

RESEARCH ARTICLE / ARAŞTIRMA MAKALESİ

Kurkuminin meme kanserinde TGF- β temelli Smad4 sinyal yolağında etkisinin gen ekspresyon düzeyinde araştırılması

Investigating the Effects of Curcumin on the TGF- β mediated Smad4 Signaling Pathway in Breast Cancer at Gene Expression Level

Erhan Bezdegümel¹, Asuman Deveci Özkan^{3*}, Merve Nur İnce¹, Zeynep Özman², Bilge Nur Küçükakça¹, Ahmet Yasir Men¹, Gamze Güney Eskiler³, Cemil Bilir⁴, Süleyman Kaleli³

¹Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dönem 5, Sakarya, Türkiye

²Bezmi Alem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

⁴Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bölümü, Sakarya, Türkiye

ORCID

Erhan Bezdegümel: <https://orcid.org/0000-0002-5798-2186>

Asuman Deveci Özkan: <https://orcid.org/0000-0002-3248-4279>

Merve Nur İnce: <https://orcid.org/0000-0003-2884-5542>

Zeynep Özman: <https://orcid.org/0000-0002-8415-6883>

Bilge Nur Küçükakça: <https://orcid.org/0000-0002-7648-3083>

Ahmet Yasir Men: <https://orcid.org/0000-0002-1981-4587>

Gamze Güney Eskiler: <https://orcid.org/0000-0002-2088-9914>

Cemil Bilir: <https://orcid.org/0000-0002-1372-4791>

Süleyman Kaleli: <https://orcid.org/0000-0002-6043-2521>

Geliş Tarihi / Received: 6 Ekim 2020

Kabul Tarihi / Accepted: 28 Ekim 2020

***Sorumlu yazar:** Asuman DEVECİ ÖZKAN, Adres: Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Korucuk, 54290, Adapazarı, SAKARYA, Tel: 0 506 236 55 28, E mail: deveci@sakarya.edu.tr



ÖZET

Amaç: Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinden izole edilen ve literatürde anti-kanser etkiye sahip olduğu bilinen bir polifenoldür. Kurkuminin, meme kanserinde MAPK ve PI3K sinyal yollarında etkisine dair çalışmalar bulunmasına rağmen, TGF-β sinyali üzerinde etkisine dair bir çalışma mevcut değildir. Bu kapsamda, mevcut çalışmada kurkuminin iki farklı alt tip [MCF-7 (Luminal A) ve MDA-MB-231 (triple negatif)] meme kanseri ve HUVEC kontrol hücrelerinde TGF-β sinyalinin düzenlenmesinde rol alan *GSK-3β*, *Smad4* ve *CCDN1* genlerinde ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Method: Kurkuminin MCF-7, MDA-MB-231 ve HUVEC hücrelerinde *GSK-3β*, *Smad4* ve *CCDN1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde değişimlerin belirlenmesi için, kurkuminin etkin dozu belirlendikten sonra, kurkumin uygulanan hücrelerden RNA izole edilerek ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile analiz edilmiştir.

Bulgular: WST-1 bulgularına göre meme kanseri hücrelerinde en etkin doz olarak belirlenen 10 µM

ABSTRACT

Aim: Curcumin is a polyphenol extracted from the *Curcuma longa* plant known for its anti-cancer properties in the literature. Although the effects of curcumin on the MAPK and PI3K signaling pathways in breast cancer are known, its effect on the TGF-β signaling pathways has not been identified. In this context, our study aimed to determine the effects of curcumin on gene expression levels of *GSK-3β*, *Smad4* and *CCDN1*, which regulate the TGF-β signaling pathway, in two different subtypes of breast cancer [MCF-7 (Luminal A) and MDA-MB-231 (triple-negative)], and HUVEC control cell lines.

kurkumin uygulanan MCF-7, MDA-MB-231 ve HUVEC hücrelerinde *GSK-3β* ekspresyon seviyeleri sırasıyla 6.1-, 15.0- ve 7.6- kat iken, *Smad4* ekspresyon seviyelerinin 1.7-, 5.1- ve 8.9- kat arttığı belirlenmiştir (p<0.05). Ayrıca, 10 µM kurkumin uygulanan MCF-7, MDA-MB-231 ve HUVEC hücrelerinde *CCDN1* mRNA seviyesinin sırasıyla 7.6-, 3.8- ve 8.6- kat artığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, kurkumin meme kanseri hücrelerinde TGF-β temelli sinyal yollarının düzenlenmesinde rol almaktadır. Ayrıca, kurkuminin daha agresif özelliğe sahip olan MDA-MB-231 hücrelerinde azalan *CCDN1* seviyesine bağlı olarak, MCF-7 hücrelerine göre *GSK-3β* ve *Smad4* 'ün ekspresyon seviyelerinde daha fazla kat artışına neden olduğu tespit edilmiştir. Ancak, kurkuminin meme kanseri hücrelerinde TGF-β temelli Smad4 ve diğer sinyal yollarında etkisinin belirlenmesine yönelik daha ileri moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi gereklidir.

Anahtar sözcükler: Meme kanseri, Kurkumin, *GSK-3β*, *Smad4*, *CCDN1*.

Materials and method: First, the effective concentration of curcumin was determined using WST-1 viability assay to investigate its effects on *GSK-3β*, *Smad4* and *CCDN1* gene expression levels in MCF-7, MDA-MB-231, and HUVEC cell lines. Subsequently, RNA was isolated from cells treated with curcumin, and gene expression levels were analyzed by RT-PCR.

Results: 10 µM curcumin was the most effective concentration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines according to WST-1 results. Our results showed a 6.1-, 15.0-, and 7.6- fold increase in *GSK-3β* expression levels and a 1.7-, 5.1-, and 8.9-fold increase in *Smad4* expression levels in MCF-7, MDA-MB-231, and HUVEC cell lines,



respectively. Additionally, 7.6-, 3.8- and 8.6-fold increase in *CCDN1* mRNA levels were detected in MCF-7, MDA-MB-231 and HUVEC cells, respectively following 10 µM curcumin incubation.

Conclusion: In conclusion, curcumin plays a role in the regulation of TGF-β-based signaling pathways in breast cancer cells. Furthermore, curcumin caused a higher increase in *GSK-3β* and

Smad4 expression levels in the more aggressive MDA-MB-231 cells with reduced expression of *CCDN1* level than MCF-7 cells. However, further molecular analysis is required to determine the effect of curcumin on TGF-β-based Smad4 and other signaling pathways in breast cancer cells.

Key words: Breast cancer, Curcumin, GSK-3β and Smad4, CCDN1.

GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır (1) ve lumpektomi, radyasyon terapisi, kemoterapi ve endokrin tedavisi gibi çeşitli tedavi yöntemlerine rağmen meme kanserinin nüks oranının hala yüksek olduğu bildirilmektedir (2,3). Bu nedenle, meme kanserinin gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunan moleküler mekanizmaları anlamamanın yanı sıra her bir alt tipe özgü olarak tedavi seçeneklerinin belirlenmesi önemli rol oynamaktadır.

Kurkumin, *Curcuma longa L.* (zerdeçal) (4) rizomlarının en önemli bileşeni olmakla birlikte, zerdeçal bitkisinden elde edilen bir polifenolik bileşiktir (5). Kurkumin sahip olduğu anti-kanser, anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkileri nedeniyle son yirmi yıldır büyük bir ilgi görmektedir (6). Literatürde var olan çeşitli çalışmalarda kurkuminin meme başta olmak üzere, akciğer, baş ve boyun, prostat ve beyin tümörleri üzerindeki anti-kanser etkisi bildirilmiştir (7). Kurkumin, Wnt/β-katenin, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) /protein kinaz B (Akt), Janus kinaz (JAK)/ sinyal dönüştürücü ve aktivatör transkripsiyonu (STAT), mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolları ve p53 sinyal iletimi ve nükleer faktör-κB (NF-κB) sinyal yolağı da dahil olmak üzere farklı hücrel sinyal yolları ile ilişkili olarak kanser progresyonunda gerilemesinde terapötik etkiye sahiptir (8). Ancak kurkuminin tümör gelişiminin farklı aşamalarında hem bir tümör baskılayıcı hem de bir metastaz destekleyici olarak ikili bir rol oynayan TGF-β sinyali (9) üzerine olan etkisine dair literatürde bir çalışma bulunmamaktadır.

TGF-β tarafından başlatılan sinyal yolağının aktivasyonu için TGF-β'nin transmembran serin/treonin kinazlar olarak bilinen spesifik reseptörlere bağlanması gerekmektedir. TGF-β, yapısal olarak aktif bir serin/treonin kinaz olan TGF-β reseptörü tip II'ye (TβRII) bağlanmaktadır. Aynı anda TGF-β reseptörü tip I (TβRI) de komplekse dahil edilerek TβRII tarafından fosforile edilmektedir. TβRI'in fosforilasyonu, aşağı yöndeki



sinyalleme kaskadlarını aktive etmektedir. Ancak hücre içi TGF- β sinyal yolağı karmaşıktır ve birçok farklı sinyal yollarını aktive edilebilmektedir (10,11). TGF- β sinyali ile başlatılan sinyal yolları arasında PI3K, Wnt/ β -katenin, Smad ve MAPK gibi çeşitli sinyal yolları yer almaktadır. Ancak başlıca tercih edilen TGF- β sinyal iletimi Smad temelli sinyal yolağıdır. Reseptörle aktive olan Smad2 veya Smad3 proteinleri (R-Smadlar), Smad4 ile kompleks oluşturmaktadır. Bunu takiben ortaya çıkan heteromerik Smad kompleksi, TGF- β 'ya yanıt veren genlerin transkripsiyonunu düzenlemek üzere çekirdeğe geçmektedir (12,13). Bunun yanı sıra, glikojen sentaz kinaz 3- β (GSK-3 β) β -katenini fosforile ederek ubiquitinasyonunu ve proteazomal degradasyonunu sağlayarak Wnt varlığında Smad3 ile kompleks oluşturarak Smad sinyal yolağında etkilidir (14-16). Yapılan bir çalışmada aktive edilmemiş Smad3'ün, ubiquitine bağlı proteazomal yıkımında β -kateninin yıkım kompleksini anımsatan bir şekilde GSK-3 β 'nın rol aldığı gösterilmiştir (17). Ayrıca Smad4 aktivitesinin, MAPK ve Wnt/GSK3 bağımlı fosforilasyona bağlı olduğu ve GSK-3 β tarafından Smad4'ün fosforile edildiği yapılan bir diğer çalışmada ortaya konmuştur (18). Bunun yanı sıra erken aşamalarda, birçok tümörde, siklin D (*CCND1*) ve c-Myc gibi proliferasyon genlerinin ekspresyon seviyesinin artması Ras/Erk ve Wnt onkojenik yolların aktivitesine neden olmaktadır (19). Bu mitojenik etki, MAPK ve Wnt/GSK3 sinyal yollarının aracılık ettiği TGF- β /Smad4 anti-proliferatif aktivitesindeki artışla dengelenmektedir (18).

Bu kapsamda, mevcut çalışmada kurkuminin TGF- β sinyalinin seçici olarak tercih ettiği Smad4 yolağı ile GSK3- β arasındaki ilişkinin belirlenmesi için; iki farklı alt tip [MCF-7 (Luminal A) ve MDA-MB-231 (triple negatif)] meme kanseri ve HUVEC kontrol hücrelerinde GSK-3 β , *Smad4* ve *CCND1* genlerindeki ekspresyon seviyelerinin belirlenerek araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücre hatları MCF7, MDA-MB-231 ve insan umbilikal ven endotel hücresi (HUVEC) hücre hattı American Type Culture Collection'dan (ATCC) satın alındı. Her üç hücre hattı, % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, Invitrogen, USA) ve 100 unit penisilin / streptomisin (Gibco, Invitrogen, USA) içeren DMEM medyumunda kültüre edildi. Tüm hücre hatları nemlendirilmiş bir inkübatörde (Thermo Fisher Scientific) 37 °C'de % 5 CO₂ ile inkübe edildikten sonra analizler yapılmadan



önce Countes II Hücre Sayım cihazı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak sayıldı.

Canlılık Analizi

WST-1 kit protokolüne göre 96 kuyulu hücre kültürü plakalarında her bir kuyusuna 2×10^4 hücre ekildikten sonra, MCF-7, MDA-MB-231 ve HUVEC hücreleri 48 saat boyunca 5 ve 10 μM dozlarda kurkumin ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyuya 10 μl WST-1 boyası eklenerek 450 nm dalga boyunda Elisa Reader (Allsheng, Çin) ile ölçüm yapılmıştır. Kurkumin ile muamele edilmemiş olan kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak sunulmuştur.

RNA izolasyonu

WST-1 canlılık analizini takiben, *GSK-3β*, *Smad4* ve *CCDN1* genlerinin ekspresyon seviyesindeki değişimlerin belirlenmesi için; 48 saat boyunca 5 ve 10 μM kurkumin uygulanan MCF-7, MDA-MB-231 ve HUVEC hücreleri PBS ile yıkanmış ve total RNA izolasyonu E.Z.N.A.VR Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, ABD) ile uygun kit protokolüne göre yapılmıştır.

RT-PCR analizi

İzole edilen RNA'ların miktar ve saflık tayini Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı ile yapılmıştır. İzole RNA'lardan High Capacity cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak uygun kit protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizi için sentezlenen cDNA'ları kullanılarak *GSK-3β*, *Smad4* ve *CCDN1*'in mRNA düzeylerinde değişimler uygun probe kullanılarak RT-PCR cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) yardımıyla belirlenmiştir.

İstatistiksel Analizler

Veriler "SPSS 22.0" istatistik programı kullanılarak ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hücrelerin canlılık yüzdeleri arasındaki farklılıklar tek-yönlü varyans analizi (Post-Hoc Tukey) ile değerlendirilmiştir. Farklı hücre gruplarındaki mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar istatistiksel olarak web tabanlı $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ metodu ile karşılaştırılmıştır.

SONUÇLAR

Kurkuminin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi

48 saat boyunca 5 ve 10 μM kurkumin uygulanan meme kanseri hücrelerinde kurkuminin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, kurkuminin artan konsantrasyonuna bağlı



olarak hücrelerde canlılık değerlerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 1; $p < 0.01$). 5 μM kurkumin uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %77.8 ve %55.6 iken, 10 μM kurkumin uygulandığında canlılık yüzdelerinin sırasıyla anlamlı bir şekilde %63.9'a ve %38.2 azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.01$). 5 ve 10 μM kurkumin uygulanan HUVEC hücrelerinde ise, canlılık yüzdeleri sırasıyla %82.9 ve %73.4 olarak analiz edilmiştir.

TGF-β sinyali ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyinde değişimler

Kurkuminin TGF-β sinyali ile ilişkili genler üzerinde etkisinin belirlenmesi için, *Smad4* ve *GSK-3β* mRNA düzeyinde değişimler RT-PCR analizi ile belirlenmiştir (Şekil 2). 5 μM kurkumin uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde *Smad4* ekspresyon seviyesi sırasıyla 1.3- ve 3.7- kat iken, 10 μM kurkumin uygulanan hücrelerde sırasıyla 1.7- ve 5.1-kat arttığı belirlenmiştir ($p < 0.01$). Ayrıca, 5 μM kurkumin uygulanan hücrelerde *GSK-3β* mRNA seviyesi sırasıyla 6.1- ve 2.5-kat arttığı belirlenmesine rağmen, 10 μM kurkumin uygulandığında mRNA seviyelerinin anlamlı bir şekilde 6.1- ve 15.0-kat olarak arttığı analiz edilmiştir ($p < 0.01$). HUVEC hücrelerinde ise kurkuminin artan dozuna bağlı olarak hem *Smad4* hem de *GSK-3β*'nin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

Ayrıca, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde kurkuminin *CCDN1* ekspresyon seviyesinde etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 3); *CCDN1*'in mRNA seviyesinin kurkuminin artan dozuna bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı ve özellikle 10 μM kurkumin uygulandığında *CCDN1*'in ekspresyon seviyesinde artışın MCF-7 hücrelerinde (7.6-kat) MDA-MB-231 hücrelerine (3.8-kat) göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Mevcut çalışmada, farklı konsantrasyonlarda kurkuminin farklı meme kanseri alt tiplerinde ve kontrol hücrelerindeki TGF-β temelli Smad4 sinyal yolağı üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre, kurkuminin farklı meme kanseri alt tiplerinde kontrol hücre hattına göre kıyaslandığında sitotoksik etkiye sahip olduğu ve terapötik etkisinin meme kanseri alt tipine göre değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca, kurkuminin TGF-β temelli Smad4 sinyal yolağı üzerine olan düzenleyici etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Kurkuminin potansiyel antikanser etkileri, *in vitro* ve *in vivo* olarak literatürde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Genel olarak, kurkuminin antitümör aktivitesi, farklı



meme kanseri hücre dizilerinde [MCF7, BT474 ve T47D (ER +, PR + HER2-), MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve HCC1806 (ER-, PR-, HER2-) araştırılmıştır (20-22). Elde edilen veriler doğrultusunda, literatüre uyumlu olarak mevcut çalışmada da MDA-MB-231 triple negatif meme kanseri hücrelerinin, MCF-7 hormon bağımlı meme kanseri hücrelerine göre kurkumine daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (23,24).

Meme kanseri hücrelerinde kurkumin, EMT, PI3K/AKT, JAK/STAT, NF-κB, ERK / p38 MAPK (25-27) dahil olmak üzere farklı sinyal yolaklarının baskılanmasıyla hücre döngüsünde tutulmaya ve apoptotik hücre ölümünü önemli ölçüde neden olmaktadır. Ayrıca kurkuminin meme ve pankreas kanserlerinde TGF-β sinyalini de inhibe ettiği bildirilmiştir (28, 29). Bu nedenle, mevcut çalışmada ilk kez farklı gen ekspresyon profiline sahip ve kurkumine karşı farklı yanıt veren iki meme kanseri alt tipinde kurkumin ile TGF-β temelli Smad4 sinyal yolağı ve *GSK-3β* arasındaki ilişkinin gen ekspresyon düzeyinde araştırılmıştır.

TGF-β, insan meme kanseri hücrelerindeki çeşitli sinyal yolaklarının güçlü bir inhibitörü olarak davranmaktadır (30,31). Bununla birlikte, TGF-β'nın anjiyogenezi uyardığı, hücre dışı matris bozunmasını indüklediği veya antitümör immün tepkileri baskıladığına dair farklı çalışmalar bulunmaktadır (32,33). Chen ve arkadaşlarının (34) çalışmalarında triple negatif meme kanseri hücrelerinde kurkuminin TGF-β ReseptörII'nin aşağı yönlü regülasyonunda yer alan *Snail*, *Twist*, *Vimentin*, *E-kaderin*, *P-Smad2*, *β-katenin* ve *GSK3-β* ekspresyonundaki değişikliklere neden olarak TGF-β sinyalini inhibe ettiği ve EMT'yi baskıladığı belirtilmiştir. Ayrıca, kurkuminin TGF-β ile uyarılan TGF-β duyarlı H358 ve A549 hücrelerinde *Smad2* ve *Smad* fosforilasyonunu inhibe ederken, TGF-β sinyalinin fonksiyonel olmadığı ACC-LC-176 hücrelerinde fosforilasyonu inhibe edemediği tespit edilmiştir (35). Diğer yandan, *Smad4* Wnt ve MAPK sinyal yolaklarının aktivitesinde artan TGF-β sinyallerinin anti-proliferatif etkisinde rol aldığı için, *Smad4*'ün tümör ilerlemede bir bariyer olarak rol oynadığı ortaya konmuştur (18).

Çalışmamızdan elde edilen veriler, kurkuminin TGF-β temelli Smad4 sinyal yolağı aktivitesi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin özellikle triple negatif meme kanseri hücrelerinde daha fazla olduğunu göstermektedir. Ancak Wnt/β-katenin ve/veya MAPK sinyalinin aktivitesine bağlı olarak TGF-β temelli Smad sinyal yolağını farklı yönde etkileri söz konusu olduğundan dolayı (18), bu yolaklarda görevli genlerin ekspresyon seviyelerinin de araştırılması gerekliliği öne çıkmaktadır. Diğer bir durumda ise, TGF-β temelli hücre proliferasyonunun durması ve siklin bağımlı kinazların (CDK'ler) inhibisyonu



söz konusudur. Çekirdeğe geçen Smad kompleksi *p21* ve *p15* genlerinin transkripsiyonunu arttırarak CDK'lar ve bunların bağlanma ortakları olan siklinlerin ekspresyonu baskılayarak, hücre siklusunun G1 fazında tutulmasına neden olmaktadır (36). Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerde kurkumin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre *CCDN1* seviyesinin daha fazla oranda azaldığı ve bu azalmaya paralel olarak *Smad 4* ve *GSK-3 β* ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede daha yüksek eksprese olduğu belirlenmiştir. Ancak kurkuminin TGF- β -temelli hücre siklusu üzerine olan etkisinin tam olarak anlaşılması için bu yolda görevli *p21* ve *p15* gibi genlerin de ekspresyon seviyelerinin belirlenerek daha ileri yönde araştırılması gerekliliği öne çıkmaktadır.

Sonuç olarak, kurkumin meme kanseri hücrelerinde TGF- β temelli Smad4 sinyal yolağının düzenlenmesinde etkili olduğu ve normal hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda toksik etkisinden dolayı belirlenen sinyal yolağında genlerin ekspresyon seviyelerinin değişimine neden olduğu belirlenmiştir. Ancak, kurkuminin TGF- β temelli Smad4 sinyal yolağı üzerindeki etkisine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına ve daha ileri moleküler analizlerin gerçekleştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Çıkar İlişkisi: Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin 2018; 68: 7–30.
2. Ananthkrishnan P, Balci FL, Crowe JP. Optimizing surgical margins in breast conservation. Int. J. Surg Oncol 2012; 585670.
3. Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon JM, et al. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. Eur. J. Cancer 2010; 46: 3219–3232.
4. Alibeiki F, Jafari N, Karimi M, Peeri Dogaheh H. Potent anti-cancer effects of less polar Curcumin analogues on gastric adenocarcinoma and

esophageal squamous cell carcinoma cells. Sci. Rep. 2017; 7: 2559.

5. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. Biochem. Pharmacol 2008; 75: 787–809.

6. Nagahama K, Utsumi T, Kumano T, Maekawa S, et al. Discovery of a new function of curcumin which enhances its anticancer therapeutic potency. Sci. Rep. 2016; 6: 30962.

7. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, et al. Curcumin and cancer: An “old-age”

disease with an “age-old” solution. Cancer Lett. 2008; 267: 133–164.

8. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Harsha C, Banik K, et al. Curcumin mediates anticancer



effects by modulating multiple cell signaling pathways. Clin. Sci. 2017; 131(15):1781-1799.

9. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGF-B: The molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat. Rev. Cancer 2006; 6: 506–520.

10. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003; 113: 685–700.

11. De Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2004; 15: 1–11.

12. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads. Annu. Rev. Cell Dev. Biol 2005; 21: 659–693.

13. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. J. Cell. Sci. 2005; 118: 3573–3584.

14. Furuhashi M, Yagi K, Yamamoto H, Furukawa Y, et al. Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor- signaling pathway. Mol Cell Biol. 2001; 21: 5132– 5141.

15. Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M. et.al. Smad3-dependent nuclear translocation of b-catenin is required for TGF-1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. Genes & Dev. 2006; 20: 666–674.

16. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C. et al. Control of -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell 2002; 108: 837–847.

17. Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, et al. Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling. Genes Dev. 2008; 22(1): 106-20.

18. Demagny H, Araki T, De Robertis EM. The tumor suppressor Smad4/DPC4 is regulated by phosphorylations that integrate FGF, Wnt, and TGF- β signaling. Cell Rep. 2014; 9(2): 688-700.

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

20. Rowe DL, Ozbay T, O'Regan RM, Nahta R. Modulation of the BRCA1 protein and induction of apoptosis in triple negative breast cancer cell lines by the polyphenolic compound curcumin. Breast Cancer (Auckl) 2009; 2: 61–75.

21. Panda AK, Chakraborty D, Sarkar I, Khan T, et al. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. J Exp Pharmacol 2017; 31: 31–45.

22. Liu D, Chen Z. The effect of curcumin on breast cancer cells. J Breast Cancer. 2013; 16: 133–137.

23. Cridge BJ, Larsen L, Rosengren RJ, Lubahn DB, et al. Curcumin and its derivatives in breast cancer: current developments and potential for the treatment of drug-resistant cancers. Oncol Discov 2013; 1: 6.

24. Lai HW, Chien SY, Kuo SJ, Tseng LM, et al. The potential utility of curcumin in the treatment of HER-2-overexpressed breast cancer: an in vitro and in vivo comparison study with herceptin. Evid.-Based Complementary Altern. Med 2012; 486568.

25. Song X, Zhang M, Dai E, Luo Y. Molecular targets of curcumin in breast cancer (Review). Mol Med Rep 2019; 19: 23–29.

26. Banik U, Parasuraman S, Adhikary AK, Othman NH. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. J Exp Clin Cancer Res 2017; 36: 98.

27. Wang Y, Yu J, Cui R, Lin J, et.al. Curcumin in treating breast cancer: a review. J Lab Autom 2016; 21: 723–731.

28. Li Y, Chen ZQ, Li YD. Effects of curcumin on the epithelial mesenchymal transition and TGF-beta/ Smads signaling pathway in unilateral ureteral



obstruction rats. Chin J Integr Med 2011; 31(9):1224–8.

29. Mo N, Li ZQ, Li J, Cao YD. Curcumin inhibits TGF-beta1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells. Asian Pac. J. Cancer Prev 2012; 13(11):5709–14.

30. Basolo F, Fiore L, Ciardiello F, Calvov S, et al. Response of normal and oncogenetransformed human mammary epithelial cells to transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1): lack of growth-inhibitory effect on cells expressing the simian virus 40 large-T antigen. IJC 1994; 56: 736–742.

31. Zugmaier G, Ennis BW, Deschauer B, Katz D, et.al. Transforming growth factors type beta 1 and beta 2 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. J. Cell. Physiol. 1989; 141: 353–361.

32. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with

disease progression in human breast cancer. Cancer Res. 1992; 52: 6949–6952.

33. Mcearchern JA, Kobie JJ, Mack V, Wu RS, et al. Invasion and metastasis of a mammary tumor involves TGF-beta signaling. Int J Cancer 2001; 91: 76–82.

34. Chen WC, Lai YA, Lin YC, Ma JW, et al. Curcumin suppresses doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition via the inhibition of TGF-beta and PI3K/AKT signaling pathways in triple-negative breast cancer cells. J. Agric. Food Chemistry 2013; 61(48):11817–24.

35. Datta R, Halder SK, Zhang B. Role of TGF-beta signaling in curcumin-mediated inhibition of tumorigenicity of human lung cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol 2013; 139(4):563–72.

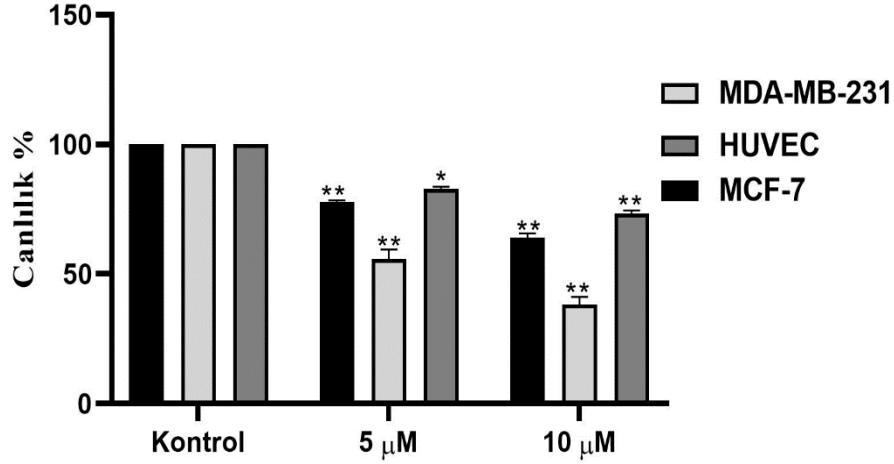
36. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. 1999; 13(12): 1501-12.

TEŞEKKÜR

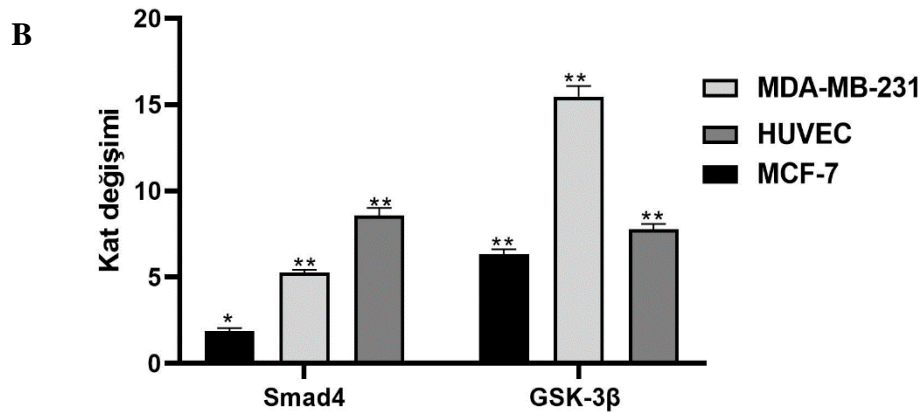
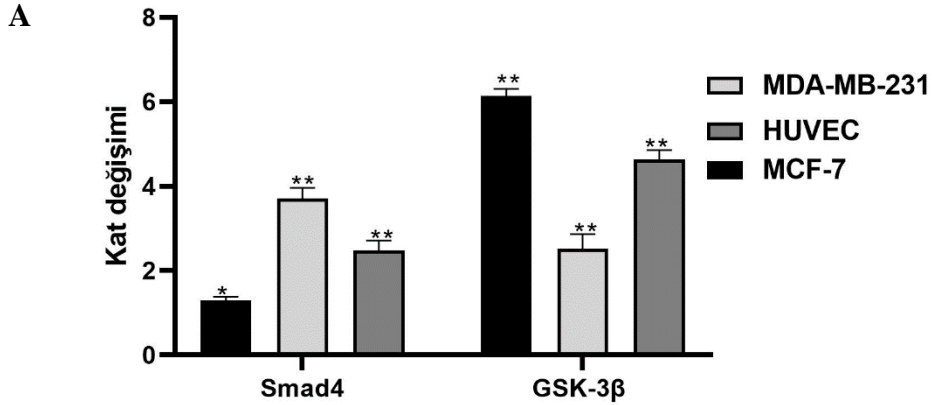
Bu çalışma 1. Uluslararası, IV. Ulusal Tıp Kongresi “Geleceğin Tıbbı IV” kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.



Şekil 1. Kurkuminin meme kanseri ve kontrol hücrelerinde neden olduğu sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).



Şekil 2. Kurkuminin meme kanseri ve normal hücrelerde *Smad4* ve *GSK-3 β* ekspresyon seviyelerinde neden olduğu değişimlerin değerlendirilmesi (A) 5 μ M ve (B) 10 μ M kurkumin ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).



Şekil 3. 5 ve 10 μ M kurkumin uygulanan hücrelerde *CCDN1* mRNA seviyesinde neden olduğu değişimler ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

