



## Anti-oxidative and apoptotic properties of curcumin as a mechanism of its antineoplastic potential in U251 cells

Fatih KAR <sup>\*1</sup>, Ceyhan HACIOĞLU <sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0001-8356-9806; 0000-0002-0993-6118

<sup>1</sup> Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı,  
Kütahya, Türkiye

<sup>2</sup> Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Turkey

### Abstract

Glioblastoma is the most aggressive of all types of brain cancer. Especially in cancer research, the effectiveness of new drug candidates is being investigated with *in vitro* studies. In this study, we aimed to investigate the antineoplastic effects of curcumin administration at different doses on U251 cells. We hypothesize that curcumin inhibits U251 cell viability by modulating prooxidant-antioxidant mechanisms, triggering ROS production, apoptosis activity, and inflammation. In this study, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , caspase 3/9 levels, total antioxidant (TAS) and total oxidant levels (TOS) were measured. Cell viability was determined by MTT and 10, 20 and 40  $\mu$ M curcumin doses were found to be effective doses. It was found that the administration of 40  $\mu$ M curcumin induced oxidative stress, inflammation and apoptosis compared to the control group and other dose groups ( $p < 0.05$ ). No statistical difference was found in the 10  $\mu$ M curcumin group. We found that 40  $\mu$ M curcumin had a dose-dependent effect on proliferation and migration of U251 glioblastoma cells and significantly inhibited their proliferation.

**Key words:** Glioblastome, Curcumin, U251 cells, anticancer drug

----- \* -----

## Kurkumin'in U251 hücrelerinde antineoplastik potansiyellerinin mekanizması olarak anti-oksidatif ve apoptotik özellikleri

### Özet

Glioblastoma beyin kanser türleri arasında en agresif olanıdır. Özellikle kanser araştırmalarında *in vitro* çalışmalar ile yeni ilaç adaylarının etkinliği araştırılmaktadır. Bu çalışma ile U251 hücreleri üzerinde farklı dozlarda kurkumin uygulamasının antineoplastik etkilerini araştırmayı amaçladık. Kurkumin'in, prooksidan-antioksidan mekanizmaları modüle ederek ROS üretimini, apoptoz aktivitesini ve inflamasyonu tetikleyerek U251 hücre canlılığını inhibe ettiğini varsayıyoruz. Bu çalışmada, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , kaspaz 3/9 seviyeleri, toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan seviyeleri (TOS) ölçüldü. MTT ile hücre canlılıkları belirlendi ve 10, 20 ve 40  $\mu$ M kurkumin dozlarının efektif dozlar olduğu tespit edildi. 40  $\mu$ M kurkumin uygulamasının kontrol grubu ve diğer doz grupları ile karşılaştırıldığında oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozu indüklediği bulundu ( $p < 0.05$ ). 10  $\mu$ M kurkumin grubunda istatistiksel olarak fark tespit edilmedi. 40  $\mu$ M kurkuminin U251 glioblastoma hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde doza bağlı bir etkiye sahip olduğunu ve proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini bulduk

**Anahtar kelimeler:** Glioblastom, Kurkumin, U251 hücreleri, antikanser ilaç

## 1. Giriş

Gliomlar, yetişkinlerde en yaygın santral sinir sisteminin (CNS) tümör tipini temsil eder ve kötü huylu beyin tümörlerinin %81'ini oluşturur [1]. Glioblastoma (GBM), yetişkinlerdeki tüm beyin tümörlerinin en kötü huylu ve en sık görülenidir (%60) [2]. Mevcut tedavi yöntemleri arasında tümör rezeksiyonu, kemoterapi, radyoterapi ve anti-vasküler hedefli ilaçlar yer almaktadır. Son yıllardaki terapötik stratejiler yeterince etkili olmadığı için yeni tedaviler veya daha etkili yöntemler bulmak önemlidir. Pro-oksidan ve proinflamatuvar ortam, glioma progresyonunda ve tedavilere yaklaşımda yer alırken, oksidatif stres, gliogeneze yol açan genetik kararsızlığa katılır. Oksidatif stres, büyük ölçüde hücrel antioksidan savunma sistemi ile dış orbitallerde eşleşmemiş elektronlara sahip moleküller olan serbest radikaller dâhil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı oluşumu arasındaki dengenin bozulmasına dayanır [3]. Glial tümör hücreleri yüksek düzeyde ROS üretir. Özellikle glioblastoma kök benzeri hücreler (GSC'ler), kısmen yüksek metabolik talepleri ve hipoksik koşulları nedeniyle oksidatif strese neden olur [4]. ROS aynı zamanda glioblastomun tümörjenezini ve ilerlemesinde rol oynayan siklooksijenaz 2 (COX-2) aktivitesinin yan ürünleridir. Bu yolağın inhibisyonu proliferasyonu azaltır ve U87MG ile T98G hücrelerinde otofajiyi artırır [5]. Oksidanlar, glioma hücresi sinyallemede ve canlılığında vazgeçilmez bir rol oynasa da, hücreleri aynı zamanda oksidatif hasara karşı savunmasız hale getirir. Kanser hücreleri, kronik olarak normal hücrelere göre daha yüksek seviyede ROS geliştirir, ancak bu, toplam antioksidan kapasitesinin daha yüksek seviyelerine bağlı olarak dengelenebilir. Yüksek doz antioksidanlar kanser hücreleri için toksik, sağlıklı hücreler için ise toksik olmayabilir. Antikanser ilaçların kanserde seçici olarak oksidatif stresi indükleyip indükleyemeyeceği, devam eden çalışmaların konusudur [6]. Bazı flavonoidler oksidatif stresi artırabilir; apigenin, quercetin ve proantosiyandinler, glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunu azaltır ve T98G, U87MG, U373MG ve U251 hücrelerinde ölümlerini ve / veya istilasını tetikler [7, 19].

Çok sayıda çalışma, zerdeçalının (*Curcuma longa*) etken maddesi olan kurkuminin, GBM dâhil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde kanser önleyici özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur [8]. Anti-inflamatuar ve oksidan aktivitesi ile de bilinen kurkumin, çok çeşitli hücre sinyal yollarını etkileyerek kanserli hücrelerde hücre çoğalmasını azaltmakta, apoptozu da arttırmaktadır. Buna rağmen, zayıf bağırsak emilimi ve farmakokinetiği nedeniyle kurkuminin terapötik uygulaması sınırlıdır [9]. Bununla birlikte, klinik etkinliğini optimize etmek için kurkumin'in GBM'yi tedavi edebileceği olası mekanizmaların açıklığa kavuşturulması için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Bu çalışma ile U251 hücreleri üzerinde farklı dozlarda kurkumin uygulamasının antineoplastik etkilerini araştırmayı amaçladık. Kurkumin'in, prooksidan-antioksidan mekanizmaları modüle ederek ROS üretimini, apoptoz aktivitesini ve inflamasyonu tetikleyerek U251 hücre canlılığını inhibe ettiğini varsayıyoruz. Bu çalışmada, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , kaspaz 3/9, toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan (TOS) seviyeleri ölçüldü. Sonuçlarımız, kurkuminin kemo-direncin üstesinden gelmenin yolunu açabileceğini, oksidatif stresin terapötik seviyeleri artırması ile Warburg etkisi (kanser hücrelerinin hızlı ATP elde edebilmek için glikozu laktata dönüştürmesi) inhibisyonuyla sinerji içinde hareket edebileceğini göstermiştir

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1 Hücre Kültürü ve Kurkumin Uygulaması

Glioblastoma hücre dizisi U251, daha önce tarif edildiği gibi %10 fetal bovin serumu (FBS) ile desteklenmiş Dulbecco'nun modifiye Eagle's ortamında (DMEM) kültürlendi [10]. Hücreler, 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'de nemlendirilmiş koşullar altında inkübe edildi. Ortam her 3 günde bir değiştirildi. Hücreler, aşağıdaki deneyler için %95 birleşmede pasajlandı. Kurkumin, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde 10 mM'lik bir stok konsantrasyonunda hazırlandı ve 4 °C'de saklandı.

### 2.2 Hücre Canlılık Testi

3-(4,5-dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT, Sigma-Aldrich M5655) analizi için, U251 hücreleri 96 oyuklu plakalarda kültürlendi (her bir kuyu için 1x10<sup>4</sup> hücre) ve yapışan hücrelere 24 saat boyunca 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 160  $\mu$ M kurkumin uygulandı. Kurkumin uygulamasının ardından hücreler, karanlıkta 37 °C'de 3 saat boyunca 100  $\mu$ L 0.5 mg/mL taze hazırlanmış MTT solüsyonu ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra süpernatant atıldı ve oluşan formazan kristalleri 100  $\mu$ L %100 DMSO içinde çözüldü. Son olarak, her bir kuyunun absorbans değerleri bir mikropilaka okuyucu (800TS, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, ABD) kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Hücre canlılığını hesaplamak için daha önce açıkladığımız formüle göre kurkumin uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak kabul edildi ve bu hücrelerin %100 canlı olduğu varsayıldı [10].

### 2.3 Biyokimyasal Analizler

U251 hücreleri ( $1 \times 10^4$ ) 96 oyuklu bir plaka içinde kültürlendi. Hücreler plakanın yüzeyini kapladıktan sonra, 24 saat boyunca 10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$  kurkumin dozlarında muamele edildi. İşlemin ardından hücreler fosfat tamponu (PBS; pH 7.4) ile yıkandı ve yapışan hücreler tripsin yardımı ile plakadan ayrıldı. Ardından 4 °C'de 1000xg'de 5 dakika santrifüj edilerek bir Eppendorf tüpünde toplandı. Pelletler 2 kez PBS içinde yıkandı ve ardından liziz tamponu içinde 500 mL radyoimmünopresipitasyon (RIPA, Santa Cruz Biotechnology, ABD) ile yeniden süspansiyon edilerek orbital çalkalayıcıda (Isolab) 4 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak, pelletler, 4 °C'de 20 dakika boyunca 10000xg'de santrifüj edildi.

10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$  kurkumin dozları uygulanan hücre lizatlarından, IL-1 $\beta$  (Elabscience; KAC1211), TNF- $\alpha$  (Sigma; RAB0476-1KT), kaspaz 3/9 (SEA626Hu) seviyeleri, toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan seviyeleri (TOS) (Rel Assay Diagnostic) ticari ELISA kitleri ile üretici talimatlarına göre ölçüldü.

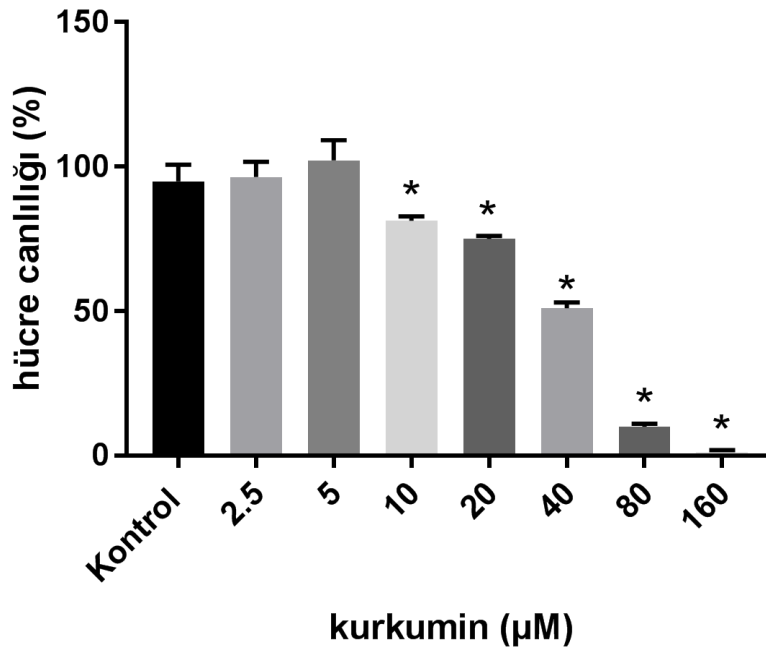
### 2.4 İstatistik Analizler

Tüm deneyler, üç bağımsız deneyin üçlü tekrarı olarak yapıldı ve veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Veriler, GraphPad Prism yazılımı 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov normalite testleri yapıldı. Deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı, ardından Tukey Post hoc analizi yapıldı.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 3. Bulgular

### 3.1 Yüksek Doz Kurkumin Uygulaması U251 glioblastoma hücre çoğalmasını engeller

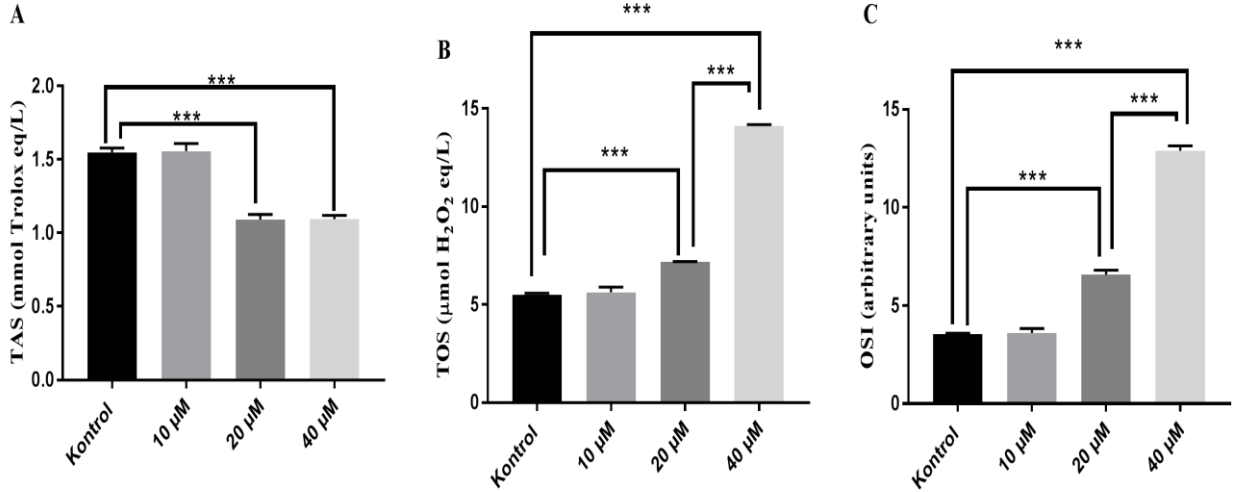
MTT yöntemini kullanarak kurkumin'in glioblastoma hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini ölçtük. Çalışmamızda, 0, 10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$  kurkumin ile 24 saat boyunca muamele edilen U251 hücre lizatları kullanıldı. Şekil 1'de kurkuminin doza bağlı bir şekilde glioblastoma proliferasyonunu inhibe ettiğini gözlenmektedir. 160 ve 80  $\mu\text{M}$  dozlarında hücre canlılığı çok az olduğu tespit edildi.



Şekil 1. Farklı dozlarda kurkumin uygulamasının U251 hücre canlılığına etkisi

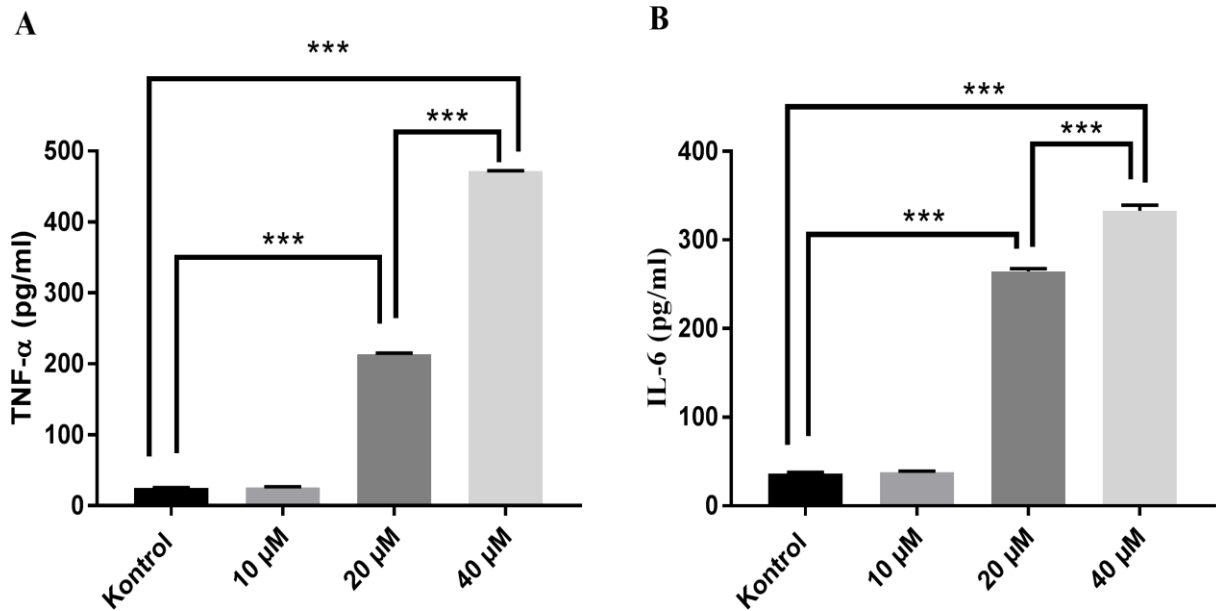
### 3.2 Doza bağılı olarak Kurkumin Oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu tetikler

Şekil 2’de kurkuminin farklı dozlarında oksidatif stres üzerinde etkisi incelendi. 40  $\mu\text{M}$  dozunda oksidatif stres indeksi kontrol grubuna göre daha yüksekti ( $p<0.05$ ).



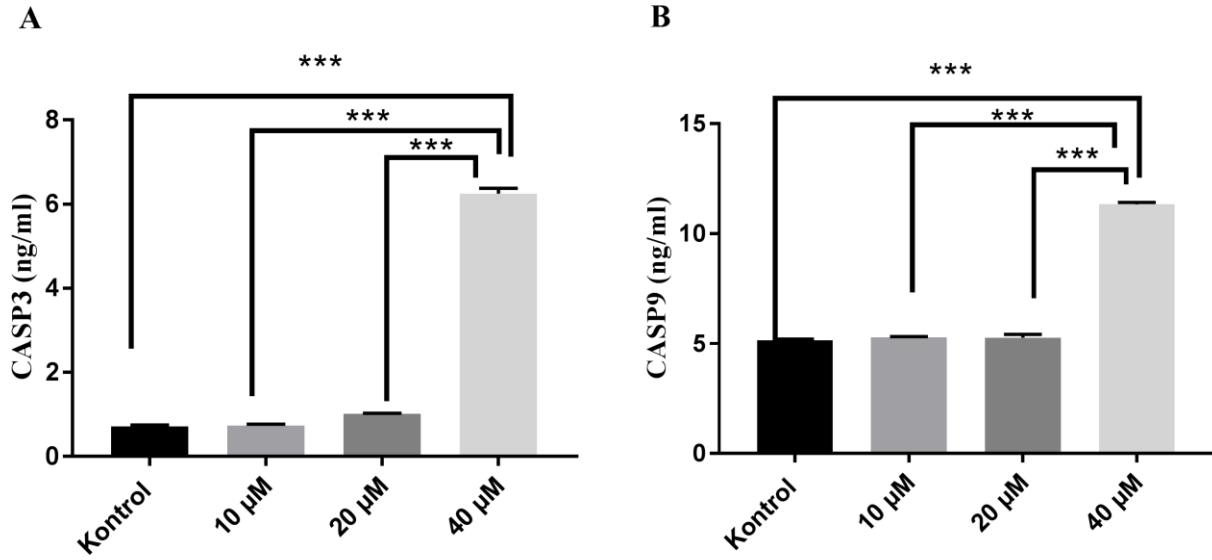
Şekil 2. Farklı dozlarda kurkumin uygulamasının U251 hücrelerindeki oksidatif stres üzerine etkisi

Şekil 3’de TNF-a ve IL-6 düzeyleri incelendiğinde ise doza bağımlı olarak proinflatuar sitokin düzeylerinin kontrol grubuna göre yükseldiği ve doz grupları arasında istatistiksel farkların olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).



Şekil 3. Farklı dozlarda kurkumin uygulamasının U251 hücrelerindeki proinflatuar sitokinler üzerine etkisi

Şekil 4’te ise oksidatif stres ve inflamasyon süreçlerine paralel olarak yüksek doz uygulaması ile apoptozun indüklendiğini düşünmekteyiz. CASP3 ve CASP9 düzeyleri doza bağımlı olarak artmıştır ( $p<0.05$ ).



Şekil 4. Farklı dozlarda kurkumin uygulamasının U251 hücrelerindeki apoptatik markerlar üzerine etkisi

#### 4. Sonuçlar ve Tartışma

Kurkuminin glioblastoma hücrelerinde biyokimyasal etkilerini araştırdık ve U251'i inhibe etmek için *in vitro* potansiyel etkinliğini oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik yollar üzerinden değerlendirdik. Kurkuminin glioblastoma hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde doza bağlı bir etkiye sahip olduğunu ve glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini bulduk. İnhibisyon, kurkumin uygulaması altında oksidatif stresi indüklemesi ile ilişkilendirildi. Kurkumin antineoplastik etkisi önceki araştırmalar ile tutarlıdır [11, 12]. Doğal ürünler, düşük toksisite profilleri ile ilişkilendirildikleri için antikanser ajanlar olarak ilgi çekicidir. Bu, yüksek dozlarda güvenle kullanılmasına veya mevcut rejimlere eklenmelerine izin verir. Gerçekten de kurkumin, klinik çalışmalarda büyük yan etkiler olmaksızın yüksek dozlarda uygulanmıştır [13, 14]. Bununla birlikte, kullanımına karşı uyarıda bulunan bazı veriler mevcuttur. Kurkumin bir antioksidan olmasına rağmen, glutatyonun azalmasıyla ROS'ta geçici bir artışa ve hücre canlılığında azalmaya neden olabilir [15]. Özellikle doz çalışmalarının hücre hatlarında farklı etkiler yaratabileceğini düşünmekteyiz. Örneğin; Antioksidan bir madde prooksidan etki gösterebilir. U138MG (insan glioblastoma), U87, U373 ve C6 (sıçan glioblastoma) hücre dizileri kurkumin uygulamasıyla hücre canlılığının %50 sini gösteren IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 29, 19, 21 ve 25 µM olduğu, astrositler için IC<sub>50</sub>'nin ise 135 µM olduğu bulundu.

Kurkuminin kanser hücrelerinde doğrudan sitotoksik etkileri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla da gözlenmiştir. Değişken kurkumin konsantrasyonları ile tedavi edilen GBM hücreleri (U87, U51, U235) 72 saatte 70 M'lik konsantrasyonlarda %20'den daha az canlılık seviyelerine ulaştı; etkinin doza bağımlı olduğu ortaya çıktı [16]. Kurkumin preparatlarının, apoptotik yollarla etkileşimler yoluyla neoplastik dokunun radyosensitizasyonuna neden olurken, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtta azalma yoluyla normal dokuyu koruduğu gösterilmiştir [17]. U87MG hücrelerinde 25 ve 50 µM kurkumin, CASP3 aktive ederek apoptozu çalışmamıza benzer şekilde indüklemiştir [18]. ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin kurkumini "Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan" veya Kasım 2018 itibarıyla GRAS olarak sınıflandırdığını da belirtmek önemlidir. Diğer kanser hücreleri çalışmalarında ise kurkumin benzeri bitki ekstraktlarından elde edilen etken madde ve antioksidan bileşiklerinde kanser hücreleri üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir [19].

Kurkumin, sağlığa oldukça faydalı doğal bir üründür. Düşük toksisiteye bağlı güvenlik profili zamanla test edilmiştir ve ürün binlerce yıldır insan diyetinin bir bileşeni olmuştur. *In vitro* çalışmalarda, Wnt, RANK, STAT3 ve diğer sinyal yolları veya tümörjenik moleküller ile etkileşimi hakkında daha fazla veri ortaya çıktıkça, kurkuminin *in vivo* anti-glioma etkilerine sahip olma potansiyeli açık hale gelecektir.

#### Kaynaklar

- [1] Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., ... & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-oncology*, 16(7), 896-913.

- [2] Vitovcova, B., Skarkova, V., Rudolf, K., & Rudolf, E. (2020). Biology of Glioblastoma Multiforme—Exploration of Mitotic Catastrophe as a Potential Treatment Modality. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5324.
- [3] Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- [4] Schroeder, A. B., Pointer, K. B., Clark, P. A., Datta, R., Kuo, J. S., & Eliceiri, K. W. (2020). Metabolic mapping of glioblastoma stem cells reveals NADH fluxes associated with glioblastoma phenotype and survival. *Journal of biomedical optics*, 25(3), 036502.
- [5] Palumbo, P., Lombardi, F., Augello, F. R., Giusti, I., Dolo, V., Leocata, P., ... & Cinque, B. (2020). Biological effects of selective COX-2 inhibitor NS398 on human glioblastoma cell lines. *Cancer Cell International*, 20, 1-17.
- [6] Postovit, L., Widmann, C., Huang, P., & Gibson, S. B. (2018). Harnessing oxidative stress as an innovative target for cancer therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018, 6135739.
- [7] Liu, Y., Tang, Z. G., Yang, J. Q., Zhou, Y., Meng, L. H., Wang, H., & Li, C. L. (2017). Low concentration of quercetin antagonizes the invasion and angiogenesis of human glioblastoma U251 cells. *Oncotargets and therapy*, 10, 4023.
- [8] Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2008). Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and molecular life sciences*, 65(11), 1631-1652.
- [9] Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The essential medicinal chemistry of curcumin: miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 60(5), 1620-1637.
- [10] Hacıoğlu, C., Kar, F., Kacar, S., Sahintürk, V., & Kanbak, G. (2021). Bexarotene inhibits cell proliferation by inducing oxidative stress, DNA damage and apoptosis via PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway in C6 glioma cells. *Medical Oncology*, 38(3), 1-11.
- [11] Tu, S. P., Jin, H., Shi, J. D., Zhu, L. M., Suo, Y., Lu, G., ... & Yang, C. S. (2012). Curcumin induces the differentiation of myeloid-derived suppressor cells and inhibits their interaction with cancer cells and related tumor growth. *Cancer prevention research*, 5(2), 205-215.
- [12] Tian, B., Zhao, Y., Liang, T., Ye, X., Li, Z., Yan, D., ... & Li, Y. (2017). Curcumin inhibits urothelial tumor development by suppressing IGF2 and IGF2-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Journal of drug targeting*, 25(7), 626-636.
- [13] Lao, C. D., Ruffin, M. T., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., ... & Brenner, D. E. (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 1-4.
- [14] Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., & Srinivas, P. S. S. R. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta medica*, 64(04), 353-356.
- [15] Strasser, E. M., Wessner, B., Manhart, N., & Roth, E. (2005). The relationship between the anti-inflammatory effects of curcumin and cellular glutathione content in myelomonocytic cells. *Biochemical pharmacology*, 70(4), 552-559.
- [16] Walker, B. C., & Mittal, S. (2020). Antitumor Activity of Curcumin in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9435.
- [17] Jagetia G.C. (2007) RADIOPROTECTION AND RADIOSENSITIZATION BY CURCUMIN. In: Aggarwal B.B., Surh YJ., Shishodia S. (eds) *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 595. Springer, Boston, MA
- [18] Zanutto-Filho, A., Branganhol, E., Edelweiss, M. I., Behr, G. A., Zanin, R., Schröder, R., ... & Moreira, J. C. F. (2012). The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(6), 591-601.
- [19] Soydam Aydın, S., Yücel, E. (2021). Anti-proliferative effect of *Cistus laurifolius* on human cervical adenocarcinoma (Hep2C), human muscle rhabdomyosarcoma (RD), mouse fibrosarcoma (Wehi 164) cell line. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14 (2) , 236-241.