

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Kurkuminin Ishikawa Hücre Hattında Canlılık ve Apoptoz Üzerindeki Etkileri

Hatice Kübra BAŞALOĞLU¹, Çiğdem YENİSEY², Mehmet TURGUT^{3,4},
Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL⁵, Yiğit UYANIKGİL^{6,7}

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın.

³ Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Aydın.

⁴ Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

⁵ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı, İzmir.

⁶ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁷ Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kordon Kanı, Hücre-Doku Uygulama ve Araştırma Merkezi, İzmir.

ÖZET

Kurkumin (diferuloilmetan), başta Çin olmak üzere Asya ülkelerinde kanser tedavisi için alternatif tıpta kullanılmaktadır. Son yıllarda, kurkuminin bazı kanser tiplerine karşı doğal bir antitümöral ajan olduğu öne sürülmektedir. Bu araştırmanın amacı, Ishikawa endometriyal kanser hücre hattı üzerinde kurkuminin antitümöral etkilerini değerlendirmektir. Ishikawa hücreleri 10, 20, 40, 80 ve 100 µM konsantrasyonlarda kurkumin ile inkübe edildi. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası apoptoz, kaspaz 3/7 değerleri ve hücre canlılığı değerlendirildi. Kurkuminin *in vitro* olarak, Ishikawa hücre canlılığını üzerinde inhibe edici etki gösterdiği saptandı. Ayrıca 48 saat kurkumin ile 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda apoptoz en yüksek düzeyde iken, 100µM konsantrasyonlarda hücrelerin apoptoz yerine nekroza gittiği gözlemlendi. Öte yandan kaspaz 3/7 enzim sonuçları, 80 µM kurkumin konsantrasyonunda en yüksek düzeyde saptandı. Kurkumin, Ishikawa hücre hattı üzerinde farklı hücre ölüm yolağını etkilemektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz. Kurkumin. Ishikawa Hücre Hattı.

Effects of Curcumin on Cell Viability and Apoptosis of Ishikawa Cell Lines

ABSTRACT

Curcumin (diferuloylmethane), has been used in alternative medicine for anticancer therapies mainly in Asian countries especially in China. In recent years such evidence suggested that curcumin comprise anti-tumoral natures against some of cancers. Nonetheless, it was little known its anti-tumoral effects and molecular mechanism on endometrial carcinoma. The purpose of this research evaluating anti-tumoral effects of curcumin in endometrial cancer cell lines of Ishikawa. We incubated the Ishikawa cell lines with curcumin at 10, 20, 40, 80 and 100 µM concentrates. We evaluated apoptosis and caspase 3/7 values and cell viability after 24, 48 and 72 hours of incubation. It was found that curcumin inhibited Ishikawa cell viability *in vitro*. Also, treatment with curcumin for 48 hours, at 10 and 20 µM concentrations apoptosis were highest but 100µM concentrations it was observed that cells were going necrosis instead of apoptosis. On the other hand caspase 3/7 enzymes results were the highest at 80 µM concentration of curcumin. We think that curcumin affects different apoptotic pathways in the Ishikawa cell line.

Key Words: Apoptosis. Curcumin, Ishikawa cell line.

Geliş Tarihi: 09.Şubat.2022

Kabul Tarihi: 12.Nisan.2022

Dr. Yiğit UYANIKGİL
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
35100 Bornova
İzmir
Tel: 232 390 59 08
E-posta: yigituyanikgil@gmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:

Hatice Kübra BAŞALOĞLU: 0000-0002-1470-2842

Çiğdem YENİSEY: 0000-0001-7693-641X

Mehmet TURGUT: 0000-0001-7130-2530

Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL: 0000-0001-8822-9130

Yiğit UYANIKGİL: 0000-0002-4016-0522

Endometriyal karsinom (EK), özellikle gelişmiş ülkelerde her yıl binlerce yeni tanı alınan¹⁻⁵ ve kadınlarda 8. ölüm nedeni² ile en sık görülen jinekolojik malignitedir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, EK'nin dünyadaki en yaygın 15. kanser türü olduğunu bildirmiştir. İnsidans oranları değişken olmakla birlikte, yaşa bağlı sınıflandırılmalarda Kuzey Amerika ve Avrupa'da, dünyanın geri kalanından daha yüksek bir oran mevcuttur². Farklı patogeneze sahip iki tip EK vardır. Endometrioid histolojideki östrojen ilişkili tip 1 hastalar tüm vakaların %80'ini oluşturur. Tip 2 seröz adenokarsinom vakaları ise EK ilişkili mortalitenin %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır⁶.

EK'nin güncel tedavi protokolü şu anda cerrahi rezeksiyon ve eşlik eden pelvik radyoterapi ile gerçekleştirilmektedir. Ancak hastalığın 3. ve 4. evresindeki hastalarda sağkalım oranı %25- 45 olarak bildirilmektedir. Mevcut tedavi stratejileri, hastaların genel sağkalım oranını artırmak için yetersizdir³. Ayrıca hastaların %15'inin tedaviye yanıt vermediği bildirilmiştir⁴. Bu nedenle EK'nin etkin kontrolü ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yeni ajanların keşfi oldukça önemlidir.

Bitkisel ilaçlar uzun yıllardır insanlar tarafından bilinmekte ve kullanılmaktadır. Kurkumin, çok sayıda çalışmada etkileri araştırılan umut verici bitkisel ajanlardan biridir⁵. Kurkumin, eski tıp metinlerinde ve geleneksel Çin tıbbında sıkça bahsedilen Asya kökenli bir bitki olan *Curcuma longa*'nın rizomlarından elde edilir^{7,8}.

Kurkumin; antioksidan, antiinflamatuvar, antianjiyojenik, nöroprotektif, antimikrobiyal, antiviral, antifungal, yara iyileştirici özellikler içeren geniş bir biyolojik aktivite göstermektedir^{5,7,9}. Kurkuminin bu etkileri proinflamatuvar sitokinler, apoptotik proteinler, transkripsiyon faktörleri, çeşitli enzimler ve proteinler gibi çoklu hücre sinyal molekülleri aracılığı ile yaptığı bilinmektedir¹⁰.

Birçok kanser türü üzerinde iyileştirici etkileri olduğu bilinen kurkuminin antikanserojen etkisi son zamanlarda özellikle dikkat çekmektedir. Kurkumin ile ilgili yapılan araştırmalarda, tümör oluşumu, gelişimi ve metastazını önlemede etkili olduğu gözlenmiştir^{7,9}. Sitokinler, protein kinazlar ve büyüme faktörleri tümör hücrelerinin çoğalmasında ve farklılaşmasında çok önemli rol oynamaktadır. Kurkumin; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) onkoproteini ve TNF- α dâhil birçok sitokini (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 ve NF-KB'nin aktivasyonu yoluyla) baskıladığı bilinmektedir^{4,11}. Ayrıca, poli-ADP riboz polimeraz (PARP) bölünmesinin uyarılmasının ve kaspaz-7, kaspaz-9'un inflamatuvar belirteçlerin down regülasyonu ile aktivasyonunun kanser hücresi proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir¹¹.

Ishikawa hücreleri östrojen ve progesteron için steroid reseptörleri barındırmalarına karşın östrojen bağımlı

olmaması sayesinde östrojen içermeyen ortamlarda gelişimlerini sürdürebilirler. Ayrıca normal endometriyum ile aynı enzimler ve yapısal proteinleri barındırırlar. Bu nedenlerle Ishikawa hücreleri, insan endometriyal kanserini en iyi karakterize eden hücreler olarak bilinmektedir¹²⁻¹⁴.

Bu çalışmanın amacı, kurkuminin insan endometriyal kanserini en iyi karakterize eden Ishikawa endometriyal kanser hücre hattı üzerindeki antitümöröl etkinliğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Kimyasallar

Kurkumin (Kat. No. C7727), dimetil sülfoksit (DMSO) (Kat. No. 472301, Minimum Essential Medium Eagle Medium (MEM) (Kat. No. 51412C), fetal bovin serumu (Kat. No. F4135), antibiyotik solüsyonu (penisilin/streptomisin 0.1) % v/v), Dulbecco Fosfat Tamponu (DPBS) (Kat. No. D8537), Sigma Aldrich, Interlab, İstanbul. MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)) (Kat. No. M5655), Thermo Fischer Scientific, bovin serum albumin (BSA) (Kat. No. 9048-46-8) Capricorn Scientific ve ApoPercentage apoptoz kiti Biocolor Life Science Assay'den, Muse Caspase-3/7 kiti (Kat. No. MCH100108) Merck Millipore Atlas Biotechnology, Ankara, Türkiye'den temin edildi.

Ishikawa Hücre Hattı

Deneyde kullanılan hücreler, Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi (BİLTEM) hücre hattı stoklarından alınmıştır. Hücreler, fenol kırmızısı MEM + 2mM glutamin + %1 esansiyel olmayan aminoasitler + penisilin (100 U/mL) ve streptomisin (100 μ g/mL) ile %5 fetal sıgır serumu (FBS) (Lonza Bioscience, Belçika) içinde saklanmıştır. 37°C'de CO₂'li ortamda kültüre edilmiştir. Hücreler, %80-90 konfluense ulaştığında deneyler gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığının değerlendirilmesi

Hücre canlılığı, kolorimetrik 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlenmiştir. Ishikawa hücreleri, 100 μ L büyüme ortamında 96 kuyucuklu plaklara ekildi (kuyucuk başına 10.000 hücre). Hücre ekiminden 24 saat sonra ortam aspire edildi ve 10, 20, 40, 80 ve 100 μ M kurkumin içeren 100 μ l taze serumsuz MEM ilave edildi. Kurkumin ile 24, 48 ve 72 saat muamele edildikten sonra ortam aspire edildi ve 90 μ L serumsuz MEM ortamındaki taze 10 μ L MTT solüsyonları (0,5 mg/ml) her kuyuya ilave edildi ve hücreler 4 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Son olarak, MTT içeren ortam uzaklaştırıldı ve

Kurkuminin Ishikawa Hücreleri Üzerindeki Etkisi

formazan kristallerini çözmek için kuyucuk başına 200 uL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenip 10-15 dakika süreyle bir çalkalayıcı üzerinde inkübasyon sağlandı. Optik yoğunluk (OD), 570 nm dalga boyunda Thermo Lab systems ELISA okuyucu kullanılarak ölçüldü. Ölçümler için, her örnek farklı üç günde ve sekiz kez tekrar edilerek yapıldı. Canlılık yüzdesi, aşağıdaki formül kullanılarak üç tekrarlı bağımsız deneylerde elde edilen verilerin ortalama değerlerinin doğrusal olmayan regresyon uyumu ile hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = (\text{OD tedavi grubu}/\text{OD kontrol grubu}) \times 100. (\text{IC50})$$

Apoptoz Testi

Kurkumin uygulanmış Ishikawa hücrelerinde apoptoz, ticari Bicolor ApoPercentage apoptoz kiti kullanılarak gösterildi. Hücreler, 200 µl kültür ortamında 96 kuyucuklu plaklara (kuyu başına 30.000 hücre) ekildi. 37°C/%5 CO₂'de 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler taze besiyeri ile yıkandı ve her kuyucuğa 100 µl serumsuz besiyerinde farklı dozlarda kurkumin (10, 20, 40, 80 ve 100 µM) eklendi. Yalnızca kültür ortamını içeren Ishikawa hücresi, negatif kontrol olarak kullanıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra, hücreleri korumak için ortam aspire edildi. İnkübasyon süresine ulaşılmasından 30 dakika önce, kuyucukların merkezine 5 µl apoptoz kiti 100 µl/kuyucuk taze kültür ortamı eklendi. Testin kalan 30 dakikası için plaklar inkübe edildi. Kültür ortamı/boya karışımı boşaltıldı ve hücreleri iki kez 200 µl/kuyucuk DPBS ile yıkandı. Plaklar, mikroskopta (Olympus CK40) fotoğraflandı. Hücreleri iyice yıkadıktan sonra kolorimetrik işaretleme için 100 µl/kuyu apoptoz kiti salım reaktifi eklendi ve plaklar 10 dakika hafifçe sallanıp, Thermo Lab systems ELISA okuyucu ile 550 nm'de ölçüm yapıldı.

Kaspaz-3/7 aktivitesinin ölçümü

Kaspaz enzimleri, apoptoz aktivitesinin bir indeksi olarak kabul edilir. Bu nedenle, ticari Muse® Caspase-3/7 kitini kullanarak kurkumin ile tedavi edilen hücrelerde Muse Cell Analyzer® aracılığıyla kaspaz-3/7 aktiviteleri ölçüldü.

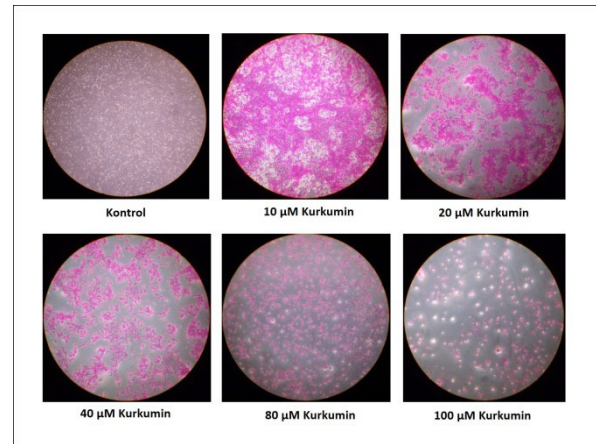
İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç tekrarlı yapıldı ve sonuçlar ortalama ± SS olarak ifade edildi. Tüm istatistiksel hesaplamalar, IBM SPSS Statistics sürüm 25 istatistiksel yazılım paketi kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenlerin dağılımı her grup tarafından Shapiro Wilk Testi ile değerlendirildi. Varyansların homojenliğini kontrol etmek için Levene Testi; çoklu karşılaştırmalar için F (varyanslar homojendi) veya Welch (varyanslar homojen değildi) istatistikleri kullanıldı. F-Test için Tukey HSD yöntemi, Welch-Test için Dunnett T3 yöntemi kullanılarak ikili

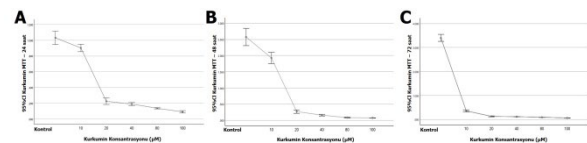
karşılaştırmalar yapıldı. IC₅₀ değişkenleri için basit doğrusal regresyon analizi yapıldı. Tüm testler α=0,05'te gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

Kurkuminin Ishikawa hücrelerinde antiproliferatif etkisi ve hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi. Kurkuminin Ishikawa hücrelerinde zaman ve doz bağımlı olarak hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı saptandı. Her bir zaman periyodunda daha yüksek konsantrasyonlarda neredeyse hiç hücre bulunmadığı gözlemlendi. 24, 48 ve 72 saat için IC₅₀ değerleri sırasıyla 15,72; 12,77 ve 1,83 olarak bulundu (Şekil 1-2). Apoptotik hücre yoğunluğu, 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda daha yüksek seviyede bulundu. Daha yüksek konsantrasyonlarda, apoptotik hücrelerin ölümüyle bağlantılı olarak absorbans konsantrasyonlarının düştüğü saptandı.

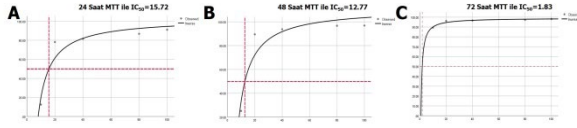


Şekil 1.
Farklı kurkumin dozlarında (apoptotik hücre yoğunluğu) mikroskopik görünümü.



Şekil 2.
Kurkumin konsantrasyonlarının MTT testi ile gösterilmesi gösterilmesi. A) 24. saat, B) 48. saat C) 72. saat

Şekil 4'teki kurkumin konsantrasyonunun aksine, Şekil 3 ve Tablo I'deki invert mikroskopta hem apoptotik hücre yoğunluğu hem de apoptotik hücrelerde azalma saptanmıştır. Kaspaz 3/7 Muse® hücre analizatör sonuçları Şekil'de gösterilmektedir. Toplam apoptotik hücre yoğunluğu kontrol kuyucuğunda %10 olarak bulundu. Apoptotik hücrelerin en yüksek olduğu kurkumin doz grubunun 80 µM konsantrasyonda olduğu saptandı.



Şekil 3.

Test saatlerine göre IC₅₀ değerlerinin hesaplanması;

A) 24. saat, B) 48. saat C) 72. saat

Tablo I. Apoptotik hücre yoğunluk indeksi.

Kurkumin (µM)	Ortalama ± Standart Sapma
10	0.873 ± 0.15 ^a
20	0.818 ± 0.09 ^b
40	0.474 ± 0.122 ^c
80	0.453 ± 0.094 ^d
100	0.232 ± 0.04 ^e

ELISA sonuçları ortalama ± standart sapma, n=8. p değerleri aşağıdaki gibidir:

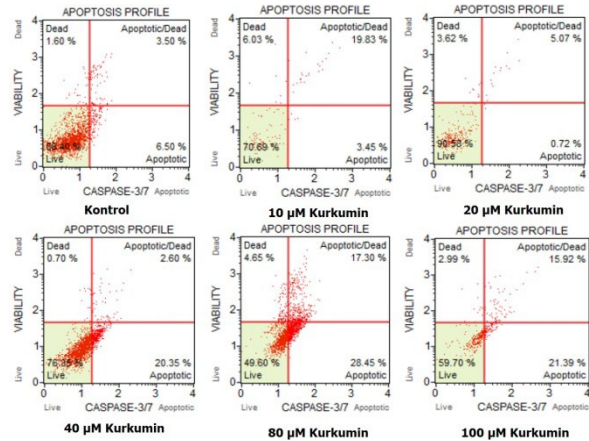
^a p<0,001; 40 µM, 80 µM ve 100 µM ile karşılaştırıldığında.

^b p<0,001; 40 µM, 80 µM ve 100 µM ile karşılaştırıldığında.

^c p<0,001; 10 µM ve 20 µM karşılaştırıldığında; p<0,01; 100 µM ile karşılaştırıldığında.

^d p<0,05; 100 µM ile karşılaştırıldığında; p<0,001; 10 µM ve 20 µM ile karşılaştırıldığında.

^e p<0,05; 80 µM ile karşılaştırıldığında; p<0,01; 40 µM ile karşılaştırıldığında; 0,001; 10 µM ve 20 µM karşılaştırıldığında.



Şekil 4.

Muse hücre analizörü ile elde edilen Kaspas 3/7 apoptotik hücre yüzdeleri

Tartışma

Kurkumin ile ilgili birçok kanser türü üzerinde antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antimigrasyon etkilerini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır¹⁵⁻¹⁹. Bununla birlikte, kurkuminin endometriyal karsinom hücreleri üzerindeki etkisine dair az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, inkübasyon süresi ve kurkumin konsantrasyonlarının özel bir hücre tipi olan Ishikawa hücreleri üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu hücreler normal endometriyum ile aynı enzimler ve yapısal proteinleri barındırır, östrojen

ve progesteron için steroid reseptörleri barındırmalarına karşın östrojen bağımlı olmamaları sayesinde östrojen içermeyen ortamlarda gelişimlerini sürdürebilir. Bu nedenlerle Ishikawa hücreleri, insan endometriyal kanserini en iyi karakterize eden hücreler olarak bilinmektedir.

Kumar ve ark.³, 10 µM kurkumin ile tedavi edilen Ishikawa hücrelerinde 48 saat sonra apoptozu göstermiştir. En yüksek apoptotik hücre kolorimetrik ölçüm ile 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda bulunmuştur. Ayrıca 10 µM için apoptotik popülasyonu %32,56 olarak bulmuşlardır. Aynı zamanda Ishikawa hücrelerini kurkumin ile 48 saat inkübe ederek IC₅₀ değerlerini 10.60 µM olarak bulmuşlardır. Xu ve ark.⁴ Ishikawa hücre hattında yaptıkları çalışmada 15 µM ve 30 µM lipozomal kurkumin (sırasıyla yaklaşık %15-20) uygulaması yapmış ve 48 saatte IC₅₀ değerini 12.77 µM olarak bulmuştur. Bu çalışma sonucunda hafif dereceli apoptoz varlığını bildirmiştir.

Chen ve ark.¹, kolorimetrik MTT testi ile insan endometriyal adenokarsinom (HEC-1B) hücre hatlarında 40 µM'nin altındaki kurkumin dozu ile antiproliferatif etkinin önemsiz olduğu belirtmişlerdir. Sirohi ve ark.²⁰, 48 saatlik kurkumin uygulaması sonrası primer HEC-1B hücrelerinde IC₅₀ değerinin 17,9 µM, Ishikawa ve HEC-1B hücre hatlarında IC₅₀ değerinin 5,9 µM olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi hücre tipi ve kurkumin formasyonu da hücre proliferasyonunu etkilemektedir.

Bir diğer önemli kriter inkübasyon süresidir. Feng ve ark.¹⁸, insan endometriyal hücre hattı RL-952'yi farklı konsantrasyonlarda (10, 50 ve 100 uM) kurkumin ile 12., 24. ve 48. saatlerde boyunca inkübe edip MTT testi ile hücre proliferasyonunu değerlendirmiştir. 12 saatlik inkübasyon sonunda farklı dozlar arasında kurkuminin inhibitör etkisinin önemsiz kaldığını ancak süre arttıkça, özellikle de 48. saatte inhibitör etkisinin zamana ve doza bağlı olarak arttığını gözlemlemişlerdir. Sun ve ark.²², 15 ve 30 µM kurkumin konsantrasyonunda CCK-8 ile Ishikawa hücrelerinin proliferasyonunu değerlendirmiş ve iki grup arasındaki farkın tekrarlanan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ve her iki konsantrasyondaki hücre sayısını 4 günlük inkübasyondan sonra önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır. Tierney ve ark.²⁰, sadece 24 saat boyunca 100 µM kurkumin ile Ishikawa hücre hattında önemli bir azalma bulmuşlardır. Bu çalışmada 24, 48 ve 72 saat için IC₅₀ değerleri sırasıyla 15,72; 12,77 ve 1,83 olarak bulunmuştur. Kurkumin, Ishikawa hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır.

Bu çalışmada; kolorimetrik yöntemle apoptotik hücre sayısını değerlendirmek için Apopercantage Apoptosis Kit kullanıldı. 40, 80 ve 100 µM kurkumin dozlarında

Kurkuminin Ishikawa Hücreleri Üzerindeki Etkisi

absorban konsantrasyonunun invert mikroskop altında görülen apoptotik hücrelerin ölümü nedeniyle azaldığını görüldü. Şekil 3 ve Tablo I'de görüldüğü gibi, yüksek konsantrasyonda kurkumin tedavisinin apoptotik hücre sayısını azalttığını buldu. Bu bulgu sonucunda, özellikle 100 µM'de yüksek kurkumin konsantrasyonu ile inkübe edilen hücrelerin apoptoz yerine nekroza gittiği düşünülmüştür. Xu ve ark.⁴, akım sitometresi ile Hoechst 33258 boyama ve Annexin-V-APC apoptoz kiti ile Ishikawa hücrelerinde apoptoz indüksiyonu üzerindeki lipozomal kurkuminin etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında; 24 saat sonra IC15-20'yi temsil eden konsantrasyonlarda Hoechst 33258 ile boyalı Ishikawa hücrelerinde floresan mikroskopunda apoptotik kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma konsantrasyonunda önemli bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Apoptotik hücre sayısını kantitatif olarak belirlemek için Annexin-V-APC apoptoz tespit kiti kullanılmış ve apoptoz oranları 15 µM ve 50 µM kurkumin dozlarında sırasıyla %15,12 ± %0,59 ve %43,25 ± %1,48 olarak bulunmuştur. Feng ve ark.'nın²¹, kurkuminin insan endometriyal karsinom hücre dizisi RL-952'de apoptozu zamana ve doza bağlı olarak artırdığını gösterdiği sonuçların bulgularımızla çeliştiği görülmüştür.

Muse® hücre analizatörü ile alınan kaspaz 3/7 sonuçları, apoptozun intrinsik yol üzerinden gerçekleştiği görülmüştür. Kaspazlar bir sistein proteaz ailesidir. Apoptoz, nekroz ve inflamasyonda temel rol oynarlar¹⁰. Kaspaz 3'ün kurkumin tarafından aktive edildiğini ve insan akciğer kanseri A-549 hücrelerinde mitokondriyal bağımlı apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir²⁴. Bu çalışmada; kurkumin konsantrasyonundaki artışın Ishikawa hücrelerinde apoptotik hücre aktivitesinin belirlenmesinde, kaspaz 3/7'i arttırdığını saptanmıştır. 80 µM kurkumin uygulanan grupta kaspaz 3/7 düzeyinin en yüksek olduğu (%28,45) bulunmuştur. Ayrıca kaspaz 3/7 enzimlerindeki artışın, kurkumin konsantrasyonuna bağlı olmadığı da görülmüştür.

Thayyullathil ve ark.²⁵, 0-24 saatlik inkübasyon süresi boyunca 20, 40, 60, 80, 100 µM kurkumin konsantrasyonunda L929 hücre hattında kurkuminin kaspaz bağımlı ve bağımsız apoptozu neden olduğunu bildirmiştir. Apoptoz indükleyici faktörün kaspaz enzimlerinden bağımsız olarak nükleer apoptozu tetiklediğini ve proapoptotik etkileri arasında kaspaz enzimlerinin inhibisyonunun olmadığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, kurkuminin endometriyal adenokarsinom hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiğini ve tümör büyümesini baskıladığını göstermiştir. Kanser tedavisinde uygulanan radyasyon, kemoterapi ve cerrahi rezeksiyon yöntemlerinden hiçbiri tam kür sağlamamaktadır. Bu nedenle tedavide yeni ajanların keşfedilmesi ve bu ajanların da

kullanıldığı kombinasyon tedavileri büyük önem taşımaktadır. Kurkumin, birçok kanser türü üzerindeki etkinliği nedeniyle umut verici bir ajandır. Bu bağlamda kurkuminin biyoyararlanımını arttırmaya yönelik farmakolojik araştırmalar ve kurkuminin tümör hücreleri üzerindeki moleküler etkilerini araştıran çalışmalar gelecek için büyük önem taşımaktadır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Makalede yer alan hücre kültürü çalışmaları için etik kurul onayı gerekmemektedir.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım H.K.B, Ç.Y., M.T.; Veri toplama ve işleme Ç.Y., H.K.B, E.O.Ç.U.; Analiz ve verilerin yorumlanması Ç.Y., Y.U.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması H.K.B., Y.U, M.T, E.O.Ç.U.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi (BİLTEM) çalışanlarına teşekkür ederiz. Ishikawa hücre hattı, Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi (BİLTEM) hücre hattı stoklarından elde edilmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Chen Q, Gao Q, Chen K, Wang Y, Chen L, Li X. Curcumin suppresses migration and invasion of human endometrial carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2015;10:1297-1302.
2. Felix AS, Yang HP, Bell DW, Sherman ME. Epidemiology of endometrial carcinoma: etiologic importance of hormonal and metabolic influences. *Adv Exp Med Biol.* 2017;943:3-46.
3. Kumar A, Kumar Sirohi V, Anum F, Singh PK, Gupta K, Gupta D, et al. Enhanced apoptosis, survivin down-regulation and assisted immunochemotherapy by curcumin loaded amphiphilic mixed micelles for subjugating endometrial cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2017;13:1953-63.
4. Xu H, Gong Z, Zhou S, Yang S, Wang D, Chen X, Wu J, Liu L, Zhong S, Zhao J, Tang J. Liposomal curcumin targeting endometrial cancer through the NF-κB pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48:569-82.
5. Khoury E, Matar R, T Touma T. Curcumin and endometrial carcinoma: an old spice as a novel agent. *International Journal of Women's Health* 2019;11:249-256.
6. Başaran D, Salman MC, Yüce K. Endometrial cancer: management of serous and clear cell histologies. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics.* 2014;7:75-83
7. Dempe JS, Pfeiffer E, Grimm AS, Metzler M. Metabolism of curcumin and induction of mitotic catastrophe in human cancer cells. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52:1074-81.
8. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Tan BK, Kumar AP, Sethi G. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules.* 2015;20:2728-69.
9. Shen L, Ji HF. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends Mol Med.* 2012;18:138-44.
10. Ravindran J, Prasad S, Aggarw BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *The AAPS Journal* 2009;11:495-510.
11. Shehzad A, Qureshi M, Anwar MN, Lee YS. Multifunctional curcumin mediate multitherapeutic effects. *J Food Sci.* 2017;82:2006-15.

12. Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Human Cell* 2002 15:3. 2002;15(3):104–17.
13. Naciff JM, Khambatta ZS, Carr GJ, Tiesman JP, Singleton DW, Khan SA, et al. Dose- and Time-Dependent Transcriptional Response of Ishikawa Cells Exposed to Genistein. *Toxicological Sciences*. 2016 May 1;151(1):71.
14. Albitar L, Pickett G, Morgan M, Wilken JA, Maihle NJ, Leslie KK. EGFR isoforms and gene regulation in human endometrial cancer cells. *Molecular Cancer*. 2010 Jun 25;9:166.
15. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci*. 2006;27;78:2081-7.
16. Kim HJ, Park SY, Park OJ, Kim YM. Curcumin suppresses migration and proliferation of Hep3B hepatocarcinoma cells through inhibition of the Wnt signaling pathway. *Mol Med Rep* 2013;8:282–6.
17. Ono M, Higuchi T, Takeshima M, Chen C, Nakano S. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of curcumin against human gallbladder adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 2013;33:1861–6.
18. Youns M, Fathy GM. Upregulation of extrinsic apoptotic pathway in curcumin-mediated antiproliferative effect on human pancreatic carcinogenesis. *J Cell Biochem* 2013;114:2654–65.
19. Xu X, Qin J, Liu W. Curcumin inhibits the invasion of thyroid cancer cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway. *Gene* 2014;546:226–32.
20. Sirohi VK, Popli P, Sankhwar P, Kaushal JB, Gupta K, Manohar M, Dwivedi A. Curcumin exhibits anti-tumor effect and attenuates cellular migration via Slit-2 mediated down-regulation of SDF-1 and CXCR4 in endometrial adenocarcinoma cells. *J Nutr Biochem*. 2017;44:60-70.
21. Feng W, Yang CX, Zhang L, Fang Y, Yan M. Curcumin promotes the apoptosis of human endometrial carcinoma cells by downregulating the expression of androgen receptor through Wnt signal pathway. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2014;35:718-23.
22. Sun M, Yu F, Gong M, Fan G, Liu C. Effects of curcumin on the role of MMP-2 in endometrial cancer cell proliferation and invasion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:5033–5041.
23. Tierney BJ, McCann GA, Naidu S, et al. Aberrantly activated pSTAT3-Ser727 in human endometrial cancer is suppressed by HO-3867, a novel STAT3 inhibitor. *Gynecol Oncol*. 2014;135:133–141.
24. Lin SS, Huang HP, Yang JS, et al. DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade- and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer Lett*. 2008;272:355.
25. Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Galadari S. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:1403–1412.