

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

**AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KAN0438757 VE
RESVERATROL KOMBİNASYONUNUN PROGRAMLI HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEHER SARUHAN

MOEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

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

BİNGÖL-2022

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince maddi manevi her konuda yanımda olan, desteğini, anlayışını ve bilgi birikimini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Can Ali Ağca'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımlarını eksik etmeyen Bingöl Üniversitesi Yüksek lisans öğrencisi Deniz Özdemir'e katkılarından dolayı teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışmama vermiş oldukları destekten dolayı Bingöl Üniversitesi Rektörlüğüne (Proje No: BAP-FEF.2021.004) teşekkür ederim.

Bu süreçte yanımda olan aileme, arkadaşım Şeyma Akbulut'a ve erkek arkadaşım Mehmet Özer'e ilgileri, sevgileri ve gösterdikleri fedakarlıktan dolayı son derece minnettarım.

Yüksek lisans tezimi, hayatım boyunca hep yanımda olan, beni bu günlere getiren, onun için savaştığım, henüz bir yıl önce hayatını kaybeden dünyanın en iyi annesine, anneme ithaf ediyorum.

Seher SARUHAN

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Akciğer Kanseri	3
1.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi	3
1.1.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri	5
1.1.3. Akciğer Kanseri Güncel Tedavi Yaklaşımları	6
1.2. Fosfofruktokinaz-2/fructose-2, 6-bifosfataz (PFKFB).....	7
1.2.1. Akciğer Kanseri Tedavisinde PFKFB3 Hedefli Küçük Molekül İnhibitörleri.....	11
1.3. Resveratrol	14
1.1.1. Resveratrol'ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	15
1.1.1. Resveratrol'ün Antikanser Etkileri	17
1.1.1. Resveratrol'ün Programlı Hücre Ölümüne Etkisi	18
1.1.1. Resveratrol'ün DNA Hasarına Etkisi	21
2. MATERYAL VE YÖNTEM	22
2.1. Hücre Kültürü	22
2.1.1. Hücrelerin Kültüre Alınması	23
2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması (Çoğaltılması)	23
2.1.3. Hücre Sayımı	24

2.1.4. Hücrelerin Dondurulması	25
2.2. Hücre Canlılığı.....	25
2.2.1. WST-1 Testi	25
2.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi	26
2.4. Akridin Orange-Etidium Bromide ile Hücre Ölümü Değerlendirmesi.....	27
2.5. Mitokondri Membran Potansiyeli'nin Belirlenmesi.....	28
2.6. Hücre Göçü Analizi	29
2.7. Western Blot Deneyi	29
2.8. İstatiksel Analiz	33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
3.1. KAN0438757'nin A549 ve H1299 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	34
3.2. Resveratrol'ün A549 ve H1299 Hücre Hatları Üzerindeki Hücre Canlılığına Etkisi.....	37
3.3. A549 Hücre Hattında, KAN0438757 ve Farklı Dozlardaki Resveratrol Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi.....	38
3.4. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	39
3.5. H1299 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	40
3.6. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ile Resveratrol Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	41
3.7. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Ölümü Üzerine Etkisi.....	42
3.8. A549 Hücre Hattının KAN0438757 ve Resveratrol Kombinasyonunun Hücre Ölümü Üzerine Etkisi.....	43
3.9. A549 Hücre Hattı Üzerinde KAN0438757'nin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi.....	44
3.10. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerinde KAN0438757 ile Resveratrol Kombinasyonunun Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi.....	45
3.11. A549 Hücre Hattında Resveratrol ve KAN0438757 Kombinasyonun	

Hücre Göçü Üzerine Etkisi.....	46
3.12. KAN0438757 ve Resveratrol Kombinasyonlarının Bax, Beclin-1 ve p62 Protein Düzeleri Üzerine Etkileri.....	47
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

M	: Molar
μL	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
rpm	: Dakikada devir sayısı
mm	: Milimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
ADP	: Adenozin Di Fosfat
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
PFK-1	: Fosfofruktokinaz
PFKFB	: Fosfofruktokinaz-2/früktoz 2,6 bifosfat
F6P	: Fruktoz 6-fosfat
F2,6BP	: Fruktoz 2,6 bifosfat
F1,6BP	: Fruktoz 1,6 bifosfat
PFK-2	: Kinaz
FBPase	: Bisfosfataz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz

SIRT-1	: Situin-1
CO ₂	: Karbon Di Oksit
O ₂	: Oksijen
FBS	: Fetal Bovine Serum
DMSO	: Di Metil Sülfoksit
PBS	: Fosfat Buffer Saline
AO	: Akridin Oranj
EB	: Etidyum Bromür
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
SDS	: Sodyum Dodesül Sülfat
APS	: Amonyum Per Sülfat
TBS-T	: Fosfat Buffer Solüsyonu
IC ₅₀	: İnhibisyon Konsantrasyon Değeri
UV	: Ultra Viyole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Kanserin ayırt edici özellikleri.....	2
Şekil 1.2.	2020’ de Dünya çapında her yaşta ve her iki cinsiyette kansere bağlı ölüm sayıları	4
Şekil 1.3.	PFKFB3, çoklu sinyal yolları tarafından düzenlenmesi	8
Şekil 1.4.	Normal doku ile tümörlü doku arasında enerji meydana getirme aşamaları	9
Şekil 1.5.	PFKFB3’ün hücre döngüsü ve apoptozdaki rolü	10
Şekil 1.6.	KAN0438757 molekülünün, moleküler mekanizması	13
Şekil 1.7.	Resveratrolün moleküler yapısı	14
Şekil 1.8.	Resveratrol’ün trans ve cis izomerleri	16
Şekil 1.9.	Resveratrolün karsinogenezin tüm aşamalarını etkileyebilmesi	18
Şekil 1.10.	Memeli hücresinde apoptozis yolakları; intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaklar	19
Şekil 1.11.	Resveratrol, hücre döngüsü ilerlemesini ve apoptozla ilgili moleküler yolları modüle ederek hücre çoğalmasını durdurması	20
Şekil 2.1.	WST-1 hücre canlılığı testi protokolü	26
Şekil 2.2.	xCELLigence test aşamaları	27
Şekil 2.3.	Western blot elektroforez basamakları	31
Şekil 2.4.	Membrana transfer aşaması	32
Şekil 2.5.	Bloklama ve antikorlarla muamele basamağı	32
Şekil 3.1.	KAN0438757’nin hücre canlılığı üzerine etkisi (A) A549 hücre canlılığı (B) A549 hücre görüntüleri	34
Şekil 3.2.	KAN0438757’nin hücre canlılığı üzerine etkisi (A) H1299 hücre canlılığı (B) H1299 hücre görüntüleri (C) A549 ve H1299 hücre hatlarında KAN0438757’nin hücre canlılığına etkisi	35

Şekil 3.3.	Resveratrol'ün hücre canlılığına etkisi (A) A549 hücre hattı (B) H1299 hücre hattı (C) A549 ve H1299 hücre hatlarında resveratrolün hücre canlılığına etkisi	37
Şekil 3.4.	A549 hücre hattında, KAN0438757 ve resveratrol kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi	38
Şekil 3.5.	A549 hücre hattının KAN0438757 ile tedavisi sonucu hücre proliferasyon test sonucu	39
Şekil 3.6.	H1299 hücresinin KAN0438757 ile tedavisinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi	40
Şekil 3.7.	A549 hücre hattı üzerinde KAN0438757 ile resveratrol kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkisi	41
Şekil 3.8.	A549 Hücresinin KAN0438757 ile tedavisinin hücre ölümü üzerindeki etkisi	42
Şekil 3.9.	A549 hücre hattında resveratrol ile KAN757'nin kombinasyonunun hücre ölümü üzerindeki etkileri	43
Şekil 3.10.	A549 hücre hattında KAN757 ile tedavi sonrası mitokondri membran potansiyeli deney sonuçları	44
Şekil 3.11.	A549 hücre hattında Resveratrol ve KAN757'nin kombinasyon tedavisinin mitokondri membran potansiyeline etkileri	45
Şekil 3.12.	A549 hücre hattında Resveratrol ile KAN0438757 molekül kombinasyon tedavisinin hücre göçü deney sonuçları	46
Şekil 3.13.	A549 hücre hattında KAN0438757 ile Resveratrol'ün kombinasyon tedavisinin Western blot deney sonuçları	47

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KAN0438757 VE RESVERATROL KOMBİNASYONUNUN PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

ÖZET

Akciğer kanseri, dünya çapında birçok kanser arasında en sık görülen kanser türüdür. PFKFB3, glikoliz sürecinde önemli role sahip bir enzimdir. Sahip olduğu yüksek kinaz/fosfataz oranı ile (740:1) kanser hücrelerinde önemli bir hedef olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar ışığında geliştirilen PFKFB3 hedefli PFK-158 küçük molekül inhibitörü ile solid tümör hastalarında faz I klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmaların neticesinde, PFKFB3'ü hedefleyen, daha etkin bir küçük molekül inhibitörlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yakın zaman önce ortaya çıkan KAN0438757 inhibitörü, normal hücelere zarar vermeden transforme hücrelerde çoğalmayı inhibe ettiği bildirilmiştir. Resveratrol bileşiği üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yapraklarında bulunur ve patojenler bitkilere saldırdığında ve yaralandığında bitkiler tarafından üretilir. Ayrıca resveratrol antikanser etkilere sahiptir ve hücre büyümesi, inflamasyon, apoptoz, metastaz ve anjiyogenezi kontrol ederek çeşitli sinyal iletim yollarını etkileyerek kanserin tüm evrelerini etkilemektedir. Bu çalışmada, resveratrol ve KAN0438757 kombinasyonunun, hücre proliferasyonu, hücre ölümü, mitokondriyal membran potansiyeli, hücre göçü ve programlı hücre ölümü biyobelirteçleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Elde edilen veriler ile resveratrol ve KAN0438757 kombinasyon tedavisinin hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği ve hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda kombinasyon tedavisi ile hücre göçünün engellendiği ve hücrelerin programlı hücre ölümü ile apoptoza gittiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler, resveratrolün, KAN0438757'nin etkinliğini arttırdığını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, PFKFB3, KAN0438757, resveratrol, apoptoz.

THE EFFECT OF KAN0438757 AND RESVERATROL ON SCHEDULED CELL DEATH IN THE TREATMENT OF LUNG CANCER

ABSTRACT

Lung cancer is the most common type of cancer among many cancers worldwide. PFKFB3 is an enzyme that has an important role in the glycolysis process. With its high kinase/phosphatase ratio (740:1), it is considered an important target in cancer cells. Phase I clinical studies were carried out in solid tumor patients with the PFKFB3-targeted PFK-158 small molecule inhibitor, which was developed in the light of the studies conducted in this context. As a result of these studies, it was aimed to develop more effective small molecule inhibitors targeting PFKFB3. The recently emerged inhibitor KAN0438757 has been reported to inhibit proliferation in transformed cells without harming normal cells. Resveratrol compound is found in grape, red wine, peanut, vine leaves and is produced by plants when pathogens attack and injure plants. In addition, resveratrol has anticancer effects and affects all stages of cancer by affecting various signal transduction pathways by controlling cell growth, inflammation, apoptosis, metastasis and angiogenesis. In this study, it is aimed to determine the effects of resveratrol and KAN0438757 combination on cell proliferation, cell death, mitochondrial membrane potential, cell migration and programmed cell death biomarkers. With the obtained data, it has been shown that resveratrol and KAN0438757 combination therapy significantly inhibited cell viability and reduced cell proliferation. At the same time, it was determined that cell migration was inhibited by combination therapy and cells went to apoptosis with programmed cell death. These data reveal that resveratrol increases the effectiveness of KAN0438757.

Keywords: Lung cancer, PFKFB3, KAN0438757, resveratrol, apoptoz.

1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ile karakterize edilen, dünya çapında sıklıkla karşılaşılan ve ölüm oranları gün geçtikçe hızlı bir şekilde artmaya devam eden hastalıklardan biridir. Ayrıca ülkemizde de artan nüfus ve yaşlılıkla beraber kanserin görülme sıklığı oldukça fazladır (Siegel et al., 2012). Bununla birlikte, kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümden sonra kanser dünya genelinde ölüm oranı sıralamasında ikinci sırada yer almaktadır (Cooper et al., 2013). Kanser, doğal gelişimi ölüme yol açabilen, kendiliğinden düzensiz bölünüp çoğalarak bulunduğu bölge dışına yayılabilen (invazyon) damar oluşumu (anjyogenesiz) sonucunda, hücrelerin orijinden uzak dokulara hareketi (metastaz) ile ortaya çıkan bozukluklar olarak kabul edilmektedir (Jones & Baylin, 2007). İnsan vücudu yapısal ve fonksiyonel işlevleri olan birçok hücreden meydana gelmektedir. Bu hücreler sağlıklı bir insan vücudunda kontrollü olarak büyür ve bölünürler. Fakat bu hücreler yaşlandığında, hasara uğradığında veya mutasyonlar sonucunda ölmesi ve planlanmış olarak yeni hücrelerle değiştirilmesi olayı apoptoz olarak adlandırılır (Hanahan & Weinberg, 2011). Çoğalan hücreler kanserli değil ise iyi huylu (being) tümör olarak adlandırılırlar ve bu tümörler diğer doku ve organlara yayılmazlar. Aynı zamanda cerrahi yöntemler kullanılarak tedavi edilebilirler. Kötü huylu (maling) tümörler ise kanser hücrelerinin meydana getirdiği tümörler olarak bilinmektedirler. Bu tümörler ilk olarak yakın doku ve organlara sonrasında ilerleme durumuna göre uzak dokulara metastaz yapma özelliği gösterirler (Characteristics & Adrenocortical, 1985). Bilinen 100' den fazla çeşitli kanser türü bulunmaktadır. Bu kanser türleri ortaya çıktıkları doku veya organa göre isimlendirilmektedirler. Aynı zamanda belirli organlarda tümör alt tipleri de yer almaktadır (Hanahan & Weinberg, 2011).

Yıllarca yapılan araştırmalar, klinik öncesi analizlere dayanarak bilim insanları 2000 yılında kanser hücrelerini normal hücreden ayıran 6 özellik belirlemişlerdir. Metastaz aktivasyonu ve invazyon, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, büyüme baskılayıcılarından kaçış, immün sistemin yıkımından kaçış ve anjiyogenesiz indüksiyonu olarak sınıflandırılmıştır. Bunun yanı sıra yapılan son çalışmalarda, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, hücresel ölümden kaçış, proliferasyon sinyalinin sürdürülmesi ve inflamasyon olmak üzere kanseri karakterize eden 4 özellik daha eklenerek, kanserin 10 özelliği ortaya çıkmıştır. Kanser bu özellikleri normal bir hücrenin öldürücü bir hale dönüşerek doku ve organlara nasıl yayıldığını tanımlamaktadır (Hanahan & Weinberg, 2011).



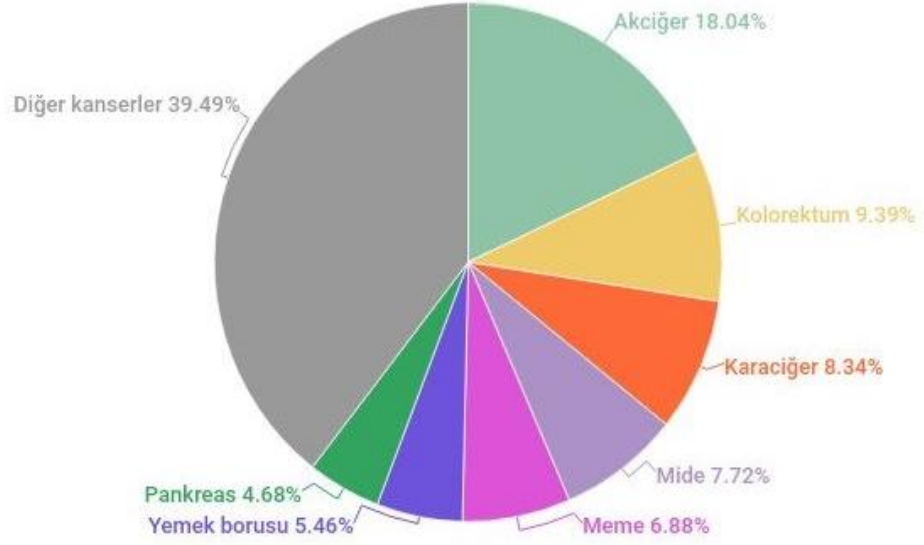
Şekil 1.1. Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2011)

1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, tüm dünyada birçok kanser arasından en sık görülen kanser türüdür. Dünya üzerinde ortalama 1 milyondan fazla insan akciğer kanserinden hayatını kaybetmektedir (Müsellim B, 2007). Akciğer kanseri, akciğer dokularında kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize malign bir akciğer tümörüdür. Bu büyüme, tedavi edilmezse yakındaki dokulara veya diğer vücut bölümlerine daha da yayılabilmektedir (Akhtar & Bansal, 2017). Akciğer kanseri temel olarak 2 grupta incelenmektedir. İlk grupta, küçük hücreli akciğer kanseri yer almakta ve akciğer kanserleri arasında en az görülen ve aynı zamanda ölüm riskinin en yaygın olduğu bir kanser türü olarak bilinmektedir. Hastalık seyri hızlı ilerlemekle birlikte diğer doku ve organlara daha çabuk yayılım göstermektedir (Zappa & Mousa, 2016). Patoloji, moleküler ve biyolojik yapıları diğer akciğer kanserlerinden farklı olmakla beraber ölüm riski oldukça yüksektir. İkinci olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir. Küçük hücreli akciğer kanserinden farklı olarak en çok görülen ve ölüm riskinin en az olduğu akciğer kanseridir. Bu kanser türünün diğer doku ve organlara yayılma durumunun da daha düşük olduğu bilinmektedir (Barayan et al., 2020). Akciğer tümörleri 3 ana patolojik tipe ayrılmaktadır. Bunlar, yassı hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinomu içeren Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) olarak adlandırılmaktadır (Risch & Plass, 2008). Geçtiğimiz birkaç on yılda, adenokarsinom insidansı büyük ölçüde arttı ve adenokarsinom, en yaygın KHDAK tipi olarak skuamöz hücreli karsinomun yerini almaktadır (Dela Cruz et al., 2011).

1.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Akciğer kanserinin dünyada genel olarak en çok görüldüğü yerler, Orta Doğu, Doğu Asya, Güney Avrupa ve Kuzey Amerika'dır. En düşük oranlarda ise Batı Afrika ve Batı Afrika'nın merkezinde olduğu tahmin edilmiştir (Rafiemanesh et al., 2016). Dünya çapında akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen ve ölüm oranlarının en yüksek olduğu kanser türü içerisinde yer alırken, kadınlarda da üçüncü en yaygın kanser türü olarak bilinmekte ve ölüm oranlarının en yaygın ikinci nedeni arasında yer almaktadır (Travis, 2011).



Şekil 1.2. 2020’de Dünya çapında her yaşta ve her iki cinsiyette kansere bağlı ölüm sayıları (Web, 2021)

Erkeklerde akciğer kanseri görülme sıklığı, gelişmiş ülkelerde az gelişmiş ülkelere kıyasla daha yüksektir. Bu oran daha çok sigara içme alışkanlıklarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kadınlarda ise akciğer kanseri, gelişmiş ülkelerde daha yaygındır ve sigara ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Dünya çapında gün geçtikçe kadınların akciğer kanserine yakalanma oranının arttığı bildirilmiştir (de Groot et al., 2018). Her iki cinsiyete de bakıldığında akciğer kanseri, yıllık tahmini ölüm sayısında listenin başında yer almaktadır (Dela Cruz et al., 2011). Ülkemizde de akciğer kanseri, en yaygın görülen ve ölüm oranlarının en fazla olduğu kanser türlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Investigations, 2002). Ülkemizde, erkeklerde akciğer kanseri en sık görülen kanser türü olurken kadınlarda ise beşinci sırada yer almaktadır. Ülkemizin batı bölgelerinde akciğer kanseri görülme sıklığı daha fazladır ve yaş oranlarının artmasıyla akciğer kanserinin görülme sıklığının da arttığı bildirilmiştir (Metintas et al., 2012).

1.1.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri

Akciğer kanserini oluşturan risk faktörlerinin başında sigara gelmektedir ve akciğer kanseri indisansının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Bununla birlikte pipo ve puro kullanımının akciğer kanseri riski üzerindeki etkisi hafif sigara içiciliğine benzemektedir (Molina et al., 2008). Sigara kullanıcılarının yaşı, kullandığı sigara çeşidi, tüketilen sigara sayısı ve sigarayı kullanma sürelerine bağlı olarak kanserin gelişim süreci etkilenmektedir. Aynı zamanda sigarada bulunan zararlı maddeler sigara dumanında da bulunduğu için pasif içiciler de bundan fazlasıyla etkilenmektedir. Akciğer kanseri riskini en aza indirebilmek için sigara kullanımının azaltılması gerekmektedir. (Müsellim B, 2007). Akciğer vakalarının büyük çoğunluğu (%80) sürekli tütün dumanına maruz kalmaktan kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalarda tütün içenleri, akciğer kanserine yakalanma riskinin çok yüksek olduğu bilinmektedir. Tütün dumanına maruz kalan fakat sigara içmeyenlerin, hiç sigara içmeyenlere oranla daha yüksek risk altında oldukları görülmektedir. Bununla birlikte sigarayı bırakma süresinin artmasıyla da akciğer kanseri riskinin azaldığı rapor edilmiştir (Akhtar & Bansal, 2017). Sigara kullanımı dışında akciğer kanserine sebep olan durumlar, kalıtsal faktörler, çalışılan meslek, beslenme ve hava kirliliği gibi birçok faktör etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda sigara içmeyenlerin akciğer kanserine yakalanma nedenlerinin arasında genetik yatkınlık yer almaktadır (Aronchick, 1990). Akciğer kanserli hastaların birinci dereceden akrabalarında kansere yakalanma oranının yüksek olduğu bildirilmiştir. (Schwartz et al., 2007).

Akciğer kanserinin diğer bir nedeni de mesleki maruz kalma durumudur. Arsenik, asbest, berilyum, krom, radon, nikel gibi çeşitli iş yeri maddeleri kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır. Asbest akciğer kanserinin en yaygın mesleki nedenlerinden biridir. Birçok çalışma ortamı, çalışanları kanserojenlere maruz bırakmakta ve bunun sonucunda akciğer kanseri riskinde artışa yol açtığı rapor edilmiştir (Risch & Plass, 2008). Düzensiz beslenme, obezite ve diyet faktörleri akciğer kanseri riskini arttıran önemli unsurlardır. Özellikle A ve E vitamini eksikliğinde akciğer kanserine yakalanma riski oldukça fazladır. Artan sebze ve meyve alımının ise erkeklerde ve kadınlarda azalmış riskle ilişkili olduğu görülmektedir (Cooper et al., 2013). Alkol tüketiminin özellikle bira içiminin hem erkeklerde hem de kadınlarda akciğer kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir.

Araç emisyonları, ozon karbon monoksit, nitrojen, aromatik hidrokarbonlar ve metaller dahil olmak üzere gaz ve partikül kirleticiler, önemli hava kirliliği kaynaklarıdır (Clément-*duchéne et al.*, 2010). Bunlardan kaynaklanan kirlilikler, akciğer kanseri de dahil olmak üzere çok çeşitli akut ve kronik hastalıklara neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışma, hava kirliliğine maruz kalan bireyler de daha yüksek DNA hasarı, mutasyonlar ve diğer kromozomal anomalilikler gösterdiği bilinmektedir (Travis, 2011).

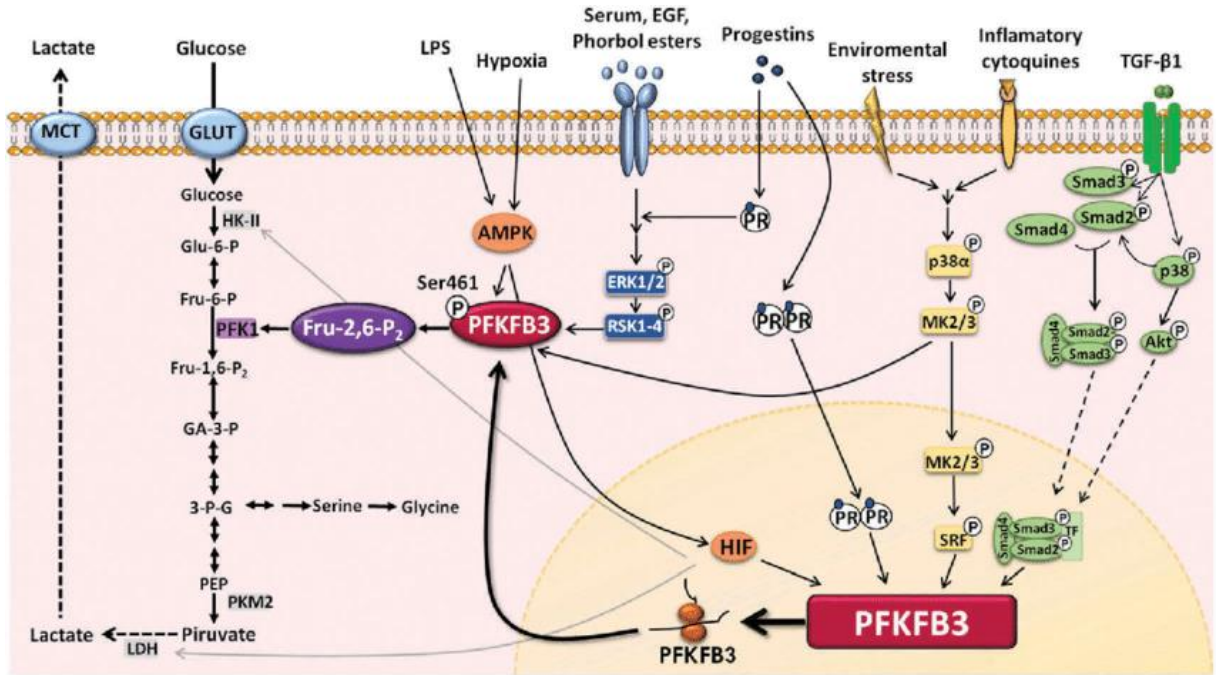
1.1.3. Akciğer Kanseri Güncel Tedavi Yaklaşımları

Akciğer kanseri ölümcül bir hastalıktır, fakat tütün kullanımının azaltılması ve bununla birlikte geleneksel tedavi yöntemleri kullanılması kansere yakalanma riskinin en aza indirebilmektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleler, hastalığın seyrine ve hastanın durumuna göre doktor gözetiminde uygulanmaktadır. (Barayan et al., 2020). Güncel tedavi yöntemleri olarak immünoterapi, kök hücre tedavisi, kanser büyüme inhibitörleri ve küçük molekül inhibitörler kullanılarak kanseri tedavi etmede önemli adımlar ortaya çıkmıştır. Onkojenik sürücü mutasyonlarının keşfi ve bu mutasyonlara yönelik spesifik hedefli tedavi, son on yılda ileri akciğer kanseri olan hastalarda tedavi yaklaşımları için dikkate değer bir ilerleme sağlamıştır (Park et al., 2019). Ölüm riski ve sayısının artmasıyla beraber tedavi yaklaşımlarında ilerlemeler sağlanmıştır. Özellikle akciğer kanserinde yeni tedavi ajanlarının bulunmasıyla birlikte, genomla ilgili amaçlar belirlenmiş ve hali hazırda sürdürülen tedavilerin uygulamaları devam etmektedir (Cella & Patel, 2008). Akciğer kanserinde bulunan ajanların başarılı olmasının asıl nedeni, genomla ilgili terapilerde kullanılacak ajanların seçimi ve terapinin daha hassas bir şekilde sürdürülmesi olmuştur. Bu nedenle son yıllardaki tedavilerde kullanılacak yeni ajanlar umut verici olmaktadır (Park et al., 2019).

1.2. Fosfofruktokinaz-2/fructose-2, 6-bifosfataz (PFKFB)

Tümör hücrelerinin köken aldıkları dokudan önemli ölçüde daha yüksek bir oranda glikozu alıp katabolize ettiği gözlemi ilk olarak 90 yıl önce Otto Warburg tarafından bulunmuştur (Yalcin et al., 2009). 1920’lerdeki öncü çalışmalarda Otto Warburg, kanserlerin oksijen varlığında bile yüksek anaerobik benzeri glikoz oranlarını sürdürmek için dikkate değer bir yeteneğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Anaerobik glikoliz, laktat üretmek için glikozu kullanırken, aerobik glikoliz, trikarboksilik asit döngüsüne giren pirüvat üretir ve sonucunda oksidatif fosforilasyon yolu ile enerji üretebilir (Potter et al., 2016). Birçok tümörün, oksijen tedariklerinin uygun olup olmadığına bakmaksızın yüksek glikolitik oranlara sahip olması olayı “Warburg Etkisi” olarak adlandırılmaktadır. Bu tümörler, enerji ihtiyaçlarının çoğunu karşılamak amacıyla fazla miktarda ATP üretebilmek için glikolitik yola bağıdırlar (Bartrons & Caro, 2007).

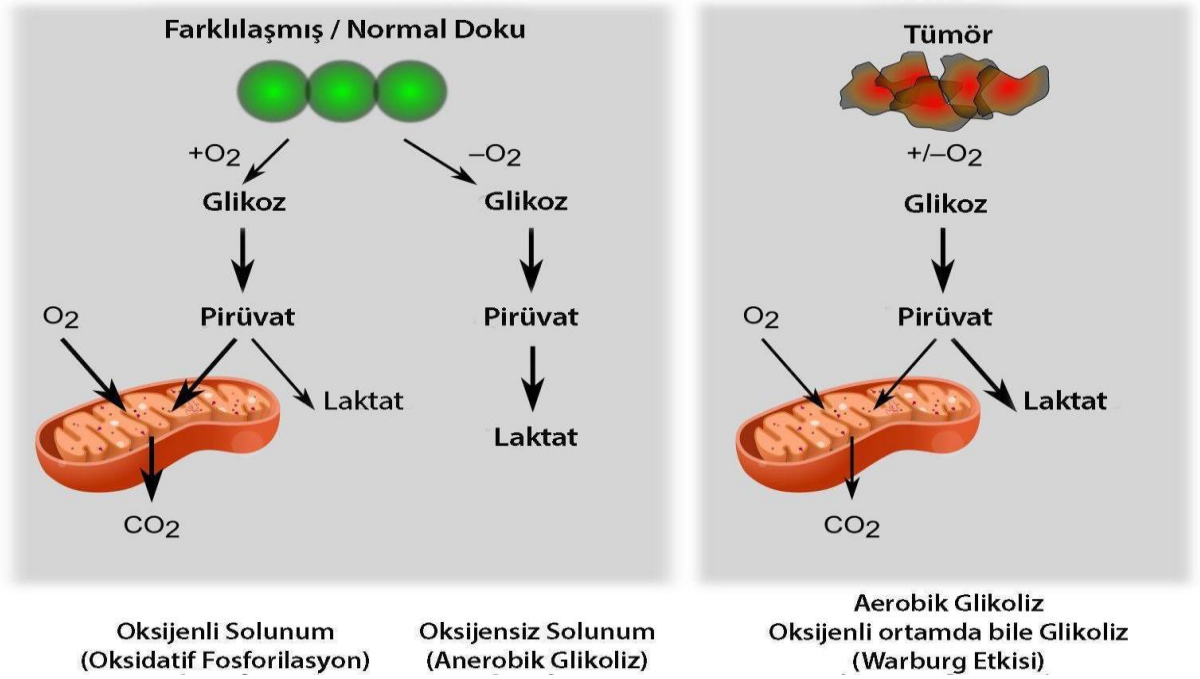
Glikolitik yol, substratların varlığı, allosterik efektörler ve sırayla mRNA, protein ekspresyon seviyeleri ve fosforilasyon gibi transkripsiyon sonrası modifikasyonlar tarafından kontrol edilen metabolik taşıyıcıların, enzimlerin ve düzenleyicilerin aktiviteleri ile düzenlenmektedirler. Transforme hücreleri normal hücrelerden ayıran önemli bir özellik büyüme faktörü, sinyal yollarının yapıcı aktivasyonu ve bu yolların doğrudan metabolizmayı kontrol etmesi şeklinde ilerlemektedir (Clem et al., 2008). Fosfofruktokinaz (PFK-1), glikolitik yolda glikoz akışını kontrol edebilen anahtar düzenleyici bir enzimdir. [ADP tarafından allosterik olarak aktive edilir ve ATP, sitrat tarafından inhibe edilmektedir.] Aynı zamanda fruktoz-2,6-bifosfat (F-2, 6-BP), PFK-1’in en güçlü allosterik aktivatörü ve bir früktoz-1,2- bisfosfataz inhibitörü olduğu bilinmektedir (Minchenko et al., 2003). Fruktoz 6-fosfat’ın (F6P) 6-fosfofrukto-1-kinaz (PFK-1) tarafından früktoz 1,6-bifosfata (F1,6BP) dönüştürülmesi, glikolizin ilk kararlı adımıdır ve bu reaksiyon esasen geri döndürülmemektedir. Bu nedenle PFK-1, glikolitik yolda önemli bir kontrol noktasıdır ve bu enzim, glikolitik akışın hızını dikte etmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Clem et al., 2008).



Şekil 1.3. PFKFB3, çoklu sinyal yolları tarafından düzenlenmesi (Bartrons et al., 2018)

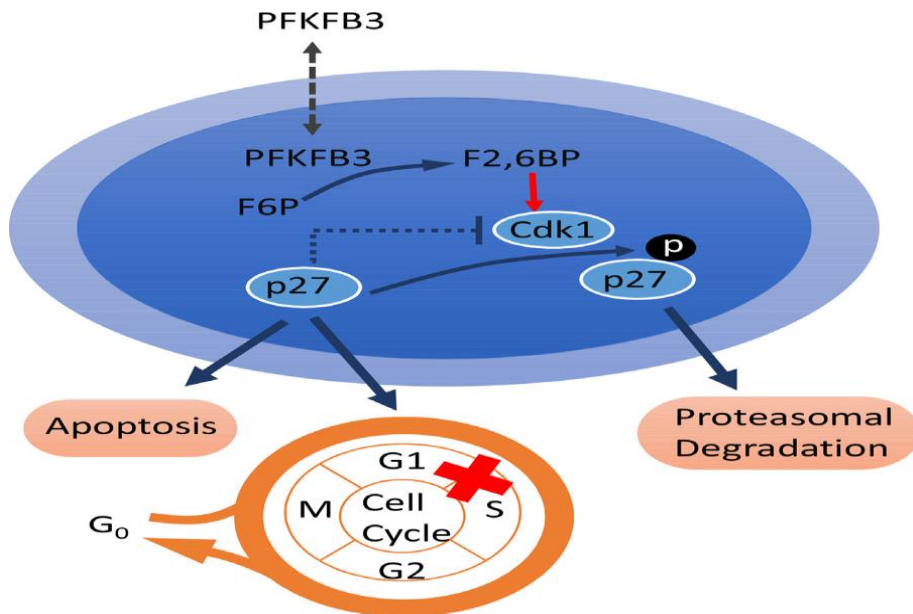
Glikoz metabolizması, früktoz 2,6- bifosfatın (F2, 6BP) konsantrasyonunu belirleyen dört bifonksiyonel 6-fosfofrukto-2-kinaz / fruktoz-2,6- bifosfataz (PFKFB1-4) enzim ailesi tarafından düzenlenmektedir (Chesney et al., 2014). Tek bir homodimerik iki işlevli enzim ailesi 6-fosfofrukto-2 kinaz / fruktoz-2,6 bifosfataz, F2,6BP'nin hücre içi seviyelerinin belirlenmesinden sorumludur. Bu enzimler, PFK-1 ile aynı substratı paylaşır ve F6P'yi F2,6BP'ye fosforile edebilir veya F2-6BP'yi F6P'ye fosforile edebilme yeteneğine sahiptir (Yalcin et al., 2009). Tek bir bifonksiyonel PFKFB veya PFK-2 enzimleri ailesi, F-2, 6BP'nin hücre içi seviyelerini, bu bileşiği sentezleyerek ve parçalayarak korumaktan sorumludur (Minchenko et al., 2003). Hem PKF-2 (kinaz) hem de FBPase (bisfosfataz) reaksiyonları bir homodimerik proteinin aynı polipeptit üzerinde katalize edildiği bilinmektedir (Bensinger & Christofk, 2012). Kinaz-bisfosfataz aktivitesi, hangi izoformların ifade edildiği, glikoz alım hızı, birkaç glikolitik ara maddenin konsantrasyonu ve fosforilasyon gibi translayon sonrası modifikasyonlar tarafından belirlenmektedir (Clem et al., 2008). Farklı genler tarafından kodlanan dört ana PFKFB (PFKFB1-4) izozimi bulunmaktadır. Her izoformun farklı düzenleyici ve kinetik özellikleri içerdiği bilinmektedir. Dört PFKFB izoformunun katlanması, yüksek dizi homojilerinden dolayı birbirlerine çok benzemektedirler. Fakat indüklenebilen PFKFB3 enzimi, diğer izozimlerden farklı yapısal özellikler sergilemektedir (Lu et al., 2017).

Dört farklı genin (PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB4), PFK-2/ FBPase kodladığı bilinmekte ve her izoformun kinaz ve fosfataz aktiviteleri, doku dağılımı ve protein kinazlara düzenleyici tepkisi farklılık göstermektedir (Atsumi et al., 2005). PFKFB-1, PFKFB-2 ve PFKFB-4'ün sırasıyla karaciğer/kas, böbrek/kalp ve testislerde eksprese edildiği bulunmuştur ve neredeyse eşit kinaz/ fosfataz oranları sergilemektedirler (Bensinger & Christofk, 2012). Diğer PFKFB izoenzimlerinin aksine PFKFB3 gen ürününü, yüksek F2, 6BP seviyelerini korumaya ve dolayısıyla yüksek bir glikolitik hızı sürdürmeye hizmet eden oldukça fazla bir kinaz-fosfataz aktivite oranına sahip olduğu bilinmektedir. Ve bu nedenle F2, 6BP'nin birikmesini destekleyerek glikolizi arttırmaktadır (Atsumi et al., 2005). PFKFB3 geni, farklı faktörler tarafından indüklenebilen bir izoenzimi ifade etmekte ve çoğalabilen transforme hücreler de dahil pek çok dokuda ifade edilebilmektedir (Brooke et al., 2014). Aynı zamanda birçok kanser türünde aşırı derecede ifade edilmektedir (L. Shi et al., 2017).



Şekil 1.4. Normal doku ile tümörlü doku arasında enerji meydana getirme aşamaları (Web,2021)

PFKFB3, sitoplazma içerisinde yer alan ve glikoliz reaksiyonunda rol oynayan bir enzimdir. Çeşitli kanser türlerinde, hızlı çoğalan hücrelerde ve mutasyona uğramış genlerde glikoliz seviyesini arttırıcı etkisi bulunmakta ve hipoksik koşullar altında aktive edilmektedir. Bazı kanserli hücre tiplerinde yalnızca sitoplazma içerisinde değil aynı zamanda çekirdeğe lokalize olduğu bilinmektedir. (W. K. Shi et al., 2018). İnsan PFKFB3 geni, 10p 15.1 konumunda kromozomun 10. kısa kolunda yer almakta ve yaklaşık olarak 109.847 kb'lık bir genomik bölgeyi kapsayan 19 ekzondan oluşmaktadır (Bartrons et al., 2018). PFKFB3, glikoliz dışındaki düzenleyici görevlerde de yer almakta ve aşırı eksprese edildiğinde hücre proliferasyonunu arttırıcı yönde etkisinin olduğu bilinmektedir (W. K. Shi et al., 2018). PFKFB3 seviyesi hem transkripsiyonel seviyede hem de protein stabilitesi ile düzenlenmektedir. Çok çeşitli tümör ve/veya dokularda bulunmasının yanı sıra hipoksik (oksijen yetmezliği) koşullarda da aktive edilir. Hücre döngüsü dönüşümünü ve düzenlenmesini desteklemek amacıyla kullanımı söz konusudur. Bunun dışında PFKFB3 glikoliz metabolizmasını baskılayarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltıp hücre ölümüne neden olabilmektedir (Cantelmo et al., 2016). PFKFB3'ün, hücre ölüm yollarından biri olan apoptoz oranını arttırdığı ve otofaji ile de ilişki içerisinde bulunduğu kanıtlanmıştır. Buradan yola çıkılarak kanser hücrelerinde PFKFB3'ün engellenmesi veya yok edilmesi durumunda hücre içi ROS miktarında azalma, hücre döngüsünün durması ve bununla birlikte DNA hasarına neden olduğu da bilinmektedir (Cao et al., 2019; Liu et al., 2019; W. K. Shi et al., 2018).



Şekil 1.5. PFKFB3'ün hücre döngüsü ve apoptozdaki rolü (Lu et al., 2017)

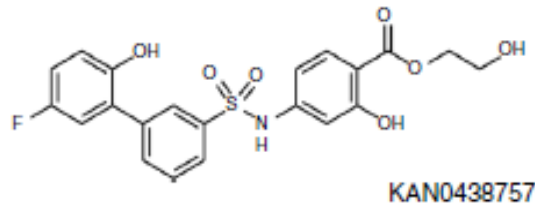
1.2.1. Akciğer Kanseri Tedavisinde PFKFB3 Hedefli Küçük Molekül İnhibitörleri

Normal hücreler, enerji üretebilmek için oksijen varlığında mitokondriyal yolları veya oksidatif fosforilasyonu kullanır ve yalnızca oksijen kaynaklarının eksiklik olduğu durumlarda glikoliz devreye girebilir (Chowdhury et al., 2017). Neoplastik hücreler ise transforme oldukları durum nedeniyle sürekli artan enerji gereksinimi ve anabolik ihtiyaçlarını karşılamak için oksijen varlığında bile normal hücrelerden daha fazla glikolizi metabolize edebilmektedirler. Fazla glikolitik oranın bulunması hücreler için ATP ihtiyacını ortadan kaldırmada önemli bir faktör olmaktadır. Ayrıca, çoğu tümörler bu hücrelere oksijen ve besin sağlayan anormal damar yapısı nedeniyle hipoksik koşullara maruz kalmaktadır (W. Zhu et al., 2016). PFKFB3 enzimi, gen ekspresyonu ya da izoenzim aktivitesini engelleyerek glikozu baskılayıp kanser tedavisinde etkili bir rol oynamaktadır. Bunun dışında mitojenik, hipoksik ve enflamatuar özellikler PFKFB3 üzerinde engelleyici bir etki göstermektedir. Buna bağlı olarak PFKFB3 geni, akciğer kanserlerinde olumlu yönde etki göstererek genlerin düzenlenmesini sağlamada uygun bir hedef haline gelmektedir (Matsumoto et al., 2021). Aynı zamanda PFKFB3, akciğer kanseri hücrelerinde glikoz metabolizmasına ve hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olarak önemli bir görevi yerine getirmektedir. PFKFB3, glikoliz artışına bağlı olarak akciğer kanseri hücrelerinin hayatta kalmasında gerekli olan bir enzim olarak kullanılmaktadır (Chowdhury et al., 2017; Lypova et al., 2019). Kanser tedavisinde PFKFB3'ün kullanılmasının asıl nedeni, glikolizin farmakolojik inhibisyonu ve yüksek glikolitik aktivite kanserin metabolik bir özelliği olarak kabul edildiğinden, kanseri tedavi etmede yeni bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır (Cao et al., 2019). Bu stratejinin doğal sonucu olarak, kanser hücrelerinde PFKFB3'ün inhibisyonunu sağlayan birçok küçük molekül inhibitörü geliştirilmiştir (W. K. Shi et al., 2018). Bu inhibitörler, 3PO, PFK15, PFK158 ve son olarak KAN0438757 molekülleridir. PFKFB3 inhibitörlerinin, tümör hücrelerini *in vivo* ve *in vitro* olarak baskılaması, beklenen glikoliz ve metabolizma için düzenleyici görevler üstlendiğini kanıtlamaktadır (Y. Zhu et al., 2018).

3- (3 - Piridinil) -1- (4 - piridinil) -2 - propen - 1 - on (3PO) molekülü, PFKFB3 izoziminin bazal katalitik aktivitesinin iyi çalışılmış bir baskılayıcısıdır (Cao et al., 2019). PFKFB3'ün, 3PO tarafından engellenmesi, *in vivo* ve *in vitro* ortamda damar oluşumunu ve glikoliz oranını azalttığı bulunmuştur (Wik et al., 2020). Hücre içi F2,6P2'yi azaltarak, transforme hücrelerde glikolitik akışı baskılayıcı özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Cao et al., 2019). PFKFB3'ten bağımsız olarak 3PO'nun insan endotel hücrelerinin, enflamatuar aktivitesini engellediği bilinmektedir (Wik et al., 2020). 3PO genellikle glikoliz inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında birçok hücre içerisinde birikerek hücre içi pH oranını azaltmaktadır. Aynı zamanda glikolitik yolağın enzimatik aktivasyonunu engelleyici etkisinin olduğu da belirlenmiştir. 3PO'nun antiglikolitik aktivitesi ile PFKFB3'e doğrudan bağlanmasına gerek kalmadan, tek başına hücre içi ortamın asitleşmesine müdahale edici yeteneğinin bulunduğu kanıtlanmıştır (Emini Veseli et al., 2020). 3PO, PFKFB3 proteininin bağlandığı ve işlev gördüğü bölgelere bağlanarak fonksiyonunu yerine getirmektedir (W. K. Shi et al., 2018). 3PO, PFKFB3'ün güçlü bir inhibitör olduğu ancak suda çözünürlüğünün düşük olması nedeni ile klinik olarak kullanımını kısıtlayan en önemli faktörlerden biri olduğu rapor edilmiştir. Fakat yakın zamanda çıkan nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıyıcılardan olan 3PO, *in vivo* olarak kullanıldığında antikanser etkinliğini iyileştirme potansiyelini gösterebilmektedir (Cao et al., 2019). PFKFB3'ün diğer bir inhibitörü ise 1- (4-piridinil) -3- (2-kinolinil) -2-propen-1-on (PFK15)'tir. Birçok farklı kanser türünde yüksek antitümör etki ettiği rapor edilmiştir (Liu et al., 2019). PFK15, PFKFB3 aracılığı ile kanserli hücre hatlarında glikoz alımı, ATP oluşumu ve aynı zamanda laktat üretimini önemli oranda azaltıcı etkisi bulunmaktadır. PFK15, kanserli hücrelerin çoğalmasını baskılayarak, hücre döngüsü ilerlemesini durdurup apoptozu indüklediği bilinmektedir (H. M. Li et al., 2017). PFK15, farmakokinetiğin daha ileri pre klinik değerlendirmesi olarak seçilmiş olup, *in vivo* ve *in vitro* antimetabolik, antineoplastik özellikler sergilediği bildirilmiştir (W. Zhu et al., 2016). *In vitro* çalışmalarda tümör büyümesini azalttığı, bununla beraber Xsenograft hayvan modellerinde tümör büyümesini azalttığı bildirilmiştir (Richardson et al., 2019). PFK15, dönüştürülmüş hücrelerde hızlı bir şekilde apoptozu indükleyebilir, yeterli farmakokinetik özellik sergileyebilir ve aynı zamanda glukoz alımını baskılayıp PFKFB3' e karşı daha büyük bir inhibitör aktivitesi sağlayabilmektedir (W. Zhu et al., 2016).

PFK15 tedavisi ile tümörlü hücrelerde damar oluşumlarını indükleyerek, damar çapında azalma gibi etkileri de bulunmaktadır (Matsumoto et al., 2021). PFKFB3'ün önemli bir inhibitörü olan PFK15, akciğer kanserlerinde veya metastazı azaltmada etkisini göstermiş ve bunların sonucunda PFK15'i kanser tedavilerinde umut verici bir ajan olarak karşımıza çıkarmıştır (Mondal et al., 2019). PFK158, PFKFB3'ün aktif formunun güçlü ve seçici bir inhibitörüdür. Kanser hücrelerinde glikoz alımını, ATP üretimini ve laktat salınımını azaltarak apoptozun indüksiyonuna yol açmaktadır. PFK158 ile baskılanan otofajik oran, lipofajiye sebep olarak lipid damlacığı ile ilişkili proteinlerin düzenlenmesini etkilemektedir (Mondal et al., 2019). PFK158'in direnç mekanizmaları sıklıkla glikolizi düzenleyen yolları aktive etmesinden dolayı PFK158'in sitotoksik ve hedeflenmiş ajanlarla kombinasyon tedavilerinde etkinliğini arttırmakta ve tümör gerilemesini desteklediği bilinmektedir (Chen et al., 2021). *In vivo* şartlar altında PFK158'in daha iyi bir sinerjistik etkiye sahip olduğu ve aynı zamanda kanser hücrelerinde hücre döngüsünü düzenleme, damar oluşumu ve ilaç direnci üzerine olumlu yönde etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bunlara ek olarak PFK158, kanserli hücrelerde hücre canlılığını inhibe ederek, hücre döngüsünü Go/G1 evresinde tutukladığı sonucuna varıldığı rapor edilmiştir (Mondal et al., 2019). Yakın zamanlı çalışmalarda PFK158'in kanser hücrelerinde *in vitro* olarak apoptozu ve sitotoksisiteyi sinerjistik bir şekilde arttırdığı, bunun sonucunda da bu ajanlara karşı içsel direncin üstesinden geldiğini ortaya koymaktadır (Chen et al., 2021). PFK158'in tek başına veya belirli bir kemoteropatik ajan ile kombinasyonunun çeşitli kanser tedavilerinde önemli derecede etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (Mondal et al., 2019).

KAN0438757, PFKFB3'ü güçlü bir şekilde hedefleyen küçük inhibitördür. Bu molekül, normal hücreler üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadan, transforme hücrelerin duyarlılığını uyartabilme yeteneğine sahiptir. (Gustafsson et al., 2018).

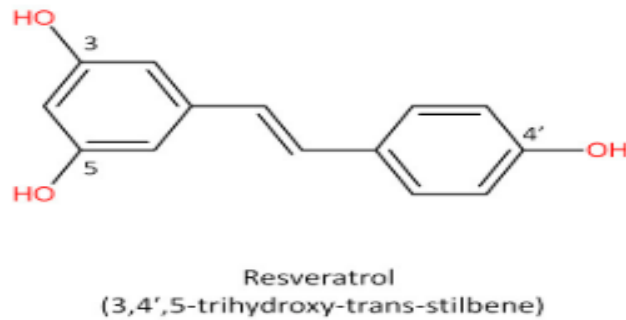


Şekil 1.6. KAN0438757 molekülünün, moleküler mekanizması (De Oliveira et al., 2021)

Kanser hücrelerinde PFKFB3 tarafından belirlenen KAN0438757 inhibitörünün enzimatik aktivitesinin engellenmesi sağlanarak, DNA replikasyon çatalında bozulmalara neden olmaktadır. Böylelikle kanser hücrelerinde DNA hasarına neden olarak, hücreleri ölüme götürmektedir. KAN0438757 inhibitörünün engellenmesi durumunda, kanserli hücrelerin uyarıldığı ve DNA kırılmalarına karşı duyarlılığın arttığı, belirlenmiştir. (Gustafsson et al., 2018). Kanser hücrelerinin, KAN0438757 ile tedavisinin sonucunda hücresel duyarlılığı uyardığı ve bu nedenle kanser tedavisi için potansiyel bir inhibitör olduğu kabul edilmektedir (De Oliveira et al., 2021). KAN0438757, yeni keşfedilen bir inhibitör olduğu için literatürde çok fazla çalışma yer almamaktadır. Fakat buna rağmen önemli işlevlerinin bulunması, bu molekülü kanser tedavilerinde kullanılan umut verici bir ajan olarak karşımıza çıkarmaktadır (Gustafsson et al., 2018).

1.3. Resveratrol

Tarih boyunca doğal ürünler insan hastalıklarının tedavisinde kayda değer bir rol oynamıştır. Bu doğal ürünlerden biri de resveratrol bileşimidir. Resveratrol, üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçi boynuzu ve yaban mersini gibi en az 72 bitki türünde bulunan polifenolik bir bileşiktir (Dong, 2003).



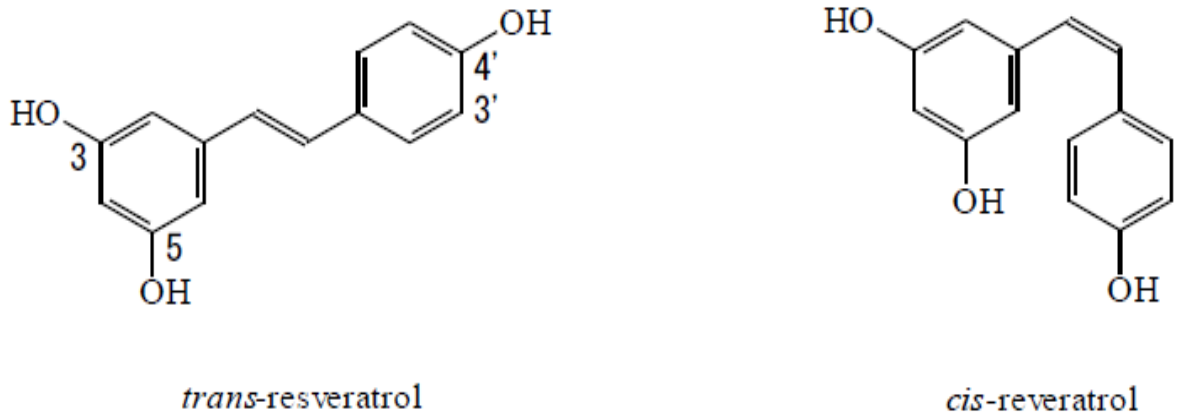
Şekil 1.7. Resveratrolün moleküler yapısı (Akat et al., 2020)

Resveratrol ilk olarak 1939'da *Veratrum grandiflorum*'dan (Çöpleme bitkisi)'un reçinelerinde Michio Takaoka tarafından izole edilmiştir. Daha sonra 1977 de *Vitis vinifera*'nın asma yapraklarında fungal enfeksiyon veya UV ışınlar tepki olarak sentezlenen bir bileşik olduğu bulunmuştur. Bitkilerde çeşitli dış etkenlere karşı savunma maddeleri olarak sentezlenen bu ikincil metabolit maddelere fitoaleksiner (Bitki koruyucuları) adı verilmiştir (Breuss et al., 2019). Resveratrolün, 1982 yılında Çin ve Japonya'da Kojikon (Kojikon: Itadori çayı olarak da bilinmektedir) olarak adlandırılan; cilt enfeksiyonları, fungal enfeksiyonlar, kalp, karaciğer ve damar hastalıklarında kullanılan “*Polygonum cuspidatum*” kurusunda bulunduğu belirtilmiştir. Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene); polifenoller, flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, lignanlar ve stilbenler kapsayan doğal bir antioksidandır (Breuss et al., 2019).

1.3.1. Resveratrol'ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Resveratrol, patojenlerin bitkilere saldırması, yaralanma, UV ışığına maruz kalma veya stres altında olma sonucunda bitkiler tarafından üretilen önemli bir fitoaleksindir (Olivares-Marin et al., 2019). Aynı zamanda, antioksidatif, antiinflamatuvar, antikanser, antimikrobiyal ve östrojenik özellikler de göstermektedir. Bu özelliklerin yanı sıra diyabet, obezite, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi kronik rahatsızlıkları tedavi etmede kullanılan önemli bir kemoteropatik ajandır. Resveratrol, çeşitli moleküler ajanlarla etkileşime girerek adaptif bağışıklığı düzenlemede görevleri bulunmaktadır (Malaguarnera, 2019). Stilbenler, bitkiler tarafından stresli koşullara özellikle mantar enfeksiyonuna ve UV radyasyonuna yanıt olarak üretilen sekonder metabolitlerdir. Bazı bitkisel gıdalarda doğal olarak bulunan ancak özellikle üzüm ve kırmızı şarapta bulunan resveratrol, bu bileşik sınıfının en çok araştırılan ve en iyi bilinen bir üyesidir (Varoni et al., 2016). Resveratrol'ün bir stilben yapısına sahip olması, bu bileşiğin bir metilen köprüsü ile bağlı iki aromatik halkadan oluştuğu anlamına gelmektedir (Bola et al., 2014). Resveratrol'ün yapısal olarak cis ve trans olmak üzere iki formu bulunmaktadır (Olivares-Marin et al., 2019). Doğal gıdalarda, bitkilerde veya şarapta resveratrol, hem cis hem de trans izomerler şeklinde yer almaktadırlar (Yang et al., 2019). Trans formu, daha yaygın ve daha büyük biyolojik aktiviteye sahiptir ve sterik açıdan en kararlı olanıdır. Trans resveratrol'ün damar hastalıkları, kanserler, viral enfeksiyonlar ve nörodejeneratif süreçler gibi birkaç önemli patolojinin önleyici bir ajanı olduğu bilinmektedir (Delmas et al., 2011).

Cis resveratrol izomerizasyonu ise 254 nm veya 366 nm dalga boylarında güneş ya da mor ötesi radyasyona maruz kaldığında, trans izomeri kararlılığını kaybettiğinde meydana gelmektedir. Bu da bitkilerin enfeksiyonlara ve UV maruziyetine karşı savunmadaki rolünden kaynaklanmaktadır (Fiod Riccio et al., 2020). Cis izomeri trans izomerine göre daha kararsız olmasına rağmen her iki izomerde farklı biyolojik etkilere sahip olmaktadır (Delmas et al., 2011).

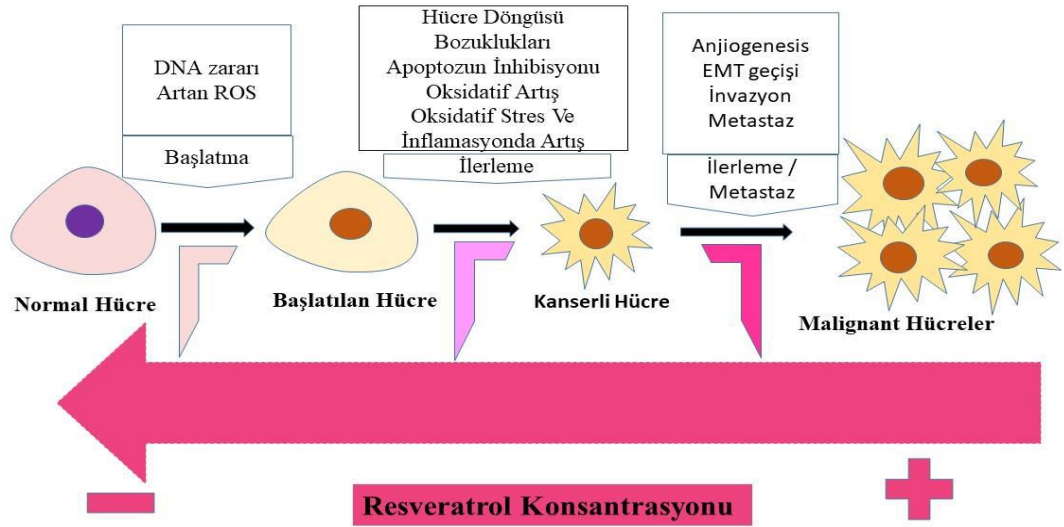


Şekil 1.8. Resveratrol'ün trans ve cis izomerleri (Yang et al., 2019)

Resveratrol kimyasalı, düşük molekül ağırlığı ve belirli enfeksiyonların ilerlemesini engelleme yetenekleri ile bilinmektedir. Bu maddelerin bitkilerde birikmesi sonucu, mantar enfeksiyonu, UV radyasyonu, kimyasal maddeler ve genel olarak bitki için stresli faktörler gibi parazitlere ve diğer olumsuz koşullara karşı direnç mekanizması tarafından üretilmektedir (Gambini et al., 2015). Hem *in vitro* hem de *in vivo* deneysel modellerde yapılan çalışmalar sonucunda mitokondriyal bozukluğun azaltılmasında ve redoks tepkimelerinin hasarını önlemede etkileri olduğu kanıtlanmıştır (Jardim et al., 2018). Resveratrolün olumlu etkilerinin olmasının dışında, toksik bir bileşik olduğu da kabul edilmiştir ve birçok kanser türünde, birden fazla yolak üzerinde zamana, doza ve kullanılan hücre tipine göre değişik etkiler göstermesiyle bilinmektedir (Olivares-Marin et al., 2019).

1.3.2. Resveratrol'ün Antikanser Etkileri

Kanser, kardiyovasküler bozukluklardan sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve araştırmalar sonucu yaşam tarzı değişiklikleri ve beslenme alışkanlıkları ile kanseri geliştirme şansının azaltılabileceği düşünülmektedir. Dünya çapında insanlar kanseri önlemek veya tedavi etmek için diyet sebzeleri, şifalı otlar ve bitki özlerini kullanmışlardır (Shukla & Singh, 2011). Kanser ajanları, birçok farklı bitki içerisinde doğal olarak bulunmakta ve insan kanserlerinin tedavilerinde etki göstermektedir. Kendiliğinden meydana gelen bu ajanlar, düşük toksisiteye sahiptirler ve birçok hastanın ağrılarını azaltarak hastalık sürecine yardımcı olmaktadır. Doğal bitkilerde bulunan birçok kanser ajanının aktivitesi, sentetik ilaçlardan daha düşük olabildiğinden farklı kanser ajanlarının kombinasyonu ile kanserin tedavi edilmesini önemli derecede arttırabileceği bildirilmiştir (M. Wang et al., 2019). Resveratrolün birçok etkisinin arasında en dikkat çekici olanı, antikanserdeki rolü olmasıdır. Çeşitli kanser türlerinde hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlardaki etkileri, resveratrolü hücre içerisinde moleküler bir hedef haline getirmektedir. (Kong et al., 2017) Resveratrolün, yumurtalık, mide, prostat, akciğer, pankreas, deri ve lenfoid kanser hücreleri de dahil olmakla birlikte birçok tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca resveratrol, hücre büyümesini ve bölünmesini, iltihaplanmayı, apoptozu, metastazı ve anjiyogenezi kontrol ederek çeşitli sinyal iletim yollarını etkileyip, kanserin tüm aşamalarına etki etmektedir (Ko et al., 2017). Resveratrol'ün antikanser özelliği, çok çeşitli insan tümör hücrelerinin çoğalmasını *in vitro* olarak engellediğini göstermektedir. Polifenolik, fitoalleksin ve analogları, kardiyovasküler ve nöroproteksiyon, bağışıklık düzenlenmesi ve kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalık modellerinde *in vitro* ve *in vivo* faydaları bulunmaktadır (Shukla & Singh, 2011). Resveratrol, karsinogenez aşamalarını önlemek durdurmak veya tersine çevirmek için birçok kemopreventif ve kemoterapötik mekanizmalar bulunmaktadır. Birkaç fitokimyasal arasında paylaşılan mekanizmalar takip edildiğinde resveratrol, normal hücrelere karşı sınırlı toksisiteye sahip iken kanser hücrelerinde çok sayıda hedef üzerindeki aktiviteyi ifade ederek birkaç bozulmuş sinyal yolağında baskılayıcı ajan olarak hareket edebilmektedir (Varoni et al., 2016). Resveratrol, çeşitli mekanizmalar üzerinde aynı anda hareket ederek hem kanser önlemede hem de tedavi ile ilgili umut verici bir antikanser ajanı olarak karşımıza çıkmaktadır (Varoni et al., 2016).

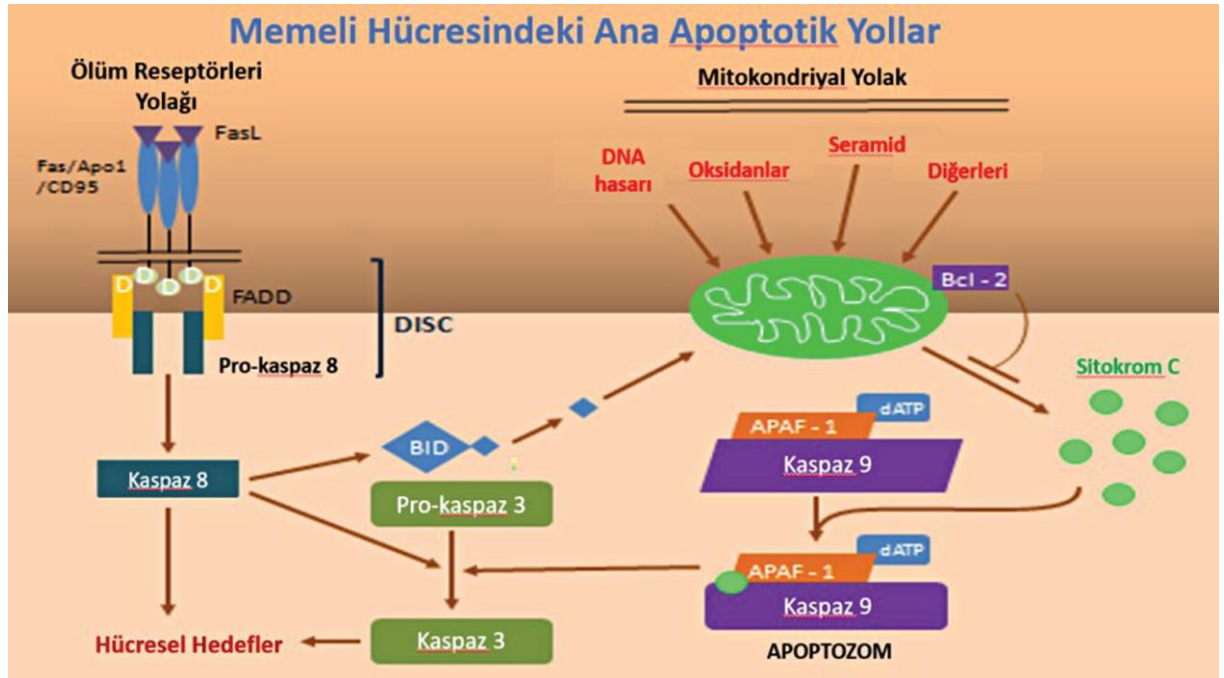


Şekil 1.9. Resveratrolün karsinogenezin tüm aşamalarını etkileyebilmesi (Akat et al., 2020)

1.3.3. Resveratrol'ün Programlı Hücre Ölümüne Etkisi

Dış etkenler sonucu hasar gören hücreler nekroz geçirirken, iç veya dış uyaranlar nedeniyle programlanmış intihara yönlendirilen hücreler ise apoptoza uğramaktadır (Gökhan et al., 2022). Programlı hücre ölümü yani diğer adıyla apoptoz, çok hücreli organizmalarda görülen hasarlı ve yaşlı hücrelerin genetik olarak düzenlenen hücre ölüm programıyla kendilerini öldürmeleri olarak tanımlanmaktadır. Apoptozla hücre ölümü enerjiye bağlı olarak, hücresel yaralanma ve inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri genlerle düzenlenen ve RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan bir olaydır (Ghobrial et al., 2005). Apoptozun gerçekleşmesinde meydana gelen olaylar; ölüm sinyalinin alınması, kaspazların aktivasyonu, hücre ölümünün gerçekleşmesi, parçalanma ve fagositoz gibi aşamalardan oluşmaktadır. Apoptotik hücre ölüm programı, Bcl2 protein ailesi, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktive edici faktör olmak üzere üç ana bileşen içermektedir (Dermatoloji Dergisi et al., 2016). Bcl-2 gen ailesinin homodimer veya heterodimer yapıda olmasının bağlı olduğu durum, belirli bir hücrenin apoptoza eğiliminin var olup olmamasından kaynaklanmaktadır. Bcl-2 gen ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik genler olmak üzere iki üyeden oluşmaktadır (Coşkun & Özgür, 2011).

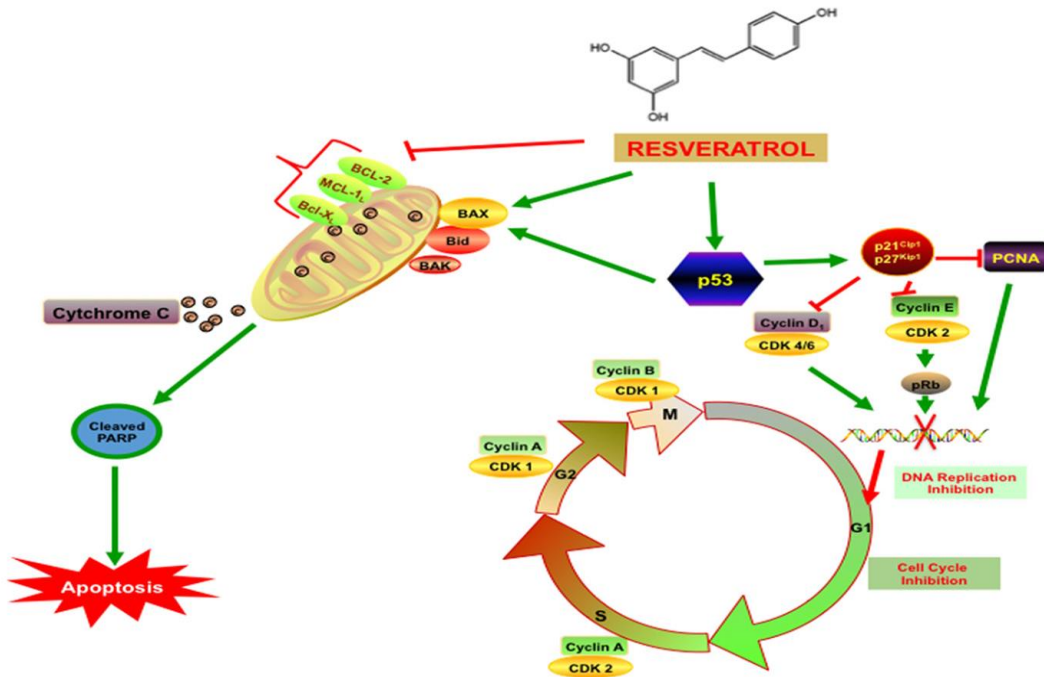
Antiapoptotik genler, Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 olmak üzere üç şekilde bulunmakta ve bu genler endoplazmik retikulum içerisinde, çekirdek zarında ve mitokondrinin dış membranı gibi yerlerde bulunmaktadır. Proapoptotik genler ise Bax, Bid, Bak, Puma, Bad, Bcl-xs ve Noxa'dan oluşmaktadır. Bu genler hücrede sitozolde bulunmakta ve fazla bulundukları durumda hücre apoptoza daha yatkın olmaktadır (Zimmermann & Green, 2001).



Şekil 1.10. Memeli hücresinde apoptozis yolları; intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar (Celepli et al., 2020)

Apoptoz süreci, DNA hasarına neden olan genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas Ligandı) ve hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere üç farklı şekilde işlevini gerçekleştirmektedir (Takashina et al., 2017). Apoptoz, dışsal (ekstrinsik) yol ve içsel (intrinsik- mitokondrial) yol olmak üzere iki ana yoldan oluşmaktadır. Dışsal (ekstrinsik) yolda, ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas, TNF-R, DR33, DR4 ve DR5; sırasıyla Fas-L, TNF alfa, Apo-3L, Apo-2L, Apo-2L ölüm sinyalleri ile bağlanıp uyarıcı sinyal bileşenlerini meydana getirir ve kaspaz-8'i aktifleştirerek DNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır (Dermatoloji Dergisi et al., 2016).

İçsel (intrinsik) yolda ise hücre içerisine alınan sinyaller sonucunda ölümü aktifleştiren Bid, yaşam aktifleştiricisi Bcl-2'yi inaktif hale getirerek diğer ölüm aktifleştiricisi Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Sonrasında gelen uyarının ardından mitokondri membranında por oluşumu uyarılır ve mitokondri membranının yapısı bozulur. Ölüm uyarıları ile mitokondriden sitokrom-c, Smac, AIF ve Endonükleaz-G salınımı uyarılır. Hemen sonrasında sitokrom-c mitokondri membranı üzerinden sitoplazmaya ilerler. Sitokrom-c, Apaf-1 ve kaspaz-9 ile birleşerek apoptozom adı verilen bir yapıyı meydana getirirler. Bu yapı da diğer kasazları aktifleştirerek hücreyi ölüme götürür (Ghobrial et al., 2005). Resveratrol, doza, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak kanser hücrelerinde apoptozu uyarak toksik bir rol oynama yeteneğine sahiptir (Wu et al., 2019). Resveratrolün kanser hücreleri üzerindeki bu etkiyi apoptozis mekanizması üzerinden gerçekleştirdiği ve bunun için apoptozise ait çeşitli yolları kullanabildiği belirlenmiştir. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu sağlarken aynı zamanda proapoptotik Bax ekspresyonunu aktive ederek, antiapoptotik Bcl2 ekspresyonunda azalmaya yol açmaktadır. Bununla birlikte FasL/CD95 sinyal kaskadını kullanarak, mitokondriden sitoplazmaya Sitokrom c salınımının aktivasyonuna yol açıp mitokondride translokasyonu artırıcı etkileri bulunmaktadır (Takashina et al., 2017).



Şekil 1.11. Resveratrol, hücre döngüsü ilerlemesini ve apoptozla ilgili moleküler yolları modüle ederek hücre çoğalmasını durdurması (Singh et al., 2017)

1.3.4. Resveratrol'ün DNA Hasarına Etkisi

Oksidatif stres, aşırı ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumu ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz olması durumunda ortaya çıkmaktadır. ROS, çoklu organ hasarlarının ilerlemesinde önemli bir etkisinin olmasının dışında inflamatuvar etkilere, lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına neden olmaktadır (Aydın et al., 2016). Aynı zamanda bazı antibiyotikler ROS üreterek DNA'da oksidatif hasara sebebiyet vermektedirler. DNA hasara uğratıldığında, transkripsiyon, replikasyon, enerji metabolizması ve hücre bölünmesi gibi olaylar olumsuz etkilenmektedir. Bu nedenle DNA'daki onarım sistemleri devreye girerek hasarı onarmaya çalışmaktadırlar. Eğer hasar miktarı fazla olup da düzeltilemezse, hücre ölüme kadar gidebilmektedir (Subramanian et al., 2016). Resveratrol, sirtuin (SIRT-silent information regülatör) protein ve gen ailesinin önemli bir aktivatörüdür. Sirtuinler aynı zamanda DNA onarım enzimlerini deasetile ederek aktifleştirdikleri ve böylelikle DNA'yı stabilize edebilmektedirler. DNA hasar ve onarımın düzenlenmesinde SIRT1'in benzersiz özelliğinin yanında ayrıca telomer uzunluğunu ve genomik stabiliteyi korumada rolü bulunduğu bilinmektedir (Miyazaki et al., 2008). SIRT1 eksikliğinin DNA hasarı ile sonuçlanabilecek onarım odaklarının oluşumunu bozduğu ve böylece apoptozu indükleyerek tümöre karşı koruduğu kanıtlanmıştır. Doğal bir antioksidan olan resveratrolün, DNA hasarını ve oksidatif organ hasarını azalttığı bilinmektedir (Aydın et al., 2016). Resveratrolün trans izomeri, hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna ve ROS'un neden olduğu DNA hasarına karşı koruyucu bir etki göstermektedir (Avdatek et al., 2018). Bu tezde, akciğer kanserinde PFKFB3 hedefli küçük molekül inhibitörü KAN0438757'nin ve resveratrolün kullanıldığı kombine tedavinin, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, mitokondri membran potansiyeli, hücre göçü, apoptotik ve otofajik biyobelirteçler üzerine olası etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin belirli şartlar altında, bir ortam içerisinde yaşatılması ve çoğaltılarak çeşitli çalışmalarda kullanılmak üzere uygulanması gereken bir tekniktir. Hücre kültürü çalışmaları, güncel moleküler biyoloji, sitogenetik ve biyokimyasal alanlarda araştırmak yapmak ve aynı zamanda tanı ve üretim çalışmalarını daha iyi uygulayabilmek için çok fazla kullanılmaktadır (Sandell & Sakai, 2011). Aslında hücre kültürü yapılan birçok çalışmanın temelini oluşturmakta ve araştırmalarda oldukça önemli bir yere sahip olmaktadır. Hücre kültürünün asıl görevi, kanserli hücredeki maddenin etkisini belirleme, belirli bir doku veya hücrede üretilen protein gibi bir maddenin görevini saptama ve hücrelerin sayını arttırarak üzerinde uygulamalar yapmaktır. Hücrelerin vücudun dışında rahatça yaşayıp çoğalabilmeleri için bazı şartlar gerekmektedir. Sıcaklık, ph, osmotik basınç, CO₂ yoğunluğu, O₂ gibi şartların *in vitro* hücre kültüründe dengeli bir şekilde olması ve bu ortamın kontrolünün sağlanması önemli kurallar arasında yer almaktadır (Phelan & May, 2015). Hücrelerin bu koşullarda çoğalabilme ve yaşamlarını sürdürebilmeleri için besiyeri adı verilen ortamlara ihtiyaçları vardır. Besiyeri veya besi ortamı, mikroorganizmaların veya hücrelerin gelişimini desteklemek amacıyla laboratuvar ortamında hazırlanmış besleyici ortamlardır. Besiyeri elde etmek için bu 3 bileşen kullanıldı. Hepsi bazal medium içerisine aktarıldı ve karıştırıldı. Hücrelerin çözdürülmesi, pasajlanması, ekimi gibi aşamalarda kullanılacak olan besiyeri +4 C'ye kaldırıldı. İhtiyaç halinde çıkarılıp 37 C'de su banyosunda kısa bir süre bekletildikten sonra kullanıma hazır hale getirildi. Bu çalışmada, ATCC (American Type Culture Collection)' den satın alınan insan akciğer kanseri hücre hatları kullanıldı.

2.1.1. Hücrelerin Kültüre Alınması

Steril bir ortamda çalışmak için kabin açıldı ve %70 alkol ile temizlendi. Kullanılacak malzemeler de alkollenip kabin içerisine alındı. A549 hücreleri donmuş bir şekilde karyotüp içerisinde sıvı azottan çıkarıldı ve -20 C'ye alınarak 10 dakika bekletildi. Sonrasında 37 C'de sıcak su banyosunda 1-2 dakika çözündürüldü. Hücreler çözündükten sonra kabin içerisine alındı ve diğer taraftan 15 ml'lik falkon tüp içerisine 3 ml medium eklendi. Çözünmüş hücreler de hazırlanan falkon tüpe eklendi ve pipetle karıştırıldı. Sonrasında hücreler 2500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra, tüp tabanındaki hücrelere temas etmeden sıvı kısım çekilip atıldı. Tüpte kalan pellet içerisine 2 ml medium eklendi ve tekrardan pipetaj yapılarak homojen bir karışım elde edildi. Karışımın tamamı tüpten çekilip 75 cm²'lik flaska eklendi ve üzerine 6 ml medium ilave edildi. Ekim işlemi bittikten sonra hücrelerin eşit dağılması için flask hafifçe sallandı ve 37 C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakıldı. Sürekli takip edilen hücreler %80-90 konfluense ulaştıklarında pasajlandı.

2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması (Çoğaltılması)

Hücre kültürü çalışmalarında, hücreler plato fazına ulaştıklarında büyüme mediumunun yetersizliği ve hücrelerin yüzeye yapışması için yeterli alana sahip olmaması, ölüm fazının başlamasına neden olmaktadır. Bu nedenle hücreler, büyüme ve bölünmenin maksimum düzeyde olduğu geç logaritmik fazda pasajlanmaktadır. Yüzeye yapışan hücrelerin kapladıkları alanın yüzde cinsinden ifade edilmesi olarak da bilinen konfluens, yaklaşık olarak %80-90 seviyeye ulaştığında hücreler ya pasajlanmalı ya da uzun süreli saklanmak için dondurulmalıdır (Phelan May 2015). Hücreler %90 konfluense ulaştıklarında pasajlama için inkübatörden çıkarıldı. Flask içerisindeki medium pipet yardımıyla çekilip atıldı ve içerisine yıkama solüsyonu olan PBS eklendi, hafifçe sallanıp yıkandıktan sonra çekilip atıldı. Flask içerisine 2 ml tripsin eklendi ve tüm yüzeye yapışması için yavaşça sallandı. Sonrasında flask CO₂ inkübatöre konuldu ve 3-4 dk inkübasyona bırakıldı. Tripsin enzimi, proteinlerin parçalanmasını sağlayan bir proteaz enzimidir.

Medium içerisinde bulunan FBS, tripsinin inhibitörlerini barındırmaktadır. Tripsinizasyon basamağında, tripsin enzimi kullanılarak yüzeye yapışan hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlanmaktadır (Sandell & Sakai, 2011). İnkübatörden çıkarılan flask mikroskop altında gözlemlendi. Hücrelerin çoğunluğunun tabandan ayrıldığı görüldü, ayrılmayanlar için de flaska hafifçe vurularak tabandan ayrılması sağlandı. Sonrasında flask içerisine tripsinin 2 katı medium eklendi ve pipetaj yapılarak tabandaki tüm hücre sıvıyla homojen hale getirildi. Bu karışım 15 ml'lik falkon tüpe alındı ve 2500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet içerisine taze mediumdan 3 ml eklenip karıştırıldı. Sayım için karışımdan bir miktar alındı ve geriye kalanı flaska ekilip CO₂ inkübatöre kaldırıldı. Bu aşamadan sonra hücrelerin miktarını belirlemek için sayım yapıldı.

2.1.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı, hücre kültürü çalışmalarında en önemli basamaklardan biridir. Büyüme mediumu ile homojen olarak çözünen hücrelerden sayım için 100 µl alındı ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı üzerine 100 µl tripan blue boyası eklendi ve karıştırıldı. Çalışmalarda ihtiyaç duyulduğu kadar hücrenin işleme alınabilmesinde sayım yaparken kullanılan tripan blue boyası, canlı ve ölü hücrelerin analizinin yapılmasında olanak sağlamaktadır. Thoma lamı üzerinde çukur bir kısım bulunmakta ve bu çukurun oluşturmuş olduğu iki bölmeye lamel yerleştirilmektedir. Mikrosantrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan her iki bölmeye 10 µl gelecek şekilde lam üzerine yavaş ve dikkatli davranarak aktarılmıştır. Thoma lamı, mikroskop üzerine yerleştirildi ve hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Sayım yapılırken sayım lamından her biri 16 kareden oluşmakta ve buradaki 4 sayım bölgesinde bulunan hücreler sayılıp ortalaması alınmaktadır. Sayımda hücrelerin ortalamaları alındı ve hücre süspansiyonunun ml'sinde kaç hücre olduğu formül kullanılarak hesaplandı. Yapılacak çalışmadaki kullanılacak hücre sayısı göz önüne alınarak hücre süspansiyonundan kaç ml'ye ihtiyaç olduğu hesaplandı ve uygulamaya geçildi.

2.1.4. Hücrelerin Dondurulması

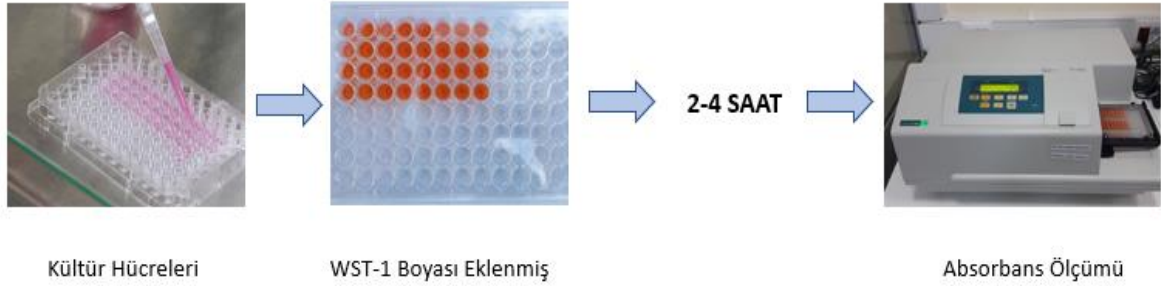
Flask içerisindeki hücreler %80-90 konfluense ulaştıklarında mediumları çekilip atıldı. Flask 3 ml PBS ile yıkandıktan sonra 3 ml tripsin eklendi ve her yere homojen dağılması için hafifçe sallandı. Flask 37 C’de CO₂ inkübatörde 3-4 dk bekletildi. İnkübatörden çıkarılan flask içerisine tripsinin 2 katı medium eklendi ve tamamen karıştırıldıktan sonra 15 ml’lik falkon tüpüne eklenip 2500 rpm’de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet üzerine freezing medium eklendi. Freezing medium hazırlanırken %10 DMSO ve %90 FBS kullanıldı. Hücre ve freezing medium homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra karyotüpe alındı. Önce -20 C’de soğutuldu sonrasında sıvı azotta dondurularak ilerleyen zamanlardaki çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı.

2.2. Hücre Canlılığı

2.2.1. WST-1 Testi

Hücre canlılığı ölçümü, bir numunedeki sağlıklı hücre sayısını test eden farklı hücre kültürü formlarındaki en temel testlerden biridir (Yin et al., 2012). Hücrelerin canlılık seviyeleri veya çoğalma oranları, hücre sağlığının iyi bir göstergesidir. Fiziksel ve kimyasal ajanlar hücre sağlığını ve metabolizmasını etkileyebilmekte ve farklı mekanizmalarla hücrelerde toksisiteye neden olabilmektedir. Bu mekanizmaların neden olduğu hücre ölümünü belirlemek amacıyla ucuz, güvenilir, tekrarlanabilir ve kısa süreli sitotoksikite ve hücre canlılığı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Aslantürk, 2018). Deneysel olarak, biyolojik, kimyasal veya fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrası canlılıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Hücre canlılığının belirlenmesi için çok sayıda test bulunmaktadır. Bu çalışmada uygulanacak hücre canlılığı testi ise tetrazolyum tuzlarının oluşturduğu WST-1 testidir (TOKUR & AKSOY, 2017). WST-1 testi yöntemi, güvenilirliği yüksek, tekrarlanabilirliği bulunan hücre canlılığını belirlemede yaygın olarak kullanılabilen kolorimetrik bir deneydir (Aslantürk, 2018). Tetrazolyum tuzu olan WST-1’in mPMS (1-metoksi-5-metil-fenazinyum metil) gibi ara elektron alıcısı varlığında mitokondri dehidrojenaz enzimleri tarafından suda yüksek oranda çözünür formazana dönüştürülmesine dayanmaktadır (Yin et al 2012). Suda çözünür tuz, hücre kültürü ortamına salınır.

İnkübasyon süresi boyunca reaksiyon, hücre kültüründeki mitokondri dehidrojenaz miktarı ile doğru orantılı olan bir renk değişikliği üretir ve bu nedenle tahlil hücrelerin metabolik aktivitesini ölçebilir (Aslantürk 2018).



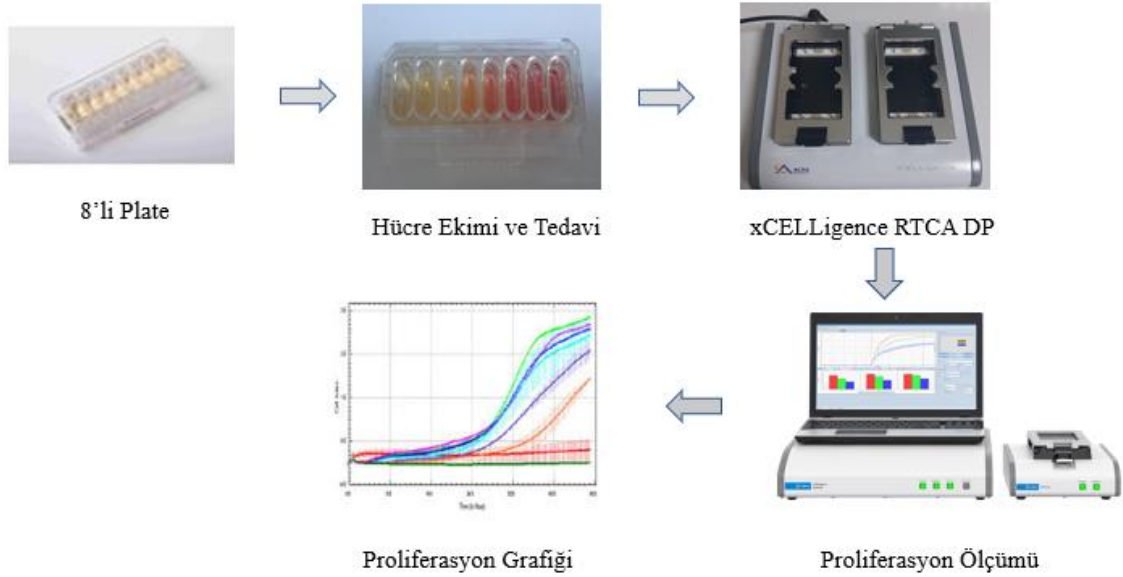
Şekil 1.12. WST-1 hücre canlılığı testi protokolü

96'lık well plate içerisine 3×10^3 hücre ekildi. Ekim sonrası plate 37 C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakıldı. 24 saat sonra plate içerisindeki mediumlar çekilip atıldı ve tedavi dozları hesaplanarak her kuyucuğa 90 µl medium+ilaç karışımı eklendi. Kontrol grubu olarak sadece medium kullanıldı. Tedavi süresine göre, 48 saat 37 C ve %5 CO₂ ortamına bırakıldı. İnkübasyon süresi bittikten sonra WST-1 boyama solüsyonundan her kuyucuk içerisine 10µl eklendi ve 2-4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde plate'ler eliza mikro-plaka okuyucu cihazına konuldu ve sırasıyla 450, 490 nm'lerde okutularak ölçüm gerçekleştirildi. Alınan absorbans değerlerinin ortalamaları ile hücre canlılığı hesaplandı.

2.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

xCELLigence sistemi, hücresel biyolojik olayların etiketleme yapılmadan gerçek zamanlı analizinin yapılmasını sağlayan bir yöntemdir (Ozdemir Ark 2014). xCELLigence sistemi sayesinde okuma olarak empedansı kullanarak hücresel fenotipik değişikliklerin gerçek zamanlı bir şekilde etiketsiz ve dinamik olarak izlenmesi sağlanmaktadır (Ke et al 2011). Sistem, iyi tasarlanmış plakaların altına yerleştirilen mikro elektrotlar aracılığıyla elektronik empedansı ölçmeye yaramaktadır. Elektronik empedans ölçümü, hücre sayısı, canlılık, morfoloji ve hareket gibi hücrelerin biyolojik durumu hakkında nicel bilgiler vermektedir. xCELLigence yöntemi ile diğer geleneksel uç nokta tahlilleriyle elde edilemeyen verileri elde etmek oldukça kolay olmaktadır (Ozdemir Ark 2014).

Aynı zamanda xCELLigence sistemi, hücre canlılığının sürekli izlenmesi, yaşlanma, hücre ölümü ve azalmış proliferasyon gibi hücre canlılığının farklı bozulmaları arasında ayırım yapabilmeyi mümkün kılmaktadır (Ke et al 2011).



Şekil 1.13. xCELLigence test aşamaları

xCELLigence deneyi için belirlenen 8 kuyucuklu plate içerisine 1×10^3 hücre ekildi. Ekim işlemi bittikten sonra %5 CO₂ inkübatör içerisindeki elektronik cihaza yerleştirilip 24 saatlik inkübasyon süresi başlatıldı. Süre bittikten sonra kuyucuk içerisindeki mediumlar çekilip atıldı. Kontrol grubu kuyucuğuna 300 µl medium, diğer doz gruplarına da her doz hesaplanarak eklendi. Kapağı kapatılıp %5 CO₂ inkübatör içerisindeki cihaza yerleştirildi ve tedavi süresi belirlenerek tablet üzerinde ayarlandı. Tedavi süresi bitiminde deney sonlandırıldı ve tablet üzerinde grafik elde edilmiş oldu.

2.4. Akridin Orange-Etidium Bromide ile Hücre Ölümü Değerlendirmesi

Akridin Oranj, hem canlı hem de ölü hücreleri boyayabilen hayati bir boyadır. Akridin oranj floresan boyası, nükleik asit seçici bir boya olmasının yanı sıra hücre döngüsünün belirlenmesi için yaralı olan katyonik özellikler barındırmaktadır (AYKUT, 2019). Akridin portakalı boyası, hücre geçirgen bir boyadır ve bu da bu boyanın interkalasyon yoluyla DNA ile ya da elektrostatik çekimler aracılığıyla RNA ile etkileşime girmesine olanak sağlamaktadır. Akridin portakalı, canlı hücrelerde asidik vakuoller (lizozomlar,

endozomlar ve otofagozomlar) RNA ve DNA'yı boyamak için kullanılmaktadır (Kusuzaki et al., 2007). Etidyum bromür, DNA parçalarının görselleştirilmesinde kullanılan koyu kırmızı floresan bir boyadır. Bu boya yalnızca membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyamaktadır (Dem & Tez, 2017). 6'lı well plate içerisine her bir kuyucuğa 3×10^4 hücre ekildi ve 24 saat CO₂ inkübatörde bekletildi. Süre bittikten sonra plate içerisindeki mediumlar çekilip atıldı. Tedavi dozları ayarlandı, kontrol grubu da dahil olmak üzere kuyucuklara ekildi ve plate CO₂ inkübatöre alınarak 48 saatlik tedavi süresi başlatıldı. Süre bitikten sonra akrdin oranj etidyum bromür boyası (1:1 500 µl) hazırlandı. Plate içerisindeki sıvı çekilip atıldıktan sonra her kuyucuk 2 kez yıkama solüsyonu olan PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra her kuyucuğa AO-EB boya karışımından 50 µl eklendi ve mikroskop altında görüntüleme yapıldı.

2.5. Mitokondri Membran Potansiyeli'nin Belirlenmesi

JC-1 boyası, mitokondriye girebilen J agregatları adı verilen tersinir kompleksler oluşturmaya başlayan lipofilik, katyonik bir boyadır. JC-1 moleküllerinden farklı olarak, bu J kümeleri yeşil yerine kırmızı spektrumda (maksimum yaklaşık olarak 590 nm'de) uyarma ve emisyon sergilemektedir. Böylelikle sağlıklı hücrelerde JC-1 boyası, enerjili ve negatif yüklü mitokondriye girerek burada birikir ve kendiliğinden kırmızı floresan J-agregatları oluşturur (Perelman et al., 2012). Buna karşılık sağlıklı ya da apoptotik hücrelerde JC-1 boyası da mitokondriye girer. Fakat mitokondrinin içi artan membran geçirgenliği ve bunun sonucunda elektrokimyasal potansiyel kaybı nedeniyle daha az negatif olduğundan JC-1, J agregatlarının oluşumunu tetiklemek için yeterli konsantrasyona ulaşmaz ve böylelikle orijinal yeşil floresan rengi korunmuş olur (Sivandzade et al., 2019). 6'lı well plate içerisine 3×10^4 hücre ekildi ve 24 saat CO₂ inkübatörde bekletildi. Süre bittikten sonra mediumlar aspire edildi ve kontrol kuyucuğuna medium, diğer kuyucuklara tedavi dozları eklendi. Plate'in kapağı kapatılıp CO₂ inkübatöre bırakılarak 48 saatlik tedavi süresi başlatıldı. Süre bitiminde plate içerisindeki sıvılar çekilip atıldı ve kuyucuklar PBS ile yıkandı. Konsantrasyon 1 mM'dan 200 mM'a seyreltilti. Plate içerisindeki her kuyucuğa hazırlanan 200 mM'lık karışımdan 50 µl boya eklendi ve mikroskopta görüntüleme yapılarak fotoğraflar elde edildi.

2.6. Hücre Göçü Analizi

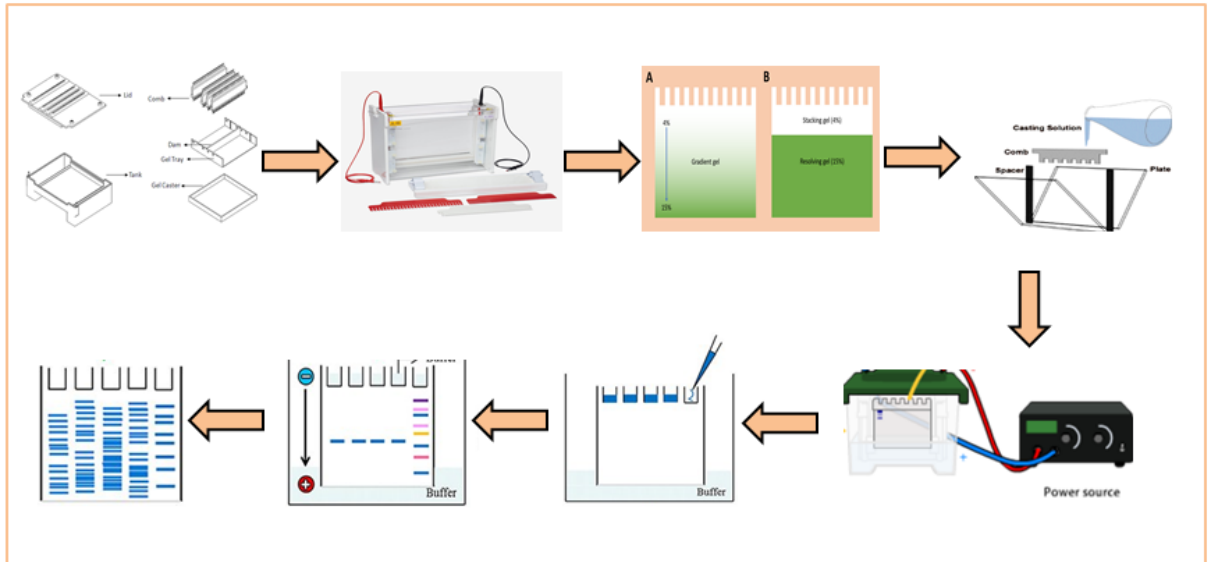
Yara iyileştirme deneyi olarak adlandırılan wound healing deneyi, *in vitro* hücre göçünü incelemek için geliştirilmiş en eski yöntemlerden biridir. Bu yöntem, hücre tek tabakası üzerinde oluşturulan “yara” içine hücre göçünün gözlemlenmesine dayanmaktadır (Grada et al., 2017). Bu yöntemin temel amacı, tek katmanlı hücreler üzerinde bir “yara” oluşturmalarını, yarayı kapatmak için hücre göçü sırasında başlangıçta ve düzenli aralıklarla görüntülerin yakalanmasını, bunun sonucunda da hücre göçünün oranını belirlemek için görüntülerin karşılaştırılması olayı ile son bulmaktadır (Rodriguez et al., 2005). 12’li well plate içerisine 1×10^5 hücre ekildi ve 24 saat CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre bittikten sonra plate içerisindeki medium çekilip atıldı ve her kuyucuk boş bir pipet ucu yardımıyla ortadan boylu boyunca çizildi. Kuyucuklar PBS ile yıkandı ve tedaviler uygulandı. Sonrasında plate CO₂ inkübatöre bırakıldı, 24 ve 48 saat sonralarında mikroskopta görüntüler alındı.

2.7. Western Blot Deneyi

Western blot, araştırmacıların bu protein saptama tekniğinin ilk ayrıntılı tanımını 1979’ da yayınlamasından bu yana, onlarca yıldır yaşam bilimleri laboratuvarında temel bir unsur olarak yer almaktadır (Taylor et al., 2013). Western blot yöntemi, birçok araştırmada proteinleri ayırmak ve tanımlamak amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Mahmood & Yang, 2012). Western blotlama veya immünoblotlama, proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile boyutlarına göre ayrılmasını, daha sonra bir membran desteğine transferini, immobilizasyonunu ve antikor aracılı bir raportör sistemi kullanarak seçici tespitini ifade etmektedir. Bu teknik, karmaşık bir biyolojik numuneden belirli bir proteini kalitatif olarak tanımlamak ve moleküler ağırlığı hakkında bilgi sağlamak için rutin olarak kullanılmaktadır (Taylor et al., 2013). Western blot tekniğinde bir protein karışımı, jel elektroforezi yoluyla moleküler ağırlığa ve dolayısıyla türüne göre ayrılmaktadır. Bunların sonucunda her protein için bir bant üreten zara aktarılacak membran ilgili proteine özgü etiket antikorları ile inkübe edilmektedir (MacPhee, 2010). Membran üzerine bağlı olmayan antikor yıkanarak ayrılır, yalnızca ilgili proteine bağlı antikor bırakılmış olur. Bağlı antikorlar film yöntemi geliştirilerek tespit edilebilir.

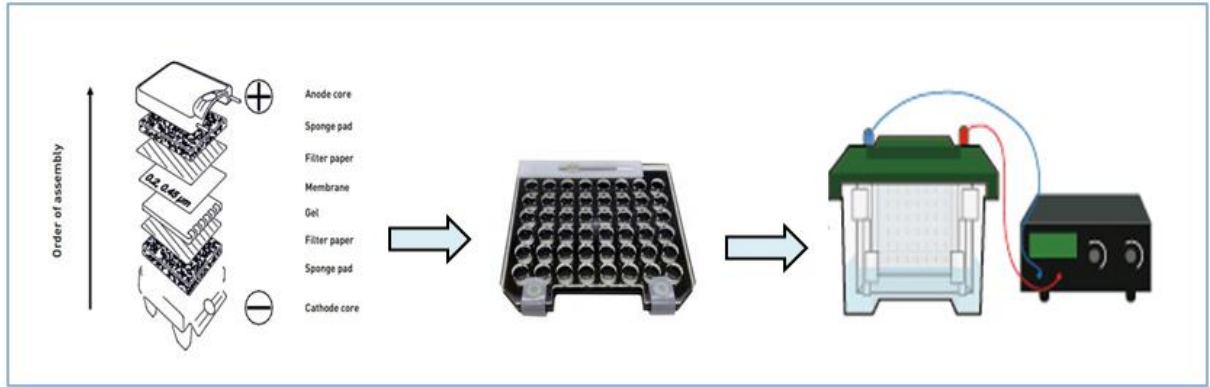
Antikorlar yalnızca ilgilenilen proteine bağlandığı için sadece bir bant görünür olmalıdır. Bandın kalınlığı, mevcut protein miktarına karşılık gelir ve böylece bir standart yapmak mevcut protein miktarını gösterebilir (Mahmood & Yang, 2012). Bu çok adımlı yöntem, hedef proteinlerin varlığını veya yokluğunu, boyutunu ve modifikasyonunu veya bozunma durumlarını belirlemektedir. Aynı zamanda karmaşık protein karışımlarından veya homojenatlardan proteinlerin nicelleştirilmesine olanak tanımaktadır (Taylor et al., 2013). Western blot prosedüründe güvenli sonuçları engelleyebilecek birçok potansiyel engel bulunmaktadır. Bunlar örnek hazırlama, normalleştirme, SDS-PAGE jel yükleme, protein transferi, birincil ve ikincil antikor seçimi, inkübasyonlar ve yıkamalar, saptama yöntemi seçiminden birçok analize kadar her adımında çeşitli zorlukları içermektedir. Bunun yanında film tabanlı algılamadan türetilen kimyasal ışıldayan western blot verileri, ölçülebilir, tekrarlanabilir verilerin üretilmesinde belirgin zorlukları ortaya çıkarmaktadır. Bu problemler, düşük dinamik algılama aralığından ve algılama sınırını doğru bir şekilde belirlemedeki zorluktan kaynaklanmaktadır. Buna karşılık bu yöntem, uygun teknik, doğrulama ve kontrollerle yürütüldüğü sürece, uygun fiyatlı ve yüksek derecede hassas jel ve leke görüntüleme teknolojilerinin eni reaktiflerle birleştiği hızlı evrimi, araştırmacılara gerçekten niceliksel western blot verileri üretme araçları sağlamaktadır (Taylor et al., 2013). Hücre toplanması basamağında, 60 mm'lik petri kapları içerisine 6×10^5 hücre ekildi ve 24 saat CO₂ inkübatörde bekletildi. Süre bittikten sonra mediumlar çekilip atıldı ve tedavi dozları eklenerek tedavi süresi boyunca inkübasyona bırakıldı. Tedavi süresi bittikten sonra mediumlar atıldı ve hücrelere soğuk PBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla toplandı. Toplanan hücreler mikrosantrifüj tüpüne konularak 6600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve protein izolasyonu basamağına geçildi. Proteaz inhibitörlerini barındıran lizis tamponundan her bir örnek içerisine 200 µl ilave edildi ve 1-2 saat +4 C'de bekletildi. Sonrasında 10 dk +4 C'de 14000 rpm'de santrifüj yapıldı ve elde edilen çözeltinin süpernatant kısmı başka bir mikrosantrifüj tüpüne alındı, pellet kısmı da atıldı. Bu işlemler buz üzerinde yapılırken, ölçüm için tüpler içerisine örneklerden bir miktar alınıp eklendi, üzerlerine Commasie Blue G250 boyasından eklenip 595 nm'de spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüpünde kalan hücreler üzerine 100 M'lık Lammlı SDS Buffer'dan eklendi ve 95 C'de 5 dk denatürasyon edildi. İşlem bitiminde 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra -20 C'ye konuldu.

Jel hazırlama işlemi için iki jel kullanıldı. İlk jel separate (ayırma) jeli, protein miktarlarına göre %12'lik 10 ml hazırlandı. Jel içerisine saf su, %30 akrilamid mix, pH'ı 8,8 olan Tris çözeltisi, %10'luk SDS, %10'luk APS solüsyonu ve son olarak temed eklendi ve hazırlanan jel tank içerisine konuldu. Sonrasında ikinci jel olan yükleme jeli yani stacking jel hazırlandı. Tüm malzemeler diğer jel ile aynı yalnızca Tris çözeltisinin pH'ı 6,8 olacak şekilde hazırlandı, diğer donmuş jelin üzerine aktarıldı ve tarak yerleştirildi. Son konulan jel de polimerleştikten sonra elektroforez basamağına geçildi. Hazırlanmış örnekler -20 C'den çıkarıldı ve jel üzerindeki tarak alındıktan sonra ilk kuyucuğa protein markeri gelecek şekilde örnekler sıvı ile yüklendi. Tank içerisine running buffer eklendi ve kapağı kapatılıp 25 amperde koşturmaya başlandı.



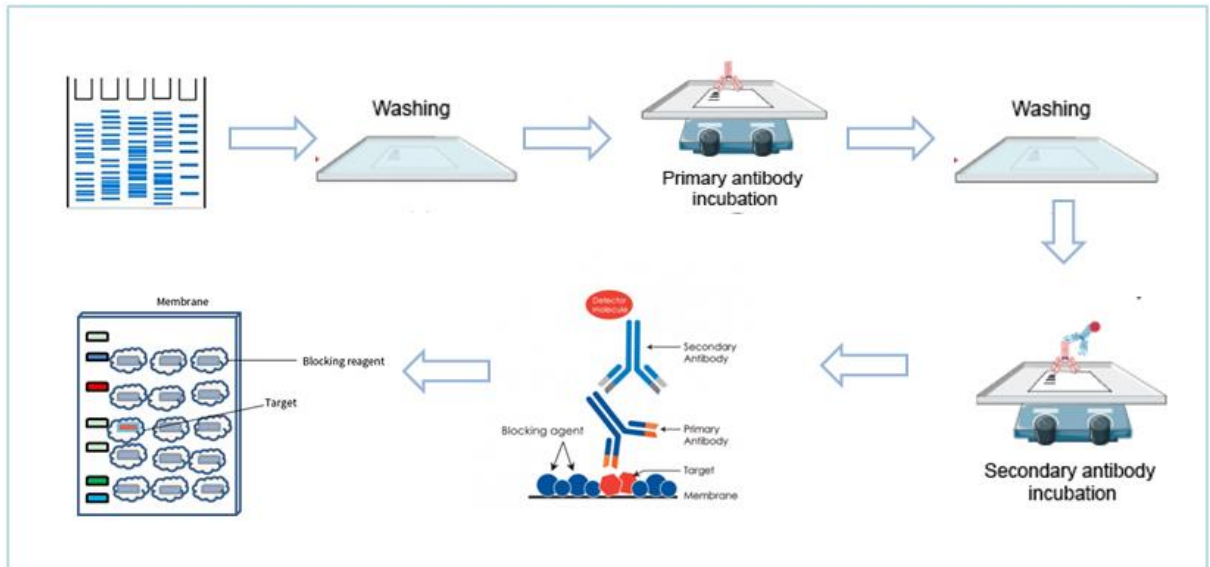
Şekil 1.14. Western blot elektroforez basamakları

Koşturma bittikten sonra membrana transfer için, membran metanol içerisinde alındı ve transfer için sandviç modeli hazırlandı. Siyah kısım alta gelecek şekilde tüm malzemeler transfer buffer ile ıslatılıp konuldu. İlk olarak sünger, üzerine sırasıyla 2 adet ince, 1 adet kalın filtre kağıdı, jel ve membran sonra yine 2 adet ince filtre kağıdı konuldu son olarak sünger de eklenip kapağı kapatıldı. Tank içerisine konuldu, üzerine transfer buffer eklendi Cihaz 220 miliampere ayarlandı ve 120 dk süre ile transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemi bittikten sonra membran bloklama için %5'lik süt tozu TBS-T içerisinde çözündürülüp hazırlandı. Hazırlanan bu karışım içerisine membran konulup 45 dk bloklandı.



Şekil 1.15. Membrana transfer aşaması

Bloklama süresi bittikten sonra ilk olarak primer antikor %5'lik süt tozu içerisinde (Bax: 1:500; p62: 1:1000; Beclin-1: 1:100) olacak şekilde hazırlandı ve membran içerisine konulup 1 gece +4 C'de roller da bekletildi. Ertesi gün 5 kez 5 dk boyunca membran TBS-T ile çalkalayıcı da yıkandı. İşlem bittikten sonra membran sekonder antikor ile (anti-rabbit: 1:2500, anti-mouse:1:5000) muamele edildi ve 1 saat süre ile oda sıcaklığında bekletildi. Sekonder antikordan çıkarılan membran tekrardan 5 kez 5 dk TBS-T ile yıkandı. Su ve Tris içeren Kemilüminesans solüsyonları 1:1 olacak şekilde karıştırıldı. Membran üzerine eklenip 1 dk boyunca hafifçe çalkalandı. Hemen sonrasında membran kasete alındı ve X-Ray cihazında karanlık odada görüntü alındı.



Şekil 1.16. Bloklama ve antikorlarla muamele basamağı

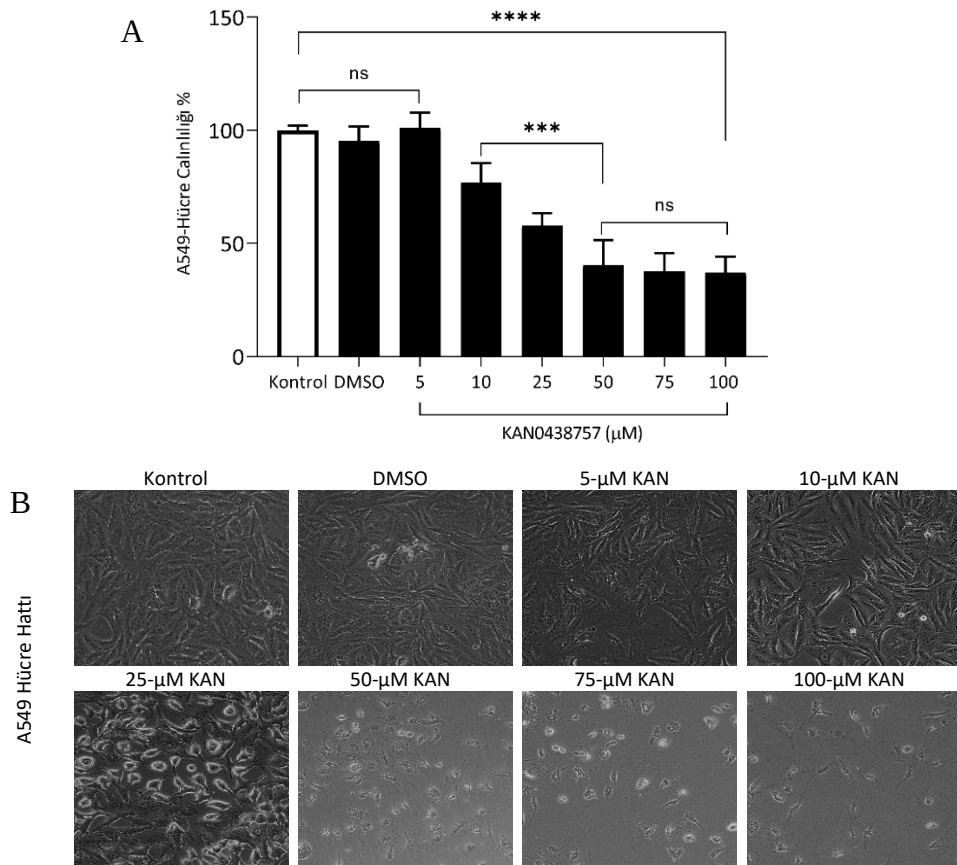
2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz “One-way ANOVA” metodunda çoklu karşılaştırma Post-Hoc Testlerine göre Graph Pad Prism 5.01 programı ile analiz edilmiştir. Analizlerde $p < 0.05$ önemli olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

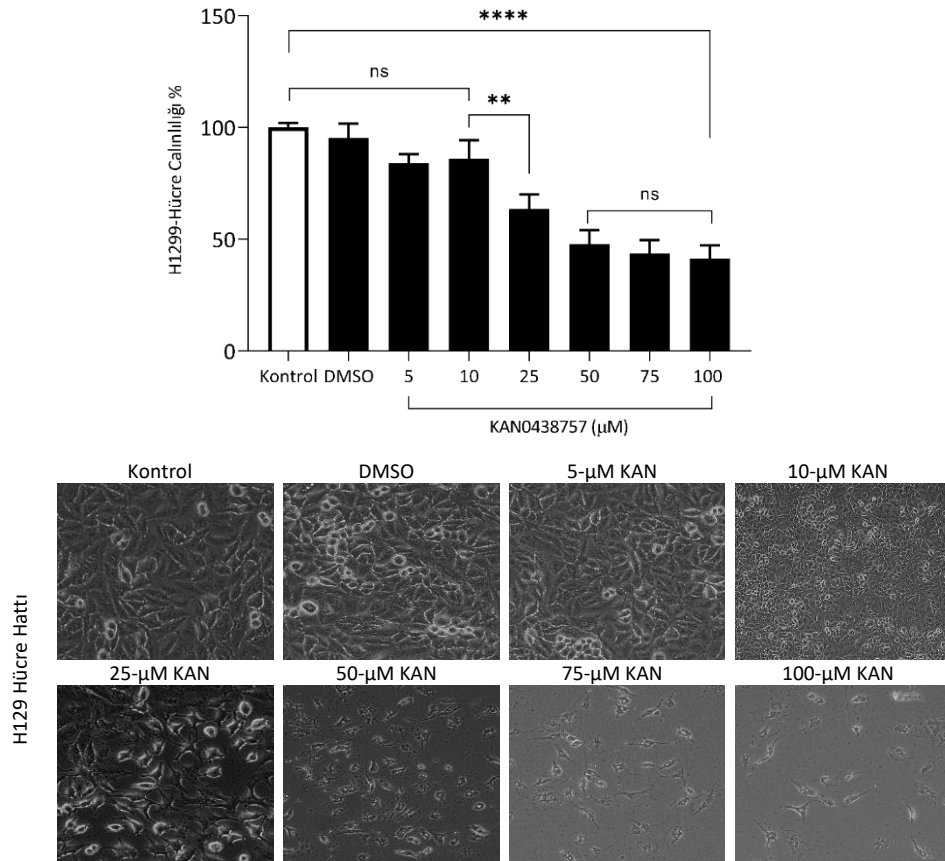
3.1. KAN0438757'nin A549 ve H1299 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

KAN0438757 inhibitörünün akciğer kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerindeki etkisi WST-1 hücre canlılık testi ile belirlendi. KAN0438757 tedavi dozları, 5, 10, 25, 50,75 ve 100 μ M olacak şekilde 48 saatlik süre ile uygulandı. Üretici firmanın geliştirdiği protokol uygulandıktan sonra 450-480 nm'lerde ölçüm alındı. Ölçüm sonuçlarına göre Kan0438757 ile tedavi sonrası A549 hücre hattında IC₅₀ değeri 35,2 μ M olarak, H1299 hücre hattında ise IC₅₀ değeri 52,4 μ M olarak belirlendi.

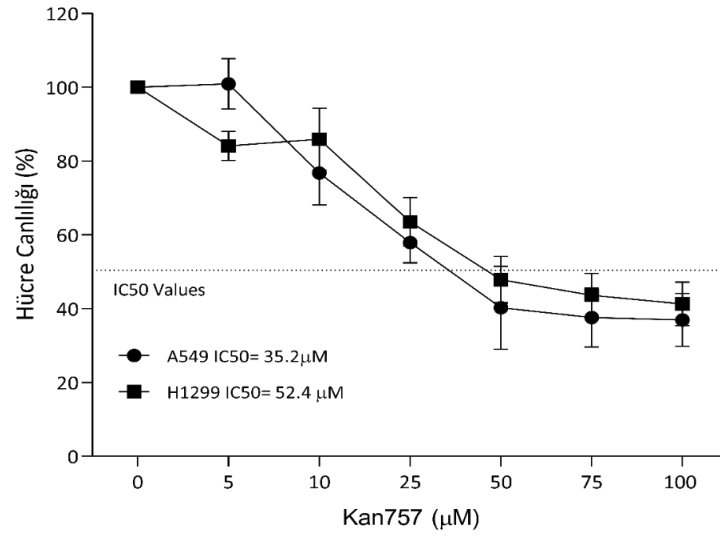


Şekil 3.1. KAN0438757'nin hücre canlılığı üzerine etkisi (A) A549 hücre canlılığı (B) A549 hücre görüntüleri

B



C

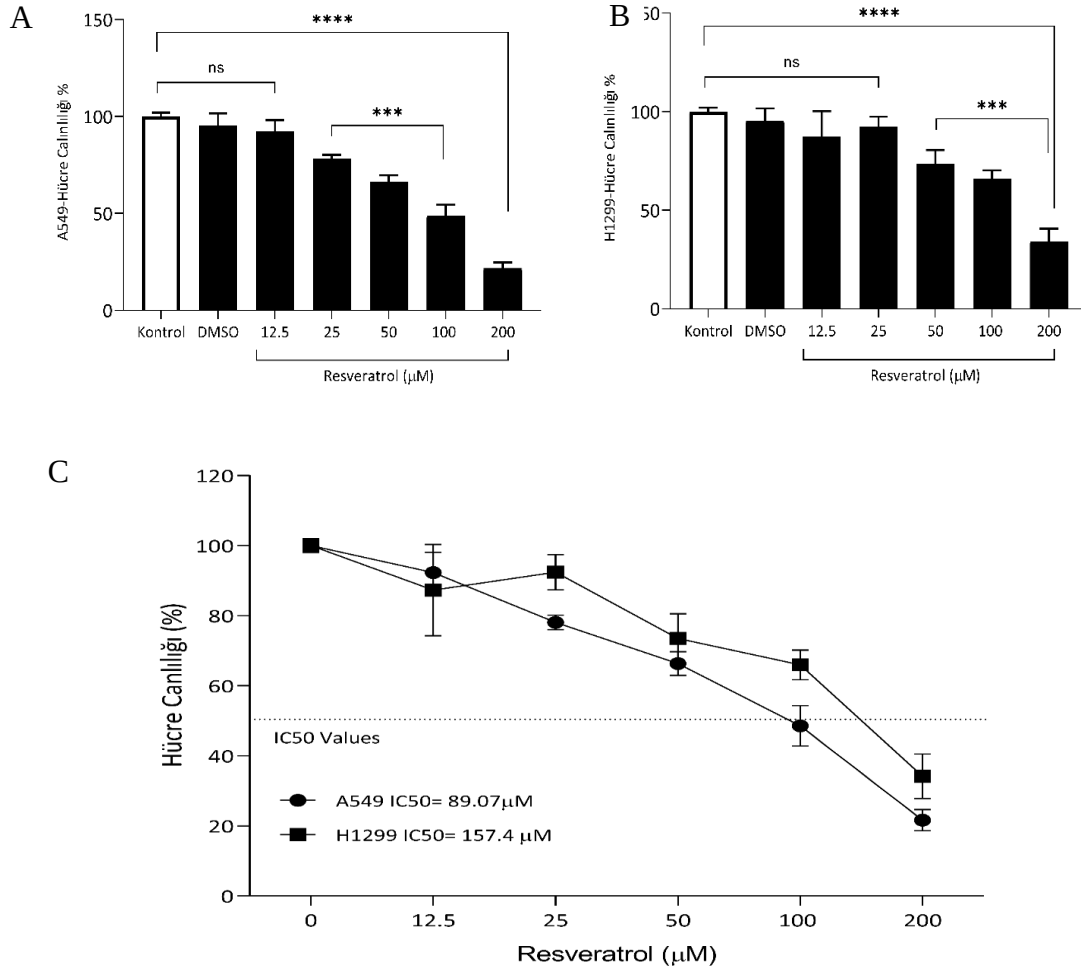


Şekil 3.2. KAN0438757'nin hücre canlılığı üzerine etkisi (A) H1299 hücre canlılığı (B) H1299 hücre görüntüleri (C) A549 ve H1299 hücre hatlarında KAN0438757'nin hücre canlılığına etkisi

A549 hücrelerinde H1299'a göre daha fazla bir etkinin olduğu, A549 hücre hattında 5 μM dozundan 50 μM dozuna kadar gözle görülür bir azalmanın gerçekleştiği, 50 μM 'dan sonra ise hücre ölümünün neredeyse sabit bir şekilde kaldığı görülmektedir. H1299 hücre hattında ise 10 μM 'lık dozdan 50 μM 'lık doza kadar net bir şekilde hücre canlılığını azalttığı ve 50 μM dozundan sonra da yine hücre canlılığının sabit kaldığı gözlemlendi.

3.2. Resveratrol'ün A549 ve H1299 Hücre Hatları Üzerindeki Hücre Canlılığına Etkisi

Resveratrol'ün A549 ve H1299 hücre hatlarında hücre canlılığına etkisini belirlemek amacıyla WST-1 testi uygulandı. Hücreler farklı resveratrol dozları ile (12.5, 25, 50, 100 ve 200 μ M) tedavi edildi. Ölçüm sonucunda alınan verilere göre A549 hücre hattının IC₅₀ değeri 89,07 μ M, H1299 hücre hattının IC₅₀ değeri ise 157,4 μ M olarak hesaplandı.

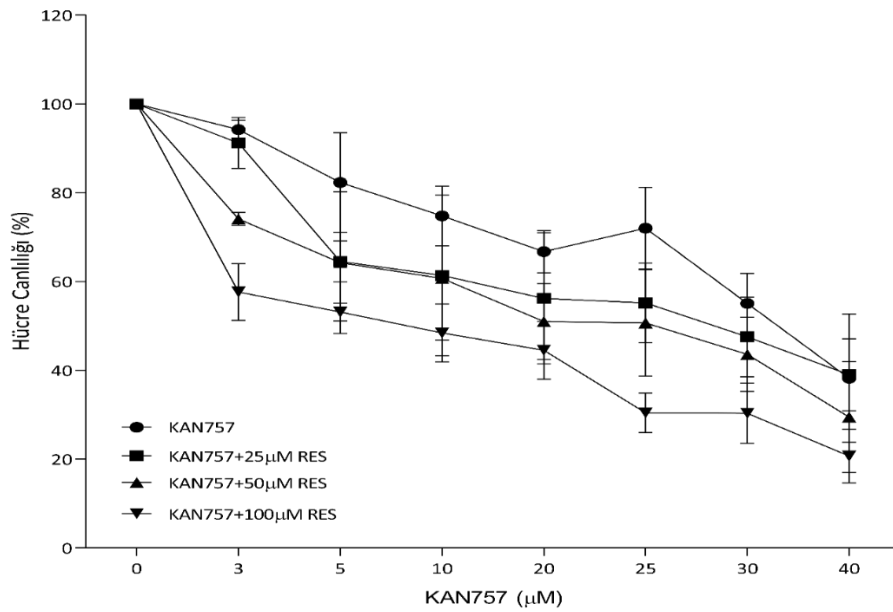


Şekil 3.3. Resveratrol'ün hücre canlılığına etkisi (A) A549 hücre hattı (B) H1299 hücre hattı (C) A549 ve H1299 hücre hatlarında resveratrolün hücre canlılığına etkisi

Şekil 3.2'de gösterildiği gibi, resveratrolün A549 hücre hattında doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. H1299 hücre hattında ise yine aynı şekilde resveratrol, hücre canlılığını doza bağımlı olarak azalttı fakat 25 μ M'dan sonra daha net bir azalma olduğu gözlemlendi. İki hücre hattında da özellikle 100 μ M dozundan sonra hücre canlılığında gözle görülür bir azalma olduğu belirlendi.

3.3. A549 Hücre Hattında, KAN0438757 ve Farklı Dozlardaki Resveratrol Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi

A549 hücre hattında KAN0438757 ve resveratrol bileşiğinin kombinasyonunun hücre canlılığını nasıl etkilediği incelendiğinde, kontrol grubunun yanında Kan0438757 dozları sırasıyla 3, 5, 10, 20, 25, 30 ve 40 μM olacak şekilde resveratrolün 25, 50 ve 100 μM 'lık dozları ile kombinasyonu şeklinde hesaplandı. 48 saatlik tedavi süresi sonrası WST-1 ile boyanıp Eliza cihazında 450- 480 nm'lerde ölçüm alındı.

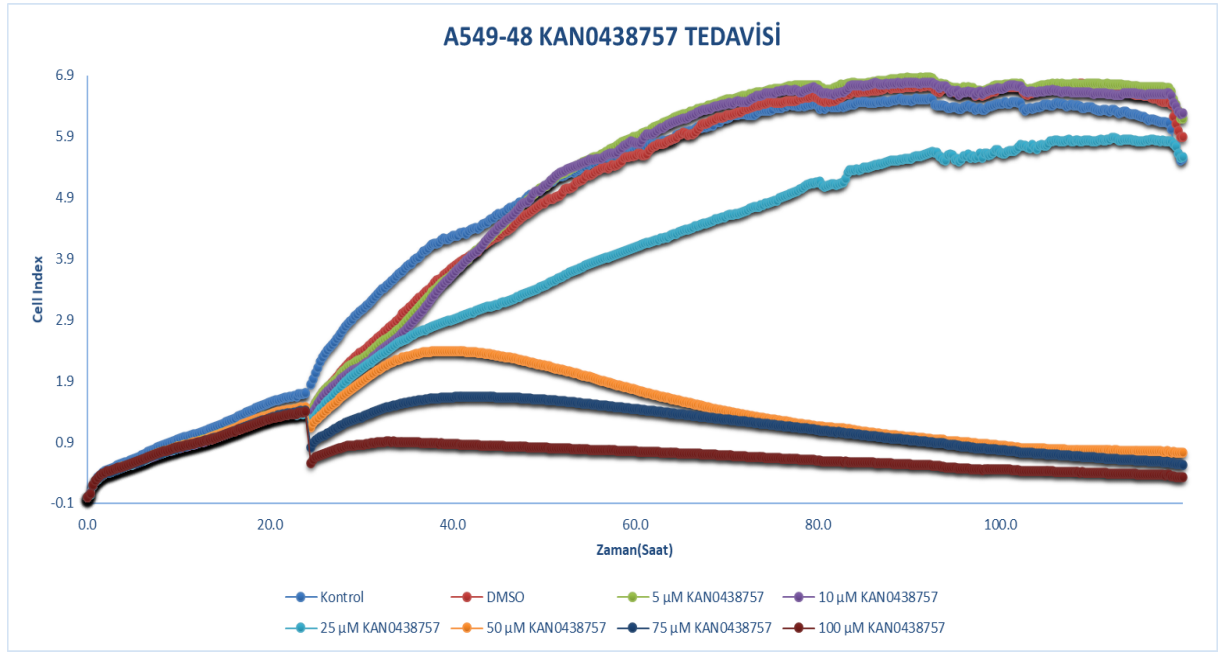


Şekil 3.4. A549 hücre hattında, KAN0438757 ve resveratrol kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

KAN0438757 inhibitörü tek başına kullanıldığında 25 μM dozundan sonra hücre canlılığında gözle görülür bir azalma olduğu görülmektedir. 25 μM resveratrol+KAN0438757 kombinasyonu ve 50 μM resveratrol+KAN0438757 kombinasyon gruplarındaki etkinliğin birbirine yakın olduğu ancak 100 μM Resveratrol+KAN0438757 grubunda kayda değer bir biçimde hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi.

3.4. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

A549 hücre hattının KAN0438757 ile tedavisinin ardından hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için Xcelligence ile hücre indeksi belirlendi. Kontrol grubu, DMSO ve KAN0438757 dozları, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 μ M olacak şekilde hesaplandı. 48 saatlik tedavi sonrası sonuçlar aşağıdaki şekilde gösterildi.

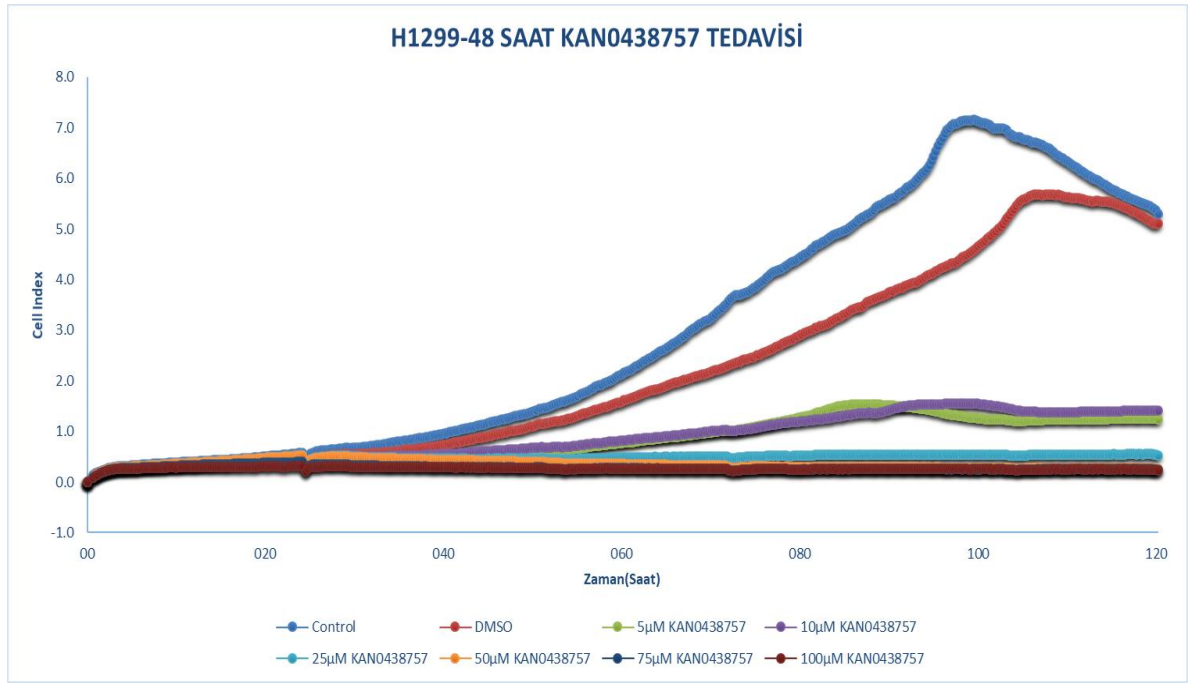


Şekil 3.5. A549 hücre hattının KAN0438757 ile tedavisi sonucu hücre proliferasyon test sonucu

Şekil 3.4'de hücre indeksi grafiği incelendiğinde, kontrol grubu ve çözücü (DMSO) grubunun beklendiği gibi hücre proliferasyonuna etkisinin olmadığı belirlendi. Sırasıyla 5 ve 10 μ M dozlarının kontrol grubu ile benzer bir proliferasyon eğrisi oluşturduğu gözlemlendi. Öte yandan 25 μ M grupta ise proliferasyonun kontrol grubuna kıyasla bir miktar da olsa azaldığı gözlemlendi. 50, 75 ve 100 μ M dozları ise grafikte de görüldüğü üzere sırasıyla hücre proliferasyonunu dramatik bir biçimde azalttığı tespit edildi.

3.5. H1299 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi için H1299 hücre hattında KAN0438757 ile tedavi sonrası oluşan değişiklikleri gözlemlemek amacıyla Xcelligence ile hücre indeksi belirlendi. Deneyde kontrol grubu DMSO ve KAN438757 tedavi dozları, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 μ M olacak şekilde uygulandı. 48 saatlik tedavi sonrası sonuçlar şekildeki grafikte gözlemlendi.

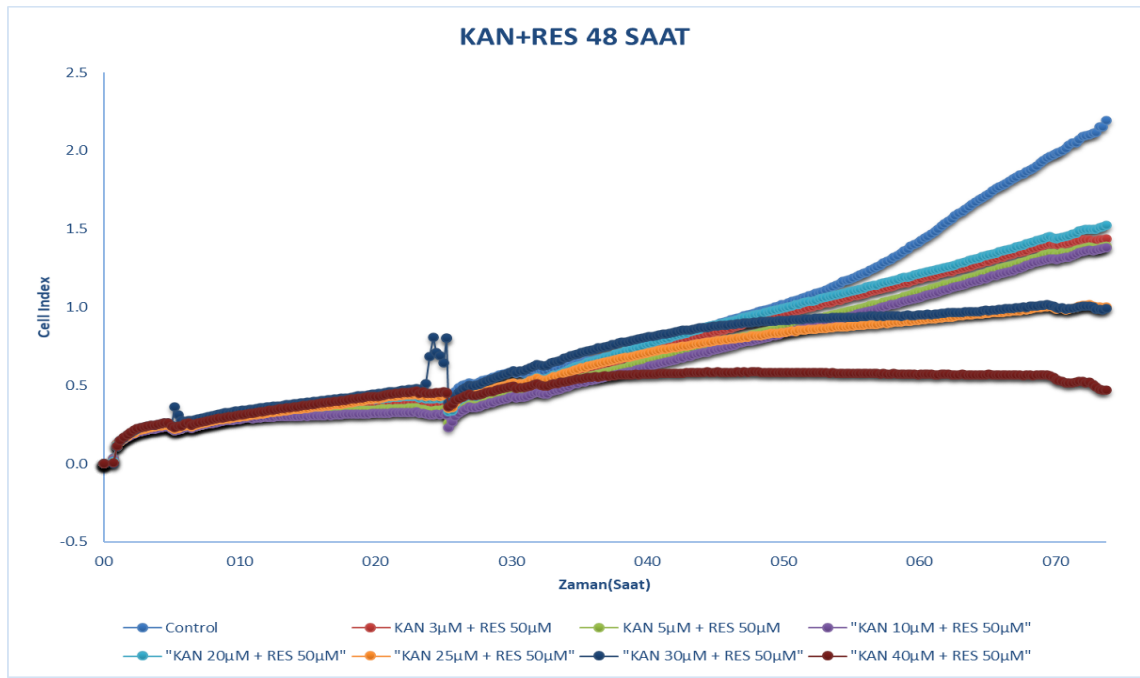


Şekil 3.6. H1299 hücresinin KAN0438757 ile tedavisinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi

Şekil 3.6'da görüldüğü gibi ilk olarak kontrol grubunun beklenildiği gibi hücre çoğalmasına bir etkisinin olmadığı görüldü. DMSO grubunun ise kontrol grubuna kıyasla bir etkisinin olduğu fakat diğer dozlar ile kıyaslandığında gözle görülür bir etkisinin bulunmadığı kanısına varıldı. 5 ve 10 μ M dozları ise neredeyse aynı etkiyi göstererek hücre çoğalmasını kısmen de olsa azalttığı gözlemlenirken. 25, 50, 75 ve 100 μ M dozlarında ise sırasıyla doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edildi.

3.6. A549 Hücre Hattında KAN0438757 ile Resveratrol Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

A549 hücre hattı üzerinde KAN0438757 dozlarının, resveratrolün tek bir dozu ile kombinasyonu sonucunda hücre çoğalmasına etkisi incelendi. Kontrol grubu başta olmak üzere Kan757'nin 3, 5, 10, 20, 25, 30 ve 40 μM dozları ile resveratrolün 50 μM dozunun 48 saat süre ile kombinasyon tedavisi yapıldı.

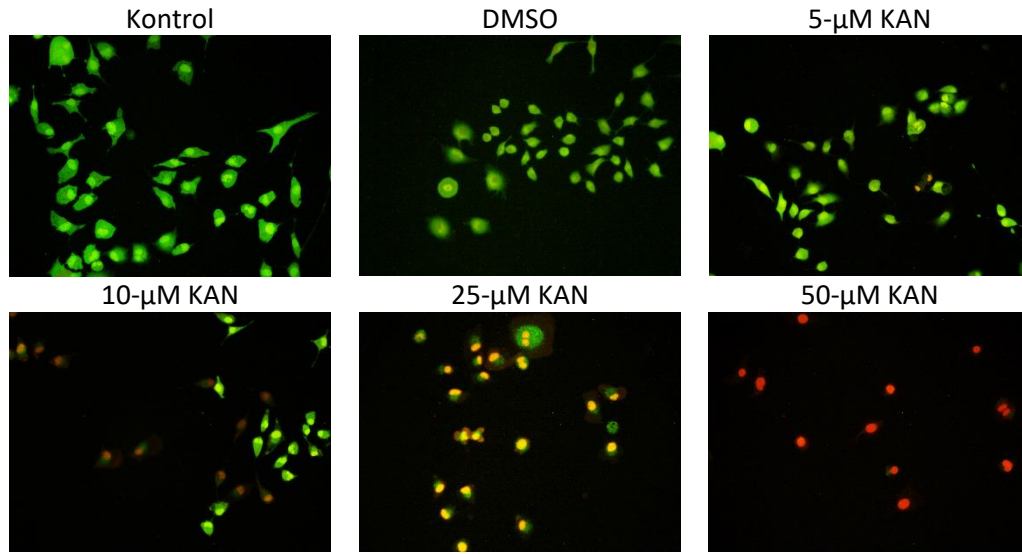


Şekil 3.7. A549 hücre hattı üzerinde KAN0438757 ile resveratrol kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkisi

Şekil 3.6 incelendiğinde, kontrol grubunun hücre çoğalmasına belirli bir etkisinin olmadığı görüldü. Sonrasında 3, 5, 10 ve 20 μM + resveratrol 50 μM dozlarında ise hepsinin neredeyse aynı çizgi üzerinde bulunduğu az da olsa kontrol grubuna kıyasla bir etki gösterdiği tespit edildi. KAN0438757 dozlarının 25 ve 30 μM + resveratrol 50 μM olduğu kısımda ise doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu azaltarak olumlu yönde bir sonuç elde edildiği gözlemlendi. Son olarak en yüksek doz olan Kan 40 μM + resveratrol 50 μM kombinasyonunun hücre çoğalmasını beklenildiği gibi önemli ölçüde azalttığı belirlendi.

3.7. A549 Hücre Hattında KAN0438757'nin Hücre Ölümü Üzerine Etkisi

Akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücresi, KAN0438757 inhibitörü ile 5, 10, 25, 50 ve 100 μM dozları ile 48 saat tedavi edildi. Kontrol ve DMSO grupları bölüm: 2.4'te açıklandığı gibi negatif kontrol olarak kullanıldı. Tedavi sonrası hücreler akridin oranj-etidyum bromür boyası ile boyandı, invert mikroskop altında incelendi ve fotoğraflar kaydedildi.

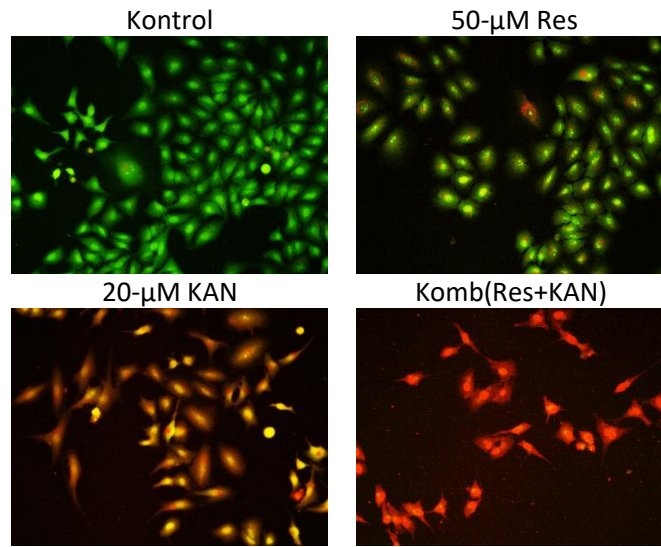


Şekil 3.8. A549 Hücresinin KAN0438757 ile tedavisinin hücre ölümü üzerindeki etkisi

AO-EBr boyası beraber kullanıldığında canlı hücreleri yeşile, cansız hücreleri kırmızıya ve erken apoptotik evrede bulunan yani ölmeye yakın olan hücreleri de sarı turuncu renkte boyamaktadır. Şekil üzerinde incelendiğinde kontrol ve DMSO grubu beklenildiği gibi negatif kontrol oldukları için yeşil renkte görünmekte yani hücrelerin canlı olarak bulunduğu gözlemlenmektedir. 5 μM uygulana doz bakıldığında canlı hücre sayısının oldukça fazla olduğu görülmektedir. 10 μM ve 25 μM dozlarındaki boyamada hücrelerin yeşil renkten çıkarak sarı ve turuncu renge döndükleri yani doza bağımlı bir şekilde doz miktarının artmasıyla hücrelerin apoptotik evreye yaklaştıkları gözlemlenmektedir. Son olarak en yüksek dozlar olan 50 μM da canlı hücrenin kalmadığı belirlendi.

3.8. A549 Hücre Hattının KAN0438757 ve Resveratrol Kombinasyonunun Hücre Ölümü Üzerine Etkisi

A549 hücre hattı üzerinde KAN0438757 ve resveratrol kombinasyonunun hücre ölümü üzerine olan etkileri AO-EBr boyaması ile belirlendi. Hücreler, resveratrol (50 μ M) ve KAN0438757 ile ayrı ayrı ve kombine şekilde hücrelere uygulandı. Ardından bölüm 2.4’te anlatıldığı gibi AO/EBr ile boyandıktan sonra floresan invert mikroskop ile incelendi ve fotoğraflar kaydedildi.

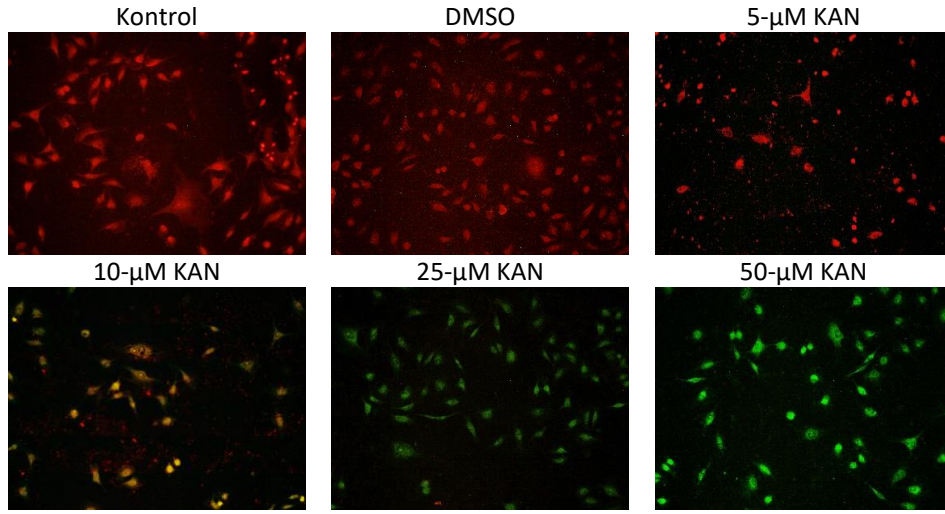


Şekil 3.9. A549 hücre hattında resveratrol ile KAN757’nin kombinasyonunun hücre ölümü üzerindeki etkileri

Tek başına resveratrolün 50 μ M dozundaki boyama sonucu incelendiğinde hücredeki renk değişiminin net olmadığı belirlendi. KAN0438757 tek başına 20 μ M dozunda uygulandığında ise hücrelerin büyük çoğunluğunun hücre ölümünü tetiklediği belirlendi. Son olarak resveratrol ile KAN0438757 kombinasyonunun ise dramatik bir biçimde hücrelerin ölümüne neden olduğu belirlendi. Bu sonuçlar bize, hem resveratrol hem de KAN0438757’nin tek başına tedavide etkinliğinin zayıf olduğunu ancak kombine edildiklerinde hücre ölümü üzerinde kayda değer bir etkiye sahip olduklarını göstermiştir.

3.9. A549 Hücre Hattı Üzerinde KAN0438757'nin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

KAN0438757'nin mitokondri membran potansiyeli üzerine olan etkileri bölüm 2.5'te açıklandığı gibi JC-1 analizi ile değerlendirildi. KAN0438757 (5,10,25,50 μ M) dozları ile 48 saat tedavi süresinin ardından hücrelere JC-1 boyası uygulandı ve sonrasında floresan mikroskop altında incelenerek fotoğraflar kaydedildi.

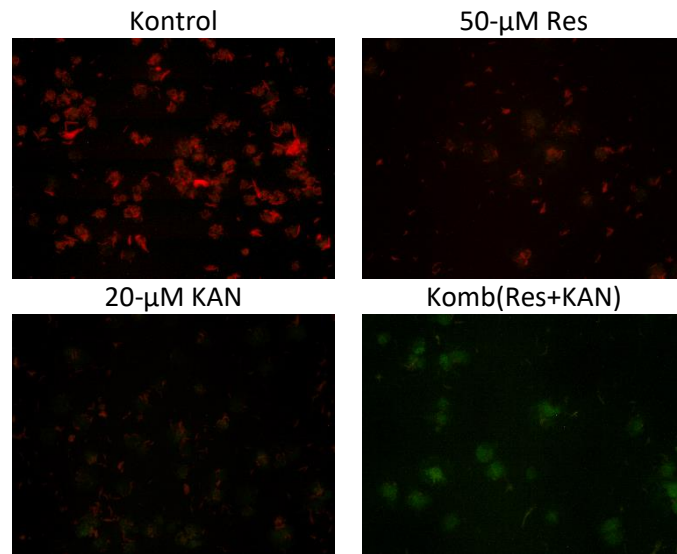


Şekil 3.10. A549 hücre hattında KAN757 ile tedavi sonrası mitokondri membran potansiyeli deney sonuçları

Şekil 3.10'da görüldüğü gibi JC-1 boyaması, AO-EBR boyama deneyinin aksine canlı hücreleri kırmızı renkte, ölü hücreleri ise yeşil renkte boyamaktadır. KAN0438757'nin 5 μ M dozunda henüz hücrelerin mitokondri membran potansiyellerinin bozulmadığı ve bu nedenle kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi. 10 μ M dozunda ise hücrelerin membran potansiyellerinin az da olsa bozulduğu bu nedenle hücrelerin sarıya boyandığı belirlendi. 25 ve 50 μ M dozlarında ise hücrelerin yeşil renge boyandığı gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda KAN0438757'nin doza bağlı bir şekilde hücrelerin mitokondri membran potansiyellerini tam olarak bozduğu tespit edildi.

3.10. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerinde KAN0438757 ile Resveratrol Kombinasyonunun Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

Resveratrol ile KAN0438757 molekülünün kombinasyon tedavisinin A549 hücre hattı üzerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine olan etkileri JC-1 analizi ile belirlendi. Resveratrol'ün 50 μ M dozu ile KAN0438757'nin 20 μ M dozunun kombinasyonu sonucu 48 saatlik tedavinin ardından hücreler JC-1 boyası ile boyandı ve floresan mikroskop altında fotoğraflar kaydedildi.

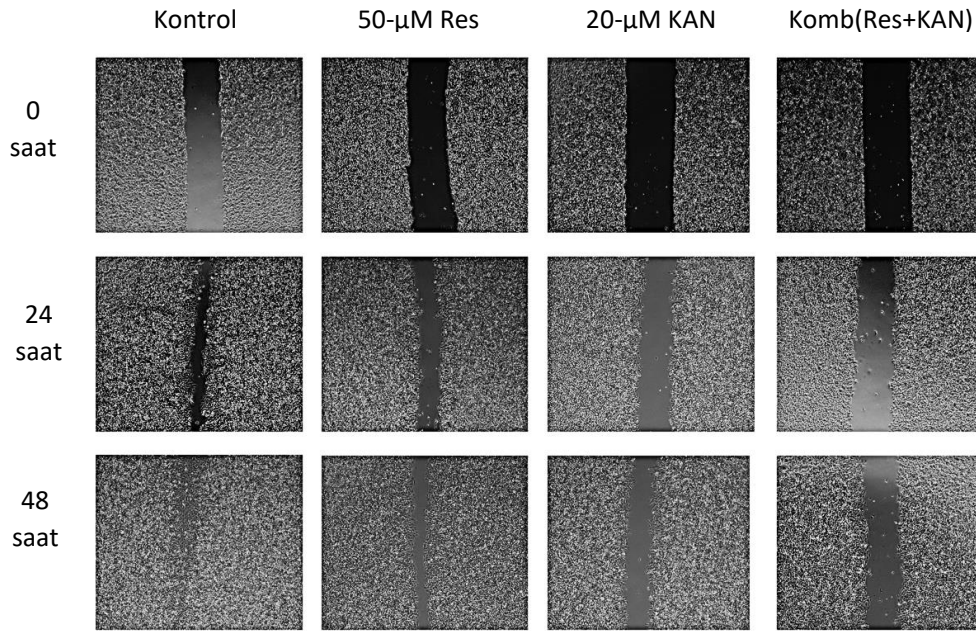


Şekil 3.11. A549 hücre hattında resveratrol ve KAN757'nin kombinasyon tedavisinin mitokondri membran potansiyeline etkileri

Şekil 3.11'de görüldüğü gibi, resveratrolün 50 μ M dozunun tek başına uygulanması sonucu kontrol grubuna kıyasla hücrelerin mitokondri membran bütünlüğünü az miktarda olsa bozduğu gözlemlendi. KAN0438757'nin 20 μ M dozda kullanılması sonucu resveratrole göre daha iyi bir etkinin olduğu fakat tam olarak hücrelerin membran bütünlüğünü bozmadığı sonucu elde edildi. Son olarak resveratrol ve KAN0438757'nin kombinasyon şeklinde uygulanması sonucu hücrelerin tamamen mitokondri membran bütünlüğünün ve hücre ölümü üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu gözlemlendi.

3.11. A549 Hücre Hattında Resveratrol ve KAN0438757 Kombinasyonunun Hücre Göçü Üzerine Etkisi

A549 hücre hattı üzerinde uygulanan yara iyileşmesi (wound healing) deneyinde, resveratrolün 50 μ M dozu ile KAN0438757'nin 20 μ M dozu öncelikle tekli tedaviler şeklinde daha sonra kombinasyon halinde kullanıldı. Tedavi süreleri olarak 0 saat, 24 saat sonrası ve 48 saat sonrası, olmak üzere mikroskopta incelendi ve fotoğraflar kaydedildi.

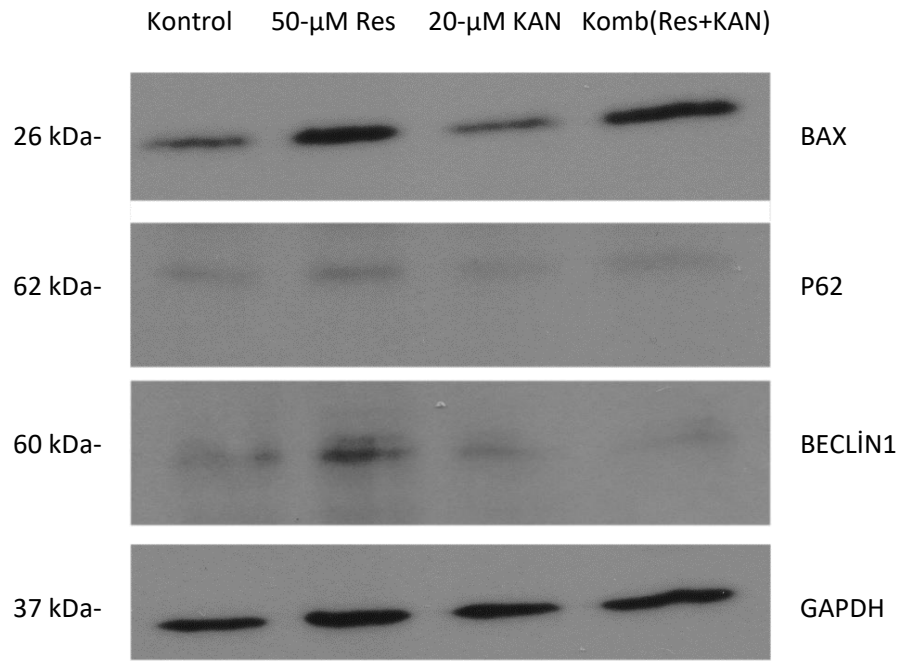


Şekil 3.12. A549 hücre hattında resveratrol ile KAN0438757 molekül kombinasyon tedavisinin hücre göçü deney sonuçları

Kontrol grubunda 0. saat ile karşılaştırıldığında, 24 ve 48 saat sonrasında hücreler arasındaki alanın kapandığı gözlemlendi. Resveratrolün 50 μ M dozunun tek başına kullanılması sonucu tedavi sürelerinin tamamına bakıldığında kontrole kıyasla hücreler arası alanın kayda değer bir biçimde kapandığı gözlemlendi. KAN0438757'nin 20 μ M dozu incelendiğinde tüm tedavi süreleri sonrasında hem kontrole hem de resveratrole göre daha iyi bir sonuç oluşturarak hücreler arası alanın yara izinin gözle görülür kapanmadığı belirlendi. Son olarak resveratrol ile KAN0438757 kombinasyonuna bakıldığında 0. saate kıyasla 24 ve 48 saat de hücreler arası alanın kapanmadığı tespit edildi.

3.12. KAN0438757 ve Resveratrol Kombinasyonlarının Bax, Beclin-1 ve p62 Protein Düzeyleri Üzerine Etkileri

A549 hücreleri, KAN0438757 (20 μ M) resveratrol (50 μ M) ve kombinasyonlarının 48 saat süre ile tedavi edilmesinden sonra kazıyıcı yardımı ile toplandı. Ardından bölüm 2.7’de anlatıldığı gibi western blot yöntemi ile Bax, p62 ve Beclin-1’in protein ekspresyon düzeyleri analiz edildi.



Şekil 3.13. A549 hücre hattında KAN0438757 ile Resveratrol'ün kombinasyon tedavisinin Western blot deney sonuçları

İlk olarak Bax proteininin ekspresyon düzeylerine bakıldığında, 50 μ M resveratrol dozunun kontrol grubuna oranla önemli derecede arttığı, 20 μ M KAN0438757 dozunun tekli tedavisinin Bax proteini ekspresyon düzeyini etkilemediği fakat kombinasyon grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttığı görüldü. P62 proteininde ise kontrol grubuna oranla resveratrolün p62 grubunda ekspresyon düzeyinin arttığı, KAN0438757'nin ise kayda değer bir etkisinin bulunmadığı sonucuna varıldı. Son olarak kombine doz olan dördüncü bandın kontrol grubuna kıyasla daha az eksprese olduğu belirlendi. Beclin-1 proteinine bakıldığında, resveratrolün kontrol grubu ile karşılaştırıldığında az da olsa bir artışın olduğu, KAN0438757 grubunda ise kontrole oranla azalmanın meydana geldiği ve son olarak kombinasyon grubunda önemli derecede azalmanın meydana geldiği görüldü. Akciğer kanseri, dünya çapında sıklıkla görülen

ölümcül bir hastalıktır (Minna et al., 2002). Akciğer kanseri tedavisi için kullanılan kemoterapi ajanları ve bunları ikili kombinasyonları bulunmaktadır. Bu kombinasyonlar yaklaşık %35'lik 1 yıllık sağ kalım ve yaklaşık %15'lik 2 yıllık sağ kalım oranları elde edilmektedir. Bu tedaviler tam olarak iyileştirici olmasa da genellikle semptomların azalmasına ve 2-10 ay arasında yaşamın uzamasına imkân vermektedir. Kemoterapinin yeterli gelmediği durumlarda ise semptomları hafifletmek amacıyla radyoterapi kullanılmaktadır (Minna et al., 2002). Son zamanlarda bulunan yeni tedavi ajanları ile birlikte kemoterapinin etkisinin artan bir şekilde devam etmesinin ardından, akciğer kanserini iyileştirmede umut vaat ettiği sonucuna varılmaktadır (Wistuba & Gazdar, 2006). Kanser üzerine yapılan birçok çalışma bulunmakta ve bunların bazılarının tümör metabolizmalarında anormallikler gözlemlenmektedir. Anaerobik solunum da laktat üretmek için glikoliz kullanılırken, aerobik solunumda trikarboksilik asit döngüsü için pirüvat üretilir ve oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji açığa çıkar. Bu durumda, normal hücreler oksijen varlığında glikolizi kullanmazlar (Potter et al., 2016). Otto Warburg tarafından tanımlanan ve “Warburg Etkisi” olarak adlandırılan olayda, kanserli hücrelerin oksijen varlığında bile yüksek oranda glikolizi kullandığı bilinmektedir (Bartrons & Caro, 2007). Bununla birlikte yeni çoğalan tümör hücreleri enerjik ve metabolik ihtiyaçları için fazla miktarda glikolizi alarak katabolize etme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle glikoliz, kanser hücrelerinde oldukça önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (Y. Wang et al., 2020).

Homodimerik 6-fosfofrukto-2-kinaz/früktoz-2,6-bisfosfatazlar (PFKFB'ler), glikoz aşamasındaki anahtar düzenleyici enzimlerdir (Gustafsson et al., 2018). PFKFB genleri, yarısı N-terminal kinaz alanı, diğer yarısı C-terminal bir fosfataz alanı bulunduran iki işlevli yapıda bulunmaktadır (Pegoraro et al., 2013). PFKFB geni, farklı kinaz/bisfosfataz izoenzimlerini kodlayan, PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-3 ve PFKFB-4 olmak üzere dört grupta incelenmektedir. Bu dört PFKFB geninin farklı hücresel desenleri bulunmakta, farklı kinaz/bisfosfataz aktivite oranları sergilemekte ve farklı protein kinazlar tarafından kontrol edilmektedir (Bartrons et al., 2018). Yapısal olarak PFKFB-1,2,4 izoformları, testis, böbrek, kalp, karaciğer, ve kasta ifade edilirken, PFKFB-3 izoformu hipoksi ve hücre dışı inflamasyona yanıt olarak artmış ekspresyonu uyarabilme kabiliyetine sahiptir. Aynı zamanda PFKFB-3 740:1'lik bir kinaz-bisfosfataz oranı ile öne çıkarken diğer izoformlar ise birliğe daha yakın daha dengeli bir oran sergilemektedirler (Gustafsson et al., 2018).

PFKFB-3 izoenzimi, yüksek kinaz-bisfosfataz oranına sahip olması nedeniyle her yerde ifade edilebilmekte ve çoğalan dokularda, dönüştürülmüş hücrelerde ve çeşitli katı tümörlerde glikoliz ve laktat üretimine katkıda bulunmaktadır (Bartrons et al., 2018). PFKFB-3 glikolizin önemli bir hız sınırlayıcı enzimidir. PFK-1'in güçlü allosterik aktivatörü olduğu düşünülmekte ve F2, 6BP'nin kararlı durum seviyelerini kontrol ederek glikoliz hızını düzenlemektedir (Zhang et al., 2019). PFKFB-3 glikolitik faaliyetlerinin yanı sıra, tümör endotelial hücre damar dallanması, G1-S fazlarında hücre döngüsünün ilerlemesinin desteklenmesi ve apoptozun engellenmesi gibi birçok hücrel olayın modülasyonunda önemli roller oynadığı bildirilmiştir. PFKFB-3 sıklıkla akciğer, meme, kolon, pankreas tümörleri vb. dahil olmak üzere çok sayıda insan tümörlerinde aşırı eksprese edildiği ve aynı zamanda ise normal dokularda yetersiz şekilde ifade edilmesi, PFKFB3'ün kanser tedavisinde ilgi çekici bir hedef olarak görülmesini sağlamıştır (Y. Wang et al., 2020).

PFKFB-3 enziminin bilinen inhibitörleri arasında, 3PO, PFK-15, PFK-158 ve KAN0438757 ön plana çıkmaktadır (W. Zhu et al., 2016). 3PO, PFKFB-3'ün önemli bir inhibitörüdür. PFKFB-3'ün 3PO tarafından engellenmesinin kanser ve inflamasyonda patolojik anjiyogenezi güçlü bir şekilde azalttığı bilinmektedir (Wik et al., 2020). PFK-15, PFKFB-3'e ve antitümör etkilerine karşı güçlü bir aktivite sergileyen küçük moleküler bir PFKFB-3 inhibitörüdür (C. Wang et al., 2018). PFK-158, çoğu kanser hücresinde, glikozun artan regülasyonunu engelleyen ve antitümör aktivite gösteren PFKFB-3'ün küçük molekülü bir inhibitörüdür (W. Zhu et al., 2016). KAN0438757, PFKFB-3'ü güçlü bir şekilde hedefleyen ve yakın zamanlı çalışmalarda geliştirilen önemli bir küçük molekül inhibitörüdür. DNA replikasyonunda bozulmalara neden olarak DNA hasarı oluşturduğu ve bu yolla ölüme götürdüğü bilinmektedir. Henüz yeni bulunan bir ajan olması ve DNA hasarında önemli rol oynaması, KAN0438757'nin kanser tedavisinde yüksek potansiyele sahip bir küçük molekül inhibitörü olduğunu ortaya koymuştur (Gustafsson et al., 2018). Resveratrol, üzüm, yer fıstığı ve çilek gibi insanlar tarafından sıklıkla tüketilen birçok bitki türünde bulunan bir fitoalleksindir. Bitkilerde mekanik yaralanma, mantar enfeksiyonu ve UV radyasyonuna tepki olarak üretilmektedir (Carter et al., 2003). Resveratrolün yapısı, stilben bazlıdır ve hem trans hem de cis formlarından meydana gelen iki fenolik halka içermektedir. Resveratrol, antiinflamatuvar, antioksidatif ve yaşlanmayı önleyici nitelikler

gibi çok yönlü özelliklere sahiptir (Ko et al., 2017). Resveratrolün bu özellikleri dışında antitümör etkilerinin de olduğu bilinmektedir.

Resveratrol doğal bir bileşik olduğundan, kanser dahil birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde oldukça önemli bir rol üstlenmektedir. Birçok in vitro çalışmada resveratrolün hem tümör başlangıcına hem de kanser ilerleme yollarına karşı koruma sağlayan antikanser özellikleri bulunmaktadır (Kulkarni & Cantó, 2015). Resveratrol, hücre büyümesini ve bölünmesini, inflamasyonu, apoptozu, metastazı ve anjiyogenezi kontrol eden çeşitli sinyal iletim yollarını etkileyerek başlangıç sürecinden ilerlemeye kadar çeşitli kanser evrelerini etkilemektedir (Ko et al., 2017). Resveratrol aynı zamanda tümör hücrelerinin apoptozisine yol açmakta ve bunun yanı sıra hücre döngüsünün de durmasını teşvik edebilmektedir. Tümör büyümesini ve göçünü bloke etmeyi önleyebilir ve bununla birlikte tümör oluşumuna yol açabilecek DNA hasarını engelleyebilmek için bir antioksidan görevi görebilmektedir (Carter et al., 2003). Resveratrol birçok kanser hücresinde doza, zamana ve hücre tipine bağlı olarak farklı etkiler göstermesinden dolayı kanser tedavilerinde umut verici bir ajan olarak karşımıza çıktığı bilinmektedir (Walle, 2011). Bu çalışmadaki amacımız, akciğer kanseri tedavisinde küçük molekül inhibitörü olan PFKFB-3'ün yeni bir inhibitörü KAN0438757 molekülünün ve resveratrolün kombine edilmesi sonucunda programlı hücre ölümü üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Yaptığımız çalışmada ilk sonuç, KAN0438757 molekülünün A549 ve H1299 hücre hatlarında hücre canlılığı testi WST-1 ile ölçümü gerçekleştirildi. Bunun sonucunda hücre canlılığı her iki hücre hattında da incelendiğinde 10 ila 50 μ M dozlarında önemli derecede hücre ölümünün gerçekleştiği sonucuna varıldı. KAN0438757'nin A549 ve H1299 hücrelerindeki IC50 değerleri karşılaştırıldığında A549'da (35,2), H1299'a (52,4) göre daha düşük olduğu belirlendi. Oliveira ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise bizim çalışmamamızdan farklı olarak, kolorektal kanser hücreleri LDH salınımı ile hücre canlılık testine tabi tutulmuş. KAN0438757 ile yapılan 50-100 μ M dozlarında ve 48 saatlik tedavi sonrasında kanser hücrelerinde hücre ölüm oranlarını önemli derecede artırdığı sonucuna varılmıştır (De Oliveira et al., 2021). Öte yandan Li ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, PFKFB-3'ün başka bir inhibitörü olan PFK-15'in farklı konsantrasyonları ile tedavi edilen A549 hücrelerinin aşağı regülasyonunun sağlandığı ve A549 akciğer

adenokarsinom hücrelerinin hücre canlılığını PFK-15 ile inhibe ettiği gözlemlenmiştir (X. Li et al., 2018).

Bu çalışmada, resveratrolün akciğer kanseri hücre hatları A549 ve H1299 üzerindeki hücre canlılığın etkisi WST-1 testi ile incelendi. Yapılan testin sonucunda H1299 hücre hattında resveratrolün hücre canlılığını 100-200 μ M dozları arasında önemli derecede azalttığı sonucuna varırken, A549 hücre hattında ise diğer hücre hattında olduğu gibi doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı sonucu elde edilmiştir. Takashina ve arkadaşlarının çalışmalarında, bizim çalışmamızda aldığımız sonuçlar ile oldukça benzerlik gösterdiği görülmektedir. Akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde resveratrolün 100 μ M dozu ile 48 saatlik tedavi sonucunda hücre canlılığının önemli derecede inhibisyonunun gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Takashina et al., 2017). Fan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise resveratrolün hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek için A549 hücreleri çeşitli konsantrasyonlarda resveratrol ile inkübe edilmiş ve MTT testi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre resveratrolün doza ve zamana bağlı bir şekilde A549 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Fan et al., 2020). Bir başka çalışmada ise resveratrolün farklı akciğer kanseri hücre hatlarında (H838 ve H520) hücre canlılık belirteci MTT testi ile hücre proliferasyonun etkisine bakılmıştır. Sonuçlar doza ve zamana bağlı bir şekilde düşük dozda resveratrolün H520 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde hafif bir arttırıcı etki gösterdiğini, yüksek dozda ise resveratrolün her iki hücre hattında da proliferasyonu önemli derecede inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (Ma et al., 2015). Akciğer kanseri hücre hatlarından (A549 ve H1299) daha etkili sonuç aldığımız A549 hücre hattı üzerinde Kan0438757 inhibitörü ile resveratrol molekülünün kombine tedavisinin hücre canlılığı WST-1 testi üzerindeki etkisi incelendi. Resveratrolün en düşük 25 μ M dozu ile KAN0438757'nin 25-40 μ M dozları arasındaki kombinasyonun hücre canlılığını belirli bir oranda azalttığını, diğer yandan resveratrolün en yüksek dozu 100 μ M ile Kan0438757'nin 30-40 μ M arasındaki kombine tedavinin diğer kombinatif dozlara oranla önemli derecede hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. Resveratrol ve Timokininin kombine edildiği bir başka çalışmada ise kombinatif tedavinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede etkili olduğunu ve hücrelerin çoğunu tekli tedavilere oranla daha fazla öldürdüğü sonucuna varılmıştır (Ismail et al., 2018).

Gerçek zamanlı hücre proliferasyon takibi deneyinde akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde KAN0438757'nin farklı dozlarında tedavileri yapıldı. Xcelligence testi

sonucunda KAN0438757'nin 50, 75 ve 100 μ M dozlarında hücre proliferasyonunu önemli oranda azalttığı elde edildi. Bhattacharya ve çalışma arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada PFKFB3'ün PFK158 inhibitörünün, MPM hücre hattı üzerinde hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiştir. PFK158'in zamana ve doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Mondal et al., 2019). PFKFB3'ün başka bir inhibitörü olan PFK15 ile yapılan bir çalışmada, PFK15'in pankreatik kanser hücrelerinde hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerindeki etkileri belirlemek için SRB ve CCK8 kitleri ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda PFK15'in pankreatik hücre hatlarında proliferasyonu önemli bir şekilde azalttığı ve hücre ölümünü uyardığı sonucuna ulaşıldığı bildirilmiştir (Richardson et al., 2019). H1299 hücre hattı üzerinde KAN0438757 inhibitörünün tedavi sonrası hücre proliferasyon deneyi sonucunda 48 saatlik farklı KAN0438757 dozlarının kullanıldığı tedavide hücre proliferasyonunu doza bağımlı bir şekilde azaldığı belirlendi. Oliveira ve arkadaşlarının kolon kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada, KAN0438757'nin farklı konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu baskıladığı, poliferatif kapasitesini koruduğu, 50 ve 75 μ M dozlarında ise hücre proliferasyonunu önemli ölçüde ortadan kaldırdığı sonucuna varılmıştır (De Oliveira et al., 2021). Horvathova ve takımının çalışmalarında ise KAN0438757 molekülünden farklı olarak PFKFB3'ün başka bir inhibitörü PFK15 kullanılmış. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde, PFK15'in hem kanserde hem de aktive edilmiş endotel hücrelerinde proliferasyonu azalttığı sonucuna ulaşıldığı rapor edilmiştir (Murár et al., 2018). A549 hücre hattında KAN0438757 ile resveratrol molekülünün kombinasyon tedavisi yapıldı. KAN0438757'nin farklı dozları ile resveratrolün 50 μ M dozunun kullanılması sonucunda, KAN0438757'nin en düşük dozu 3 μ M ile resveratrolün 50 μ M dozunun kombinasyonu, kontrol grubuna çok yakın bir değer aralığında olduğu görüldü. KAN0438757'nin en yüksek dozu 40 μ M ile resveratrolün 50 μ M dozunun kombine tedavisinin kontrole ve diğer dozlara oranla dramatik bir biçimde azaldığı belirlendi. Bu sonuçların ışığında kombinatif tedavinin bireysel etkilerden daha fazla hücre proliferasyonunu engellediği sonucuna ulaşıldı. Murar ve arkadaşları, 3PO ve Sunitinib (SU) kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Ancak en yüksek ve en düşük konsantrasyonlarda SU ve 3PO'nın kombine taranması, tek başına SU veya 3PO ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde azaltmadığı görülmüştür. Tek başına uygulanan glikoliz inhibitörü 3PO, kontrole kıyasla doza bağımlı olarak HUVEC hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Murár et al., 2018). KAN0438757 inhibitörü ile tedavi edilen A549 akciğer kanseri hücre hattında

hücre ölümünü belirlemek için tedavi sonrası hücreler AO/EBr ile boyandı. Deney sonucunda KAN0438757'nin 10 ve 25 μM dozlarında erken apoptozun başladığını 50 μM dozunda hücre canlılığını yitirdiğini ve doza bağlı bir şekilde hücre ölümünün gerçekleştiği belirlendi. Bhattacharya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise apoptoz belirteci olarak Anneksin V ve PI kullanılarak 24 saatlik farklı hücre hatlarında PFKFB3'ün bir başka inhibitörü PFK158 ile tedavi ettiklerinde, hücrelerde erken apoptozun yaklaşık olarak %20, çok düşük nekrotik hücrelerin %2 olduğu ve %35 geç apoptozun meydana geldiği gözlemlenmiştir (Bhattacharya et al., 2019). Yakın tarihli bir diğer çalışmada ise 3PO'nun melanom hücrelerinde tedavi edildiği ve hücreleri nekroza uğrattığı sonucu elde edilmiştir (Kotowski et al., 2020). Akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde KAN0438757 ve resveratrolün kombinasyon tedavileri sonucunda hücre ölümü belirlendi. 48 saatlik tedavi sonrası hücreler AO-EBr boyaları ile boyandı ve resveratrolün tek başına 50 μM dozunda erken apoptozun başladığı, diğer yandan KAN0438757'nin tek başına 20 μM dozunda kontrole kıyasla erken apoptoz sürecinde olduğu belirlendi. Kombinasyon tedavisinin ise hem kontrole hem de tekli tedavilere kıyasla hücrelerin apoptozun geç evresinde oldukları belirlendi.

Güncel olarak kullanılan kemoterapi ajanı sisplatin ve PFK15 inhibitörünün kullanıldığı bir çalışmada Hela, A549 ve HCT116 hücreleri tek başına PFK15'in apoptozu önemli ölçüde etkilemediği ancak sisplatin tarafından indüklenen apoptozu önemli ölçüde arttırdığı sonucu bulunmuştur. Aynı zamanda PFKFB3'ün CRISPR/Cas9 ile knockout edildiği hücrelerde sisplatin ile tedavi edilen Hela hücrelerinde glikoliz aktivasyonunu bloke ettiği bildirilmiştir (F. Li et al., 2018). Çalışmamızdaki bir başka sonuç da KAN0438757'nin A549 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesidir. A549 hücre hattı üzerinde belirli dozlarda KAN0438757 molekülü kullanılarak tedavi edildi. KAN0438757'nin 25 ve 50 μM dozlarında ve doza bağlı bir şekilde mitokondri membran potansiyellerini kaybettikleri sonucuna varıldı. Bir başka çalışmada PFK15'in lenfoma hücrelerindeki tedavi sonrası mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak mitokondri membran potansiyelinin doza bağlı bir şekilde bozulduğu ve hücrelerin geri dönüşü olmayan bir apoptoz sürecine girdikleri belirlenmiştir (Zhao et al., 2020). A549 hücre hattı üzerinde resveratrol ve KAN0438757'nin 48 saatlik kombine tedavisi sonrası JC-1 boyaması yapıldı ve görüntüler incelendi. Resvertrolün tek başına 50 μM dozunda hücrelerin pek etkilenmediği,

KAN0438757'nin tekli tedavisinde ise kontrole ve resveratrole kıyasla hücrelerin mitokondri membran potansiyelinin bozulduğu tespit edildi. Resveratrol ve KAN0438757'nin kombinasyon grubunda ise tekli tedavilere ve kontrol grubuna kıyasla hücrelerin membran potansiyelinin bozulduğu ve tamamının öldüğü gözlemlendi. A549 hücre hattında resveratrolün 50 μ M dozu ve KAN0438757'nin 20 μ M dozlarının kombinatif tedavileri ile hücre göçü üzerine etkileri incelendi. Kontrol grubunda sıfırıncı saatte hücreler arası alanın açık olduğu zaman ilerledikçe bu alanın kapandığı gözlemlendi. Tekli tedavilerde, kontrole göre daha az ancak kombinasyona göre daha fazla kapanma meydana geldi. Kombinasyon tedavisinde ise sıfırıncı saatte, kontrol ve tekli tedavilerle aynı hücreler arası alanın olduğu fakat zamana bağlı olarak en son 48 saatte kontrole kıyasla kombinasyon tedavisindeki alanın kapanmadığı, kendi sıfırıncı saatine oranla ise az da olsa kapanmanın gerçekleştiği belirlendi. Bu veriler ışığında kombinasyon tedavisinin, hücrelerin göç etme kabiliyetini kısıtladığı sonucuna varılmıştır.

Jiang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, resveratrol ve sülforafan (SFN) kombinasyonunun U251 glioma hücre hattı üzerindeki hücre göçü deneyi uygulanmıştır. Yalnızca resveratrol ve SFN işleminden sonra boşluk mesafesi hücre göçünün kısmi inhibisyonunu gösterirken, kombinasyon tedavisinden sonra aynı saatte boşluk mesafesi kontrol edildiğinde hücre göçünün neredeyse tamamının inhibe edildiği sonucuna ulaşılmıştır (Jiang et al., 2010). Bu sonuçlar doğrultusunda bizim çalışmamızda da olduğu gibi, kullanılan ajan ve inhibitörler tek başlarına hücre göçünü kısmen engellerken, kombinasyon halindeki durumlarda hücre göçü üzerinde ilave bir önleyici etkiye sahip oldukları görülmektedir. Proapoptotik BAX proteininin akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde resveratrol ve KAN0438757 moleküllerinin tekli ve kombinasyon tedavileri sonucunda ekspresyon düzeyleri belirlendi. Resveratrolün tekli tedavisinin kontrole oranla artış gösterdiği kombinasyon grubunda ise resveratrole oranla az olsa da kontrol dozuna göre önemli derecede arttığı belirlendi. Bir diğer western blot sonucunda yine A549 hücre hattında resveratrol ve KAN0438757 molekülleri ile tedavilerin ardından p62 ve Beclin-1 otofaji biyobelirteçlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi. p62'de resveratrolün tekli tedavisinin kontrol ile kıyaslandığında bir miktar artışın olduğu, KAN0438757'nin tekli kullanımında etkinin olmadığı fakat kombinasyon tedavisinde kontrole oranla anlamlı bir etkinin olduğu sonucu elde edildi. Beclin-1 sonuçları incelendiğinde resveratrolün tekli dozunun kontrole kıyasla arttığı, kombinasyon grubunun ise KAN0438757'ye ve kontrole

oranla az da olsa bir artışın olduğu belirlendi. Ancak Zhu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada PFKFKB3 inhibitörü olan PFK15'in mide kanseri hücre hatlarında apoptoz ve hücre döngüsüne etkileri bakılmış. Yapılan western blot deneyinde PFK15 ile tedavi edilen mide kanseri hücrelerinin Bax ekspresyonu incelenmiş ve sonucunda apoptozu teşvik eden Bax proteininin ekspresyon seviyesinde doza bağımlı bir şekilde azalmanın olduğu sonucuna varılmıştır (W. Zhu et al., 2016). HCT-116 kolon kanseri hücre hattında PFKFB3 inhibitörü 3PO ile farklı konsantrasyonlardaki tedavi sonrasında p62 proteininin ekspresyon düzeyine bakılmış. P62 protein ekspresyonunun otofajiye uyardığı sonucu elde edilmiştir (Chesney et al., 2014). Bu sonuçlar doğrultusunda, A549 hücre hattı üzerinde yapılan resveratrol ve KAN0438757'nin kombinasyon tedavisinin Bax, p62 ve Beclin-1'in protein ekspresyonları üzerindeki etki incelendiğinde, proapoptotik Bax ekspresyonundaki artışın hücreleri programlı hücre ölüm yolağı apoptozu yönlendirdiği ve bu nedenle istenilen sonuca ulaşıldığı gözlemlendi. Diğer yandan p62 ve Beclin-1 otofaji biyobelirteçlerinin de Bax'ın protein ekspresyonuna göre daha az olduğu fakat ekspresyon düzeylerinin kayda değer bir sonuç ile otofajiye yöneldikleri sonucu belirlendi. Buradan da anlaşılacağı üzere resveratrol ve KAN0438757 kombinasyonunun A549 hücre hattında programlı hücre ölüm yolları ile ölüme sürüklendiği gözlemlendi.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak resveratrol ve KAN0438757 kombinasyonunun akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre ölümü, hücre göçü ve programlı hücre ölümü üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu belirlendi. A549 ve H1299 hücre hatlarında kombinasyon tedavisinin sonucunda hücre canlılığını büyük ölçüde azalttığı, bununla birlikte hücre proliferasyonunu önemli ölçüde engellediği çalışmamız ile ortaya konulmuştur. Aynı zamanda A549 akciğer kanseri hücrelerinin kombinasyon tedavisi ile migrasyon yeteneğini kayda değer bir şekilde baskılamıştır. Otofajinin önemli belirteçleri Beclin-1 ve p62 protein ekspresyon miktarlarının kombinatif tedavi ile arttığı KAN0438757 ve resveratrolün otofaji üzerindeki etkisini göstermektedir. Ayrıca proapoptotik sinyal yolağı Bax'ın protein seviyesinin de önemli miktarda arttığını ve apoptozu tetiklediğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında, akciğer kanseri tedavisinde KAN0438757 ve resveratrol kombinasyonunun önemli derecede etkili olduğu aynı zamanda ileride yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir

KAYNAKLAR

Akat F, Tez S, Anab MYA, Dan D (2020) Resveratrolün Akciğer Kanseri Hücre Hattında Isı Şok Proteini-90 ve Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeylerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, s. 15-86

Akhtar N, Bansal JG (2017) Risk Factors of Lung Cancer İn Nonsmoker. Current Problems İn Cancer 41(5): 328–339

Aronchick BJM (1990) Lung Cancer: Epidemiology, s. 5–11

Aslantürk ÖS (2018) In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, And Disadvantages. Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, p. 1–18

Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Takeuchi, J, Bando H, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T (2005) Regulation 54(7): 3349–3357

Avdatek F, Birdane YO, Türkmen R, Demirel HH (2018) Ameliorative Effect Of Resveratrol On Testicular Oxidative Stress, Spermatological Parameters And DNA Damage İn Glyphosate- Based Herbicide-Exposed Rats. Andrologia 50(7): 1–8

Aydın S, Şahin TT, Bacanlı M, Taner G, Başaran AA, Aydın M, Başaran N (2016) Resveratrol Protects Sepsis-İnduced Oxidative DNA Damage İn Liver and Kidney of Rats. Balkan Medical Journal 33(6): 594–601

Aykut ÖH (2019) Farklı Koşullarda Muhafaza Edilen Sperm Örneklerinde Sıcaklık Ve Seminal Plazmanın Rolü, s. 1-30

Barayan R, Ran X, Lok BH (2020) PARP İnhibitors For Small Cell Lung Cancer And Their Potential For İntegration İnto Current Treatment Approaches. Journal Of Thoracic Disease 12(10): 6240–6252

Bartrons R, & Caro J (2007) Hypoxia, Glucose Metabolism and The Warburg's Effect. Journal Of Bioenergetics and Biomembranes 39(3): 223–229

Bartrons R, Rodríguez-García A, Simon-Molas H, Castaño E, Manzano A, Navarro-Sabaté, À (2018) The Potential Utility of PFKFB3 As A Therapeutic Target. Expert Opinion on Therapeutic Targets 22(8): 659–674

Bensing SJ, Christofk HR, (2012) New Aspects of The Warburg Effect İn Cancer Cell Biology. Seminars İn Cell and Developmental Biology 23(4): 352–361

Bhattacharya SS, Thirusangu P, Jin L, Roy D, Jung D, Staub J, Roy B, Molina JR, Shridhar V (2019) PFKFB3 Inhibition Reprograms Malignant Pleural Mesothelioma To Nutrient Stress- Induced Macropinocytosis And ER Stress As Independent Binary Adaptive Responses. *Cell Death and Disease* 725(10): 1-17

Bola C, Bartlett H, Eperjesi F (2014) Resveratrol And The Eye: Activity And Molecular Mechanisms. *Graefe's Archive For Clinical And Experimental Ophthalmology* 252(5): 699 – 713

Breuss JM, Atanasov AG, Uhrin P (2019) Resveratrol And Its Effects On The Vascular System. *International Journal Of Molecular Sciences* 20(7): 1–18

Brooke DG, Van Dam EM, Watts CKW, Khoury A, Dziadek MA, Brooks H, Graham LJK, Flanagan JU, Denny WA (2014) Targeting The Warburg Effect In Cancer; Relationships For 2- Arylpyridazinones As Inhibitors Of The Key Glycolytic Enzyme 6-Phosphofructo-2- Kinase/2,6-Bisphosphatase 3 (PFKFB3). *Bioorganic And Medicinal Chemistry* 22(3): 1029–1039

Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A, Goveia J, Kalucka J (2016) Normalization , Impairs Metastasis And Improves. *Cancer Cell* 30(6): 968–985

Cao Y, Zhang X, Wang L, Yang Q, Ma Q, Xu J, Wang J, Kovacs L, Ayon RJ, Liu Z, Zhang M, Zhou Y, Zeng X, Xu Y, Wang Y, Fulton DJ, Weintraub NL, Lucas R., Dong Z, Huo Y (2019) PFKFB3-Mediated Endothelial Glycolysis Promotes Pulmonary Hypertension. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 116(27): 13394–13403

Carter LG, Carter LG, Orazio JAD, & Pearson KJ (2003) Resveratrol And Cancer : Focus On In Vivo Evidence, p. 1-20

Celepli S, Bigat İ, Celepli P, Karagin PH (2020) Apoptoz Ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji* 3(1): 103–111

Cella DF, Patel JD (2008) Improving Health-Related Quality Of Life In Non-Small-Cell Lung Cancer With Current Treatment Options. *Clinical Lung Cancer* 9(4): 206–212

Characteristics M, Adrenocortical M (1985) Of Tumors, s. 766–773

Chen L, Yu K, Chen L, Zheng X, Huang N, Lin Y, Jia H, Liao W, Cao J, Zhou T (2021) Synergistic Activity And Biofilm Formation Effect Of Colistin Combined With Pfk-158 Against Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Infection And Drug Resistance* 14(3): 2143–2154

Chesney J, Clark J, Klarer AC, Imbert-Fernandez Y, Lane AN, & Telang S (2014) Fructose- 2,6-Bisphosphate Synthesis By 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase 4 (PFKFB4) Is Required For The Glycolytic Response To Hypoxia And Tumor Growth. *Oncotarget* 5(16): 6670–6686

Chowdhury N, Vhora I, Patel K, Doddapaneni R, Mondal A, Singh M (2017) Liposomes Co- Loaded With 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2, 6-Biphosphatase 3 (PFKFB3) Shrna Plasmid And Docetaxel For The Treatment Of Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceutical Research* 34(11): 2371–2384

Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rasku MA, Arumugam S, Dean WL, Eaton J, Lane A, Trent JO, Chesney J (2008) Small-Molecule İnhibition Of 6-Phosphofructo-2-Kinase Activity Suppresses Glycolytic Flux And Tumor Growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(1): 110–120

Clément-Duchêne C, Vignaud J, Stoufflet A, Bertrand O, Gislard A, Thiberville L, Grosdidier G, Martinet Y, Benichou J, Hainaut P, Paris C (2010) Lung Cancer Characteristics Of Never Smoker Lung Cancer Including Environmental And Occupational Risk Factors 67(6): 144–150 Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE (2007) Lung Cancer: Diagnosis And Management 75(1): 56-63

Cooper WA, Lam DCL, O'Toole SA, Minna JD (2013) Molecular Biology Of Lung Cancer. *Journal Of Thoracic Disease* 5(5): 73-92

Coşkun G, & Özgür H (2011) Apoptoz Ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *ARŞİV* 20(3):145–158

Cycle TC (2001) S Tem C Ells, s. 88–91

De Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF (2018) The Epidemiology Of Lung Cancer. *Translational Lung Cancer Research* 7(3): 220–233

De Oliveira, T, Goldhardt T, Edelmann M, Rogge T, Rauch K, Kyuchukov ND, Menck K, Bleckman A, Kalucka J, Khan S, Gaedcke J, Haubrock M, Beissbarth T, Bohnenberger H, Planque M, Fendt SM, Ackermann L, Ghadimi M, & Conradi LC (2021) Effects Of The Novel Pfkfb3 İnhibitor Kan0438757 On Colorectal Cancer Cells And İts Systemic Toxicity Evaluation İn Vivo. *Cancers* 13(5): 1–24

Dela Cruz CS, Tanoue LT, & Matthay RA (2011) Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, And Prevention. *Clinics İn Chest Medicine* 32(4): 605–644

Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, Latruffe N (2011) Transport, Stability, And Biological Activity Of Resveratrol. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1215(1): 48–59

Dem H, & Tez S (2017) Olea Europaea (Zeytin) Yaprığı Fenolik Bileşeni Oleuropein ' İn Temozolomid İle Birlikte Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Glioblastoma Olea Europaea (Zeytin) Yaprığı Fenolik Bileşeni Oleuropein ' İn Temozolomid İle Birlikte. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, s. 36-70

Dermatoloji Dergisi G, Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, D, Ve Zührevi Hastalıklar Kliniği Yazışma Adresi, D, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Ve

Araştırma Hastanesi, A, Ve Zührevi Hastalıklar Kliniği D, Canpolat F (2016) GDD Hücre Siklusu Ve Apoptoz Cell Cycle And Apoptosis. Güncel Derlemeler Ağustos, s. 11–17

Dong Z (2003) Molecular Mechanism Of The Chemopreventive Effect Of Resveratrol. Mutation Research - Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis 524(5): 145– 150

El-Garawani IM, & Hassab El Nabi SE (2016) Increased Sensitivity Of Apoptosis Detection Using Direct Staining Method And İntegration Of Acridine Orange As An Alternative Safer Fluorescent Dye İn Agarose Gel Electrophoresis And Micronucleus Test. Canadian Journal Of Pure And Applied Sciences 10(2): 3865–3871

Emini Veseli B, Perrotta P, Van Wielendaele P, Lambeir AM, Abdali A, Bellosta S, Monaco G, Bultynck G, Martinet W, De Meyer GRY (2020) Small Molecule 3PO İnhibits Glycolysis But Does Not Bind To 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase-3 (PFKFB3). FEBS Letters 594(18): 3067–3075

Fan Y, Li J, Yang Y, Zhao X, Liu Y (2020) Resveratrol Modulates The Apoptosis And Autophagic Death Of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Via A P53 - Dependent Pathway : Integrated Bioinformatics Analysis And Experimental Validation, s. 929–938

Fiod Riccio BV, Fonseca-Santos B, Colerato Ferrari P, Chorilli M (2020) Characteristics, Biological Properties And Analytical Methods Of Trans-Resveratrol: A Review. Critical Reviews İn Analytical Chemistry 50(4): 339–358

Fong KM, Sekido Y, Minna JD (1999) Basic Science Review Molecular Pathogenesis Of Lung Cancer. The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery 118(6): 1136–1152

Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas- Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C (2015) Properties Of Resveratrol: In Vitro And In Vivo Studies About Metabolism, Bioavailability, And Biological Effects İn Animal Models And Humans. Oxidative Medicine And Cellular Longevity s.1-14

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA (2005) Targeting Apoptosis Pathways İn Cancer Therapy. CA: A Cancer Journal For Clinicians 55(3): 178–194

Gökhan A, Kılıç K, Gülle K, Uyanıkgil Y, Çavuşoğlu T (2022) Apoptotik Yolaklar Ve Hedefe Yönelik Tedaviler. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 27(4): 565–573

Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V (2017) Research Techniques Made Simple: Analysis Of Collective Cell Migration Using The Wound Healing Assay. Journal Of Investigative Dermatology 137(2): 11–16

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): 15-68

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks Of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5): 646–674

<https://www.drozdogan.com/dunya-kanser-istatistikleri-2020-her-5-kisiden-biri-kanserle-karsilasiyor/> (Erişim Tarihi: 15.12.2021)

<https://www.drozdogan.com/meme-kanserinin-tedavi-sonrasi-tekrarlamasi-yag-metabolizmasiyla-iliskilendirildi/> (Erişim Tarihi:10.12.2021)

Investigations C (2002) Pattern Of Lung Cancer İn Turkey , 1994 – 1998 s. 207–210

Ismail N, Abdel Y, Ali A, Ahmed E, El-Maraghy NN (2018) Future Journal Of Pharmaceutical Sciences Novel Combination Of Thymoquinone And Resveratrol Enhances Anticancer Effect On Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Future Journal Of Pharmaceutical Sciences* 4(1): 41– 46

Jardim FR, De Rossi FT, Nascimento MX, Da Silva Barros RG, Borges PA, Prescilio IC, De Oliveira MR (2018) Resveratrol And Brain Mitochondria: A Review. *Molecular Neurobiology* 55(3): 2085–2101

Jiang H, Shang ÆX, Wu ÆH, Huang ÆG, Wang Y, Subhash ÆSAÆ, Akt AÁCÁ (2010) Combination Treatment With Resveratrol And Sulforaphane Induces Apoptosis İn Human U251 Glioma Cells, p. 152–161

Johnson DG, Walker CL (1999) Cyclins And Cell Cycle Checkpoints. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology* 39(1): 295–312

Jones PA, Baylin SB (2007) Review The Epigenomics Of Cancer, p. 683–692

Jonkman JEN, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, Colarusso P (2014) An İntroduction To The Wound Healing Assay Using Live-Cell Microscopy. *Cell Adhesion And Migration* 8(5): 440–451

Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA (2011) The Xcelligence System For Real-Time And Label- Free Monitoring Of Cell Viability. *Methods İn Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 740(2): 33–43

Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, Bishayee A, Ahn KS (2017) The Role Of Resveratrol İn Cancer Therapy. *International Journal Of Molecular Sciences* 18(12): 1–36

Kong F, Zhang R, Zhao X, Zheng G, Wang Z, Wang P (2017) Resveratrol Raises İn Vitro Anticancer Effects Of Paclitaxel İn NSCLC Cell Line A549 Through CO X-2 Expression. *Korean Journal Of Physiology And Pharmacology* 21(5): 465–474

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- İn A375 Human Melanoma Cells. 2625(3): 2613–2625

- Kulkarni SS, Cantó C (2015) Biochimica Et Biophysica Acta The Molecular Targets Of Resveratrol. BBA - Molecular Basis Of Disease 1852(6): 1114–1123
- Kusuzaki K, Murata H, Matsubara T, Satonaka H, Wakabayashi T, Matsumine A, Uchida A (2007) Acridine Orange Could Be An Innovative Anticancer Agent Under Photon Energy. In Vivo 21(2): 205–214
- Li F, Liu J, Bao R, Yan G, Feng X, Xu Y, Sun Y, Yan W, Ling Z, Xiong Y, Guan K, Yuan H (2018) Acetylation Accumulates PFKFB3 In Cytoplasm To Promote Glycolysis And Protects Cells From Cisplatin-Induced Apoptosis. Nature Communications 508(1): 1-17
- Li HM, Yang JG, Liu ZJ, Wang WM, Yu ZL, Ren JG, Chen G, Zhang W, Jia J (2017) Blockage Of Glycolysis By Targeting PFKFB3 Suppresses Tumor Growth And Metastasis In Head And Neck Squamous Cell Carcinoma. Journal Of Experimental And Clinical Cancer Research 36(1): 1–12
- 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): 123–134
- Liu X, Zhao Y, Zhang E, Yan H, Lv N, Cai Z (2019) The Synergistic Effect Of PFK15 With Metformin Exerts Anti-Myeloma Activity Via PFKFB3. Biochemical And Biophysical Research Communications 515(2): 332–338
- 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, Telang S, Chesney J, Imbert-Fernandez Y (2019) Increased 6-Phosphofructo-2- Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase-3 Activity In Response To EGFR Signaling Contributes To Non-Small Cell Lung Cancer Cell Survival. Journal Of Biological Chemistry 294(27): 10530–10543
- Ma L, Li W, Wang R, Nan Y (2015) Resveratrol Enhanced Anticancer Effects Of Cisplatin On Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines By Inducing Mitochondrial Dysfunction And Cell Apoptosis 47(1): 1460–1468
- Macphee DJ (2010) Methodological Considerations For Improving Western Blot Analysis. Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods 61(2): 171–177
- Mahmood T, Yang PC (2012) Western Blot: Technique, Theory, And Trouble Shooting. North American Journal Of Medical Sciences 4(9): 429–434
- Malaguarnera L (2019) Influence Of Resveratrol On The Immune Response. Nutrients 11(5): 1 24
- Martinotti S, Ranzato E (2020) Scratch Wound Healing Assay. Methods In Molecular Biology 2109(1): 225–229

Matsumoto K, Noda T, Kobayashi S, Sakano Y, Yokota Y, Iwagami Y, Yamada D, Tomimaru Y, Akita H, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Eguchi H (2021) Inhibition Of Glycolytic Activator PFKFB3 Suppresses Tumor Growth And Induces Tumor Vessel Normalization In Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Letters* 500(45): 29–40

Metintas S, Metintas M, Ak G, Kalyoncu C (2012) Environmental Asbestos Exposure In Rural Turkey And Risk Of Lung Cancer 3123(1): 23-96

Minchenko O, Opentanova I, Caro J (2003) Hypoxic Regulation Of The 6-Phosphofructo-2- Kinase/Fructose-2,6- Bisphosphatase Gene Family (PFKFB-1-4) Expression In Vivo. *FEBS Letters* 554(3): 264–270

Minna JD, Roth JA, Gazdar AF (2002) Focus On Lung Cancer. 1(February) s. 49–52

Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, Sunagawa K (2008) SIRT1, A Longevity Gene, Downregulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression In Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology* 28(7): 1263–1269

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008) Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, And Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings* 83(5): 584–594

Mondal S, Roy D, Sarkar Bhattacharya S, Jin L, Jung D, Zhang S, Kalogera E, Staub J, Wang Y, Xuyang W, Khurana A, Chien J, Telang S, Chesney J, Tapolsky G, Petras D, Shridhar V (2019) Therapeutic Targeting Of PFKFB3 With A Novel Glycolytic Inhibitor PFK158 Promotes Lipophagy And Chemosensitivity In Gynecologic Cancers. *International Journal Of Cancer* 144(1): 178–189

Murár M, Horvathová J, Moravčík R, Addová G, Zeman M, Boháč A (2018) Synthesis Of Glycolysis Inhibitor (E)- 3 -(Pyridin - 3 - Yl)- 1 -(Pyri Din - 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

Müsellim B (2007) Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi Ve Etyolojisi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Türkiye'de Sık Karşılaşılan Hastalıklar II, s. 113–118 Okabe S (2021) Therapeutic Targeting Of PFKFB3 And PFKFB4 In Multiple Myeloma Cells Under Hypoxic Conditions, s. 1–20

Olivares-Marin IK, González-Hernández JC, Madrigal-Perez LA (2019) Resveratrol Cytotoxicity Is Energy-Dependent. *Journal Of Food Biochemistry* 43(9): 1–10

Ozdemir A, Ark M (2014) Xcelligence Real Time Cell Analysis System: A New Method For Cell Proliferation And Cytotoxicity. *Niche Journal* 2(2): 15–17

Park H, Sholl LM, Hatabu H, Awad MM, Nishino M (2019) Imaging Of Precision Therapy For Lung Cancer: Current State Of The Art. *Radiology* 293(1): 15–29

- Pegoraro C, Maczkowiak F, Monsoro-Burq AH (2013) Gene Expression Patterns A Tissue- Specific And Dynamic Expression During *Xenopus Laevis* Development. *Gene Expression Patterns* 13(7): 203–211
- Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A (2012) JC-1: Alternative Excitation Wavelengths Facilitate Mitochondrial Membrane Potential Cytometry. *Cell Death And Disease* 3(11): 1–7
- Phelan K, May KM (2015) Basic Techniques In Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols In Cell Biology* (March) 1(1): 112-122
- Potter M, Newport E, Morten KJ (2016) The Warburg Effect: 80 Years On. *Biochemical Society Transactions* 44(5): 1499–1505
- Rafiemanesh H, Mehtarpour M, Khani F, Hesami SM, Shamlou R, Towhidi F, Salehiniya H, Makhsosi BR, Moini A (2016) Epidemiology, Incidence And Mortality Of Lung Cancer And Their Relationship With The Development Index In The World. *Journal Of Thoracic Disease* 8(6): 1094–1102
- Richardson DA, Sultan A, Sritangos P, James A, Bruce JIE (2019) Metabolic Regulation Of Calcium Pumps In Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Role Of Phosphofructokinase-Fructose- Bisphosphatase-3 (PFKFB3). *Pancreatology* 19(1): 70-79
- Risch A, Plass C (2008) Lung Cancer Epigenetics And Genetics. *International Journal Of Cancer* 123(1): 1–7
- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL (2005) Wound-Healing Assay. *Methods In Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 294(1): 23–29
- Sandell L, Sakai D (2011) *Mammalian Cell Culture* (Issue July), p. 25-75
- Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML (2007) The Molecular Epidemiology Of Lung Cancer. *Carcinogenesis* 28(3): 507–518
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD (1998) Progress In Understanding The Molecular Pathogenesis Of Human Lung Cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta - Reviews On Cancer* 1378(1): 12-83
- Shi L, Pan H, Liu Z, Xie J, Han W (2017) Roles Of PFKFB3 In Cancer. *Signal Transduction And Targeted Therapy* 2(1): 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):1-18
- Shukla Y, Singh R (2011) Resveratrol And Cellular Mechanisms Of Cancer Prevention. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1215(1): 1–8

Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer Statistics, p.15-74

Singh SK, Banerjee S, Acosta EP, Lillard JW, Singh R (2017) Resveratrol Induces Cell Cycle Arrest And Apoptosis With Docetaxel In Prostate Cancer Cells Via A P53/P21waf1/CIP1 And P27kip1 Pathway. *Oncotarget* 8(10): 17216–17228

Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L (2019) Analysis Of The Mitochondrial Membrane Potential Using The Cationic JC-1 Dye As A Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protocol* 9(1): 1–13

Subramanian M, Soundar S, Mangoli S (2016) DNA Damage Is A Late Event In Resveratrol- Mediated Inhibition Of Escherichia Coli. *Free Radical Research* 50(7): 708–719

Takashina M, Inoue S, Tomihara K, Tomita K, Hattori K, Zhao QL, Suzuki T, Noguchi M, Ohashi W, Hattori Y (2017) Different Effect Of Resveratrol To Induction Of Apoptosis Depending On The Type Of Human Cancer Cells. *International Journal Of Oncology* 50(3): 787–797

Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M (2013) A Defined Methodology For Reliable Quantification Of Western Blot Data. *Molecular Biotechnology* 55(3): 217–226

Tokur O, Aksoy A (2017) In Vitro Sitotoksiste Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 6(1): 112–118

Travis WD (2002) Pathology Of Lung Cancer 23(1): 1-23

Travis WD (2011) Pathology Of Lung Cancer. *Clinics In Chest Medicine* 32(4): 669–692

Varoni EM, Lo Faro AF, Sharifi-Rad J, Iriti M (2016) Anticancer Molecular Mechanisms Of Resveratrol. *Frontiers In Nutrition* 3(1): 24-68

Von Bertalanffy L (1963) Acridine Orange Fluorescence In Cell Physiology, Cytochemistry And Medicine. *Protoplasma* 57(1–4): 51–83

Walle T (2011) Bioavailability Of Resveratrol 1215(22): 9–15

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(5) 359–367

Wang M, Jiang S, Yu F, Zhou L, & Wang K (2019) Noncoding Rnas As Molecular Targets Of Resveratrol Underlying Its Anticancer Effects. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 67(17): 4709–4719

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(9): 112- 612

Wik JA, Lundbäck P, Poulsen LLC, Haraldsen G, Skallehegg BS, Hol J (2020) 3PO Inhibits Inflammatory Nfkb And Stressactivated Kinase Signaling In Primary Human Endothelial Cells Independently Of Its Target PFKFB3. *Plos ONE* 15(3): 1–18

Wistuba II, Gazdar AF (2006) Lung Cancer Preneoplasia, p. 28-96

Wu H, Chen L, Zhu F, Han X, Sun L, Chen K (2019) The Cytotoxicity Effect Of Resveratrol: Cell Cycle Arrest And Induced Apoptosis Of Breast Cancer 4T1 Cells. *Toxins* 11(12): 1–20

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

Yang L, Qin X, Liu H (2019) Design , Synthesis And Biological Evaluation Of A Series Of New Resveratrol Analogues As Potential Anti-Cancer Agents, s. 36-75

Yin LM, Wei Y, Wang Y, Xu YD, Yang YQ (2012) Long Term And Standard Incubations Of WST-1 Reagent Reflect The Same Inhibitory Trend Of Cell Viability In Rat Airway Smooth Muscle Cells. *International Journal Of Medical Sciences* 10(1): 68–72

Yu L, Sun ZJ, Wu SL, Pan CE (2003) Effect Of Resveratrol On Cell Cycle Proteins In Murine Transplantable Liver Cancer. *World Journal Of Gastroenterology* 9(10): 2341–2343

Zappa C, Mousa SA (2016) Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment And Future Advances. *Translational Lung Cancer Research* 5(3): 288–300

Zhang R, Li R, Liu Y, Li L, Tang Y (2019) The Glycolytic Enzyme PFKFB3 Controls TNF- A -Induced Endothelial Proinflammatory Responses 42(1): 146–155

Zhao Q, Li J, Wu B, Shang Y, Huang X, Dong H, Liu H, Chen W, Gui R, Nie X (2020) Smart Biomimetic Nanocomposites Mediate Mitochondrial Outcome Through Aerobic Glycolysis Reprogramming : A Promising Treatment For Lymphoma, s. 42-112

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

Zhu Y, Lu L, Qiao C, Shan Y, Li H, Qian S, Hong M, Zhao H, Li J, Yang Z, Chen Y (2018) Targeting PFKFB3 Sensitizes Chronic Myelogenous Leukemia Cells To Tyrosine Kinase Inhibitor. *Oncogene* 37(21): 2837–2849

Zimmermann KC, Green DR (2001) How Cells Die: Apoptosis Pathways. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 108(4): 0–4