



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**All-Trans Retinoik Asit ve Kurkuminin Kombinasyonel Tedavisinin
Glioblastoma Üzerindeki in vitro Anti-Kanser Etkisinin Araştırılması**

CEYDA SÖNMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. AYSEL ÖZPINAR

İSTANBUL-2025



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**All-Trans Retinoik Asit ve Kurkuminin Kombinasyonel Tedavisinin
Glioblastoma Üzerindeki in vitro Anti-Kanser Etkisinin
Araştırılması**

CEYDA SÖNMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. AYSEL ÖZPINAR

İSTANBUL-2025

BEYAN

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

11.06.2025

Ceyda Sönmez

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize edilen karmaşık bir hastalık grubudur. Farklı kanser türlerinde her yıl milyonlarca yeni vaka teşhis edilmekte ve toplum sağlığını ciddi derecede etkilemektedir. Kanser hücrelerinin sürekli bölünme sinyallerini aktifleştirmesi, hücre ölüm mekanizmalarını baskılaması ve metastatik kapasitesini artırması agresif karakter kazanarak klasik tedavilere direnç geliştirmesine yol açmakta bu da yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Tez çalışması ile, tedavisi en zor kanser türlerinden biri olan glioblastoma multiforme (GBM) hücre hattı üzerinde All-Trans Retinoik Asit (ATRA) ve kurkumin kombinasyonunun in vitro anti-kanser etkilerini incelemeyi amaçladık. Bu kapsamda, kombinasyonel tedavinin in-vitro anti-kanser etkisi fonksiyonel deneyler ile incelenmiş olup bu etkinin hangi sinyal yollarını değiştirerek hücrelerin proteomik profilindeki değişikliklere yol açtığını araştırdık. Lise ve lisans eğitimim sırasında kanser biyolojine olan ilgim araştırma, hücre kültürü, in-vitro analizler sırasında edindiğim deneyimler ile pekişmiş olup bu alanda bana özgün yaklaşımlar kazandırmıştır.

Öncelikle, bu fikrin hayata geçmesini sağlayan, kendisinden disiplin, özveri ve işini sevip layığıyla yapabilme değerlerini öğrendiğim, bilgi birikimi ve hayat tecrübeleriyle her aşamada desteğini esirgemeyip yanımda olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Aysel Özpınar'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında deneysel tasarım ve analizlerde desteği ve yapıcı eleştirileriyle bana yol gösteren değerli Prof. Dr. Batu Erman, Doç. Dr. Gülen Melike Demirbolat ve Doç. Dr. Özgül Gök Özatay hocalarıma,

Eğitimim boyunca bana birçok şey katan Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Yüksek lisans eğitimim sırasında yararlandığım ve maddi-manevi desteklerini esirgemeyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A birimine,

Tez çalışmasına, TÜBİTAK 223S356 projesi ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB)'na

Bütün hayatım boyunca her zorluğa benimle beraber göğüs gerip, moral ve manevi desteklerini eksik etmeden anlayış ve sevgi dolu yaklaşımları için sevgili annem Nurdan Sönmez ve sevgili babam Zafer Sönmez'e yürekten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Glioblastoma Multiform.....	4
2.1.1 GBM oluşum ve progresyon mekanizmaları.....	4
2.1.2 GBM tedavi stratejileri ve limitasyonlar	6
2.2. All-Trans Retinoik Asit.....	7
2.2.1 ATRA ve biyolojik aktivitesi	8
2.2.2 ATRA’ nın anti- kanser etkinliği ve limitasyonlar	10
2.3. Kurkumin	11
2.3.1. Kurkuminoidler	12
2.3.2. Kurkumin ve biyolojik aktivitesi	13
2.3.3. Kurkumin ve kanser	14
2.3.4. Kurkumin ve Glioblastoma.....	15
2.3.5. Kurkuminin anti-kanser etkinliğindeki limitasyonlar	15
2.4. Kanser Araştırmalarında Proteomik Çalışmaların Önemi.....	16

3	GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1	Gereç	18
3.2	Yöntem	19
3.2.1	Araştırma düzeni.....	19
3.2.2.	Hücre kültürü çalışmaları	20
3.2.2.1.	Hücrelerin uygun koşullarda büyütülmesi	20
3.2.2.2.	Hücrelerin açılması, büyütülmesi ve pasajlanması.....	21
3.2.3.	xCELLigence deneyleri	22
3.2.3.1.	xCELLigence hücre canlılığı deneyi.....	22
3.2.3.1.1.	Hücrelerin E-plate 'lere ekilmesi.....	22
3.2.3.1.2.	ATRA ve Kurkumin ilaçlarının hazırlanması ve uygulanması	23
3.2.3.1.3.	Hücrelerin takibi ve veri analizi	23
3.2.3.	Annexin V-FITC apoptoz analizi.....	24
3.2.4	Proteomik analizler	25
3.2.4.1	Proteomik analiz için örnek hazırlama	25
3.2.4.2	Kütle spektrometrisi ve veri analizi	26
3.2.4.3	İstatistiksel ve biyoinformatik analizler	26
4	BULGULAR.....	27
4.1	ATRA ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87 Hücre Hattındaki Sinerjistik Etkisi.....	27
4.2	Annexin V-FITC / PI Apoptoz analizi.....	31
4.3	Kütle Spektrometrisi ile Protein Tanımlaması ve Biyoinformatik Analizi ..	33
4.3.1	KEGG yolak analizleri	35
4.3.1.1	ATRA uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları.....	35
4.3.1.2	Kurkumin uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları ..	37
4.3.1.3	Kombinasyon uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları.....	38
4.3.1.4	Tedavi uygulanmayan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları..	40

5 TARTIŞMA.....	43
5.1 ATRA ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87-MG Canlılığı Üzerindeki Sinerjistik Etkisi	43
5.2 ATRA ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87-MG Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisi.....	45
5.3 Yolak Analizlerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi.....	46
6 SONUÇ	51
7 KAYNAKÇA.....	52
8 ÖZGEÇMİŞ	61

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ATRA	All-Trans Retinoik Asit (All-Trans Retinoic Acid)
BBB	Kan-Beyin Bariyeri (Blood-Brain Barrier)
CI	Hücre İndeksi (Cell Index)
CURC	Kurkumin (Curcumin)
DMEM	Dulbecco'nun Değiştirilmiş Örnek Ortamı (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
EMT	Epitel-Mezenkimal Geçiş (Epithelial-Mesenchymal Transition)
FBS	Fetal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)
FITC	Flüorescein İzotiyosiyanat (Fluorescein Isothiocyanate)
GBM	Glioblastoma Multiforme (Glioblastoma Multiforme)
GO	Gen Ontolojisi (Gene Ontology)
IC50	Yarı Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu (Inhibitory Concentration 50)
KEGG	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi–Tandem Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry)
MGMT	O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (O6-methylguanine-DNA methyltransferase)
NSC	Nöral Kök Hücre (Neural Stem Cell)
OPC	Oligodendrosit Ön Hücresi (Oligodendrocyte Precursor Cell)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
PI	Propidyum İyodür (Propidium Iodide)
RAR	Retinoik Asit Reseptörü (Retinoic Acid Receptor)
RARE	Retinoik Asit Yanıt Elemanı (Retinoic Acid Response Element)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (Real-Time Cell Analyzer)
RXR	Retinoid X Reseptörü (Retinoid X Receptor)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SPARC	Sekrete Edilen, Asidik ve Sistein Zengini Protein (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine)
TMZ	Temozolomid (Temozolomide)



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Epitel- Mezenkimal Geçiş	5
Şekil 2. All-trans Retinoik Asit	8
Şekil 3. ATRA'nın hücre içi aktivitesi	9
Şekil 4. Kurkumin	13
Şekil 5. İş Akış Şeması	20
Şekil 6. ATRA ve Kurkuminin Hücre Canlılığı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi	28
Şekil 7. ATRA 75 µM + Kurkumin 20 µM Kombinasyonunun Zamana Bağlı Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	31
Şekil 8. ATRA Ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87 Hücre Hattındaki Apoptotik Etkisi	32
Şekil 9. Venn diyagramı ile protein dağılımı	34
Şekil 10. ATRA uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları	36
Şekil 11. Kurkumin uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları	37
Şekil 12. Kombiansyon uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları	39
Şekil 13. Kontrol grubundaki U87-MG hücrelerinde sinyal mekanizmaları	40

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan cihaz ve malzemeler.....	18
Tablo 2. Kullanılan Kimyasallar.....	19
Tablo 3. U87-MG hücre hattına uygulanan ilaç dozları.....	23
Tablo 4. ATRA ve Kurkumin Kombinasyonlarına Ait CI (Kombinasyon İndeksi) Değerleri.....	29



ÖZET

All-Trans Retinoik Asit ve Kurkuminin Kombinasyonel Tedavisinin Glioblastoma Üzerindeki in vitro Anti-Kanser Etkisinin Araştırılması

Glioblastoma multiforme (GBM), invaziv doğası, yüksek nüks oranı ve standart tedavilere karşı geliştirdiği direnç nedeniyle kötü prognoza sahip, son derece agresif bir beyin tümörüdür. Özellikle heterojen tümör yapılarında, tek ajanlı tedavilerin sınırlı etkinliği, yeni ve çok yönlü terapötik stratejilerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasında, All-Trans Retinoik Asit (ATRA) ve kurkuminin kombinasyonel tedavisinin U87 glioblastoma hücreleri üzerindeki in vitro anti-kanser etkileri araştırılmıştır. İlk aşamada, doz ve zamana bağlı sitotoksik etkiler xCELLigence sistemi kullanılarak gerçek zamanlı olarak izlenmiş, ardından seçilen doz ve zaman aralığında Annexin V-FITC/PI boyama yöntemi ile apoptoz mekanizması değerlendirilmiştir. En etkili kombinasyon dozu ile gerçekleştirilen LC-MS/MS tabanlı proteomik analizler, bu kombinasyonun apoptoz, hipoksi, oksidatif stres ve inflamasyon gibi çok boyutlu hücresel stres yanıtlarını eşzamanlı olarak aktive ettiğini göstermiştir. Elde edilen bulgular, kombinasyonel tedavi yaklaşımının glioblastoma tedavisinde önemli bir terapötik potansiyel taşıyarak ilerideki in vivo ve klinik araştırmalar için bir temel sunduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Glioblastoma, U87, ATRA, Kurkumin, Kombinasyon tedavisi

ABSTRACT

Investigation of the in vitro Anti-Cancer Effect of Combinational Treatment of All-Trans Retinoic Acid and Curcumin on Glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive brain tumor with poor prognosis due to its invasive nature, high recurrence rates, and resistance to standard therapies. The limited efficacy of single-agent treatments, especially in heterogeneous tumor structures, highlights the need for the development of novel and multifaceted therapeutic strategies. In this thesis, the in vitro anti-cancer effects of a combinational treatment involving All-Trans Retinoic Acid (ATRA) and curcumin on U87 glioblastoma cells were investigated. In the initial phase, dose- and time-dependent cytotoxic effects were monitored in real time using the xCELLigence system, followed by the evaluation of apoptotic mechanisms through Annexin V-FITC/PI staining. Proteomic analyses based on LC-MS/MS, performed with the most effective combination dose, revealed that the treatment simultaneously activated multidimensional cellular stress responses, including apoptosis, hypoxia, oxidative stress, and inflammation. The findings demonstrate that this combinational therapy approach holds significant therapeutic potential in glioblastoma treatment and provides a valuable foundation for future in vivo and clinical studies.

Keywords: Glioblastoma, U87, ATRA, Curcumin, Combination therapy

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastoma (GBM), beyin tümörleri arasında en yaygın ve en agresif türdür. GBM, hasta ölümlerine neden olmanın yanında, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi mevcut tedavi seçeneklerinin sınırlı etkinliği nedeniyle hastaların sağkalım süresi de çok kısa olmaktadır. Bu durum, mevcut tedavi seçeneklerinin yetersizliğini ve GBM tedavisi için yeni stratejilere ihtiyacı göstermektedir. Literatürde, GBM tedavisinde daha umut verici sonuçlar elde etmek üzere geleneksel tedavi yaklaşımı yanında kombinasyonel tedavi stratejileri ele alınmaktadır.

ATRA ve kurkumin gibi biyoaktif moleküller hücre proliferasyonunu farklı mekanizmalar yoluyla baskılamaktadır. Hücre apoptozunu baskılamak, tümör gelişimini engellemek veya durdurmaktadır. Buna karşın ilaçlar, çözünürlük, biyoyumumluluk ve stabilite açısından belirli kısıtlamalara tabidir. Bu nedenle, her iki bileşik arasındaki sinerjistik etkilerin GBM tedavisi için yenilik sağlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, ATRA ve kurkuminin sinerjik etkilerini ortaya koyarak glioblastoma tedavisine yönelik yeni ve etkili bir kombinasyonel yaklaşım geliştirmek, bu etkinliği moleküler düzeyde açıklığa kavuşturarak kombinasyonel tedavilere yeni yaklaşımlar kazandırmaktır.

Bu tez kapsamında, ATRA ve kurkuminin kombine dozlarının U87-MG GBM hücre hatlarında in vitro ortamdaki anti-kanser etkileri araştırılmış ve bu etkinin hücrelerin proteomik profilini nasıl değiştirdiği incelenmiştir. Hücre canlılığı, apoptoz ve proliferasyon üzerindeki etkilerin incelenmesi gelecekteki in vivo ve potansiyel klinik çalışmalar için bir adım olması hedeflenmiştir. Bu sayede GBM gibi agresif beyin tümörlerine yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunulması beklenerek ileride yapılacak kapsamlı hayvan deneyleri ve klinik araştırmalara ışık tutacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Glioblastoma Multiform

İnsanlarda en ölümcül kanser türlerinden birini temsil eden Glioblastoma Multiform (GBM), yüksek invaziv özelliğe sahip agresif bir beyin tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre GBM, merkezi sinir sistemi tümörleri arasında 4.derece olarak sınıflandırılmaktadır (1)Tüm gliomalar arasında glioblastomalar, IDH-yabanıl tip (IDH1 veya IDH2 genlerinde herhangi bir mutasyon göstermeyen) olarak adlandırılmaktadır. Bununla beraber, tanı koyulabilmesi için histolojik olarak nekroz veya mikro damar proliferasyonu bulunmalıdır. Nekroz veya mikro damar proliferasyonu göstermeyen gliomalar için glioblastoma tanısını koymak amacıyla TERT promotör mutasyonu, EGFR amplifikasyonu ve kromozom +7/-10 testleri yapılmalıdır. Bu moleküler belirteçlerden birinin veya daha fazlasının varlığı glioblastoma (IDH-yabanıl tip, WHO derece 4) tanısı için yeterli olmaktadır (2).

Glioblastoma dünya çapında 100.000 kişide 0,59-3,69 arasında ve ABD'de 100.000 kişide 3,21 oranında görülmektedir (3). Türkiye'de görülme sıklığı ise 100.000 kişide yaklaşık 3 ila 4 yeni vakadır (4). Yüksek derecede yayılcı ve agresif doğası nedeniyle GBM hastalığının seyri oldukça kötü, ortalama sağkalım süresi sadece 12-18 aydır (5). GBM' in görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir. Etnik köken olarak bakıldığında ise Kafkas ırkında görülme sıklığı diğer etnik gruplarla kıyaslandığında daha yüksektir (6).

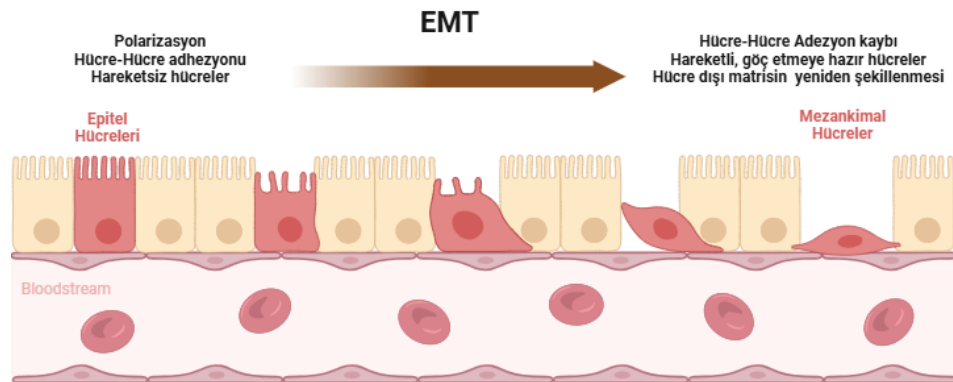
2.1.1 GBM oluşum ve progresyon mekanizmaları

GBM'in, başlangıçta yalnızca beyindeki glial hücrelerinden türev aldığı düşünülmeye karşın yapılan çalışmalar, GBM'in nöral kök hücrelerinden (NSC'ler), NSC' den türetilmiş astrositlerden ve oligodendrosit öncü hücrelerinden (OPC'ler) türev aldığını da göstermektedir (6,7). GBM oluşumuna, bu hücrelerin farklılaşması sırasında sinyal yollarındaki moleküllerin değişikliği yol açmaktadır. GBM' in ortaya çıkışında genel olarak üç adet sinyal yolağının etkili olduğu bilinmektedir.

Bu sinyal yolları tümör proteini p53 yolağı, reseptör tirozin kinaz/Ras/fosfoinositid 3-kinaz sinyal yolağı ve retinoblastoma (Rb/E2F) yolağıdır (8)Bahi geçen bu yolaklardaki değışimler kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve artan hücre canlılığına neden olurken, aynı zamanda tümör hücresinin yaşlanmadan ve apoptoz mekanizmalarından kaçmasına yol açmaktadır. Yapılan son çalışmalarla birlikte, hücre proliferasyonu, apoptoz, doku homeostazı, kök hücrelerin hayatta kalması gibi hücresel süreçleri yöneten Notch sinyal yolağı da GBM'in progresyonu ile ilişkilendirilmiştir. GBM'de Notch sinyal yolağının aktivasyonu, hücre proliferasyonunu teşvik eder ve hayatta kalma yeteneklerini artırır. Bununla birlikte çevredeki hücreleri, anjiyogenezi ve bağışıklık yanıtlarını etkileyerek tümör büyümesini ve yayılmasını da destekleyebilir (9).

Bahsedilen sinyal yollarındaki değışiklikler hücre içerisindeki kritik yaşamsal mekanizmaları etkilemektedir. Bu mekanizmalardan biri olan Epitel Mezenkimal Geçiş (EMT), GBM oluşumu ve ilerlemesinde ciddi öneme sahiptir. EMT, epitel hücrelerinin adhezyonunu kaybederek birbirlerinden ayrılması ve mezenkimal hücre özellikleri kazandığı dinamik bir süreçtir (şekil 1). EMT süreci hücrelerin bazal membranını bozarak komşu dokuları veya uzak organları istila (migrasyon ve invazyon) etmesine izin verir (10). Bunun sonucunda GBM hücreleri yüksek agresif karakterini artırır ve hücrelerin metastatik geçişe bağılı özellikleri düşük sağıkalım oranına yol açar.

Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT)



şekil 1. Epitel- Mezenkimal Geçiş (created in BioRender.com).

GBM'in agresif karakteri kazanmasına neden olan faktörlerden biri de tümör mikro çevresindeki pro-inflamatuar sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin sürekli inflamasyona sebep olarak tümör oluşumunu destekleyen nöro inflamasyon meydana getirmesidir (11). Glioblastomada nöro inflamasyon, artmış damarlanma, hipoksik tümör mikro çevresi ve bağışıklık baskılayıcı ortam gibi tipik özellikleri taşımaktadır. Tüm bu özellikler ve kan-beyin bariyerinin varlığı, glioblastomadaki nöro inflamatuvar mikro çevreyi olumsuz bir patolojik süreç haline getirmektedir (12).

2.1.2 GBM tedavi stratejileri ve limitasyonlar

Glioblastoma tedavisi multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Kesin bir tedavi seçeneği olmamakla birlikte Glioblastoma tedavisinde cerrahi girişimleri takip eden radyoterapi ve kemoterapi başlıca tedavi seçenekleridir (7,13). Yüksek derecede yayılmacı agresif doğası ve invaziv yapısı nedeniyle, çevredeki beyin yapılarına da zarar vereceği için tümörün cerrahi olarak tamamen çıkarılması zordur (3). Cerrahi müdahale, eşzamanlı kemo-radyoterapi ve adjuvan kemoterapiyi içeren tedavi seçeneklerine rağmen, glioblastoma hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı sadece %9,8'dir ((2,3,14).

Tümör karşıtı etkilere sahip olduğu bilinen DNA alkilleyici ajanlar kemoterapide başlıca kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlardan biri olan Temozolamid (TMZ) kan beyin bariyerini (KBB) geçebilmesi, vücut pH'ında fizyolojik olarak aktive edilebilmesi gibi özellikleriyle GBM tedavisinde ilk tercih edilen kemoterapötik ilaçtır. Buna karşılık; TMZ' ye karşı gelişen ilaç direnciyle beraber hastaların yüzde ellisi TMZ tedavisine yanıt vermemektedir (5). TMZ' ye gelişen direncin çeşitli sebepleri mevcuttur. Örneğin, O6-metilguanin-DNA-metiltransferaz (MGMT)'ın onarıcı aktivitesi, DNA'nın O6-guanin pozisyonundaki metilasyonu engelleyerek TMZ' nin sitotoksik etkilerini geçersiz kılabilir. Diğer yandan, sinyal mekanizmalarının düzensizliği de TMZ direncine katkıda bulunmaktadır. Araştırmalar, glioblastoma tümörlerinin önemli bir yüzdesinde PI3K/AKT yolağında bozulmalar olduğunu göstermektedir. Kemoterapi direncini artırmasıyla bilinen PI3K/AKT yolu, apoptozu inhibe ederek ve hücrel hayatta kalmayı proliferasyon ve anjiyogenez yoluyla teşvik ederek anti-

apoptotik proteinleri aktive eder. Bunun sonucunda TMZ' nin etkileri azalır ve direnç meydana gelir (15,16).

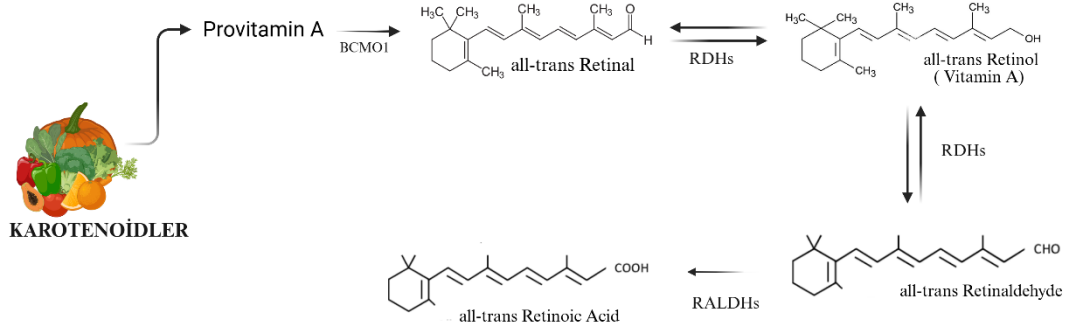
GBM tedavi stratejilerinde hedeflenen çoğu sinyal yolu tanımlanmış olmasına rağmen, bu yolların klinik denemelerde hedeflenmesi, sonuçları önemli ölçüde iyileştirmemiştir. Bu yollar son derece birbirine bağlıdır ve glioblastomada kök hücre özelliklerini, invazyonu ve tedavi direncini artıran benzer etkilere sahiptir. Bu durum, GBM 'yi etkili bir şekilde tedavi etmenin önündeki önemli engellerden biridir. Etkili tedavi yöntemlerine giden yoldaki bir sonraki adım, GBM için hangi ilaç kombinasyonlarının ölümcül olduğunu belirlemek olabilir. Kombinasyon tedavilerindeki iyileştirmeler ve yenilikçi yaklaşımlar GBM tedavisinde gerekli ilerlemeleri sağlayabilir.

2.2. All-Trans Retinoik Asit

A vitamini (retinol) metaboliti All-trans retinoik asit, küçük moleküler yapıda ve hücre içerisinde aktif bir moleküldür. Hücre çoğalmasından hücre farklılaşmasına, bağışıklık fonksiyonundan apoptoza, nöral fonksiyondan embriyonik gelişime kadar çeşitli hücre içi fonksiyonlarda sinyal molekülü görevi görerek önemli biyolojik süreçleri düzenler (17). Diyetle alınan karotenoidler, β -karoten-15,15'-monooksijenaz (BCMO1) enzimi aracılığıyla all-trans retinal formuna oksitlenir. All-trans retinal, çift yönlü bir reaksiyonla retinol (Vitamin A) ve all-trans retinaldehit formlarına dönüşebilir; bu reaksiyonlar, retinol dehidrojenaz (RDH) enzimleri tarafından katalizlenmektedir. Son aşamada, all-trans retinaldehit, aldehit grubunun oksidasyonu ile all-trans retinoik aside çevrilir (18) Bu dönüşüm, retinoik asidin hücre sel farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde görev aldığı aktif metabolit formunu oluşturur.

ATRA, hücre içi reseptörler ile iletişim kurarak transkripsiyon faktörü gibi davranır. Hücre reseptörleri ile kolaylıkla etkileşim kurması kimyasal yapısı sayesinde. Kimyasal yapısı; bir polien zinciri ve bu zincire bağlı sikloheksen

halkasına sahiptir. Yapısında ayrıca bir terminal karboksilik asit grubu bulunur (Şekil 2).



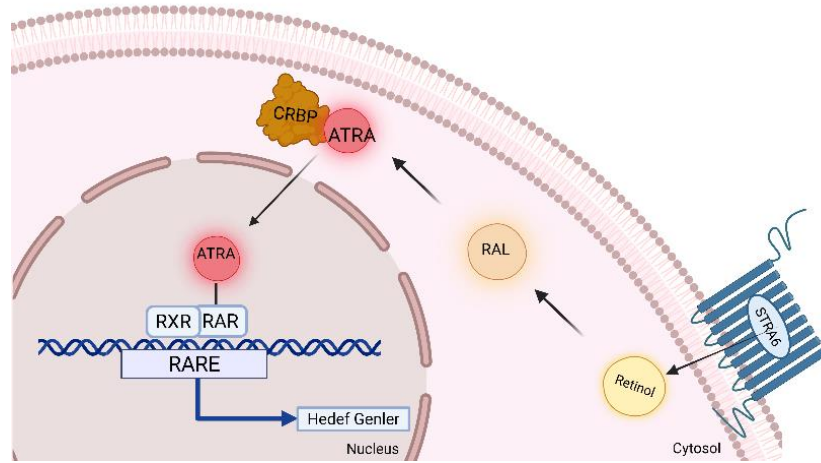
Şekil 2. All-trans Retinoik Asit (created in Biorender.com).

ATRA' nın kimyasal yapısındaki polien zinciri, 13-cis retinoik asit veya 9-cis retinoik asit gibi aktif izomerlerine dönüşme reaksiyonunu (izomerleşme) kolaylaştırır. Sonuç olarak, izomerleri ile kıyaslandığında ATRA, hücresel reseptörler ile daha iyi etkileşim kurabilen forma sahiptir (19).

2.2.1 ATRA ve biyolojik aktivitesi

Retinoid ailesinin en aktif metaboliti olan ATRA, gen ekspresyonlarını düzenleyerek çeşitli sinyal mekanizmaları ve hücresel davranışları direkt olarak etkileme potansiyeli ile geniş çapta biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu özelliği, ATRA'yı bilimsel araştırmaların odağı haline getirmiştir.

Retinoik asit hücre içerisinde CRBP proteini ile taşınır. Hücre içerisinde retinoik asit nükleer reseptörüne (RAR) bağlanır. RAR reseptörleri, hücresel süreçlerde rol oynayan önemli genleri aktive ederek veya baskılayarak regüle eder. RAR'lar, retinoid X reseptörler (RXRs) ile heterodimer oluşturarak hedef genlerin DNA dizisinde yer alan retinoik asit yanıt elemanlarına (RARE) bağlanır (Şekül 3). Bu da nükleer reseptör koaktivatörleri (NCOA) aktive ederek biyolojik süreçlerde rol alan genlerin düzenlenmesine yol açar (20,21).



Şekil 3. ATRA'nın hücre içi aktivitesi (created in Biorender.com).

Çekirdekte nükleer reseptöre yukarıda belirtildiği gibi bağlandıktan sonra hücre gelişimi, hücre farklılaşması, hücre çoğalması, apoptoz, immün düzenlenmesi, hemostaz ve hastalıklar gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara ait hedef genlerin aktivasyonu veya inhibisyonunu gerçekleştirir.

ATRA'nın kritik özelliklerinin başında EMT mekanizmasını düzenleme yeteneği gelir. Wu ve ark. yaptığı bir çalışmada, ATRA'nın epitel hücre farklılaşması sırasında epitel dokuların yapısal ve işlevsel bütünlüğünü sağladığı gözlemlenmiştir (22). Buna bağlı olarak, epidermal bariyer fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (23). Karaciğer hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise ATRA'nın farklılaşmayı destekleyerek ve EMT mekanizmasını baskılayarak hücrelerin hücre göçünü azaltmıştır(17) Beyin gelişiminde de kritik role sahip olan ATRA, nöral kök hücrelerin astrosit ve nöron hücrelerine farklılaşmasını destekleyerek nörogenezi düzenler (24).

ATRA'nın aynı zamanda biyokimyasal mekanizmalara da etki ederek metabolizmayı düzenleme yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmiştir(25,26). Örneğin; yapılan bir çalışmada β -oksidasyonuna ait genleri aktive ederek lipid mobilizasyonunu artırdığı ve adipogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir (27). Ayrıca, insülin duyarlılığını geliştirdiği ve metabolik rahatsızlıkları düzenlemede potansiyel sahibi olduğu düşünülmektedir (28).

Doğal bir biyolojik molekül olan ATRA, hücresel mekanizmalardaki önemi ve kritik süreçlerdeki düzenleyici rolü sebebiyle çeşitli hastalıkların tedavisindeki araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle kanser araştırmalarının ilgi odağı haline gelen ATRA, potansiyel terapötik bir ajan konumundadır.

2.2.2 ATRA' nın anti- kanser etkinliği ve limitasyonlar

Kanser; oluşum sebepleri ve progresyon süreçleri açısından son derece karmaşık ve heterojen bir profil sergilemektedir. Kanserlin ortaya çıkması genelde tek bir kaynağa bağlanamaz. Hücre içerisindeki farklı biyolojik mekanizmaların senkronize bir şekilde anormal davranışları ile karakterize edilir. Örneğin; hücre döngüsünün bozulmasını takiben gerçekleşen kontrolsüz hücre büyümesi ve buna bağlı proliferasyonun kalıcı olarak devam etmesi, hücre ölümü mekanizmasının devre dışı kalmasıyla apoptozun baskılanması, oksidatif stres, genetik mutasyonlar ve kronik inflamasyon gibi tetikleyici süreçler oluşum ve progresyonun başlıca unsurlarıdır.

ATRA gibi hücre içerisinde aktif moleküllerin etki sağladığı sinyal mekanizmalarında yaşanan anormallikler de GBM dahil farklı kanserler ile ilişkilendirilebilir. Örneğin, normalde yoğun olarak çekirdekte bulunması gereken CRBP proteininin sitoplazmada anormal şekilde bulunmasının GBM hastaları üzerinde sağkalımı etkilediği bildirilmiştir (29).

ATRA' nın hücre içerisindeki kritik mekanizmalardaki etkisi, kanserdeki terapötik çalışmalar için potansiyel ajan olarak düşünülmesine yol açmaktadır. ATRA hücre farklılaşmasını uyarak metastazı azaltma yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda apoptozu aktive ederek hücre canlılığını da azaltabilir. U87-MG GBM hücre hattında yapılan çalışmalarda, ATRA' nın doz ve zamana bağlı olarak apoptoz hızında artış, hücre göçü, hücre proliferasyonu ve canlılığında da önemli ölçüde azalış gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, ATRA' nın MMP-2 ve MMP-9' un seviyelerini düşürdüğü ve buna bağlı olarak invazyonda azalma meydana geldiği belirtilmiştir (30).

ATRA' nın anti-kanser etkisi meme, akciğer ve pankreas gibi kanserlerde dahil birçok kanser türünde de araştırılmış ve radyasyon ya da kemoterapi gibi geleneksel yöntemlerin anti-kanser etkisini artırdığı gözlemlenmiştir (31,32) .

ATRA, kanser hücrelerinde terapötik bir etkinlik sergilese de kanserli hücrelerin ATRA' ya karşı gösterdikleri kuvvetli ilaç direnci klinik etkide sınırlamalar meydana getirmektedir. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak amacıyla belirli sinyal mekanizmalara odaklanılan araştırmalar hızla devam etmektedir. Bunun yanı sıra ATRA ve çeşitli terapötik ajanları içeren kombinasyonel ilaç tedavileri de sık sık uygulanmaktadır. Son çalışmalar; ATRA' nın diğer ilaçlar ile sinerjistik etki yaratacak kombinasyonel tedavi yaklaşımlarının önemini vurgulamaktadır. Örneğin, düşük dozlarda ATRA ile Fimaporfin bazlı tedavinin kolon ve meme karsinomlarında sitotoksiteyi artırdığı gözlemlenmiştir (33).

ATRA' nın potansiyel anti-kanser etkinliğe karşı ilaç direncinin gelişmesi gibi limitasyonlar sebebiyle tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Gerçekleştirilen in-vitro ve klinik çalışmalar, ATRA' nın özellikle kombinasyonel tedavileri içeren yaklaşımlarının terapötik önemini göstermektedir.

2.3. Kurkumin

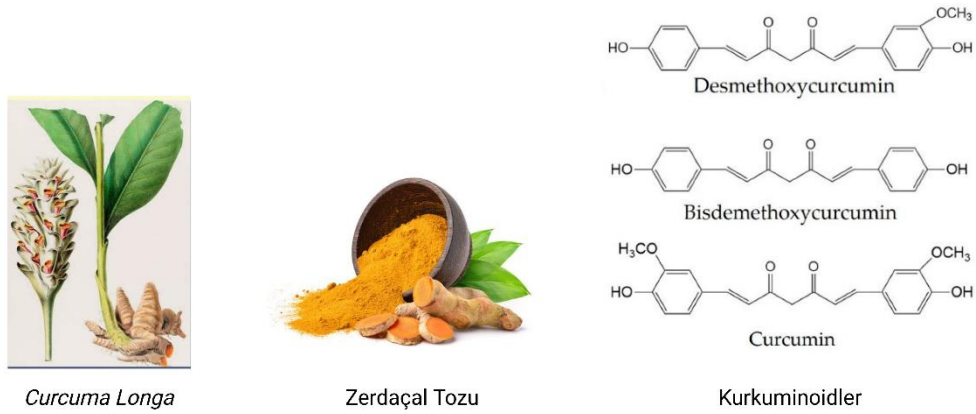
Kurkumin, zencefil ailesine (*Zingiberaceae*) ait zerdeçal bitkisinin (*Curcuma Longa*) etken maddesidir (Şekil 4). (Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) adı:(1E,6E)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion). Zerdeçala sarı-turuncu rengini veren kurkumin , biyolojik olarak aktif bir moleküldür. Zerdeçal bitkisi aslen antik Hindistan'a özgü olup genellikle tropikal Güneydoğu Asya'da yetiştirilmektedir. Yetiştigi bölgelerdeki yerel halk, zerdeçalı yüzyıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde doğal ilaç olarak kullanmış, günümüzde ise özellikle baharat olarak mutfağımıza kadar gelmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (34).

Kurkumin aynı zamanda "Diferüloilmetan" gibi farklı kimyasal isimlerle de adlandırılabilir. Kurkuminin kimyasal yapısı gereği, merkezinde bir metilen köprüsü ile bağlanmış iki ferulik asit kalıntısına sahip bir polifenoldür (35). Konjuge çift bağlarla stabilize edilmiş benzersiz yapısı biyolojik aktivitelerini ve biyokimyasal reaktivitesini belirlemektedir. Kurkumin ışığa maruz kaldığında parçalanarak bir bileşiktir. Bu bozulmanın keşfedilmesi *C. Longa*' dan ekstrakt edilen kurkumin pigmentinin sarı boya ve gıda renklendirici alanlarında kullanılırken yaşanan renk solmalarının gözlemlenmesine dayanmaktadır. Bunun üzerine foto-oksidasyon süreçleri yoğun olarak incelenen kurkuminin, güneş ışığı altında foto-oksidasyonu sonucunda çeşitli aldehitler ve asitler oluşturduğu, bunun da konjuge alkil kısmının oksidatif bölünmesinden kaynaklandığı ortaya çıkmıştır(36) .

C. Longa 'nın rizomundan elde edilen kurutulmuş zerdeçal tozunda, zerdeçalın kökeni ve yetiştirildiği toprak koşullarına bağlı olarak, %2-5 oranında kurkumin bulunur. Kurkumin, büyük bir yüzde ile *C. Longa* ' dan elde edilmesinin yanı sıra *Zingiberaceae* ailesine ait benzer sarı rizomlara sahip diğer *Curcuma* türlerinde de kurkumin varlığı tespit edilmiştir. Örneğin, *C. Zedoaria*, *C. Xanthorrhiza*, *Zingiber cassumunar* ve *Z. Zerumbet* gibi türlerin rizomlarında kurkumin ve benzer bileşikler tespit edilmiştir (37).

2.3.1. Kurkuminoidler

Kurkumin ile yapısal olarak ilişkili fenolik bileşenler *Zingiberaceae* rizomlarında aktif olarak bulunur ve kurkuminoidler olarak adlandırılır. Demetoksikurkumin (DMC) ve bisdemetoksikurkumin (BDMC) bu kurkuminoidlere örnek olarak verilebilir (Şekil 2). Marketlerde satılan zerdeçal tozunun temel bileşenleri kurkumin, DMC ve BDMC'dir. Bunların bulunma oranları ise sırasıyla %77, %17 ve %3'tür. Kurkuminoidlerin hücrelerde gösterdiği etkiler birbirine çok benzer; ama kurkuminoidler vücutta farklı farklı emilip metabolize olduğu için farklı ve potansiyeller barındırabilir. Örneğin, yukarıda bahsedilen üç tane kurkuminoid çok farklı oranda antioksidan ve anti-inflamatuar etki göstermektedir (34,37,38).



Şekil 4. Kurkumin (created in biorender.com).

2.3.2. Kurkumin ve biyolojik aktivitesi

Kurkumin, birçok biyolojik aktiviteye sahip doğal bir biyoaktif bileşik olması ve çeşitli fiziksel-kimyasal özellikleri nedeniyle, terapötik uygulamalarda önemli bir potansiyele sahiptir. Kurkumin ile ilgili bilimsel çalışmalar, ilk olarak 1815 yılında zerdeçal rizomlarından izole edilmesinin ardından başlamış ancak 1970'lere kadar kimyasal yapısı, sentezi ve biyokimyasal aktivitesi hakkındaki araştırmalar sınırlı kalmıştır (39,40). 1976'da ise ilk defa Kurkumin'in kimyasal yapısına istinaden inflamasyon ile bağlantılı antioksidan aktivitesini incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda kurkuminin kanser üzerindeki potansiyel tedavi edici etkisi bildirilmiş, bunun üzerine kurkuminin araştırmaları hızlı bir şekilde artış göstermiştir(41–43). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kurkuminin anti-tümör, anti-kanser, anti-viral, anti-Alzheimer, anti-artrit vb. etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve potansiyel terapötik etkinliği vurgulanmıştır (36). Yaklaşık iki yüzyıllık bir bilimsel geçmişe sahip olan kurkumin, hala dünyanın dört bir yanından araştırmacıları kendine çekmektedir.

Kurkuminin en bilinen biyolojik aktivitesi, vücutta hücrelere zarar veren kararsız serbest radikalleri nötralize edebilmesidir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi serbest radikaller ile savaşan enzimlerin etkinliğini artırarak oksidatif stresi azaltır (44). Kurkuminin anti-inflamatuar ve anti-oksidan rolü bununla sınırlı kalmaz; aynı zamanda vücutta, nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2) sinyal yolu gibi çeşitli mekanizmaları destekleyerek anti-oksidan yanıtın üretimini

artırır (45). Bununla birlikte, kurkumin demir ve bakır gibi serbest radikaller üreten metal iyonlarına bağlanma yeteneği, bu iyonların oksidatif reaksiyonlara katılmasını ve daha fazla serbest radikal üretmesini engellemektedir (46).

Kurkumin anti-inflamatuar aktivitesi, vücudu bakteri, virüs, mantar ve parazitlere karşı da koruyabilir. Mikrobiyal hücre zarlarına zarar vermesi, mikrobiyal enzimleri inhibe etmesi ve mikrobiyal nükleik asit replikasyonu azaltması kurkuminin anti mikrobiyal aktivitesine örnek olarak gösterilebilir (47).

2.3.3. Kurkumin ve kanser

Güçlü anti-inflamatuar ve anti-oksidan yeteneği kurkumini kanser gibi komplike hastalıkların terapötik araştırmalarında potansiyel bir ajan konumuna getirmektedir. Yapılan çalışmalarda, kurkuminin kanser hücrelerinin büyümesini durduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte metastazı azalttığı, apoptozu artırdığı ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda kurkumin anti-inflamatuar aktivitesi sayesinde kanser hücrelerinin inflamasyon mekanizmalarına müdahale ederek anti-kanser etkinlik göstermektedir. Kurkuminin hepatoselüler karsinoma (HCC) fare modelleri üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada, PTPN1 ve PTPN11 seviyelerini düşürdüğü bu sayede proliferasyonu azaltarak koruyucu bir aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır (48). Kurkumin, baş boyun kanserinde NF- κ B, JAK/STAT ve EGFR sinyal yollarını düzenleyerek anti-kanser etkinlik göstermiştir aynı zamanda kurkuminin kombinasyonel tedavilerinin bu etkinliği artırabileceği vurgulanmıştır(41) Kurkuminin kolon kanserindeki etkinliği ise TGF- β seviyelerini azaltmış, PD-L1 aktivitesini baskılamıştır. Bunun sonucunda kurkumin; kolon kanserinde bağışıklık yanıtını desteklemiştir (49).

Kurkumin anti-inflamatuar ve anti-oksidan mekanizmalar aracılığıyla; kanserde hücre büyümesini, çoğalmasını ve metastazını baskılayarak potansiyel terapötik etkiler gösterebilir. Bu nedenle onkolojik araştırmalarda potansiyel terapötik ajan olarak öne çıkmaktadır.

2.3.4 Kurkumin ve Glioblastoma

GBM'in agresif karakteri kazanmasına neden olan faktörlerden biri tümör mikro çevresindeki pro-inflamatuar sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin sürekli inflamasyona sebep olarak tümörijenik etkiyi artırmasıdır (50). Anti inflamatuvar özelliğe sahip Kurkuminin anti-kanser etkinliği glioblastomada da araştırılmış ve bugüne kadar yapılan çalışmalarda Kurkumin'in GBM kök hücrelerinin kötü huylu kanser özelliklerini azalttığı, normal dokuyu korurken modern kemoterapi ve radyasyonun etkilerini güçlendirdiği bununla beraber kanser hücrelerinde apoptozu başlattığı gösterilmiştir(51) . Ayrıca interlökinler ve kemokinler gibi çeşitli pro-inflamatuar sitokin ifadelerini inaktive ederek inflamasyonu azaltmıştır. Yapılan çalışmalarda kurkuminin, U87 Glioblastoma hücrelerinde de doza ve zamana bağlı olarak in vitro sitotoksik etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir (52). Buna ek olarak kurkuminin, GBM hücrelerinin TMZ' ye geliştirdikleri ilaç direnci üzerinde iyileştirici etki sağladığı, bu etkinin kombinasyonel ilaç tedavisi ile arttığı gösterilmiştir(53). Yapılan çalışmalar, kurkumin ve sinerjistik kombinasyonlarının GBM tedavisinde potansiyel terapötik bir ajan olabileceğini ortaya koymaktadır.

2.3.5. Kurkuminin anti-kanser etkinliğindeki limitasyonlar

Kurkuminin anti-kanser etkinliğinin kanıtlandığı in-vitro, in-vivo ve preklinik çalışmalar bulunmasında rağmen klinik etkinliği oldukça kısıtlıdır. Kurkuminin anti-kanser etkinliğindeki limitasyonların sebepleri düşük biyoyararlanım, suda az çözünürlük ve kararsız bileşik yapısı, vücut tarafından hızlı metabolize edilmesi ve karaciğer tarafından hızlı eliminasyonu, ısıya, ışığa ve pH değişikliklerine karşı duyarlılığından dolayı stabilitesinin düşük olması şeklinde sıralanabilir.

Kurkuminin biyoyararlanımı düşük olması terapötik dozlara ulaşılmasını engellemektedir. Suda çözünmeyen ve kararsız bir yapıda olması bağırsak epitellerinden emilimi sırasında hızlı bir şekilde metabolitlerine dönüşmesine yol açar. Suda daha çözünür olan bu metabolitler de kararsız yapıdadır ve oluşumu geçicidir. Bütün bunlar kandaki kurkumin seviyeleri düşürüp dolaşımda yeteri kadar

bulunamamasına ve nihayetinde organlara ya da kanserli bölgelere ulaşamamasına neden olur (54).

Bağırsak epitellerinden emilimi sonrası kana geçen kurkumin, ilk dolaşım sırasında karaciğerde hızlı bir şekilde elimine edilir (first pass effect). Dolayısıyla kandaki konsantrasyonu iyice azalır ve diğer organlara ulaşan kurkumin miktarı oldukça düşüktür. Bu durum biyoyararlanımı ciddi derecede etkileyerek kurkuminin istenen seviyelerde bulunmasını zorlaştırır (54,55).

Kurkuminin klinik etkisindeki limitasyonlar kanser hücrelerini hedeflemede başarısızlığa yol açmaktadır. Bu limitasyonların üstesinden gelmek için yeni yaklaşımlar geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Kanser Araştırmalarında Proteomik Çalışmaların Önemi

Kanser hücreleri üzerinde yapılan ilaç çalışmalarının incelenmesi, bu ilaçların etkilerinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasını derinleştirir. Kompleks profillere ve tümör heterojenliğine sahip GBM gibi kanserlerde, proteomik teknikler kanser biyolojisini kapsamlı şekilde ele almayı mümkün kılar.

Proteomun analiz edilmesi sayesinde, erken tanıya yönelik biyobelirteçler tanımlayabilmekte, kanserin moleküler temellerini anlayabilmekte ve hedefe yönelik tedaviler geliştirebilmektedir. Bu doğrultuda, kütle spektrometrisine dayalı proteomik yöntemlerle meme ve kolorektal kanser gibi pek çok kanserde tanıya yönelik protein belirteçleri başarıyla saptanmıştır (56,57). Aynı zamanda bu belirteçler, alt tip sınıflandırmasını daha hassas hale getirerek kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarını mümkün kılmıştır (56,58).

Proteomik analizler kanserde protein-protein etkileşimleri ve sinyal yollarının incelenmesine olanak tanıyarak ilaç direnci ve tümör progresyonu gibi mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlar (59,60). Teknolojik açıdan, sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) gibi ileri düzey proteomik yaklaşımlar,

karmaşık protein karışımlarını yüksek doğrulukla analiz etme imkânı sunarak büyük ölçekli kanser çalışmalarını mümkün kılmıştır (61). Böylece ilaç kombinasyonları ve bunların etki mekanizmaları da dahil olmak üzere yeni tedavi stratejilerinin potansiyeli daha iyi kavranabilir. Proteomik teknolojilerdeki sürekli gelişim, kanserin tanı, tedavi ve önlenmesinde yeni ufuklar amaya devam etmektedir.



3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 1’de verilmiştir. Kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 2’ de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	Marka/Model
Mikropipetler	Thermo Scientific
Santrifüj Cihazı	Thermo Scientific, LABOFUGE 400
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4 °C, -20 °C ve -80 °C)	Kirsch, Haier
Sıvı Azot Tankı (-180 °C)	Thermo Scientific
Hassas Terazî	SHIMADZU
%5 CO ₂ , 37 °C İnkübatör	Thermo Scientific
Otoklav Cihazı	Nüve SteamArt
Mikropipet uçları	
2, 5, 10 ve 25 mL hacimli steril serolojik pipetler	ISOLAB, COSTAR
xCELLigence® RTCA DP	Agilent
xCELLigence® E-plate	Agilent
Biyogüvenlik Hücre Kabini	Thermo Scientific, S2020
Invert Mikroskop	ZEISS, Primo Vert
Su Banyosu	Nüve, ST30
15 ve 50 ml hacimli santrifüj tüpleri	DEBMED, NEST
25 cm ² ve 75 cm ² ’lik Flask	BIOFIL
Kryotüpler	WATSON

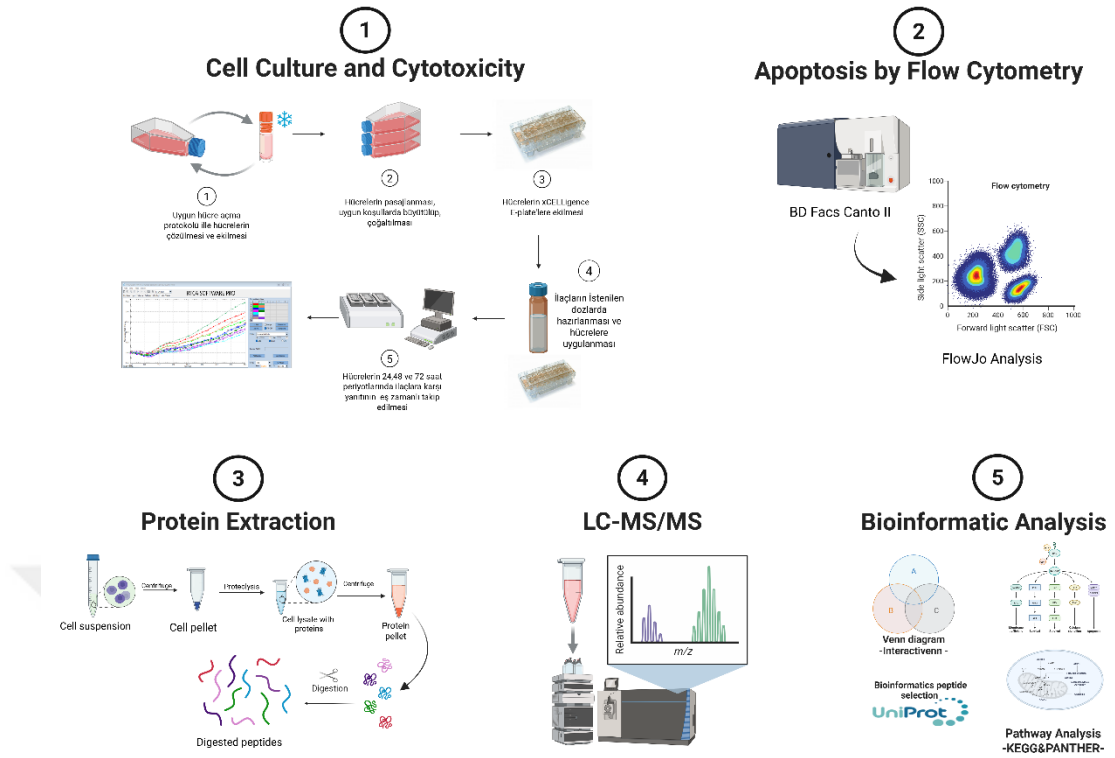
Tablo 2. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Firma/Kodu
%0,25 Tripsin-EDTA	Thermo Scientific ,25200056
DMEM	Thermo Scientific, 41966029
DPBS	Thermo Scientific, 14190094
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Scientific, 15140-122
Trypan Blue Solution, 0.4%	Glpbio, GF00376
DMSO	Sigma, D2650-100ML
ATRA	Merck, 554720-500MG
Kurkumin	Merck, 239802-100MG
Fetal Bovine Serum	Sigma, F7524-500ML

3.2 Yöntem

3.2.1 Araştırma düzeni

Tez çalışmasının ilk aşamasında ATRA+Kurkumin kombinasyonel tedavisinin U87 hücre hattındaki doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi incelendi. Bu bağlamda, serbest ve kombinasyon dozların U87 hücrelerinin canlılığı üzerinde gösterdiği etkiler xCELLigence deneyleri ile analiz edildi (Şekil 5.1). Devamında, bu etkinlik Annexin V-FITC apoptoz analizleri ile desteklendi (Şekil 5.2). En etkin dozların uygulandığı hücreler ile LC-MS/MS proteomik analiz gerçekleştirildi (Şekil 5.3, Şekil 5.4). Elde edilen bulgular biyoinformatik analizler ile yorumlandı (Şekil 5.5).



Şekil 5. İş akış şeması (created in BioRender.com).

3.2.2. Hücre kültürü çalışmaları

Hücre Kültürü çalışmaları, biyogüvenlik kabininde, steril koşullara dikkat edilerek gerçekleştirildi. Çalışmalara başlamadan önce kullanılacak tüm malzemeler UV ışığı altında en az 20 dakika bekletilerek sterilizasyonu sağlandı. Kabin ve kabinde kullanılacak malzemeler çalışma öncesi %70 etanol ile silinerek sterilize edildi.

3.2.2.1. Hücrelerin uygun koşullarda büyütülmesi

Çalışmada ATCC (American Type Culture Collection) firmasından temin edilen glioblastoma multiform kökenli U87MG (ATCC HTB-14) hücreleri kullanıldı. Hücrelerin büyütülmesi için sterilizasyonu yüksek, kontaminasyon riski az olan filtreli T25 ve T75 flasklar tercih edildi. Çalışmalar için gerekli olan solüsyonlar tüm hazırlıkları yapıp alikotlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Bazik besiyeri olarak Gibco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose with normal L-Glutamine, 500 mL) tercih edilmiştir ve 45 mL'lik hacimlere alikotlandı.

Complete besiyeri hazırlamak için %10 oranında Fetal sığır serumu (FBS) (5 ml), %1 oranında Penisilin-Streptomisin (0,5 mL) kullanıldı. Hücre dondurma besiyeri %90 FBS, %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı. Ayrıca hücre kültüründe kullanılan Tripsin-EDTA (0,25 %), 100 mL ve 1X Fosfat Tamponu (PBS) solüsyonları da sırasıyla 15 mL ve 50 mL'lik tüplere alikotlandı.

3.2.2.2. Hücrelerin açılması, büyütülmesi ve pasajlanması

Hücrelerin teslim alınma sürecinin tamamlanmasının ardından, sistematik olarak çoğaltılıp geniş bir stok eldesi gerçekleştirildi. Hücrelere ilk olarak cell thawing (hücre açma) prosedürü uygulandı. Buna göre; öncelikle cryo tüp 37 °C sıcak su banyosunda iki dk bekletilerek çözünmesi sağlandı. Ardından hızlı bir şekilde biyogüvenlik kabinine alınıp, önceden besiyeri eklenmiş 15 ml'lik santrifüj tüpüne pipet yardımıyla yavaş bir şekilde aktarıldı. Hücreler 1000 g x 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından, üst sıvı aspire edilmiş ve hücre pelleti 1 mL Complete DMEM ile resüspanse edilip T25 flask'a ekim gerçekleştirildi. Hücrelerin 24 saat boyunca flask yüzeyine tutunması beklenerek 24 saat sonunda eski besiyeri aspire edilip 5 mL fresh besiyeri eklendi. Hücreler 3-4 gün boyunca 37°C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde bekletildi. %80 yoğunluğa geldiklerinde T25 ve T75 flasklara aktarılıp pasaj devam ettirildi. Hücre pasajı yapılırken, öncelikle eski besiyeri aspire edildi ve iki kere 1X PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminin ardından, T25 flask için 500 µl, T75 flask için 1 mL tripsin eklenmiş ve 5 dk 37°C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından kabine geri alınan flasklara tripsin miktarının 3 katı olacak şekilde fresh complete DMEM eklenip santrifüj tüplerine aktarıldı. 1000 g x 5 dk santrifüj edilen hücreler, üst sıvısı aspire edildikten sonra 1 mL fresh complete medium ile resüspanse edilip tripan mavisi kullanılarak BİORAD cell titer cihazı ile hücre sayımı gerçekleştirildi. Son olarak hücreler T25 için 60.000/mL, T75 için 75.000/mL olacak şekilde ekildi. Her 2 günde bir pasajı gerçekleştirilen hücrelerden stok eldesi için hücre dondurma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.3. xCELLigence deneyleri

xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer) DP (dual purpose) cihazı, hücresel canlılığı aynı zamanda hücre göçünü hiçbir işaretlemeye gerek duymaksızın gerçek zamanlı olarak görüntüleyebilmeyi sağlayan ileri düzey bir cihazdır. Çift amaçlı (DP) özellikli tasarımı hem proliferasyon hem de migrasyon/invazyon gibi fonksiyonel deneyler gerçekleştirebilmeyi sağlar. Cihaz, hücresel fonksiyonu, mikroelektronik sensörleri sayesinde gerçekleştirilen empedans ölçümü ile test eder. Cihaza ait özel kuyucuklu plakalara (E-plate) yayılan hücreler, tabanda yer alan mikro elektrotlara bağlanarak elektrik akımını engelleyerek empedans artışına neden olur. Empedans, hücre indeksi (cell index, CI) şeklinde sunulur ve hücrenin davranışının gerçek zamanlı nicel bir karşılığını yansıtır.

Deney süresince, cihaz, standart 37 °C, %5 CO₂'li hücre kültürü inkübatöründe tutulur ve hücrelerin uygun koşullarda bekletilmesi sağlanır. Cihaz, bir kablo ile, inkübatör dışında dizüstü bilgisayara (kontrol ünitesi) bağlıdır. Sitotoksiste gibi dinamik deneylerde hücrelerin ilaçlara veya çevresel faktörlere tepkisini sürekli ve gerçek zamanlı bir şekilde yakalar ve bilgisayar ekranına yansıtır. Deney boyunca, hücre davranışı gözlemlenebilmektedir.

3.2.3.1. xCELLigence hücre canlılığı deneyi

3.2.3.1.1. Hücrelerin E-plate 'lere ekilmesi

Öncelikle, E-plate plakalara 50 µl besiyeri eklendi ve arka plan ölçümü yapıldı. Daha sonra U87MG hücreleri 100 µl besiyeri içerisinde 5000/kuyucuk hücre olacak şekilde hazırlandı ve kuyucuklara ekildi. E-plate'ler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, ardından inkübatör içerisindeki cihaza yerleştirildi. Son olarak, deneyin ilk adımı olan 24 saatlik okuma başlatıldı. Hücrelerin, kuyucuklara tutunup logaritmik büyüme fazına geçmeleri için 24 saat beklenirken, bu süre sonunda, hücrelere ilaç uygulaması gerçekleştirildi.

3.2.3.1.2. ATRA ve Kurkumin ilaçlarının hazırlanması ve uygulanması

ATRA ve Kurkumin ilaçları; üretici firmanın talimatına uygun saklama koşullarında muhafaza edildi. İlaçlar, her deneyden önce taze olarak hazırlandı. Üretici firmanın talimatına göre ATRA ve Kurkumin DMSO içerisinde çözöldü. Sırasıyla 31 mM ve 13.57 mM stok çözöltülerden dilüsyon yapılarak 5, 10 20 μ M konsantrasyonlarda kurkumin ve 25, 50, 75 μ M konsantrasyonlarda hazırlanarak ilaç çözöltüleri elde edildi. Ayrıca bu konsantrasyonların ikili kombinasyonları da hazırlandı (Tablo 3). Her kuyucuğun DMSO yüzdelikleri eşit tutuldu ve kontrol grubuna bu yüzdeliğe sahip DMSO içeren DMEM eklendi. Hücre ekiminin ardından 24 saat sonra; ilaçlar, her kuyucuğa 50 μ l içerisinde uygulandı.

Tablo 3. U87-MG hücre hattına uygulanan ilaç dozları

ATRA/Kurkumin	Kurkumin 0 μ M	Kurkumin 5 μ M	Kurkumin 10 μ M	Kurkumin 20 μ M
ATRA 0 μ M	Negatif Kontrol	5 μ M	10 μ M	20 μ M
ATRA 25 μ M	25 μ M	25 μ M + 5 μ M	25 μ M + 10 μ M	25 μ M + 20 μ M
ATRA 50 μ M	50 μ M	50 μ M + 5 μ M	50 μ M + 10 μ M	50 μ M + 20 μ M
ATRA 75 μ M	75 μ M	75 μ M + 5 μ M	75 μ M + 10 μ M	75 μ M + 20 μ M

3.2.3.1.3. Hücrelerin takibi ve veri analizi

Hücrelerin ilaçlara karşı davranışı 72 saat boyunca eş zamanlı olarak takip edildi. 72. saatin sonunda deney sonlandırıldı ve veriler RTCA Pro yazılımı ile analiz edilerek görsel ve sayısal çıktılar elde edildi. Tüm hücre kültürü verileri, ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar, GraphPad PRISM 8.0 yazılımı kullanılarak iki yönlü ANOVA yöntemiyle yapıp; anlamlı farkların belirlenmesinde ise Tukey testi uygulandı.

3.2.3. Annexin V-FITC apoptoz analizi

Hücre ölümü, mekanik ve kimyasal hasar ile gerçekleşebileceği gibi hücre tarafından planlı bir şekilde de gerçekleşebilir. Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz özellikle onkolojik araştırmalarda yer verilen fizyolojik bir süreçtir. Normal bir canlı hücrenin plazma zarı iç ve dış katmanında farklı fosfolipit içeriğiyle asimetrik dağılım gösterir. Örneğin dış katmanda fosfatidilkolin ve sfingomyelin bulunurken iç katmanda aminofosfolipitler, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin (PS) bulunur (62). Apoptotik hücre ise plazma zarı asimetrisinin bozulması, hücre-hücre etkileşimlerinin zayıflaması, sitoplazma ve çekirdeğin yoğunlaşması ve DNA hasarı gibi morfolojik özelliklere sahiptir. Erken apoptoz sürecinde plazma bütünlüğü bozularak iç katmandaki PS dış katmana transloke olarak hücre dışı ortama maruz kalır. Apoptozun tespiti için PS'ye yüksek afinite ile bağlanan fosfolipit bağlayıcı protein Annexin V, genelde FITC (fluorescein isothiocyanate) gibi florokromlarla birleştirilir, ticari olarak satın alınabilir. FITC-Annexin V boyaması, propidyum iyodür (PI) gibi boyalar ile birlikte kullanılır. Canlı hücreler membran bütünlüğü sayesinde PI'yı hücre içine almazken apoptozun geç evrelerinde membran bütünlüğü kaybolduğunda ölü ve hasarlı hücreler PI'yı hücre içine alır. Böylelikle akış sitometrisinde analiz edilen canlı hücreler (Annexin V-FITC (-) , PI (-)) , erken apoptotik hücreler (Annexin V-FITC (+) , PI (-)) , geç apoptotik ve ölü hücreler Annexin V-FITC (+) , PI (+)) birbirinden ayrılarak apoptozun tespitini kolaylaştırır.

Tez çalışmasında, apoptoz analizi ticari olarak satın alınan FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Cat. 556547, BD) kullanılarak yapıldı. Annexin V/PI apoptoz analizi için U87 glioblastoma hücreleri, 6 kuyucuklu kültür plaklarına her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde, 2 mL hacimde ekildi. Çalışmada dört deney grubu yer aldı: negatif kontrol, ATRA (75 μ M), kurkumin (20 μ M), ATRA ve kurkumin kombinasyonu (75 μ M + 20 μ M). Hücre ekiminden 24 saat sonra deney gruplarına ilaç uygulaması gerçekleştirildi. Negatif kontrol grubuna ise diğer deney grupları ile aynı orana sahip olacak şekilde %0,2 oranında DMSO içeren taze kültür ortamı (DMEM) eklendi.

72 saatin sonunda, her bir kuyudaki kültür sıvısı deney gruplarına ait ayrı Falcon tüplerine dikkatlice toplandı. Hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve yıkama sıvısı da yine aynı tüplere eklendi. Ardından, hücreler 100 µL tripsin yardımıyla plakadan ayırarak aynı tüplere toplandı. Elde edilen hücre süspansiyonları 400 g'de 5 dakika santrifüjlenerak süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletleri, 4 mL soğuk PBS ile tekrar süspanse edilerek flow sitometri analizine uygun tüplere aktarıldı. Aynı hız ve sürede tekrar santrifüj edilip üst sıvı atıldıktan sonra, hücreler 1 mL 1X binding buffer içerisinde çözüldü. Her örneğe 3 µL FITC konjugatlı Annexin V ve 5 µL propidyum iyodür (PI) eklendi. Hafif vortexleme ile karıştırılan hücreler, 15 dakika boyunca karanlık ortamda inkübe edilerek akım sitometrisine hazır hale getirildi. Elde edilen sonuçların analizi FlowJo v.10.10 adlı yazılım ile gerçekleştirildi.

3.2.4 Proteomik analizler

3.2.4.1 Proteomik analiz için örnek hazırlama

Belirlenen dozlarda ATRA, kurkumin ve bu iki ajanın kombinasyonu ile 72 saat süreyle muamele edilen hücreler, inkübasyon süresinin sonunda hücre kazıyıcı yardımıyla toplandı. Elde edilen hücre pelletleri, proteomik analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. Tüm proteomik çalışmalar üçlü tekrarlar (triplicate) esas alınarak planlandı. Protein ekstraksiyonu için "in-solution digestion" yöntemi tercih edildi ve kütle spektrometresi analizleri standart yöntemlere uygun olarak uygulandı. Dondurulmuş hücre pelletlerinin lizisi, 8 M üre ve 50 mM amonyum bikarbonat içeren bir tampon çözelti ile gerçekleştirildi. Bu tampon, EDTA içermeyen proteaz inhibitörü tableti ve phosSTOP fosfataz inhibitörü tableti ile desteklendi. Lizisin ardından, numunelere DTT ile indirgeme ve kloroasetamid ile alkilasyon işlemleri uygulandı. Daha sonra, örnekler 50 mM amonyum bikarbonat ile seyreltilerek, Promega'nın Sequencing Grade Modified Trypsin enzimiyle 37°C'de yaklaşık 16 saat süresince (gece boyunca) inkübe edildi. Asitlendirme adımının ardından oluşan tripsin peptitleri, C18 SEP-PAK kolonları kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan örnekler, nano-LC-MS/MS analizine geçmeden önce %5 formik asit ve %5 asetonitril içeren bir çözelti içinde çözdürüldü.

3.2.4.2 K t le spektrometrisi ve veri analizi

Elde edilen peptit örnekleri, ters faz C18 nano-akışlı HPLC sistemi (Dionex Ultimate 3000 RSLC nano, Thermo Fisher Scientific) ile ayrıştırılarak, Q Exactive Orbitrap k t le spektrometresi (Thermo Fisher Scientific) ile analiz edildi. Peptitlerin ayrıştırılması, laboratuvar ortamında doldurulan 75  m i  çapa ve 35 cm uzunluğa sahip C18 kolonda gerçekleştirilip; %4 ila %95 aralığında değişen asetonytril gradyanı (%0.1 formik asit içeren) kullanılarak, 300 nL/dakika akış hızında toplam 90 dakikalık bir süre boyunca sürdürüldü.

Elde edilen veriler, Proteome Discoverer 2.3 yazılımı kullanılarak SequestHT algoritması aracılığıyla analiz edildi. Sabit modifikasyon olarak sistein kalıntılarına karbamidometilasyon uygulanıp; değişken modifikasyonlar arasında protein N-terminal asetilasyonu, metiyonin oksidasyonu ve fosforilasyon tanımlandı. Tripsin sindirimi sırasında en fazla iki kaçırılmış kesime (missed cleavage) izin verilip; peptit  nc  k t le toleransı 10 ppm olarak sınırlandırıldı. Hem peptit hem de protein düzeyinde yanlış tanımlama oranı (FDR) %1 olarak ayarlandı. Protein tanımlamaları, Homo sapiens türüne ait 2016 sürümlü UniProt veritabanı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.4.3 İstatistiksel ve biyoinformatik analizler

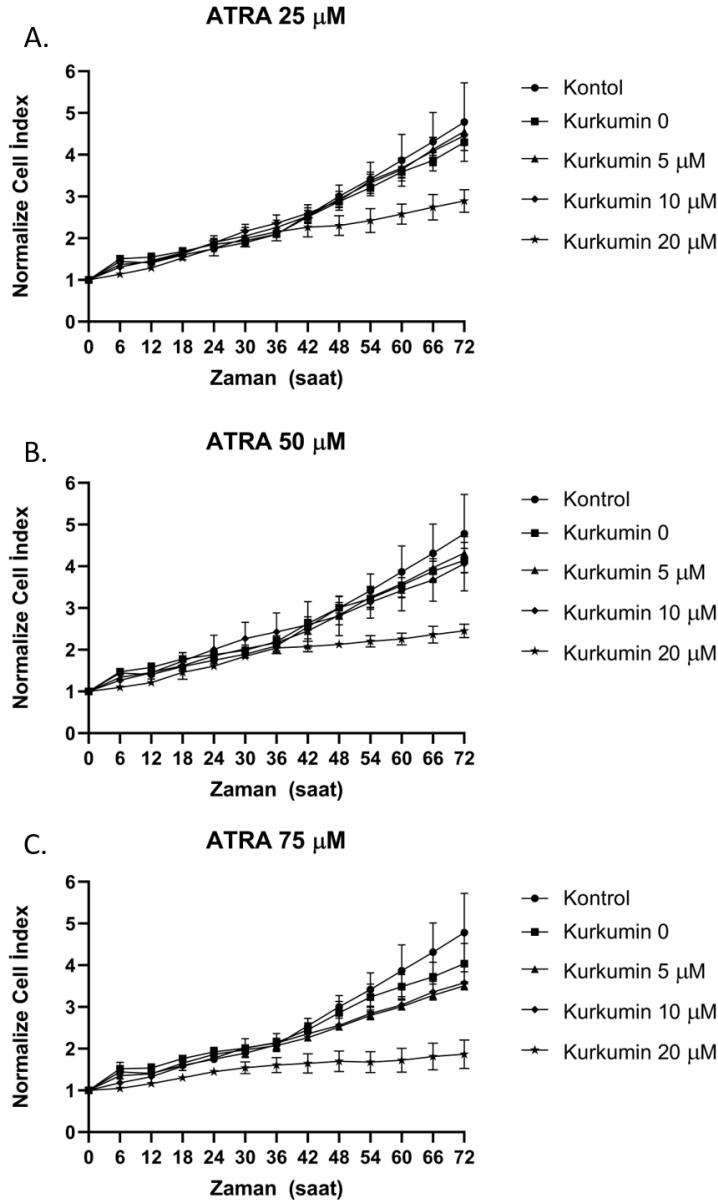
U87 GBM hücre hattında farklılaşan proteinlerin zenginleştirdiği yolların proteomik analizi için, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) biyoinformatik araçları kullanıldı. Deney gruplarına ait bulunan proteinler kanser ile ilişkili sinyal yolakları seçilerek filtrelendi. Elde edilen haritalar kullanılarak, gruplar arasında farklılık gösteren proteinler belirlenerek, literatür taraması ile birlikte karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi.

4 BULGULAR

4.1 ATRA ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87 Hücre Hattındaki Sinerjistik Etkisi

U87-MG hücrelerinin uygulanan ilaçlara karşı yanıtı, ilaçların hücre canlılığına etkisi, xCELLigence sitotoksosite deneyleri ile eş zamanlı olarak gözlemlendi. 72 saatin sonunda, elde edilen bulgular; RTCA yazılımı ile analiz edildi. İlaç uygulamasının etkisini karşılaştırmalı olarak değerlendirebilmek amacıyla, xCELLigence verileri ilaç uygulama zamanı olan 24. saate göre normalize edildi. Böylece her gruptaki hücre indeksi değeri, kendi başlangıç düzeyine oranlanarak sunuldu.

Sonuçlara göre, ATRA ve kurkumin kombinasyonu, her iki ilacın tek başına kullanılmasına göre U87 hücre canlılığını azaltmada daha etkili olup, doza ve zamana bağlı bir etki gösterdiği saptandı (Şekil 6).



Şekil 6. İlaçların Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Zamana Bağlı Etkisi. Hücre canlılığı, xCELLigence sistemi aracılığıyla gerçek zamanlı olarak izlendi ve farklı deney koşullarında hücre indeksi (cell index) değerleri ölçüldü. Hücre index değeri hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Grafiklerde, ATRA'nın 25 µM (A), 50 µM (B) ve 75 µM (C) konsantrasyonlarının Kurkumin'in 5, 10 ve 20 µM dozlarıyla birlikte uygulandığı durumlarda zaman içerisinde gözlenen değişimler yer almaktadır. Grafiklerde ilaç uygulanmayan grup kontrol olarak belirtilirken, yalnızca ATRA uygulanan grup kurkumin 0 µM şeklinde belirtildi.

Bulgular, ATRA ve Kurkumin'in birlikte uygulanmasının hücre çoğalmasını belirgin biçimde baskıladığını göstermektedir ($p < 0.001$). Özellikle ATRA 75 µM ve Kurkumin 20 µM kombinasyonu, normalize hücre indeksinde en büyük düşüşe neden olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, iki ajanın birlikte kullanıldığında hücre

proliferasyonunu baskılayıcı yönde güçlü ve muhtemelen sinerjik bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada ilaçlar arasındaki sinerjik etki, CompuSyn yazılımı kullanılarak değerlendirildi ve U87-MG hücrelerinde güçlü bir sinerjik sitotoksik etki ortaya koyduğu saptandı. Her bir kombinasyona ait CI (kombinasyon indeksi) değerleri Tablo 5'te sunuldu. İki ilaç arasındaki etkileşimi nicel olarak değerlendirmeye olanak sağlayan CI indeksi, kombinasyonun sinerjik, antagonistik ya da sadece ekleyici (additif) bir etki oluşturup oluşturmadığını belirlemeye yardımcı olur. Bulgularımıza göre, önerilen CI aralıkları dikkate alındığında, ATRA 75 μ M ve Kurkumin 20 μ M kombinasyonu 0.1'in altında bir CI değeri göstererek çok güçlü bir sinerjik etkiye işaret etmektedir. Buna karşılık, ATRA 25 μ M + Kurkumin 15 μ M, ATRA 25 μ M + Kurkumin 10 μ M ve ATRA 50 μ M + Kurkumin 5 μ M kombinasyonları, CI değerinin 10'un üzerinde olması nedeniyle belirgin bir antagonistik etkileşim gösterdi. Diğer kombinasyon dozlarının ise CI aralıklarına göre güçlü sinerjizm (CI: 0.1–0.3) ya da sinerjik etki (CI: 0.3–0.7) sergilediği gözlemlendi (63).

Tablo 4. ATRA ve Kurkumin Kombinasyonlarına Ait CI (Kombinasyon İndeksi) Değerleri

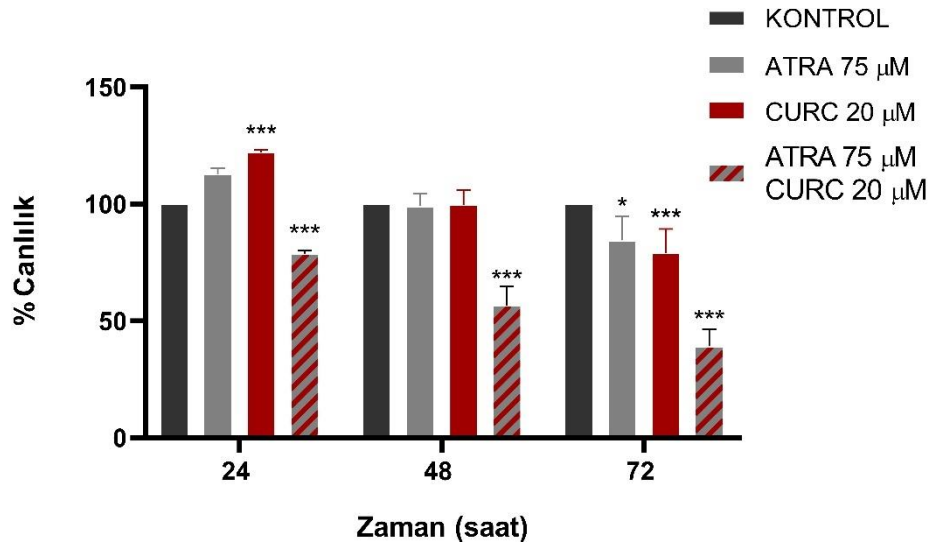
ATRA	Kurkumin	Etki	CI
25 μ M	5 μ M	0.074	299.722
25 μ M	10 μ M	0.035	186.572
25 μ M	20 μ M	0.395	0.28584
50 μ M	5 μ M	0.071	549.411
50 μ M	10 μ M	0.239	0.50677
50 μ M	20 μ M	0.487	0.17941
75 μ M	5 μ M	0.266	0.31258
75 μ M	10 μ M	0.252	0.51962
75 μ M	20 μ M	0.609	0.09409

Kısaltmalar: CI: Kombinasyon İndeksi; ATRA: All-trans Retinoik Asit

Normalize hücre indeksi grafiklerinde, 20 μ M Kurkumin'in 25, 50 veya 75 μ M ATRA ile birlikte uygulanmasının, kontrol grubuna kıyasla zamanla hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 1). Hücre canlılığına ilişkin değerlendirildiğinde, ATRA veya Kurkumin tek başına uygulandığında ilk 24 saatte

hafif bir artış saptandı. Bu durum, her iki ajanın da tekli uygulamada başlangıçta hücre proliferasyonunu bir miktar destekleyebileceğini düşündürmektedir. Ancak A50 μ M + C20 μ M ve A75 μ M + C20 μ M gibi kombinasyon dozları, bu proliferatif etkiyi baskılayarak hücre canlılığında azalmaya neden olmaktadır. 48. saat itibarıyla, ilaçların beklenen sitotoksik etkileri ortaya çıkmaya başlayarak hücre canlılığı doz bağımlı olarak azaldı. Bu zaman noktasında, özellikle yüksek doz kombinasyonlar hücreler üzerinde belirgin sitotoksikite gösterdi. İnkübasyon süresi 72 saate uzatıldığında, 75 μ M ATRA ve 20 μ M Kurkumin kombinasyonu, hücre canlılığını %50'nin altına düşürmek için yeterli olmaktadır. İlginç bir şekilde, 5 μ M Kurkumin'in ATRA ile birlikte uygulanması, hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir azalma sağlamadı. Öte yandan, 10 μ M Kurkumin'in 50 veya 75 μ M ATRA ile kombinasyonu 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemektedir ($p < 0.01$).

Genel olarak, en güçlü sitotoksik etki, 75 μ M ATRA ve 20 μ M Kurkumin'in birlikte uygulanmasıyla elde edildi ve bu kombinasyonla hücre canlılığı 24. saatte %78.7'ye, 48. saatte %56.6'ya ve 72. saatte %39.1'e kadar düşmüştür (Şekil 8). Elde edilen bu güçlü sinerjik etki nedeniyle, ATRA 75 μ M + Kurkumin 20 μ M kombinasyonu U87-MG hücrelerinde apoptoz ve proteomik analizler için tercih edildi.

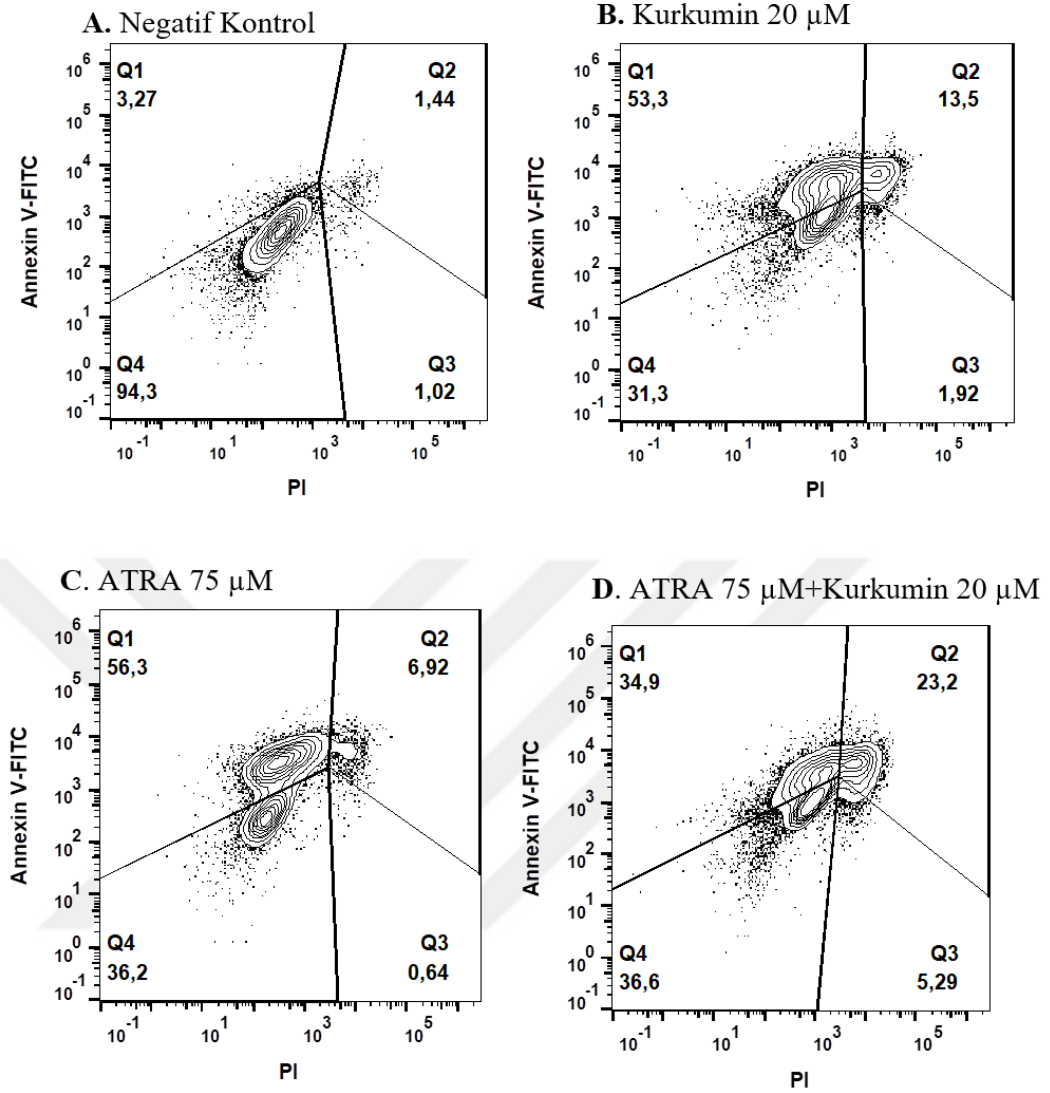


Şekil 7. ATRA 75 μ M + Kurkumin 20 μ M Kombinasyonunun Zamana Bağlı Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi. Sütun grafiği, ATRA (75 μ M), Kurkumin (20 μ M) ve bu iki ajanın kombinasyonu ile yapılan tedavilerin ardından 24., 48. ve 72. saatlerde ölçülen hücre canlılığı yüzdeleri göstermektedir. ATRA (gri sütunlar) veya Kurkumin (düz

kırmızı sütunlar) tek başına uygulandığında, özellikle ilk 24 saatte hücre canlılığı büyük ölçüde korunmaktadır. Ancak iki ajanın birlikte kullanıldığı kombinasyon tedavisi (çizgili kırmızı sütunlar), her bir zaman noktasında hücre canlılığında anlamlı bir azalma yaratmaktadır (*p = 0.033; ***p < 0.001). Bu azalma, zamanla daha belirgin hâle gelmiş ve kombinasyonun sitotoksik etkisinin giderek arttığını göstermektedir. Bu bulgular, ATRA ve Kurkumin arasında güçlü bir sinerjik etkileşim olduğunu ortaya koymaktadır.

4.2 Annexin V-FITC / PI Apoptoz Analizi

U87 hücrelerinin 72.saatteki apoptoz yanıtı, Annexin V-FITC ve PI boyaması yapılarak akış sitometrisinde ölçülmesiyle analiz edildi. Bu analizde, Negatif Kontrol, kurkumin ve kombinasyon olmak üzere 4 deney grubu yer aldı. Analiz sonuçlarına ait grafikler Şekil 8’de gösterildi.



Şekil 8. ATRA ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87 Hücre Hattındaki Apoptotik Etkisi. Hücreler, ilaç uygulamasının 72. saatinde V-FITC ve PI ile boyanarak akış sitometrisinde analiz edildi. A. Negatif Kontrol; B: Kurkumin (20 μ M); C: ATRA (75 μ M); D: Kombinasyon (ATRA 75 μ M + Kurkumin 20 μ M).

Kuadrantlarda Q1 (Annexin V + , PI -) ile işaretlenen alan erken apoptotik hücreleri göstermektedir. Erken apoptotik hücreler , henüz tamamen parçalanmayan plazma membranı sayesinde yalnızca Annexin V ile boyanmaktadır. Q2 (Annexin V + , PI +) ile işaretlenen bölge ise geç apoptozu işaret etmektedir. Hücre ölümü tamamen gerçekleşmiş ve plazma membran bütünlüğü kaybolan hücreler PI ile boyanmaktadır. Q3 (Annexin V - , PI +) bölgesi ise nekrotik hücreleri göstermektedir. Canlı hücreler ise Q4 (Annexin V- PI -) alanında yer almaktadır.

Kontrol grubunda, %94,3 oranı ile yüksek canlılık tespit edildi. İlaç uygulanmayan hücrelerde apoptoza ilişkin belirti gözlemlenmedi. ATRA ve kurkumin uygulanan hücrelerde erken apoptoz seviyesi oldukça yüksekti. (sırasıyla; %53,3 ve %56,3). Tek başına uygulanan ilaçlar U87 hücrelerinde güçlü derecede erken apoptozu indüklediği saptandı. Bununla birlikte geç apoptozun düşük olması (sırasıyla; %13,5 ve %6,92), hücrelerin apoptoz sürecinin ilk aşamalarında olduğunu belirtmektedir. İki grupta da nekroz oranının çok düşük olması ilaçların programlanmış ve kontrollü hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir.

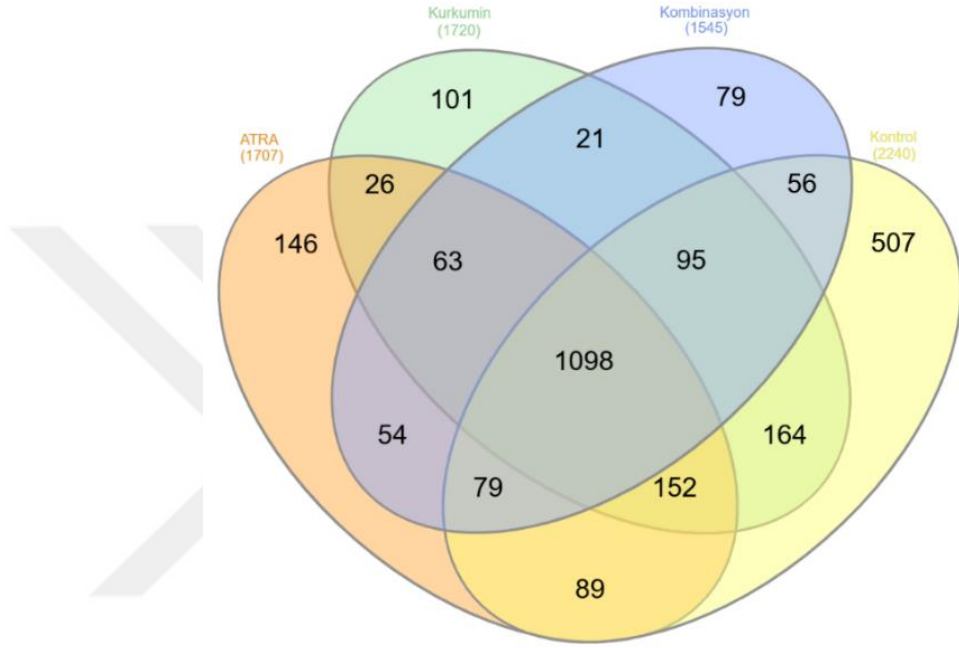
Kombinasyon grubunda, canlılık oranının ciddi ölçüde azalmasının yanında geç apoptoz oranı da önemli düzeyde artış gösterdiği gözlemlendi (%23,2). Bu sonuç, hücrelerin apoptozun ileri aşamalarına geçerek programlı ölümlerini tamamladıklarını göstermektedir. İlaçlar, 72.saatte etkinliğini devam ettirmektedir. Nekroz oranının tekli artmış olması muhtemelen apoptozun ilerleyip hücre membran bütünlüğünün kaybolmasıyla ilişkilendirilebilir.

Özetle, kontrole kıyasla tüm gruplarda apoptozun indüklendiği saptandı. Hem ATRA hem kurkumin tek başına uygulanması U87 hücrelerinde güçlü bir şekilde erken apoptozu uyardı. Kombinasyonel tedavi ise apoptozun geç evresinde artışa yol açarak etkinliği artırıp ölüm sürecinin belirgin şekilde ilerlemesine sebep olduğu gözlemlendi. Nekroz oranlarının tüm deney grubundan düşük olması hücre ölümünün apoptoz kaynaklı olduğunu göstermektedir.

4.3 Kütle Spektrometrisi ile Protein Tanımlaması ve Biyoinformatik Analizi

ATRA ve Kurkumin'in sinerjik etkisi belirlendikten sonra, bu etkinin altında yatan terapötik mekanizmaları anlamak amacıyla hücrelerin proteom profilleri analiz edildi. Hücre canlılığının 72. saatte sinerjik kombinasyon ile anlamlı şekilde azaldığı koşullarda ortaya çıkan proteomik farklılıklar değerlendirildi. LC-MS/MS analizleri sonucunda elde edilen farklı proteinlerin Accession ID'leri, ATRA ile tedavi edilen hücreler, Kurkumin ile tedavi edilen hücreler, kombinasyon uygulanan hücreler ve kontrol grubundaki U87 GBM hücreleri olmak üzere dört gruba ayrılarak Venn

diyagramı ile görselleştirildi (Şekil 9). Bu diyagram, tedaviye özgü olarak değişen protein profilleri hakkında moleküler düzeyde bilgi sunmakta; yalnızca ilgili gruba özgü ya da gruplar arasında ortak olan proteinler, ATRA, Kurkumin ve kombinasyonlarının modüle ettiği biyolojik yolların ve hücresel süreçlerin aydınlatılmasına temel oluşturmaktadır [22].



Şekil 9. Venn diyagramı. ATRA, kurkumin, kombinasyon tedavisi ve kontrol (tedavi uygulanmamış) gruplarında tanımlanan özgül ve ortak proteinlerin sayısal dağılımını göstermektedir. Diyagramda, yalnızca ilgili grupta tespit edilen proteinlerin yanı sıra, birden fazla koşulda ortak olarak ifade edilen proteinler de vurgulanmaktadır.

İlaç uygulanmayan U87 GBM hücreleri, karşılaştırmalı değerlendirme için kontrol grubu olarak ele alındı. Tüm gruplarda ortak olarak ifade edilen protein sayısı toplamda 1098 olarak belirlendi. Bununla birlikte, yalnızca ATRA ile tedavi edilen hücrelerde 146, kurkumin grubunda 101, kombinasyon grubunda 79 ve tedavisiz kontrol grubunda ise 507 proteine özgül ifade saptandı. Özellikle, kombinasyon tedavisi uygulanan grupta farklılaşan protein sayısının oldukça sınırlı olması dikkat çekmektedir. Her bir tedavi grubunda ve kontrolde özgül olarak tanımlanan proteinler, tedaviye özgü moleküler değişimlerin belirlenmesi amacıyla ileri biyoinformatik analizlere tabi tutuldu.

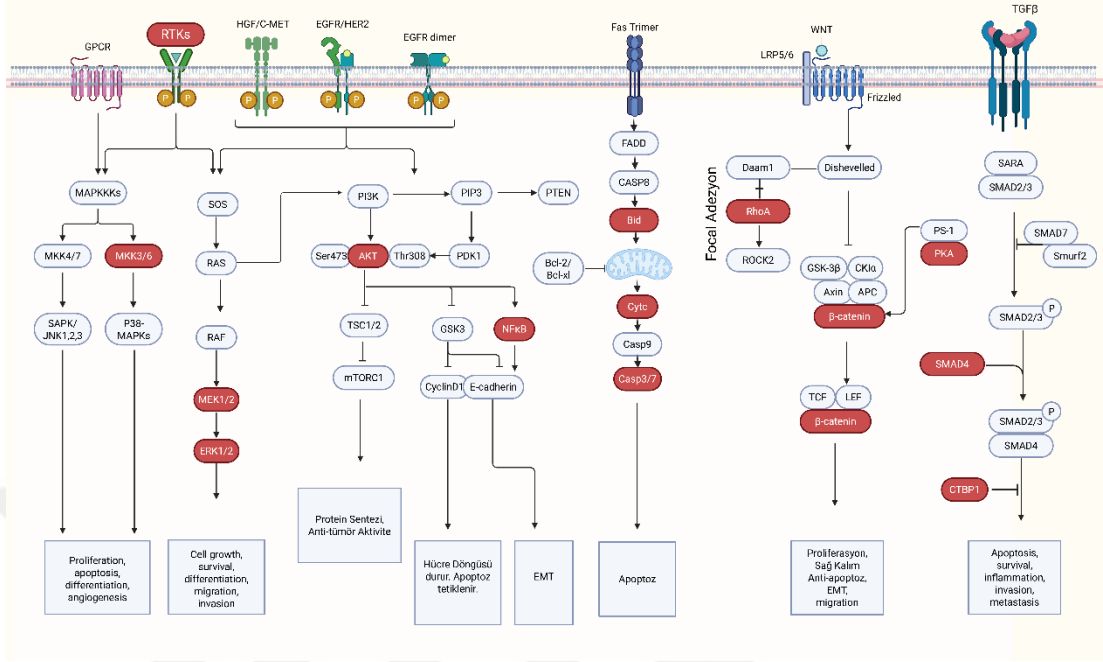
4.3.1 KEGG yolak analizleri

Bu çalışmada, all-trans retinoik asit (ATRA), kurkumin ve kombinasyon tedavilerinin U87-MG glioblastoma hücre hattındaki proteomik profil üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, tespit edilen farklı protein kümeleri üzerinde KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) yolak zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir tedavi grubunda anlamlı değişim gösteren proteinler için yapılan KEGG analizi, özellikle tümör progresyonu, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü ve hücre-adezyon süreçlerini yöneten kanserle ilişkili yolakların belirlenmesine odaklanılmıştır. Böylece, proteomik verilerden hareketle ATRA'ya özgü, kurkumin kaynaklı ve kombinasyon kaynaklı sinyal mekanizmaları ayrıntılı biçimde ortaya konarak, GBM hücrelerindeki antitümör aktivitenin moleküler temelleri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

4.3.1.1. ATRA uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları

ATRA uygulanan U87-MG hücrelerinde saptanan proteinlerin, hücresel sinyal yolakları üzerindeki dağılımı şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 10). Görselde kırmızı renkle işaretlenmiş proteinler, ATRA uygulanan deney grubuna özgü olarak proteomik analizlerde tespit edilen proteinleri temsil etmektedir. Bu proteinlerin, başlıca MAPK, PI3K/AKT/mTOR, apoptoz, WNT/ β -katenin ve TGF- β sinyal yolakları içerisinde yer aldığı belirlenmiştir.

ATRA Uygulanan U87-MG Hücrelerindeki Sinyal Mekanizmaları



Şekil 10. ATRA uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları. Bu grupta saptanan proteinler kırmızı kutucuklarda gösterilmiştir (created in Biorender.com).

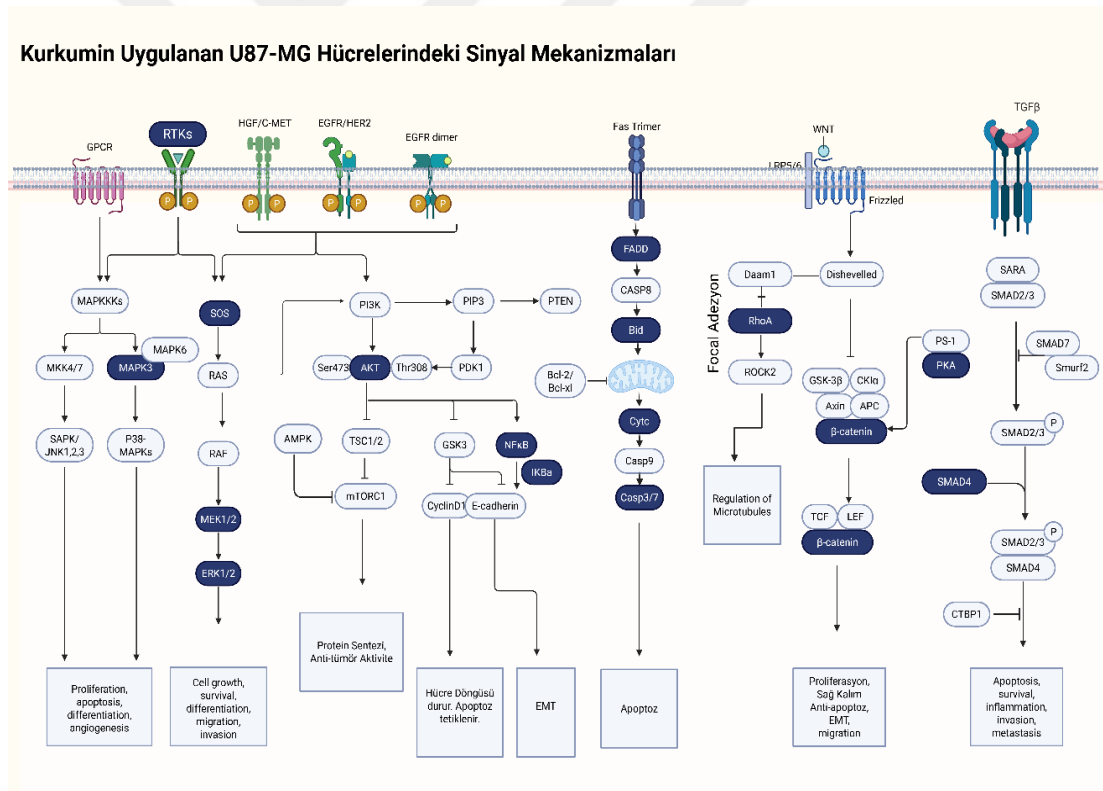
MAPK yolları içerisinde MKK3/6, MEK1/2 ve ERK1/2 proteinlerinin varlığı saptanmıştır. Bu proteinler sırasıyla P38 ve ERK kinazlarının aktivasyon kaskadında görev almakta olup, hücre büyümesi, farklılaşma ve stres yanıtlarıyla ilişkilidir. PI3K/AKT yolunda ise AKT proteini tespit edilmiştir. AKT, hücre proliferasyonu ve hayatta kalma süreçlerinde kritik rol oynar. Ayrıca, bu yolda yer alan NFκB proteini de ATRA grubunda saptanmış olup, hücrel inflamasyon ve anti-apoptotik sinyallerle bağlantılıdır.

Apoptoz yoluna ait olarak, mitokondri bağımlı hücre ölümü mekanizmalarıyla ilişkili Caspase 3/7 proteinleri belirlenmiştir. Bu proteinler, hücre içi ölüm kaskadının son yürütücü elemanlarıdır. WNT sinyal yoluna ait β-katenin transkripsiyon kompleksinin bir bileşeni olan CTBP1 de ATRA uygulaması sonrası saptanmıştır. Son olarak, TGF-β yollarında yer alan SMAD4 proteininin varlığı da deney grubunda saptanmış; bu protein, TGF-β aracılı sinyal iletiminin merkezinde yer almakta ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır.

ATRA uygulanan U87-MG hücrelerinde bu yollara ait farklı proteinlerin tespit edilmesi, ATRA'nın çoklu sinyal yolları üzerinde etkili olabilecek moleküler hedeflerle etkileşim kurduğunu ortaya koymaktadır.

4.3.1.2 Kurkumin uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları

Kurkumin uygulanan U87-MG hücrelerinde tespit edilen proteinlerin hücresel sinyal yollarındaki dağılımı şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 11). Görselde lacivert kutucuklarla gösterilen proteinler, kurkumin grubunda proteomik analizler sonucunda saptanmış olan proteinleri temsil etmektedir. Bu proteinlerin MAPK, PI3K/AKT/mTOR, apoptoz, WNT/ β -katenin, TGF- β ve fokal adezyon gibi kanserle ilişkili çok sayıda sinyal yoluna dağıldığı görülmektedir.



Şekil 11. Kurkumin uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları. Bu grupta saptanan proteinler lacivert kutucuklarda gösterilmiştir (created in Biorender.com).

MAPK sinyal yoluna ait olarak, MAPK3, MEK1/2 ve ERK1/2 proteinleri saptanmıştır. PI3K/AKT yolunda ise AKT ve IκBα gibi sinyal aktarım proteinlerinin

kurkumin grubunda yer aldığı görülmüştür. Bu yolla, anti-tümör aktivite ile ilişkili çeşitli sinyallerin aktarıldığı bilinmektedir. Ayrıca, bu grupta apoptozla ilişkili olarak Caspase-3/7 proteinlerinin yanı sıra FADD ve Bid proteinleri de tespit edilmiştir.

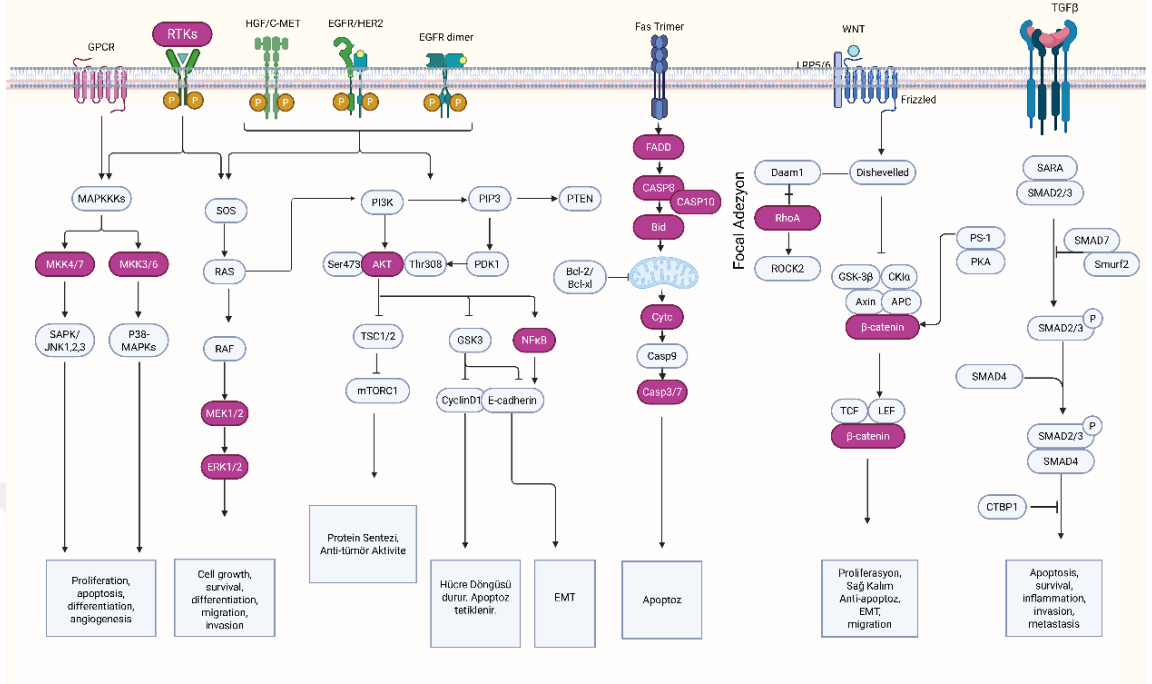
WNT sinyal yoluna ait olarak β -katenin proteininin bulunduğu, ayrıca, TGF- β yollarına ait olarak SMAD4 ve PKA proteinlerinin kurkumin grubunda yer aldığı belirlenmiştir.

ATRA ve kurkumin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, her iki uygulamada da bazı ortak sinyal yollarında farklı proteinlerin saptandığı gözlemlenmiştir. Örneğin, her iki grupta da ERK ve AKT yollarına ait proteinler bulunmakla birlikte, ATRA grubunda MKK3/6, CTBP1 gibi proteinler tespit edilirken; kurkumin grubunda MAPK3, IKB α , FADD, PKA ve SOS gibi proteinler saptanmıştır. Bu sonuçlar, her iki bileşiğin farklı sinyal yolları ve moleküler hedefler üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

4.3.1.3 Kombinasyon uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları

Kombinasyon (ATRA + kurkumin) uygulanan U87-MG hücrelerinde tespit edilen proteinler, sinyal yolları bağlamında incelendiğinde MAPK, PI3K/AKT/mTOR, apoptoz, WNT/ β -katenin ve fokal adezyon mekanizmaları içerisinde yer aldıkları görülmüştür (Şekil 12). Bu gruba özgü olarak tespit edilen proteinler arasında MKK4/7, MKK3/6, MEK1/2, ERK1/2, AKT, NF κ B, FADD, CASP8, CASP10, Bid, Cyt-c, CASP3/7, RhoA ve β -catenin bulunmaktadır. MAPK sinyal yolunda hem MKK4/7 hem de MKK3/6 proteinlerinin yer alması dikkat çekicidir. PI3K/AKT yolunda AKT ve NF κ B proteinlerinin varlığı gözlemlenmiştir. Apoptoz yoluna ait olarak FADD, CASP8, CASP10, Bid, Cyt-c ve CASP3/7 proteinlerinin tümü kombinasyon grubunda saptanmıştır. Ayrıca, WNT/ β -katenin sinyal yolunda β -catenin ve RhoA proteinleri de bu grupta tespit edilmiştir.

Kombinasyon Uygulanan U87-MG Hücrelerindeki Sinyal Mekanizmaları

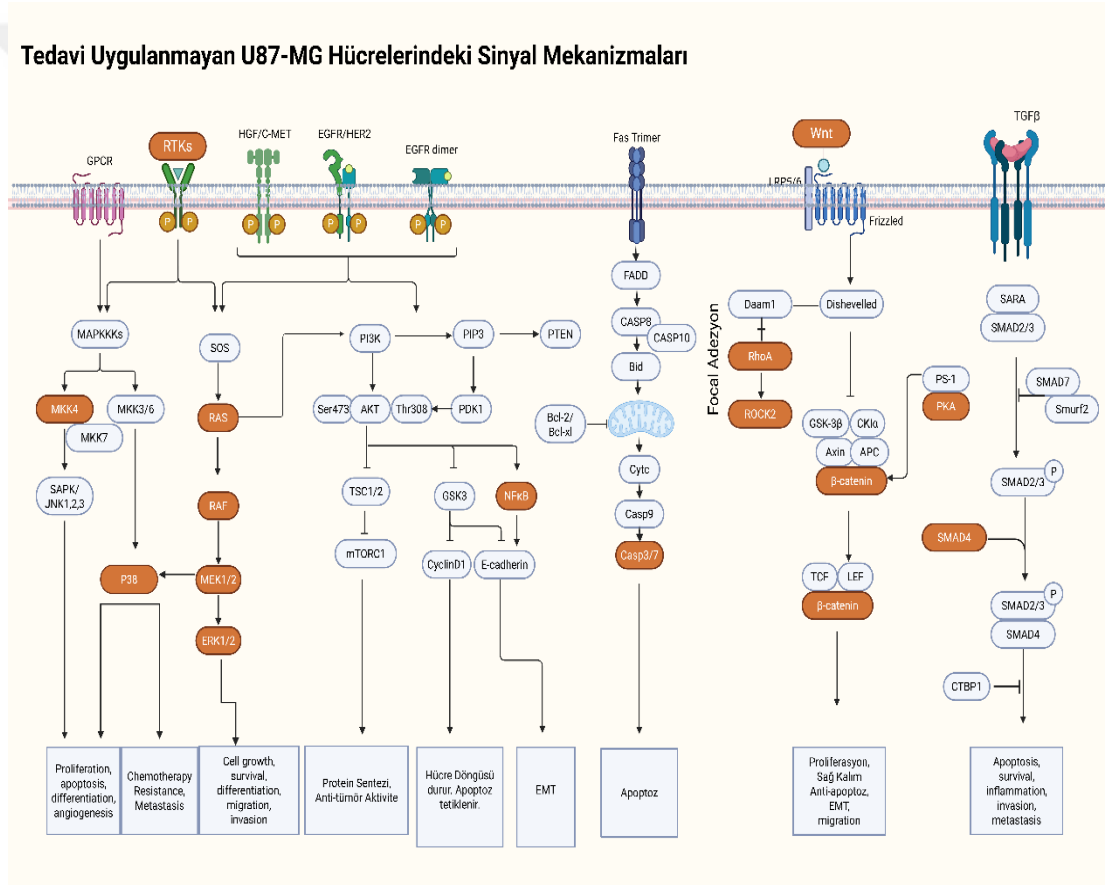


Şekil 12. Kombinasyon uygulanan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları. Bu grupta saptanan proteinler pembe kutucuklarda gösterilmiştir (created in Biorender.com).

Kombinasyon grubunda tespit edilen proteinler, ATRA ve kurkumin gruplarıyla karşılaştırıldığında bazı ortak ve özgün protein profilleri gözlemlenmiştir. MAPK yolunda ATRA grubunda MKK3/6, MEK1/2 ve ERK1/2; kurkumin grubunda ise MAPK3, MAPK6, MEK1/2 ve ERK1/2 proteinleri yer alırken, kombinasyon grubunda bunlara ek olarak MKK4/7 proteini de saptanmıştır. PI3K/AKT yolunda ATRA grubunda AKT ve NFκB; kurkumin grubunda AKT, PDK1, mTORC1 ve IKBα proteinleri tespit edilmiştir. Kombinasyon grubunda ise AKT, GSK3 ve NFκB proteinleri bulunurken, kurkumin grubunda yer alan PDK1 ve IKBα proteinlerine rastlanmamıştır. Apoptoz yolunda hem ATRA hem kurkumin gruplarında CASP3/7 proteini ortak olarak saptanırken, kombinasyon grubunda ayrıca FADD, CASP8, CASP10, Bid ve Cyt-c gibi apoptozla ilişkili ek proteinler de tespit edilmiştir. WNT yolunda β-catenin proteini kombinasyon ve kurkumin gruplarında saptanmış olup ATRA grubunda bulunmamıştır. TGF-β sinyal yolunda ise ATRA ve kurkumin gruplarında tespit edilen SMAD4 veya CTBP1 proteinleri kombinasyon grubunda saptanmamıştır.

4.3.1.4 Tedavi uygulanmayan U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları

Tedavi uygulanmayan (kontrol) grubunda tespit edilen proteinlerin sinyal yolları üzerindeki dağılımı Şekil 13'te gösterilmiştir. Turuncu renkle işaretlenen proteinler, kontrol grubuna ait proteomik analizlerde tespit edilen proteinleri temsil etmektedir. Bu grupta tespit edilen proteinler MAPK, PI3K/AKT, apoptoz, WNT/ β -katenin, TGF- β ve fokal adezyon gibi temel sinyal mekanizmalarına dağılmıştır. Belirlenen proteinler arasında MKK4, P38, RAS, RAF, MEK1/2, ERK1/2, NF κ B, CASP3/7, ROCK2, β -katenin, PKA ve SMAD4 yer almaktadır.



Şekil 13. Kontrol grubu U87-MG hücrelerindeki sinyal mekanizmaları. Bu grupta saptanan proteinler turuncu kutucuklarda gösterilmiştir (created in Biorender.com)

MAPK sinyal yolunda kontrol grubuna özgü olarak MKK4, MKK7 ve P38 proteinleri tespit edilmiştir. PI3K/AKT yolunda NF κ B proteini, apoptoz yolunda ise yalnızca CASP3/7 proteini bulunmuştur. WNT yolunda β -katenin, fokal adezyon yolunda ROCK2, TGF- β yolunda ise SMAD4 ve PKA proteinleri saptanmıştır.

Kontrol grubunda tespit edilen proteinler, ATRA, kurkumin ve kombinasyon gruplarında gözlemlenen proteinlerle karşılaştırıldığında bazı örtüşen ve özgün proteinler olduğu görülmektedir. ATRA grubunda bulunan MKK3/6, MEK1/2, ERK1/2, AKT, NFκB, Casp3/7, SMAD4 ve CTBP1 proteinlerinden MEK1/2, ERK1/2, NFκB, Casp3/7 ve SMAD4 proteinleri kontrol grubunda da ortak olarak saptanmıştır. Kurkumin grubunda bulunan AKT, MEK1/2, ERK1/2, Casp3/7, SMAD4 ve β-catenin proteinlerinden MEK1/2, ERK1/2, Casp3/7, SMAD4 ve β-catenin kontrol grubunda da yer almaktadır. Kombinasyon grubunda saptanan MKK4/7, MKK3/6, MEK1/2, ERK1/2, AKT, GSK3, NFκB, FADD, Casp8, Casp10, Bid, Cyt-c, Casp3/7, β-catenin ve RhoA proteinlerinden MEK1/2, ERK1/2, NFκB, Casp3/7 ve β-catenin kontrol grubu ile ortakdır. Diğer yandan, MKK7, RAS, RAF, P38, ROCK2 ve PKA gibi proteinler yalnızca kontrol grubuna özgü olarak saptanmıştır.

Apoptoz yolları açısından bakıldığında, Casp3/7 aktivitesine rağmen upstream apoptoz sinyal elemanlarının (ör. Bid, Cyt-c, Casp9) aktif olmaması, bu yolun tam olarak işlevsel olmadığını, yani apoptotik sinyalleme baskılandığını ortaya koymaktadır.

Genel olarak, tedavi uygulanmayan kontrol grubunda proliferasyon, hücre göçü, inflamasyon ve anti-apoptotik yolların aktif olduğu agresif bir tümöral profil gözlemlenmiştir. Kurkumin uygulaması bu durumu kısmen tersine çevirerek pro-apoptotik sinyalleri artırmış, proliferatif ve migratif aktiviteyi baskılamıştır. Ancak en belirgin antitümöral etki, Kurkumin ve ATRA'nın birlikte uygulandığı kombinasyon grubunda ortaya çıkmıştır. Kombinasyon tedavisi, çok sayıda onkogenik sinyal yolunu eşzamanlı olarak inhibe etmiş, apoptoz mekanizmalarını kuvvetli şekilde aktive ederek glioblastoma hücrelerinin malign özelliklerini baskılamıştır.

Bu bulgular, kombinasyon tedavisinin glioblastomada daha etkili bir moleküler yanıt oluşturabileceğini göstermektedir.

5 TARTIŞMA

5.1 ATRA ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87-MG Canlılığı Üzerindeki Sinerjistik Etkisi

Mevcut glioblastoma tedavileri, hastaların çoğunda tümör nüksüyle sonuçlandığından klinik anlamda sınırlı fayda sağlar. Etkinliği kısıtlayan faktörler arasında beyin özgü bağışıklık profilleri, GBM hücre heterojenitesi, immünsüpresif tümör mikroçevresi, çeşitli nörolojik ve sistemik yan etkiler ile tümörün kaçış mekanizmaları ve konvansiyonel terapilere karşı direnci yer alır (64). Hedefe yönelik tedaviler son çalışmalarla birlikte sınırlı düzeyde fayda sağlarken, kombinasyonel tedavi yaklaşımları umut vaat etmektedir. Bu noktada, tümör heterojenliğini ve ilaç etki mekanizmalarını anlamak, tedavi sonuçlarını iyileştirmek için kritik öneme sahiptir (65).

Bu doğrultuda tez çalışmasında, All-trans retinoik asit ve kurkumin kombinasyon tedavisinin U87 GBM hücrelerinin canlılığına olan etkisi ve etki mekanizmaları araştırıldı. Elde edilen bulgular, tek başına ATRA veya kurkumin uygulamalarının ilk 24 saatte hafif proliferatif etki gösterebilmesine karşın, her iki ajanın sinerjik etkilerle hücre çoğalmasını baskıladığını göstermektedir. Özellikle 75 μ M ATRA + 20 μ M kurkumin kombinasyonu, 72 saat sonunda %39,1'e kadar düşen normalize hücre indeksiyle en güçlü anti-proliferatif etkiyi göstermektedir (Şekil 7). CompuSyn analizi, bu kombinasyonun CI < 0,1 değeriyle "sinerjik" olduğunu doğrulamaktadır (Tablo 4).

24.saatte gözlenen hafif proliferatif etki ise dikkat çekicidir. Ancak bu etkiler, kombinasyon tedavisi ile hızla baskılanmış ve sitotoksik yanıt ön plana geçmektedir. Düşük doz ATRA'nın erken dönemde hücre farklılaşmasını tetiklemesi ve bu yolla geçici proliferatif sinyaller üretebilir (66) ATRA'nın potansiyel anti-kanser etkinliği önemli ölçüde moleküler ve hücresel bağlama dayanmaktadır. Literatürde, ATRA'nın anti-kanser etkisinin hücre tipine ve dahil olan moleküler yollara göre değişiklik gösterdiği bildirilmektedir. Örneğin, ATRA, retinoik asit reseptörlerini aktive ederek

ve apoptozu başlatarak prostat ve over kanseri hücrelerinin büyümesini durduğu gözlemlenmiştir (67,68). Buna karşın, ATRA paradoksal olarak mesane kanseri (T24 hücre hattı) hücrelerinin proliferasyonunu, FABP5 ve PPAR β/δ gibi yolların disregülasyonu aracılığı ile artırmıştır (69). A549 akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada, ATRA'nın, transkripsiyondan bağımsız bir mekanizma ile ERK sinyal yolunu aktive ederek hücre çoğalmasını, yaşamını sürdürmesini ve göçünü artırdığı gösterilmiştir (70). Bu da, özellikle ERK yolunun devreye girdiği bağlamlarda ATRA'nın tümör destekleyici etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu durum, ATRA'nın çoğalmayı teşvik edici ya da baskılayıcı etkilerinin bağlama ve hücrel koşullara bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

U87 GBM hücrelerinde yapılan çalışmalar ise ATRA'nın doza ve zamana bağlı bir şekilde canlılığı azalttığını göstermesinin yanı sıra yapılan bir çalışmada anti-kanser etkinin doza bağlı olarak 0-10 gün aralığında devam ettiği bildirilmiştir (71,72)

Kurkuminin kanser hücrelerindeki anti-proliferatif etkisi de kanserin türüne, tedavi koşullarına, uygulama şekli ve uygulanan konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Düşük dozlardaki kurkumin kanser hücrelerini doğrudan öldürmede sınırlı sitotoksik etkiler gösterebilmektedir. Örneğin, kurkuminin redoks dengesini modifiye ederek bazı hücre savunma mekanizmalarını geçici olarak uyarabileceği düşünülmektedir (51). Kurkuminin glioblastoma hücrelerinde zamana bağımlı sitotoksik etkileri, literatürde farklı zaman noktalarında değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, kurkuminin tekli ve kombinasyonel uygulamalarda özellikle 72. saatte belirgin apoptotik ve anti-proliferatif etkiler gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, zamana bağlı hücrel stres birikimi ve kurkuminin gecikmeli etki mekanizmaları ile ilişkilendirilebilir. Nitekim, bir çalışmada yalnızca 72. saate odaklanılarak U87 hücrelerinde kurkumin tedavisinin etkileri değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar, bizim bulgularımızla tutarlılık göstermiştir (73).

Bu benzerlik, 72. saatin kurkuminin glioblastoma hücrelerinde maksimum terapötik etkiyi ortaya koyduğu kritik bir zaman noktası olabileceğini düşündürmektedir.

İlaçların glioblastoma hücre hatlarında (U87, U251 vb.) etkileriyle ilgili literatürde oldukça değişken sonuçlar rapor edilmiştir (74). Bu farklılıklar; hücre hattına özgü genetik profiller, kullanılan doz, hücre pasaj sayısı, ilaç çözünürlüğü, stabilitesi, çözücü farkları ve analiz yöntemleri gibi çok sayıda faktörden kaynaklanabilir.

Birçok çalışmada MTT veya CCK-8 gibi son nokta (endpoint) ölçümlerine dayalı hücre canlılığı testleri kullanılmışken, bu çalışmada xCELLigence RTCA kullanılarak hücre proliferasyonu gerçek zamanlı ve sürekli şekilde izlenmiştir. Bu yöntem, hücre morfolojisi, adezyonu ve büyümesini dinamik olarak değerlendirmeyi mümkün kılarak gerçek zamanlı gözlemlenebilir sonuçlar sağlamaktadır. Bu metodolojik farklılıklar da ilaçların etkilerinde gözlenen varyasyonlara katkıda bulunabilir. Ayrıca, tüm ilaçlar DMSO içinde çözülmüş ve son çözücü konsantrasyonu %0.2'de sabit tutulmuştur. Ancak, çözünürlük, saflık ve lotlar arası değişkenlik gibi teknik faktörler de deneysel çıktılarda farklılık yaratabilmektedir.

5.2 ATRA ve Kurkumin Kombinasyonel Tedavisinin U87-MG Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisi

Annexin V-FITC/PI analizleri, ATRA ve kurkuminin tek başına uygulandığı gruplarda erken apoptoz oranlarının oldukça yüksek (%53–56) olması, her iki ajanın da ayrı uygulamalarda benzer bir yolla programlı hücre ölümünü etkin şekilde başlatabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, geç apoptoz oranlarının düşük kalması, hücrelerin programlı ölüm sürecine girdiğini ancak henüz tam yıkıma uğramadığını göstermektedir. Kombinasyon grubunda ise geç apoptozun belirgin artışı, ajanların tek başına apoptozu başlattığını ancak hücre ölümünün tamamlanması için sinerjik uyarılara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bu, programlanmış hücre ölümünün kontrollü ve etkili bir şekilde gerçekleştiğine işaret etmektedir (75). Aynı

zamanda, nekrotik hücre oranlarının düşük kalması, ölüm mekanizmasının kontrollü ve programlanmış olduğunu vurgulamaktadır (51). Literatürde kurkuminin kaspaz-3 aktivasyonu, Bax/Bcl-2 oranının artırılması ve mitokondriyal apoptotik yolların aktive edilmesi yoluyla apoptoz indüklediği bildirilmiştir (76).

Benzer şekilde, ATRA'nın FAS sinyal yolağını aktive ederek apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (77). İlaçların kombinasyon halinde uygulanması, apoptotik sürecin erken fazdan geç faza ilerlemesini sağlamış olabilir.

5.3 Yolak Analizlerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, U87-MG glioblastoma hücrelerinde Kurkumin, ATRA ve bu iki ajan kombinasyonunun kanserle ilişkili majör sinyal yolları üzerindeki etkileri proteom düzeyinde karşılaştırmalı olarak literatür katkısı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, ATRA ve kurkumin tedavisinin glioblastomanın moleküler fenotipi üzerinde farklı proteinler aracılığıyla etkili olabileceğini ve özellikle kombinasyon tedavisinin çoklu yolları hedefleyerek daha geniş kapsamlı bir tümör baskılayıcı etki oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

- **AKT (Protein Kinaz B) Proteini**

Gruplar arasındaki yolak farklılıkları, eksprese edilen proteinler karşılaştırıldığında bazı önemli farklılıklar saptanmıştır. Bu farklılıklardan ilki PI3K-Akt-mTOR sinyal mekanizmasının merkezi bileşeni olan Akt proteininin ATRA, kurkumin ve kombinasyon gruplarında eksprese edilirken kontrol grubunda eksprese edilmediğidir. AKT proteini, aynı zamanda protein kinaz B olarak da bilinen, hücredeki çeşitli süreçlerde kritik rol oynayan bir serin/treonin kinazdır. Bu süreçler arasında hücre hayatta kalımı, proliferasyon, metabolizma ve migrasyon yer alır. Fonksiyonlarını, çok sayıda substratı fosforile etme yeteneği sayesinde yerine getirir; bu da farklı hücresel aktiviteleri etkiler. AKT, normal hücrelerde hayatta kalma mekanizmasını desteklemektedir (78). Ayrıca, hücre proliferasyonunda görev alır. Bu etkisini, protein sentezi ve hücre büyümesi için kritik olan mTOR/p70S6K yolunu modüle ederek gösterdiği bildirilmiştir (78). Fakat yapılan çalışmalarda normal

hücrelerde aktive olurken kanser hücrelerinde Akt'nin sıklıkla deregüle olur; bu durum, hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalmasına ve hayatta kalmasına yol açarak tümör oluşumuna (tümörijenesis) katkıda bulunur(79,80). İlaç uygulanan U87-MG hücrelerinde Akt'nin tekrardan aktive olması, ilgili downstream yolları etkileyerek hücreleri apoptoza sürüklemiş ve hücre proliferasyonunu azaltmış olabilir.

- **C-terminal bağlayıcı protein 1 (CTBP1)**

ATRA uygulanan hücrelerde eksprese edilen C-terminal bağlayıcı protein 1 (CTBP1), çeşitli kanser türlerinde tümör progresyonuna katkıda bulunan önemli bir proteindir. Bu özelliğiyle proliferasyon, migrasyon, invazyon ve ilaç direnci gibi çeşitli hücresel süreçleri etkilemektedir. Prostat kanserinde, tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılayarak hücre proliferasyonu ve invazyonu artırdığı, ayrıca kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (81,82). Endometriyal kanserde, hücre çoğalması, göçü, invazyonu ve kök hücre benzeri özellikleri destekleyerek tümör agresifliğini artırdığı bildirilmiştir (83). Akciğer adenokarsinomunda, SOX2 ile etkileşerek hücre büyümesini ve invazyonu teşvik ettiği gözlemlenmiş; bu durum hastalarda kötü sağkalım sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir (84). Ayrıca mide kanserinde, CTBP1, DNA tamir proteini olan RAD51'in ekspresyonunu artırarak sisplatin direncini güçlendirmekte ve kemoterapi baskısı altında kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (85). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, ATRA uygulamasının CTBP1 proteinini eksprese ettiğini ve ilaç direnci gibi kanser progresyonuna katkı sağlayan süreçleri tetikleyebileceğini göstermektedir. Kurkumin ile kombinasyonel uygulaması bu proteini baskılayarak ATRA'ya oluşan direnci azaltmış olabilir.

- **SMAD4 Proteini**

Gruplar arası farklılık gösteren bir diğer protein SMAD4, bütün gruplarda eksprese edilirken, kombinasyon grubunda ekspres edilmediği saptandı. SMAD4, kanserde çok yönlü roller üstlenen ve esas olarak transforming growth factor- β (TGF- β) sinyal yolunda yer alan merkezi bir proteindir. SMAD4 proteini, Hücre büyümesi,

farklılaşma, apoptoz ve metastaz gibi çeşitli hücrel süreçlerde rol oynamaktadır. Meme kanserinde ise SMAD4, TGF- β tarafından tetiklenen epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) rol aldığı bildirilmektedir. Bu durum, SMAD4'ün kanser hücrelerinin invazyonu ve metastazında önemli olabileceğini göstermektedir(86). Ayrıca SMAD4 işlevinin kaybı, tümör mikroçevresinde, kanser yönelik immün yanıtı artırabilir. Örneğin pankreas kanserinde, SMAD4 kaybı DNA hasarını artırmakta bağışıklık yanıtlarını aktive ederek tümör mikroçevresini değiştirdiği gözlemlenmiştir (87). Elde edilen bulgulara görülen SMAD4'ün kombinasyon grubunda eksprese edilmemesi, U87 hücrelerinin kombinasyonel tedaviye karşı yanıtında etkin rol alabileceğini düşündürmektedir.

- **Protein Kinaz A (PKA)**

ATRA, kurkumin ve kontrol grubunda eksprese edilirken kombinasyon grubunda olmayan protein kinaz A (PKA), kanserde çok yönlü bir rol oynayarak tümör oluşumuna ve kanser ilerlemesine katkıda bulunan çeşitli hücrel süreçleri etkiler. cAMP'ye bağlı bir serin-treonin kinazı olarak PKA, hücre büyümesi, farklılaşma, metabolizma ve apoptozu düzenleyen sinyal iletim yollarında görev alır. PKA'nın aktivitesi, çeşitli kanserlerin başlatılması ve ilerlemesiyle ilişkilendirilmiş olup, bu nedenle kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak öne çıkar. Yapılan çalışmalarda, cAMP-PKA sinyalizasyonunun, çeşitli insan tümörlerinde, kanser hücrelerinin büyümesi, göçü, invazyonu ve metabolizmasını etkilediği bildirilmiştir (88)cAMP-PKA eksen, metabolik stres altında kanser hücrelerinin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir; metabolik adaptasyondaki rolü ve terapötik hedef olarak potansiyelini ortaya koyduğu belirtilmiştir (89). Tümör oluşumu ve ilerlemesine katılımı göz önüne alındığında, PKA yeni bir moleküler terapi hedefi olarak önerilmektedir (90). Bu çalışmada, kombinasyon tedavisinin PKA proteininin baskılanmasına yönelik değişimi, anti-kanser etkisini bu protein aracılığıyla gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir.

- **Son of Sevenless (SOS) Proteinleri**

Son of Sevenless (SOS) proteinleri, özellikle SOS1, RAS sinyal yolunu aktive etmeleri sayesinde kanserde kritik bir rol oynar. Bu yol, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalmasını düzenlemede merkezi bir öneme sahiptir. SOS proteinlerinin kanserdeki rolleri çok yönlüdür; sinyal iletimindeki işlevleri, potansiyel terapötik hedef olmaları ve onkojenik mutasyonlarla etkileşimleri bu çok yönlülüğün temelini oluşturur. SOS1 proteinleri, GDP'nin GTP ile değişimini teşvik ederek RAS'ı aktive ederler ve bu da hücre proliferasyonu ve hayatta kalması için kritik olan MAPK/ERK gibi aşağı akım yollarının aktivasyonuna yol açar (91). Mesane kanserinde yapılan bir çalışmada, SOS proteinlerinin artmış ekspresyonu gözlemlenmiştir; bu da artan RAS aktivasyonu yoluyla tümör oluşumuna katkı sağladıklarını düşündürmektedir (92). Proteomik analizlerde kurkumin grubunda SOS1 proteini tespit edilirken, ATRA+kurkumin kombinasyonunda SOS1 tespit edilememiştir. Bu, kombinasyon tedavisinin RAS sinyalini tek başına kurkumin tedavisinden daha etkin biçimde baskıladığını göstermektedir.

- **ROCK2 Proteini (Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2)**

ROCK2, hücre iskeletinin düzenlenmesi ve aktin filamentlerinin reorganizasyonu üzerinden kanser hücrelerinin göç ve invazyonunu destekler; bu süreç özellikle EMT aşamasında belirginleşir (93,94). Mide kanserinde ROCK2 düzeyinin artması, tümör derecesi ve metastazla pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (95). Ayrıca pankreas ve rahim ağzı kanserlerinde kemoterapi ve radyoterapi direncine katkıda bulunarak tedavi başarısını azalttığı gösterilmiştir (96,97). Proteomik analizlerde ROCK2 proteini, yalnızca kontrol grubunda tespit edilirken, ATRA, kurkumin ve kombinasyonu uygulanan gruplarda yoktur; bu da tedavinin ROCK2 ekspresyonunu etkin biçimde bastırdığını ve sonuç olarak hücre göçü, invazyonu ile tedavi direncine ait mekanizmaların zayıflatıldığını düşündürmektedir.

- **p38 (p38 mitogen-aktivasyonlu protein kinaz) Proteini**

p38 MAPK, hem tümör baskılayıcı hem de destekleyici işlevler gösterebilen çift yönlü (dual) bir kinase ailesi üyesidir. Bazı çalışmalarda p38 'in, DNA hasar yanıtını koruyarak hücre döngüsünü durduğu ve onkogenik dönüşümü engelleyici etki gösterdiği bildirilirken (98), bazı araştırmalarda ise tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu destekleyerek tümör progresyonuna katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (99). Proteomik verilerde p38 yalnızca kontrol grubunda saptanmış; tedavi gruplarında bu protein saptanamamıştır. Bu bulgu, p38'in kemoterapi direncine aracı olan sinyal yollarını zayıflatarak tedavi etkinliğini artırabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, p38'in tedavi gruplarında bulunmaması hem tümör baskılayıcı hem de destekleyici rollerinin dengelendiği ortamda kemoterapi direncini azaltması yönünde önemli katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6 SONUÇ

Bu tez çalışmasında, glioblastoma multiforme (GBM) hücreleri üzerinde All-Trans Retinoik Asit (ATRA) ve kurkuminin kombine uygulanmasının in vitro anti-kanser etkileri detaylı şekilde araştırılmıştır. xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi, Annexin V/PI akış sitometrisi ve LC-MS/MS tabanlı proteomik analizler ile elde edilen bulgular bir araya getirilerek ATRA ve kurkumin kombinasyonunun, GBM hücre canlılığı üzerinde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir azalma sağladığı, kombinasyon tedavisinin güçlü sinerjistik etki gerçekleştirdiği ve hücre ölüm mekanizmalarını özellikle geç apoptoz yönünde aktive ettiği ortaya konmuştur. Proteomik analiz sonuçları, her iki ajanın farklı fakat birbirini tamamlayan moleküler mekanizmalara ait proteinleri hedef aldığını göstermiştir. Özellikle ATRA uygulamasında CTBP1 gibi tümör progresyonuna katkı sağlayan proteinlerin saptanması, kurkuminin ise bu proteomik yanıtları dengeleyerek direnç mekanizmalarını baskılayabileceği gösterilmiştir. Kombinasyon grubunda ise ROCK2 ve SMAD4 gibi maligniteyle ilişkilendirilmiş proteinlerin ekspresyonunun kaybolduğu gözlenmiştir. Bu durum, kombinasyon tedavisinin glioblastoma hücrelerinde hem proliferasyonu hem de metastatik potansiyeli baskılayan kapsamlı bir biyolojik yanıt oluşturabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, ATRA ve kurkumin kombinasyonunun, tek ajanlı tedavilere kıyasla daha güçlü anti-tümöral etkiler oluşturabileceği ve glioblastoma tedavisi için potansiyel bir adjuvan strateji olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışması, alternatif ve hedefe yönelik kombinasyon terapilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacak nitelikte olup ileri düzey in-vivo ve klinik çalışmalara temel oluşturabilir.

7 KAYNAKLAR

1. Rodriguez FJ. The WHO classification of tumors of the central nervous system-finally here, and welcome! Vol. 32, Brain Pathology. John Wiley and Sons Inc; 2022.
2. Park YW, Vollmuth P, Foltyn-Dumitru M, Sahm F, Ahn SS, Chang JH, et al. The 2021 WHO Classification for Gliomas and Implications on Imaging Diagnosis: Part 1—Key Points of the Fifth Edition and Summary of Imaging Findings on Adult-Type Diffuse Gliomas. Vol. 58, Journal of Magnetic Resonance Imaging. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 677–89.
3. Lu J, Huo W, Ma Y, Wang X, Yu J. Suppressive immune microenvironment and CART therapy for glioblastoma: Future prospects and challenges. Vol. 600, Cancer Letters. Elsevier Ireland Ltd; 2024.
4. Brandes AA, Franceschi E, Ermani M, Tosoni A, Albani F, Depenni R, et al. Pattern of care and effectiveness of treatment for glioblastoma patients in the real world: Results from a prospective population-based registry. Could survival differ in a high-volume center? Neurooncol Pract. 2014 Dec 1;1(4):166–71.
5. Rios SA, Oyervides S, Uribe D, Reyes AM, Fanniel V, Vazquez J, et al. Emerging Therapies for Glioblastoma. Vol. 16, Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
6. Wu W, Klockow JL, Zhang M, Lafortune F, Chang E, Jin L, et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. Vol. 171, Pharmacological Research. Academic Press; 2021.
7. Davis ME. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. Clin J Oncol Nurs. 2016 Oct 1;20(5):1–8.
8. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell. 2013 Oct 10;155(2):462.
9. Wang S, Gu S, Chen J, Yuan Z, Liang P, Cui H. Mechanism of Notch Signaling Pathway in Malignant Progression of Glioblastoma and Targeted Therapy. Vol. 14, Biomolecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
10. Epifanova E, Babaev A, Newman AG, Tarabykin V. Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development. Vol. 1705, Brain Research. Elsevier B.V.; 2019. p. 24–31.
11. Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, Munoz L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: Implications for therapy. Vol. 168, British Journal of Pharmacology. 2013. p. 591–606.
12. Li X, Gou W, Zhang X. Neuroinflammation in Glioblastoma: Progress and Perspectives. Vol. 14, Brain Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
13. Haque A, Das A, Hajiaghamohseni LM, Younger A, Banik NL, Ray SK. Induction of apoptosis and immune response by all-trans retinoic acid plus interferon-gamma in human

- malignant glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007 May;56(5):615–25.
14. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma [Internet]. Available from: www.nejm.org
 15. Singh N, Miner A, Hennis L, Mittal S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. Vol. 4, *Cancer Drug Resistance*. OAE Publishing Inc.; 2021. p. 17–43.
 16. Ji H, Lu Z. The role of Protein kinase CK2 in Glioblastoma development. *Clinical Cancer Research*. 2013 Dec 1;19(23):6335–7.
 17. Cui J, Gong M, He Y, Li Q, He T, Bi Y. All-trans retinoic acid inhibits proliferation, migration, invasion and induces differentiation of hepa1-6 cells through reversing EMT in vitro. *Int J Oncol*. 2016 Jan 1;48(1):349–57.
 18. Zhu -----
----- G, Zhu G. Vitamin A and its Derivatives-Retinoic Acid and Retinoid Pharmacology. [cited 2025 Jun 3]; Available from: www.biomedgrid.com
 19. Repa JJ, Hansont KK, Clagett-Dame M. All-trans-retinol is a ligand for the retinoic acid receptors (vitamin A/all-trans-retinoic acid/ligand binding/neuroblastoma/fusion protein). Vol. 90, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993.
 20. Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: An overview of the retinoic acid signaling pathway. Vol. 67, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2010. p. 1423–45.
 21. Girardi CS, Rostirolla DC, Lini FJM, Brum PO, Delgado J, Ribeiro CT, et al. Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019 Mar 1;1866(3):317–28.
 22. Isla-Magrané H, Zufiaurre-Seijo M, García-Arumí J, Duarri A. All-trans retinoic acid modulates pigmentation, neuroretinal maturation, and corneal transparency in human multiocular organoids. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Dec 1;13(1).
 23. Osanai M, Nishikiori N, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor α agonists in colitis. *Mol Pharmacol*. 2007;71(1):250–8.
 24. Hafeez H, Khatib T, McCaffery P, Przyborski S, Redfern C, Whiting A. Neurogenesis in Response to Synthetic Retinoids at Different Temporal Scales. *Mol Neurobiol*. 2018 Mar 1;55(3):1942–50.
 25. Yu SY, Liu Z, Chung S, Kim YC. Obesity-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Suppresses In Vivo and In Vitro Retinoic Acid Synthesis and Fatty Acid Oxidation in Adipose Tissue [Internet]. Available from: https://academic.oup.com/cdn/article/5/Supplement_2/955/6293604

26. Farjo KM, Moiseyev G, Nikolaeva O, Sandell LL, Trainor PA, Ma J xing. RDH10 is the primary enzyme responsible for the first step of embryonic Vitamin A metabolism and retinoic acid synthesis. *Dev Biol.* 2011;357(2):347–55.
27. Stoecker K, Sass S, Theis FJ, Hauner H, Pfaffl MW. Inhibition of fat cell differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes by all-trans retinoic acid: Integrative analysis of transcriptomic and phenotypic data. *Biomol Detect Quantif.* 2017 Mar 1;11:31–44.
28. Gliniak CM, Mark Brown J, Noy N. The retinol-binding protein receptor STRA6 regulates diurnal insulin responses. *Journal of Biological Chemistry.* 2017 Sep 8;292(36):15080–93.
29. Liu RZ, Li S, Garcia E, Glubrecht DD, Yin Poon H, Easaw JC, et al. Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma. *Glia.* 2016 Jun 1;64(6):963–76.
30. Liang C, Yang L, Guo S. All-trans retinoic acid inhibits migration, invasion and proliferation, and promotes apoptosis in glioma cells in vitro. *Oncol Lett.* 2015;9(6):2833–8.
31. Reinhardt A, Liu H, Ma Y, Zhou Y, Zang C, Habbel JP, et al. Tumor cell-selective synergism of TRAIL- and ATRA-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2018 May 1;38(5):2669–82.
32. Greve G, Schiffmann I, Lübbert M. Epigenetic priming of non-small cell lung cancer cell lines to the antiproliferative and differentiating effects of all-trans retinoic acid. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015 May 26;141(12):2171–80.
33. Wong JJW, Lorenz S, Selbo PK. All-trans retinoic acid enhances the anti-tumour effects of fimaaporfin-based photodynamic therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2022 Nov 1;155.
34. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. Vol. 19, *Molecules.* MDPI AG; 2014. p. 20091–112.
35. Sharifi-Rad J, Rayess Y El, Rizk AA, Sadaka C, Zgheib R, Zam W, et al. Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology.* Frontiers Media S.A.; 2020.
36. Jitoe-Masuda A, Fujimoto A, Masuda T. Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net Curcumin: From Chemistry to Chemistry-Based Functions. Vol. 19, *Current Pharmaceutical Design.* 2013.
37. Bertoncini-Silva C, Vlad A, Ricciarelli R, Giacomo Fassini P, Suen VMM, Zingg JM. Enhancing the Bioavailability and Bioactivity of Curcumin for Disease Prevention and Treatment. Vol. 13, *Antioxidants.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
38. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. Vol. 15, *AAPS Journal.* 2013. p. 195–218.
39. Aggarwal B. Curcumin-Biological and medicinal properties [Internet]. 2006. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/235993633>

40. Antioxidant activity of curcumin and related compounds*.
41. Veselá ina, Masar M, Babula P, Dytrych P, Martásek P, Jakubek M. Curcumin: A Potential Weapon in the Prevention and Treatment of Head and Neck Cancer. Cite This: ACS Pharmacol Transl Sci [Internet]. 2024 [cited 2025 Jun 3];2024:3394–418. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsptsci.4c00518>
42. Buhrmann C, Kraehe P, Lueders C, Shayan P, Goel A, Shakibaei M, et al. Curcumin Suppresses Crosstalk between Colon Cancer Stem Cells and Stromal Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Potential Role of EMT. 2014 [cited 2025 Jun 3]; Available from: www.plosone.org
43. HAO J, DAI X, GAO J, LI Y, HOU Z, CHANG Z, et al. Curcumin suppresses colorectal tumorigenesis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway by downregulating Axin2. *Oncol Lett*. 2021 Mar 1;21(3).
44. Wolnicka-Glubisz A, Wisniewska-Becker A. Dual Action of Curcumin as an Anti- and Pro-Oxidant from a Biophysical Perspective. Vol. 12, Antioxidants. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
45. Shahcheraghi SH, Salemi F, Peirovi N, Ayatollahi J, Alam W, Khan H, et al. Nrf2 regulation by curcumin: Molecular aspects for therapeutic prospects. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
46. Mary CPV, Vijayakumar S, Shankar R. Metal chelating ability and antioxidant properties of Curcumin-metal complexes – A DFT approach. *J Mol Graph Model* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2025 Jun 3];79:1–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1093326317302723>
47. F Hayashi MA, Noelia Cariddi L, Seron K, Steinmann JoergSteinmann J, Steinmann E, Praditya D, et al. Anti-infective Properties of the Golden Spice Curcumin. 2019 [cited 2025 Jun 3]; Available from: www.frontiersin.org
48. Zhang J, Liu Y, Wang X, Wang Z, Xing E, Li J, et al. Curcumin inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by blocking PTPN1 and PTPN11 expression. *Oncol Lett*. 2023 Jul 1;26(1).
49. Hou C, Hu Y, Zhang T. Research on curcumin mediating immunotherapy of colorectal cancer by regulating cancer associated fibroblasts. *Anticancer Drugs* [Internet]. 2024 [cited 2025 Jun 3];36(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39264802/>
50. Masood A Bin, Kayani MA, Batoo S. Targetting Interleukins Involved in Glioblastoma-A New Pharmacological Approach. 2020 [cited 2025 Jun 3];01(02):82–8. Available from: www.jlbsr.org
51. Zoi V, Galani V, Vartholomatos E, Zacharopoulou N, Tsoumeleka E, Gkizas G, et al. Curcumin and radiotherapy exert synergistic anti-glioma effect in vitro. *Biomedicines*. 2021 Nov 1;9(11).
52. Du WZ, Feng Y, Wang XF, Piao XY, Cui YQ, Chen LC, et al. Curcumin suppresses malignant glioma cells growth and induces apoptosis by inhibition of SHH/GLI1 signaling

- pathway in vitro and vivo. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 2013 Dec [cited 2025 Jun 3];19(12):926–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24165291/>
53. Serafino A, Krasnowska EK, Romanò S, De Gregorio A, Colone M, Dupuis ML, et al. The Synergistic Combination of Curcumin and Polydatin Improves Temozolomide Efficacy on Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2025 Jun 3];25(19). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39408901/>
 54. Bertoncini-Silva C, Vlad A, Ricciarelli R, Giacomo Fassini P, Suen VMM, Zingg JM. Enhancing the Bioavailability and Bioactivity of Curcumin for Disease Prevention and Treatment. Vol. 13, Antioxidants. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
 55. Dash JR, Pattnaik G, Samal HB, Pradhan G, Baral CPK, Behera B, et al. Novel Approaches for the Enhancement of Bioavailability of Drugs: An Updated Review. *Curr Drug Discov Technol* [Internet]. 2024 Aug 12 [cited 2025 Jun 3];21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39129281/>
 56. Zeidan BA, Townsend PA, Garbis SD, Copson E, Cutress RI. Clinical proteomics and breast cancer. *Surgeon* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2025 Jun 3];13(5):271–8. Available from: <https://scispace.com/papers/clinical-proteomics-and-breast-cancer-2ncma6vdkc>
 57. Wang F, Qin H, Xiao H, Hummon AB, Lindhorst PH. Proteomics of Colorectal Cancer: Tumors, Organoids, and Cell Cultures-A Minireview. 2020 [cited 2025 Jun 3]; Available from: www.frontiersin.org
 58. Mazur MG, Pyatchanina T V. The use of proteomic technologies in breast cancer research. *Exp Oncol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2025 Jun 3];38(3):146–57. Available from: <https://scispace.com/papers/the-use-of-proteomic-technologies-in-breast-cancer-research-5eykkxfsia>
 59. Babu N, Bhat MY, John AE, Chatterjee A. The role of proteomics in the multiplexed analysis of gene alterations in human cancer. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2025 Jun 3];18(9):737–56. Available from: <https://scispace.com/papers/the-role-of-proteomics-in-the-multiplexed-analysis-of-gene-4aedsqle0q>
 60. Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Mortazavian A, Vafaei R, Rezaei-Tavirani M, Zali H, et al. Application of Proteomics in Cancer Study. 2013 [cited 2025 Jun 3];18. Available from: <http://ivyunion.org/index.php/ajcs/Vo2>.
 61. Werner T, Fahrner M, Schilling O. Using proteomics for stratification and risk prediction in patients with solid tumors. *Pathologie* [Internet]. 2023 Nov 24 [cited 2025 Jun 3];44:176–82. Available from: <https://scispace.com/papers/using-proteomics-for-stratification-and-risk-prediction-in-3oy13chwcp>
 62. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998 Jan 1;31(1):1–9.

63. Yang Z, Feng J, Jing J, Huang Y, Ye WW, Lei L, et al. Resistance to anti-HER2 therapy associated with the TSC2 nonsynonymous variant c.4349 C > G (p.Pro1450Arg) is reversed by CDK4/6 inhibitor in HER2-positive breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2023 Dec 1;9(1).
64. Liu Y, Zhou F, Ali H, Lathia JD, Chen P. Immunotherapy for glioblastoma: current state, challenges, and future perspectives. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2024 Oct 15 [cited 2025 Jun 3];21(12):1354–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-024-01226-x>
65. Salgaller M, Liao L. Current Status of Clinical Trials for Glioblastoma. *Rev Recent Clin Trials* [Internet]. 2008 Apr 18 [cited 2025 Jun 3];1(3):265–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18473979/>
66. Amani M, Mazani M. Cytotoxic effects of all-trans-retinoic acid with cisplatin on esophageal cancer cell line (KYSE-30) [Internet]. 2014. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/269873884>
67. The Effects of All- Trans Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation in Ovarian Cancer Cell Line COC1. [cited 2025 Jun 3]; Available from: <https://scispace.com/papers/the-effects-of-all-trans-retinoic-acid-on-proliferation-and-t1a0zvln2uut>
68. Liu Z, Ren G, Shangguan C, Guo L, Dong Z. ATRA Inhibits the Proliferation of DU145 Prostate Cancer Cells through Reducing the Methylation Level of HOXB13 Gene. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2025 Jun 3];7(7):40943. Available from: www.plosone.org
69. Costantini L, Molinari R, Farinon B, Lelli V, Timperio AM, Merendino N. Clinical Medicine Docosahexaenoic Acid Reverted the All-trans Retinoic Acid-Induced Cellular Proliferation of T24 Bladder Cancer Cell Line. [cited 2025 Jun 3]; Available from: www.mdpi.com/journal/jcm
70. Quintero Barceinas RS, García-Regalado A, Aréchaga-Ocampo E, Villegas-Sepúlveda N, González-De La Rosa CH. All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
71. inhibitory-effects-of-retinoic-acid-and-iif-on-growth-1cy36mghr2.
72. Liu H, Wang S, Lin JM, Lin Z, Li HF. Investigation of the lipidomic changes in differentiated glioblastoma cells after drug treatment using MALDI-MS. *Talanta*. 2021 Oct 1;233.
73. Mousavi SM, Hosseindoost S, Mahdian SMA, Vosooghi N, Rajabi A, Jafari A, et al. Exosomes released from U87 glioma cells treated with curcumin and/or temozolomide produce apoptosis in naive U87 cells. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2025 Jun 4];245. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37028110/>
74. Vičentić JM, Schwirtlich M, Kovačević-Grujičić N, Stevanović M, Drakulić D. All-trans retinoic acid influences viability, migration and adhesion of U251 glioblastoma cells. *Arch Biol Sci*. 2017;69(4):699–706.
75. Serafino A, Krasnowska EK, Romanò S, De Gregorio A, Colone M, Dupuis ML, et al. The Synergistic Combination of Curcumin and Polydatin Improves Temozolomide Efficacy on Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Sep 30 [cited 2025 Jun 4];25(19):10572–

10572. Available from: <https://scispace.com/papers/the-synergistic-combination-of-curcumin-and-polydatin-5lfxnc4bqbm>
76. Hossain MM, Banik NL, Ray SK. Synergistic anti-cancer mechanisms of curcumin and paclitaxel for growth inhibition of human brain tumor stem cells and LN18 and U138MG cells. *Neurochem Int* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2025 Jun 4];61(7):1102–13. Available from: <https://scispace.com/papers/synergistic-anti-cancer-mechanisms-of-curcumin-and-2aa19ssqq3>
 77. Salih HR, Kiener PA. Alterations in Fas (CD 95/Apo-1) and Fas ligand (CD178) expression in acute promyelocytic leukemia during treatment with ATRA. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2025 Jun 4];45(1):55–9. Available from: <https://scispace.com/papers/alterations-in-fas-cd-95-apo-1-and-fas-ligand-cd178-2lfzars8gj>
 78. Matheny RW, Adamo ML. Current Perspectives on Akt Akt-ivation and Akt-ions. *Exp Biol Med* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2025 Jun 4];234(11):1264–70. Available from: <https://scispace.com/papers/current-perspectives-on-akt-akt-ivation-and-akt-ions-2gp7hbus73>
 79. Paccosi E, Balzerano A, Proietti-De-Santis L. Interfering with the Ubiquitin-Mediated Regulation of Akt as a Strategy for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2025 Jun 4];24(3):2809–2809. Available from: <https://scispace.com/papers/interfering-with-the-ubiquitin-mediated-regulation-of-akt-as-2zrin615>
 80. Islam M, Jones S, Ellis I. Role of Akt/Protein Kinase B in Cancer Metastasis. *Advances in Cardiovascular Diseases* [Internet]. 2023 Nov 8 [cited 2025 Jun 4];11(11):3001–3001. Available from: <https://scispace.com/papers/role-of-akt-protein-kinase-b-in-cancer-metastasis-3vtgex3no2>
 81. Wu G, Dong Z, Dong Y, Chen Y, Zhu H, Ding D, et al. LncRNA CTBP1-AS inhibits TP63-mediated activation of S100A14 during prostate cancer progression. *Cancer Sci* [Internet]. 2024 Mar 13 [cited 2025 Jun 4];115(5):1492–504. Available from: <https://scispace.com/papers/lncrna-ctbp1-as-inhibits-tp63-mediated-activation-of-s100a14-20sf1vettj>
 82. Wang R, Asangani IA, Chakravarthi BVSK, Ateeq B, Lonigro RJ, Cao Q, et al. Role of transcriptional corepressor CtBP1 in prostate cancer progression. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2012 [cited 2025 Jun 4];14(10):905–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23097625/>
 83. Wang J, Huang Y, Tian C, Zheng Y, Kong W, Jiang P. Overexpression of CTBP1 Promotes Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Stemness in Endometrial Cancer. 2023 Dec 22 [cited 2025 Jun 4]; Available from: <https://scispace.com/papers/overexpression-of-ctbp1-promotes-cell-proliferation-4oosa0ekz7>
 84. Liu Y, Bian T, Feng J, Qian L, Li X, Zhang Q, et al. CtBP1 interacts with SOX2 to promote the growth, migration and invasion of lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2025 Jun 4];42(1):67–78. Available from: <https://scispace.com/papers/ctbp1-interacts-with-sox2-to-promote-the-growth-migration-3otti9rspn>

85. WU Y, ZHAO H. Ctbp1 strengthens the cisplatin resistance of gastric cancer cells by upregulating rad51 expression. *Oncol Lett* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2025 Jun 4];22(5):810. Available from: <https://scispace.com/papers/ctbp1-strengthens-the-cisplatin-resistance-of-gastric-cancer-sbafwirni3>
86. Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Löwik C, van der Pluijm G, et al. Data from The Tumor Suppressor Smad4 Is Required for Transforming Growth Factor β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition and Bone Metastasis of Breast Cancer Cells. 2023 Mar 30 [cited 2025 Jun 4]; Available from: <https://scispace.com/papers/data-from-the-tumor-suppressor-smad4-is-required-for-3cn8re7a>
87. Xiong W, He W, Wang T, He S, Xu F, Wang Z, et al. Smad4 Deficiency Promotes Pancreatic Cancer Immunogenicity by Activating the Cancer- Autonomous DNA- Sensing Signaling Axis. *Advanced Science* [Internet]. 2022 Jan 22 [cited 2025 Jun 4];9(7):2103029–2103029. Available from: <https://scispace.com/papers/smad4-deficiency-promotes-pancreatic-cancer-immunogenicity-mv65yeuu>
88. Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol* [Internet]. 2020 Nov 24 [cited 2025 Jun 4];9(1):1–13. Available from: <https://scispace.com/papers/complex-roles-of-camp-pka-creb-signaling-in-cancer-41u4fx47hq>
89. Palorini R, Votta G, Pirola Y, De Vitto H, De Palma S, Airolidi C, et al. Protein Kinase A Activation Promotes Cancer Cell Resistance to Glucose Starvation and Anoikis. *PLoS Genet* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2025 Jun 4];12(3):1–41. Available from: <https://scispace.com/papers/protein-kinase-a-activation-promotes-cancer-cell-resistance-3aaesxtuqu>
90. Sapio L, Maiolo F Di, Illiano M, Esposito A, Chiosi E, Spina A, et al. TARGETING PROTEIN KINASE A IN CANCER THERAPY: AN UPDATE. Vol. 13, *EXCLI Journal*. 2014.
91. Luo G, Wang B, Hou Q, Wu X. Development of Son of Sevenless Homologue 1 (SOS1) Modulators To Treat Cancers by Regulating RAS Signaling. *J Med Chem* [Internet]. 2023 Mar 28 [cited 2025 Jun 4];66(7):4324–41. Available from: <https://scispace.com/papers/development-of-son-of-sevenless-homologue-1-sos1-modulators-cfj2c7ra>
92. Watanabe T, Shinohara N, Moriya K, Sazawa A, Kobayashi Y, Ogiso Y, et al. Significance of the Grb2 and Son of Sevenless (Sos) Proteins in Human Bladder Cancer Cell Lines. *IUBMB Life* [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2025 Jun 4];49(4):317–20. Available from: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/15216540050033195>
93. Wei L, Surma M, Shi S, Lambert-Cheatham N, Shi J. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Jun 4];64(4):259–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26725045/>

94. Li M, Ke J, Wang Q, Qian H, Yang L, Zhang X, et al. Upregulation of ROCK2 in gastric cancer cell promotes tumor cell proliferation, metastasis and invasion. *Clin Exp Med* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2025 Jun 4];17(4):519–29. Available from: <https://scispace.com/papers/upregulation-of-rock2-in-gastric-cancer-cell-promotes-tumor-1yfalz79rs>
95. Ning Y, Zheng M, Zhang Y, Jiao Y, Wang J, Zhang S. RhoA-ROCK2 signaling possesses complex pathophysiological functions in cancer progression and shows promising therapeutic potential. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2024 Oct 14 [cited 2025 Jun 4];24(1). Available from: <https://scispace.com/papers/rhoa-rock2-signaling-possesses-complex-pathophysiological-3t092oqzt39q>
96. Zhou Y, Zhou Y, Wang K, Li T, Zhang M, Yang Y, et al. ROCK2 Confers Acquired Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer Cells by Upregulating Transcription Factor ZEB1. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Nov 27 [cited 2025 Jun 4];11(12):1881. Available from: <https://scispace.com/papers/rock2-confers-acquired-gemcitabine-resistance-in-pancreatic-4y79a45br1>
97. Pranatharthi A, Thomas P, Udayashankar AH, Bhavani C, Suresh SB, Krishna S, et al. RhoC regulates radioresistance via crosstalk of ROCK2 with the DNA repair machinery in cervical cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [Internet]. 2019 Sep 5 [cited 2025 Jun 4];38(1):392–392. Available from: <https://scispace.com/papers/rhoc-regulates-radioresistance-via-crosstalk-of-rock2-with-1xnjhybw3>
98. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Mar 11 [cited 2025 Jun 4];21(6):1913. Available from: <https://scispace.com/papers/the-p38-pathway-from-biology-to-cancer-therapy-4al2vx750r>
99. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (1979). 1987;235(4785):182–91.

8 ÖZGEÇMİŞ

