

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜÇÜK MOLEKÜL İNHİBİTÖRÜ KAN438757 VE KURKUMİN
KOMBİNASYONUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE
HATTINDAKİ ANTİ-NEOPLASTİK ETKİSİNİN DEŞİFRE
EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ ÖZDEMİR

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Can Ali AĞCA**

BİNGÖL-2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları süresince yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmaların tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren değerli hocam Doç. Dr. Can Ali AĞCA'ya teşekkür ederim. Tez çalışmasına desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Rektörlüğüne, Bingöl Üniversitesi moleküler biyoloji anabilim dalına teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalar esnasında yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım Turin Üniversitesi onkoloji bölümünden Prof.Dr.Chiara Riaganti ve Sapienza Üniversitesi Biyoloji ve Biyoteknoloji Bölümü Charles Darwinden Dr.Marco Fidaleo ve Bingöl Üniversitesi Yüksek lisans öğrencisi Seher SARUHAN'a teşekkürlerimi sunuyorum. Tez çalışmasına desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Rektörlüğü' ne (Proje No: BAP-FEF.2021.005.) teşekkür ederim.

Son olarak bende büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen anne ve kız kardeşime, tezin hazırlanması sırasında gösterdikleri sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı özellikle teşekkürü bir borç bilirim.

Deniz ÖZDEMİR

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. 6-fosfosfrukto-2-kinaz / fruktoz-2,6-bifosfataz 3 (PFKFB3).....	5
1.2. PFKFB3'ün Kanserdeki Rolü	9
1.3. PFKBF3 İnhibitörleri.....	12
1.3.1. (3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO).....	12
1.3.2. (1-(4-pyridinyl)-3-(2-quinolinyl)-2-Propen-1-one) (PFK15).....	13
1.3.3. 1-(4-pyridinyl)-3-[7-(trifluoromethyl)-2E-quinolinyl]-2-propen-1 -one (PFK-158).....	13
1.3.4. KAN0438757.....	14
1.4. Kurkumin.....	15
1.4.1. Antikanser Etki.....	17
1.3.4. Kurkumin ve DNA Hasarı	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
2.1. Materyal.....	20
2.2. Yöntem.....	23

2.2.1. Hücre Kültür Çalışmaları	23
2.2.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması.....	23
2.2.1.2. A549 ve H1299 Hücrelerinin Çözülmesi ve Ekimi.....	24
2.2.1.3. A549 ve H1299 Hücrelerinin Pasajlanması.....	24
2.2.1.4. A549 ve H1299 Hücrelerinin Dondurulması.....	25
2.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	25
2.2.3. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	26
2.2.4. Hücre Göçünün Tespiti	27
2.2.5. Tek Hücre Jel Elektroforezi	28
2.2.5.1. Örneklerin Hazırlanılması.....	28
2.2.5.2. Slaytların Hazırlanması.....	28
2.2.5.3. Hücrelerin Lizis Edilmesi.....	28
2.2.5.4. Elektroforez.....	29
2.2.5.5. Nötralizasyon.....	29
2.2.5.6. Boyama ve Görüntü Alma.....	29
2.2.6. Hücre Hattında Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EtBr) Boyaması ile Hücre Ölümünün Belirlenilmesi.....	30
2.2.7. Mitokondri Membran Potansiyelinin Tespiti	31
2.2.8. Western Blotting	32
2.2.8.1. Örneklerin Hazırlanılması ve Protein İzolasyonu	32
2.2.8.1. Jel Hazırlama	32
2.2.8.1. Elektroforez.....	33
2.2.8.1. Transfer.....	33
2.2.8.1. Bloklama.....	33
2.2.8.1. Antikorlar ile Muamele.....	34
2.2.8.1. Görüntüleme.....	35
2.2.9. İstatistiksel Analiz.....	35
 3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	 36
3.1. KAN0438757'nin A549 ve H1299 Hücre Hatlarındaki Hücre Canlılık Bulguları.....	 36
3.2. Kurkuminin A549 ve H1299 Hücre Hatlarındaki Hücre Canlılık Bulguları.	38
3.3. KAN0438757'nin A549 Hücre Hattında ile Kurkumin	

Kombinasyonunun Hücre Canlılık Etkileri.....	39
3.4. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....	40
3.5. H1299 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Proliferasyonuna Etkisi.	41
3.6. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....	42
3.7. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Göçüne Etkisi.....	43
3.8. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun Hücre Göçüne Etkisi.....	44
3.9. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin DNA Hasarının Gösterilmesi.....	45
3.10. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun DNA Hasarının Gösterilmesi.....	46
3.11. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Ölümü Üzerine Etkisi.....	47
3.12. A549 Hücre Hattında KAN0438757 Kurkumin Kombinasyonun Hücre Ölümü Üzerine Etkisi.....	48
3.13. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi.....	49
3.14. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi.....	50
3.15. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun TIGAR, Bax Proteinleri Üzerine Etkisi	51
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

KAN	: KAN0438757
Kur	: Kurkumin
PFKFB3	: 6-Fosfofrukto-2-Kinaz/Fruktoz-2,6-Bifosfataz 3
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
NSCC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
SCLC	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
PFK-1	: Fosfofruktokinaz-1
3PO	: (3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-on
PFK-15	: 1-(Piridin-4-il)-3-(kinolin-2-il)prop-2-en-1-on
PFK-158	: 1-(4-piridinil)-3-[7-(triflorometil)-2E-kinolinil]-2-propen-1-on
F-2,6-BP	: Fruktoz-2,6-Bifosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör Kabba B
ml	: Mililitre
μM	: Mikro Molar
DMSO	: Dimetilsülfoksit
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
CO ₂	: Karbondioksit
°C	: Santigrat Derece
WST-1	: Water-Soluble Tetrazolium Salt
PBS	: Phosphate-Buffered Saline

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Kanserin karakteristik 10 özelliği.....	2
Şekil 1.2.	2020 Yılında En Sık Görülen 10 Kanser için Vaka ve Ölümünün Dağılımı.....	3
Şekil 1.3.	PFKFB3 geni ve proteininin genel yapısı.....	8
Şekil 1.4.	PFKFB3 proteininin hücre döngüsündeki görevi.....	10
Şekil 1.5.	PFKFB3 proteinin anjiogenez ve metastaz üzerindeki etkisi.....	11
Şekil 1.6.	PFKFB3 inhibitörleri.....	13
Şekil 1.7.	KAN0438757.....	15
Şekil 1.8.	Curcuma Longa bitkisi ve Kurkuminin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 1.9.	Kurkumin tarafından hedeflenen proteinler.....	18
Şekil 2.1.	Gerçek zamanlı hücre analizi.....	26
Şekil 2.2.	Wound Healing testi aşamaları.....	27
Şekil 2.3.	Tek Jel Elektroforezi işlem adımları.....	29
Şekil 2.4.	Akridin oranj ve Etidyum bromür boyaması işlem adımları.....	30
Şekil 2.5.	Mitokondriyal membran potansiyel boyaması işlem adımları.....	31
Şekil 2.6.	Protein izolasyonu işlem adımları.....	32
Şekil 2.7.	Western blotting yönteminde kullanılan adımlar.....	34
Şekil 3.1.	A549 hücre hattında KAN0438757'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.....	36
Şekil 3.2.	H1299 hücre hattında KAN0438757'nin hücre canlılığı üzerine etkisi....	37
Şekil 3.3.	A549 ve H1299 Hücre hatlarında KAN0438757'nin IC50 degerleri.....	37
Şekil 3.4.	A549 ve H1299 hücre hatlarında Kurkuminin hücre canlılığı üzerine etkisi.....	38
Şekil 3.5.	A549 ve H1299 Hücre hatlarında kurkuminin IC50 degerleri	38

Şekil 3.6.	A549 hücre hattında KAN0438757 ile Kurkumin kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi	39
Şekil 3.7.	A549 hücre hattında KAN0438757'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	40
Şekil 3.8.	H1299 hücre hattında KAN0438757'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	41
Şekil 3.9.	A549 hücre hattında KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonun hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 3.10.	A549 hücre hattında KAN0438757 48 saatlik tedavisi ile hücre göçünün belirlenilmesi.....	43
Şekil 3.11.	A549 hücre hattında kombinasyonun hücre göçü üzerine etkisi	44
Şekil 3.12.	A549 hücrelerinde KAN0438757'nin DNA hasarı üzerine etkisi.....	45
Şekil 3.13.	KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonun A549 hücrelerinde DNA hasarı üzerine etkisi.....	46
Şekil 3.14.	A549 hücrelerinde KAN0438757'in hücre ölümünü üzerine etkisi.....	47
Şekil 3.15.	A549 hücrelerinde KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisi.....	48
Şekil 3.16.	A549 hücrelerinde KAN0438757'nin mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesi.....	49
Şekil 3.17.	A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonun mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesi.....	50
Şekil 3.18.	A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonun TIGAR, Bax proteinleri üzerine etkisi.....	51

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Kullanılan Cihazlar	20
Tablo 2.	Kullanılan Sarf Malzemeler	21
Tablo 3.	Kullanılan Kimyasallar	21
Tablo 4.	Besi yerinde kullanılan bileşikler	24
Tablo 5.	Dikey elektroforezde kullanılan jel içerikleri.....	33

KÜÇÜK MOLEKÜL İNHİBİTÖRÜ KAN438757 VE KURKUMİN KOMBİNASYONUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDAKİ ANTI-NEOPLASTİK ETKİSİNİN DEŞİFRE EDİLMESİ

ÖZET

Akciğer kanseri, dünyadaki en yüksek görülme ve ölüm oranlarına sahip, oldukça kötü huylu bir tümör türüdür. Geleneksel akciğer kanseri tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Akciğer kanseri hastalarında en fazla etki gösteren tedavi seçeneği kemoterapide belirli süre ve doz sonrası kemo-direnç ortaya çıkarak tedavinin etkinliğini sınırlamaktadır. Kemoterapide ilaç etkinliğini artırmak ve kemo-direnci ortadan kaldırmak için kombinasyon terapi ile güçlü bir yanıt alınmaktadır. Akciğer kanserinde hücre içerisinde enerji gereksiniminin artması ile özellikle glikoz yolağında düzenleyici bir protein PFKFB3'ün ekspresyonunda çok fazla artış görülmektedir. PFKFB3 (iPFK2), günümüze kadar keşfedilen dört PFKFB izoziminden bir tanesidir. PFKFB3, 6-fosfrukructo-2-kinaz / fruktoz-2,6-bifosfat 3 enzimini kodlayan bir gendir. Tümör hücrelerinde enerji metabolizmasının engellenmesi günümüzde geliştirilmekte olan önemli bir tedavi olarak kabul edilmektedir. Yeni bir PFKFB3 inhibitörü olarak tanımlanan küçük molekül inhibitörü KAN0438757 kanserli hücrelerde DNA hasar yanıt mekanizmasında kritik bir işleve sahip olması nedeniyle hedefe yönelik tedavide etkin bir rol almaktadır. Kurkumin, *curcuma longa* rizomlarının ana biyoaktif bileşenidir. Kurkumin'in antioksidan ve antikanser aktivite gibi birçok biyolojik işlevi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmadaki temel amacımız, KAN0438757 ve kurkumin kombinasyonun akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki anti-kanser etkisinin araştırılmasıdır. WST-1 testi ile KAN0438757, Kurkuminin hücre canlılıkları ve IC50 değerleri tespit edildi, ayrıca eşzamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) kullanılarak KAN0438757 ve kombinasyon grublarının akciğer kanseri hücrelerinin profilerasyonlarında düşüşe neden olduğu belirlendi. Hücre göçü testi ile yeni inhibitörün monoterapi etkisi ile kombinasyon etkisinin analiz edildi. DNA hasarı için ise tek hücre jel elektroforezi kullanılarak A549 hücrelerinde dramatik bir DNA hasarının neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca kombinasyonun hücre ölümü ve mitokondriyal membran potansiyel boyama metodları ile morfolojik olarak gösterildi. Son olarak western blotting ile apoptoz belirteçlerinde, KAN0438757 ve kurkumin kombinasyonu akciğer kanseri hücrelerinde hücre ölümünü artırdığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: KAN0438757, kurkumin, A549, hücre ölümü.

DECIPHERING THE ANTI-NEOPLASTIC EFFECT OF SMALL MOLECULE INHIBITOR KAN438757 AND CURCUMIN COMBINATION ON LUNG CANCER CELL

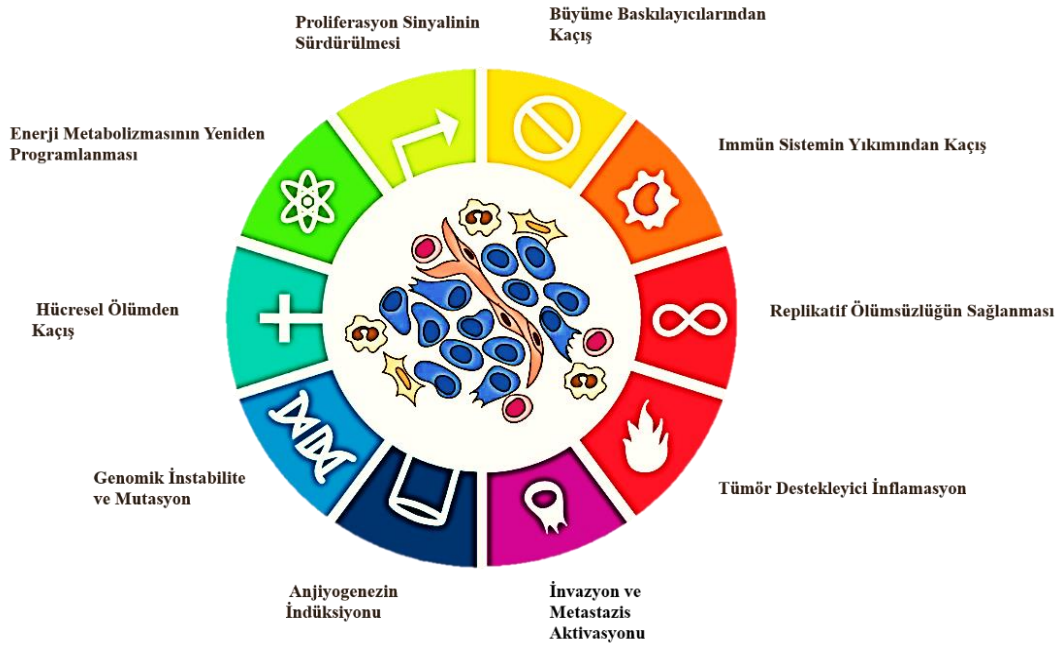
ABSTRACT

Lung cancer is a highly malignant type of tumor with the highest incidence and death rates in the world. Surgery, radiotherapy and chemotherapy are used in the traditional treatment of lung cancer. The most effective treatment option in lung cancer patients is that chemo-resistance occurs in chemotherapy for a certain period of time and after dose, limiting the effectiveness of the treatment. In chemotherapy, a strong response is obtained with combination therapy to increase drug efficacy and eliminate chemo-resistance. In lung cancer, with the increase in the energy requirement in the cell, there is a great increase in the expression of a regulatory protein PFKFB3, especially in the glucose pathway. PFKFB3 (iPFK2) is one of four PFKFB isozymes discovered to date. PFKFB3 is a gene that encodes the 6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-biphosphatase 3 enzyme. Inhibition of energy metabolism in tumor cells is currently accepted as an important treatment under development. The small molecule inhibitor KAN0438757, defined as a new PFKFB3 inhibitor, plays an active role in targeted therapy because it has a critical function in the DNA damage response mechanism in cancer cells. Curcumin is the main bioactive component of the rhizomes of *Curcuma longa*. Curcumin has been shown to have many biological functions such as antioxidant and anticancer activity. Our main aim in this study is to investigate the anti-cancer effect of the combination of KAN0438757 and curcumin on the lung cancer cell line. Cell viability and IC50 values of KAN0438757, Curcumin was determined by WST-1 test, and it was determined that KAN0438757 and combination groups caused a decrease in the proliferation of lung cancer cells using the simultaneous cell analysis system (RTCA). The combination effect of the new inhibitor with the monotherapy effect was analyzed by cell migration assay. For DNA damage, using single cell gel electrophoresis, it was revealed that a dramatic DNA damage was caused in A549 cells. In addition, the combination was morphologically demonstrated by cell death and mitochondrial membrane potential staining methods. Finally, it was determined that the combination of KAN0438757 and curcumin increased cell death in lung cancer cells in apoptosis markers by western blotting.

Keywords: KAN0438757, curcumin, A549, cell death.

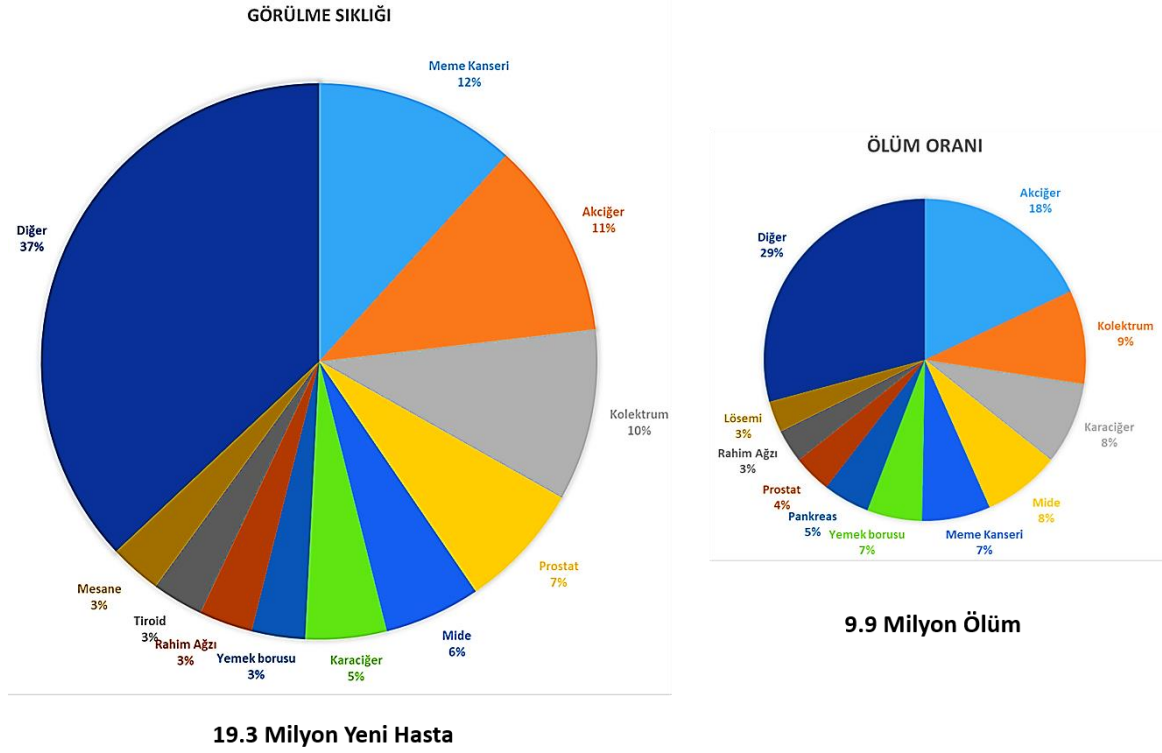
1. GİRİŞ

Kanser, hücre genomundaki değişiklikleri veya mutasyonları içeren bir grup anormal hücrenin normal hücre bölünmesi kurallarını göz ardı ederek kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü bir hastalık olarak tanımlanır (Hejmadi 2014). Normalde hücreler sürekli olarak hücrenin bölünmesi, başka bir hücreye farklılaşması veya ölmesi gerektiğini belirleyen sinyallere sürekli maruz kalmasıdır. Kanser hücreleri ise, bu sinyalleri farklı şekilde kullanarak kontrolsüz büyüme ve çoğalmaya neden olur. Aslında, kansere bağlı ölümlerin neredeyse %90'u, metastaz adı verilen bir süreç olan tümörün uzak doku ve organlara yayılmasından kaynaklanmaktadır (Klein 2008) (Şekil 1.1). Modern kanser biyolojisinin temeli, basit bir ilkeye dayanır, hemen hemen tüm memeli hücreleri, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre ölümünü kontrol eden benzer moleküler ağları paylaşır. Kanser oluşumu ve tedavisi ile ilgili araştırmaların temelini oluşturan hâkim teori, normal hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve hücresel düzeydeki bu ağlardaki değişikliklerin bir sonucu olarak kansere dönüşmesi ve her hücre için bu bozulmanın meydana gelebileceği sınırlı sayıda yol bulunmasıdır (Evan and Vousden 2001; Hejmadi 2014).



Şekil 1.1. Kanser karakteristik 10 özelliği (Hanahan and Weinberg 2018)

Akciğer karsinomu olarak da bilinen akciğer kanseri, akciğer dokularında kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize kötü huylu bir akciğer tümörüdür (Wistuba et al 2001). Bu büyüme, metastaz süreciyle akciğerin ötesine, yakındaki dokuya veya vücudun diğer kısımlarına yayılabilir (Wadowska et al 2020). Son yüzyılda akciğer karsinomu, nadir görülen ve belirsiz bir hastalıktan dünyadaki en yaygın kansere ve kanserden ölümlerin en yaygın nedenine doğru ilerledi. İçinde bulunduğumuz dönemde, en son küresel istatistiksel analiz, 2020 yılında dünya çapında 2,206,771 milyon yeni vaka teşhis edildiğini ve aynı yıl içinde 1,796,144 milyon ölüm olduğu tahmin edilmektedir (Sung et al 2021). Akciğer kanseri, 2020'de en sık teşhis edilen ikinci kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir (toplam kanser ölümlerinin %18,01), erkeklerde (%14,3) en sık görülen kanserdir ve kadınlarda (%8,4) görülme sıklığı erkeklere göre daha düşüktür (Organization 2018; Sung et al 2021) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. 2020 Yılında En Sık Görülen 10 Kanser için Vaka ve Ölümün Dağılımı(Sung et al 2021)

Akciğer kanserleri, geleneksel olarak küçük hücreli olmayan karsinom (NSCC) ve küçük hücreli karsinom (küçük hücreli akciğer karsinomu, SCLC) olarak ikiye ayrılır; ilki vakaların %80'ni ve ikincisi kalan %20'sini oluşturmaktadır (Zheng 2016). Akciğer kanserinin patogenezi, uzun bir süre boyunca çoklu moleküler anormalliklerin birikmesini içerir. Gen ekspresyonundaki değişiklikler, anormal mikroRNA ekspresyonundan veya metilasyonundan, DNA sekans değişikliklerinden, DNA segment amplifikasyonundan, delesyonundan veya tam kromozom kazanımlarından veya kayıplarından kaynaklanır (Massion and Carbone 2003; Pendharkar et al 2013). Bu lezyonlar, hücrelerin hücre bölünmesinin, apoptozun ve istilanın normal regülasyonundan kaçmasına ve / veya konak ile etkileşimini değiştirmesine izin verir (Pendharkar et al 2013; Tarro et al 2019). Sigara, özellikle sigara, akciğer kanserine en çok katkıda bulunan faktörler arasında yer alır. Sigara dumanı, benzo [α] piren dahil en az 73 bilinen kanserojen içerir (Hecht 2012). Gelişmiş dünyada 2000 yılında erkeklerde akciğer kanseri ölümlerinin %90'ı sigara içmeye (%7) kadınlarda atfedilmiştir. Sigara akciğer kanseri vakalarının %85'ini oluşturur (Peto et al 1996). Pasif sigara içme bir başkasının sigarasından çıkan dumanın solunması, içmeyenlerde akciğer kanserinin bir nedenidir. ABD, Avrupa ve Birleşik Krallık'ta yapılan

çalışmalar, pasif dumana maruz kalanlar arasında sürekli olarak önemli bir risk artışı olduğunu göstermiştir (Hecht 2012; Jaakkola and Jaakkola 2006). Dış ortam hava kirliliğinin akciğer kanseri riskini artırmada bir etkisi vardır. Trafik egzoz dumanında açığa çıkabilen ince partiküller (PM_{2.5}) ve sülfat aerosolleri, oldukça yüksek riskle ilişkilidir (Corte et al 2010). Azot dioksit için, milyarda 10 birimlik kademeli bir artış, akciğer kanseri riskini %14 artırmaktadır. Ayrıca pişirme ve ısıtma için odun, odun kömürü, gübre veya mahsul kalıntısının yakılmasıyla iç mekân hava kirliliğinden kaynaklanan akciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir (Gholamnejad 2019; Hamra et al 2015). Akciğer kanserinin yaklaşık %8'i kalıtsal faktörlere bağlıdır. Akciğer kanserli kişilerin akrabalarında risk ikiye katlanmaktadır. Bu muhtemelen genlerin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır (de Alencar et al 2020). Kromozom 5, 6 ve 15 üzerindeki polimorfizmin akciğer kanseri riskini etkilediği bilinmektedir (de Mello et al 2013). Akciğer kanseri oluşumu diğer kanserlerle benzerdir, onkojenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile başlayan bir süreçtir. K-ras proto-onkogenindeki mutasyonlar, akciğer adenokarsinomlarının %10-30'undan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Jančík et al 2010). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin yaklaşık %4'ü bir EML4-ALK tirozin kinaz füzyon genini içermektedirler (Sasaki et al 2010).

DNA metilasyonunun değiştirilmesi, histon kuyruk modifikasyonu veya mikro RNA regülasyonu gibi epigenetik değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açmaktadır (Jakopovic et al 2013). Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) hücre proliferasyonunu, apoptozu, anjiyogenezi ve tümör invazyonunu düzenler. EGFR'nin mutasyonları ve amplifikasyonu, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yaygın etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Akciğer kanseri hastalarında sıklıkla mutasyona uğramış veya amplifiye edilmiş diğer genler c-MET, NKX2-1, LKBI, PIK3CA ve BRAF'dir (Jakopovic et al 2013; Sasaki et al 2010). Akciğer kanseri tedavisi, kanserin spesifik türüne, ne kadar yayıldığına ve kişinin sağlık durumuna bağlıdır. Yaygın tedaviler türleri; cerrahi, kemoterapi ve radyasyon tedavisini içermektedir. Akciğer kanserinin hedefe yönelik tedavisinin ilerlemiş akciğer kanseri için önemi artmaktadır (Lemjabbar et al 2015). Erken evre KHDAK vakalarının çoğunda, akciğer lobunun alınması (lobektomi) tercih edilen cerrahi tedavidir. Tam lobektomiye uygun olmayan kişilerde daha küçük bir sub lobe eksizyon (wedge rezeksiyon) yapılabilir. Hastalığın durumuna göre tüm akciğerin çıkarılması (pnömonektomi) yapılmaktadır (Predina et al 2016). Radyasyon

tedavisi; Kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini önlemek için yüksek enerjili X-ışını veya diğer radyasyon türlerini kullanan bir kanser tedavisidir (Remick and Amin 2019). Kemoterapi; Hücreleri öldürerek veya bölünmelerini durdurarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak için ilaçlar kullanan bir kanser tedavisidir (Angahar 2017). Vücudun normal biyolojik işlevi, fazla hücreleri veya hasarlı hücreleri çıkararak ve böylece yeni hücre oluşumunu işaret ederek vücudun hücrelerini yeniler. Aksine, kanser hücreleri apoptoz tarafından kontrol edilmedikleri için kontrolsüz bölünme ve ölümsüzlük derecesinde bir artışa sahiptir (Rodgers et al 2012). Bu nedenle, normal bireylerde hücre çoğalması, hücre ölümü ile dengelenir ve düzenlenir, kanserli kütlelerde, hücre proliferasyonunun hücre ölüm oranına yüksektir. Bulunan kemoterapötik ilaçlardan toplam 132 tanesi FDA onaylıdır (Abbas and Rehman 2018; Rodgers et al 2012). Bu ilaçlar spesifik olarak tümör hücrelerini hedeflemek ve onları genotoksik etki ile öldürmek için tasarlanmıştır (Abbas and Rehman 2018).

Küçük molekül inhibitörleri, küçük boyutları nedeniyle, hücre dışı, hücre yüzeyi ligand bağlayıcı reseptörlerin yanı sıra hücre büyümesi ve metastaz teşviki için aşağı akış sinyalinin iletilmesinde anahtar rol oynayan anti-apoptotik proteinler dahil hücre içi proteinleri hedeflemek için başarıyla kullanılmaktadır. Moleküler hedefli kanser ilacı keşfi üzerine son birkaç on yılda yapılan araştırmalar, kanser tedavisi için klinikte başarılı bir şekilde tanıtilen bir kaç küçük molekülli ilacın kullanımını göstermektedir (Clem et al 2013; Seo et al 2011).

1.1. 6-fosfosfrukto-2-kinaz / fruktoz-2,6-bifosfataz 3 (PFKFB3)

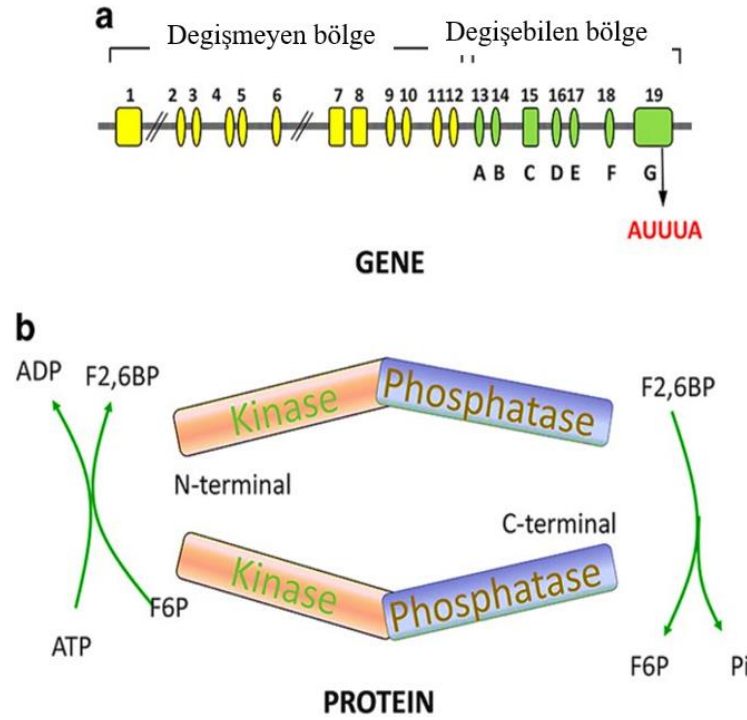
Glikoliz, insan hücre metabolizmasında önemli bir enzimatik süreçtir. Trikarboksilik (TCA) asit döngüsü, pentoz fosfat yolu (PPP) ve yağ asitleri ve kolesterol sentezi gibi çoklu biyokimyasal yollarda gerekli olan substratların üretimine katılır. Normal insan hücrelerinde (kırmızı kan hücreleri hariç), indirgenmiş oksijen koşullarında metabolizmada anaerobik reaksiyonlar baskındır. Bununla birlikte, 1927'de Otto Warburg, tümör mikroçevresindeki oksijen konsantrasyonundan bağımsız olarak kanser hücrelerinde glikolizin önemli bir rolünü bildirdi (Koppenol et al 2011; Otto Warburg et al 1927). Tümör hücreleri enerji ihtiyaçlarını karşılamak için yüksek miktarda glikoz alır ve tüketir, bununla birlikte, tümör hücreleri, oksijenden zengin koşullarda bile, büyük miktarlarda laktik asit

üretmek, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yerine glikozu glikoliz yoluyla metabolize etmeyi tercih eder ; bu fenomene warburg etkisi veya aerobik glikoliz olarak adlandırılmaktadır (Warburg 1956). Kanseri hücresi metabolizmasının bu yeniden programlanması, yalnızca agresif büyümesinden sorumlu değildir, aynı zamanda Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşumunda ve hücre büyümesi için anahtar metabolitlerde faydalı bir azalmaya neden olabilir (Koppenol et al 2011). 1960'larda, termodinamik değerlendirmeleri ve hücre içi metabolit konsantrasyonlarının ölçümlerini içeren glikoliz düzenlemesi üzerine çalışmalar, heksokinaz, PFK-1 ve piruvat kinaz tarafından katalize edilen dengesiz reaksiyonların tanımlanmasına yol açmıştır (Newsholme and Start 1973). 1980'de, ise PFK-1'in güçlü bir allosterik uyarıcısı olan fruktoz-2,6-bisfosfat (Fru-2,6-P2) keşfedilmiştir. Fru-2,6-P2 seviyeleri hepatositlerde glikoz varlığında önemli ölçüde artmış ve glukagon ile inkübasyondan sonra kaybolarak, glikoliz ve glukoneogenez arasında zarif bir geçiş mekanizması sergilemiştir (Hers and Van Schaftingen 1982).

Fru-2,6-P2, PFK-1'in ATP inhibisyonunu baskılar ve AMP ile sinerjistik olarak hareket ederek fruktoz-1,6-bisfosfatazı inhibe etmektedir. Böylece Fru-2,6-P2, fruktoz-6P/fruktoz-1,6-P2 substrat döngüsünün düzenlenmesinde kilit bir rol oynar, keşfi karbonhidrat metabolizmasının nasıl düzenlendiğinin anlaşılmasında bir dönüm noktası oluşturmuştur (Pilkis et al 1995; Rider & Bartrons 2010). Fru-2,6-P2'nin daha sonra diğer dokularda ve çoğalan ve dönüştürülmüş hücrelerde glikolizin kontrolünde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Fru-2,6-P2 sentezi ve bozunması, homodimerik iki işlevli bir enzim olan 6-Fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6 bisfosfataz (PFK-2/FBPase-2) tarafından katalize edilmektedir (Hers and Van Schaftingen 1982; Rider & Bartrons 2010). Glikoliz yoğunluğu, fizyolojik olarak geri dönüşü olmayan üç enzimin aktivitesi ile düzenlenir: heksokinaz, fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) ve piruvat kinaz. PFK-1, glikolizin ana hız sınırlayıcı enzimidir ve fruktoz-6-fosfattan (F-6-P) fruktoz-1,6-bisfosfat sentezinden görevlidir (Bartrons et al 2018). Aktivitesi, adenosin trifosfat (ATP), adenosin difosfat (ADP), F-6-P ve fruktoz-2,6-bisfosfat (F-2,6-BP) gibi sitoplazmik olarak lokalize metabolik ürünler tarafından düzenlenmektedir. Bu bileşiklerden, 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFK 2/FBPase-2, PFKFB) tarafından katalize edilen reaksiyonun bir ürünü olan F-2,6-BP, PFK1 'nin en güçlü pozitif allosterik efektörüdür (Houddane et al 2017). PFK-2/FBPase-2 sırasıyla N-terminal alanı (2-Kase) ve C-terminal alanı (2-Pase) aracılığıyla F-2,6-BP'nin hem sentezinin hem de bozunmasının katalizlenmesinden sorumlu iki işlevli bir

enzimdir. Ayrıca, 2-Kase bölgesinin aktif bölgesi, işlevi için gerekli olan iki farklı alana (F-6-P bağlama döngüsü ve ATP bağlama döngüsü) sahiptir (Lu et al 2017). İnsanlarda PFK-2/FBPase-2, dört farklı gen tarafından kodlanır: PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4. Şimdiye kadar dört farklı PFK-2/FBPase-2 izozimi (PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4) tanımlanmıştır (Ros and Schulze 2013). İzozimler, doku ve fonksiyonel özgüllük ile karakterize edilir. PFKFB1 karaciğer ve iskelet kasında bulunabilir, PFKFB2 kalp kasında baskındır, PFKFB3 her doku ve organdan eksprese edilirken, PFKFB4 esas olarak testislerde bulunmaktadır. İki izozimin (PFKFB3 ve PFKFB4) aşırı ekspresyonu, çeşitli katı tümörlerde ve hematolojik kanser hücrelerinde gösterilmiştir (Yi et al 2019).

PFKFB3 geni, 10p15.1 kromozomunda bulunur ve 15'i rutin olarak eksprese edilen ekzonları kodlayabilen 19 bölge içermektedir (Mahlknecht et al 2003). PFKFB3 geni, sabit ve değişken bölgeler olmak üzere 2 bölgeye ayrılmaktadır. Değişken bölge, A–G adlı yedi ekzon içerir ve bu bölgedeki ekzonlardaki varyasyonlar, altı PFKFB3 izoformuna yol açar. PFKFB3, 3'UTR'sinde AUUUA değişken ögesinin birden çok kopyasını içerir (Mahlknecht et al 2003). Bu genin 5' promotörü, Sp (Spesifik protein) -1, AP (aktivatör protein) -2 bağlanma alanı, HRE (hipoksi yanıt elemanı) ve SRE (serum yanıt elemanı) içermektedir. Bu spesifik bağlanma bölgeleri, glikolizin düzenlenmesinde önemli roller oynar (Navarro et al 2001).

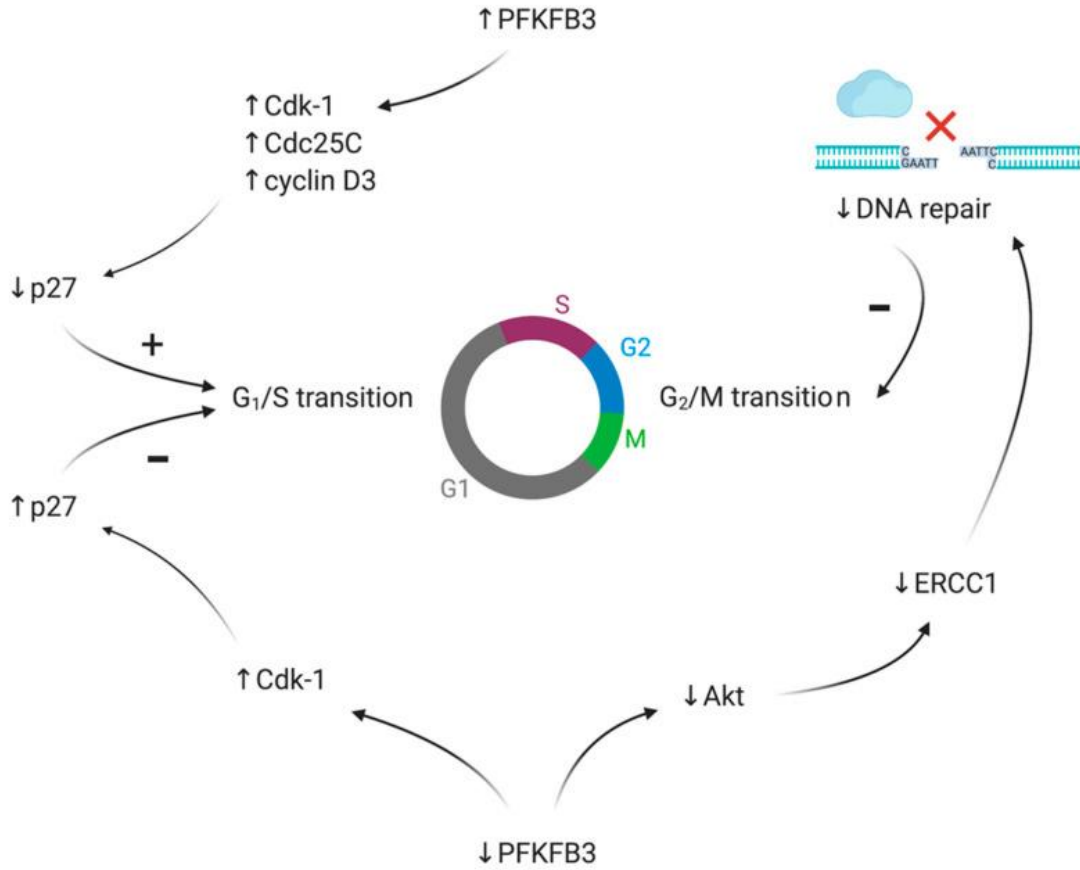


Şekil 1.3. PFKFB3 geni ve proteininin genel yapısı (Shi et al 2017)

PFKFB3 proteini iki homodimerden oluşmaktadır. Monomer yapısı, aynı polipeptit zinciri içinde iki fonksiyonel alana bölünmüştür (Seo et al 2011). C-terminal alanı, enzimin bisfosfataz aktivitesini içermektedir. Bu alan, F2,6P2'nin F6P ve inorganik fosfata (Pi) hidrolitik bozunmasını katalize eder (Cavalier et al 2012). N-terminal alanı, F2,6P2'nin F6P ve ATP'den sentezinden sorumludur. PFKFB3 proteini her yerde ve özellikle çoğalan dokularda, dönüştürülmüş hücrelerde, katı tümörlerde ve lösemi hücrelerinde yüksek seviyelerle eksprese olmaktadır (Macut et al 2019; Shi et al 2017). PFKFB3 ekspresyonu, mitojenik, enflamatuar ve hipoksi uyaranlarına karşı yanıt olarak ve hücre döngüsünün DNA sentezi fazında fazlaca regüle edilebilmektedir (Atsumi et al 2002; Abdullah Yalcin et al 2009). Metabolizmada birçok değişiklik oluşturarak tümör hücrelerinin proliferasyonuna ve hayatta kalmasına neden olmaktadır. PFKFB3'ün onkogen benzeri bir düzenleyici olduğunu yüksek ekspresyonunun, akciğer, mide meme ve diğer kanser türlerinde sıklıkla görülmektedir. PFKFB3'ün inhibe olmasıyla beraber kanser hücreleri etkin bir şekilde kemoterapiye daha yanıt vermektedir (Li et al 2018; Yalcin ve arkadaşları 2014).

1.2. PFKFB3'ün Kanserdeki Rolü

PFKFB3 daha yüksek ekspresyonu, birçok kanser türünde, daha kısa genel sağkalımı veya daha sık metastaz varlığı ile ilişkilidir. Tümör oluşumu, olumsuz bir ortamda hayatta kalmayı sağlayan hücresel metabolizmadaki çeşitli değişikliklere bağlı olduğundan, yüksek oranda glikolitik aktivite gözlenmektedir (Pavlova and Thompson 2016). PFKFB3'ün kanser hücresi proliferasyonundaki rolüne ilişkin ilk gösterge, Atsumi ve arkadaşlarının 2002'de, iPFK-2 mRNA ve protein ekspresyonun G1/S geçişi sırasında ve özellikle S hücre döngüsü fazı sırasında indüklendiğini deşifre etmiştir. Bu bulgular doğrultusunda Calvo ve arkadaşları 2006'da HeLa adenokarsinoma servikal kanser hücrelerinde siRNA kullanılarak PFKFB3'ün susturulmasından sonra önemli bir büyüme hızı düşüşü gözlemişler. Son kanıtların çoğu, PFKFB3'ün sikline bağımlı kinazların (Cdks) ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisine ve dolayısıyla hücre döngüsü durmasına işaret etmektedir. Abdullah ve arkadaşlarının 2009'da PFKFB3'ün ektopik ekspresyonunun, Cdk-1, Cdc25C ve siklin D3 dahil olmak üzere bazı Cdk'lerin upregülasyonuna yol açarken, p27 proteinini aşağı regüle ettiğini göstermişlerdir. 2014 yılında PFKFB3'ün, F-2,6-BP'nin p27 ubiquütisyonunu düzenleyen Cdk-1'in aktivasyonuna aracılık ettiği, PFKFB3 susturmanın ise Cdk-1 aktivitesini inhibe ettiği ve böylece G1/S geçişinden sorumlu p27'yi stabilize ettiği sonucuna varmışlardır (Doménech et al 2015). Ayrıca, PFKFB3 yıkımının HeLa hücrelerinde G1/S'de hücre döngüsü durmasını indüklediği gözlemlenmiştir (Doménech et al 2015). 2018 yılında PFKFB3'ün kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde bir etkisi olduğu başka bir olası sinyal yolunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmada, PFKFB3 yıkımı, DNA onarım fonksiyonlarını bozarak hepatoselüler karsinom hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve bu da G2/M fazı hücre döngüsü durmasıyla sonuçlanmıştır (Shi et al 2018).

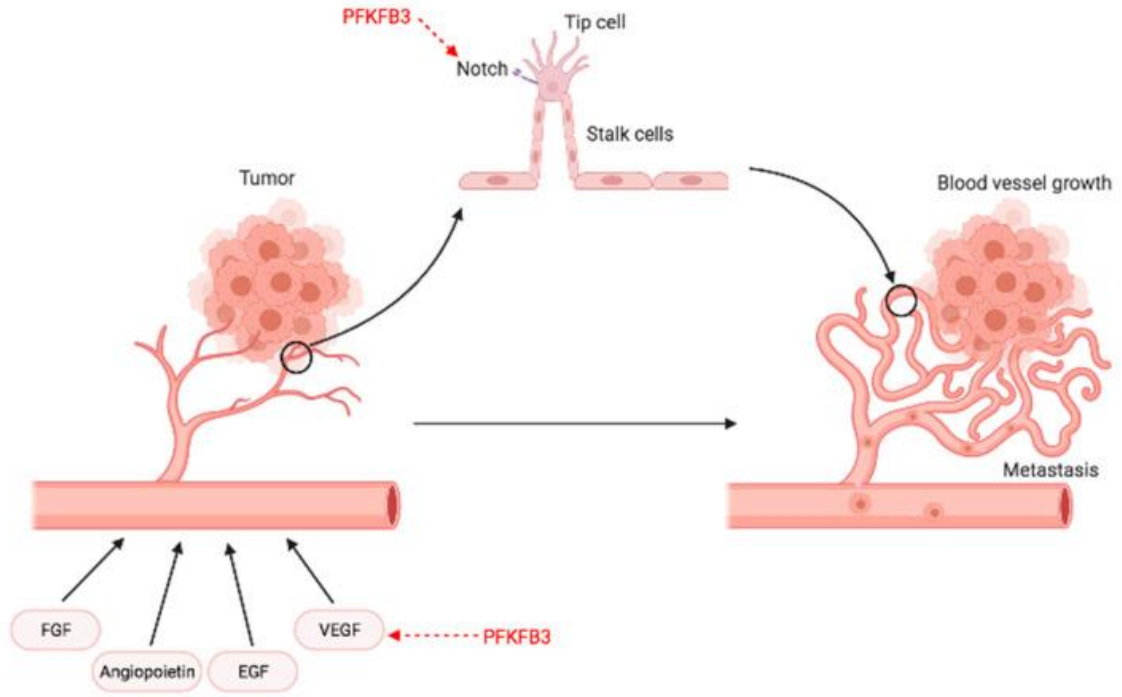


Şekil 1.4. PFKFB3 proteininin hücre döngüsündeki görevi (Kotowski et al 2021)

Bu protein, DNA onarımı için gerekli bir protein olan ERCC1 ekspresyonunun aşağı regülasyonunun sonucu olabileceği öne sürülmüştür. PFKFB3'ün down regülasyonunda, Akt ekspresyonunun azalması neden olmaktadır (Shi et al 2018). Sunulan bazı PFKFB3 inhibitörlerinin neden farklı hücre döngüsü fazlarında hücre döngüsü durmasını indükleyebileceğini açıklayabilmektedir. 3PO (geliştirilen ilk PFKFB3 inhibitörü), Jurkat hücrelerinde (insan T lenfosit hücrelerinin ölümsüzleştirilmiş bir hattı) G2/M fazı durmasını indükleyebilmektedir, 3PO ayrıca A375 insan melanom hücrelerinde G0/G1 faz hücre döngüsü durmasını indükleyebileceğini göstermektedir (Clem et al 2008; Kotowski et al 2020).

PFKFB3, otofaji ölüm yolağının düzenlenmesinden de önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca meme kanseri, tümörlerinde vasküler endotelial büyüme faktörü α (VEGF α) proteinini azaltarak hücrelerin anjiyogenezinin engellendiği bildirilmiştir (Peng et al; Lu et al). PFKFB3'ün küçük molekül inhibitörü olan PFK15, hücre döngüsü

tutuklamasını ve programlı hücre ölüm yolu-1 indükleyerek ve mide kanserinde invazyonu önlediği bildirilmiştir (Zhu et al 2016). Yetersiz glikoz otofajiyi indüklemekte ve S6 veya ATP'nin baskılanmasını ve/veya ROS'taki bir artışın her biri otofajide bir artışa neden olmaktadır. Bu nedenle, PFKFB3'ün yıkılması nedeniyle glikoz alımındaki azalmanın HCT-116 hücrelerinde benzer şekilde otofajiyi aktive ettiği rapor edilmiştir (Klarer et al 2014).



Şekil 1.5. PFKFB3 proteinin anjiogenez ve metastaz üzerindeki etkisi (Kotowski et al 2021)

PFKFB3 protein düzeyleri VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) aktivitesine aracılık ederek anjiyogenezi etkiler, burada PFKFB3 yukarı regülasyonu, artmış VEGF aktivitesi ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, PFKFB3'ün susturulması anjiyogenezi bozmakta, PFKFB3'ün aşırı ekspresyonu, Notch'un pro-sap aktivitesini geçersiz kılmaktadır (Kotowski et al 2021). Endotel hücreleri (EC'ler), ATP üretimi için oksidatif fosforilasyondan ziyade glikolize dayanmaktadır; EC'lerde glikolitik aktivatör PFKFB3'ün kaybı damar oluşumunu engellemektedir (De Bock et al 2013).

PFKFB3'ü bloke ederek glikolizin kısmi ve geçici inhibisyonunun, sistemik etkilere neden olmadan oküler veya inflamatuvar hastalık gibi patolojik anjiyogenezi inhibe ettiği

bilinmektedir (Cantelmo et al 2016; Schoors et al 2014). Son yıllarda, glikolizin temel düzenleyici adımlarını hedeflemek, bilim adamları arasında giderek artan bir ilgi alanı haline geldi. Bu süreçte farklı moleküler hedefleri etkileyen yeni inhibitörler hakkında birçok çalışma bulunmaktadır (Fortunato et al 2018). Küçük boyutları nedeniyle, hücre dışı, hücre yüzeyi ligand bağlayıcı reseptörleri ve hücre büyümesi ve metastaz teşviki için aşağı yönlü sinyalleşmesinin iletilmesinde anahtar rol oynayan anti-apoptotik proteinler dahil hücre içi proteinleri hedeflemek için başarıyla kullanılmaktadır. Moleküler hedefli kanser ilacı keşfi üzerine son birkaç on yılda yapılan araştırmalar, kanser tedavisi için klinikte başarılı bir şekilde tanıtılan bir dizi küçük moleküllü ilaçla sonuçlanmıştır (Lavanya et al 2014).

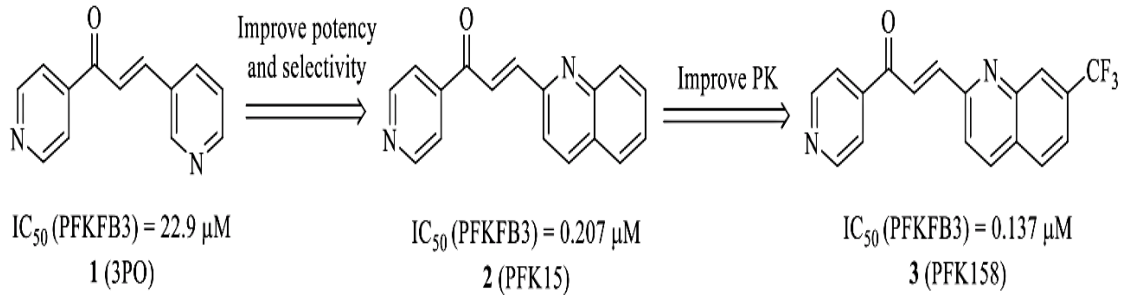
1.3. PFKFB3 İnhibitörleri

1.3.1. (3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO)

PFKFB3, kanser hücrelerinin enerji metabolizmasındaki rolünün deşifre edilmesinin ardından geliştirilen, PFKFB3 hedefli ilk kullanılan küçük moleküllü inhibitör 3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO)'dur, bu molekül PFKFB3 proteinini inhibe eden işlevsel bir inhibitördür. Bu molekülün tek bir ajan olarak kullanıldığında Jurkat T lösemi hücre proliferasyonunu bloke ettiği ve çoklu kinaz inhibitör alt birimleri ile kombinasyon halinde kullanıldığında belirgin bir sinerji gösterdiği rapor edilmiştir (Murár et al 2018). *In vivo* bir çalışmada fare tümör modelinde 3PO, 70 mg / kg dozunda hücre içi F2,6BP seviyesini ve glikoz alımını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu küçük molekül inhibitörünün düşük dozda (25 mg / kg) PFKFB3 inhibisyonuna yol açarak, tümör damarı normalizasyonunu indüklediğini ve tümör hücresi damarlanması ve metastazında bir azalmaya neden olurken, yüksek dozda 3PO (70 mg/kg) doğrudan kanser hücresi ölümüne neden olması yerine proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır. 3PO'nun zayıf çözünürlüğü ve seçiciliği ile yüksek etki elde etmek için gereken yüksek doz nedeniyle, 3PO klinik çalışmalarda daha fazla değerlendirilmemiştir (Houddane et al 2017).

1.3.2. (1-(4-pyridinyl)-3-(2-quinolinyl)-2-Propen-1-one) (PFK15)

3PO'nun klinikteki doza bağımlı olumsuz sonuçları ardından bu molekülün daha etkili bir türevi olan piridin parçasının bir kinolin halkası ile bir araya getirilmesi sonucu PFK15 getirilmiştir. PFKFB3'e karşı 3PO'dan yaklaşık 100 kat daha güçlü ($IC_{50} < 0.207 \text{ mM}$) bir etki sergilediği bildirilmiştir. Hem 3PO hem de PFK15'in ATP bağlanma sahasına bağlandığını, ancak PFK15'in kinolin azotunun ilave bir etkileşim oluşturabileceğini ve böylece PFKFB3 ile sıkı bağlanmasını geliştirebileceğini ileri sürülmüştür (Clem et al 2013). Ayrıca, PFK15, doza bağlı bir şekilde glikoz alımını ve hücre içi F2,6BP, ATP, laktat seviyelerini önemli ölçüde azaltma ve otofaji inhibisyonuna yol açtığı ortaya çıkarılmıştır. PFK15 ayrıca çeşitli *in vivo* tümör modellerinde güçlü antitümör aktiviteleri sergilediği ve PFK15'in bir antidiyabetik ilaç olan fenformin ile kombinasyonun sinerjistik anti tümör etkileri gösterdiği bildirilmiştir (Clem et al 2013; Houddane et al 2017).



Şekil 1.6. PFKFB3 inhibitörleri (Wang et al 2020)

1.3.3. 1-(4-pyridinyl)-3-[7-(trifluoromethyl)-2E-quinolinyl]-2-propen-1-one (PFK-158)

Bir PFK15 türevi olan PFK-158, faz 1 klinik çalışmalarında kullanılan ilk PFKFB3 inhibitörüdür. PFK-158, 3PO ve PFK15 ile karşılaştırıldığında deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda olumlu bir etki göstererek prelinik terapötik tedavi ile sonuçlanmıştır (Redman et al 2015). Ayrıca PFK158'in, akciğer, göğüs, yumurtalık, glioblastom, pankreas ve kolon kanseri türlerinde antitümör aktivite göstermesi ve tümör büyümesi inhibisyonuna yol açan PFKFB3'ün güçlü ve spesifik bir inhibitörü olduğunu belirlenmiştir. Ek olarak,

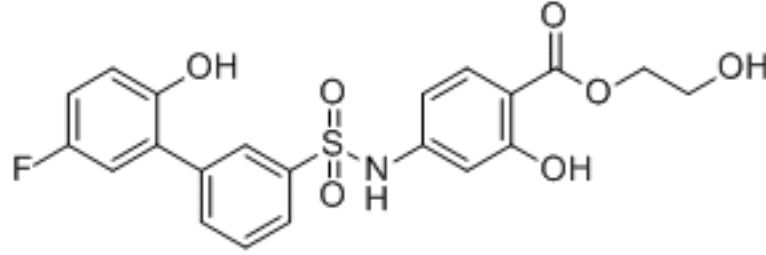
PFK158, PFK15'e kıyasla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar'da şaşırtıcı derecede üstün etkinlik ve farmasötik özellikler gösterdiği rapor edilmiştir (Redman et al 2015).

1.3.4. KAN0438757

PFKFB3 geninin (PFKFB3) protein ürünü, tümörlerde aşırı eksprese edilmesi nedeniyle, nedeniyle birçok küçük molekül inhibitör hedefi haline gelmektedir. Kanser tedavisinde yeni bir umut verici PFKFB3 inhibitörünün keşfi ile tümör hücrelerini direk olarak hedefe duyarlı yok etme ve birden fazla hücreyel mekanizmanın aktive edilmesi küçük molekül inhibitörünün etkinliğinin kat ve kat artırdığının bir göstergesidir. Yeni küçük molekül inhibitörün(KAN0438757) DNA hasar yanıt mekanizmasında, Homolog rekombinasyonda görev alan proteinleri direk hedef alması ve DNA metabolizmasındaki önemli derecedeki etkinlikleri sayesinde hücre döngüsünü(G2-M) evrelerinde tutuklamaya iterek hedeflenmiş tedavi önemli ve güçlü bir seçenek haline dönüştürmektedir (Gustafsson et al 2018). Özellikle bu inhibitörün hücre döngüsü ve DNA metabolizmasındaki rolü düşünüldüğünde diğer kullanılan inhibitörlere göre birden fazla yolağı etkileşimi güçlü bir yeni nesil küçük molekül inhibitörü olduğunu ortaya koymaktadır. Hücre döngüsü üzerindeki etkisi sayesinde kanser hücrelerini direk hedefleyerek programlı ölüm yollarını kısa sürede aktive ederek kanserli hücrenin ölümüne yol açar, böylelikle tümörün invazyon ve metastaz yapma ihtimalleri ortadan kalkar (Peng et al 2018). Bu inhibitörün diğer üç küçük molekül inhibitörüne göre daha düşük dozlarda ve maksimum etki yapabilme kabiliyeti sayesinde hücre içinde minimum dozu ile maksimum düzeyde etki göstererek birçok kanser türünde yeni bir güncel ve etkili bir kemoterapi ajanı haline gelebileceği öne sürülmüştür (Clem et al 2013; Gustafsson et al 2018; Zhu et al 2016).

Özellikle akciğer kanserlerinde sıklıkla karşılaşılan durumlardan biri olan aşırı eksprese olmuş PFKFB3 geni kanserli hücrelerin temel enerji ihtiyaçlarının fazlasını karşılayarak hücreler kontrolsüz şekilde artması, tedavide olumsuzluklara yol açmakta fakat güçlü bir PFKFB3 inhibitörü KAN0438757 ile kanserli hücrelerin temel metabolik yollarında görevli PFKFB3 proteinin ekspresyonunda önemli düzeyde azalmaya yol açması enerji metabolizmasını negatif yönde etkileyebileceği bildirilmiştir (Clem et al 2013; Gustafsson et al 2018; Murár et al 2018; Redman et al 2015; Wang et al 2018). 2021 yılında yapılan bir çalışmada KAN0438757 'nin HUVEC ve kolorektal kanser hücrelerinin enerji

metabolizmasını etkilemesi ve PFKFB3 inhibisyonu sonucu hücresel büyümenin yavaşlaması, hücre canlılığını azaltması ve konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre ölümünü indüklemesi ile güçlü bir yeni nesil PFKFB3 inhibitörü olarak rapor edilmiştir (Oliveira et al 2021).



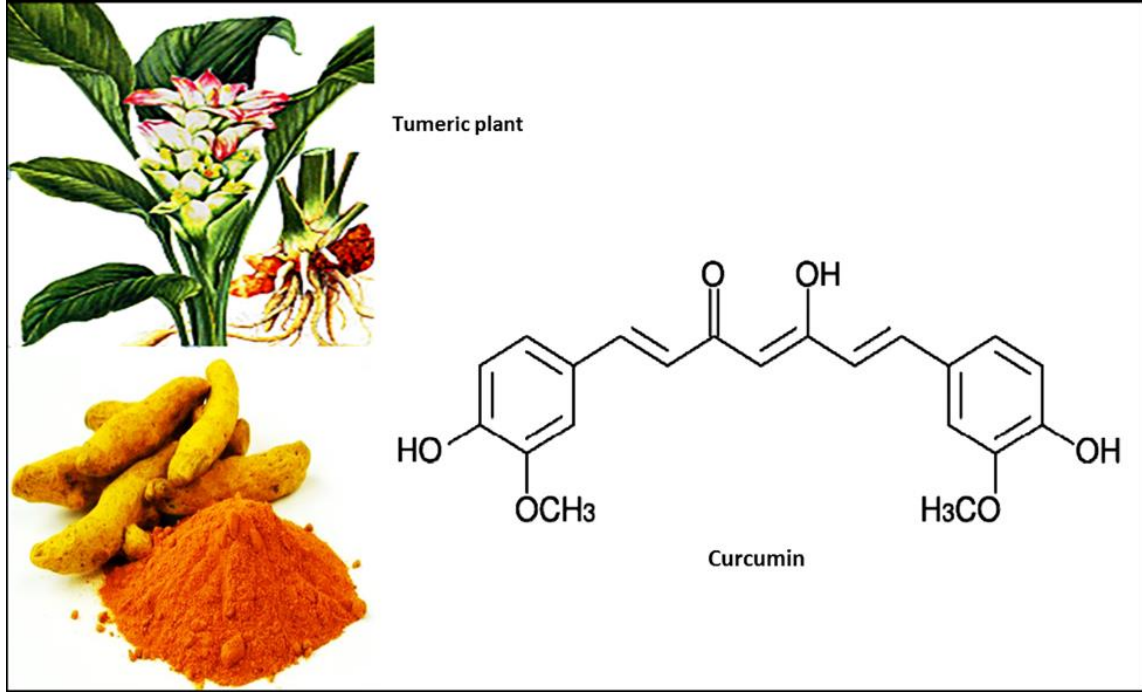
Şekil 1.7. KAN0438757 (Oliveira et al 2021)

1.4. Kurkumin

Nutrasötikler, yaprak, tohum ve meyve gibi doğal ürünlerden elde edilen polifenollerdir. Bu polifenollerin, bitki bağışıklık sisteminde hayati bir rol oynadığı ve bu da onları kanser de dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıklar için potansiyel terapötikler haline getirdiği bilinmektedir. Şu anda kanser tedavisi için kullanılan kemoterapötiklerin çoğu bitki kaynaklarından elde edilmektedir (Tapas et al 2008). Birçok polifenol, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozu indükleyebilme yeteneğine sahiptirler (Manach et al 2004). Başlangıçta polifenoller, antioksidan özelliklerinden dolayı kanser tedavisinde ilgi görmüşlerdir (Scalbert et al 2005). Son araştırmalar polifenollerin proteinler, enzimler, reseptörler ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girebileceğini ve böylece doğrudan moleküler düzeyde fizyolojik değişikliklere yol açabileceğini göstermektedirler (Manach et al 2004).

Son yıllarda zerdeçalda (*curcuma longa*) bulunan ve “*curcuma domestica*” olarak da bilinen aktif bileşenlerin kanser önleyici etkisine çok dikkat edilmiştir. Bu zencefil ailesinin (Zingiberaceae) çok yıllık otsu bir bitkisidir (Priyadarsini 2014). Bu bitkinin 300'den fazla aktif bileşeni arasında, araştırmalar, kökünden elde edilen ve sarı veya turuncu bir pigment ile karakterize edilen bir madde olan kurkuminin özelliklerine odaklanmıştır. Kurkumin, Asya'da, özellikle geleneksel Hint tıbbında (Ayurveda) 2500 yıldan daha eskiye dayanan

çeşitli hastalıkların tedavisi için yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Çeşitli cilt hastalıkları, yaralar, sinüzit, göz enfeksiyonu, romatizma, hazımsızlık, stres ve depresyon, peptik ülser ve bağırsak sendromu ve plasental hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli sağlık sorunları için kullanılmıştır (Unlu et al 2016).



Şekil 1.8. Curcuma Longa bitkisi ve Kurkuminin kimyasal yapısı (Alrawaiq and Abdullah 2014)

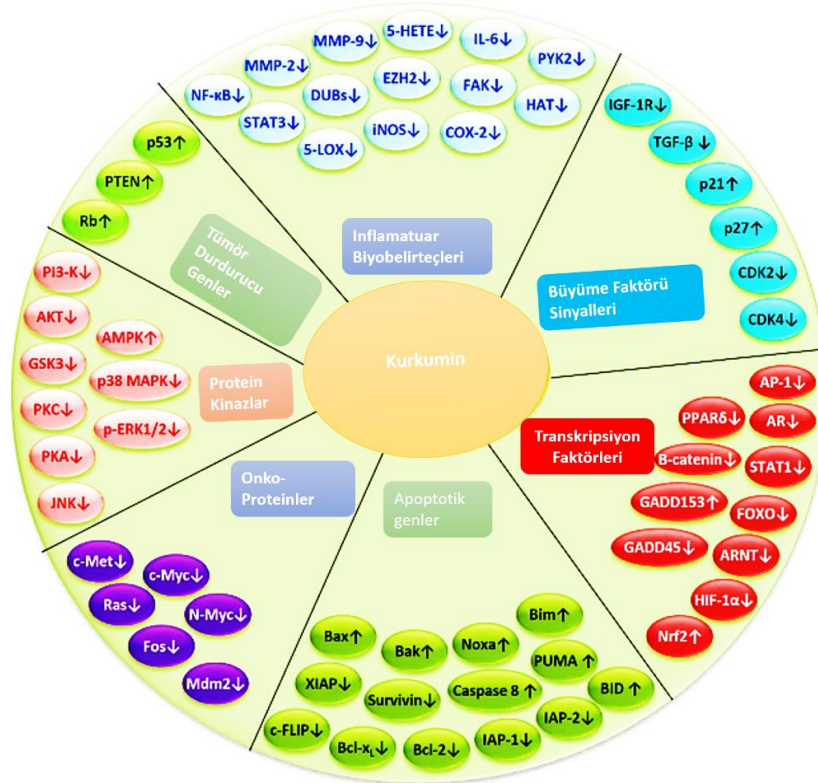
Kurkuminin kimyasal yapısı, yedi karbonlu bir keto-enol bağlayıcı ile bağlanan hidroksil ve metoksil grupları ile ikame edilmiş iki fenil halkasından oluşur. Yapısal olarak keto ve enol olmak üzere en az iki totomerik formda bulunabilir ve antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, antiviral, antibakteriyel ve antidiyabetik özelliklere sahiptir (Begum ve ark 2008). Kurkumin, apoptozun indüklenmesi ve kanser hücrelerinin S, G2 / M hücre döngüsü fazında tutulması yoluyla karsinogenezin yükselme / ilerleme aşamasını inhibe etmektedir. Ayrıca bileşik, büyüme faktörü reseptörlerinin aktivitelerini düşürmektedir (Ali ve ark 2006). Kurkumin süperoksit radikalini, hidrojen peroksidi ve nitrik oksiti temizler ve lipid peroksidasyonunu durdurmaktadır (Zheng et al 2018). Ayrıca Kurkuminin ROS'u arttırdığı ve bunun da DNA hasarı ve apoptoz ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Kurkumin, mevcut kemoterapötik ajanların etkinliğini artıran çeşitli moleküler hedefleri ve sinyal yollarını etkileyebilmektedir. Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), β -katenin, NF- κ B, p38

MAPK, DNA (sitozin-5)-metiltransferaz-1, COX-2, 5 gibi çok sayıda farklı protein ile etkileşime girebilir. -lipoksijenaz, PGE2, FOXO3, indüklenabilir NOS, ROS, siklin D1, VEGF, glutatyon, sitozolik PLA2, p-Tau (p- τ) ve TNF- α . Kurkuminin bu yeteneği, farklı kronik hastalıklarla bağlantılı çoklu hücre sinyal yollarının seçici modülasyonunu kolaylaştırır, bu da güçlü birçok hedefli polifenol olduğunu kuvvetle göstermektedir.

1.4.1. Antikanser Etki

Kurkumin'in diğer moleküler hedefler arasında büyüme faktörleri, sitokinler, protein kinazlar, enzimler, transkripsiyon faktörleri ve anti-apoptotik proteinlerle etkileşime girme yeteneği, bir anti-kanser ilacı olarak kullanımının araştırılmasına yol açmaktadır. Kurkumin, meme, kolorektal, akciğer, prostat, servikal ve ayrıca lösemiler ve lenfomalar dahil olmak üzere birçok kanserin tedavisinde etkili bir yere sahiptir (Rani and Yadav 2018). Kanser, çeşitli biyokimyasal yolların ve yüzlerce molekülün kuralı dışı olduğu çok aşamalı bir süreçtir. Bunlara büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, sitokinler, enzimler ve apoptoz ve proliferasyonu düzenleyen genlerde dahil olmaktadır ve kurkuminin kanserde yer alan birçok molekülü hedef aldığı bilinmektedir (Zhou et al 2012). Kurkumin'in NF- κ B üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Çünkü tümör hücrelerinde NF- κ B'nin aktivasyonu normal hücrelerden nispeten daha yüksektir ve antiapoptotik genler, metastaz, tümör gelişimi ile ilgili süreçlerde rol oynar (Wilken et al 2011). Kurkumin ile muamelenin bir sonucu olarak, NF- κ B, I κ B (NF- κ B inhibitörü) ile bağlanmayı sürdürme eğilimindedir, çünkü kurkumin, I κ B'nin fosforilasyonunu ve bozulmasını engeller. Bu nedenle, inaktive edilmiş NF- κ B/I κ B kompleks sitoplazmada tutulur ve çekirdeğe giremez. Sonuç olarak, siklin D1, COX-2 ve Bcl-2 dahil olmak üzere NF- κ B'nin genetik ürünlerinin kanserle ilişkili ifadesi, çeşitli tümör hücrelerinde kurkumin tarafından aşağı regüle edilmektedir (Hussain et al 2008; Wilken et al 2011). Conboy ve arkadaşları 2009'da moleküler modelleme yaparak ve kurkuminin PKC ile etkili bir şekilde bağlanabildiğini belirlemişlerdir ve kurkuminin, bir protein kinaz C deltasının (PKC) bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Conboy et al 2009). Mingzhong Zheng ve arkadaşları 2004'de kurkuminin, NF- κ B'nin aşağı regülasyonu ve p53 tümör baskılayıcı proteinin artan seviyelerine yanıt olarak hücre döngüsü durmasını ve melanom hücre hatları A375 ve MeWo'nun apoptozunu indükleyebileceğini bildirmişlerdir. Normal hücrelere kıyasla akciğer, meme tümör hücrelerinde yüksek oranda

eksprese edilen bir transkripsiyon faktörü olan Sp-1'in koaktivatörler ve ko-represörlerle etkileşime girdiği ve böylece hücre döngüsü ve karsinogenez dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonu aktive ettiği gösterilmiştir (Mingzhong Zheng et al 2004). Son veriler, kurkumin'in kolorektal kanser hücre dizilerinde Sp-1 aktivasyonunu ve ADEM10, kalmodulin (CALM), EPHB2, HDAC4 ve SEPP1 dahil olmak üzere aşağı akış genlerini baskılayarak hareket edebileceğini ileri sürmüştür; bu sonuçlar, kurkuminin mesane kanserinde Sp-1 aktivitesini baskılayabildiğini ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHKDAK) hücrelerinde Sp-1'in DNA bağlama aktivitesini azaltabileceğini bildiren diğer çalışmalarla tutarlılık göstermektedir (Chen et al 2013; Vallianou et al 2015).



Şekil 1.9. Kurkumin tarafından hedeflenen proteinler (Hasima and Aggarwal 2012)

Kurkuminin, akciğer kanseri tedavisinde en önemli terapötik etkinliğini, insan akciğer kanseri hücre hatları A549'da NF-κB'nin regülasyonunu azaltması yoluyla ve ayrıca JAK2/STAT3 sinyal yolu üzerinde hareket ederek, JAK2 aktivitesini inhibe ederek sergilediği bildirilmiştir (Wu et al 2015). Kurkumin ayrıca COX-2, EGFR ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) 1/2 aktivitelerinin ekspresyonunu baskılayarak akciğer

adenokarsinom hücrelerinde proapoptotik aktivitesini sergileyerek, artmış apoptoz ve akciğer adenokarsinom hücrelerinin sağkalımının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (LevAri et al 2006). Programlı hücre ölüm yolağı-2 olan otofajide kurkumin antikanser etkisi ile beraber PI3K / mTOR aktivasyonu engellenip, LC3-II'nin LC3-I'e oranının ve Beclin-1'in protein seviyelerinin arttığı akciğer kanseri tedavilerinde önemli bir yol kat edildiğinin göstergesidir (Zhou et al 2014). Kurkumin ayrıca kanserli hücrelerde DNA hasarının artmasına ve hücre içi ROS miktarını artırarak ER bağımlı ve normal apoptozisin aktifleşmesine aracılık etmektedir. Önemli bir hücre döngüsü regülatörü olup G(1)/S and G(2)/M evrelerinde tutuklamaya yol açarak hücre döngüsünün tamamlanması engellemektedir (Lee and Kim 2009). Kurkumin normal hücrelerde toksik etki göstermemesi, molekül ağırlığının düşük olması ve tümör hücrelerinin gelişimini engellemede yüksek aktiviteye sahip olması sebebiyle, yeni nesil kemoterapötik tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir yere sahip olmaktadır (Jurenka 2009; Zhang et al 2018; Aggarwal and Bharti 2003).

1.4.2. Kurkumin ve DNA Hasarı

Kurkumin kanserli hücrelerde DNA hasarında bir aktivatör olarak görev alarak, mitokondride ROS üretimini indükler ve sitokrom C'nin mitokondrinin iç membranından sitozole doğru çıkışını sağlayarak kaspaz yolunu aktive ederek kanser hücresinde ROS bağımlı olarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Chen et al 2010). Kurkumin, BRCA1, MGMT, MDC1 ve 14-3-3σ gibi bazı DNA onarım proteinlerinin seviyelerini azaltarak devamlı bir DNA hasar birikmesine yol açmaktadır, ancak fosforile edilmiş p53 ve γH2AX gibi DNA hasar proteinlerin seviyelerini yükselterek sitotoksositeye, çekirdeğin yoğunlaşmasına ve DNA hasarının oluşmasından sorumludur (Lagunas & Bermúdez 2020).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Laminar Flow	ESCO
Shaker	LAB COMPANION
Hassas Terazı	DENVER
Manyetik Karıştırıcı	IKA
CO ₂ İnkübatörü	ESCO
Otomatik Pipet	SCI LOGEX
-20+4 Buz Dolabı	Arçelik
-80 Dondurucu	Glacier
Buz Makinesi	HOSHIZAKI
Santrifüj	HERMLE
Otoklav	HIRAYAMA
Spektrofotometre	Spectramax Plus
Elisa Cihazı	SPECTRA MAX
Roller	IKA C-MAG HS 7
İnvert Mikroskop	OLYMPUS CKX41
Elektroforez Cihazı	BIO-RAD
Sıcak Su Banyosu	MUVE BATH
pH Metre	HANNA
thermomixer	EPPENDORF
Vortex	VORTEX 2 GENE
Mikro Pipet(10-20-100-1000ul)	EPPENDORF
X-Ray görüntüleme cihazı	CARESTREAM

Tablo 2. Kullanılan sarf malzemeler

5-10 ML SEROLOJİK PİPET	GREINER
Flask (25-75-150)	LABSOLUTE
Petri Dish(30-60-100mm)	LABSOLUTE
Pipet Uçları (10-200-1000 µl)	VARTEX
Eppendorf Tüp	Microcult
Well Plate(6-12-96'lı)	LABSOLUTE, COSTAR, NST
Mikroskop Lam	ISO LAB
Mikroskop Lam	ISO LAB
X-Ray film	Carestream
5-10 ML SEROLOJİK PİPET	GREINER
Flask (25-75-150)	LABSOLUTE
Petri Dish(30-60-100mm)	LABSOLUTE
Pipet Uçları (10-200-1000 µl)	VARTEX
Eppendorf Tüp	Microcult
Well Plate(6-12-96'lı)	LABSOLUTE, COSTAR, NST
Mikroskop Lam	ISO LAB
Mikroskop Lam	ISO LAB
5-10 ML SEROLOJİK PİPET	GREINER
Flask (25-75-150)	LABSOLUTE
Petri Dish(30-60-100mm)	LABSOLUTE
Pipet Uçları (10-200-1000 µl)	VARTEX

Tablo 3. Kullanılan kimyasallar

Tris	SIGMA
Glycine	SIGMA
Crystal Violet	SIGMA
Metanol	MERCK
Etanol	MERCK
TEMED	SIGMA

APS	SIGMA
SDS	SIGMA
Twen-20	SIGMA
TritonX-100	SIGMA
WST-1 Kiti	BOSTER BIO
Yağsız Süt Tozu	SIGMA
Acridine orange	SIGMA
Etidyum Bromür	SIGMA
Kurkumin	MERCK
PFKBF3 İnhibitörü Küçük Molekül KAN0438757	MedChemExpress
SİSPLATİN	KOCAK FARMA
DMSO	SIGMA
NaOH	SIGMA USA
DEMEM	GIBCO
RPIM	GIBCO
DPBS	GIBCO
Tripan Blue	GIBCO
Tripsin	GIBCO
Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO
Penisilin	GIBCO
Streptomisin	GIBCO
GAPDH(sc-365262)	SANTACRUZ
P53(sc-126)	SANTACRUZ
BAX	SANTACRUZ

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültürü, fizyolojik koşullarda ökaryotik hücrelerin sıcaklık, nem, besin maddeleri gibi koşulları laboratuvarında ve özel kaplarda kontaminasyondan uzak tutarak uygun bir yapay ortamda büyütüldüğü süreçtir. Kültürlenmiş hücrelerin deneysel uygulamaları, *in vitro* olarak çoğaltılabilen hücre tipleri kadar çeşitlidir. İnsan akciğer kanser hücre hatları A549 ve H1299 Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC, ABD) satın alınan hücreler %5 CO₂ inkübatöründe (ESCO, ABD) 37 ° C'de %10 Fetal sığır serumu (FBS, Sigma, ABD; kat. No. F7524) ile DMEM tam ortamında çoğaltıldı. Ortam ayrıca 64 ug / ml penisilin (kat.No. A1837.0010) + 0.1 mg / ml streptomisin (kat.No. A1852.0025; her ikisi de VWR, ABD) antibiyotik çözeltisi ile desteklendi.

2.2.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması

Biyogüvenlik kabin içerisinde, kullanılacak besiyeri, 0.22 um gözenekli pess membran filtre(WVR) kullanılarak hazır hale getirildi. Filtre çalışması sırasında konulacak besi yeri tamamlayıcıların hepsi %70 etil alkol kullanılarak biyogüvenlik kabin içerisine alındı. Hazırlanılacak besiyeri miktarı 554 ul ve bunun için %10 FBS(fetal sığır serumu), %1 penisilin streptomisin(64 ug / ml penisilin (kat.No. A1837.0010) + 0.1 mg / ml streptomisin (kat.No. A1852.0025) ilavesi yapıldı. Yüksek glukoz içeriğine sahip DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO,4,5g/L D-Glucose, L-Glutamine,110 mg/L Sodium Pyruvate) totalde 554 ul tamamlanmış oldu.

Tablo 4. Besi yerinde kullanılan bileşikler

İçerikler	%	Kullanılan Hacim(ml)
DMEM	89	500
FBS	10	50
Penilisin/ Streptomisin	1	4
Total Besi Yeri	100	554

2.2.1.2. A549 ve H1299 Hücrelerinin Çözülmesi ve Ekimi

Sıvı azot tankında mufaza altına alınan A549 ve H1299 hücreleri burada uzun bir süre boyunca saklanılabilir. Karyotüp tüp içerisinde saklanan hücreler biyogüvenlik içerisinde alınmadan önce bir kaç dakika steril su banyosu içerisinde bekletildi, Kabin içerisinde alınan karyotüp içerisinde bir miktar medium konularak çözülme işlemi yapıldı, ve tüm hücre çözeltisi toplanılarak 15ml falcona aktarılarak 4 dakika +4°C’de 2500 RPM2 de santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işlemi sonrası falcon içerisinde süpernatant kısım atılarak pellet kısım bir miktar medium ile homojen şekilde karıştırılarak 75cm flask içerisinde bırakılarak total hacim 10ml olacak şekilde medium eklenildi. Daha sonra CO₂ inkübatörüne alınarak hücrelerin çoğalması beklenildi.

2.2.1.3. A549 ve H1299 Hücrelerinin Pasajlanması

Pasajlama olarak da adlandırılan alt kültürleme, ortamın çıkarılması ve hücrelerin önceki bir kültürden taze büyüme ortamına aktarılmasıdır, hücre hattının daha fazla yayılmasını sağlayan bir prosedür. Kültürdeki hücrelerin büyümesi, ekimden sonraki gecikme fazından hücrelerin katlanarak çoğaldığı log fazına kadar ilerler. Yapışkan kültürlerdeki hücreler mevcut tüm substratı işgal ettiğinde ve genişleme için yer kalmadığında veya süspansiyon kültürlerindeki hücreler, ortamın daha fazla büyümeyi destekleme kapasitesini aştığında, hücre proliferasyonu büyük ölçüde azalır veya tamamen durur. Sürekli büyüme için en uygun yoğunlukta tutmak ve daha fazla çoğalmayı teşvik etmek için kültür bölünmeli ve taze ortam sağlanmalıdır.

2.2.1.4. A549 ve H1299 Hücrelerinin Dondurulması

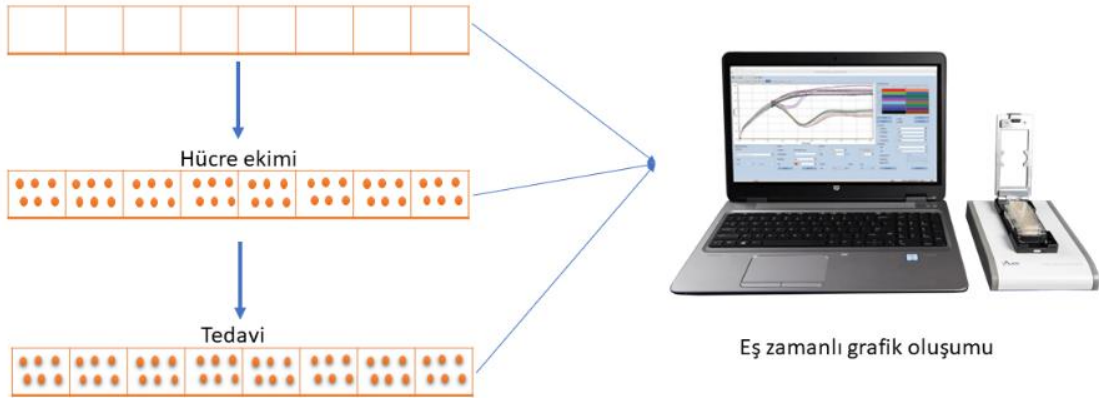
Memeli hücrelerini her zaman ve uzun süre sağlıklı bir şekilde kullanılması için belirli periyotlarda hücrelerin dondurulması gerekmektedir. Hücreleri pasajlama yapıldığı zamanlarda bir miktar hücre -80 veya -196 saklanır. A549 ile H1299 hücreleri normal şekilde tripsin ile kaldırıldı ve santrifüj işlemi yapıldı. Hücreleri dondurmak için freze medium gereklidir; 1ml DMSO, 9ml FBS ile toplam 10 ml şeklinde hazırlandı. Hücreler kontaminasyon uzak bir şekilde kabin içerisinde özel dondurma tüpleri kullanıldı. Santrifüj sanrası supernatant uzaklaştırıldı ve üzerine freze medium eklenerek çözündürülme yapıldı. Hücre miktarına bağlı olarak her bir tüpe 1 ml hücre konuldu ve direk -80 dondurucuya bırakıldı.

2.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Tetrazolyum tuzları, hücresel enzimler tarafından formazana bölünür. Canlı hücrelerin sayısındaki bir genişleme, numunedeki mitokondriyal dehidrojenazların genel aktivitesinde bir artışa neden olur ve bu da oluşan formazan boya miktarını artırır. Metabolik olarak aktif hücreler tarafından üretilen formazan boyasının miktar tayini, spektrofometre kullanılarak yapılmaktadır (Ishiyama et al 1993). Logaritmik fazdaki hücreler toplandı. Hücreler sayılarak 96 kuyulu bir mikrotiplerde her kuyuya 100 µl hücre süspansiyonu (3×10^2 hücre/kuyu) ekim yapıldı. Tek katmanlı hücreler gece boyunca bir CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübe edildi (her kuyunun hücre sayısı hücre boyutuna ve çoğalma hızına bağlıdır). 24 Saat sonra hücreler KAN0438757 ve kurkumin ajanları ile ayrı ayrı ve kombine şeklinde tedavi edilerek belirlenen tedavi süresince hücreler CO₂ inkübatöründe bekletildi. Daha sonra her kuyucuğa 10 µL WST-1 Reaktifi eklenildi ve 4 saat inkübe edildi. 450 nm veya 420-480 nm'de bir mikrotiplerde okuyucu kullanarak absorbansı ölçüldü.

2.2.3. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

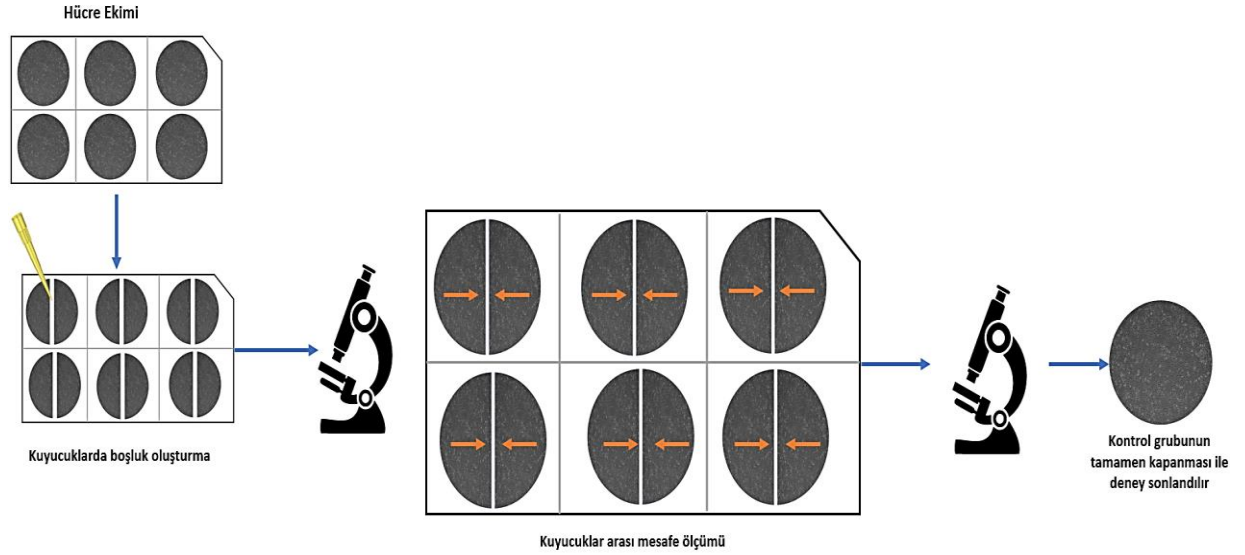
Küçük molekül inhibitörü KAN0438757 ve kurkumin'in Akciğer kanser hücre hattındaki hücre büyümesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, hücreler 8 kuyucuklu plakalara ekilecek, oyuk başına 5×10^3 hücre ekilecek ve gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 ile nemlendirilmiş bir atmosferde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler, farklı konsantrasyonlarda KAN0438757, kurkumin ve kombinasyonları ile tedavi edildi. Bu inkübasyondan sonra, kültürler, 48 saat boyunca %5 CO_2 ile nemlendirilmiş bir atmosferde 37°C 'de inkübeye bırakılacak ve bu zaman zarfında gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) tüm verileri eş zamanlı olarak verileri cihazın yazılımında toplandı ve grafiğe döküldü.



Şekil 2.1. Gerçek zamanlı hücre analizi

2.2.4. Hücre Göçünün Tespiti

Akciğer kanseri hücreleri, tek tabakalı formasyonu elde etmek için 24 saat boyunca FBS içeren ortam ile 6 kuyucuklu plakala ekildi. Kontrol grubunun kapanması ile normal ve belirleyici çaplı şeritler oluşturmak için 200 ul pipet ucu yardımıyla fiziksel bir çizik yapıldı ve kültür kapları daha sonra PBS ile yıkandı. Test edilen bileşiklerin farklı konsantrasyonlarını içeren serumsuz DMEM ortam ile tedavi edilen hücreler çizilmiş alanları belirli zaman aralıklarında mikroskop yardımı ile her 24 saatte bir fotoğrafları çekildi ve bu süreç kontrol grubunun kapanması ile sonlandırıldı.



Şekil 2.2. Wound Healing testi aşamalar

2.2.5. Tek Hücre Jel Elektroforezi

2.2.5.1. Örneklerin Hazırlanılması

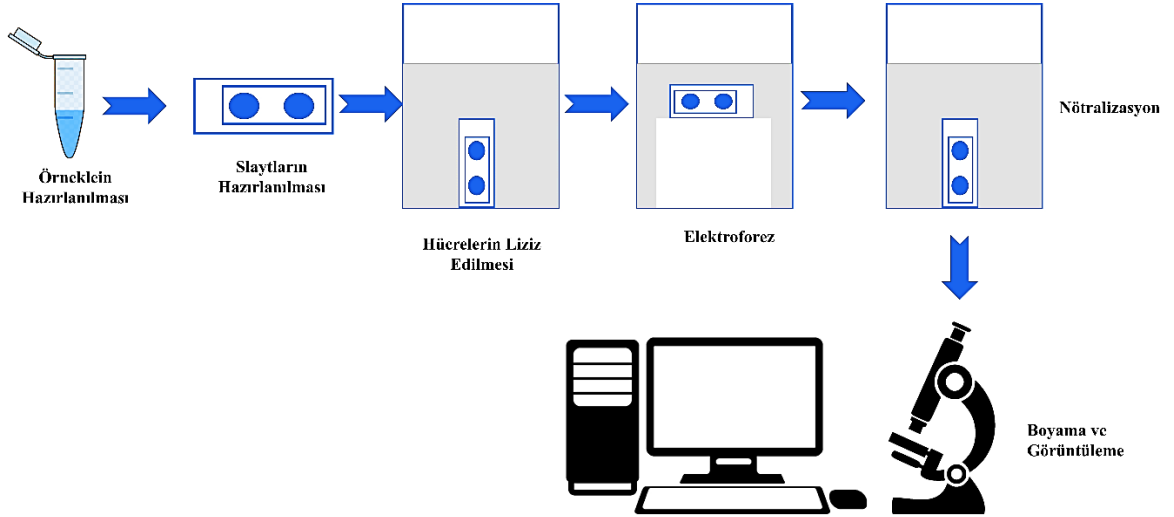
6 Kuyucuklu plakalara 10×10^5 miktarında hücre %5 CO₂ inkübatöründe (ESCO, ABD) 37°C'de %10 fetal sıgır serumu (FBS, Sigma, ABD; kat. No. F7524) ile DMEM ortamında çoğaltıldı. Ardından hücrelere farklı doz ve sürelerde KAN0438757 ve kombine tedavileri yapıldı. Hücreler 24 saat sonra tripsin edta ile kaldırılarak, ardından santrifüj işlemi yapıldı ve ardından kullanılacak miktar kadar hücre sayımı yapıldı.

2.2.5.2. Slaytların Hazırlanması

Deneyin ilk basamağında normal eriyen agaroz mikrodalga fırın kullanılarak hazır hale getirildi; 0,75g Agaroz + 100ml dH₂O cam, ardından lam alınarak normal eriyen agaroz solisyonuna batırılarak ön yüzeyi kaplanması sağlandı. Ardından bir gece kuruması için +4°C'de bekletildi. İkinci olarak düşük erime noktalı agaroz jeli için; 0,065g LMA+ 10ml PBS oranında malzeme kullanıldı. Bu adımda hücre ile düşük erime noktalı agaroz ependorf tüp içerisinde, 10-5ul (10.000 hücre) + 85ul LMA ependorf içerisinde karıştırıldı 15 dk bekletildi.

2.3.5.3. Hücrelerin Lizis Edilmesi

Dikkatli şekilde slaytlar alınarak, hazırlanılmış olan lizis buffer içerisine (2.5 M NaCl =29,22g, 100 mM Na₂EDTA =7,44g, 10 mM Tris Base 1=0,24g, %1 Triton X-100 =2ml, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) =20ml , dH₂O=178ml) ve lam üzerinden lamel kaldırılarak , lam lizis buffer içerisine konuldu ve 60 dk beklenildi. Lizis işleminin gerçekleştirilmesi için örnekler +4°C karanlıkta bekletildi.



Şekil 2.3. Tek Jel Elektroforezi işlem adımları

2.3.5.4. Elektroforez

Bir sonraki adımda ise, lam lizis buffer içerisinde çıkartılarak elektroforez tankı üzerine aynı yönde yerleştirildi ve üzerine elektroforez buffer (Na_2EDTA = 0,56g, NaOH = 18g, dH_2O = 1ml) eklenildi, ardından elektroforez işlemi ($+4^\circ\text{C}$) sıcaklığında 30 dakika süre ile 25 volt 300 Amper şeklinde koşturuldu.

2.3.5.5. Nötralizasyon

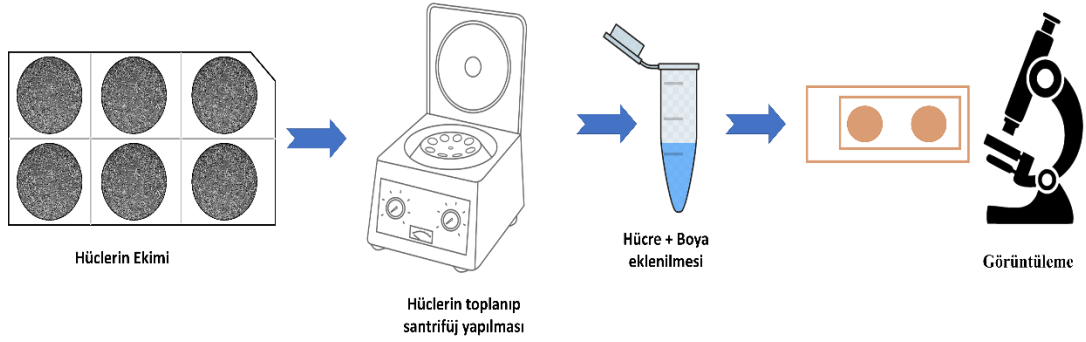
Elektroforez ardından sliderlar dikkatli bir şekilde alınarak etrafı kapalı bir kap içerisinde 5 dakika süre ile nötralizasyon tamponu ile muamele edildi ($+4^\circ\text{C}$).

2.3.5.6. Boyama ve Görüntü Alma

Son işlem olarak görüntü alma suda çözünmüş $2 \mu\text{g/mL}$ etidyum bromür ile 15 dakika slider üzerine eklenildi ve üzerine lamel konularak yaklaşık olarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon için beklenildi ve daha sonra florasen invert mikroskop yardımı ile hücrelerin fotoğrafları kaydedildi.

2.2.6. Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EtBr) Boyaması

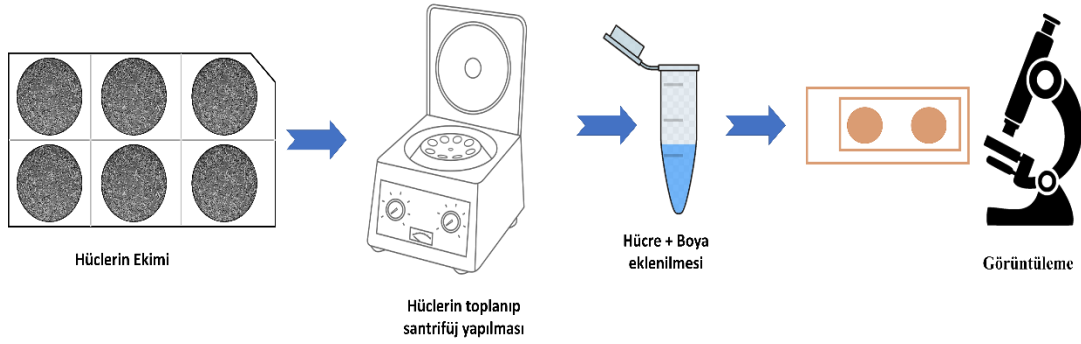
6 Kuyucuklu plakalara 10^5 miktarında hücre %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de %10 Fetal sığır serumu ile DMEM ortamında inkübe edildi. Bir gece sonrası hücrelere belirlenen dozlarda KAN0438757 ve kombine tedavileri yapıldı. Hücreler 48 saat sonra Tripsin EDTA ile kaldırıldı, ardından santrifüj işlemi yapıldı ve son adım olarak 1 µl AO/EB solüsyonu ile 25 µl hücre süspansiyonu ($0,5 \times 10^6$ ila $2,0 \times 10^6$ hücre/ml) inkübe edildi. 10 µl hücre süspansiyonunu mikroskobik bir slayt üzerine yerleştirildi, bir cam lamel ile kapatıldı ve floresan filtre ve 20X objektif kullanarak invert floresan mikroskobunda hücrelerin fotoğrafları kaydedildi.



Şekil 2.4. Akridin oranj ve Etidyum bromür boyaması işlem adımları

2.2.7. Mitokondri Membran Potansiyelinin Tespiti

JC-1, mitokondriyal membran potansiyelini ölçmek için kullanılan bir floresan lipofilik karbosiyanin boyadır (Perelman et al 2012). 5×10^5 yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalarda hücreler kültürlendi. 24 Saat sonra belirtilen dozlarda 48 saatlik tedaviler yapıldı. Hücreler Tripsin EDTA ile kaldırıldı ve santrifüj işlemi yapılarak JC-1 ile boyanmaya hazır hale getirildiler. Her santrifüj tüpü başına 10 μ L JC-1 (200 μ M) stok eklenildi ve hücreleri 37°C'de, %5 CO₂, 15-20 dakika'da inkübe edildi. Daha sonra hücreler santrifüj yapıldı ve ardından 2 kez PBS ile yıkandılar. Yıkama işlemi ardından tekrar santrifüj işlemi yapıldı ve hücreler 500 μ L PBS ile homojen şekilde karıştırıldı. Son adım olarak 10 μ L çözelti alınarak lam üzerine koyulup mikroskop altında görüntüleme işlemi yapıldı.

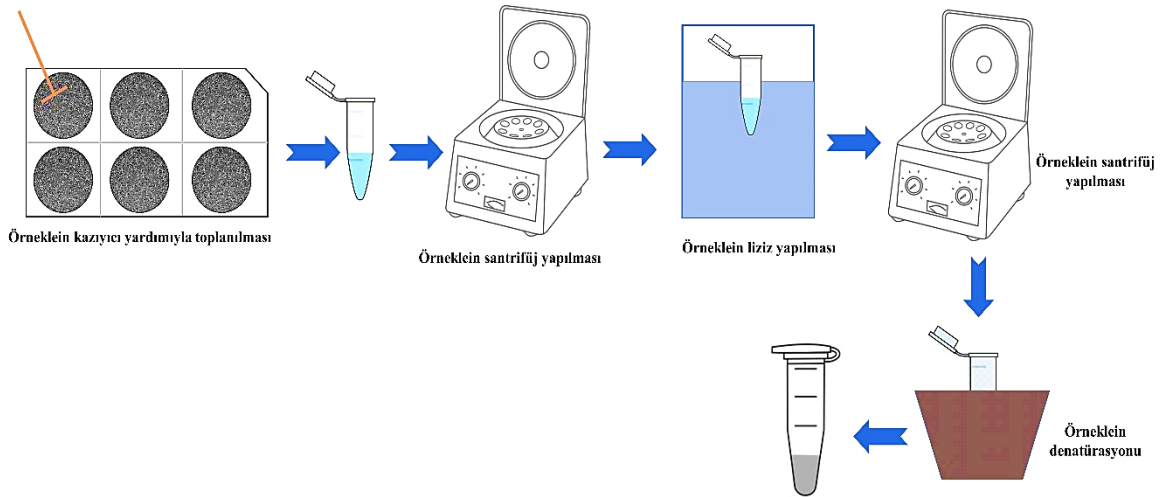


Şekil 2.5. Mitokondri membran potansiyel boyaması işlem adımları

2.2.8. Western Blotting

2.2.8.1. Örneklerin Hazırlanılması ve Protein İzolasyonu

Hücreler dikkatli bir şekilde kazıcı kullanılarak soğuk PBS yardımıyla yavaş bir şekilde toplandı. Daha sonra örnekler 6600 RPM’de 15 dk santrifüj yapılarak süpernatant kısım atılarak pellet toplandı. İkinci adım olarak hücreler lizis buffer ile muamele edilip. Proteaz inhibitörleri içeren lizis buffer ile örnek başı 250 uL eklenir 1 saat buz üstünde bekletildi ve ardından 14000 RPM +4°C’de 10 dk santrifüj yapıldı. Supernatant kısmı alındı ve sonraki aşama olan total protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak 595nm’ spektrofotometre yapıldı. Ardından örnekler Lammi buffer ile karıştırıldı ve 95 °C’de 5dk süre ile denature edildi.



Şekil 2.6. Protein izolasyonu işlem adımları

2.2.8.2. Jel Hazırlama

Üçüncü aşama olarak öncelikle Jel hazırlamak için ince ve kalın cam hiçbir şey sıvı sızdırmayacak şekilde konumlandırıldı. %12 stacking jel 50ml falcon tüp içerisinde sırasıyla; 3.3 ml Saf su, 4 ml Acrilaymide, 100 uL TRIS, 100 ul SDS, 30 ul APS, 4 ul TEMED sürekli karıştırılarak yavaş bir şekilde ince ve kalın cam arasına yüklenildi. Jelin üst kısmı düz olması için ise bir miktar propanal eklenir ve yaklaşık 20 dk beklenildikten sonra diğer jel hazırlandı. 15 ml falcon içerisinde ise yükleme jeli için; 2.1ml Saf su, 0.5ml

Acrilamide, 0.38uL TRIS, 30uL SDS, 30uL APS, 2uL TEMED konsantrasyonlarında hazırlandı. Propanal yavaşça ilk jel üzerinden uzaklaştırılarak üzerine 15ml içerisinde hazırlanan yeni jel kontrollü bir şekilde bırakıldı ve kurumadan direk 10 dişli bir tarak takılarak donmaya bırakıldı.

Tablo 5. Dikey elektroforezde kullanılan jel içerikleri

%12'lik Ayırma Jel İçeriği	
H ₂ O	3.3 ml
%30 Acrilamide Mix	4 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	2.5 ml
%10 SDS	100 uL
%10 APS	100 ul
TEMED	4ul

%4'lük Yükleme Jel İçeriği	
H ₂ O	2.1 ml
%30 Acrilamide Mix	0.5 ml
1 M Tris, pH 6.8	380 ul
%10 SDS	30 uL
%10 APS	30 ul
TEMED	4ul

2.2.8.3. Elektroforez

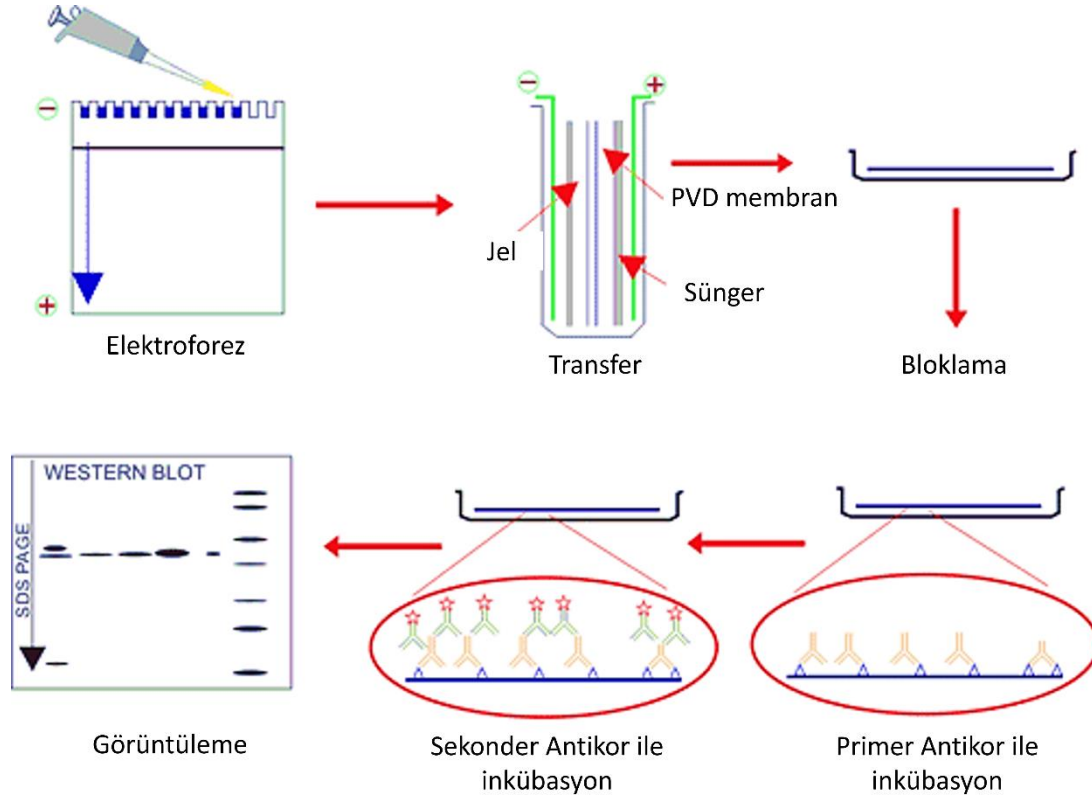
Dördüncü aşamada hazırlanan jel tank içerisine dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Tank içerisine yaklaşık olarak 1 litre 1X running buffer ilavesi yapıldı. Daha sonra ise hazırlanan jele; protein marker ve örneklerden jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi. Tankın üst kapagı kapatıldı ve güç kaynağı kullanılarak 20 mA yürütme başlatıldı. Yürütme işlemi ortalama olarak 2 saat devam etti ve tüm protein marker açılıncaya kadar yürütme devam edildi.

2.2.8.4. Transfer

Jel ve membrana ardından filtre kağıdı ve sünger konularak sandviç hazırlandı. Jel tutucu kaset tank içerisine konuldu ve tank 1X transfer buffer ile tamamlandı. Transfer işlemi 220 mA 2 saat jelden membrana transfer edildi.

2.2.8.5. Bloklama

Transfer sonrası PVDF membrane bloklama işlemine alındı. Bloklama solüsyonu için 0.5g süt tozu tartıldı ve üzerine 10ml TBS-T eklenilerek membran boyutunda bir kap içerisine konuldu 60 dk boyunca membranın bloklanması sağlandı.



Şekil 2.7. Western blotting yönteminde kullanılan adımlar

2.2.8.6. Antikorlar ile Muamele

Yedinci adımda ise; ilk olarak membran bloklama solüsyonunda çıkartılarak direk olarak hazırlanılan primer antikor (TIGAR 1:1000; BAX: 1500; GAPDH 1:1000) içerisine bir gece boyunca +4°C’de yer alan çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Ertesi gün ise 5 kez 5 dakika boyunca primer antikordan çıkartılan membranın yıkanılması yapıldı ve süre bitiminde membrane direk olarak sekonder antikor (Antimouse 1:5000, Antirabbit 1:5000) ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Ardından 5x5 kez yıkama işlemi yapıldı.

2.2.8.7. Görüntüleme

Son adım olarak membrane üzerindeki proteinlerin görüntülenmesi yapıldı; antikor inkübasyonun ardından membran TBS-T ile 5 kez yıkandı ve akabinde 5 ml kemilüminesans ajanı ile muamele edildi. X-ray kaset içerisine konulan PVDF membran belli süre karanlıkta inkübe edildi ve X-ray makinesinde görüntü film üzerine aktarıldı.

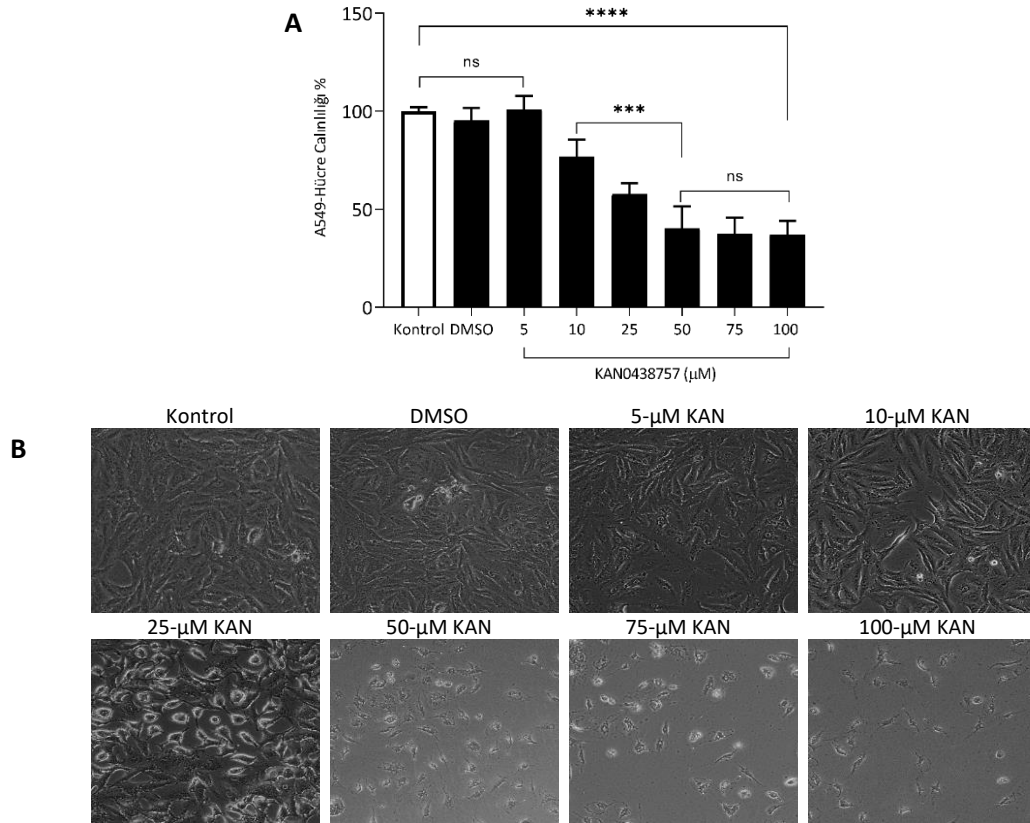
2.2.9. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı (ABD) kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey'nin post hoc testi kullanılarak yapıldı.

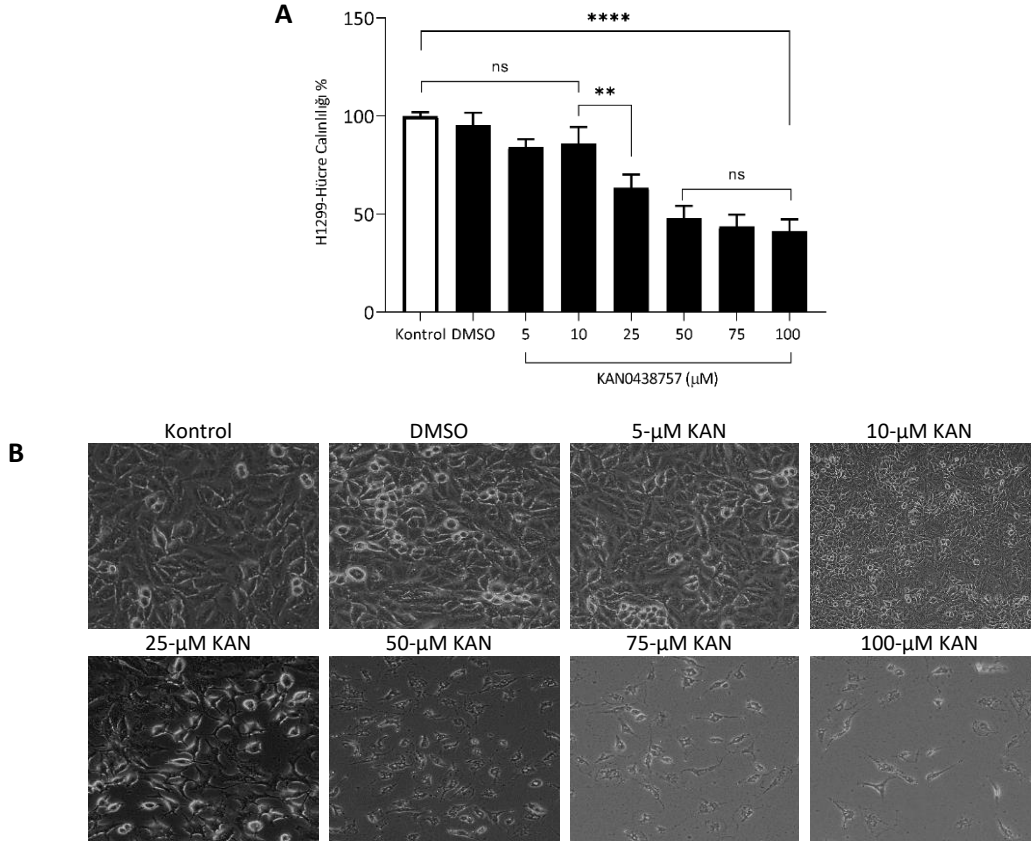
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. A549 ve H1299 Hücre Hatlarında KAN0438757'nin Hücre Canlılık Etkileri

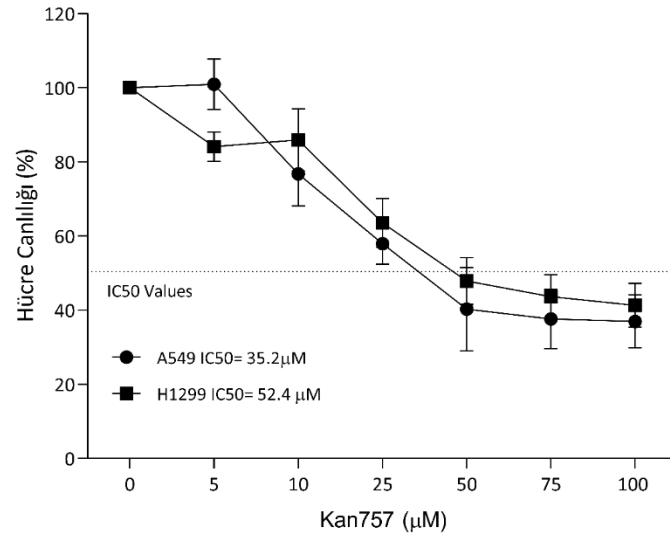
A549 ve H1299 hücre hatlarında KAN0438757'nin hücre canlılığı üzerine etkileri WST-1 testi ile (bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi) belirlendi. A549 ve H1299 hücre hattında ilk kez bu tez çalışmasında küçük molekül inhibitörü KAN0438757 IC50 degerleri tespit edilmiştir. A549 hücre hattında IC50 degeri; 35.2 μM olarak, H1299'da ise IC50; 52.4 μM olarak belirlenmiştir. Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de görüldüğü gibi IC50 degeri daha yüksek dozlarda hücre canlılığına olan etkileri benzerdir.



Şekil 3.1. A549 hücre hattında KAN0438757'nin hücre canlılığı üzerine etkisi. (A)hücre canlılığı (B) A549hücrelerinin negatif görüntüleri



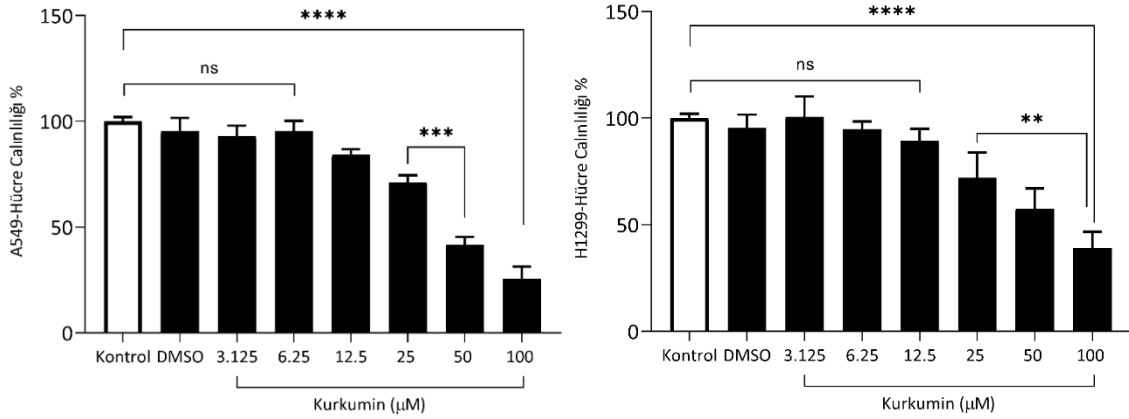
Şekil 3.2. H1299 hücre hattında KAN0438757'nin hücre canlılığı üzerine etkisi. (A) hücre canlılığı (B) H1299 hücrelerinin negatif görüntüleri



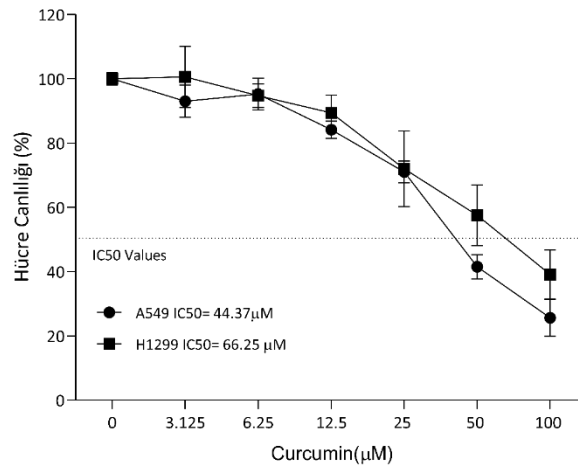
Şekil 3.3. A549 ve H1299 Hücre hatlarında KAN0438757'nin IC50 degerleri

3.2. A549 ve H1299 Hücre Hatlarında Kurkuminin Hücre Canlılık Etkileri

Kurkumin için 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında tedavi yapıldı ve A549 hücre hattında belirlenen Kurkuminin A549 IC₅₀ değeri 44.37 μM . H1299 hücre hattında tespit edilen IC₅₀ değeri ise 66.25 μM olarak hesaplandı. Şekil 3.4’de yer alan grafikte görüldüğü gibi kurkumin doza bağımlı bir şekilde iki farklı hücre hattında da kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek bir etki göstermiştir. A549 ve H1299 hücre hatlarında grafiğe bakıldığında Kurkuminin etkisi iki hücre hattında benzer bir etki yaptığı görülmüştür. IC₅₀ değerlerinin bulunduğu aralıkta şekil 3.5’de hücrelerin yarısının öldüğü ve bu değerlerin etkili oldukları tespit edilmiştir.



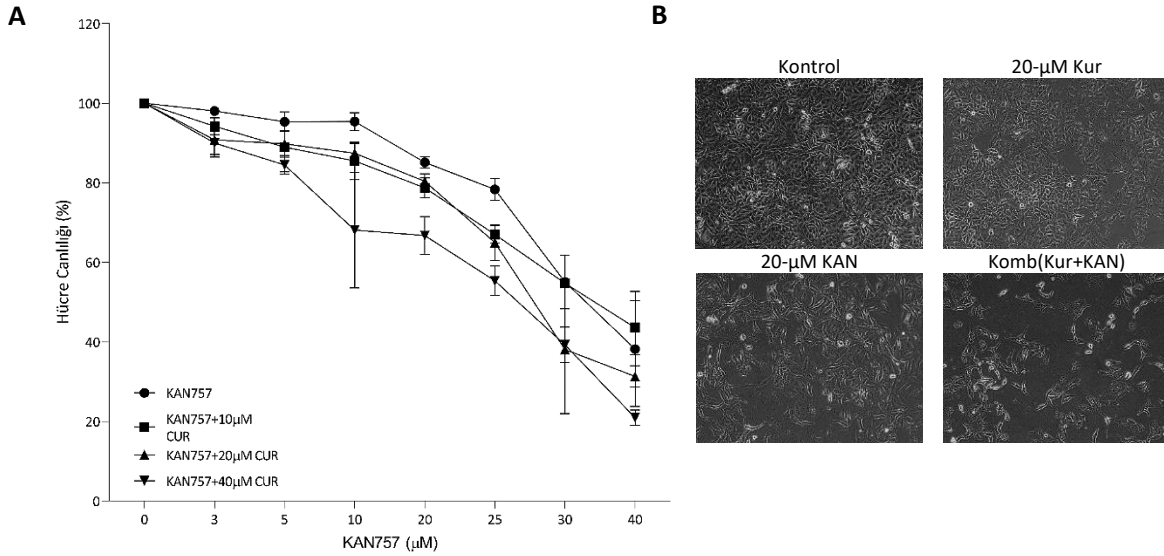
Şekil 3.4. A549 ve H1299 hücre hatlarında Kurkuminin hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 3.5. A549 ve H1299 Hücre hatlarında kurkuminin IC₅₀ değerleri

3.3. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ile Kurkumin Kombinasyonunun Hücre Canlılık Etkileri

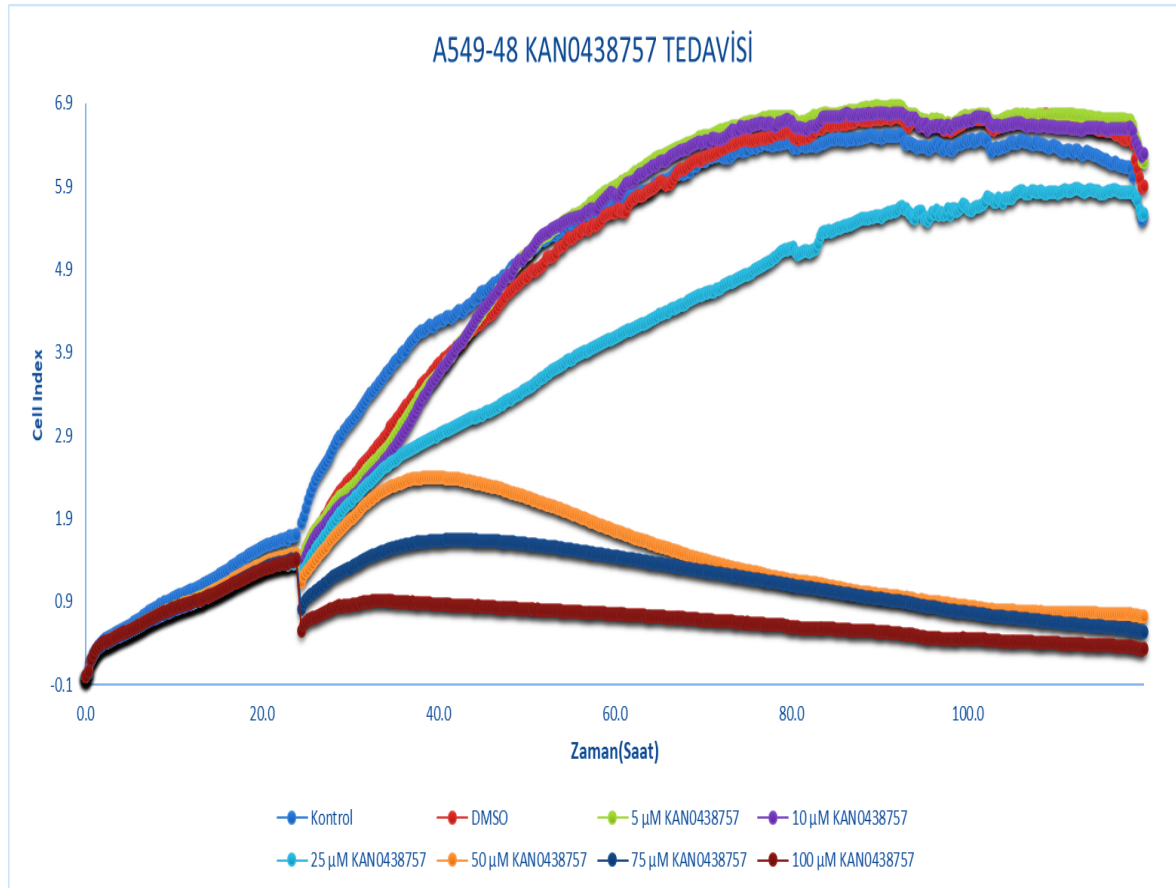
KAN0438757'nin (0, 3, 5, 10, 20, 25, 30, 40 μ M) ile Kurkuminin (10, 20, 40 μ M) kombinasyonunun A549 hücre hattında hücre canlılık testi kullanılması ile A549 hücrelerinde kullanımlarının etkileri görüldü. Şekil 3.6'da A549 hücrelerinde grafikte görüldüğü gibi kombinasyonun doza bağımlı bir şekilde kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek bir etki gösterdi. KAN0438757 tek başına etkisinin yüksek dozlarda tek başına etki yaptığı gözlemlenmiştir. 10 μ M Kurkumin ve KAN0438757 farklı doz kombinasyonunda hücrelerin büyük çoğunluğunun son guruplarda öldüğü görülmektedir. 20 μ M Kurkumin ve KAN0438757 farklı doz kombine gurubunda ise A549 hücreleri düşük doz gruplarından itibaren çoğalmalarının zayıfladığı, fazlaca ölüm olduğu kaydedilmiştir. Son grup 40 μ M Kurkumin ile KAN0438757 farklı doz kombinasyonun en etkili grup olması ile çalışmadaki yüksek verimliliği ortaya çıkarmaktadır.



Şekil 3.6. A549 hücre hattında KAN0438757 ile Kurkumin kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi (A)hücre canlılığı (B) A549 hücrelerinin negatif görüntüleri

3.4. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Proliferasyonuna Etkisi

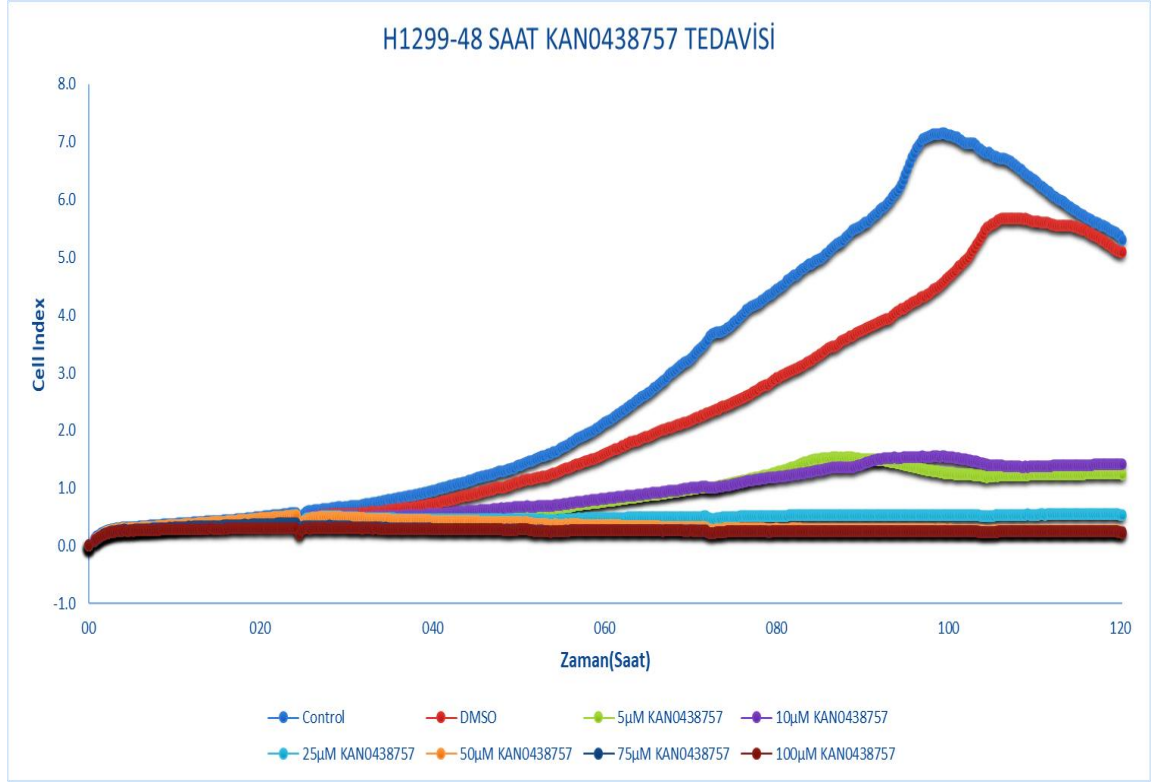
Hücre proliferasyonu testinde xCELLingence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) kullanılarak 8 kuyucuklu bir plate her bir kuyucuk için 10×10^3 hücre ekimi yapılarak ve bir gece sonrasında ise belirtilen dozlarda A549 hücre hattında tedavi yapıldı. Hücre hattında sadece yeni inhibitor KAN0438757'nin 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μM dozlarında 48 saatlik inkübasyon işlemi yapıldı. Şekil 3.7'de elde edilen grafikte koyu mavi renk ile gösterilen çubuğun kontrol grubu olduğu ve grafiğin en tepe noktasında olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki hücrelerin hızlı bir artış sergilediği, fakat artan doz miktarları ile hücrelerde azalma olduğu eş zamanlı olarak ölçüldü. DMSO grubunun bir etkisinin olmadığı fakat özellikle KAN0438757'nin 50, 75 ve 100 μM dozlarındaki hücre çoğalmasının azaldığı bu gruplarda tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. A549 hücre hattında KAN0438757'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi

3.5. H1299 Hücre Hattında KAN0438757'nin Proliferasyonuna Etkisi

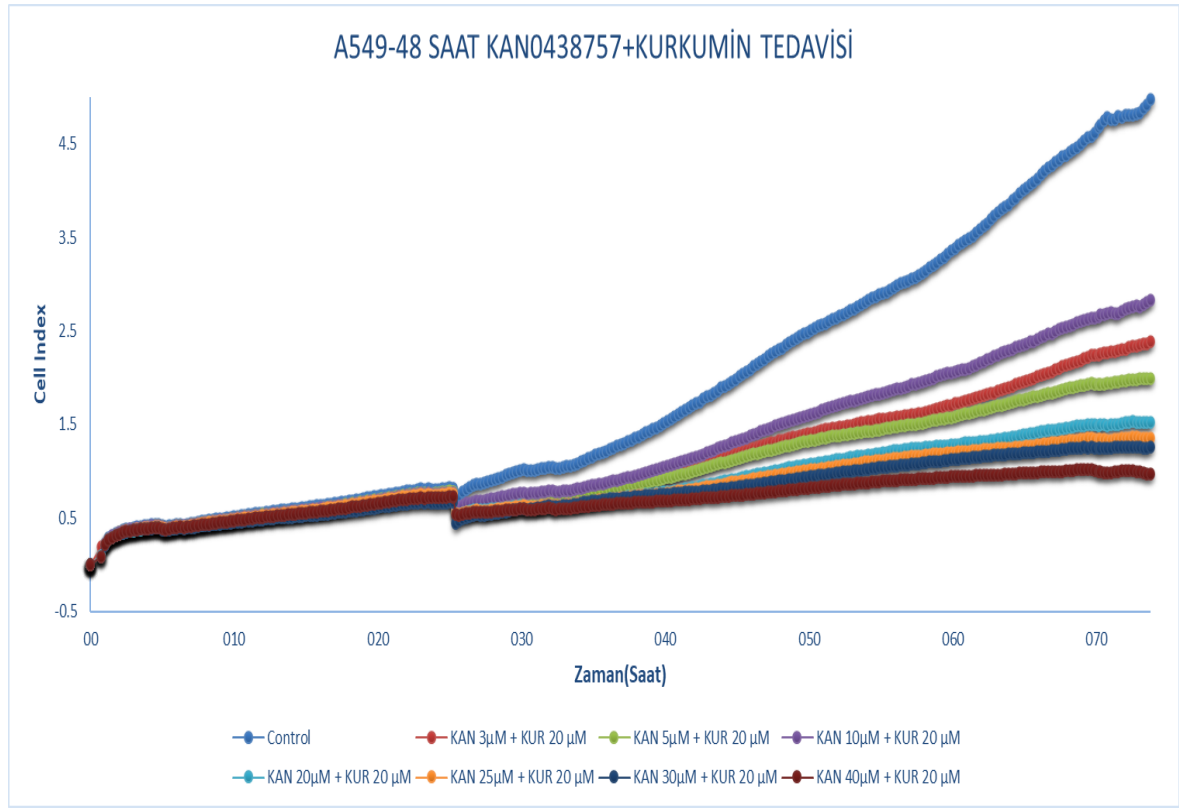
Şekil 3.5'de KAN0438757'nin H1299 hücre proliferasyonunda kontrol grubuna kıyasla 50,75 ve 100 μ M grublarında hücrelerin proliferasyonun yavaşladığı ölçülmüştür.



Şekil 3.8. H1299 hücre hattında KAN0438757'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi

3.6. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun Hücre Proliferasyonuna Etkisi

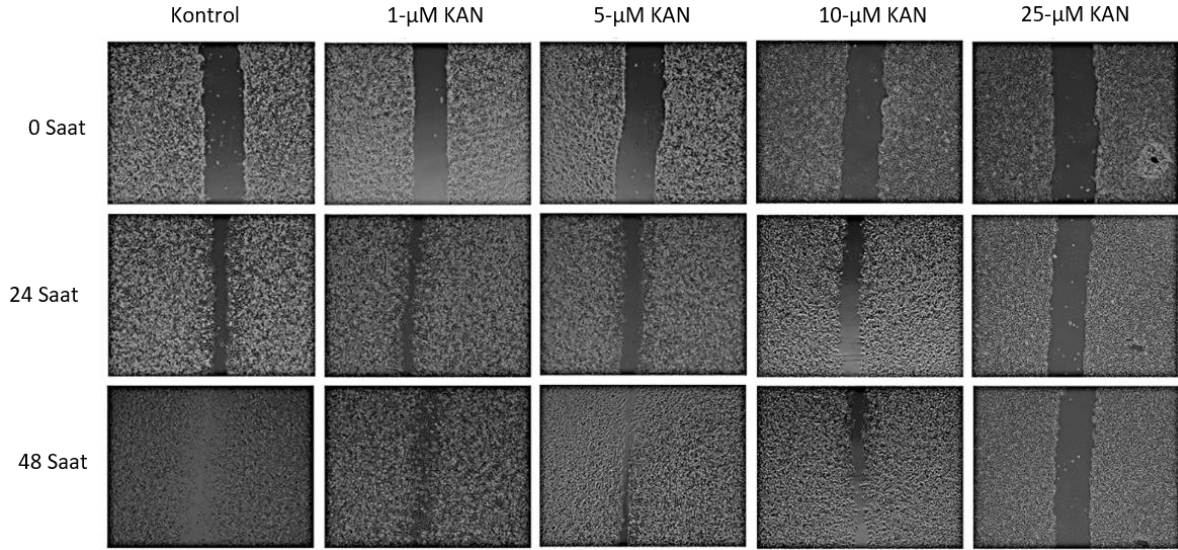
A549 hücre hattında küçük molekül inhibitörü KAN0438757'nin farklı dozları ve Kurkuminin IC50 degerinin yarısı kullanılarak kombinasyon 48 saat boyunca tedavi edilmiştir. Şekil 3.9'da kontrol gurubu ile düşük kombine guruplarında hücre profilerasyonunda artış gözlemlendi. Hücre profilerasyonun yüksek kombine guruplarında ise negatif yönde düşüşe neden oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 3.9. A549 hücre hattında KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonun hücre proliferasyonu üzerine etkisi

3.7. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Göçüne Etkisi

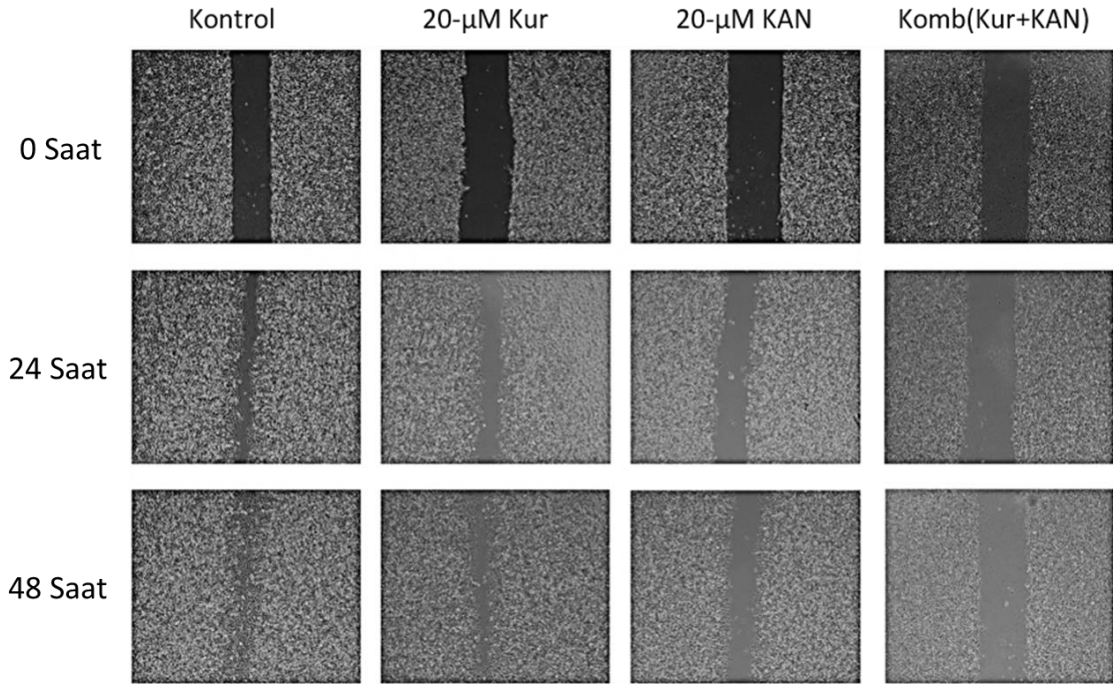
KAN0438757'nin hücre göçü üzerindeki etkilerini saptamak için A549 hücrelerinde yara iyileşmesi deneyi yapıldı. Şekil 3.10. gösterildiği gibi, KAN0438757 tedavisinde, Kontrol gurubu 48 saat sonunda tam olarak kapanırken 25 μ M gurubunda hücre göçünün çok yavaş olduğu tespit edilmiştir. 10 μ M gurubunda ise hücreler arası boşluğun en yüksek doza kıyasla daha fazla kapanma görülmüştür. Bu sonuçlar, KAN0438757 tedavisinin, A549 kanser hücrelerinde hücre göç aktivitesini belirgin şekilde inhibe ettiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 3.10. A549 hücre hattında KAN0438757 48 saatlik tedavisi ile hücre göçünün belirlenilmesi

3.8. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun Hücre Göçüne Etkisi

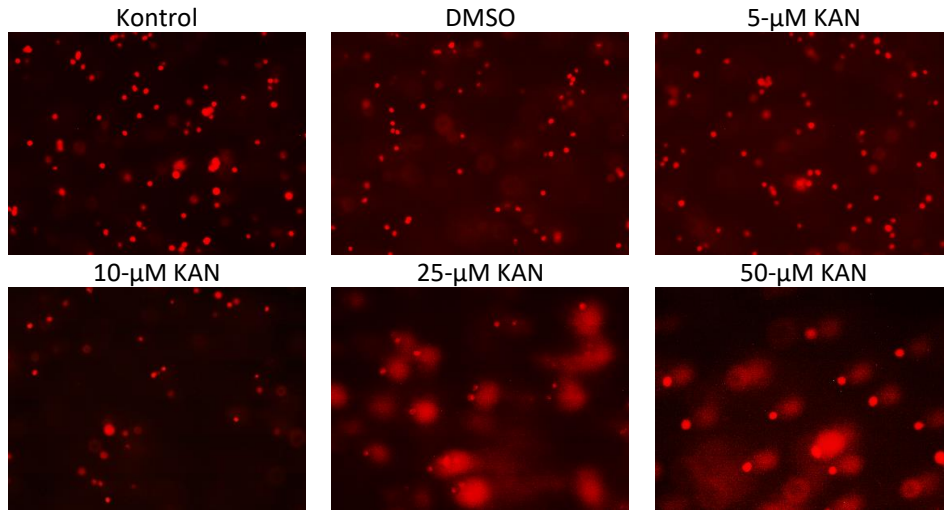
Şekil 3.11’de gösterildiği gibi KAN0438757’in ve Kurkumin kombinasyonun A549’da hücre göçü ve istilasası üzerindeki etkilerini göstermek için 0, 24, 48 saatlerinde kontrol, Kurkumin 20µM, KAN0438757- 20µM, kombinasyon şekilde tedavi yapıldı. Özellikle kombinasyon grubunun hücrelerin göç kabiliyetini önemli ölçüde azaltmış ve hücre proliferasyonunu durdurmuştur. KAN0438757- 20µM 48 saatte hücre göçünde bir hareketliliğin olduğu görülmüştür. Kurkumin grubunda ise kontrole göre bir yavaş göç istilasası oluştu fakat 48’inci saate gelindiğinde neredeyse oluşturulan hücreler arası boşluğun kapandığı tespit edilmektedir. Kombinasyon gurubundaki umut verici sonuç ile gerçekten de KAN0438757’nin hücre göçünü durduru bir etki sergileyebileceği belirlenmiştir.



Şekil 3.11. A549 hücre hattında kombinasyonun hücre göçü üzerine etkisi

3.9. A549 Hücre Hattında KAN0438757 DNA Hasarının Gösterilmesi

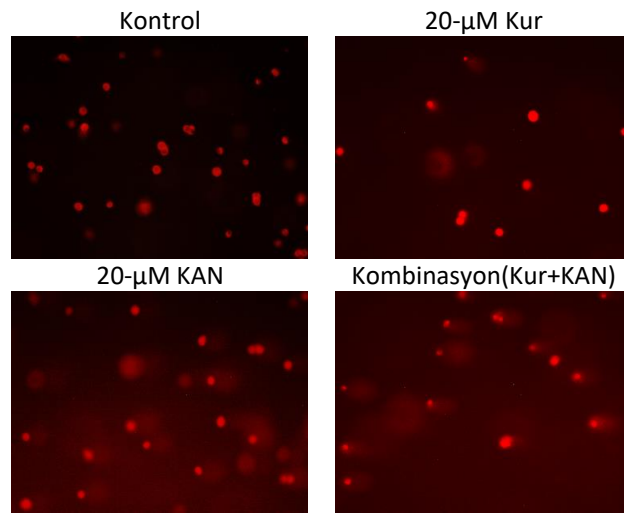
KAN0438757'in A549'da DNA hasarı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için, hücreler KAN0438757'nin farklı dozları ile muamele edildikten sonra DNA hasarı tek hücre jel elektroforezi ile incelendi. Şekil 3.12'de gösterildiği gibi kontrol gurubuna kıyasla, tedavi edilen guruplarda kuyruk oluşumu doz artışına bağlı olarak arttığını göstermiştir. 25 ve 50 μ M KAN0438757 ile tedavi edilen hücrelerde en büyük kuyruk oluşumunu tetikleyerek DNA hasarı oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Bu tahlilde, birikmiş hasarlı hücrelerden alınan DNA, kuyrukları parçalanmış veya çözülmemiş DNA'ya sahip floresan kuyruklu yıldızlar olarak görünürken, normal, hasar görmemiş DNA, orijinden uzağa göç etmemektedir (Kontrol grubu).



Şekil 3.12. A549 hücrelerinde KAN0438757'nin DNA hasarı üzerine etkisi

3.10. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun DNA Hasarının Gösterilmesi

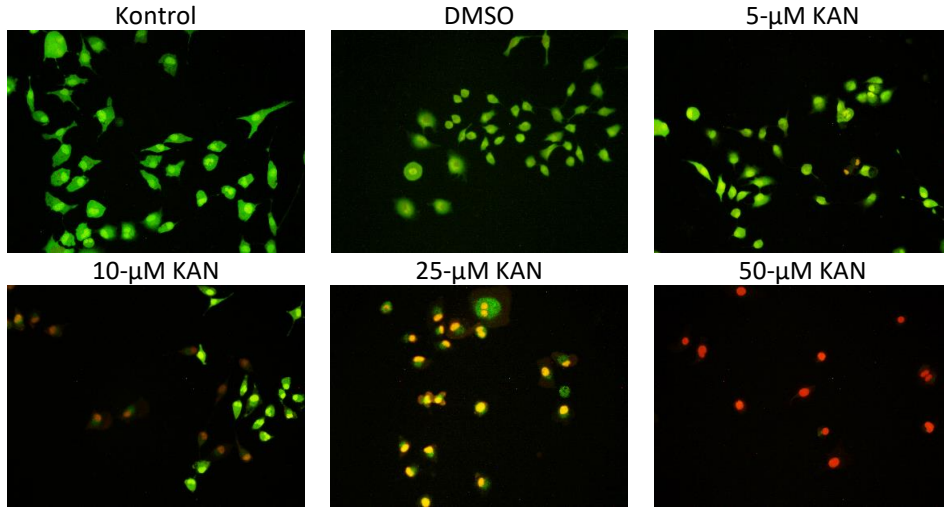
Kombinasyonla tedaviyi takiben tüm hücre guruplarında DNA zincir kırılmalarında konsantrasyona bağlı net bir artış gözlemledik (Şekil 3.13). Kontrol gurubu ile kurkumin grubu genel olarak benzer bir sonuç gösterirken KAN ve Kombinasyon gurubunda artan DNA hasarının oldukça fazla kuyruk oluşumuna neden olduğu görülmektedir. KAN0438757'nin kurkuminin etkinliğini artırdığı belirlenmiştir.



Şekil 3.13. KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonun A549 hücrelerinde DNA hasarı üzerine etkisi

3.11. A549 Hücrelerinde KAN0438757'in Hücre Ölümü Üzerine Etkisi

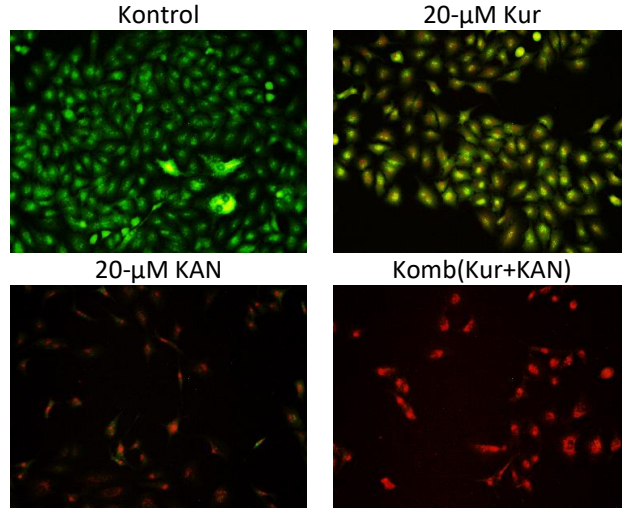
Apoptotik morfoloji, Şekil 3.14'de gösterildiği gibi, yeşil renkle boyanmış çekirdekler canlı hücreleri gösterirken yeşilimsi sarı erken apoptotik hücreleri, yoğun kırmızı renk çekirdekler geç apoptotik hücreleri göstermektedir. Muamele edilmemiş hücreler (negatif kontrol) ve bileşiklerin daha düşük konsantrasyonlarına sahip muamele edilmiş hücreler, parlak yeşil olarak sunulan normal çekirdeklerle ortaya çıkarmaktadır. 50µM tedavi gurubu, apoptotik cisimlerin varlığı ve kabarcık oluşumu gibi benzersiz apoptoz özellikleri gösteren hücreler, boyayı hücre içerisine alarak kırmızı renk ile görülmesine neden olmuştur.



Şekil 3.14. A549 hücrelerinde KAN0438757'in hücre ölümünü üzerine etkisi

3.12. A549 Hücre Hattında Hücre KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonun Hücre Ölümüne Etkisi

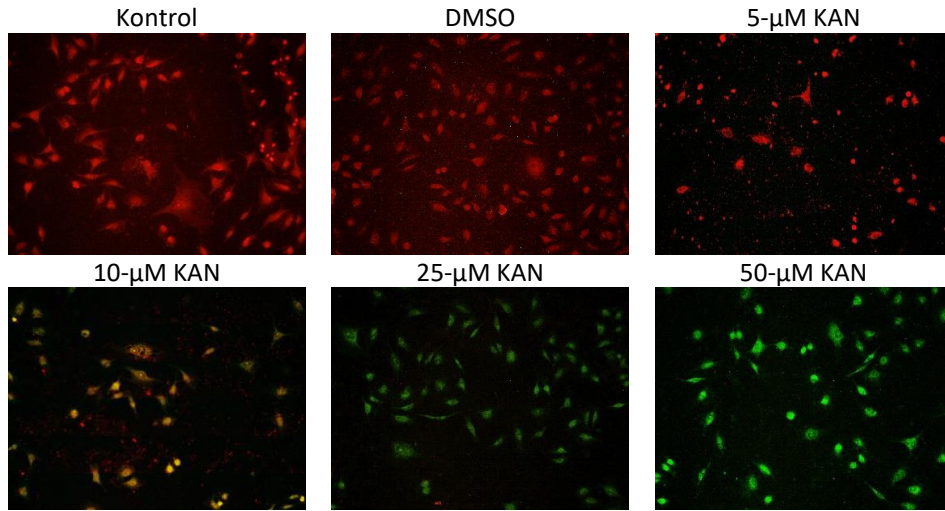
A549 hücrelerinde Şekil 3.15’ de KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonun hücre ölümü üzerine etkileri tespit edildi. Kombinasyon gurubunda kullanılan doz değerleri IC50 değerinin yarısı kullanılarak boya yapıldı. Kontrol gurubunda etken boya hücre içerisine giremediği için hücreler yeşil renkte ve hasar görmemiş şekilde görülmektedir. Kurkumin ve KAN0438757 guruplarında ise doza bağımlı olarak hücrelerde artan stres ile beraber hasar oluşarak membran bütünlüğü bozularak ethidyum bromür hücre içerisine kısmı olarak girerek erken apoptozun başladığını göstermiştir. Kombinasyon grubunda ise artan hasar ile boyar madde hücre içerisine girerek kırmızı renk oluşumları tespit edilmiştir.



Şekil 3.15. A549 hücrelerinde KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisi

3.13. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

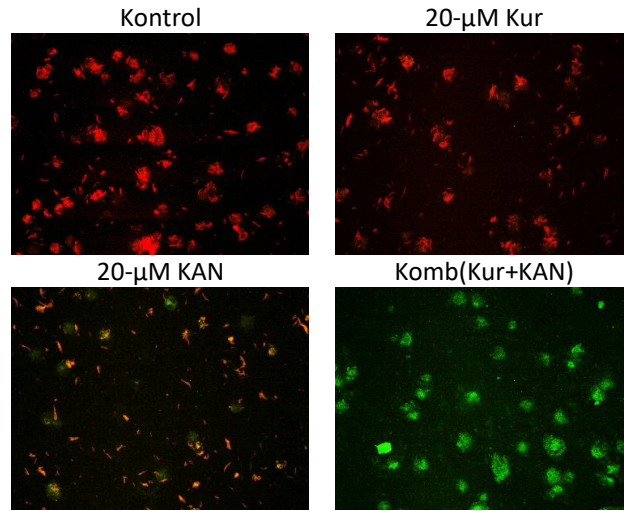
KAN0438757'nin apoptotik bir belirteç olan mitokondri membran potansiyeline etkisini A549 hücre hattında 0, 5, 10, 25, 50 μ M ve DMSO grupları şeklinde 48 saat boyunca tedavi edildiler. Mitokondri membran potansiyelinin tespiti için JC-1 boyası ile inkübe edilen hücrelerde Şekil 3.16'da görüldüğü gibi kontrol gurubunda herhangi bir hasar olmadığı için kırmızı renkte bir florasan ışıması görülmüştür. Mitokondri membran bütünlüğünü etkileyen gruplar KAN0438757 artan konsantrasyonları ile birlikte meydana gelen hasara karşın kırmızıdan yeşile doğru bir renk değişiminin ve hücre morfolojilerinde' de farklılığın olduğu florasan mikroskop altında tespit edilmiştir. A549 hücrelerinde elde edilen mitokondri membran potansiyel testi ile monoterapinin oldukça etkili bir sonucu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.16. A549 hücrelerinde KAN0438757'nin mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesi

3.14. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonunun Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

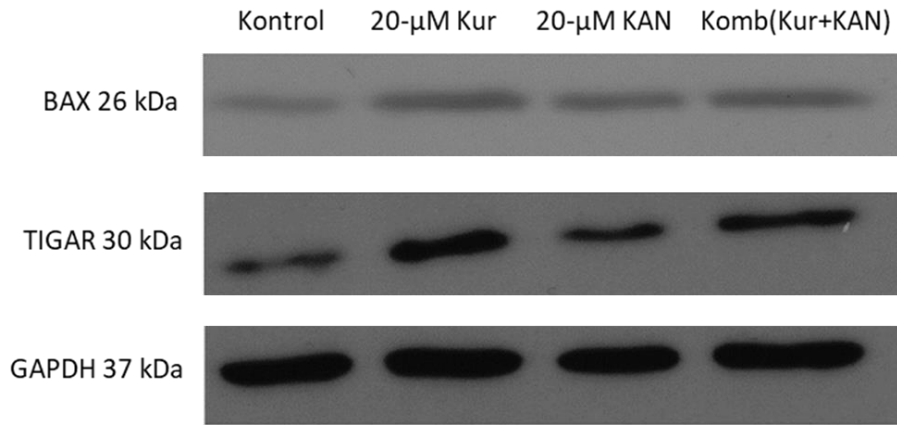
A549 hücre hattında 48 saat boyunca; 0, 20 μ M Kurkumin, 20 μ M KAN0438757 ve Kombinasyon grubu (20 μ M Kurkumin + 20 μ M KAN0438757) inkübasyon yapıldı. Şekil 3.17' de inkübasyonun ardından gruplar floresan mikroskop altında incelendiğinde kontrol grubunun beklenildiği gibi herhangi bir hasarın oluşmadığı ve hücrelerin kırmızı floresan ışığa verdikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra kurkumin grubunda kontrol grubuna kıyasla kısmen hücrelerin yeşil floresan ışığa yaptıkları tespit edilmiş. KAN0438757 yalnız başına hücrelerde kurkumin grubuna karşı daha etkili bir hasar meydana getirerek morfolojik ve turuncu floresan ışığa yaptıkları gözlemlenmiştir. En yüksek etki kombinasyon grubunda gözükerek gerçekte mitokondri potansiyeli ve normal hücre membranı bütünlüğünün bozulması ile JC-1 boyası yeşil renkte bir ışığa yaparak hücrelerin apoptotik hücre yolağının aktifleştiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.17. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonunun mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesi

3.15. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin Kombinasyonunun TIGAR, Bax Proteinleri Üzerine Etkisi

KAN0438757 ve kurkumin kombinasyonunun apoptotik biyobelirteçler üzerine etkisini belirlemek amacıyla BAX ve TIGAR proteini ekspresyon düzeyleri western blotting deneyi ile belirlendi. Hücreler 20 μ M Kurkumin grubu olarak, 20 μ M KAN0438757 ve kombinasyonu şeklinde tedavi edilmiştir. Şekil 3.18’de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TIGAR protein ekspresyon düzeyi, kurkumin ve kombinasyon gruplarında kayda değer bir artış olduğu görülmüştür. 20 μ M Kurkumin ile 20 μ M KAN0438757 tedavi gruplarında ise bir kontrole kıyasla artışın olduğu tespit edilmiştir. pro-apoptotik BAX protein ekspresyonu ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplardan arttığını özellikle kombinasyon grubunda meydana gelen artışın dikkat çekici olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.18. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ve Kurkumin kombinasyonunun TIGAR, Bax proteinleri üzerine etkisi

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. 2020 yılında dünya çapında 2,206,771 milyon yeni vaka teşhis edildiğini ve 1,796,144 milyon ölüme yol açtığı kaydedilmiştir. (Evan and Vousden 2001; Hejmadi 2014). Akciğer kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Göğüs, kolorektal ve prostat kanserlerinin toplamından daha fazla insanı öldürmektedir. Her yıl 1,38 milyon insan hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir, bu da dünya çapında günde 3.000'den fazla ölüme veya her bir dakikada iki ölüme neden olmaktadır (Organization 2018; Sung et al 2021). Akciğer kanserinin küçük hücreli akciğer karsinomu ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (KHDAK) olmak üzere iki ana alt tipi vardır ve tüm akciğer kanserlerinin sırasıyla %15 ve %85'ini oluşturur (Zheng 2016). KHDAK ayrıca üç tipte sınıflandırılır: skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom. Sigara, pasif içicilik, hava kirliliği, akciğer hastalıkları (yani tüberküloz, kronik bronşit), kanserojen kimyasallara mesleki maruziyet, iyonlaştırıcı radyasyon (yani radon bozunma ürünleri ve x-ışınları) dahil olmak üzere çeşitli çevresel risk faktörleri gelişimi ile ilişkilidir (Pendharkar et al 2013; Tarro et al 2019). Sigara, akciğer kanserinin en yaygın nedeni, tüm tanılarının en az %80'i oluşturmaktadır (Peto et al 1996; Hecht 2012; Jaakkola and Jaakkola 2006). Geleneksel olarak, tedavi seçenekleri arasında cerrahi (erken evre hastalığı olan hastalar için), radyasyon tedavisi ve kemoterapi, tek başına veya kombinasyon halinde bulunur (Lemjabbar-Alaoui et al 2015; Predina et al 2016; Remick and Amin 2019; Angahar 2017).

Hayatta kalma ve çoğalma için gerekli enerjik ve biyosentetik öncülere yönelik artan tümör taleplerini karşılamak için yüksek glikolitik akış, 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz 3'ün (PFKFB3) işlevi ile mümkün hale gelmektedir. 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) enzim ailesi, işlevi fruktoz-2,6-bifosfatın (F26BP) sentezini ve bozunmasını katalize etmek olan temel glikolitik aktivitelerdir. F26BP, 6-fosfofrukto-1-kinazın (PFK-1) allosterik bir aktivatörü ile hız sınırlayıcı bir

enzimidir. PFKFB3, insan akciğeri, meme, prostat tümörlerinde aşırı eksprese edilmektedir. PFKFB3'ün daha yüksek ekspresyonu, daha kısa sağkalım veya daha sık metastaza yönelime olduğu bildirilmiştir (Pavlova and Thompson 2016). Hücre döngüsü ve programlı hücre ölüm yollarında PFKFB3'ün artan ekspresyon düzeyi nedeniyle kansere neden olduğu rapor edilmiştir (Ros and Schulze 2013). PFKFB3 inhibisyonunu hedefleyen inhibitörler; 3PO, PFK15, PFK158'dir. 2018 yılında küçük molekül inhibitörü olarak kullanılan KAN0438757 PFKFB3 için yeni bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir (Gustafsson et al 2018). Kurkumin, *Curcuma longa*'ya dayanan kimyasal bir ekstraktır ve antioksidan, antiviral, antifungal, antikanser ve antibakteriyel gibi kapsamlı farmakolojik fonksiyonlara sahip olduğu bildirilmiştir (Wilken et al 2011).

Yapılması amaçlanan bu tezde küçük molekül olarak KAN0438757 akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerindeki etkisi ve Kurkumin ile kombinasyonun daha önce doğrudan ele alınmamış olması çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Bu çalışmadaki temel amacımız, KAN0438757 ve kurkumin kombinasyonun akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki anti-kanser etkisinin araştırılmasıdır.

KAN0438757'nin kendi başına ve yüksek kombinasyon etkisi ile akciğer kanserinde çok önemli bir tedavi hamlesi haline dönüşerek, kemoterapinin etkinliğini maksimum etki minimum toksite ile sonuçlandıracaktır.

Hazırlanan bu tez çalışmasında ilk olarak; A549 ve H1299 hücre hatlarında KAN0438757'nin akciğer kanseri üzerindeki hücre canlılık etkisi WST-1 hücre canlılık testi sonucu belirlenmiştir. A549 hücre hattında maksimum inhibisyon konsantrasyonu 50 degeri; 35.2 μ M olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyasla 100 μ M anlamlı olduğu tespit edildi. DMSO ve 5 μ M'larda anlamlı bir farklılık olmamıştır. 5 μ M grubunda kontrole kıyasla herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. 50,75,100 μ M gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. H1299'da IC50 değeri; 52.4 μ M olarak belirlendi. İstatistiksel olarak en anlamlı grubun kontrole kıyasla 100 μ M olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 25 ve 10 μ M karşılaştırılmasında'da istatistiksel bir farklılık kaydedildi. A549 hücre hattında benzer bir durum H1299 tedavi grupları olan 50, 75, 100 μ M arasında'da herhangi bir istatistiksel anlamlılık olmadığı görülmüştür. Endometriyal hücre hatlarında PFKFB3 inhibitörü

PFK158 ile yapılan bir çalışmada, hücre canlılığın doza bağımlı bir şekilde gittikçe azaldığı rapor edilmiştir(Xiao et al 2021). Oliveira ve arkadaşlarının 2021 KAN0438757 ile tedavinin, HCT-116, SW-1463 ve HUVEC'lerde hücre canlılıklarında konsantrasyona bağlı bir şekilde azaltılabileceğini göstermişlerdir.

Kurkumin tedavisinde ise A549 ve IC50 değeri; 44.37 ve olarak hesaplandı, ayrıca kontrole kıyasla 100 μ M grubunda istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. Yine kontrole kıyasla iki tedavi grubunda (3.125, 6.25 μ M) istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir. H1299 hücre hattında ise IC50; 66.25 μ M değerinde hesaplandı. 3.125, 6.25 μ M grupları kontrole kıyasla anlamlı bir farklılığın olmadığı kaydedildi. Fakat kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak en etkili grubun 100 μ M olduğu görüldü. 25 ve 10 μ M arasında' da istatistiksel anlamlılık görülmüştür. Kurkuminin A549 ve H1299 hücre hatlarında yüksek tedavi grupları (50, 75, 100 μ M) arasında' da istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir.

Baharuddin ve 2016 hücre hattında yaptıkları çalışmada A549 hücre hattında yaklaşık IC50 değeri 40 μ M olarak tespit etmişlerdir. Pillai et al 2004 H1299 hücre hattında ise maksimum inhibisyon konsantrasyon değerini 50 μ M hesaplamışlardır. Elde edilen bu sonuçlara Kurkumin ile yapılan WST-1 sonuçlarının önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Kombine çalışmada ise kurkumin ve KAN0438757 yüksek dozlarının A549 hücrelerinde, hücre canlılıkları önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir.

A549 ve H1299 hücrelerinde eş zamanlı bir hücre proliferasyonu testinde ise her iki hücre hattında da KAN438757'nin tek başına etkisi 50, 75 ve 100 μ M dozlarında hücre proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir. A549 hücrelerinde yapılan kombine tedavide ise KAN0438757 tek başına kullanımına kıyasla düşük kombine gruplarında (20 μ M-Kur+ 20 μ M-KAN) dahi hücre proliferasyonunda gerileme olduğu görülmüştür. KAN0438757, kurkuminin etkinliğini düşük dozlarda artırarak yüksek etki gösterdiği görülmektedir. Gerçek zamanlı hücre proliferasyonu deneyi ile Oliveira ve arkadaşları 2021'de 3 farklı(HCT116, HT19 ve HUVEC) hücre hattında KAN0438757'nin tek başına etkisini en verimli; 25, 50 ve 75 μ M tedavi gruplarında proliferasyonun gittikçe durduğunu ve böylelikle etkinliğinin ne kadar güçlü olduğunu belirtmişlerdir.

Hücre göçü, hücre içi sinyallere yanıt olarak tek bir hücrenin veya bir grup hücrenin yönlendirilmiş hareketi olarak bilinmektedir (Cory 2011). KAN0438757 A549 hücrelerinde hücre göçü testinde görüldüğü üzere kontrol grubuna kıyasla 10 ve 25 μ M tedavilerinde hücre göçü üzerinde yüksek bir durdurucu etki gösterdiği görülmektedir. Kurkumin ile KAN0438757 kombine çalışmasında 'da hücreler arası boşluğun en hızlı kontrol gurubunda kapandığı, ancak 20 μ M-Kur + 20 μ M-KAN grubunun aynı kaldığı belirlenmiştir. Oliveira ve arkadaşlarının 2021'de yaptıkları yara göçü testi ile KAN0438757'nin HTC116, HT19 ve HUVEC hücrelerinde 25 μ M tedavinin, kontrol gruplarına kıyasla hücreler arası boşluğun kapanmadığı gösterilmiştir. Bu sonuç ile KAN0438757'nin hücre göçündeki etkisi A549 hücrelerindeki etkiyle benzerlik gösterdi. 2009'yılında Yalçın ve arkadaşlarının HeLa, HCT116 ve MDA-MB-231 hücre hattlarında yaptıkları çalışmada PFKFB3'ün sitoplazmadan çekirdeğe lokalize olduğunu tespit etmişlerdir. Gustafsson ve arkadaşlarının 2018' PFKFB3'ün DNA hasarı ve DNA metabolizmasında görev aldıklarını U2OS hücre hatlarında KAN0438757 tedavisi ile yaptıkları çalışmada ortaya çıkarmışlardır.

Kemoterapide etkili bir sonuç için kullanılan ajanların DNA hasarı üzerindeki etkileri daima önemli bir yere sahiptir, yapılan tek hücre jel Elektroforezi testinde KAN0438757'nin tek başına A549 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 25 ve 50 μ M tedavilerinde DNA hasarının olduğu gözlemlenmiştir. Fakat düşük tedavilerde (5,10 μ M) herhangi bir kuyruk oluşumu olmadığı görülmüştür ve bunun DNA hasarı oluşmadığının bir göstergesi olarak kaydedilmiştir. KAN0438757 ve Kurkumin kombine çalışmasında ise en fazla DNA hasarı oluşumunun gözlemlendiği grup olarak kabul edildi. KAN0438757-20 μ M tedavisi kombine grubuna kıyasla daha küçük bir kuyruk oluşumu gözlemlenmiş ve böylelikle kombinasyon çalışmasının ne kadar yüksek etki yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca KAN0438757-20 μ M tedavi gurubunun Kurkumin-20 μ M göre DNA hasarı oluşumunda daha etkili olduğu kuyruk oluşumları kayda değer bir sonuç olarak gözlemlenmiştir.

Kanser tedavisinde her zaman programlı hücre ölüm yollarını aktive etmek etkili bir seçenek olmuştur. Akridin oranj-etidyum bromür boyamasında A549 hücrelerinde KAN04387'nin tek başına etkisinin kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında en yüksek hücre ölümünün (Geç apoptoz) 50 μ M dozunda gerçekleştiği görülmüştür. 25 ve 10 μ M dozlarında ise hücrelerin ağırlıklı olarak erken apoptozda oldukları belirlenmiştir.

KAN0438757 ve kurkumin kombinasyonunda ise hücrelerin monoterapiye kıyasla hücreleri daha fazla geç apoptoza taşıdıkları görülmüştür. Lypova ve arkadaşlarının 2021’de yaptıkları akridin oranj boyamasında PFKFB3 inhibitörü 5uM-PFK158’in tek başına PC9 hücrelerinde erken apoptozu başlattığını gözlemlemişlerdir. PFK158’in başka bir ajanla ile kombinasyonunda oldukça yüksek oranda hücrelerin geç apoptoza geçtikleri belirtilmiştir. Böylelikle KAN0438757 kombinasyon çalışmasının Lypova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile tutarlılık göstermesi kombinasyon tedavisinin etkinliğinin yüksek olduğunu destekler niteliktedir.

Mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$), Krebs döngüsünün aktivitesi ile ilişkili redoks dönüşümlerinden kaynaklanır ve ATP sentaz tarafından ATP yapmak için kullanılan bir ara enerji depolama formu olarak hizmet etmektedir(Zorova et al 2018). Mitokondriyal potansiyel testi ile elde edilen sonuçlarda KAN0438757’nin tek başına A549 hücrelerinde kontrol gruplarında herhangi bir renk değişiminin olmadığı fakat 25 μ M tedavi dozunda hücrelerin mitokondriyal membran bütünlüklerini kaybederek renk değişimi ve hücre yoğunluğu ile tespit edilmiştir.

Kombinasyon tedavisinde ise, kurkumin 20- μ M ve KAN0438757-20 μ M gruplarında hücre yoğunlukları ve renk değişiminin kontrole kıyasla etkilerinin olduğu görülmüştür. Fakat kombine grubunda ise renk değişimi ile hücre sayısındaki fazla azalma çok açık şekilde etki ettiği belirlenmiştir. Klarer ve arkadaşlarının 2014’de yaptıkları çalışmada HCT-116 hücre hattında yapılan çalışmada, 3PO’nun yalnız kullanımının programlı hücre ölümü tip-2’yi(otofaji) aktivelediği görülmüştür.

p53’ün transkripsiyonel hedefi olan TIGAR, programlanmış hücre ölümünü düzenleyerek çok önemli bir rol oynamaktadır. TIGAR proteinindeki etki hücre içerisindeki reaktif oksijen türlerinin miktarına göre değişiklik göstermektedir (Bensaad et al 2006). BAX, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. BCL2 ailesi üyeleri, hetero veya homodimerler oluşturur ve çok çeşitli hücresel aktivitelerde yer alan anti veya pro-apoptotik düzenleyiciler olarak işlev görmektedir. Bu protein, BCL2 ile bir heterodimer oluşturur ve apoptotik bir aktivatör olarak işlev görür. Pro-apoptotik bir protein olan BAX’da ise artış olduğu zaman programlı hücre ölümü-1(Apoptoz) aktivelediği görülmektedir (Oltval et al 1993). Western blotting deneyi ile önemli apoptoz biyobelirteçleri olan BAX ve TIGAR’ın hücre ölümü üzerine

etkisine bakılmıştır. TIGAR proteininde kontrol gurubuna kıyasla kombinasyon gurubunda bir artış görüldü. Fakat en yüksek protein artışının kurkumin-20 μM grubunda olduğu görüldü. BAX proteinindeki kontrole kıyasla kombine tedavi gurubundaki gözle görülür artışın A549 hücrelerinde hücre ölümünü aktive ettikleri önceki yapılan boyama deneyleri ile örtüşür şekilde sonuçlandığı için hücre ölümünün aktive olduğu gözlemlendi. KAN043757-20 μM grubunda' da BAX proteinindeki artışın mono terapisinde önemli ölçüde etki yaptığının göstergesi olarak tespit edilmiştir

Zhu ve arkadaşlarının 2016 mide kanseri hücrelerinde PFK15 ile yaptıkları çalışmada tedavi gruplarında Bcl-2 seviyelerinin ekspresyonunu azaltmış olduğu, ancak her iki mide kanseri hücre hattında Bax ekspresyon seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermişlerdir. Bcl-2/Bax oranının PFK15 konsantrasyonuna bağlı bir şekilde azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçların, PFK15'in kaspaz 8 aracılı dış apoptoz yolundan ziyade kaspaz 9, kaspaz 3 ve Bcl-2'nin protein seviyelerini düşürerek mitokondriyal yol boyunca apoptozu indüklediğini ileri sürmüşlerdir. Xiao ve arkadaşlarının 2021'de PFKB3 inhibitörü PFK158'in endotermiyal hücrelerde yüksek oranda BAX proteninde kontrole göre artışa neden olduğu görülmüştür, diğer anti-apoptotik proteinlerinde miktarlarında artışların olduğu tespit edilmiştir. HEC-1B ve ARK-2 hücrelerinde Xiao ve arkadaşları PFK158 karboplatin/sisplatin ile kombine yaptıklarında programlı hücre ölümünü Annexin V ile ölçtüklerinde yüksek miktarda hücrenin öldüğünü tespit etmişlerdir. Aynı şekilde KAN0438757 kombine tedavisinde Xiao ve arkadaşlarının aldıkları sonuçlarla benzer etkilerin görülmesi kombine tedavisinin etkinliğinin monoterapiye kıyasla yüksek olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abbas Z, Rehman S (2018) An Overview of Cancer Treatment Modalities. In Neoplasm. INTECHOPEN LIMITED London 6:139-158

Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC (2003) Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* 23(1): 363–398

Ali BH, Marri H, Noureldayem SA, Bakheit AO, Blundene G (2006) Some biological properties of curcumin: A review. *Natural Product Communications* 1(6): 509–521

Alrawaiq NS, Abdullah A (2014) A review of antioxidant polyphenol curcumin and its role in detoxification. *Int J Pharm Tech Res* 6(1): 280–289

Angahar LT (2017) An Overview of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, Pathophysiology, and Cancer Risks Reduction. *MOJ Biology and Medicine* 1(4): 92–96

Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R (2002) High Expression of Inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2, 6-Bisphosphatase. *Cancer Research* 62: 5881–5887

Baharuddin P, Satar N, Fakiruddin Shaik K, Zakaria N, Lim NM, Yusoff MN, Zakaria Z, Yahaya HB (2016) Curcumin improves the efficacy of cisplatin by targeting cancer stem-like cells through p21 and cyclin D1-mediated tumour cell inhibition in non-small cell lung cancer cell lines *Oncol Rep* 35(1): 13–25

Bartrons R, Simon MH, Rodríguez GA, Castaño E, Navarro SÀ, Manzano A, Martinez OUE (2018) Fructose 2, 6-bisphosphate in cancer cell metabolism. *Frontiers in Oncology* 8: 331

Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B (2008) Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326(1): 196–208

Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH (2006) TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* 126(1): 107–120

Calvo MN, Bartrons R, Castano E, Perales JC, NavarroSA, Manzano A (2006) PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Letters* 580(13): 3308–3314

Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, Chaturvedi P, Hol J, Thienpont B, Teuwen LA (2016) Inhibition of the glycolytic activator PFKFB3 in endothelium induces tumor vessel normalization, impairs metastasis, and improves chemotherapy. *Cancer Cell* 30(6): 968–985

Cavalier MC, Kim S, Neau D, Lee Y (2012) Molecular basis of the fructose-2, 6-bisphosphatase reaction of PFKFB3: Transition state and the C-terminal function. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 80(4): 1143–1153

Chen CC, Sureshbabul M, Chen HW, Lin YS, Lee JY, Hong QS, Yang YC, Yu SL (2013) Curcumin suppresses metastasis via Sp-1, FAK inhibition, and E-cadherin upregulation in colorectal cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, s. 1-1

Chen Q, Men Y, Wang H, Chen R, Han X, Liu J (2019) Curcumin inhibits proliferation and migration of A549 lung cancer cells through activation of ERK1/2 Pathway-induced autophagy. *Natural Product Communications* 14(6): 1–7

Clem BF, Neal J, Tapolsky G, Clem AL, Imbert FY, Kerr DA, Klarer AC, Redman R, Miller DM, Trent JO, Telang S, Chesney J (2013) Targeting 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFKFB3) as a Therapeutic Strategy against Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 12(8): 1461 – 1470

Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rask, MA, Arumugam S, Dean WL, Eaton J (2008) Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(1): 110–120

Cory G (2011) Scratch-Wound Assay. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) (769): 25–30

Conboy L, Foley AG, Boyle NM, Lawlor M, Gallagher HC, Murphy KJ, Regan CM (2009) Curcumin-induced degradation of PKC δ is associated with enhanced dentate NCAM PSA expression and spatial learning in adult and aged Wistar rats. *Biochemical Pharmacology* 77(7): 1254–1265

Corte TJ, Bois RM, Wells AU (2010) Murray and Nadel's textbook of respiratory medicine. The Lungs and Connective Tissue Diseases. 5th Ed. St. Louis, MO. Saunders Elsevier 1398–1429

de Alencar VTL, Formiga MN, de Lima VCC (2020) Inherited lung cancer: A review. *Ecancermedicalscience* 14: 1–13

De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong, B. W, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquiere B, Cauwenberghs S, Eelen G (2013) Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154(3): 651–663

de Mello RA, Ferreira M, Soares PF, Costa S, Cunha J, Oliveira P, Hespanhol V, Reis RM (2013) The Impact of Polymorphic Variations in the 5p15, 6p12, 6p21 and 15q25 Loci on the Risk and Prognosis of Portuguese Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 8(9): 72373

Doménech E, Maestre C, Esteban, ML, Partida D, Pascual R, Fernández MG, Seco E, Campos OR, Pérez M, Megias D (2015) AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nature Cell Biology* 17(10): 1304–1316

Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835): 342–348

Fortunato S, Bononi G, Granchi C, Minutolo F (2018) An update on patents covering agents that interfere with the cancer glycolytic cascade. *ChemMedChem* 13(21): 2251–2265

Gholamnejad M (2019) Biomass Fuel Exposure and Lung Cancer Risk Among Nonsmoking Women 7(3): 2484

Gustafsson NMS, Färnegårdh K, Bonagas N, Ninou AH, Groth P, Wiita E, Jönsson M, Hallberg K, Lehto J, Pennisi R, Martinsson J, Norström C, Hollers J, Schultz J, Andersson M, Markova N, Marttila P, Kim B, Norin M, Helleday T (2018) Targeting PFKFB3 radiosensitizes cancer cells and suppresses homologous recombination. *Nature Communications* 9(1): 1-16

Hamra GB, Laden F, Cohen AJ, Raaschou NO, Brauer M, Loomis D (2015) Lung Cancer and Exposure to Nitrogen Dioxide and Traffic: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives* 123(11): 1107–1112

Hanahan D, Weinberg RA (2018) Hallmarks of cancer: An organizing principle for cancer medicine. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology 2018: 44–65

Hasima N, Aggarwal BB (2012) Cancer-linked targets modulated by curcumin. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology 3(4): 328–351

Hecht SS (2012) Lung carcinogenesis by tobacco smoke. International Journal of Cancer 131(12): 2724–2732

Hejmadi M (2014) Introduction to cancer biology. Bookboon, s. 6

Hers HG, Van SE (1982) Fructose 2, 6-bisphosphate 2 years after its discovery. Biochemical Journal 206(1): 1

Houddane A, Bultot L, Novellademunt L, Johanns M, Gueuning MA, Vertommen D, Coulie PG, Bartrons R, Hue L, Rider MH (2017) Role of Akt/PKB and PFKFB isoenzymes in the control of glycolysis, cell proliferation and protein synthesis in mitogen-stimulated thymocytes. Cellular Signalling 34: 23–37

Hussain AR, Ahmed M, AlJomah NA, Khan AS, Manogaran P, Sultana M, Abubaker J, Platanias LC, AlKuraya KS, Uddin S (2008) Curcumin suppresses constitutive activation of nuclear factor- κ B and requires functional Bax to induce apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines. Molecular Cancer Therapeutics 7(10): 3318–3329

Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, HE P (1993) A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 41(6): 1118–1122

Jaakkola MS, Jaakkola JJK (2006) Impact of smoke-free workplace legislation on exposures and health: possibilities for prevention. European Respiratory Journal 28(2): 397–408

Jakopovic M, Thomas A, Balasubramaniam S, Schrump D, Giaccone G, Bates SE (2013) Targeting the epigenome in lung cancer: expanding approaches to epigenetic therapy. Frontiers in Oncology 3: 261

Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch, M (2010) Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010: 150960

Jurenka JS (2009) Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of. Alternative Medicine Review 14(2): 141–154

Klarer AC, O'Neal J, Imbert-Fernandez Y, Clem A, Ellis SR, Clark J, Clem B, Chesney J, Telang S (2014) Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy as a survival mechanism. *Cancer and Metabolism* 2(1): 1–14

Klein CA (2008) The metastasis cascade. *Science*, p. 1785–1787

Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. In *Nature Reviews Cancer* 11(5): 325–337

Kotowski K, Rosik J, Machaj F, Supplitt S, Wiczew D, Jabłońska K, Wiechec E, Ghavami S, Dziągiel P (2021) Role of pfkfb3 and pfkfb4 in cancer: Genetic basis, impact on disease development/progression, and potential as therapeutic targets. *Cancers* 13(4): 909

Kotowski K, Supplitt S, Wiczew D, Przystupski D, Bartosik W, Saczko J, Rossowska J, Drag-Zalesińska M, Michel O, Kulbacka J (2020) 3PO as a selective inhibitor of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3 in A375 human melanoma cells. *Anticancer Research* 40(5): 2613–2625

Lagunas RFA, Bermúdez CRM (2020) Natural Compounds That Target DNA Repair Pathways and Their Therapeutic Potential to Counteract Cancer Cells. *Frontiers in Oncology* 10: 2567

Lavanya V, Adil M, Ahmed N, Rishi AK, Jamal S (2014) Small molecule inhibitors as emerging cancer therapeutics. *Integrative Cancer Science and Therapeutics* 1(3): 39–46

Lee DS, Lee MK, Kim JH (2009) Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. *Anticancer Research* 29(12): 5039–5044

Lemjabbar AH, Hassan OUI, Yang YW, Buchanan P (2015) Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1856(2): 189–210

Lev-Ari S, Starr A, Vexler A, Karaush V, Loew V, Greif J, Fenig E, Aderka D, Ben Yosef R (2006) Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity. *Anticancer Research* 26(6): 4423–4430

Li X, Liu J, Qian L, Ke H, Yao C, Tian W, Liu Y, Zhang J (2018) Expression of PFKFB3 and Ki67 in lung adenocarcinomas and targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 445(1–2): 123–134

Lu L, Chen Y, Zhu Y (2017) The molecular basis of targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy against cancer. *Oncotarget* 8(37): 62793–62802

Lypova N, Dougherty SM, Lanceta L, Chesney J, Imbert FY (2021) PFKFB3 Inhibition Impairs Erlotinib-Induced Autophagy in NSCLCs. *Cells* 10(7):1679

Macut H, Hu X, Tarantino D, Gilardoni E, Clerici F, Regazzoni L, Contini A, Pellegrino S, Gelmi ML (2019) Tuning PFKFB3 bisphosphatase activity through allosteric interference. *Scientific Reports* 9(1): 1–10

Mahlknecht U, Chesney J, Hoelzer D, Bucala R (2003) Cloning and chromosomal characterization of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 gene (PFKFB3, iPFK2). *International Journal of Oncology* 23(4): 883–891

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727–747

Massion PP, Carbone DP (2003) The molecular basis of lung cancer: Molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respiratory Research* 4: 1–15

Murár M, Horvathová J, Moravčík R, Addová G, Zeman M, Boháč A (2018) Synthesis of glycolysis inhibitor (E)-3-(pyridin-3-yl)-1-(pyridin-4-yl) prop-2-en-1-one (3PO) and its inhibition of HUVEC proliferation alone or in a combination with the multi-kinase inhibitor sunitinib. *Chemical Papers* 72(12): 2979–2985

Navarro A, Manzano A, Riera L, Rosa JL, Ventura F, Bartrons R (2001) The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* 264(1): 131–138

Newsholme EA, Start C (1973) Regulation in metabolism, p. 349

Oliveira TD, Goldhardt T, Edelmann M, Rogge T, Rauch K, Kyuchukov ND, Menck K, Bleckman A, Kalucka J, Khan S (2021) Effects of the novel pfkfb3 inhibitor kan0438757 on colorectal cancer cells and its systemic toxicity evaluation in vivo. *Cancers* 13(5): 1011

Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4): 609–619

Organization WH (2018) WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000-2025 World Health Organization, p. 1-121

Warburg O, Wind F, Negelein E (1927) The metabolism of tumors in the body. *Journal of General Physiology* 8(6): 519-530

Pavlova NN, Thompson CB (2016) The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism* 23(1) 27–47

Pendharkar D, Ausekar BV, Gupta S (2013) Molecular Biology of Lung Cancer-A Review. *Indian Journal of Surgical Oncology* 4(2): 120–124

Peng F, Li Q, Su JY, Luo Y, Chen M, Bao Y (2018) PFKFB3 is involved in breast cancer proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *International Journal of Oncology* 52(3): 945–954

Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Zur A (2012) JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death & Disease* 3(11): 430–430.

Peto R, Boreham J, Lopez AD (1996) Mortality from smoking in developed countries. Oxford University Press p. 3-479

Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ, Lange AJ (1995) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annual Review of Biochemistry* 64(1): 799–835

Pillai GR, Srivastava AS, Hassanein TI, Chauhan DP, Carrier E (2004) Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Letters* 208(2): 163–170

Predina JD, Keating J, Patel N, Nims S, Singhal S (2016) Clinical implications of positive margins following non-small cell lung cancer surgery. *Journal of Surgical Oncology* 113(3): 264–269

Priyadarsini KI (2014) The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules* 19(12): 20091–20112

Rani V, Yadav UCS (2018) Curcumin in Cancer Prevention. In *Functional Food and Human Health* 2(2019): 329-374

Redman R, Pohlmann P, Kurman M, Tapolsky GH, Chesney J (2015) PFK-158, first-in-man and first-in-class inhibitor of PFKFB3/glycolysis: A phase I, dose escalation, multi-center study in patients with advanced solid malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 75: 615

Remick J, Amin NP (2019) Postmastectomy Breast Cancer Radiation Therapy.

Rider, M. H, & Bartrons R (2010). Fructose 2, 6-bisphosphate: the last milestone of the 20th century in metabolic control. *Biochem J* 32: 1–5

Rodgers GM, Becker PS, Blinder M, Cella D, Chanan A, Cleeland C, Coccia PF, Djulbegovic B, Gilreath JA, Kraut EH (2012) Cancer-and chemotherapy-induced anemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 10(5): 628–653

Ros S, Schulze A (2013) Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2, 6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer & Metabolism* 1(1): 1–10

Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA (2010) The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990) 46(10): 1773–1780

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 215-217

Schoors S, DeBock K, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Kuchnio A, Wong BW, Quaegebeur A, Goveia J (2014) Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metabolism* 19(1): 37–48

Seo M, Kim JD, Neau D, Sehgal I, Lee YH (2011) Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: a framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect. *PloS One* 6(9): 24179

Shi L, Pan H, Liu Z, Xie J, Han W (2017) Roles of PFKFB3 in cancer. *Nature Publishing Group* 2(6): 1–10

Shi WK, Zhu XD, Wang CH, Zhang YY, Cai H, Li XL, Cao MQ, Zhang SZ, Li KS, Sun, HC (2018) PFKFB3 blockade inhibits hepatocellular carcinoma growth by impairing DNA repair through AKT article. *Cell Death and Disease* 9(4):1-12

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries CA. *A Cancer Journal for Clinicians* 71(3): 209–249

Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB (2008) Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3): 1089–1099

Tarro G, Paolini M, Rossi A (2019) Molecular Biology of Lung Cancer and Future Perspectives for Screening. *Mass Spectrometry - Future Perceptions and Applications* 4(2019):1-16

Unlu A, Nayir E, Kalenderoglu MD, Kirca O, Ozdogan M (2016) Curcumin (Turmeric) and cancer. *J Buon* 21(5): 1050–1060

Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, Kazazis C (2015) Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of Curcumin. In *Anticancer Research* 652(35): 645–651

Wadowska K, BilLula I, Trembecki Ł, ŚliwińskaMossoń M (2020) Genetic markers in lung cancer diagnosis: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 21(13): 1–24

Wang C, Qu J, Yan S, Gao Q, Hao S, Zhou D (2018) PFK15, a PFKFB3 antagonist, inhibits autophagy and proliferation in rhabdomyosarcoma cells 21: 359–367

Wang Y, Qu C, Liu T, Wang C (2020) European Journal of Medicinal Chemistry PFKFB3 inhibitors as potential anticancer agents: Mechanisms of action, current developments, and structure-activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry* 203(1):112612

Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191): 309–314

Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES (2011) Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer* 10(1): 1–19

Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD (2001) Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Seminars in Oncology* 28: 3–13

Wu L, Guo L, Liang Y, Liu X, Jiang L, Wang L (2015) Curcumin suppresses stem-like traits of lung cancer cells via inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncology Reports* 34(6): 3311–3317

Xiao Y, Jin L, Deng C, Guan Y, Kalogera E, Ray U, Thirusangu P, Staub J, Sarkar Bhattacharya S, Xu H, Fang X, Shridhar V (2021) Inhibition of PFKFB3 induces cell death and synergistically enhances chemosensitivity in endometrial cancer. *Oncogene* 40(8): 1409–1424

Yalcin A, Clem BF, Imbert FY, Ozcan SC, Peker S, ONeal J, Klarer AC, Clem AL, Telang T, Chesney J (2014) 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression

and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death and Disease* 5(7): 1–10

Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S (2009) Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry* 284(36): 24223–24232

Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J (2009) Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 86(3): 174–179

Yi M, Ban Y, Tan Y, Xiong W, Li G, Xiang B (2019) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3 and 4: a pair of valves for fine-tuning of glucose metabolism in human cancer. *Molecular Metabolism* 20: 1–13

Zhang L, Cheng X, Xu S, Bao J, Yu H (2018) Curcumin induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells via disruption of intracellular calcium homeostasis. *Medicine (United States)* 97: 24

Zheng J, Cheng J, Zheng S, Feng Q, Xiao X (2018) Curcumin, a polyphenolic curcuminoid with its protective effects and molecular mechanisms in diabetes and diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Pharmacology* 9(5): 1–10

Zheng Min (2016) Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 25(3): 447–468

Zheng M, Ekmekcioglu S, Walch ET, Tang CH, Grimm EA (2004) Inhibition of nuclear factor- κ B and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. *Melanoma Research* 14(3): 165–171

Zhou GZ, Zhang SN, Zhang L, Sun GC, Chen XB (2014) A synthetic curcumin derivative hydrazinobenzoylcurcumin induces autophagy in A549 lung cancer cells. *Pharmaceutical Biology* 52(1): 111–116

Zhou HS, Beevers C, Huang S (2012) The Targets of Curcumin. In *Current Drug Targets* 12(3): 332–347

Zorova LD (2018) Mitochondrial Membrane Potential. *Analytical Biochemistry* 552: 50–59

Zhu W, Ye L, Zhang J, Yu P, Wang H, Ye Z, Tian J (2016) PFK15, a small molecule inhibitor of PFKFB3, induces cell cycle arrest, apoptosis and inhibits invasion in gastric cancer. PLoS ONE 11(9): 1–14