatlarını incelemiş ve kurkuminin JAK/STAT3 yolunu inhibe etmesi nedeniyle hücre büyümesini azalttığını, migrasyonu inhibe ettiğini ve invazivliği azalttığını göstermişlerdir (Senft vd., 2010). Sıçan C6 glioma hücreleri ile yapılan bir çalışmada, kurkuminin kanser kök hücrelerini hedefleme potansiyeline sahip olabileceğini gösterilmiştir (Fong vd., 2010).

Kurkumin her ne kadar Gıda ve İlaç İdaresi ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından tüketim için onaylanmışsa da, zayıf biyoyararlanımı nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisindeki kullanım etkisi sınırlı kalmıştır (Komal vd., 2019). Bunun en büyük nedeni, suda çözünememesi ve zayıf biyoyararlanımıdır. Kurkumin biyoyararlanımını artırmak için lipozomlar, nanopartiküller ve fosfolipit kompleksleri gibi birçok ilave bileşikler kullanılarak birçok kurkumin formülasyonu geliştirilmiştir. Yakın tarihli bir çalışmada yeni nesil ultrasol kurkumin (Next generation ultrasol curcumin, NGUC) olarak isimlendirilen bir kurkumin formülasyonu geliştirilmiştir (Yabas vd., 2021). Kurkuminin biyoyararlanımını artırmak için %95'lik kurkuminoid özütünü, asitleştiriciler, monogriseritler ve fosfolipidler ile birlikte izopropil alkol içerisinde çözdürmüşlerdir. Daha sonra bu solüsyonu tokoferol, orta-zincir trigriserit yağı ve hipomelloz ile karıştırarak yeni bir formülasyon geliştirilmiştir (Yabas vd., 2021). Formülasyondaki

fosfolipit 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). Elde edilen bu bileşiğin etkinliğinin test edildiği bir çalışmada sonuçlar NGUC'un, rat plazmasında kurkuminle karşılaştırıldığında 64,7 kat daha biyobulunur olduğunu göstermiştir (Yabas vd., 2021). Ayrıca, NGUC uygulamasının ratlarda monosodyum iyodoasetat ile indüklenmiş diz osteoartrit modelinde iyileştirici etkisi gösterilmiştir (Yabas vd., 2021). Ayrıca, NGUC ratlarda egzersiz performansını artırıcı bir etki göstermiştir (Sahin vd., 2021).

Hem ratlarda yapılan çalışmalar hem de daha etkin biyoyararlanım özelliğinden ötürü NGUC'un, kurkuminin sahip olduğu dezavantajları berteraf edebileceği ve kurkumine oranla daha etkin bir bileşik olabilme potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple, bu çalışmada NGUC'un glioma (C6) hücreleri üzerine potansiyel etkileri kurkumin ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında kullanılan rat kaynaklı glioma hücre hattı (C6; ATCC, CCL-107) Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (TÜTAGEM) alınmış ve hücrelerin kültürü aşağıda verilen araç ve gereçler kullanılarak yapılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Plastik Malzemeler ve Cihazlar

- 5 ve 10 ml serolojik pipetler (NEST)
- Çok kanallı pipet (Lambda, Corning)
- Steril kültür kapları (25 cm^2 ve 75 cm^2) (NEST)
- 96-kuyucuklu hücre kültür kabı (NEST)
- Biyo-güvenlik kabini (Alpina)
- Flow sitometri (Attune Acoustic Focusing Cytometer, Applied Biosystems)
- Santrifüj (Gyrozen)
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)
- 37°C ve %5 CO_2 İnkübatör (Heal Force)
- Hassas Terazi (Shimadzu, ATX224)

- Vortex (Biosan Vortex V-1 plus)
- Mikro plate okuyucu (Allsheng, AMR-100)
- Mikroskop (Motic)
- Real time qPCR (Picoreal 96, Thermo Fisher)
- Nanodrop (NaNoQ, OPTIZEN)

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

- Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) Premium (Cegrogen)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X (DPBS) (ThermoFisher)
- Dimetil Sülfoksit (Sigma)
- Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
- Penicilin/Streptomisin (Gibco)
- L-Glutamin (Gibco)
- %0.25 Tripsin-EDTA (Gibco)
- FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit with PI (BioLegend)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)
- RNA Mini Kit (İnvitrogen by Thermo Fisher Scientific)
- %99 Ethanol Absolute (Isolab)
- DNAase/RNAase içermeyen su (Invitrogen)
- Cyber Green Master mix (Applied Biosystems)
- MTT (Biomatik)

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü

1:1 oranında karıştırılan DMEM ve F-12'nin içerisine %6 oranında FBS, %1 penicilin/streptomicin ve %1 L-glutamin eklenerek hücre besiyeri hazırlandı.

-150°C'deki kriyotüplerde dondurulmuş olan glioma hücreleri oda sıcaklığına getirilerek çözdürüldü. 15 ml'lik tüplere 5 ml besiyeri ve 1 ml hücre eklenerek 2000 rpm'de 2.5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak pellet üzerine 4 ml hücre

besiyeri eklenip 25 cm^2'lik flasklara ekildi ve inkübatöre bırakıldı (Şekil 3.1). 48 saatlik sonra hücreler mikroskop altında kontrol edildi ve %80-90'lık bir alanı kapladığı gözlemlendiğinden büyük 75 cm^2'lik flasklara transfer edildi. Transfer işlemi için önce besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı ve hücreler 1xPBS ile yıkandı (besiyeri kalıntılarını uzaklaştırmak ve ölü hücreleri uzaklaştırmak için). Daha sonra flaska 1 ml Tripsin-EDTA eklendi ve inkübatöre alınarak 5 dk. inkübe edildi. 1 ml hücre 15 ml'lik tüpe eklendi ve üzerine 10 ml besiyeri eklendi. Hücreler büyük flasklara ekilerek mikroskopta kontrol edildi ve daha sonra 37°C'de %5'lik CO_2 içeren inkübatörde kültürlendi. Hücrelerin devamlılığını sağlamak için hücrelerin besi ortamı 2-3 günde bir tazelendi ve mikroskobik gözlemler sonucu hücrelerin pasajlanmasına karar verildi. Pasajlama işlemi aşağıda verilen yöntemle yapıldı;

Flasklar 2-3 ml 1xPBS ile yıkandıktan sonra 4-5 ml Tripsin-EDTA kullanarak hücreler kaldırıldı ve inkübatörde 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra hücreler yıkanarak taze besiyeri içerisinde kültürlenerek inkübatöre bırakıldı ve yeterli sayıya gelen hücreler deneylerde kullanıldı.

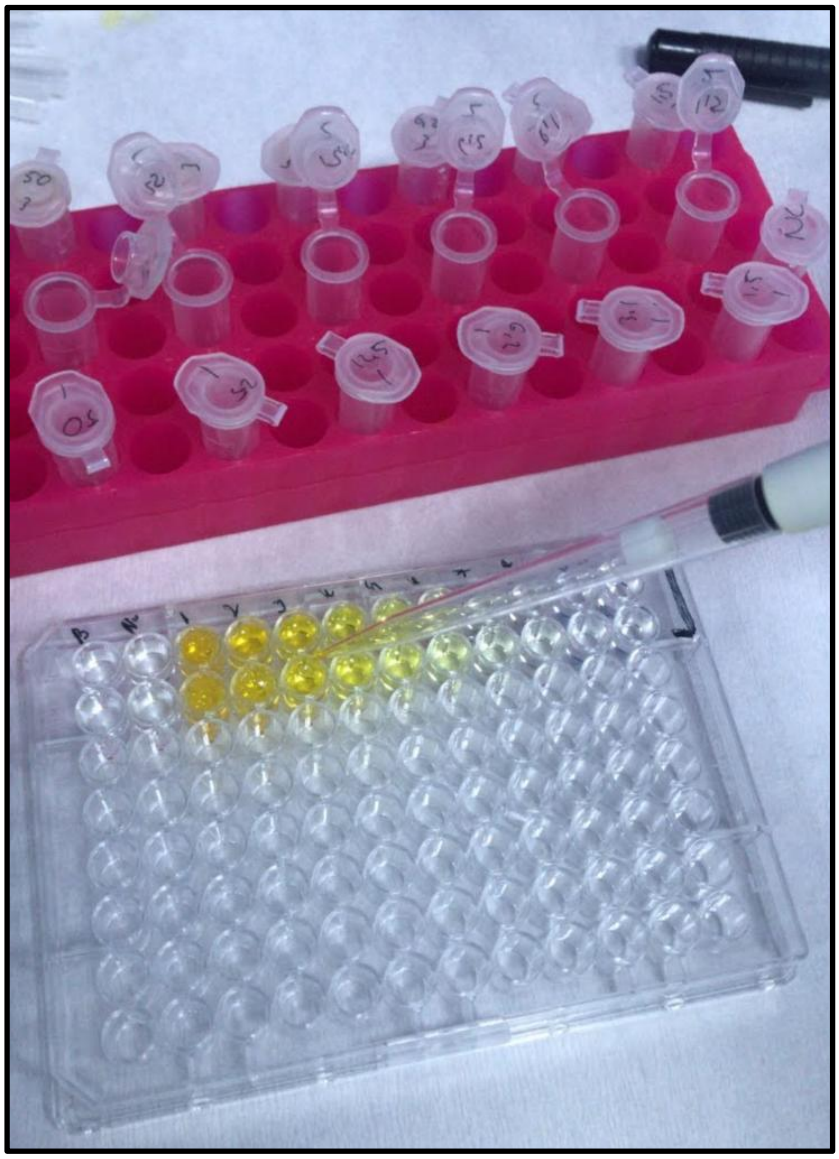


Şekil 3.1. Kültürü yapılan glioma (C6) hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü

3.2.2. Maddelerin Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan NGUC ve kurkumin Hindistan'da üretilmiş olup laboratuvarımıza toz olarak gönderilmiştir. NGUC, daha önce yayımlanan bir çalışmada açıklandığı şekilde elde edilmiştir (Yabas vd., 2021). Kısaca, %95'lik kurkuminoid ile asitleştirici, monogliseritler ve fosfolipitler karıştırılmış ve 55-60°C sıcaklıkta 40 dk. boyunca çalkanarak çözünmeleri sağlanmıştır. Daha sonra solüsyon 40°C'ye soğutularak içerisine tokoferol, orta-zincir trigriserit yağı ve hipomelloz eklendi ve 45 dk. boyunca çalkanarak homojen bir solüsyon elde edilmiştir. Bileşik daha sonra kurutularak sarımsı-turuncu bir toz elde edilmiştir (Yabas vd., 2021).

Kurkumin ve NGUC'un moleküler ağırlıkları 368.3799'dur ve düşük molekül ağırlığı sebebi ile oldukça potenttir. Deneylerde hücrelere uygulanacak maddelerin hazırlanması için, aynı miktarda tartılmış olan kurkumin ve NGUC uygulandığında son konsantrasyonu %1 olan DMSO içerisinde çözdürüldü. Uygulama dozları dilüsyon serileri ile (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM ve 6,25 µM) hazırlandı. Kontrol grubu için ise hücreler ile muamele edildiğinde son konsantrasyonu %1 olan DMSO kullanıldı. Hücreler her bir grup için 6 tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara ekildi (Şekil 3.2). Plakalar, 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 48 saat inkübe edildi ve daha sonra planlanan deneylerde kullanıldı.



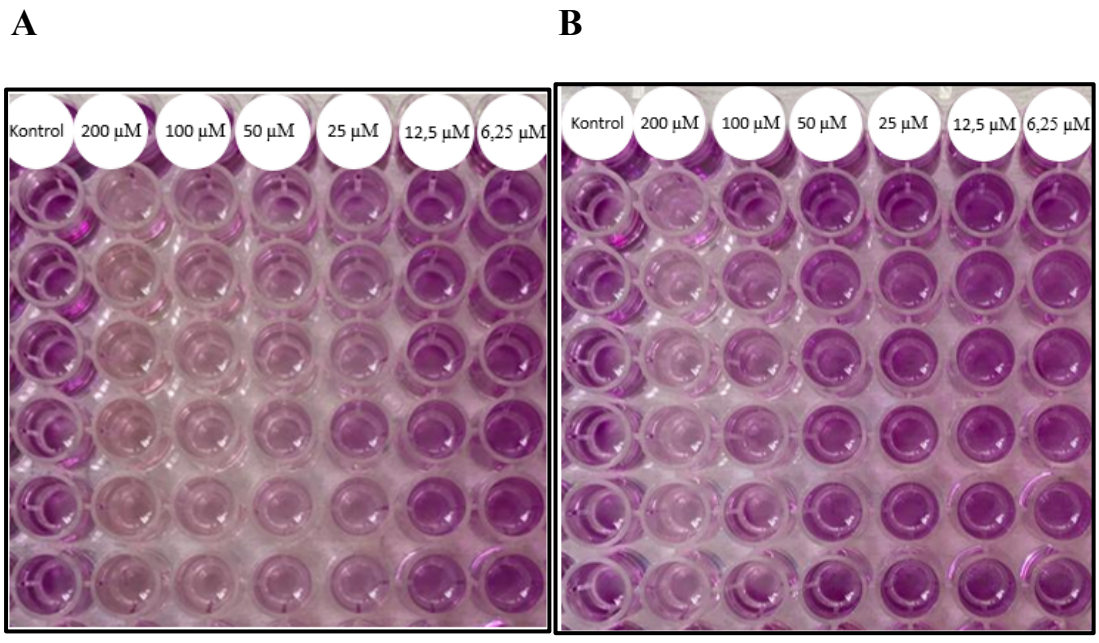
Şekil 3.2. Seri dilüsyon yöntemi ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki kurkumin ve NGUC'un 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş olan hücrelere uygulanması.

3.2.3. MTT Yöntemi ile Canlılık Tayini

Mosmann tarafından ilk olarak 1983 yılında keşfedilen MTT yöntemi, mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin yaşayan hücrelerde kolorimetrik olarak ölçülmesidir (Mosmann, 1983). Yapılan birçok deneme sonrasında optimize edilen deney için, yaklaşık $5x10^3$ C6 glioma hücresi 96-kuyucuklu plakalara ekilerek farklı konsantrasyonlardaki (6.25, 12.5, 25, 50, 100 ve 200μM) kurkumin ve

NGUC eklenerek 48 saat inkübe edilip hücrelerdeki canlılık oranı MTT testi ile değerlendirildi.

Hücreler 180 µl besiyeri içerisinde 96-kuyucuklu plaklara ekildi. C6 hücrelerinin duplikasyon süresi olan yaklaşık 24 saat beklenildi. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda kurkumin ve NGUC C6 hücrelerine uygulandı ve 48 saat 37°C'de %5 karbondioksitli inkübatörde kültürlendi. 48 saat sonra her bir kuyucuğa 20 ml 5 mg/ml MTT uygulandı ve hücreler 37°C'de %5 CO_2 inkübatörde 2-4 saat daha inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri ve MTT solüsyonunu içeren süpernatant kısım atılarak kuyucuklara 180 ml DMSO eklendi. Kuyucuklardaki renk değişimi gözlendikten sonra 492 nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçüm yapıldı ve hücre canlılıkları % olarak hesaplandı. Madde uygulanmayan (sadece DMSO uygulanan) hücrelerden (kontrol grubu) elde edilen değer %100 canlılık olarak alındı ve diğer dozlar bu grup ile karşılaştırılarak her bir doz için hücre canlılık oranı hesaplandı. Yine elde edilen değerler kullanılarak IC50 değerleri belirlendi.



Şekil 3.3. MTT testi yapılan plakaların görüntüsü. Şekil, belirtilen konsantrasyonlarda (A) kurkumin ve (B) NGUC'un C6 hücrelerine uygulanmasından sonra MTT analizi yapılarak kuyucuklarda oluşan renk değişimini göstermektedir.

3.2.4. Flow Sitometri ile Apoptoz Deneyi

Hücre zarı lipit asimetrisinden dolayı fosfatidilserin (PS) adlı fosfolipit hücre zarının iç kısmında bulunmaktadır. Zira PS'nin iç kısımda bulunması hücrelerin canlılıklarının devamı ve fonksiyonları açısından oldukça önemlidir. Bir hücre apoptotik yolağa gidecek ise bu hücredeki plazma membran zarındaki lipit asimetrisi bozulur ve PS hücre zarının dış kısmında birikir. Annexin-V ise hücre zarının dış kısmında bulunan PS'lere bağlanır ve çeşitli yöntemler kullanılarak Annexin-V boyanmasına göre apoptotik hücrelerin tespiti sağlanır. Hücreler Annexin-V ile boyanırken ayrıca Propidium Iodid gibi boyalar eklenerek ölü hücrelerin tayini de yapılabilir. Deneylerimizde FITC ile konjuge Annexin-V Apoptosis Detection Kit with PI adlı ürün kullanılarak flow sitometri cihazında canlı, apoptotik ve ölü hücreler ayırt edildi.

$2x10^5$ C6 hücresine farklı konsantrasyonlarda kurkumin ve NGUC uygulandıktan sonra flasklarda 48 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra tripsinizasyon işlemi ile süspanse hale getirildi 96-kuyucuklu plakalara aktarılarak 2000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi ve sıvı kısım atıldı. Daha sonra hücreler bir kez yıkama solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve bir kez 1x Annexin-V binding buffer solüsyonu ile yıkanarak tekrar santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldıktan sonra hücreler Annexin binding buffer solüsyonu içerisinde Annexin V (1/20 oranında seyreltildi) ve PI (1/10 oranında seyreltildi) içeren antikor karışımı ile oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 15-20 dk. işaretlendi. Boyama sonra hücreler buz üzerine alınarak 2-3 saat içerisinde flow sitometride analiz edildi. Ayrıca hiçbir boya ile işaretlenmemiş hücreler (sadece hücre), sadece Annexin-V ile boyanan hücreler ve sadece PI ile boyanan hücreler de hazırlandı ve flow sitometri cihazının kompanzasyonunda kontrol grupları olarak kullanıldır. Flow sitometri cihazında elde edilen veriler bilgisayara aktarıldı ve Flow Jo (Tree Star) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.5. mRNA Ekspresyonu ve cDNA Sentezi

Seçilen konsantrasyonlardaki madde uygulamasından sonra (kurkumin için 10μM, NGUC için 10 ve 40μM) genlerin mRNA ifade seviyelerini belirlemek için RNA Mini Kit (İnvitrogen) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre hücrelerden mRNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems) kullanılarak yine üretici firmanın protokolü uygulanarak mRNA'lardan cDNA sentezi yapıldı.

3.2.5.1. mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

- $2x10^5$ C6 hücresi yukarıda detaylandırıldığı şekilde 10µM kurkumin ve 10 ve 40µM NGUC ile flasklarda 48 muamele edildi.
- Daha sonra besiyeri dökülerek hücreler 1-2 ml DPBS ile yıkandı ve sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- Hücrelere 350µl Buffer RL (lizis buffer) eklendi ve 5 dk. bekletildi.
- Hücreler bir tüpe aktarılarak 14.000 rpm'de 1 dk. süreyle santrifüj edildi.
- Her bir 100µl hücre süspansiyonu için 60µl %96'lık etanol eklendi.
- 600µl etanollü hücre süspansiyonu RNA toplama tüpüne eklenerek 14.000 rpm'de 1 dk. süreyle santrifüj edildi.
- Sonrasında kolona 400µl Wash A solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm'de 1dk. süreyle santrifüj edildi.
- Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edildi.
- Hücrelere solüsyon eklenmeden sadece santrifüj edildi.
- Kolon, temiz bir tüpe yerleştirilerek 50µl elution solution A eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dk. süreyle santrifüj edildi.
- Bu sayede mRNA yeni tüpe alındı ve miktar ve saflık tayini için Nanodrop (NaNoQ, OPTIZEN)'da 260-280 nm UV absorbans değerinde okundu.
- Elde edilen örnekler kullanılana kadar -80°C'de saklandı.

Belirtilen protokol ile elde edilen RNA'ların miktar ve saflıkları Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıkları

Grup	RNA miktarı µg/µl	RNA saflıkları
Kontrol	326.3	2.15
Kontrol	324.5	2.18
Kontrol	313.6	2.25
Kurkumin 10 µM	63.8	2.12
Kurkumin 10 µM	85	2.08
Kurkumin 10 µM	69.7	2.06
NGUC 10 µM	95.5	2.17
NGUC 10 µM	223.5	2.15
NGUC 10 µM	256.5	2.17
NGUC 40 µM	234.7	2.13
NGUC 40 µM	178.7	2.14
NGUC 40 µM	165.8	2.18

3.2.5.2. cDNA Sentezi

Ticari olarak firmadan hazır olarak satın alınan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde elde edilen mRNA'lardan cDNA sentezi için kullanılmıştır. Üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre; mRNA'lardan 2µg (10µl) ve Çizelge 3.2'de belirtilen bileşenlerden protokole uygun şekilde hazırlanan cDNA mixinden 10µl olmak üzere toplamda 20µl son hacim PCR tüplerine eklendi. T-100 Thermal Cycle PCR cihazı kullanılarak Çizelge 3.3'de verilen koşullarda cDNA sentezi yapıldı ve elde edilen cDNA'lar, bir sonraki kullanımlarına kadar -80°C'de saklandı.

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	3 dakika

3.2.6. Gerçek Zamanlı PCR

Hiçbir madde uygulanmamış grup (kontrol), kurkumin uygulanmış grup ve iki farklı konsantrasyonda NGUC uygulanmış gruplar arasındaki hedef genlerin ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları belirlemek için Picoreal™ 96 cihazı kullanılarak gerçek zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Analiz için bir önceki bölümde anlatıldığı gibi elde edilen cDNA'lar SYBR Green qPCR Mastermix protokolünde tavsiye edilen şekilde 96 kuyucuklu plakalarda Çizelge 3.4'te verilen primerler ile çoğaltıldı. β-actin ise house-keeping gen olarak kullanıldı. Piklere ait Ct değerleri kullanılarak gen ifadeleri belirlendi.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak değerler hesaplandı. Bu çalışmada hedef genler olarak aşağıdaki genler seçilmiştir.

- NFκB, IKB-α, PI3K, AKT (NFκB sinyal yolağı için)
- Bcl-2, Bax, Kaspaz 8, Kaspaz 3 (İçsel ve dışsal apoptoz yolakları için) ve
- p21, p27, p53 (Hücre döngüsü sinyal yolağı için).

Çizelge 3.4. Bu çalışmada kullanılan primer dizileri (Bostanci, 2021).

Gen ailesi House keeping gen	**Gen adı**	**Baz dizisi**	
B-actin	Human gene and protein abbreviation ACTB/ACTB	Forward Reverse	5’ CTTTGGGCGGAAGACAGGTC 3’ 5’ TTATTGGCGGCTGTGTAAGA 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 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 suppressor Protein P53	Forward Reverse	5’CACGAGCGCTGCTCAGATAGC 3’ 5’ACAGGCACAAACACGCACAAA 3’

Gen ailesi Apoptoz sinyal yolağı	**Gen adı**	**Baz dizisi**	
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, Apoptosis Regulator	Forward Reverse	5’CAGCTGCACCTGACG3’ 5’ATGCACCTACCCAGC3’
Bax	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator Cytochrome c-2	Forward Reverse	5’ATGGACGGGTCCGGGGAG3’ 5’TCAGCCCATCTTCTTCCA3’
Kaspaz 3	Apoptosis-Related Cysteine Peptidase 3	Forward Reverse	5’TCTATGGCGCTGAGATTGTG3’ 5’ CTGTACCAGACCGAGATGTCA 3’
Kaspaz 8	Apoptosis-Related Cysteine Peptidase 8	Forward Reverse	5’AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC3’ 5’GCTGCTTCTCTCTTTTGCTGAA3’

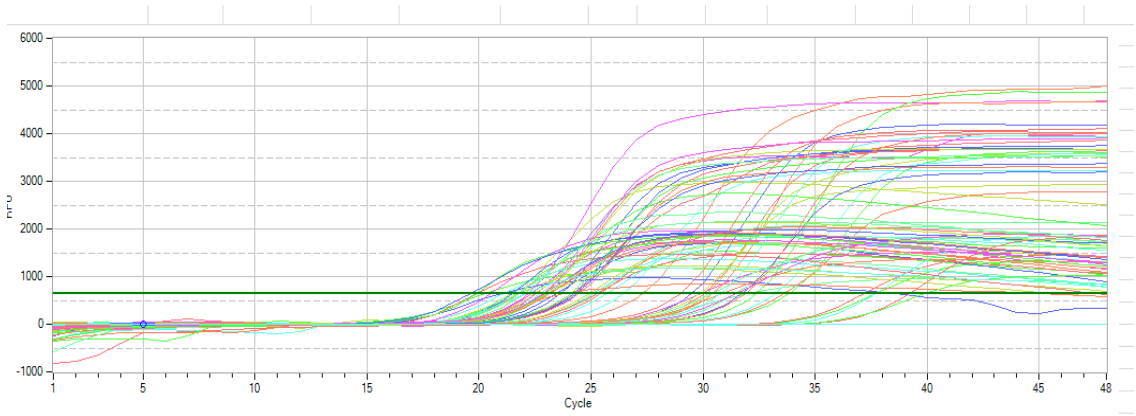
Çizelge 3.5’de belirtilen miktarlarda primer karışımı, SYBR Green qPCR Mastermix ve cDNA reaksiyon bileşenleri 96-kuyucuklu qPCR plakalarına eklenerek üzerine strip çekildi ve Picoreal™ cihazında analiz yapıldı.

Çizelge 3.5. 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 ise şu şekilde yapıldı;

- 1 döngü 50 ºC 2 dk ve 95 ºC 7 dk. (enzimlerin tutunması ve denatürasyon)
- 48 döngü
  - Denatürasyon: 95 ºC 5 sn
  - Primer eşleşmesi (Annealing): 60 ºC 5 sn
  - Primer uzaması (Elongasyon): 60 ºC 30 sn aşamaları ile cDNA'lar çoğaltıldı. Analiz sonunda Şekil 3.4 verilen bir amplifikasyon eğrisi elde edildi.



Şekil 3.4. Amplifikasyon görüntüsü. C6 glioma hücrelerine kurkumin ve NGUC uygulandıktan sonra hücrelerden mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak elde edilen örnekler hedef gen primerleri ile Picoreal cihazında analiz edildi.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen örneklerin istatistiksel analizleri, One-Way ANOVA testi ve sonrasında Tukey post testi ile GraphPad Prism 5 programı kullanılarak yapıldı ve $P<0.05$ olduğu durumlarda test edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu kabul edildi. MTT sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak maddelerin IC50 değerleri GraphPad Prism 5 programında hesaplandı.

BÖLÜM 4

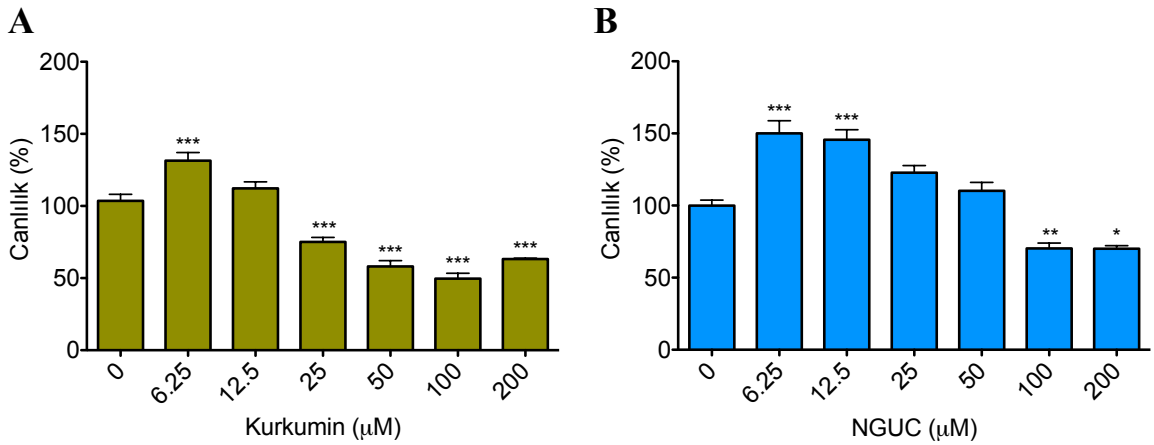
BULGULAR

4.1. Belirli Dozlarda Uygulanan Kurkumin ve NGUC, C6 Hücrelerinde Sitotoksik Etkiye Sahiptir

Kurkuminin C6 glioma hücre hattı üzerine sitotoksik etkisini test etmek için MTT analizi yapıldı. Eşit sayıda C6 hücresi 96-kuyucuklu plakalara ekildi ve hücrelere farklı dozlarda (6.25, 12.5, 25, 50, 100 ve 200μM) kurkumin uygulanarak 48 saat inkübe edildi. Kontrol grubuna ise kuyucuktaki son konsantrasyonu %1 olan DMSO uygulandı. 48 saat inkübasyon süresinden sonra MTT uygulaması ve spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Elde edilen değerler kontrol grubu verileri baz alınarak yüzdelik olarak hesaplandı. Sonuçlara göre, 200μM kurkumin uygulamasından sonra C6 hücrelerinde canlılık oranı %63, 100μM kurkumin uygulamasından sonra canlılık oranı %50, 50μM kurkumin uygulamasından sonra canlılık oranı %58 ve 25μM kurkumin uygulamasından sonra ise canlılık oranı %75 olarak gözlenmiştir (Şekil 4.1A). Daha düşük konsantrasyondaki kurkumin uygulamasının hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.1A). Bu sonuçlar kurkuminin 25μM konsantrasyona kadar C6 hücrelerinde sitotoksisiteye sahip olduğunu göstermiştir.

Benzer şekilde, eşit sayıdaki C6 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (6.25, 12.5, 25, 50, 100 ve 200μM) NGUC uygulandıktan sonra yukarıda bahsedilen analizler yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre 200 ve 100μM NGUC uygulamasından sonra C6

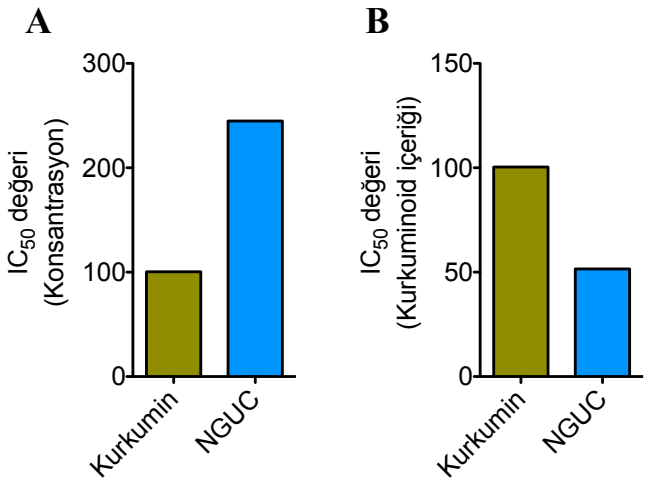
hücrelerindeki canlılık oranı kontrol grubu ile kıyaslandığında yaklaşık %70 olarak gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde daha düşük konsantrasyonlardaki NGUC uygulaması hücrelerde herhangi bir sitotoksisiteye neden olmamış, aksine hücrelerin proliferasyonlarını artırıcı bir etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.1B). Özellikle 12,5µM ve 6,25µM NGUC uygulamalarından sonra C6 hücrelerin çoğalmaları anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.1B). Bu sonuçlar belirli konsantrasyonlarda uygulandığında hem kurkuminin hem de NGUC'un C6 glioma hücrelerinin proliferasyonlarını engelleyebilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, kurkumin düşük dozlarda daha etkili olurken, yüksek konsantrasyonlarda NGUC uygulanması C6 hücrelerinin sitotoksisitesi için gerekli olmuştur. Örneğin, kurkuminin yaklaşık 25µM'da gösterdiği etkiyi NGUC 100µM uygulandığında göstermiş ve arada yaklaşık olarak 4 kat fark olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kurkumin ve NGUC uygulamasından 48 saat sonra C6 hücrelerinin canlılıkları. Eşit sayıdaki C6 hücreleri belirtilen konsantrasyonlarda (A) kurkumin ve (B) NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra hücre canlılıkları MTT analizi ile tespit edilmiştir. Veriler kontrol grubuna göre %'lik olarak hesaplanmıştır. Grafikler dört farklı deneyden elde edilen sonuçların birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Örneklerin istatistiksel analizleri One-Way ANOVA testi ve sonrasında Tukey post testi ile yapılmıştır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Bir sonraki aşamada MTT deneylerinden alınan veriler kullanılarak uygulanan maddelerin IC50 değerleri hesaplanmıştır. Kurkuminin IC50 değeri yaklaşık 100µM olarak bulunurken NGUC'un IC50 değeri yaklaşık 245µM olarak bulunmuştur (Şekil 4.2A). Ancak, daha önce bahsedildiği gibi kurkumin içerisindeki saf kurkuminoid oranı

%95 iken NGUC'un içerisindeki kurkuminoid oranı %20'dir. Sonuçlar bu bağlamda değerlendiğinde total kurkuminoid içeriği açısından arada 4.75'lik bir fark (95/20) bulunmaktadır. Dolayısıyla IC50 değerleri kurkuminoid içeriği açısından eşitlendiğinde (yani NGUC'un IC50 değeri 4.75'e bölündüğünde), NGUC'un IC50 değeri kurkuminin IC50 değerinin yarısı olmaktadır (Şekil 4.2B). Sonuçlarımız bu açıdan değerlendirildiğinde, kurkumin ile karşılaştırıldığında NGUC'un C6 hücrelerinde daha iyi bir sitotoksisiteye sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.2. Kurkumin ve NGUC'un C6 hücrelerindeki IC50 değerlerinin karşılaştırılması. MTT analizinden elde edilen sonuçlar kullanılarak uygulanan maddelerin IC50 değerleri GraphPad programı ile hesaplanmıştır. (A) Aynı konsantrasyonlarda (molarite) uygulanan kurkumin ve NGUC'un IC50 değerleri ve (B) Kurkuminoid içeriğinin eşitlenmesi için NGUC IC50'sinin 4,75'e bölünerek (95/20) elde edilen IC50 değerleri gösterilmektedir.

4.2. Kurkumin ve NGUC, C6 Hücrelerinde Apoptozu Tetikler

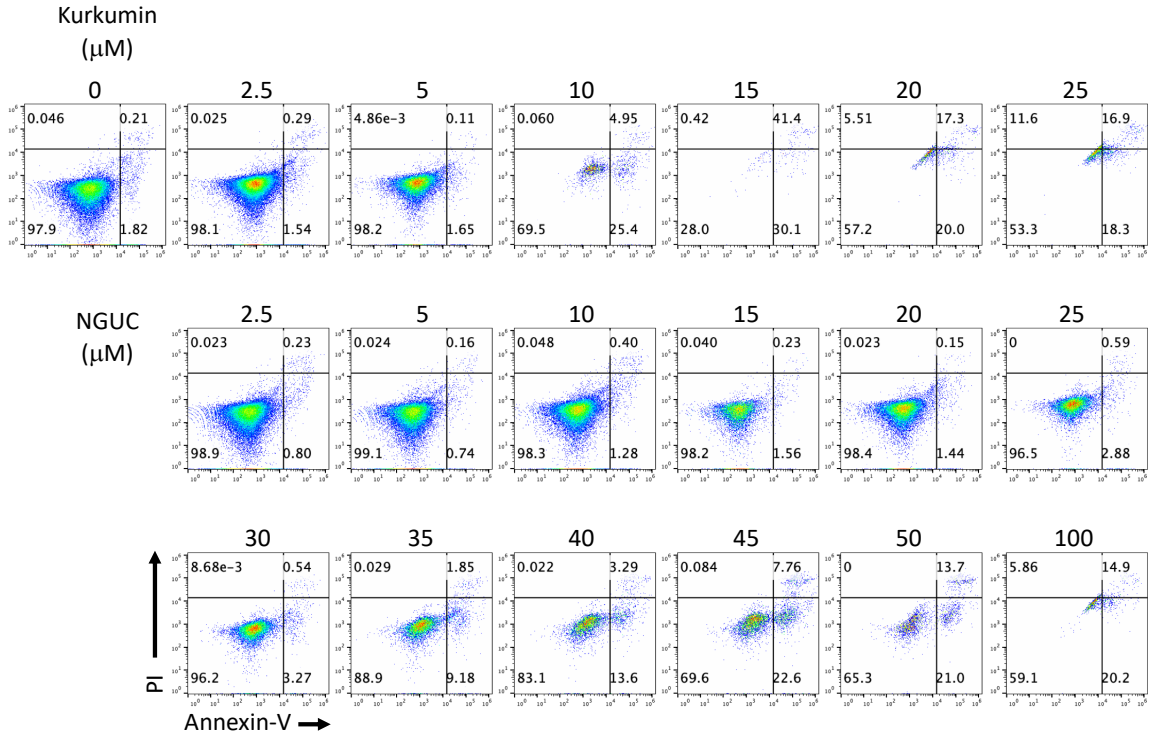
Kurkumin ve NGUC'un glioma hücrelerinde ölümü tetiklediği MTT analizi ile gösterildiğinden, bir sonraki aşamada ölüm mekanizmalarından biri olabilecek apoptozun C6 hücrelerinde uyarılıp uyarılmadığı test edilmiştir. Bunun için Annexin-V ve PI kiti kullanılmıştır. Annexin-V, apoptoza uğrayan hücrelerin dış yüzeyine taşınan bir fosfolipit olan PS'ye bağlanabilen bir moleküldür. Dolayısıyla, floresan işaretli Annexin-V kullanılarak apoptotik hücreler flow sitometri cihazında tespit edilebilir. Annexin-V'ye ilave olarak nekrotik/ölü hücrelerin tespiti için ise ikinci boya olarak PI eklenmektedir.

Flow sitometride elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilip canlı hücreler (Annexin-$V^{-}PI^{-}$), erken (early) apoptotik hücreler (Annexin-$V^{+}PI^{-}$) ve geç (Kim vd.) apoptotik/nekrotik hücreler (Annexin-$V^{+}PI^{+}$) birbirinden ayırt edilebilir.

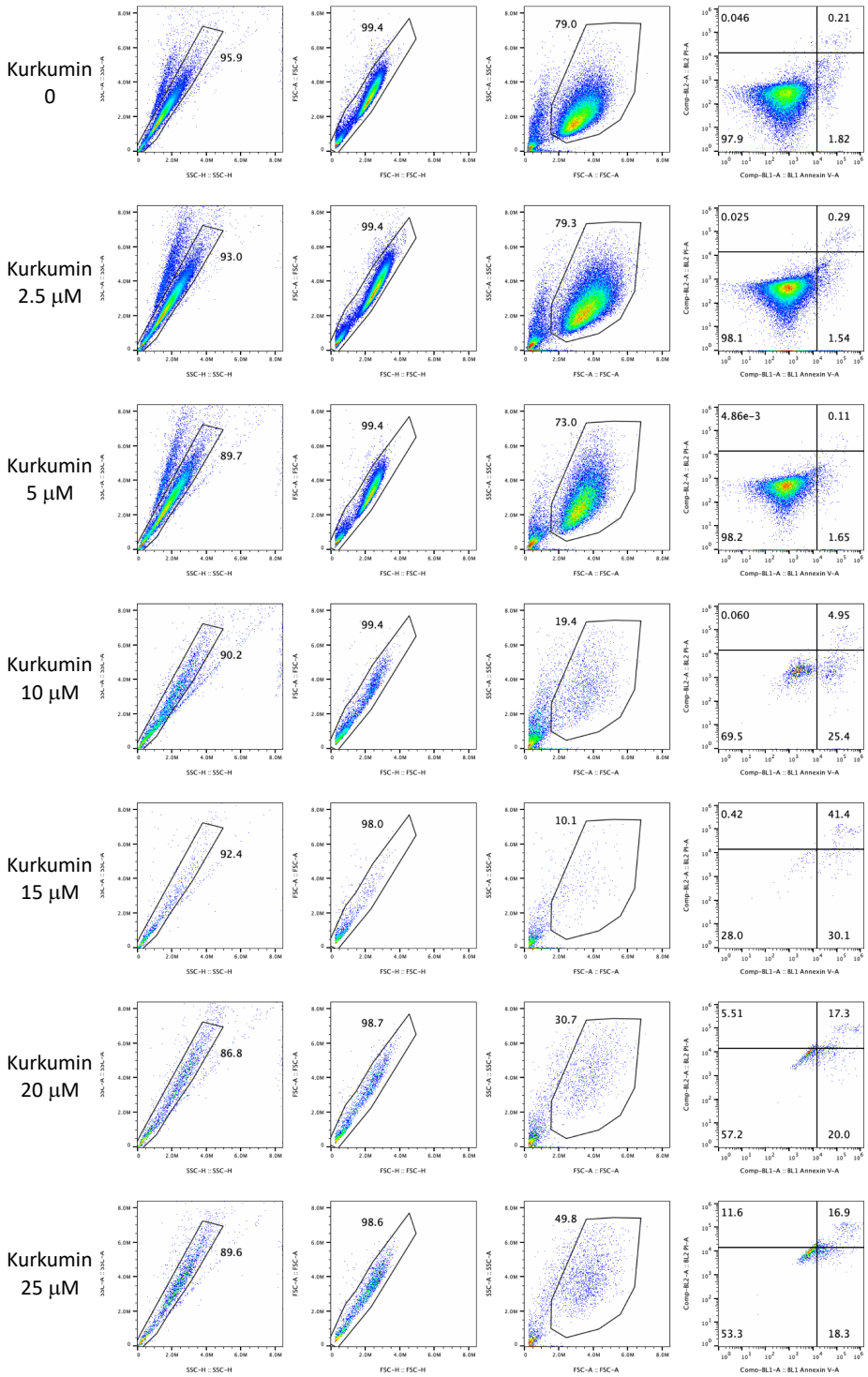
Birçok denemeden sonra flow sitometrideki apoptoz deneyi optimize edilmiştir. Eşit sayıdaki C6 hücrelerine 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 25µM kurkumin uygulandıktan sonra, hücreler 48 saat inkübe edilmiş ve daha sonra metot kısmında bahsedilen protokole göre Annexin-V ve PI ile işaretlenerek flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 2.5 ve 5µM kurkumin uygulaması C6 hücrelerinde apoptozu uyarmamış ve Annexin-$V^{-}PI^{-}$ canlı hücrelerin yüzdelerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1). Detaylı yapılan analizde C6 hücreleri 5µM kurkumin ile muamele edildiğinde SSC vs. FSC kapılaması oranının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1). Ancak 2.5 ve 5µM dozlarından farklı olarak, 10µM kurkumin uygulaması C6 hücrelerinde erken apoptotik (Annexin-$V^{+}PI^{-}$) ve geç apoptotik/nekrotik (Annexin-$V^{+}PI^{+}$) hücre popülasyonlarında bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1). Dahası 10µM kurkumin muamelesi C6 hücrelerinde SSC vs. FSC kapılaması oranını da önemli bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1). Benzer şekilde daha yüksek dozlardaki kurkumin C6 hücrelerinde apoptozu tetiklemiş ve hem SSC vs. FSC kapılamasında hem de Annexin-$V^{-}PI^{-}$ canlı hücre kapılamasında azalmaya neden olmuşken, Annexin-$V^{+}PI^{-}$ ve Annexin-$V^{+}PI^{+}$ hücrelerin yüzdelerini artırmıştır (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.1).

Benzer analizler C6 hücrelerine NGUC uygulamasından sonra da yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarımıza göre, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30µM NGUC uygulaması C6 hücrelerinde Annexin-$V^{+}PI^{-}$ apoptotik hücre popülasyonunun yüzdesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.3, 4.5 ve Çizelge 4.1). Ancak özellikle 25 ve 30µM NGUC uygulaması SSC vs. FSC kapılaması oranını azaltıcı bir etki göstermiştir (Şekil 4.3, 4.5 ve Çizelge 4.1). Fakat 35µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanan NGUC, C6 hücrelerinde hem SSC vs. FSC kapılamasında hem de Annexin-$V^{-}PI^{-}$ canlı hücre oranında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.3, 4.5 ve Çizelge 4.1). Bu azalmayla orantılı olarak, 35µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanan NGUC Annexin-$V^{+}PI^{-}$ erken apoptotik ve Annexin-$V^{+}PI^{+}$ geç apoptotik/nekrotik hücrelerin oranlarını artırıcı bir etki göstermiştir (Şekil 4.3, 4.5 ve Çizelge 4.1). Bu sonuçlar hem kurkuminin hem de NGUC'un farklı konsantrasyonlarda C6 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini

göstermiştir. Annexin-V^{-}PI^{-} canlı hücre açısından kurkumin ve NGUC arasında tahmini olarak doz karşılaştırması yapıldığında kurkuminin 10µM'da gösterdiği etkiyi NGUC yaklaşık olarak 45µM'da göstermiş ve arada yaklaşık 4 kat fark olduğu bulunmuştur ki bu sonuçlar MTT sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.3. Kurkumin ve NGUC farklı konsantrasyonlarda C6 hücrelerinde apoptozu tetikler. C6 hücreleri belirtilen konsantrasyonlardaki kurkumin ve NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra hücreler Annexin-V ve PI boyaları ile boyanmış ve flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak Şekil 4.4'de detaylı bir şekilde verilen kapılama stratejisine göre analiz edilmiştir. Analizlerde Annexin-V^{-}PI^{-} canlı hücreler olarak, Annexin-V^{+}PI^{-} erken (early) apoptotik hücreler olarak ve Annexin-V^{+}PI^{+} geç apoptotik/nekrotik hücreler olarak belirlenmiştir. Her bir bölgedeki sayılar o alanda bulunan hücrelerin toplam hücre içerisindeki yüzdesini ifade etmektedir.

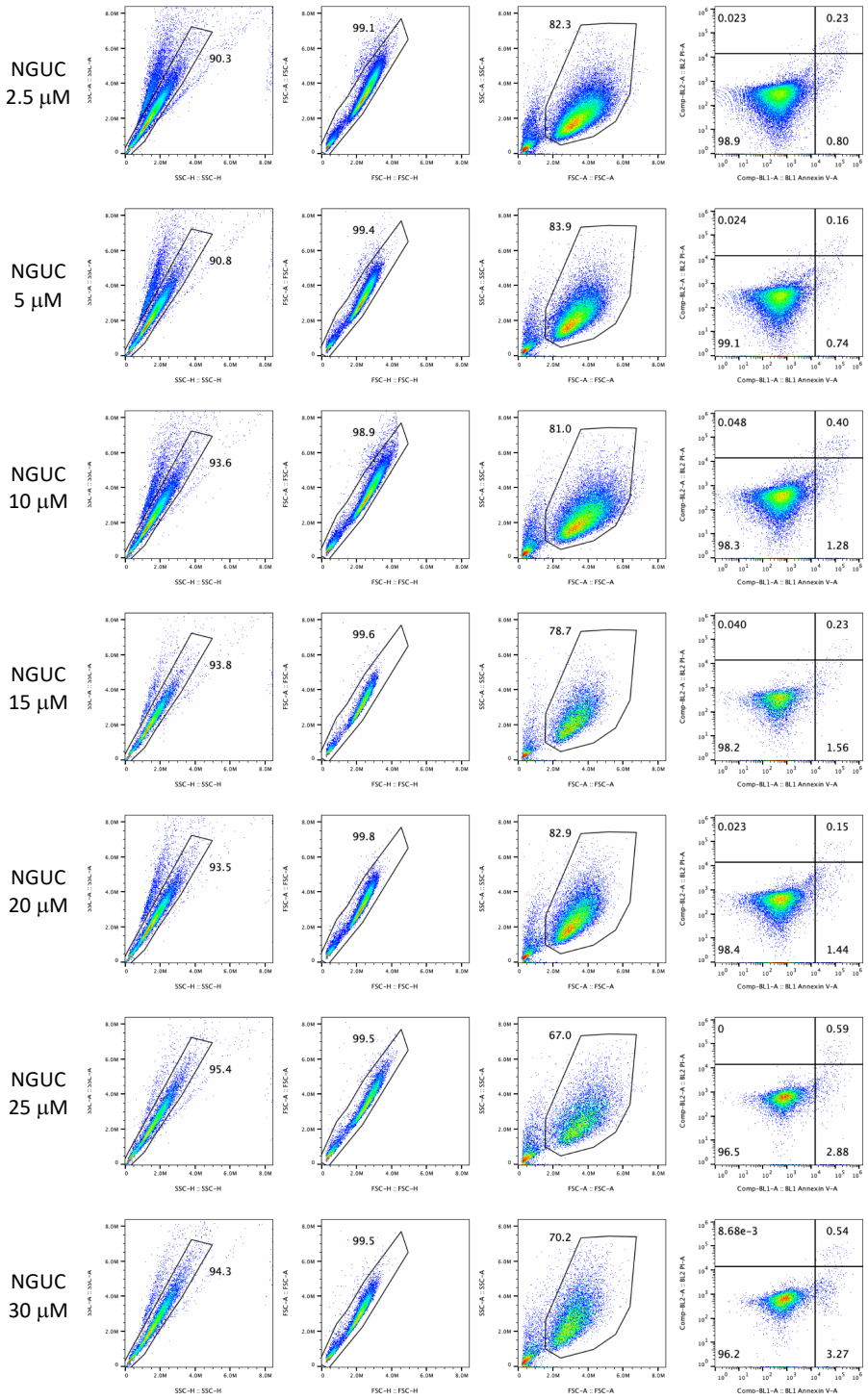


Şekil 4.4. Flow sitometri cihazında elde edilen verilerin her bir örnek için analizi. Belirtilen dozlarda kurkumin uygulamasından sonra C6 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için Hücreler ilk önce SSC-A ve SSC-H ve FSC-A ve FSC-H profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs FSC-A özelliklerine göre şekildeki hücreler seçilmiş ve bu hücrelerde Annexin-V ve PI analizi yapılmıştır.

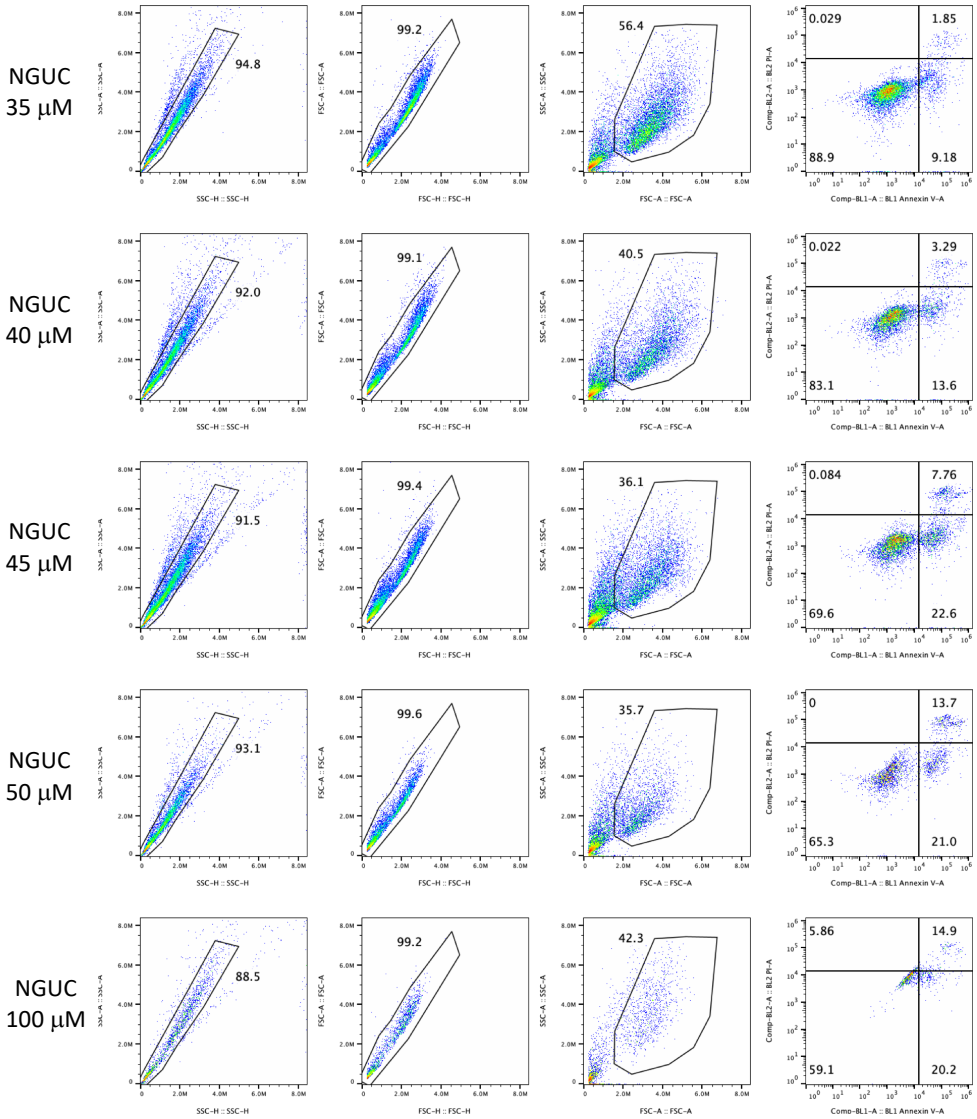
Çizelge 4.1. C6 hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki kurkumin ve NGUC ile 48 saat boyunca muamele edilmiş ve daha sonra hücreler Annexin-V ve PI kiti ile boyanarak flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonrası elde edilen canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdeleri gösterilmektedir.

	Uygulanan Dozlar (μM)	SSC vs. FCS. kapılaması	Canlı hücreler Annexin-V^- PI^- (%)	Apoptotik hücreler Annexin-V^+PI^- (%)	Nekrotik hücreler Annexin-V^+PI^+ (%)
Kurkumin	0	79.0	97.9	1.82	0.21
	2.5	79.3	98.1	1.54	0.29
	5	73.0	98.2	1.65	0.11
	10	19.4	69.5	25.40	4.95
	15	10.1	28.0	30.10	41.40
	20	30.7	57.2	20.00	17.30
	25	49.8	53.3	18.30	16.90

	Uygulanan Dozlar (μM)	SSC vs. FCS. kapılaması	Canlı hücreler Annexin-V^-PI^- (%)	Apoptotik hücreler Annexin-V^+PI^- (%)	Nekrotik hücreler Annexin-V^+PI^+ (%)
NGUC	2.5	82.3	98.9	0.80	0.23
	5	83.9	99.1	0.74	0.16
	10	81.0	98.3	1.28	0.40
	15	78.7	98.2	1.56	0.23
	20	82.9	98.4	1.44	0.15
	30	70.2	96.2	3.27	0.54
	35	56.4	88.9	9.18	1.85
	40	40.5	83.1	13.60	3.29
	45	36.1	69.6	22.60	7.76
	50	35.7	65.3	21.00	13.70
	100	42.3	59.1	20.20	14.90



Şekil 4.5. Flow sitometri cihazında elde edilen verilerin her bir örnek için analizi. Belirtilen dozlarda NGUC uygulamasından sonra C6 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için Hücreler ilk önce SSC-A ve SSC-H ve FSC-A ve FSC-H profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs FSC-A özelliklerine göre şekildeki hücreler seçilmiş ve bu hücrelerde Annexin-V ve PI analizi yapılmıştır.



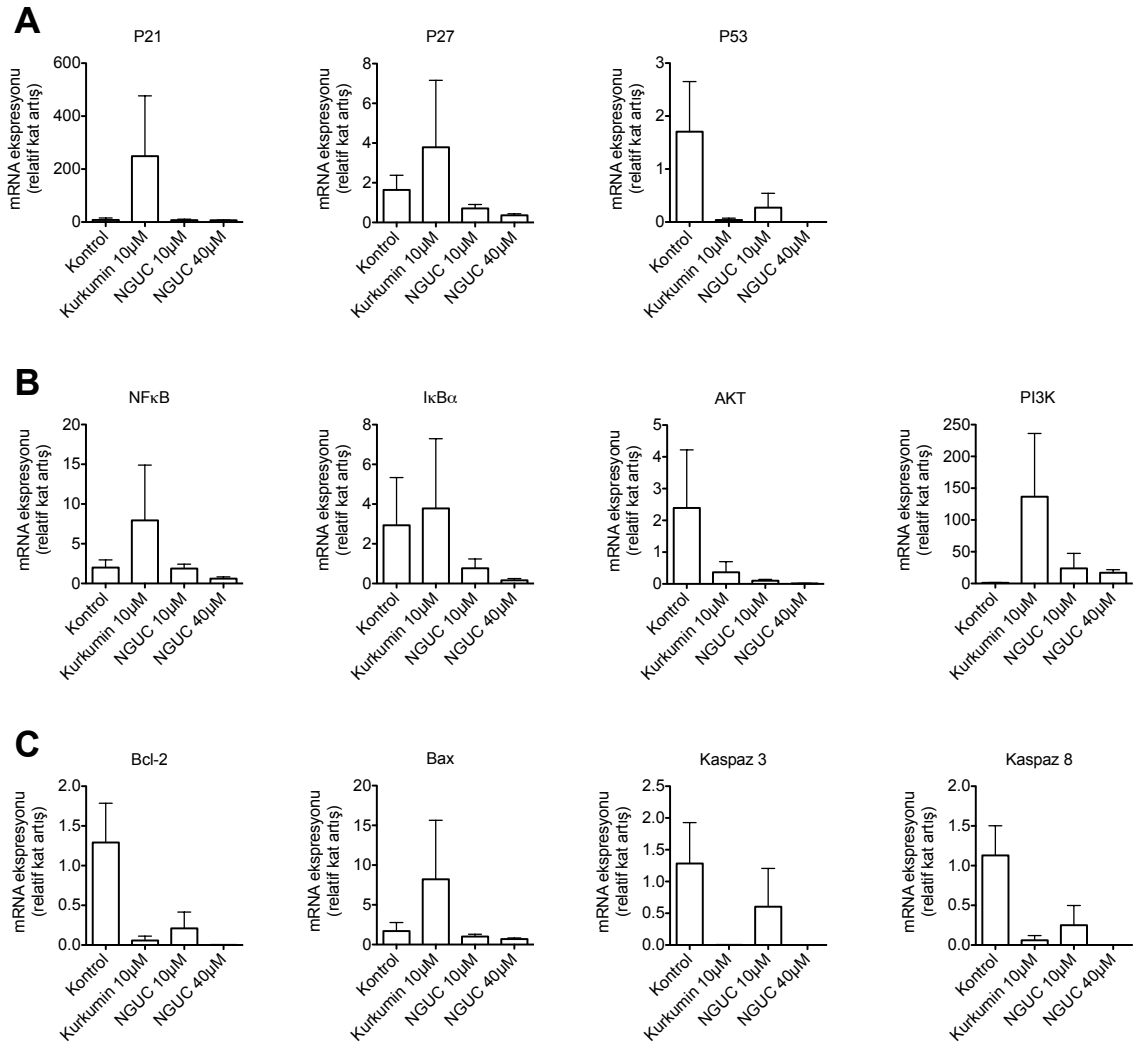
Şekil 4.5. (devamı) Flow sitometri cihazında elde edilen verilerin her bir örnek için analizi. Belirtilen dozlarda kurkumin uygulamasından sonra C6 hücrelerinde apoptotik hücrelerin analizi için Hücreler ilk önce SSC-A ve SSC-H ve FSC-A ve FSC-H profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs FSC-A özelliklerine göre şekildeki hücreler seçilmiş ve bu hücrelerde Annexin-V ve PI analizi yapılmıştır.

4.3. C6 Hücrelerinde RT-PCR Yöntemi ile Hedef Genlerin mRNA İfade Düzeylerinin Belirlenmesi Deney Bulguları

Şimdiye kadar bahsedilen sonuçlarımız hem kurkumin hem de NGUC'un belirli dozlarda C6 hücrelerinin proliferasyonlarını azaltıcı etkiye sahip olduklarını göstermiştir. Dahası her iki bileşik belirli konsantrasyonlarda C6 hücrelerinde apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonunda artışa neden olmuştur. Bir sonraki aşamada bahsedilen etkilerin hangi mekanizmalar üzerinden olabileceği araştırılmış ve bunun için hücre döngüsü, NFκB ve apoptoz yolaklarında rol oynayan bazı genlerin mRNA ifade düzeyleri test edilmiştir.

C6 hücreleri, 10μM kurkumin ve 10 ve 40μM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda NGUC ile 48 saat muamele edildikten sonra metot kısmında detaylandırıldığı şekilde örnekler hazırlanmış ve gerçek zamanlı PCR yöntemi ile hedef genlerin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Hücre döngüsünde önemli rolleri olan proteinleri kodlayan genlerin ifade düzeylerine bakıldığında kurkuminin p21 ve p27'nin mRNA düzeylerinde bir artışa neden olduğu gözlenirken, p53 mRNA ifadesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.6A). Fakat bu değişikliklerin hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı şekilde NGUC uygulaması da test edilen genlerin mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.6A).

Daha sonra kurkumin ve NGUC uygulamasının NFκB ve apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan bazı proteinleri kodlayan genlerin mRNA ifade düzeyleri üzerine etkisi test edilmiştir. NFκB yolağı için NFκB, IκBα, AKT ve PI3K seçilmiş, apoptoz yolağı için ise Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 hedef gen olarak seçilmiştir. Genel olarak her ne kadar madde uygulamaları bazı genlerin ifadesinde küçük artış/azalışlara neden olsa da hem 10μM konsantrasyonda uygulanan kurkumin hem de 10 ve 40μM konsantrasyonda uygulanan NGUC'un test edilen hedef genlerin mRNA ifadeleri üzerine etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. C6 hücrelerinde RT-PCR yöntemi ile hedef genlerin mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi deney bulguları. Belirtilen konsantrasyonlardaki kurkumin ve NGUC C6 hücrelerine uygulanmış ve hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerden mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmış ve hedef genlerin mRNA düzeyleri RT-PCR ile test edilmiştir. (A) Hücre döngüsünde, (B) NFκB ve (C) apoptoz sinyal yolaklarında rol oynayan genlerin mRNA ifadeleri referans gen olan β-actin'e göre normalize edilmiştir. Her bir grup için n=3 olup sonuçlar ortalama ± SEM olarak gösterilmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Kanser multifaktöriyel bir hastalık olmakla beraber çevresel etkenlerin ve endojen kaynaklı mutasyonların etkisiyle ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Her yıl dünyada 10 milyonun üstünde insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Özdoğan, 2021). Kanser çok kompleks bir yapıya sahiptir. Kendi besinini almak için damar oluşturabilmekte veya farklı dokuya göç edebilme özelliğinden dolayı metastaz kolaylıkla yapabilmektedir (Özdoğan, 2021). Beyin ve omurilik kanserlerinden biri olan glioblastoma, sinir hücresini çevreleyen ve onların çalışmasına yardımcı olan yapışkan destekleyici hücrelerde yani glialarda başlamaktadır (Weller vd., 2015). Glioma her yaştan insanda ortaya çıkabilir, ancak erkek erişkinlerde daha sık görülür (Ostrom vd., 2014). Glioblastoma dünyada birçok insanı etkileyen ve Dünya Sağlık Örgütü'ne göre agresif ve en ölümcül beyin kanserlerinden biridir. Glioblastoma büyümesi ve çoğalması büyük çoğunlukla kanser tedavileri ile kontrol altına alınamamıştır. Temozolomid, glioblastoma kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan ve DNA'da hasar oluşturarak hücreleri G2/M hücre fazında durdurup apoptoza sürükleyebilen bir ajandır. Ancak temozolomid'e karşı direnç ilacın etkinliğini kısıtlamaktadır (Stupp vd., 2005).

Kanser hastalarında kullanılabilecek tedavi seçeneklerin geliştirilmesi için bilim insanları birçok farklı yöntem geliştirmeye devam etmektedirler. Konvansiyonel tedavi yöntemleri genellikle cerrahi olarak tümör dokusunun çıkarılması, radyoterapi, kemoterapi ve diğer bazı yöntemleri içermektedir. Malign gliomalar, radyasyona ve

kemoterapötik ilaçlara dirençli ve bu tümörlerle ilişkili kötü prognoza katkıda bulunan, zayıflatıcı bir beyin tümörleri sınıfıdır. NFκB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu, gelişmiş glioma sağ kalımına, radyoterapi ve kemoterapi direncine katkıda bulunur (Schwartzbaum vd., 2006). Dolayısıyla bu etkileri engelleme potansiyeline sahip bitkisel ekstraktlar bilim insanları tarafından doğanın bir hediyesi olarak görülmekte ve kanser dahil çoğu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlardan biri de zerdeçaldan elde edilen kurkumindir. Kurkuminin antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-viral, anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-kanser aktiviteleri sergilediği ve bu nedenle çeşitli malign hastalıklar, diyabet, artrit, Alzheimer hastalığı, alerji ve diğer kronik hastalıklara karşı iyileştirici bir etki gösterebileceği düşünülmektedir (Aggarwal vd., 2007). Kurkumin, sarı veya turuncu pigment olma özelliği taşıyan bir polifenolik bileşiktir. Son dönemlerde özellikle anti-kanser aktivitesi nedeniyle kanser tedavisi alanında bilimsel çalışmaların ilgi odağı olmuştur. Kansere ek olarak, kurkuminin farklı organ sistemlerindeki faydaları rapor edilmiştir. Kurkumin, birçok enflamatuar sistemin homeostazını korumakta ve beyinden toksik agregatların temizlenmesini artırmaktadır (Ghosh vd., 2015). Serbest radikalleri temizleyen, demiri şelatlayan ve antioksidan tepki elemanlarını indükleyen pleiotropik bir moleküldür (Bhat vd., 2019). Son zamanlarda, nörodejeneratif hastalıkların başlamasını önlemek veya tedaviye ek yardımcı aday olabilmesi açısından da kurkumin kullanımına olan ilgi artmıştır. (Bhat vd., 2019). Yine yapılan çalışmalar, kurkuminin kan-beyin bariyerini geçerek amiloid plak oluşumunu azalttığı bu sayede Alzheimer hastalığının önlenmesinde, tedavilere ek olarak kullanılabileceğini ileri sürmüştür (Marchiani vd., 2014).

Literatürde kurkuminin glioblastoma üzerine olan etkileri in vivo ve in vitro olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmaya devam etmektedir (Wong vd., 2021).Örneğin, yapılan bir çalışmada, kurkuminin C6 glioma hücrelerinin kök hücreleri olduğu düşünülen hücrelerin çoğalmalarını azaltıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Fong vd., 2010). Yine C6 hücreleri ile yapılan bir çalışmada kurkumin içeren lipozomun C6 hücrelerinde ve C6 kök hücrelerinde apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Wang vd., 2017). Ayrıca kurkuminin C6 hücrelerinde Paklitaksel'in anti-kanser aktivitesini artırıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Fratantonio vd., 2019). Dahası kurkumin yüklü nanopartiküller C6 hücrelerinin büyümelerini engelleyici özellik göstermiştir (Shao vd., 2011). C6 hücrelerine ilave olarak U87MG, A172 ve T98G gibi diğer hücre hatları da kullanılarak

kurkumin ve yeni geliştirilen kurkumin formülasyonlarının etkileri glioblastomada ortaya konmuştur (Wong vd., 2021) (Sacks vd., 2018). Yapılan bu çalışmalarda kurkumin, genel olarak farklı glioblastoma hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azaltmış, tümör hücrelerinin ölümünü artırmış, apoptozu uyarmış ve bu etkileri moleküler olarak NFκB, PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT gibi birçok sinyal yolağını etkileyerek göstermiştir (Sacks vd., 2018). Yine yakın zamanda yapılan bir çalışmada kurkuminin U87-MG ve T98-G hücre hatlarında apoptozu AKT/FOXO3a/Bim yolağı üzerinden uyardığı gösterilmiştir (Erdoğan Eroğlu, 2022).

Kurkumin bahsedilen bu avantajlara ve minimum toksisiteye sahip olmasına rağmen, zayıf biyoyararlanımı nedeniyle klinikte kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılamamaktadır (Komal vd., 2019). Kurkuminin etkinliği, suda çözünmemesi, ince bağırsaktaki düşük emilimi ve yetersiz biyoyararlanımı nedeniyle hala sınırlıdır. Kurkuminin biyoyararlanımını artırmak için piperin, lipozomlar, nanopartiküller ve fosfolipit kompleksleri gibi birçok kurkumin formülasyonu geliştirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da yeni bir kurkumin formülasyonu (NGUC) geliştirilmiş ve normal kurkumine göre daha avantajlı olduğu rapor edilmiştir (Yabas vd.). Dolayısıyla bu tez kapsamında C6 glioma hücreleri üzerinde kurkumin ve NGUC'un etkileri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Diğer çalışmalara benzer olarak, kurkumin C6 hücrelerinin proliferasyonlarını azaltmış ve apoptozu uyarmıştır. Yüksek dozlarda uygulanan kurkuminin (200µM, 100µM, 50µM ve 25µM'de) daha etkili olduğu ve farklı oranlarda sitotoksisiteye neden olduğu gözlenmiştir. Benzer deneyler daha etkili olması beklenen NGUC ile yapıldığında beklenilenin aksine sadece 200µM ve 100µM konsantrasyonda sitotoksik etki gözlenmiştir. Sonuçlarımız kurkumin ile karşılaştırıldığında NGUC'un C6 hücreleri üzerine etkisinin daha sınırlı olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca sonuçlarımız literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman daha fazla konsantrasyonda kurkumin kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Yapılan birçok çalışmaya benzer bir şekilde kurkumin ve NGUC'un C6 hücrelerinin çoğalma özelliğini engelleyici etkisinin belirlenmesinden sonra bu etkiyi hangi yolaklar üzerinden gösterdiğinin tespiti için mekanistik analizler yapılmıştır. Literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olarak kurkuminin C6 hücrelerinde apoptozu uyardığı bulunmuştur. Ancak kurkumine oranla NGUC'un daha yüksek konsantrasyonlarda C6 hücrelerinde apoptozu uyardığı bulunmuştur. Yine daha önce

yapılan çalışmalar kurkuminin farklı glioblastoma hücre hatlarında NFκB, PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT gibi birçok sinyal yolağını etkileyebildiği rapor edildiğinden (Wong vd., 2021), bizim çalışmamızda kurkumin ve NGUC'un C6 hücrelerinde bazı önemli sinyal yolaklarında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin mRNA ifade düzeyleri de test edilmiştir. Yapılan analizlerde kurkumin ve NGUC'un hücrelerde test edilen genlerin ekspresyon düzeyleri üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır. Diğer çalışmalardan farklı olan bu bulgularımız, deneylerimizde uygulanan kurkumin ve NGUC dozlarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, kurkumin ve NGUC'un seçilen hedef genlerden başka bu yolaklarda rol oynayan diğer genler üzerinden de etki göstermesi muhtemeldir. Son yıllarda apoptoza ilave olarak piroptoz, partanatoz, entoz, ferroptoz, nekroptoz ve siklofilin D aracılı gibi diğer hücre ölüm mekanizmaları da keşfedilmiştir (Nirmala & Lopus, 2020). Dolayısıyla kurkumin ve NGUC, C6 hücrelerinin ölümünü bu yolaklar vasıtasıyla tetikliyor olması da muhtemeldir. Gelecekte farklı konsantrasyonlarda kurkumin ve NGUC uygulanmasından sonra elde edilecek hücrelerde çeşitli sinyal yolaklarında rol oynayan farklı genlerin ifade düzeylerinin test edilmesi, gösterilen etkilerin hangi mekanizmalar üzerinden olduğuna yönelik bilgi edinmemizi sağlayabilecektir.

NGUC kullanılarak yapılan in vivo çalışmalar bu bileşiğin önemli avantajları olabileceğini ve kurkuminin sahip olduğu limitasyonları bertaraf edebileceğini akıllara getirmiştir. Bu düşünceden yola çıkarak bu çalışmada da NGUC'un kurkumine oranla daha iyi bir anti-kanser aktivitesine sahip olabileceği düşünülmüştür. Ancak sonuçlarımız beklenilenin aksine NGUC'un etkisinin kurkuminden az olduğunu göstermiştir. Bu tezde sunulan deneylerde kurkumin ve NGUC hücrelere aynı konsantrasyonlarda uygulanmışlardır. Ancak belirtilmelidir ki bu tezde kullanılan kurkumin ve NGUC, içerisindeki saf kurkuminoid oranı açısından da birbirinde farklıdır. Kullanılan standart kurkumin %95 saf kurkuminoid içerirken, NGUC sadece %20 kurkuminoid içermektedir (Yabas vd., 2021). Dolayısıyla, saf kurkuminoid açısından (95/20) arada 4,75 kat fark bulunmaktadır. Sonuçlarımız bu açıdan değerlendirildiğinde NGUC C6 hücrelerinde, kurkumine benzer hatta nispeten daha iyi bir etki gösterdiği söylenebilir. Buna rağmen daha önce yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulursa (Sahin vd., 2021; Yabas vd., 2021), NGUC'un etkisi beklenenden az olmuştur. Ancak daha önce NGUC ile yapılan çalışmalar in vivo yapılmışken bu tezdeki çalışmalar in vitro yapılmıştır ve sonuçlar her

zaman birbiri ile örtüşmeyebilmektedir. Ayrıca bu çalışma ile birlikte yapılan diğer bir çalışmada da benzer sonuçlar alınmış ve NGUC'un nöroblastoma hücre hattı (N1E-115) üzerine olan anti-kanser etkileri kurkumin ile benzer olmuştur (Yeni, 2022).

Sonuç olarak, kurkumin ve NGUC'un C6 glioma hücrelerinin üzerine anti-kanser etkileri karşılaştırmalı olarak incelenen bu tez çalışmasında, her iki maddenin de C6 hücrelerinde sitotoksik bir etki gösterdiği ve apoptozu tetikledikleri gösterilmiştir. Rat plazmasında daha yüksek oranda biyobulunur olmasından dolayı NGUC'un daha etkili olması beklenmiş ancak sonuçlarımız bu düşünceyi desteklememiştir. Gelecekte yapılacak in vitro ve in vivo çalışmalar özellikle NGUC'un etkinliğini ortaya koyabilecek ve hem kurkuminin hem de NGUC'un klinikte kullanımı konusunda aydınlatıcı bilgiler sunabilecektir.

KAYNAKLAR

Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*, *595*, 1-75.

Aoki, H., Takada, Y., Kondo, S., Sawaya, R., Aggarwal, B. B., & Kondo, Y. (2007). Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular pharmacology*, *72*(1), 29-39.

Aparicio-Blanco, J., & Torres-Suarez, A. I. (2018). Towards tailored management of malignant brain tumors with nanotheranostics. *Acta Biomater*, *73*, 52-63.

Armstrong, T. S., & Gilbert, M. R. (2000). Metastatic brain tumors: diagnosis, treatment, and nursing interventions. *Clin J Oncol Nurs*, *4*(5), 217-225.

Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*.

Bhat, A., Mahalakshmi, A. M., Ray, B., Tuladhar, S., Hediyal, T. A., Manthiannem, E., Padamati, J., Chandra, R., Chidambaram, S. B., & Sakharkar, M. K. (2019). Benefits of curcumin in brain disorders. *Biofactors*, *45*(5), 666-689.

Bhat, G. S., Reddy, C. K. A., Shankar, N., & Panahi, I. (2019). A Computationally efficient IVA-based Blind Source Separation for Hearing Aid Applications and its Real-time Implementation on Smartphone. *Proc Meet Acoust*, *39*(1).

Bommer , U. A., & Perrow, K. L. (2014). *Cancer biology: Molecular and genetic basis*. mayıs 25 tarihinde https://wiki.cancer.org.au/oncologyformedicalstudents/Cancer_biology:_Molecular_and_genetic_basis dan alınmıştır.

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.

Pitot, H. C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer, Volume72, IssueS3*, 962-970.

Cahill, D., & Turcan, S. (2018). Origin of Gliomas. *Semin Neurol*, *38*(1), 5-10.

Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, *11*(2), 85-95.

Calibasi-Kocal, G., Pakdemirli, A., Bayrak, S., Ozupek, N. M., Sever, T., Basbinar, Y., Ellidokuz, H., & Yigitbasi, T. (2019). Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. *J buon*, *24*(4), 1482-1487.

Camp, S., & Dawn, F. (2016). Brain Tumors Facing Trouble Head-on. *Nursing made Incredibly Easy*, 20-28.

Catt, S., Chalmers, A., & Fallowfield, L. (2008). Psychosocial and supportive-care needs in high-grade glioma. *Lancet Oncol*, *9*(9), 884-891.

Choi, B. H., Kim, C. G., Bae, Y.-S., Lim, Y., Lee, Y. H., & Shin, S. Y. (2008). p21Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: role of early growth response-1 expression. *Cancer research*, *68*(5), 1369-1377.

Cuşkun, Y. (2019). *Beyin metastazlarının derin öğrenmeyle sınıflandırılması* Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü].

Davis, C. P. (2021). *Signs of Cancer*. 25.05 tarihinde https://www.medicinenet.com/cancer/article.htm dan alınmıştır.

Dirks, P. B. (2008). Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(17), 2916-2924.

Erdoğan Eroğlu, M. (2022). *Kurkuminin İnsan Glioblastoma Hücre Hatlarında Akt, Foxo3a Ve Bim Yolağı Üzerine Etkilerinin Araştırılması*. (Yayımlanmamış Tıpta Uzmanlık Tezi). Gaziantep Üniversitesi/Tıp Fakültesi, Gaziantep.

Fong, D., Yeh, A., Naftalovich, R., Choi, T. H., & Chan, M. M. (2010). Curcumin inhibits the side population (SP) phenotype of the rat C6 glioma cell line: towards targeting of cancer stem cells with phytochemicals. *Cancer letters*, *293*(1), 65-72.

Fratantonio, D., Molonia, M. S., Bashllari, R., Muscarà, C., Ferlazzo, G., Costa, G., Saija, A., Cimino, F., & Speciale, A. (2019). Curcumin potentiates the antitumor activity of Paclitaxel in rat glioma C6 cells. *Phytomedicine*, *55*, 23-30.

Garcea, G., Berry, D. P., Jones, D. J., Singh, R., Dennison, A. R., Farmer, P. B., Sharma, R. A., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2005). Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *14*(1), 120-125.

Ghosh, S., Banerjee, S., & Sil, P. C. (2015). The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol*, *83*, 111-124.

Giordano, A., & Tommonaro, G. (2019). Curcumin and cancer. *Nutrients*, *11*(10), 2376.

Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J*, *15*(1), 195-218.

Hacıyakupoğlu, E., Oktay, K., Olguner, S. K., Saraç, M. E., YILMAZ, D. M., & HACIYAKUPOĞLU, S. (2014). Çocukluk çağı beyin tümörleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *23*(3), 367-386.

Hill, C. I., Nixon, C. S., Ruehmeier, J. L., & Wolf, L. M. (2002). Brain tumors. *Phys Ther*, *82*(5), 496-502.

Jay F. Dorsey, Ryan D. Salinas, Mai Dang, Michelle Alonso-Basanta, Kevin D. Judy, Amit Maity, Robert A. Lustig, John Y.K. Lee, Peter C. Phillips, & Pruitt, A. A. (2020). Cancer of the Central Nervous System. In *Abeloff's Clinical Oncology*.

Jiang, Y., & Uhrbom, L. (2012). On the origin of glioma. *Upsala journal of medical sciences*, *117*(2), 113-121.

Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & M., S. D. (2002). mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery [Book Article]. *Cell 110*(2), 163-175.

Kok, V. C., & Yu, C. C. (2020). Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. *Int J Nanomedicine*, *15*, 8019-8036.

Komal, K., Chaudhary, S., Yadav, P., Parmanik, R., & Singh, M. (2019). The Therapeutic and Preventive Efficacy of Curcumin and Its Derivatives in Esophageal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, *20*(5), 1329-1337.

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

Kurulu, A. W. v. Y. (2019). Kanser (Onkoloji). https://www.acibadem.com.tr/acibadem-de/kanser-onkoloji/

Küçükoğlu, K., Aktan, Y., & GülHalise, İ. (2013). Çevresel Faktörler ve Kanser.

Ludwig, K., & Kornblum, H. I. (2017). Molecular markers in glioma. *J Neurooncol*, *134*(3), 505-512.

Marchiani, A., Rozzo, C., Fadda, A., Delogu, G., & Ruzza, P. (2014). Curcumin and curcumin-like molecules: from spice to drugs. *Current medicinal chemistry*, *21*(2), 204-222.

Miranda, A., Blanco-Prieto, M., Sousa, J., Pais, A., & Vitorino, C. (2017). Breaching barriers in glioblastoma. Part I: Molecular pathways and novel treatment approaches. *Int J Pharm*, *531*(1), 372-388.

Mohajeri, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., & Javan, M. (2015). Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair. *Neuropharmacology*, *99*, 156-167.

Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem*, *60*(5), 1620-1637.

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

Ostrom, Q., Cohen, M. L., Ondracek, A., Sloan, A., & Barnholtz-Sloan, J. (2013). Gene markers in brain tumors: what the epileptologist should know. *Epilepsia*, *54 Suppl 9*, 25-29.

Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol*, *16*(7), 896-913.

Özdoğan, M. (2020). *Dünya Kanser İstatistikleri 2020*.tarihinde https://www.drozdogan.com/dunya-kanser-istatistikleri-2020-her-5-kisiden-biri-kanserle-karsilasiyor/ dan alınmıştır.

Özdoğan, M. (2021). *Kanser nedir? Neden ve nasıl oluşur? Kısaca tüm süreç ve biyoloji*. 25 Mayıs tarihinde https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/ dan alınmıştır.

Perkins, A., & Liu, G. (2016). Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, *93*(3), 211-217.

Pichardo, G. (2020). *Brain Cancer and Gliomas*. 22 Mart tarihinde https://www.webmd.com/cancer/brain-cancer/malignant-gliomas dan alınmıştır.

Reddy, R. S. (2018). *What is the most aggressive form of glioma? Is there a complete cure?* 22 Mart tarihinde https://www.yashodahospitals.com/blog/glioma-causes-symptoms-diagnosis-treatment/ dan alınmıştır.

Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, *53*(3), 441-442.

Sacks, D., Baxter, B., Campbell, B. C. V., Carpenter, J. S., Cognard, C., Dippel, D., Eesa, M., Fischer, U., Hausegger, K., Hirsch, J. A., Shazam Hussain, M., Jansen, O., Jayaraman, M. V., Khalessi, A. A., Kluck, B. W., Lavine, S., Meyers, P. M., Ramee, S., Rüfenacht, D. A., . . . Vorwerk, D. (2018). Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int J Stroke*, *13*(6), 612-632.

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).

Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice Neurology*, *2*(9), 494-503.

Senft, C., Polacin, M., Priester, M., Seifert, V., Kögel, D., & Weissenberger, J. (2010). The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas. *BMC cancer*, *10*(1), 1-8.

Shao, J., Zheng, D., Jiang, Z., Xu, H., Hu, Y., Li, X., & Lu, X. (2011). Curcumin delivery by methoxy polyethylene glycol-poly(caprolactone) nanoparticles inhibits the growth of C6 glioma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *43*(4), 267-274.

Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: The story so far. In (Vol. 41, pp. 1955-1968).

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 987-996.

Unlu, A., Nayir, E., Dogukan Kalenderoglu, M., Kirca, O., & Ozdogan, M. (2016). Curcumin (Turmeric) and cancer. *J buon*, *21*(5), 1050-1060.

Wan Mohd Tajuddin, W. N. B., Lajis, N. H., Abas, F., Othman, I., & Naidu, R. (2019). Mechanistic Understanding of Curcumin's Therapeutic Effects in Lung Cancer. *Nutrients*, *11*(12).

Wang, Y., Ying, X., Xu, H., Yan, H., Li, X., & Tang, H. (2017). The functional curcumin liposomes induce apoptosis in C6 glioblastoma cells and C6 glioblastoma stem cells in vitro and in animals. *International journal of nanomedicine*, *12*, 1369.

Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P. Y., & Stupp, R. (2015). Glioma. *Nature reviews Disease primers*, *1*(1), 1-18.

Wong, S. C., Kamarudin, M. N. A., & Naidu, R. (2021). Anticancer mechanism of curcumin on human glioblastoma. *Nutrients*, *13*(3), 950.

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.

Yeni, S. (2022). *Kurkumin Ve Yeni Nesil Ultrasol Kurkuminin Nöroblastoma Hücre Hattı (N1E-115) Üzerine Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi.* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2017). Kanser Biyokimyası *Dicle Üniv Vet Fak Derg*

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Hilal SAMAST

E-mail: hilalsamast@gmail.com

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 : (2010-2014) Ahmet Rüştü Lisesi

İş Deneyimleri

(16.01.2022-devam ediyor) World Medicine, Kalite Kontrol Uzman Yardımcısı, Çerkezköy, Tekirdağ

(24.01.2022-30.12.2022) Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş., Steril Likit 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

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 glioma hücre hattı (C6) 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. **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.

   Bu tez çalışmasından elde edilen bazı veriler, 29-31 Ağustos 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. 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.