

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**METFORMİNİN MDA-MB-231 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDEKİ APOPTOZ VE OTOFAJİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Gülşah SONALP

1900000483

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Özge Rencüzoğulları

Haziran, 2022

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**METFORMİNİN MDA-MB-231 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDEKİ APOPTOZ VE OTOFAJİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Gülşah SONALP

1900000483

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Dr. Öğretim Üyesi Zeynep Büşra BOLAT (İstanbul Sabahattin Zaim Üniv.)

Haziran, 2022

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım tez dönemimin farklı aşamalarında desteklerini benden hiç esirgemeyen, birlikte çalışma imkanı sunan saygıdeğer tez danışmanlarım Dr. Öğretim Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI, Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA, Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Araş. Gör.Drn Pelin Özfiliz'e ve Araş. Gör.Dr. Burcu Ayhan Şahin'e ve Araş. Gör. Tamer Gümüş'e laboratuvar çalışma sürem boyunca gösterdikleri destek için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve hayatım boyunca aldığım bütün kararlarda arkamda olan kıymetli annem Gülşen Sonalp, babam Musa Sonalp ve kardeşlerim Ayşegül Sonalp ve Emir Sonalp'e bugüne gelmemde harcadıkları emekler için teşekkür ederim.

Her zaman en iyi motivasyon kaynağım olan desteklerini benden hiç esirgemeyen sevgili kuzenlerim Aslıhan Demirelli, Esra Sonalp'e ve biricik arkadaşlarım Melisa Zara, Ceren Özkan Işık'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında ikinci bir göz olan, aynı ortamı paylaşmaktan mutluluk duyduğum, desteğini her zaman hissettiren, bilgi ve tecrübelerinden her zaman istifade ettiğim çok kıymetli Dr. Leila Mehdizadehtapeh'e ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Esra Eşiyok'a teşekkür ederim.

Haziran, 2022

Zeynep Gülşah SONALP

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	vi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 KANSER	3
2.1.1 Meme Kanseri	4
2.1.1.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.1.1.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri	5
2.1.1.3 Meme Kanseri Moleküler Mekanizması	6
2.1.1.4 Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri	7
2.1.1.4.1. Cerrahi Müdahale	8
2.1.1.4.2. Kemoterapi	8
2.1.1.4.3. Hormonal Tedavi	9
2.1.1.4.4. Radyoterapi	10
2.2. METFORMİN	10
2.2.1. Metformin'in Anti-Kanser Etkisi	11
2.2.1.1. AMPK'ya Bağımlı Anti-Kanser Etkisi	11

2.1.1.2. AMPK'dan Bağımsız Anti-Kanser Etkisi.....	12
2.3 APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ	13
2.3.1 Kaspazlar.....	14
2.3.2 Bcl-2 Ailesi	16
2.3.3 İçsel Apoptoz Yolağı	16
2.3.4. Reseptör Aracılı Apoptoz Yolağı.....	17
2.4 OTOFAJİ	17
2.4.1 Makrotofaji.....	18
2.4.2 Mikrotofaji	20
2.4.3 Şaperon Aracılı Otofaji	20
2.5 5'-ADENOSİN MONOFOSFAT İLE AKTİVE EDİLMİŞ PROTEİN KİNAZ (AMPK) SİNYAL YOLAĞI	20
2.6 PI3K/AKT/mTOR SİNYAL YOLAĞI.....	22
2.7 Hippo Sinyal Yolağı.....	24
3.1 MATERYALLER.....	26
3.2 YÖNTEMLER	26
3.2.2 Kullanılan Hücre Hattı ve Özellikleri	26
3.2.3 Hücre Kültürü.....	26
3.2.4 Hücre Dondurma	27
3.2.5 MTT Hücre Canlılık Testi.....	27
3.2.6 Koloni Oluşum Deneyi	28
3.2.7 Tripan Mavisi ile Hücre Sağkalımının Belirlenmesi	28
3.2.8 Floresan Boyama.....	28
3.2.8.1 DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) Boyaması.....	28
3.2.8.2 DİOC6 (3',3-Diheksiloksakarbosiyaamin İyodür) Boyaması	29

3.2.8.3 PI Boyaması	29
3.2.9 Total protein İzolasyonu	29
3.2.10 Bradford Analizi.....	30
3.2.11 İmmunoblotlama	30
3.2.11.1 Proteinlerin hazırlanması ve SDS-PAGE’de Yürütülmesi	30
3.2.11.2 Membran Transfer ve Bloklama	30
3.2.11.3 Primer ve Sekonder Antikor İşaretleme ve Bantların Görüntülenmesi	30
3.2.12 İstatistiksel Analiz.....	31
4. SONUÇLAR	32
4.1 Metformin doza bağımlı olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre canlılığını azaltmıştır.....	32
4.2 Zamana ve Doza Bağlı Metformin Uygulamasının MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Mitokondri Membran Potansiyeline Etkisinin Gösterilmesi	32
4.3 Zamana bağlı Metformin uygulaması MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin apoptotik hücre ölümünü arttırmıştır	36
4.4 Zamana bağlı metformin uygulaması ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde otofaji mekanizmasına etkisi.....	39
4.5 Metformin Hippo sinyal yolunun aktivasyonu ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu baskılamıştır	42
5 TARTIŞMA	45
6 KAYNAKÇA.....	51
7 EKLER.....	65
7.1 EK A HÜCRE KÜLTÜRÜ	65
7.2 EK B KULLANILAN CİHAZLAR	66
7.3 EK C KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	67

7.3 EK D KULLANILAN ANTİKORLAR.....	68
7.4 KULLANILAN ÇÖZELTİLER	69
7.4.1 Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı.....	69
7.4.2 Bradford Çözeltisinin Hazırlanışı	69
7.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözelisinin Hazırlanışı (100 ml için).....	69
7.4.4 10X Yürütme Tamponu Hazırlanışı.....	69
7.4.5 10X Transfer Tamponu Hazırlanışı	69
7.4.6 10X Tris tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı	70
7.4.7 %5 Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)	70

KISALTMALAR

ACC1: Asetil CoA karboksilaz 1

AI: Aromotaz inhibitörü

AMPK: Adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz

ATP: Adenosin trifosfat

BRCA1: Meme kanseri A1 geni

BRCA2: Meme kanseri A2 geni

BSA: Sığır serum albumin

BT: Bilgisayarlı tomografi

CAMKK2: Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz

CDH1: Kadherin 1

CDK4: siklin bağımlı kinaz 4

CDK6: Siklin bağımlı kinaz 6

CHEK2: Kontrol noktası kinaz 2

CMA: Şaperon aracılı otofaji

CSC: Kanseri kök hücresi

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

dcAdoMet: Dekarboksillenmiş s-adenosilmetiyonin

DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

DiOC₆: 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EBV: Epstein-Barr virüsü

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ER: Östrojen reseptör

ERS: Endoplazmik retikulum stres

ETC: Elektron taşıma sistemi

FBS: Fetal sığır serum

FOXO: Forkhead box O
GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat-dehidrogenaz
HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HPV: İnsan papiloma virüsü
IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
LAMP-2A: Lizozomla ilişkili membran proteini tip A2
LATS 1/2: Büyük tümör baskılayıcı 1/2
LKB1: Karaciğer kinaz 1
Met: Metformin
MRI: Manyetik rezonans görüntüleme
mTOR: Rapamisin memeli hedefi
MST 1/2: Memeli Ste20 benzeri kinazlar 1/2
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NF-κB: Nükleer faktör kappaB
ODC: Ornitin dekarboksilaz
PAOX: Poliamin oksidaz
PARPi: Poli-ADP riboz polimeraz
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PET: Pozitron emisyon tomografisi
PI3K: Fosfoinositid-3 Kinaz
PR: Progesteron reseptör
PTEN: fosfotaz ve tensin homolog
PVDF: Poliviniliden florid
p-YAP: Fosforillenmiş YAP
RHEB: mTOR'a bağlanan RAS homolog
ROS: Reaktif oksijen türevi
RTK: Reseptör tirozin kinaz
SAV1: Salvador homolog1
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi
Ser: Serin

SERM: Seçici östrojen reseptör modölatörü

STK11: Serin/treonin kinaz 11

TAZ: Transkripsiyonel koaktivatör

TBS: Tris tamponlu tuz çözeltisi

TBS-T: TBS Tween

TEMED: Tetrametiletildiamin

TNBC: Üçlü negatif meme kanseri

TNF: Tümör nekroz faktör

ULK1/2: otofajiyi aktive eden kinaz ½

YAP: YES ile ilişkili protein

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%:	Yüzde
°C:	Santigrat derece
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
gr:	Gram
kDA:	Kilodalton
L:	litre
M:	Molar
mM:	Milimolar
mL:	Mililitre
mA:	miliamper
A:	Amper
V:	Volt
pH:	Hidrojen kuvveti
rpm:	Dakikadaki dönüş sayısı
rcf:	Bağıl santrifüj kuvveti

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Dünya genelinde her iki cinsiyette ve her yaşta kanser vakası ve kanser kaynaklı ölüm sayısı [1].....	5
Şekil 2. Metforminin başlıca moleküler hedefleri [50]. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 3. Apoptozun moleküler mekanizması [65].	14
Şekil 4. Kaspazların moleküler yapısı ve görev aldığı hücresel mekanizmalar [66].....	15
Şekil 5. 3 farklı türde otofajinin moleküler gösterimi [77].	18
Şekil 6. Makrotofaji moleküler gösterimi [82].	19
Şekil 7. AMPK'nın moleküler regülasyonu [92].	22
Şekil 8. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun moleküler gösterimi [95].	23
Şekil 9. Hippo sinyal yolunun moleküler regülasyonu [99].	25
Şekil 10. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Metformin uygulaması MTT hücre sağklım testi ile doza ve zamana bağlı olarak gösterilmiştir. (* p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001)	32
Şekil 11. Metformin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki zamana ve doza bağımlı etkisinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde DiOC6 florasın boyama ile gösterimi.....	33
Şekil 12. Metformin uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama yöntemiyle zamana ve doza bağımlı olarak gösterimi. .	34
Şekil 13. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında doza ve zamana bağımlı Metformin uygulamasının mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin PI boyama yöntemiyle gösterimi.....	35
Şekil 14. 10 mM metformin hücre çoğalma hızına etkisinin tripan mavisi deneyi ile belirlenmesi. (* p<0,05)	35
Şekil 15. a) Metformin uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeline etkisinin incelenmesi. b) Zamana bağımlı metformin tedavisi sonucunda oluşan kolonilerin sayısının Image J programı kullanılarak gösterimi (****p<0,0001).....	36
Şekil 16. a) MDA-MB-231 hücrelerinde Metformin uygulamasını takiben apoptoz belirteç proteinlerinin anlatımlarının GAPDH kontrol kullanılarak ChemiDoc MP	

Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi. b) Image J programı kullanılarak, zamana bağlı metformin uygulamasına bağlı apoptotik proteinlerin anlatımlarındaki değişmelerin grafiksel gösterimi. (****p<0,0001).....	38
Şekil 17. a) Metformin uygulmasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde GAPDH kontrol kullanılarak otofaji belirteç protein anlatımlarının ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı kullanılarak gösterilmesi. b) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında zamana bağlı 10 mM Metformin ile tedavisi sonucunda otofaji belirteç proteinlerinin anlatımında meydana gelen değişikliklerin Image J programı kullanılarak grafiksel gösterimi. (****p<0,0001).....	40
Şekil 18. a) Metformin uygulmasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde GAPDH kontrol kullanılarak mTOR ve p-mTOR protein anlatımlarının ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi. b) Zamana bağlı 10 mM Metformin ile tedavi sonucunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında otofajiye etkisi olan mTOR ve p-mTOR protein anlatım oranlarının Image J programı kullanılarak grafiksel anlatımı. (** p<0,01, *** p<0,001).....	41
Şekil 19. a) Metformin uygulmasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde Hippo sinyal yolağı belirteç protein anlatımlarının gösterilmesi. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Proteinlerin ifadelerindeki değişimlerinin Image J programı kullanılarak grafiksel anlatımı. c) 10 mM Metformin uygulaması (24-48 sa) sonucunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında YAP ve p-YAP protein anlatım oranlarının Image J programı kullanılarak grafiksel anlatımı. (** p<0,01, ****p<0,0001)	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kullanan hücre kültür ekipmanları	65
Tablo 2. Kullanılan cihazlar.	66
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler.	67
Tablo 4. Kullanılan antikörler	68



ÖZET

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Menopoz yaşı, obezite, tip 2 diyabet, kişisel kanser öyküsü, ailesel kanser öyküsü, BRCA1-2 mutasyonları gibi risk faktörleri ile sigara ve alkol kullanımı gibi çevresel faktörler meme kanseri gelişiminde rol oynamaktadır. 2018 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre her altı ölümden birinin nedeni kanser olup, meme kanseri kadınlarda ilk sırada yer almaktadır.

Metformin, tip 2 diyabetli hastalarda birinci basamak tedavi olarak uygulanan biguanid sınıfı bir antidiyabetik ilaçtır. Metformin insülin metabolizmasını düzenlediği gibi kilo kontrolünü de sağlar ve ayrıca insülin direnci tedavisinde kullanılır. Çalışmalar, metforminin çeşitli kanser türlerinde tümörjenez baskılayıcı ve antiproliferatif etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Kanser hücrelerinde sinyal iletimi, serin/tirozin kinaz gibi sitoplazmik kinazların reseptör tirozin kinazlarının (RTK) aktivasyonu yoluyla gerçekleşir. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu, hücre büyümesi, otofaji, apoptoz ve lipid metabolizması gibi önemli hücresel olaylarda yer alır. Otofajinin pozitif düzenleyicisi olan AMPK, Akt/mTOR yolunu baskılar ve otofajiyi indükler.

Hippo sinyal yolu, hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenler, organ boyutunu düzenler ve doku stabilitesini korur. Hippo sinyal yolundaki bozukluklar, meme kanseri hücrelerini metastaz yapmaya teşvik eder.

Literatürdeki bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasının amacı, metformin tedavisinin meme kanseri hücrelerinde ilaç uygulama dozlarına bağlı olarak apoptoz ve otofaji üzerine Hippo sinyal yolu aktivitesi üzerindeki etkilerini ortaya koymaktır. Hücre canlılık testi, florasın boyama, immünoiblottama deneyleri gerçekleştirilerek, metformin tedavisinin hippo sinyal yolu aktivitesini artırarak apoptoz ve otofojinin indüklenmesini sağladığı gösterilmiştir.

ABSTRACT

Breast cancer ranks first among the most common cancer types in women in the world and in our country. Risk factors such as menopausal age, obesity, type 2 diabetes, personal cancer history, familial cancer history, BRCA1-2 mutations and environmental factors such as smoking and alcohol use are involved in the development of breast cancer. According to 2018 World Health Organization (WHO) data, one out of every six deaths is caused by cancer and breast cancer ranks first in women.

Metformin is a biguanide-class antidiabetic drug administered as first-line therapy in patients with type 2 diabetes. Metformin regulates insulin metabolism as well as provides weight control and is also used in the treatment of insulin resistance. Studies have shown that metformin has tumorigenesis suppressive and antiproliferative effects in various cancer types.

Signal transduction in cancer cells occurs through the activation of receptor tyrosine kinases (RTK) of cytoplasmic kinases such as serine/tyrosine kinase. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway is involved in important cellular events such as cell growth, autophagy, apoptosis and lipid metabolism. AMPK/mTOR signal induces apoptosis by increasing the expression of caspase-3, which provides DNA fragmentation in apoptosis.

The Hippo signaling pathway regulates cell proliferation and apoptosis, regulating organ size and maintaining tissue stability. Disturbances in the hippo signaling pathway encourage breast cancer cells to metastasize.

In line with the information in the literature, the aim of this thesis study is to reveal the effects of metformin treatment on Hippo signaling pathway activity on apoptosis and autophagy, depending on drug administration doses in breast cancer cells. Cell viability test, fluorescent staining, and immunoblotting experiments were performed and it was shown that metformin treatment increased the activity of the hippo signaling pathway, resulting in the induction of apoptosis and autophagy.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınlarda en çok görülen kanser türlerinde birinci sırada yer almaktadır. Meme dokusunun herhangi bir yerinden kaynaklanabilir ancak en sık görülen türü meme kanallarından kaynaklanan “duktal” kanserdir. Meme kanseri gelişiminde menopoza yaşı, obezite, tip 2 diyabet, kişisel kanser öyküsü, ailesel kanser öyküsü, BRCA1-2 mutasyonları gibi risk faktörleri ve sigara, alkol kullanımı gibi çevresel faktörler yer almaktadır. 2018 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre her altı ölümden biri kanser kaynaklıdır ve kadınlarda meme kanseri ilk sırada yer almaktadır [1]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’nın (IARC) araştırmalarına göre 2020 yılında 2.26 milyon kadında görülen meme kanserinin 20 yıl sonra 3.19 milyon kadında görüleceği öngörülmektedir [2]. 2020 IARC verilerine göre Türkiye’de 24.175 kadına meme kanseri teşhisi konulmuş ve 7.161 kadında meme kanseri kaynaklı ölüm meydana gelmiştir [3]. Kadınlarda sıklıkla görülen ve görülme sıklığı artan kanser türü olan meme kanseri tedavisi için yeni terapötik ajanlar geliştirilmesi gerekmektedir.

Metformin tip 2 diyabet hastalarında birinci basamak tedavi olarak uygulanan biguanid sınıfı bir antidiyabetik ilaçtır. Metforminin birincil etkisi karaciğerde glikoz üretimini inhibe etmektir, fakat aynı zamanda periferik dokuların insülin duyarlılığını da artırır [4]. Metformin insülin metabolizmasının düzenlenmesinin yanı sıra kilo kontrolü sağlar ve insülin direnci tedavisinde de kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda Metforminin çeşitli kanser türlerinde tümörogenezi baskılayıcı ve antiproliferatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Antikanser etkisini AMPK’ya bağımlı veya AMPK’dan bağımsız yollarla göstermektedir [5].

Kanser hücrelerinde sinyal iletimi serin/tirozin kinaz gibi sitoplazmik kinazların reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivasyonu ile gerçekleşir. Tümör oluşum aşamasında kontrol edilemeyen ve sürekli devam eden RTK aktivitesi gözlemlenmektedir. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu hücre büyümesi, otofaji, apoptoz ve lipid metabolizması gibi önemli hücresel olaylarda görev almaktadır. Uygulanan çeşitli ilaçlar kullanılarak PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun doğrudan baskılayarak ya da AMPK’ya bağımlı olarak inhibisyonu sağlanarak

antitümörojenik aktivite sağlanır. Otofajinin pozitif bir düzenleyicisi olan AMPK Akt/mTOR yolunu baskılayarak otofajinin indüklenmesini sağlar [6]. AMPK/mTOR sinyali otofajinin yanı sıra apoptozda DNA fragmentasyonu sağlayan kaspaz-3 ekspresyonunda artışa neden olarak apoptoz indüklenmesini sağlar [7].

Hippo sinyal yolu, hücre çoğalmasını ve apoptozu yöneterek organ boyutunu düzenler ve doku stabilitesini korur. Hippo sinyal yolunda meydana gelen bozukluklar meme kanseri hücrelerini metastaza teşvik etmektedir. YAP eksikliğinin, genetik olarak tasarlanmış bir fare meme kanseri modelinde akciğer metastazı insidansını azalttığı gözlemlenmiştir [8]. Yapılan bir çalışmada, metforminin YAP aktivitesini düzenleyerek glioma hücrelerinin kök yapısını ve epitelyal-mezenkimal geçişi inhibe ettiği gösterilmiştir [9].

Literatürdeki bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasının amacı, meme kanseri hücrelerinde metformin ile tedavinin Hippo sinyal yolu aktivitesinin ilaç uygulama dozlarına bağlı olarak apoptoz ve otofaji üzerindeki etkilerinin gösterilmesidir. Ayrıca elde edilen verilen meme kanseri tedavisi için gerçekleştirilen faz çalışmalarında öncü veri olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 KANSER

Kanser, vücudun herhangi organ ya da dokusundaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkar. Sağlıklı vücut hücrelerinde olağan olan hücre ölümü kanser hücrelerinde görülmez, kanser hücresi sürekli çoğalmaya devam edebilir. Normalde bağışıklık sistemi anormal hücreleri yakalar ve yok eder, ancak kanser hücreleri bağışıklık sisteminden kaçabilirler. Kısaca kanser, büyümeyi durdurma yeteneğini kaybetmiş hücrelerin anormal büyümesi olarak tanımlamaktadır. Ayrıca oluştuğu doku ya da organdan bağımsız yaşamlarını sürdürebilen kanser hücrelerinin çevre dokulara ve uzak organlara yayılabilme yeteneği olarak adlandırılan metastazdan dolayı çevre doku ve organlarda da kontrolsüz hücre büyümeleri gerçekleşir [10].

Kanser üzerinde yapılan çalışmalar sonucu tümör baskılayıcı gen, protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonların kanser oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. Tümör baskılayıcı genler apoptozun indüklenmesinde, DNA hasarının onarımında, hücre bölünmesinin baskılanmasında ve metastazın önlenmesinde görevli gen gruplarıdır. Tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı tümör oluşumu ve ilerlemesine neden olmaktadır [11]. Protoonkogenler mutasyon ve gen ekspresyonundaki artış ile onkogenlere dönüşebilen genlerdir. Kontrolsüz bir şekilde protein kodlayan onkogenler kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır [12]. Tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenlerde meydana gelen nokta mutasyonları, delesyonlar ve epigenetik susturmalar fonksiyon kaybına neden olarak kanser gelişiminde rol oynar.

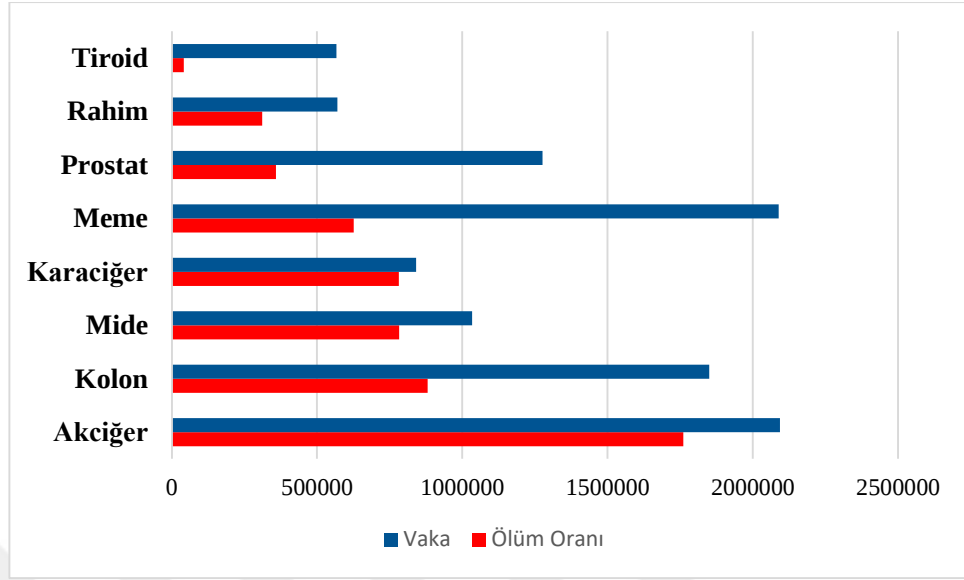
Genlerde meydana gelen mutasyonların yanı sıra sigara ve alkol kullanımı, obezite, tip 2 diyabet, hava kirliliği gibi çevresel faktörler, iyonize radyasyon, insan papiloma virüsü (HPV) ve Epstein-Barr virüsü (EBV) gibi viral etkenler kanser oluşumuna neden olmaktadır [13].

2.1.1 Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en . sık görülen kanser türüdür ve moleküler seviyede heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri, süt üretim bezlerinde (lobüler) veya meme uçlarına süt veren kanallarda (duktal) kontrolsüz hücre büyümesiyle karakterizedir [14]. Meme karsinogenezini yönlendiren birçok moleküler değişiklik mevcuttur ve tümörler bu moleküler değişikliklere göre sınıflandırılmıştır; Luminal A, Luminal B, bazal benzeri (TNBC) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) pozitif meme kanseridir. Luminal A tipi meme kanseri östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif, Luminal B ER ve/veya PR pozitif, HER2 pozitif veya negatif ve proliferasyonu yüksek olan bir meme kanseri alt türüdür. Luminal A ve Luminal B östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) pozitifdir, ancak Luminal B Luminal A'ya göre daha agresif ve metatastatik karakter sergiler [15]. HER2 pozitif meme kanseri, ER ve PR ekspresyonu olmayan, HER2 ekspresyonu ve proliferasyon gen kümeleri yüksek olan, lüminal ve bazal kümelerin ekspresyonu düşük olan bir meme kanseri alt türüdür. TNBC, ER, PR ve HER2 negatif olan bir meme kanseri alt türüdür. Meme kanseri hastalarının %20'si bu alt türe ait meme kanseri vakasıdır

2.1.1.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri kadınlarda %11.6 oranıyla dünyada en yaygın görülen kanser türüdür ve kadınlarda kanserden ölüm sıralamasında ilk sırada yer almaktadır [1]. Yapılan Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3) analizinde 71 ülkede 18 kanser türünde kanser sağkalım eğilimleri incelenmiştir. CONCORD-3 çalışmasında 66 ülkede 6.422.553 kadın için sonuçlar incelenmiş ve 25 ülkede (gelişmiş ülkeler) sağkalım %85 olarak belirlenmiştir [16]. 2018 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, Türkiye'de meme kanseri %24.4 oranla diğer kanser türleri arasında yüksek bir insidansa sahiptir [17]. 2018 GLOBOCAN verilerine göre, meme kanserinden kaynaklı ölüm oranı tüm kanser türleri arasında yaklaşık 800 000 kişi ile beşinci sırada yer alırken kadınlar arasında meme kanseri kaynaklı ölüm birinci sırada yer almaktadır (Şekil 1) [18].



Şekil 1. Dünya genelinde her iki cinsiyette ve her yaşta kanser vakası ve kanser kaynaklı ölüm sayısı [1]

2.1.1.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri oluşumuna çeşitli faktörlerin neden olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Meme kanseri dünyanın her yerinde görülen bir hastalık olmasına rağmen insidansı ve ölüm oranı farklılık göstermektedir. Bunun nedeni, yaş, genetik yatkınlık, yaşam tarzı, çevresel faktörler gibi çeşitli risk faktörlerinin olmasıdır. Meme Kanseri en çok menopoz dönemindeki kadınlarda görülmekte ve 45 yaşın altındaki kadınlarda 45 yaşın üzerindeki kadınlara oranla daha az rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilere göre, ER (+) neoplazmalar, ER (-) neoplazmaların aksine yaşla artan bir sıklık göstermektedir [23]. Genetik risk faktörleri incelendiğinde ise genetik mutasyonlara bağlı meme kanseri oluşumunda; Meme kanseri A1 geni (BRCA1) ve Meme kanseri A2 geni (BRCA2), fosfatase ve tensin homolog (PTEN), kontrol noktası kinaz-2 (CHEK2), tümör baskılayıcı gen p53, serin / treonin kinaz 11 (STK11) ve kadherin 1 (CDH1) mutasyonları meme kanserine neden olan genetik risk faktörleridir [19]. Son yıllarda yaygın olarak görülen obezite de meme kanseri risk faktörleri arasında yer almaktadır. Obezitenin postmenopozel dönemde hormon reseptörü pozitif meme kanseri gelişimi için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir [20]. Obezite meme kanseri kaynaklı ölüm oranının artmasına ve kemoteropatik ilaçların etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. Tip 2 diyabet mellitus meme kanseri riskinin artmasına neden olmaktadır. De Brujin ve arkadaşlarının

gerçekleştirdiği meta-analizde, diyabetli kadınların meme kanseri riskinin, diyabetli olmayanlara göre %23 daha fazla olduğu gösterilmiştir [21]. Diyabet mellitus, tedavi rejimlerini ve prognozu olumsuz etkilemektedir.

2.1.1.3 Meme Kanseri Moleküler Mekanizması

Kanser hücrelerinde çeşitli sistemlerde gerçekleşen bozulmalar, büyüme sinyallerindeki bozulmalar, apoptoza direnç, invazyon ve metastaz gibi malignan fenotipin ortaya çıkmasına neden olur. Bu sistemler; mitojenik sinyaller için sinyal iletim yollarını, hücre döngüsü kontrol sistemlerini ve DNA onarım sistemlerini içerir. Transmembran protein epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) bazı meme kanseri türlerinde büyümeyi uyarıcı etki göstermektedir [22]. EGFR, sağkalım, proliferasyon, apoptozun baskılanması gibi hücre fonksiyonları düzenleyen sinyal iletim yollarında görev almaktadır [23]. Meme kanseri hastalarında EGFR'nin aşırı ekspresyonu görülmektedir. Özellikle invaziv lobüler karsinomu olan hastalarda bu ekspresyon artışı daha çok gözlemlenmektedir [29]. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde görülen mutasyonlarda meme kanseri oluşumunu etkileyen moleküler belirteçlerdir. Homolog rekombinasyon ile DNA hasarlarının onarımında görevli olan bu genler metastaz ve meme kanserinin agresiflik derecesinin belirlenmesinde kullanılan moleküler belirteçlerdir. BRCA1'in Ezrin, Moesin ve Radiksin gibi metastazı kolaylaştıran membran proteinlerinin düzenlenmesinde görev almaktadır [24]. p53 proteini kodlayan TP53 geninde ekzon 5-8'de gerçekleşen tek nükleotid eklenmesi meme kanserinde en çok rastlanan mutasyondur [25]. Normal koşullarda, hücrede DNA hasarı oluşmasından sonra apoptozu veya hücre döngüsünü durulmasını uyaran p53 proteini mutant formda apoptozu baskıladığı için tümör hücresi birikmesine neden olmaktadır. Fosfotidilinositok 3.4.5-trifosfat 3-fosfat (PTEN) proliferasyon, hücre büyümesi ve migrasyon gibi birçok hücre fonksiyonunu düzenleyen tümör baskılayıcı bir genidir. PTEN geninde gerçekleşen mutasyon meme kanseri de dahil birçok kanser türünde görülmektedir. PTEN proteini fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B (AKT) sinyal yolunun inhibisyonunu sağlar [26]. PTEN geninin inaktive olmasına neden olan mutasyonlar PI3K/AKT sinyal yolağının aşırı aktivitesine neden olarak kötü prognoz ve tedaviye direnç ile ilişkilendirilir [27]. Yeni tedavi yöntemlerinin

belirlenmesinde ve yeni ilaçların geliştirilmesinde meme kanserine neden olan moleküler mekanizmalar önemli bir yere sahiptir ve yapılacak araştırmalara katkı sağlamaktadır.

2.1.1.4 Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri tedavisi için erken tanı konması ve uygun tedavi prosedürüne başlanması hastaların normal yaşamlarını sürdürebilmeleri için önemlidir. Meme kanseri için uygun tanı yöntemi mamografi olarak belirlenmiştir. Düzenli olarak çekirilen mamografi ile erken evrede meme kanseri tanısı konulabilmektedir. 50-69 yaş arası kadınlarda yıllık ya da iki yılda bir düzenli mamografi önerilirken kalıtsal BRCA mutasyonu olan veya olmayan kalıtsal kanser öyküsü olan kadınlara yıllık manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve mamografi önerilmektedir [28]. Meme kanseri teşhisi için mamografi ile birlikte klinik muayene ve patolojik incelemede gerektirmektedir. Meme kanseri teşhisi konulduktan sonra hastalığın meme içinde ya da vücutta başka bölgelere yayılıp yayılmadığını belirlemek için testler yapılır. Uygun tedavinin uygulanabilmesi için kanser evresinin belirlenmesi önemlidir. Meme kanseri 0- IV arasında A, B ve C olarak alt gruplar oluşturularak evrelendirilir ve hastalığın uygun tedavi yöntemi bu evrelere göre belirlenir. Bu evrelerden 0; olduğu yerde bulunan duktal karsinom (erken evre), IA; tümör 2 cm veya daha küçüktür ve koltukaltı lenf bezlerine yayılmamıştır, IB; koltukaltı lenf bezlerine mikro metastazlar gerçekleştirmiş, IIA; tümör 2 cm veya daha küçüktür ancak koltukaltı lenf bezlerine yayılmıştır, IIB; tümör 2-5 cm boyutlarındadır koltukaltı lenf bezlerine yayılmış uzak bölgelere yayılmamıştır, IIIA; tümör 5 cm büyüklüğündedir 4-9 koltukaltı lenf bezine yayılmıştır, uzak bölgelere metastaz gözlemlenmez, IIIB; tümör göğüs duvarına ya da cilde yayılmıştır, IIIC; tümör herhangi bir boyutta olabilir 10 veya daha fazla koltukaltı lenf bezine yayılmıştır ya da köprücük kemiği altında/üstüne bulunan lenf bezlerine yayılmıştır, IV; tümör herhangi bir boyutta olabilir ve uzak bölgelerdeki lenf bezlerine veya organlara yayılmıştır [14]. Klinik evre I veya evre II'den şüphelenilen ve metastatik karakteristik göstermeyen hastalar için evreleri net olarak belirlemek için rutin laboratuvar kan tahlilleri ve göğüs radyografisi yeterlidir. Evre IIIB/C veya evre IV meme kanserinden şüphelenildiği durumlarda göğüs, pelvis ve karın tomografisi (BT) veya karın ve pelvis MRI, göğüs BT'sinin yanında kemik ölçümü veya sodyum florür PET/BT taraması istenilmektedir [29]. F-FDG PET/CT, evre IIIB/C veya IV. evreyi

değerlendirmek için isteğe bağlı olarak incelenmektedir [30]. İleri evre meme kanseri tanısı için PET kullanımını değerlendiren 572 hasta ile gerçekleştirilen 5 çalışmanın meta-analizi sonucunda PET için 0.97'lik duyarlılık (%95 güven aralığı 0.93-0.99) gösterilmiştir [31].

Meme kanseri tedavisi için kanserin evresine ve moleküler mekanizmasına göre dört tedavi seçeneği bulunmaktadır. Bu tedavi yöntemleri; cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavidir. Evreleme ve kansere neden moleküler belirteçler belirlendikten sonra uygun tedavi prosedürü uygulanmaktadır.

2.1.1.4.1. Cerrahi Müdahale

Meme kanseri tedavisinde cerrahi müdahale tek başına uygulanan bir yöntem olmamakta, evresi ve moleküler belirteçler göz önüne alınarak diğer yöntemlerle birlikte uygulanmaktadır. Cerrahi müdahale, lokal ve bölgesel meme kanserinin birinci yöntemidir. Cerrahi müdahale; meme koruyucu yaklaşımlar (lumpektomi) ve meme koruyucu olmayan yaklaşımlar (mastektomi) olarak ikiye ayrılmaktadır. Lumpektominin temelini tel kılavuzlu yaklaşım oluşturmaktadır ve bu işlem ameliyat sırasında gerçekleştirilmektedir, radyoaktif tohum lokalizasyonu yöntemi ise ameliyattan birkaç gün önce ultrason veya mamografi eşliğinde memeye radyoaktif parçacık yerleştirilerek gerçekleştirilir [32]. Yapılan çalışmalarda, radyoaktif tohum lokalizasyonu ve tel kılavuzlu yaklaşım arasında cerrahi sonuçlar açısından fark olmadığı, ancak radyoaktif tohum lokalizasyonunun cerrahi kolaylık sağladığı gösterilmiştir [33]. Meme koruyucu cerrahi adjuvan radyoterapi gerektirmektedir [34]. Diğer bir cerrahi yöntem olan mastektomi büyük çaplı ve/veya memede yaygın dağılım gösteren meme kanseri hastalarına ve lumpektominin uygun olmadığı durumlarda uygulanmaktadır. Tümör boyutu 5 cm'den büyük ve %20'den fazla meme duvarı nüksü görülen hastalarda mastektomiden sonra radyoterapi uygulanmaktadır [35].

2.1.1.4.2. Kemoterapi

Kemoterapi birçok meme kanseri hastasında kullanılan temel tedavi yöntemidir. Kemoterapi adjuvan veya neoadjuvan olarak uygulanır. Neoadjuvan tedavide

kemoterapinin amacı, tümörü ameliyat edilebilir boyuta getirmektir [36]. Adjuvan uygulamada ise tedaviden sonra remisyondaki hastaya uygulanır ve bu yöntemle nüks sayısı en aza indirilir ve hastalıksız sağ kalım oranı arttırılır [37]. Metastatik meme kanserinin ana tedavi yöntemidir ve luminal B, Her2 pozitif ve TNBC gibi erken evre meme kanseri türlerinin tedavisinde kullanılır [38]. Ayrıca üç veya daha fazla lenf nodu nüksü bulunan luminal A meme kanseri vakalarında tedavi yöntemi olarak kemoterapi kullanılır [30,39]. Antrasiklinler, anti-mikrotübüller (taksanlar), alkilleyici ajanlar (siklofosfamid), antimetabolitler (kapesitabin, gemesitabin), platin bileşikler (cisplatin), Poli-ADP-Riboz Polimeraz inhibitörleri (PARPi) ve TDM'dir (transtuzumab). Meme kanseri tedavisinde etkili bir yöntem olmasına rağmen, kemoterapinin yan etkileri oldukça fazladır. Yan etkileri en aza indirmek için düşük doz uygulama ve yan etkiyi tedavi edici ilaç uygulama gibi yöntemler uygulanmaktadır.

2.1.1.4.3. Hormonal Tedavi

Hormon tedavisi, vücudun hormon üretmesini bloke ederek ya da hormonların meme kanseri üzerindeki etkisini durdurarak hormona duyarlı meme tümörlerinin büyümesini yavaşlatır veya durdurur. Metastatik meme kanserini tedavi etmek için çeşitli hormon terapileri uygulanmaktadır. Tamoksifen ve toremifen metastatik meme kanseri tedavisi için onaylanmış seçici östrojen reseptör modülatörleridir (SERM) [40]. Hormonal terapi ER ve PR pozitif meme kanserinde adjuvan olarak gerçekleştirilmektedir. Östrojen üretimini bloke etmek amacıyla aromataz inhibitörleri (AI) ilaçlar kullanılır, bu şekilde dokularda östrojen üretimi için kullanılan aromatazlar inhibe edilir. Neoadjuvant tedavi olarak hormonal terapinin kullanımını değerlendirmek için gerçekleştirilen klinik araştırma sonucunda; hormon tedavisinin postmenopozal kadınlarda meme tümörü boyutunu azaltmada etkili olduğu gösterilmiş fakat menopoza öncesi kadınlardaki etkisi henüz net değildir [41]. Endokrin terapiye dirençli hastalarda endokrin terapiye ek olarak hücresel sinyal yolları inhibitörleri ya da hücre siklusu inhibitörleri eklenmektedir [42]. Rapamisin memeli hedefi (mTOR) meme kanserinde düzensiz, hücre büyümesini aracılık eden PI3K/mTOR/Akt sinyal yolağı kinazıdır. Yapılan BOLERO-2 çalışmasında AI olan eksemestana ile birlikte mTOR inhibitörü olan everalimus uygulaması prognozsuz sağkalım süresinde artış olduğu gösterilmiştir [43]. PI3K sinyal yolağı

aktivasyonu hormon reseptör pozitif endokrin tedaviye dirençli hastalar için ayırt edicidir. BELLE-2 klinik araştırmasında aramotaz AI olan fulvestranta ek olarak PI3K inhibitörü olan bupersilib uygulaması prognozsuz sağkalımda iyileştirici etki göstermiştir [44]. G1 fazından siklin bağımlı kinazlar 4 ve 6 (CDK4/CDK6) tarafından düzenlenen S fazına geçişle hücre proliferasyonu gerçekleşir. MONARCH-2 çalışmasında AI olan fulvestrant ile birlikte CDK4/6 inhibitörü olan abemaciclib uygulaması sonucu prognozsuz sağkalım süresinde artış olduğu gösterilmiştir [45]. Birçok klinik çalışmada endokrin terapiye dirençli hormon reseptör pozitif meme kanseri hastalarının tedavilerine sinyal yolları ve CDK4/6 inhibitörleri eklenerek prognozsuz sağkalım sürelerinde artış olduğu kanıtlanmıştır.

2.1.1.4.4. Radyoterapi

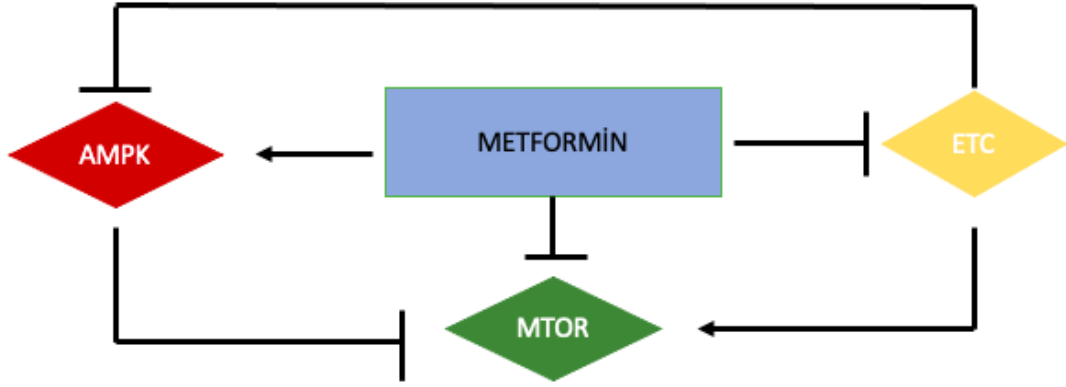
Radyoterapi tedavisinde yüksek enerjili gama ve X-ışınları radyoaktif izotoplar meme tümörlerini ortadan kaldırmak amacıyla uygulanır. Radyoterapi cerrahi müdahaleden sonra adjuvan tedavi olarak uygulanır. Erken evre meme kanserinde cerrahi müdahale sonrası uygulanan radyoterapinin meme kanserinin nüks etme riskini yarıya yarıya azalttığı gösterilmiştir [46]. Kemoterapi veya cerrahi müdahaleden 1 ay sonra ihtiyaç duyulursa haftada 3-5 gün yaklaşık 5 hafta kadar radyoterapi uygulaması gerçekleştirilir. Hangi radyoterapi türünün uygulanacağı meme kanseri türü ve radyoterapiden önce uygulanan tedaviye göre belirlenir. Bunlar meme radyoterapisi, göğüs duvarı radyoterapisi ve lenf nodları radyoterapisi olarak uygulanabilir [47].

2.2. METFORMİN

Metformin (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride) 1950'li yıllardan beri tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan bitkisel kökenli bir ilaç sınıfı olan biguanid ailesi üyesidir [48]. Metforminin birincil etkisi kandaki glikoz seviyesinin düşmesini sağlamaktır bu nedenle tip 2 diyabetli hastalarda monoterapi olarak ilk tercih edilen ilaçtır. Metforminin glikoz seviyesini düşürücü etkisinin yanı sıra kilo kontrolü, prediyabet, insülin direnci ve polikistik over sendromu tedavisinde kullanılmaktadır. Günlük alınması gereken doz miktarı 500-2500 mg/gün olarak belirlenmiştir [49]. Metforminin ana moleküler hedefleri

mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETC), Adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) ve mTOR'dur [50].

ETC, Adenosin trifosfat (ATP) üreterek AMPK'nın aşağı düzenlenmesine neden olur. Metformin ise ETC'yi inhibe ederek ATP sentezinin azalmasını sağlar ve yüksek AMP/ATP oranı mTOR'un baskılanmasını sağlayan AMPK'yı etkinleştirir. ATP sentezinin metformin aracılı inhibisyonu mTOR inhibisyonunu sağlar (Şekil 2.). Kolon kanseri hücreleri, meme kanseri hücreleri ve model organizma *C. elegans* Yapılan birçok çalışma sonucunda Metformin'in çeşitli kanser türlerinde kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı gösterilmiştir [51,52].



Şekil 2. Metforminin başlıca moleküler hedefleri [50].

2.2.1. Metformin'in Anti-Kanser Etkisi

Metforminin antikarsinojenik etkisi ilacın doğrudan ve dolaylı etkileriyle ilişkilidir. Metformin dolaylı olarak anti-tümör etkisini kanser hücrelerinin hayatta kalmasını etkileyebilecek kan şekeri ve insülin seviyesinde meydana getirdiği değişimlerle gerçekleştirmektedir [53]. Metformin doğrudan anti-kanser etkisini AMPK'ya bağımlı ve AMPK'dan bağımsız olarak göstermektedir.

2.2.1.1. AMPK'ya Bağımlı Anti-Kanser Etkisi

Metformin ETC1'i inhibe ederek ATP sentezini azaltır ve AMPK aktivasyonuna yol açarak AMPK'ya bağımlı olarak antikarsinojenik etki gösterir. AMPK'ya bağımlı anti-

kanser mekanizması tüberöz skleroz kompleksi 1 (TSC1) ve TSC2 tümör baskılayıcı genlerinin mTOR inhibe edici kompleks oluşturmalarını sağlayarak ya da mTOR'un pozitif düzenleyicisi olan RAPTOR'u doğrudan inhibe ederek gerçekleştirebilir [54]. AMPK p53'ü hedefleyerek ve p53 proteinin Ser 15 fosforilasyonu ile hücre siklusunda tutulmayı indükleyerek antikarsinojenik özellik göstermektedir [55]. AMPK'nın Treonin649'da (Thr) FOXO1'i doğrudan fosforile ettiği bildirilmiştir [56]. Yapılan başka bir çalışmada, AMPK aktivatörü olarak metformin uygulaması gerçekleştirilmiş ve FOXO1 ekspresyonu incelenmiş. Bu çalışma sonucunda FOXO1'in metformin kaynaklı AMPK aktivasyonu yoluyla yukarı regülasyon göstererek östrojen bağımlı endometrial kanser hücre büyümesini inhibe ettiği ve AMPK-FOXO1 sinyal yolunun yeni bir antikarsinojenik teröpatik hedef olabileceği gösterilmiştir [57]. Metformin hücre çoğalması, protein sentezini, hücre döngüsü ilerlemesini baskılayan ve apoptozu indükleyen mekanizmasını AMPK aktivasyonuna bağlı mTOR baskılanmasıyla gerçekleştirir. Metforminin mide adenokarsinomu üzerindeki etkilerini gösterme için yapılan çalışmanın sonucunda; metforminin AMPK aktivasyonunu arttırarak mTOR'u baskıladığı ve AMPK-Akt/mTOR sinyal yoluyla gastrik kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir [58].

2.1.1.2. AMPK'dan Bağımsız Anti-Kanser Etkisi

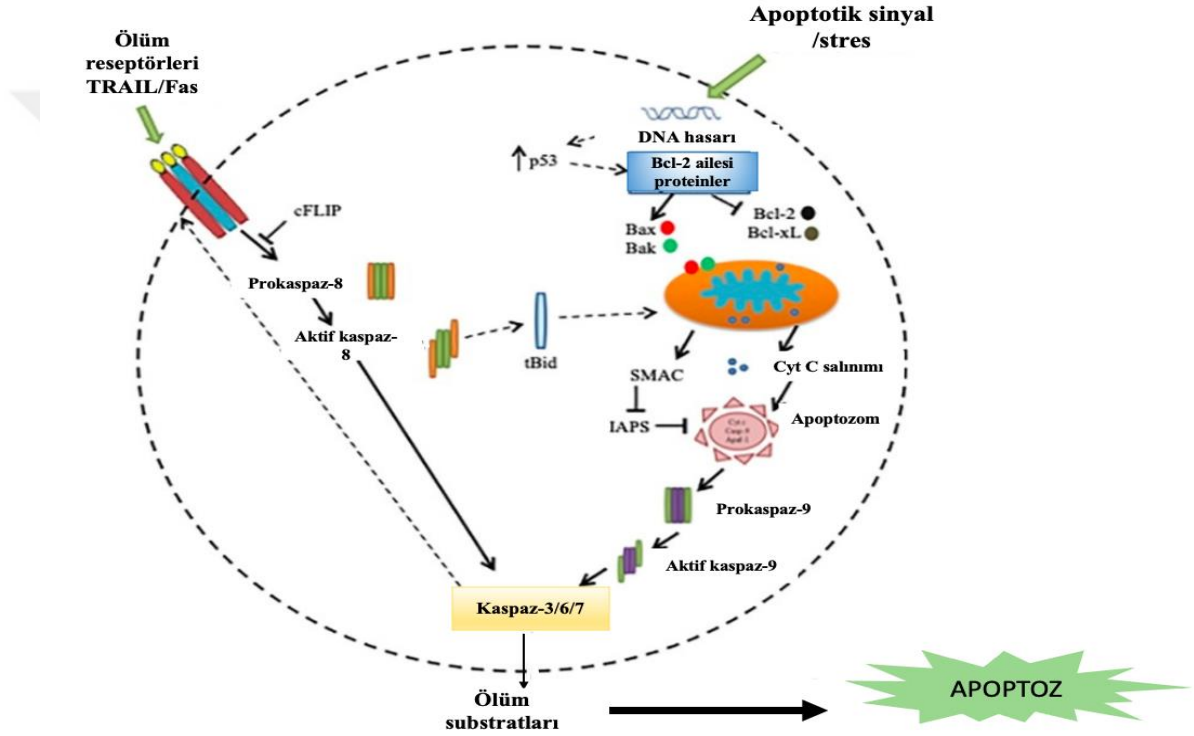
AMPK'dan bağımsız anti-tümör mekanizması ETC'yi inhibe ederek reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini, oksidatif stres ve DNA hasarını azaltarak gerçekleştirir [59]. Büyüme faktörleri mTOR'u PI3K-Akt-TSC1-TSC2 aracılığıyla düzenlerken, aminoasitler GTPazların RAG ailesi tarafından mTOR'un AMPK'dan bağımsız olarak sinyallemesini etkinleştirebilir [59]. Ragülatör kompleksi tarafından aktivasyonunun ardından, RAG GTPazlar mTORC1'i RHEB tarafından aktive edildiği lizozomal yüzeye aktarır. Metformin, Regulator kompleksi inaktive ederek mTORC1 sinyalini inhibe edebilir [60]. Metformin ayrıca transkripsiyon faktörü özlülük proteini (Sp) 1, Sp2, Sp3, Sp4 ve proonkogenik Sp tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonunu düzenler. Sp1, Sp3 ve Sp4 birçok kanser türünde aşırı ekspresedir ve birçok antikanser ilacı için hedefidir [50]. Metformin bu moleküllerin aşağı regülasyonunu sağlayarak AMPK'dan bağımsız anti-kanser etkisi gösterir.

Metforminin AMPK'ya bağımlı ve AMPK'dan bağımsız anti-kanser etkisinin yanı sıra birçok hücreyel sinyal yolu ve kanser kök hücrelerini hedef alarak antitümör etki gösterir. Mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı hücre büyümesini, farklılaşmasını, proliferasyonu, apoptozu ve hücre göçünü düzenler. Metformin c-jun N terminal kinaz (JNK)/p38 MAPK yolağını aktive ederek DNA hasarıyla indüklenebilir gen 153 (GADD153) ekspresyonunu artırarak akciğer kanseri hücrelerinde apoptoz aracılı etki gösterdiği bildirilmiştir [61]. Nükleer faktör kappaB (NF-κB), proliferasyon ve apoptozu düzenlemek için indüklenen transkripsiyon faktörüdür ve kanser tedavisinde potansiyel bir hedeftir. Metformin kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe etme etkisini NF-κB ve mTOR sinyal yollarını baskılayarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir [62]. Tümör başlatan hücreler olarak da bilinen kanser kök hücreleri (CSC) hem kemoterapi hem de radyoterapiye direnç gösteren hücrelerdir. İlk olarak 2009 yılında metformin kaynaklı CSC inhibisyonu klinik öncesi meme kanseri modellerinde gösterilmiştir [61]. Daha sonra yapılan birçok çalışmada metforminin çeşitli kanser türlerinde CSC'leri ortadan kaldırarak insan kanser ksenograflarında kemoterapiye yanıtı arttırdığı gösterilmiştir. Metformin kanser hücreleri üzerindeki biyolojik etkisini AMPK'yı aktive etme, JNK/p38 MAPK, NF-κB sinyal yolları üzerinden ve CSC'leri inhibe ederek göstermektedir.

2.3 APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

Apoptoz (tip I hücre ölümü) yaşlanmış, fonksiyonunu kaybetmiş ve hasarlı hücrelerin özel mekanizmaların kontrolüyle programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz sırasında hücrede; büzülme, yoğunluğun artması, organelerin bir araya kümelenmesi, endonükleaz aktivitesi sonucu DNA'nın parçalara ayrılması ve hücre zarında tomurcuklanma başlayarak apoptotik cisimlerin oluşması gibi morfolojik değişiklikler gözlemlenir. Embriyo döneminde başlayan apoptoz yaşamın birçok evresinde normal gelişimin sağlanabilmesi ve kanser oluşumunun önlenmesi için devam eder. Nekrozdan farklı olarak, apoptozda hücre bileşenleri hücre zarından dışarı dağılmadığı için iltihaplanma görülmez ve apoptoz sırasında enerji harcanır. Apoptoz içsel ve dışsal (reseptör aracılı) yollar olmak üzere iki farklı yoldan aktive edilir. İçsel yolk endoplazmik retikulum (ER) stresi, DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği, reaktif oksijen

türleri (ROS) aşırı üretimi, replikasyon stresi gibi çeşitli içsel uyaranlara karşı apoptozu tetikler [63]. Dışsal yolak hücre zarı yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine ligand bağlanması yoluyla gerçekleşen sinyal iletimi ile karakterizedir [64]. Her iki apoptotik yolakta apoptozun başlaması, hücre içinde inaktif olarak bulunan özelleşmiş proteazlar olan kaspazların kademeli aktivasyonu ile gerçekleşir. İçsel apoptoz mekanizması, apoptoz düzenleyici protein ailesinin (BCL-2) proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri tarafından düzenlenir [63,64] (Şekil 3).

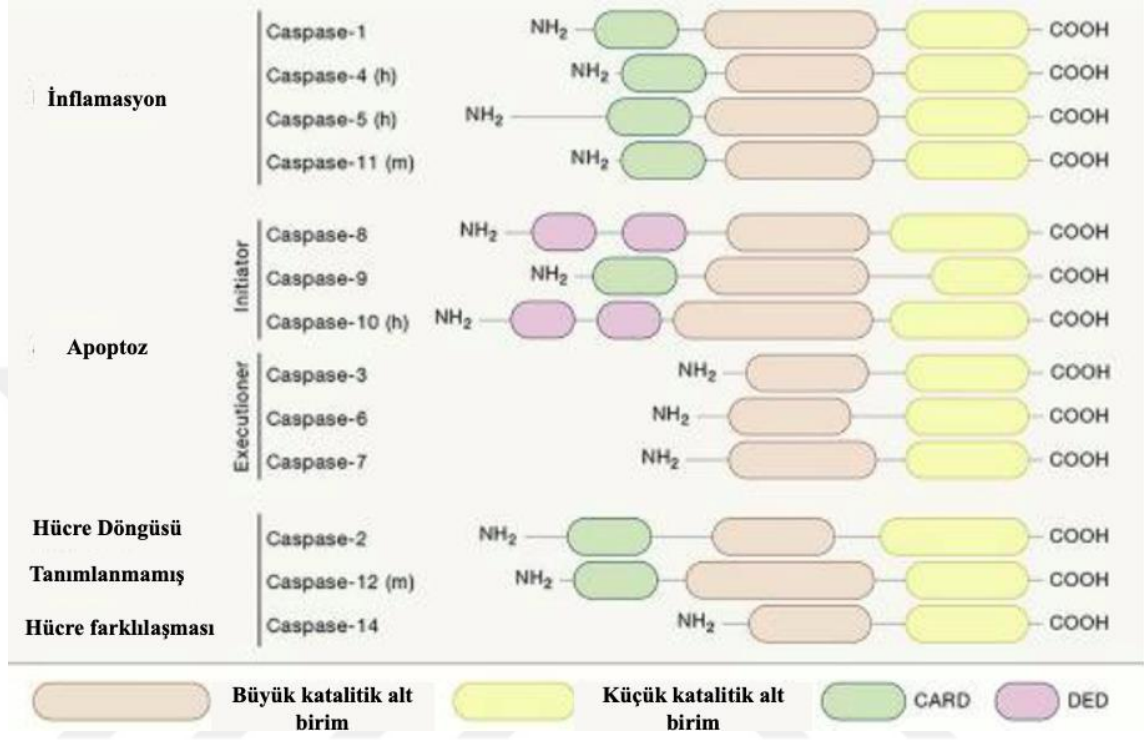


Şekil 3. Apoptozun moleküler mekanizması [65].

2.3.1 Kaspazlar

Apoptotik yolakta etkili olan proteinler kaspazlar olarak adlandırılır. Kaspazlar katalitik bölgelerinde sistein kalıntı taşırlar, hedef proteinler C- uçlarında bulunan asparttan keserler ve enzim görevi görürler. İnsan vücudunda 13 çeşit kaspaz bulunur (Şekil 4) ve kaspazlar apoptozun yanı sıra inflamasyon, hücre döngüsü ve hücre farklılaşmasında da görev almaktadır [66]. Başlatıcı (kaspaz- 8,9,10) ve efektör (kaspaz- 3,6,7) kaspaz olarak ikiye ayrılırlar, başlatıcı kaspazlar amino terminal bölgelerinde kaspaz alım alanı (CARD) veya ölüm efektör alanı (DED) bulundurur. Başlatıcı kaspazların aksine, efektör kaspazlar

amino terminal alanları içermez bu nedenle başlatıcı kaspaz tarafından belirli kısımları kesilip aktifleştirilmesi gerekir.



Şekil 4. Kaspazların moleküler yapısı ve görev aldığı hücresel mekanizmalar [66].

Kaspazlar uygun aktivasyon sinyalleri gelene kadar inaktif durumda bulunur. İçsel apoptoz yolağında görev alan başlatıcı kaspazlar; kaspaz-2 ve kaspaz-9, reseptör aracılı apoptoz yolağında görevli başlatıcı kaspazlar; kaspaz-8 ve kaspaz-10'dur İçsel apoptotik yolakta, aşırı ROS üretimi, ER stres gibi içsel uyarılarla apoptoz tetiklendikten sonra kaspaz-9 veya kaspaz-2 CARD yardımıyla Apoptoz proteaz aktivasyon faktörüne (Apaf-1) bağlanır. Apaf-1 kaspaz-9'u belirli bölgesinden keserek aktifleşmesini sağlar. Kaspaz-2 apoptozom kaspaz aktivasyon yolunda efektör kaspaz-3 tarafından aktifleştirildiği bu nedenle bu yolakta başlatıcı kaspaz yerine efektör kaspaz olarak görev almaktadır. Ancak DNA hasarı kaynaklı apoptoz mekanizmasını göstermek için yapılan çalışmada; kaspaz-2'nin başlatıcı olarak erken aktivasyonu gösterilmiştir [67]. DNA hasarı kaynaklı içsel apoptotik yolakta kaspaz-2 görev almaktadır. Receptör aracılı apoptoz yolağında görevli olan kaspazların aktifleştirilebilmesi için inflamatuvar hastalıklarda doku yıkımını başlatan tümör nekroz faktör (TNF) veya T lenfositlerden sentezlenen transmembran ölüm

reseptörü ligantı olan FAS varlığında gerçekleşir. Uygun reseptöre bağlanan FAS reseptörü aktifleştirir ve aktifleşen reseptör FAS ile ilişkili ölüm domaini olan (FADD) hücre içi proteinini kendisine çeker. Kaspaz-8 veya kaspaz -10 DED bölgesi yardımıyla FADD'ye bağlanır ve kesilerek aktifleştirilir. Aktifleşen başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları aktifleştirerek apoptoz mekanizmasını sürdürür. Efektör kaspazlar olan kaspaz-3 ve kaspaz-7 homodimer yapıda inaktiftir, başlatıcı kaspazlar tarafından küçük ve büyük alt birimleri arasında bulunan bölge kesildiğinde aktif kaspaz halini alırlar [66]. Apoptotik efektör kaspazlar DNA parçalanması, apoptotik cisimcik oluşumu gibi apoptozun morfolojik değişimlerinin oluşumunu sağlar.

2.3.2 Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 geni insanlarda foliküler lenfomadan klonlanan apoptotik bir gendir. Onkogen gibi görev yapan bu genin bir mutasyona uğramış taşıyanlar kromozom yeniden düzenlenmeleri sonucu lenfoma geliştirir. İnsan Bcl-2 proteini ile *C. elegans* 'ta bulunan CED-9 proteini homolog proteinlerdir ve ikisi de apoptozu engelleme görevi yapan düzenleyici proteinlerdir. Bcl-2 proteini mitokondri dış zarı, nukleus zarı ve ER zarında yer alan transmembran bir proteindir. Bcl-2 proteinleri, Bcl-2 Homoloji (BH) motifleri olarak bilinen doğrusal dizi motifleri veya alanlarının varlığıyla tanımlanır [68]. Bcl-2 proteinleri, pro-apoptotik; Bcl-2-etkileşim hücre ölüm düzenleyicisi (BİM), P53 anlatımı artmış apoptoz başlatıcısı (PUMA), BH3-etkileşim ölüm agonist domein (BİD) ve anti-apoptotik; Bcl-2, Bcl-x, olarak ikiye ayrılır. Pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleri yapı ve işlevi belirleyen BH alanı olarak bilinen korunmuş bölgeler içerir [69]. Pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinde bulunan BH bölgesi apoptotik kaskadın başlamasını sağlar.

Pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin bazıları anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanıp apoptotik sinyallenmeyi başlatırken bazıları direkt Bcl-2 ilişkili X proteini (BAX) ve Bcl-2 antagonist (BAK) bağlanarak aktivasyonunu sağlarlar [69].

2.3.3 İçsel Apoptoz Yolağı

İçsel apoptoz yolağı farklı stres koşullarına, mitokondriyal düzeyde hücre içi sinyal aracılık eder, bu nedenle mitokondriye bağımlı apoptotik yolak olarakta adlandırılır.

Onarılamaz DNA hasarı, hipoksi, yüksek düzeyde ROS üretimi, içsel mitokondriyal yolun başlamasını indükleyen bazı faktörlerdir [70]. Proapoptotik protein olan Bad mitokondri dış zarında bulunan antiapoptotik proteinler olan Bcl-2/Bcl-x'e bağlanır. Bcl-2/Bcl-x Bad etkileşimi antiapoptotik proteinlerin Bax ile etkileşimini engelleyerek mitokondriden sitozole sitokrom c salınımını sağlar. Mitokondriden sitokrom c salınımıyla Apaf-1 prokaspaz-9'un CARD bölgesinden bağlanması gerçekleşir. Sitokrom c salınımı kaspaz aktivasyonunu düzenlemesinin yanı sıra elektron taşıma zincirini bozarak hücrede enerji üretimini azaltıp ROS üretimini artırır [71]. Apaf-1 tarafından kesilerek aktifleşen kaspaz-9 prokaspaz-3'e bağlanarak, kaspaz-3'ün aktifleşmesini sağlar.

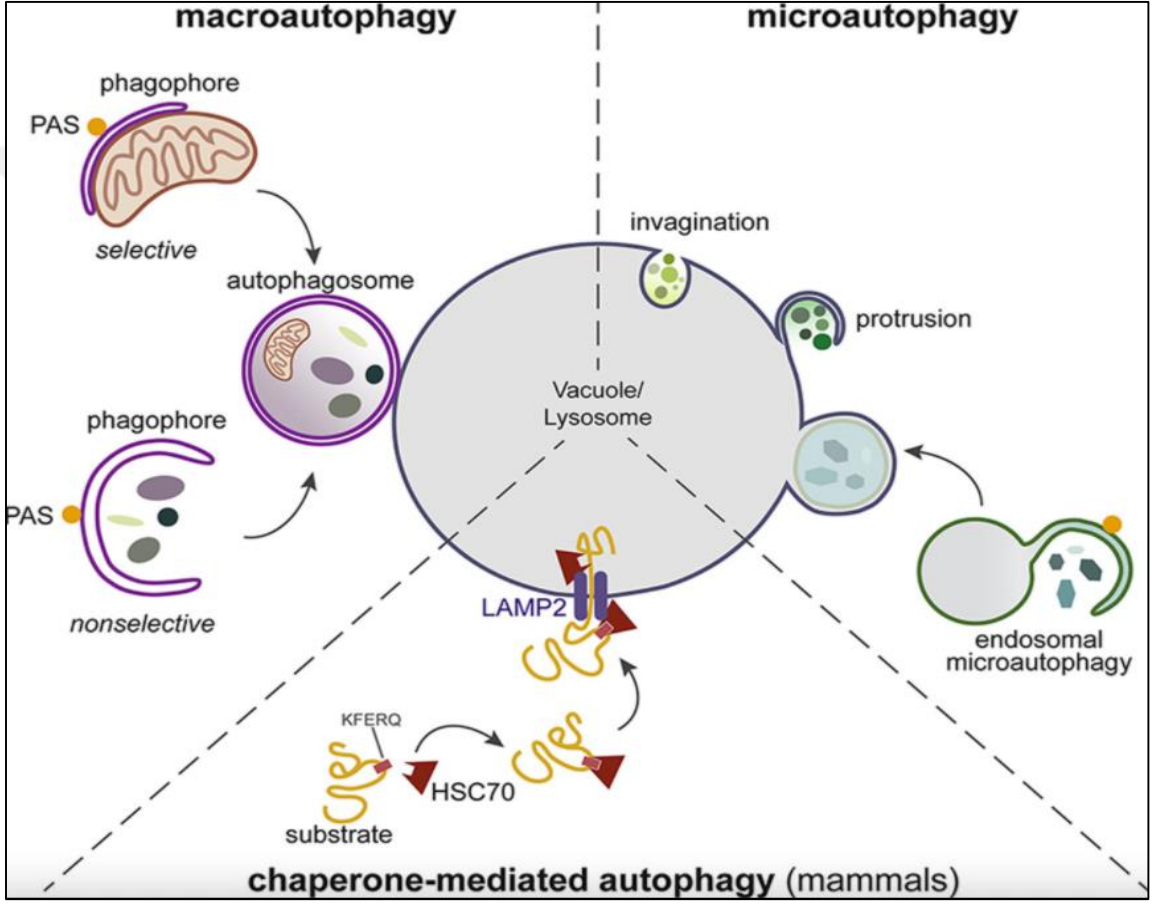
2.3.4. Reseptör Aracılı Apoptoz Yolağı

Reseptör aracılı apoptotik yol özel ligandların ya da apoptotik sinyallerin apoptozu başlatmak için membran ölüm reseptörlerine bağlanarak programlanmış hücre ölümüne neden olur. Ölüm reseptörleri TNF ailesine ait reseptörlerdir. Reseptör aracılı apoptoz yolağı ligandın Fas/TRAIL reseptörlerine bağlanmasıyla aktifleşir. Apoptoz ile ilişkili protein FADD ölüm alanı ve ölüm efektör alanı olmak üzere iki bağlanma bölgesi içerir [64,70]. Aktifleşen Fas FADD'ya ölüm alanından bağlanır ve prokaspaz-8 FADD'ın ölüm alanından bağlanarak ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşturur [72,73]. DISC prokaspaz-8'in otoproteolitik parçalanmasını sağlar [73]. Aktifleşen kaspaz-8 mitokondriyal yoldan apoptozu sağlar veya kaspaz-3'ü aktifleştirerek hücrenin apoptoza gitmesini sağlar.

2.4 OTOFAJİ

Otofaji evrimsel süreçte korunmuş katabolik bir süreçtir. Otofaji hücrel stresle yanıt olarak protein degradasyonu ve organel turnover gibi homeostazı sağlayan fonksiyonları sürdüren bir mekanizmadır. Otofaji, lizozomal sindirimi sağlayacak olan otofagozom oluşumu yoluyla hasarlı organelleri, protein agregalarını ve hücre içi patojenleri temizlemek için hücrel ve çevresel stresler tarafından uyarılan bir mekanizmadır [74]. Otofaji makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere 3 farklı tipte

araştırılmaktadır (Şekil 5). Makrotofaji genel olarak otofaji teriminin direkt kullanımıyla ifade edilmektedir [75]. Otofaji, Tip 2 hücre ölümü olarakta tanımlanmaktadır tip 1 hücre ölmüyle arasındaki en büyük morfolojik farklılık mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organeller ve/veya sitoplazmanın bir kısmının çift veya çok membranlı veziküller içine alınmasıdır [76].

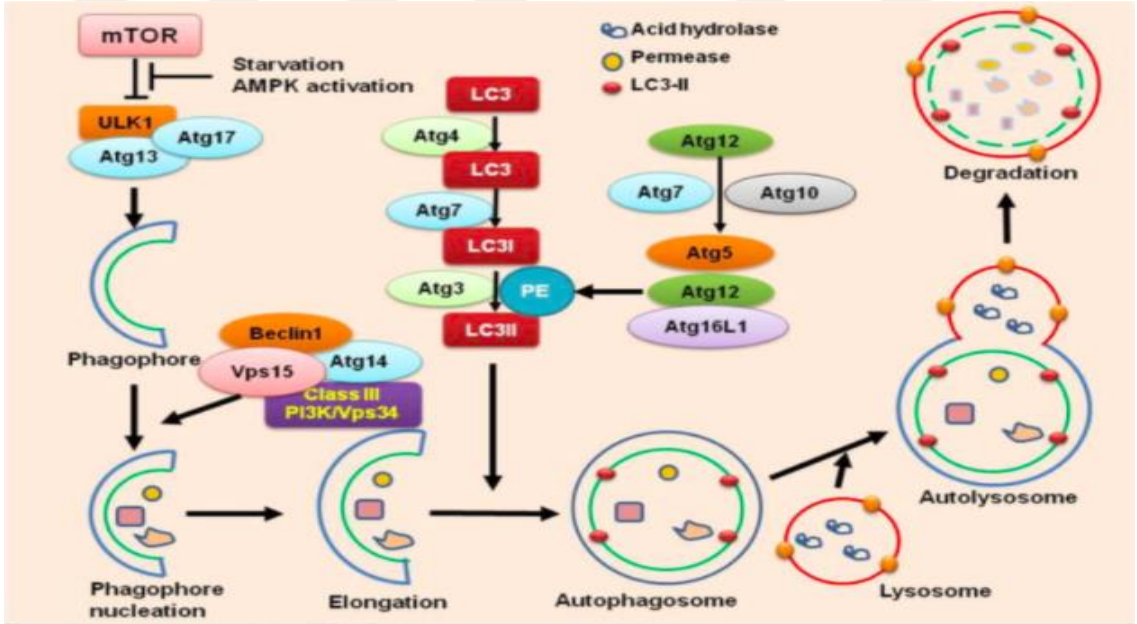


Şekil 5. 3 farklı türde otofajinin moleküler gösterimi [77].

2.4.1 Makrotofaji

Makrotofaji, hücresel içeriklerin bileşenlerine ayrıldığı, hücrenin kendini yoketme mekanizmasıdır. Makrotofajide sitoplazmik proteinler; degradasyon için lizozoma teslim edilmek üzere kullanılırken, otofagazom olarak bilinen çift membranlı veziküller; organelleri içine almak için kullanır. Makrotofaji süreci otofaji ile ilişkili proteinler (ATG) tarafından düzenlenir [78].(Şekil 6) Makrotofaji sürecinde mTOR inhibitör olarak

görev alırken AMPK aktivatör olarak görev almaktadır. Hücrel iç dengeyi korumak için mTOR'un stres, enerji seviyesi ve büyüme faktörleri gibi çeşitli faktörlere yanıt olarak hücrel sinyal yollarını düzenlediği bilinmektedir. mTORC1'in ULK1-ATG13-FIP200 trimerik kompleksi ile etileşimi yoluyla makrotofajinin düzenlenmesini sağlamaktadır [79]. mTORC1'in ULK1'in serin 758 (Ser758) aminoasitinden fosforlanması fagofor oluşumunu inhibe ederek makrotofaji inhibisyonunu sağlar [80]. Otofaji temel olarak başlatma, membran çekirdeklenmesi ve fagofor oluşumu, fagofor genişlemesi, lizozom ile füzyon ve bozunmayı içeren beş basamaktan oluşmaktadır. AMPK aktivasyonu fagofor oluşumunu uyararak Beclin1 kompleksinin (Beclin1-Sınıf II PI3K-Vps34-Vps15-Atg14) etkinleşmesini sağlayan ULK1 kompleksi (ULK1-Atg7-Atg-9) aktivasyonunu sağlar. Beclin1 kompleksi membran çekirdeklenmesi ve fagofor oluşumunu sağlar. Konjuge Ag12Atg5 kompleksi Atg16L1 ile bağlanarak mikrotübülle ilişkili protein hafif zinciri 3 (LC3) proteinini indüklenmesini sağlayarak otofagozom oluşumunu indükler [81,82]. Otofagozomun lizozom ile füzyonu sonucu otolizozom yapısı oluşarak degradasyonu sağlar. (Şekil 6)



Şekil 6. Makrotofaji moleküler gösterimi [82].

2.4.2 Mikrootofaji

Mikrootofaji ilk olarak karaciğer üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarla incelenmiştir. Mikrootofaji doğrudan lizozomlar tarafından yutulan hücre içi proteinlerin ve organellerin parçalanmasının sağlandığı otofaji mekanizmasıdır. mTOR makrootofajide olduğu gibi mikrootofajininde düzenlenmesini sağlar [83]. Mikrootofaji, metabolik adaptasyon, organellerin yeniden şekillenmesi ve kontrolünün sağlanmasını sağlar, makrootofajide olduğu gibi açlık durumunda mikrootofaji gözlemlenmez.

2.4.3 Şaperon Aracılı Otofaji

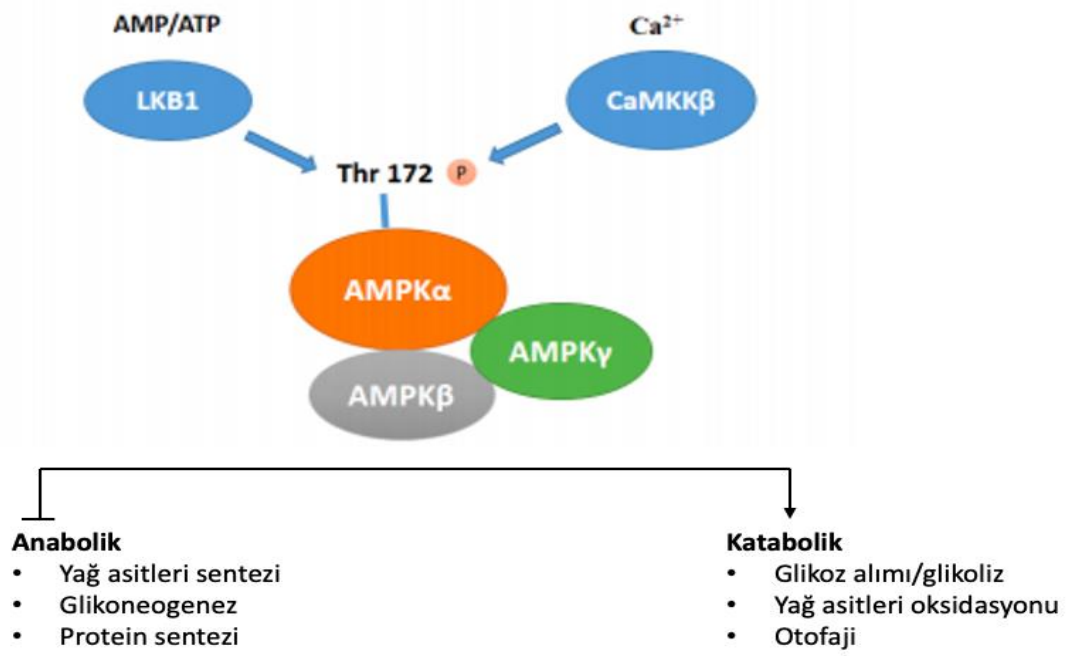
Şaperon aracılı otofaji (CMA) protein yıkımını lizozoma bağımlı olarak gerçekleştirir ve bu otofaji türünde sadece çözünebilir proteinlerin yıkımı gerçekleştirilir. Hsp40 ortoloğu olan Hsc70 ve lizozomla ilişkili membran proteini tip 2A (LAMP-2A) proteinleri CMA'da görevli proteinlerdir. CMA, makrootofajide olduğu gibi otofagozoma ihtiyaç duymadan LAMP-2a reseptörü aracılığıyla doğrudan lizozomun lümenine doğrudan translokasyon sağlar [79]. CMA, pentapeptid KFERQ modifi taşıyan hedef proteinleri tanıyarak mikrootofajiden daha seçici bir degradasyon sağlar. Sitoplazmada HSC70, kompleks HSC70 substratını oluşturmak için hedef proteinlerdeki KFERQ dizisini tanır ve kompleks HSC70-substratı, LAMP-2A'nın sitosolik kuyruğu ile etkileşime girerek, hedef proteinin lizozom lümenine translokasyonunu sağlar. [84].

2.5 5'-ADENOSİN MONOFOSFAT İLE AKTİVE EDİLMİŞ PROTEİN KİNAZ (AMPK) SİNYAL YOLAĞI

5'adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) metabolik yolları kontrol ederek enerji dengesinin korunmasını sağlar. Serin/terionin kompleksi olan AMPK; katalitik α -alt birimi (α -1, α -2), bir iskelet β -alt birimi (β -1 ve β -2) ve düzenleyici alt birim (γ -1, γ -2 ve γ -3) olmak üzere üç ana alt birimden oluşur [85]. AMPK heterodimerleri normalde α - alt birimi kinaz bölgesinde bulunan treonin 172 (Thr172) fosforilasyonundan sonra aktifleşir. Memelilerde AMPK, 5'-AMP'nin; yukarı akış kinazları tarafından Thr172 fosforilasyonun gerçekleştirilmesi, protein fosfatazlar tarafından Thr172'nin defosforilasyonun inhibisyonu ve allosterik aktivasyon, yoluyla bağlanması sonucu aktifleşir [86]. α - alt biriminin N-terminal bölgesinde bulunan Thr172

kalıntısı, AMPK aktivitesini kısa süreli düzenleyen birçok farklı yukarı akış kinazı tarafından fosforile edilebilir. Karaciğer Kinaz B1 (LKB1) kinazı AMPK aktivasyonu için gereken önemli bir yukarı akış kinazıdır. LKB1 kinazı çeşitli sinyallere yanıt olarak Thr172'yi fosforile edebilir [87]. Ayrıca AMPK Ca^{+2} ve DNA hasarı artışına bağlı olarakta aktive edilebilir. Thr172 LKB1'den bağımsız olarak Kalsiyum/Kalmodülene bağımlı protein kinaz kinaz 2 (CAMKK2) tarafından kalsiyum akışına yanıt olarak fosforile edilebilir [88]. Glikoz açlığında AMP'den bağımsız olarak AMPK aktivasyonunu sağlayan hücresel bir mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizma glikoz yoksunluğunda, v-ATPase, Ragulator, AXIN, LKB1 ve AMPK'dan oluşan bir lizozomal kompleks oluşumunu sağlar ve bu kompleks Thr172'de LKB1 tarafından AMPK aktivasyonu sağlar.[89]. AMPK çeşitli ilaçlar yoluyla teröpatik olarakta aktive edilebilmektedir. Bu teröpatik ajanların AMPK'yı aktive ettiği mekanizmalar; 1) hücre içi AMP ve ADP'yi arttırarak dolaylı yoldan AMPK'yı aktive edenler, 2) AMP'yi taklit ederek AMPK aktivasyonu sağlayanlar, 3) Karbonhidrat bağlanma arayüz modülü (CBM) ve kinaz alanı arasındaki bölgeye seçici olarak bağlanarak AMPK'yı aktive eden bileşikler, olarak üç ana sınıfa ayrılır [90]. (Şekil 7) Birinci sınıf bileşikler Metformin ve diğer biaguanid sınıfı bileşiklerdir, bu bileşikler mitokondriyal solunum ve ATP üretimini inhibe ederek AMP/ADP seviyesini arttırır ve AMPK aktivasyonunu sağlarlar [70,75]. İkinci sınıf bileşikler AMP analogu olan ön ilaçlar olarak uygulanır ve en bilineni 5-aminoimidazol-4-karboksamid-1- β -D-ribofuranosittir (AICAR) [85,90]. Üçüncü sınıf bileşikler AMPK'ya doğrudan bağlanan ve aktive eden küçük moleküllerdir ve ilk üyesi tienopiridon A769662'dir [85]. Aktifleşen AMPK glikoz metabolizması, lipid metabolizması, protein sentezi, otofaji ve mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesini sağlar. AMPK otofajide görev alan serin/treonin protein kinaz olan Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinaz 1/2'yi (ULK-1/2) fosforilleyerek aktive eder ve hücrede otofaji mekanizması devreye girer [91]. Protein sentezinin düzenlenmesinde görevli olan p-AMPK, TSC2 ve raptorun fosforiasyonu yoluyla mTOR'u inhibe ederek translasyonun inhibisyonunu sağlar [85]. Asetil CoA'nın Malonil CoA'ya karboksillenmesi yağ asidi sentezini başlatır. Asetil CoA karboksilaz 1 (ACC1) yağ asidi sentez reaksiyonunun katalizörüdür. AMPK ACC1 enzimini inhibe ederek yağ asidi sentezinin inhibisyonunu sağlar [92]. AMPK, lipid kolesterol ve glikoz metabolizmasını düzenleyerek ve protein

sentezini baskılayarak, otofaji aktive edici kinazların aktivasyonunu sağlayarak enerji dengesinin ve metabolik fonksiyonların düzenlenmesini sağlar.



Şekil 7. AMPK'nın moleküler regülasyonu [92].

2.6 PI3K/AKT/mTOR SİNYAL YOLAĞI

Reseptör tirozin kinazlara (RTK) büyüme sinyali bağlanmasıyla aktifleştirilen PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı metabolizma, hücre büyümesi ve çoğalmasını düzenlemektedir. Bu sinyal yolu p110 katalitik alt birimi ve p85 düzenleyici alt birimlere sahip heterodimer bir yapı olan PI3K'in RTK'lar aracılığıyla aktifleştirilimesiyle başlar. p85 p110 kompleksinin PIP2'nin PIP3'e dönüştürülmesini sağlaması yolağın diğer üyelerinin uyarılmasını sağlar. PIP3, PTEN tarafından defosforillenerek PIP3 PIP2 dönüşümüne ve sinyal yolunun durdurulmasına neden olur [93]. PIP3'ün PDK1'i aktifleştirmesinden sonra, Treonin308'den (Thr308) PDK1 tarafından ve serin473'te (Ser473) mTORC2 tarafından aktifleştirilen Akt sinyal yolunun devamlılığını sağlar [94]. p-Akt GSK-3, FOXO, Bad, Kaspaz9, NF- κB, mTOR ve p21 proteinlerinin fosforilasyonunu sağlayarak glikoz metabolizmasını, hücre büyümesini, proliferasyonu ve hücre döngüsünün düzenlenmesini sağlar [95]. Bax ve Bcl-2 gibi apoptozla ilişkili proteinlerin düzenlenmesini sağlamaktadır. PI3K/Akt/mTOR yolağı Bcl-2'nin yukarı

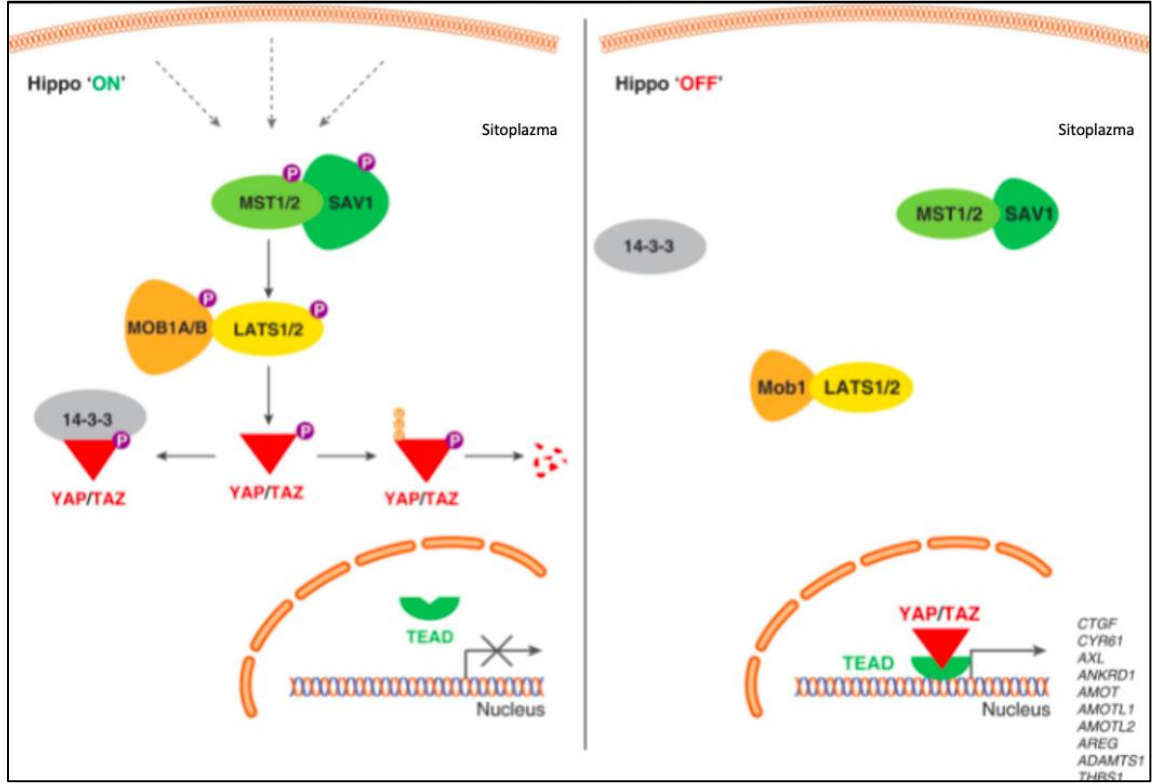
yapmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada PI3K/Akt aşağı düzenlenmesinin neden olduğu mTOR baskılanması sonucu mide, meme, kolon, prostat ve karaciğer karsinomlarında otofajiyi indüklediği gösterilmiştir [98].

2.7 Hippo Sinyal Yolağı

Hippo sinyal yolağı ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de tanımlanan evrimsel olarak korunmuş bir serin / treonin kinaz sinyalleme kaskadıdır [99]. Hem *D. melanogaster* hem de memelilerde hippo sinyal yolu, hücre çoğalmasını, hücre ölümünü ve hücre farklılaşmasını modüle ederek hücre sayısını düzenler [100]. Bu sinyal yolu hücre proliferasyonunu ve rejenerasyonu düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır ayrıca kanser dahil çeşitli hastalıkların ilerlemesinde de rol oynadığı bilinmektedir. Hippo sinyal yolu Memeli Ste20 benzeri kinazlar 1/2 (MST 1/2), büyük tümör baskılayıcı 1/2 (LATS 1/2) ve YES ile ilişkili proteini (YAP) ve onun paraloğu PDZ bağlanma motifi transkripsiyonel ko-aktivatör (TAZ) oluşmuştur [101]. Hippo yolağının temeli serin/treonin fosforilasyonuna dayalıdır. Hippo yolunun aktivasyonu, YAP'ın ser127'de LATS 1/2 aracılığı ile fosforilasyonu ve buna bağlı olarak YAP inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Fosforillenmiş YAP, sitoplazmada 14-3-3 ile etkileşimi sonucunda sitoplazmada parçalanır ve bu durum hedef gen transkripsiyonun inhibisyonu ile sonuçlanır [100,102]. Hippo yolu inaktive olduğu durumda ise etkisiz durumda olan MST1/2 ve LATS1/2 YAP/TAZ'ın defosforile olmasını sağlayarak çekirdekte YAP/TAZ birikimine yol açar. Çekirdekte biriken YAP/TAZ hücre proliferasyonu gibi çeşitli hücresel faaliyetleri düzenleyen gen transkripsiyonlarını uyarmak için TEAD ailesi transkripsiyonel faktörleri (TEAD1-4) ile bağlanır [103].

1999 yılında St. John ve ark. LATS1'den yoksun farelerde hipofiz hiperplazisi gerçekleştiği ve tümör geliştiğini keşfetti ve daha sonraki çalışmalarda LATS 'ın kanser hücreleri için tümör baskılayıcı görevi gördüğü kanıtlandı [104, 105]. Yapılan çalışmalarla Hippo sinyal yolunun tümör baskılayıcı bir yol olduğu ve meme kanseride dahil bir çok kanser türünde etkili olduğu gösterilmiştir. Kontrolsüz hücre çoğalması malignitenin ana ögesidir ve Hippo-YAP/TAZ daki fonksiyon kaybı kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olmaktadır (Şekil 9). Kanser neden olduğu ölümlerin ve kanser tedavisinde zorlukların bir nedeni de metastazdır. YAP/TAZ aktivasyonu epidermal mezankimal geçiş (EMT), istila ve bağışıklık sisteminden kaçma gibi metastazla ilişkili

hücresel süreçleri destekleyerek metastazın gerçekleşmesine katkı sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, metastatik pankreas tümörlerinde YAP/TAZ aktivasyonu primer tümörlere kıyasla arttığı göstermektedir [106]. Hücre çoğalması ve metastazın yanı sıra YAP/TAZ aktivasyonu ilaç direnci ve kanser nükslerinde de rol oynamaktadır. Meme kanseri kök hücrelerinde (BCSC) TAZ'ın aşırı ekspresyonu çoklu ilaç direnci proteinlerinin aktivitesini artırır [107]. YAP/TAZ yukarı akış kinazı olan LATS1/2'nin fonksiyon kaybı da ilaç direnciyle ilişkilendirilmiştir. Kemotröpatik bir ilaç olan paklitaksel duyarlı SKOV3 yumurtalık kanseri hücrelerinde siRNA aracılı LATS1/2 yıkımı paklitaksel tedavisi ile uyarılan hücre ölümünde azalmaya neden olmuştur [107].



Şekil 9. Hippo sinyal yolunun moleküler regülasyonu [99].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MATERYALLER

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlara, hücre kültürü ekipmanlarına, kimyasal sarf malzemelerine, antikorlara ve kitlere ayrıntılı olarak ekler bölümünde yer verilmiştir.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Metforminin Hazırlanışı

Metformin Sigma Aldrich firmasından (PHR1084) olarak temin edildi. 1 M olacak şekilde saf su ile hazırlandı. 1 M olarak hazırlanan Metformin 1mM, 2mM, 5mM ve 10mM olacak şekilde hücre uygulaması öncesi dilüsyon hesaplamasıyla hesaplanarak 24 sa, 48 sa ve 72 sa olarak uygulandı.

3.2.2 Kullanılan Hücre Hattı ve Özellikleri

MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) üçlü negatif meme kanseri hücresi olup metastatik meme adenokarsinomu olan 51 yaşında bir kadından elde edilmiştir. Adherent ve epitalyal yapıda bulunan MDA-MB-231 hücreleri östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) içermediği için oldukça agresif ve invaziv meme kanseri hücre hattıdır.

3.2.3 Hücre Kültürü

Üçlü negatif meme kanseri hücresi MDA-MB-231(ATCC HTB-26) hücreleri %5 CO₂ içeren 37°C' lik etüvde, %10 fetal sıgır serumu (FBS), 100 mg/ml Streptomisin, 100 U/ml Penisilin ve 25 mM glikoz içeren DMEM (Dulbecco's modified Eagle serum) besiyerinde büyütülmüştür. Hücre sayısında yeterli artış sağlandıktan sonra hücrelerin bulunduğu 75 cm²'lik petri kapları 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Bu işlemten sonra petri kaplarına 2 ml Tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) eklenerek 37°C'lik etüvde yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin zarar görmesi önlemek için hücrelerin üzerine uygun besiyerleri eklenerek tripsinin inaktivasyonu gerçekleştirilmiş ve hücrelere yıkama yapılarak 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Hücreleri içeren falkon

tüpleri 500 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant döküldükten sonra 1 ml uygun besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Neubauer homositomeresine 10 µl hücre süspansiyonu eklenerek hemositometrede bulunan 25 karedeki canlı hücreler sayılmış 10^4 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır. Petri kaplarına 6×10^5 hücre ekilerek pasajlama gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Hücre Dondurma

Hücre ekiminden sonra yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerin bulunduğu 75 cm²'lik petri kapları 2 ml PBS ile yıkanır. Bu işlemten sonra petri kaplarına 2 ml Tripsin-EDTA) eklenerek 37°C'lik etüvde yaklaşık 5 dakika bekletilir. Hücrelerin zarar görmesi önlemek için hücrelerin üzerine uygun besiyerleri eklenerek tripsinin inaktivasyonu gerçekleştirilir ve hücrelere yıkama yapılarak 15 ml'lik falkon tüplere alınır. Hücreleri içeren falkon tüpleri 500 g'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant döküldükten sonra 1 ml dondurma medyası (freezing media) eklenerek pipetaj yapılır. Elde edilen homojen süspansiyon uygun olarak işaretlenmiş kriyo tüplerine konur ve -80°C'de izopropanolde bekletir. Hücre stokları sıvı azota alınır ve burada saklanır.

3.2.5 MTT Hücre Canlılık Testi

Meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) 96 kuyucuklu petriye her kuyucukta 1×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılır ve hücreler 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilir. Daha sonra hücreler 1-10 mM metformin ile 24 ve 48 saat 37°C'de inkübe edilir. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerine 10 µl 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) ajanı eklenerek 4 saat 37°C'de inkübe edilir. MTT ajanı ile inkübasyondan sonra canlı hücrelerin tarafından MTT ajanını metabolize ederek oluşturduğu formazon kristallerini çözmek için 100 µl DMSO eklenerek karanlıkta 5 dakika bekletilir. Formazon kristallerinin DMSO ile çözünmesinden sonra hücre canlılığı oranı Mikroplaka ELISA okuyucuda 570 nm'de absorbans ölçümü yapılır. Elde edilen sonuçlar en az üç dört tekrarlı üç farklı deneyin ortalaması alınarak gösterilmiştir.

3.2.6 Koloni Oluşum Deneyi

Meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) 6 kuyucuklu petriye 2×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılır. 10 mM Metformin 24 sa ve 48 sa boyunca uygulanır. 24 sa ve 48 sa metformin uygulaması sonunda hücreler üzerindeki besiyeri çekip atılır ve taze besiyeri ile değişimi yapılır. %90 yoğunluğa ulaşan kontrol grubu hücrelerine göre yaklaşık 14 gün sonunda medya uzaklaştırılır. Hücreler 1X PBS ile yıkanır. 3:1 oranda %100 metanol: asetik asit fiksatif ile hücreler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir. Hücreler üzerine 500 µl %0,5 kristal viole eklenerek, 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. 20 dakika sonunda distile su ile yıkanarak boya uzaklaştırılır. Kolonilerin çekimi ve sayımı gerçekleştirilir.

3.2.7 Tripan Mavisi ile Hücre Sağkalımının Belirlenmesi

Metformin'in MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde, hücre çoğalması üzerine etkisini belirlemek amacıyla hücre sağ kalım deneyi yapılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 10 mM Metformin uygulanmıştır. Her 24, 48 ve 72 saat sonunda hücreler tripsin ile toplanarak 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Hücre pelleti 100 µl besiyeri ile çözülür. Çözülen pelletlerden 10 µl alınır ve 10 µl tripan mavisi ile karıştırılarak hemositometride sayımı yapılır. Hücre sağkalım testi en iki tekrarlı üç farklı deneyin ortalaması alınarak incelenmiştir.

3.2.8 Floresan Boyama

3.2.8.1 DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) Boyaması

Meme kanseri hücresi olan MDA-MB-23 her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu petriye ekim yapılır ve 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilir. Daha sonra hücrelere 1, 2, 5 ve 10 mM metformin uygulanır. İlaç ile inkübasyondan sonra hücre besiyeri 5mg/ml DAPI içeren besiyeri ile değiştirilir ve 10 dakika karanlıkta bekletilir ve floresan mikroskopuyla incelenir. Eksitasyonu 359 nm ve emisyonu 420 nm'de DNA'ya bağlanan boya mavi olarak gözlemlenir.

3.2.8.2 DİOC6 (3',3-Diheksiloksakarbosiyamin İyodür) Boyaması

Meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu petriye ekim yapılır ve 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edilir. Daha sonra hücrelere 1, 2, 5 ve 10 mM metformin uygulanır. İlaç ile inkübasyondan sonra hücrelerin bulunduğu besiyeri 5mg/ml DİOC6 içeren besiyeriyle değiştirilir. Hücreler 30 dakika 37°C 'de karanlıkta inkübe edilir. İnkübasyondan sonra hücreler florasan mikroskobu altında sağlıklı hücreler eksitasyonu 484 nm'de emisyonu 501 nm'de yeşil olarak gözlemlenmiştir.

3.2.8.3 PI Boyaması

Meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231(ATCC HTB-26) her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu petriye ekim yapılır ve 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edilir. Daha sonra hücrelere 1, 2, 5 ve 10 mM metformin uygulanır. İlaç ile inkübasyondan sonra hücrelerin bulunduğu besiyeri 5mg/ml PI içeren besiyeriyle değiştirilir. Hücreler 30 dakika 37°C 'de karanlıkta inkübe edilir. İnkübasyondan sonra hücreler florasan mikroskobu altında ölü hücreler kırmızı olarak gözlemlenmiştir.

3.2.9 Total protein İzolasyonu

100 mm'lik kültür petri kaplarına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılarak gece boyunca 37°C ve %5 CO_2 etüvde inkübe edilir. Ardından 10 mM metformin 24 saat uygulanır. Hücreler, 1X PBS ile kazıma yöntemiyle petriden toplanır. Petriden toplanan hücrelerin 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürülmesi sağlanır. Bu işlem petrideki bütün hücreler toplanana kadar devam ettirilir. Santrifüj ile çöktürülen hücrelere hücre lizis tamponu eklenir ve 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda örnekler inkübe edilir. İnkübasyondan sonra örnekler 20 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de 13200 rpm'de santrifüj edilir. Üst faz yeni bir eppendorf tübüne alınarak protein tayini gerçekleştirilir.

3.2.10 Bradford Analizi

İzole edilen proteinlerin miktarını belirlemek için Bradford analiz tekniği kullanılır. 96 kuyucuklu petri kullanılarak 1,5 µl konsatrasyonda artan dozlarda (1, 2, 3, 4 ve 5 µl) sıgır serum albümin (BSA) kullanılarak standart eğri oluşturulur. 96 kuyucuklu petriye her protein örneğinden 1 µl konulur üzerine 200 µl Bradford çözeltisi ilave edilerek 5 dakika karanlıkta inkübe edilir. 595 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile okuma yapılır. Oluşturulan standart eğri kullanılarak absorbans değeri bilinen izole protein örneklerinin konsantrasyonu hesaplanır.

3.2.11 İmmunoblotlama

3.2.11.1 Proteinlerin hazırlanması ve SDS-PAGE’de Yürütülmesi

30 µg protein ile 5X Laemli tamponu 1:4 oranında karıştırılır ve 5 dakika boyunca 95°C’de inkübe edilir. İnkübasyondan sonra proteinler %4 yükleme jeli ve %10 veya %15 ayırma jeli SDS-PAGE hazırlanır ve proteinler ilk kuyucukta protein belirteci olacak şekilde jele yüklenir ve 85 voltta (V) 4 saat boyunca yürütülür.

3.2.11.2 Membran Transfer ve Bloklama

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılır. Poliviniliden florid (PVDF) membran kullanılacak hale gelmesi için metanol ile aktive edilir, aktifleşen PVDF ayırma jelinin altına yerleştirilir. Membranın altında ve jelin üstünde olacak şekilde yerleştirilen transfer tamponuyla ıslatılmış filtre kağıtlarıyla birlikte sistem transfer kasetine yerleştirilir. 2,5 miliamper (mA) değişen kDa’a bağlı olarak transfer gerçekleştirilir. Transfer gerçekleştikten sonra membranlar %5’lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilir ve bloklama işlemi gerçekleştirilir.

3.2.11.3 Primer ve Sekonder Antikor İşaretleme ve Bantların Görüntülenmesi

Bloklanmış membranlar 1:1000 olarak hazırlanan primer antikorunda (Beclin, LC3, Atg5, Atg12, mTOR, PARP, BCL-2, Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9) +4 °C’ de bir gün bekletilir.

Primer antikor işaretlemesinden sonra membran ikinci antikora alınmadan önce 5 dakika olarak üç kere 1xTBS-T zeltisi ile yıkanır. Daha sonra membran 1:3000 hazırlanan ikincil antikor ile +4°C’ de bir gün boyunca bekletilir. Membran TBS-T zeltisi ile 5dk boyunca iki kere ve TBS zeltisi ile 5dk boyunca bir kere yıkanır. Yıkama işleminden sonra örnekler kemiluminisans tamponu (ECL) ile 3 dakika inkübe edilir. Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatr aletinde görüntüleme gerçekleştirilir.

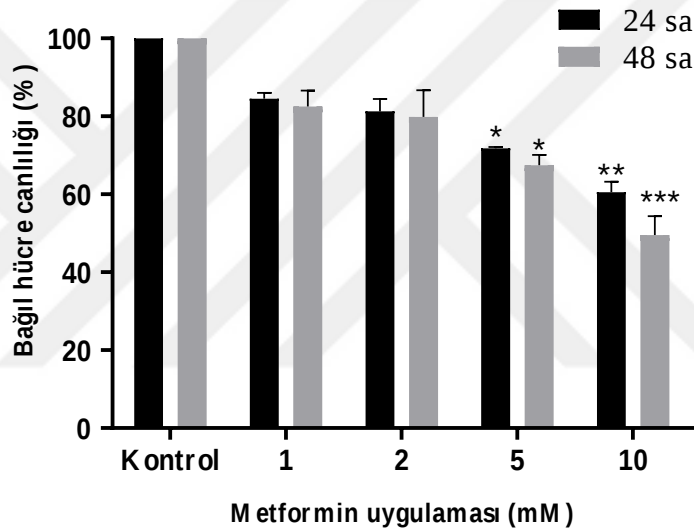
3.2.12 İstatiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar en az iki tekrarlı üç farklı deneyin ortalamasıdır. Deneylerden elde edilen tüm sayısal sonuçlar GraphPad Prism 6 kullanılarak grafik haline dönüştürülmüş ve istatistiksel olarak analizleri, Two-way ANOVA metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anlamlı değişimler için p değeri sırasıyla *p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001 olarak gösterilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1 Metformin doza bağımlı olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre canlılığını azaltmıştır

Metformin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için MTT sağkalım testi gerçekleştirilmiştir. Metformin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerin doza (1-10 mM) ve zaman (24-48 saat) bağılı olarak uygulanmıştır. Metformin'in 10 mM 24 saatlik uygulamasında %60 oranında hücre canlılığı gözlemlenirken 10 mM 48 saatlik metformin uygulamasında %50 oranında hücre canlılığı gözlemlenmiştir (Şekil 10).

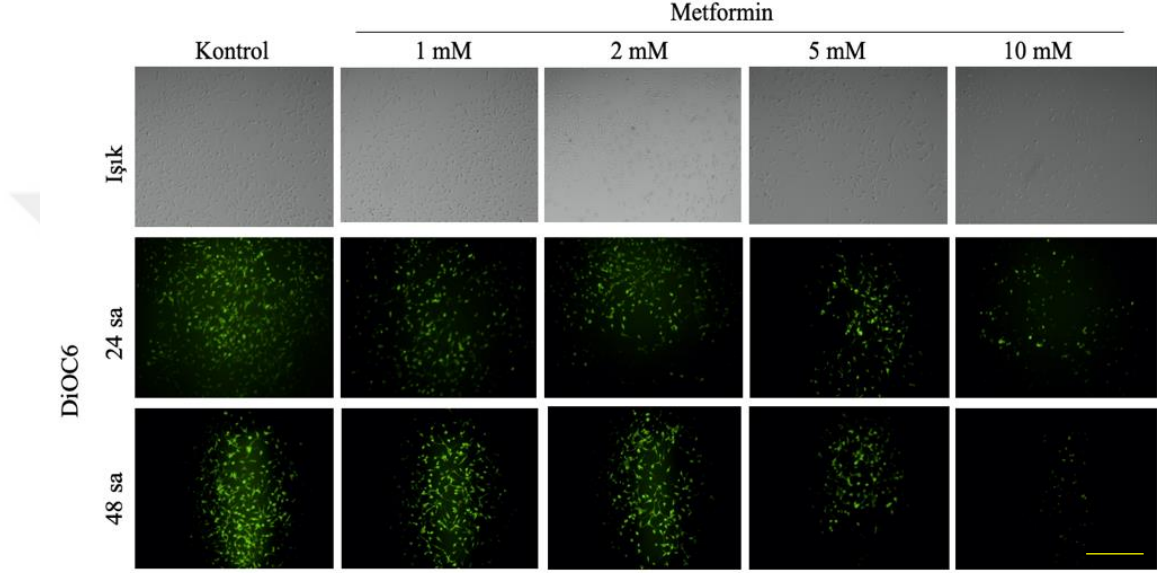


Şekil 10. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Metformin uygulaması MTT hücre sağkalım testi ile doza ve zamana bağılı olarak gösterilmiştir. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2 Zamana ve Doza Bağılı Metformin Uygulamasının MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Mitokondri Membran Potansiyeline Etkisinin Gösterilmesi

Metforminin zamana (24 sa, 48 sa) ve doza (1-10 mM) bağılı olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisini gözlemlemek için DAPI, DIOC6 ve PI boyamaları gerçekleştirilmiştir. Metforminin mitokondriyal membran potansiyeli (MMP)'ne bağılı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkisini gözlemlemek için DIOC6 boyaması ile incelenmiştir. Metforminin hücre ölümüne etkisi DNA kırıklarının görüntülenebilmesini sağlayan DAPI ve ölü hücre membranlarından difüze olan PI boyamaları ile incelenmiştir. DIOC6 ile boyanan canlı hücreler yeşil floresan renkte gözlenmiştir. 1 mM ve 2 mM

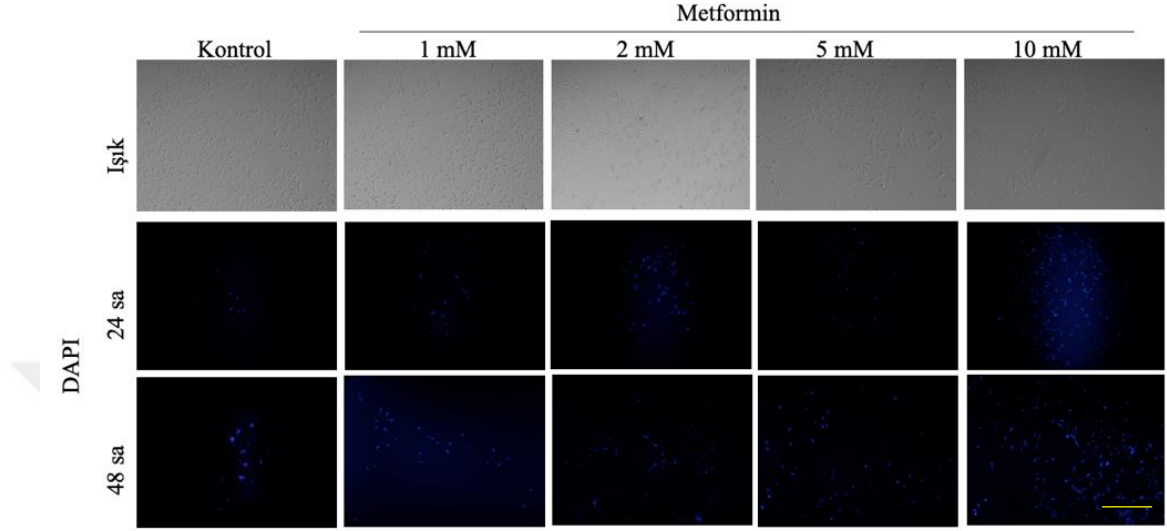
metforminin hem 24 sa hem de 48 sa uygulaması hücre canlılığında belirgin bir azalmaya sebep olmamıştır. Ancak 5 mM metformin 48 sa metformin uygulamasında daha etkili olmakla birlikte 24 sa uygulama süresinde de hücre canlılığını %50 oranında azaltmıştır. 10 mM metformin MMP kaybını arttırarak, MDA-MB-231 mem kanseri hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. Metformin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki zamana ve doza bağımlı etkisinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde DiOC6 floresan boyama ile gösterimi. Ölçek çubuğu: 50 μ m

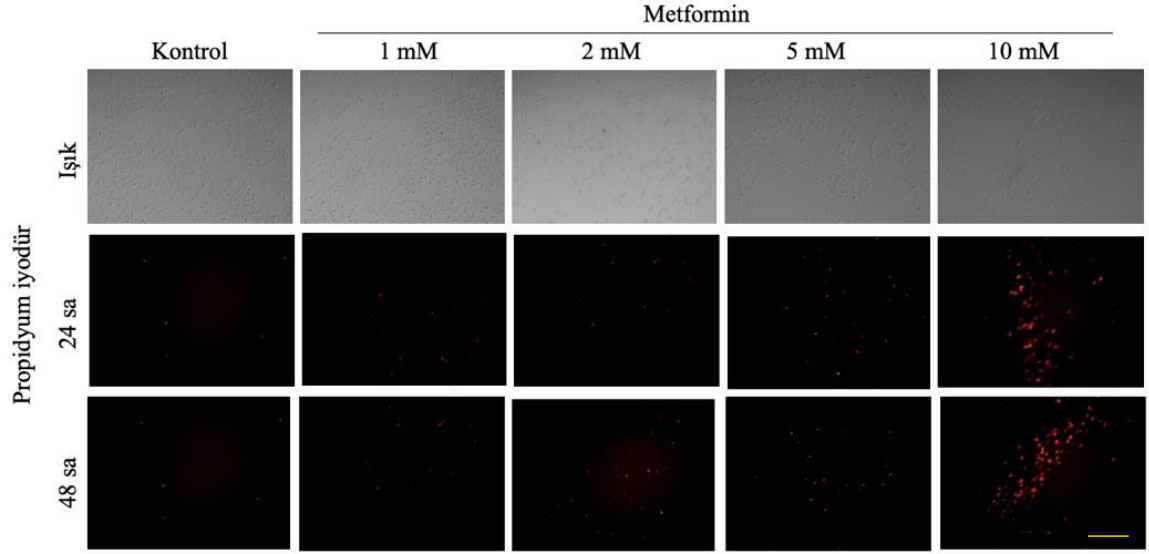
DAPI veya 4',6-diamidino-2-fenilindol, DNA'daki adenin-timinden zengin bölgelere güçlü bir şekilde bağlanan floresan bir boyadır. Floresan mikroskopisinde yaygın olarak kullanılır. DAPI çözeltide minimum floresansa sahiptir, ancak DNA'ya bağlandığında parlak bir şekilde floresan hale gelirler. Apoptoz sırasında DNA, çok sayıda DNA çift sarmal kırılması (DSB'ler) oluşturan internükleozomal bölümlerde kapsamlı parçalanmaya uğrar. Onların varlığı, apoptotik hücrelerin en karakteristik belirteçlerinden biri olarak kabul edilir. Apoptotik hücreleri tanımlamak için yaygın olarak kullanılan DAPI boyamada DSB'leri işaretleyen florokrom boyası olarak bilinmektedir. Metformin 1 mM, 2 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında 24 sa ve 48 sa uygulamalarını takiben incelendiğinde, DNA kırıklarında anlamlı bir artış gözlenmemiştir. 48 sa 10 mM

metformin uygulaması MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde DNA kırıklarına bağlı olarak hücre ölümünü arttırmıştır (Şekil 12).



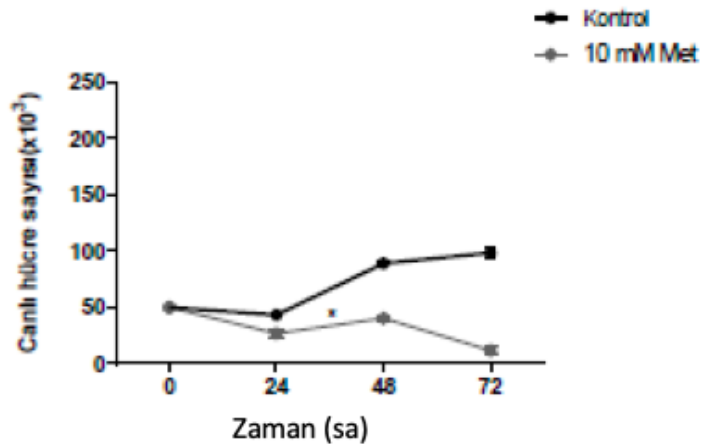
Şekil 12. Metformin uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama yöntemiyle zamana ve doza bağlı olarak gösterimi. Ölçek çubuğu: 50 μ m

Propidium iyodür, hücreleri ve nükleik asitleri boyamak için kullanılabilen bir floresan interkalasyon ajanıdır. PI, bazlar arasında çok az veya hiç dizi tercihi olmadan araya girerek DNA'ya bağlanır. Sulu bir solüsyondayken, PI maksimum 493 nm floresan uyarımına ve maksimum 636 nm emisyonu sahiptir. 10 mM Metformin uygulandığında membran bütünlüğü bozulan hücreler kırmızı renkte gözlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında doza ve zamana bağlı Metformin uygulamasının mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin PI boyama yöntemiyle gösterimi. Ölçek çubuğu: 50 μ m

Hücre sağkalım test sonuçlarına göre 24 sa ve 48 sa uygulanan 10 mM metformin hücre canlılığını sırasıyla %40 ve %50 oranında azaltmıştır. 10 mM metforminin zamana bağlı olarak hücre çoğalmasına etkisi tripan mavisi deneyi ile incelenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 mM metformin sitotoksik bir etki göstermiş, hücre canlılığında zamana bağlı olarak hücre çoğalma hızını baskılamıştır (Şekil 14).

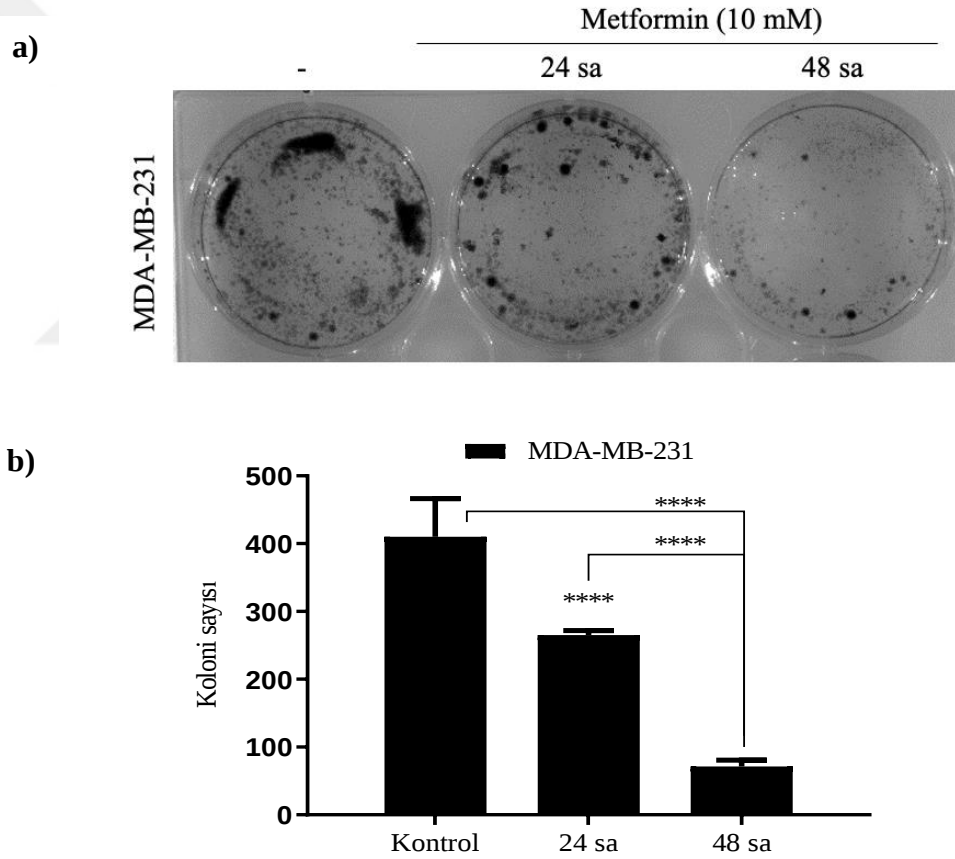


Şekil 14. 10 mM metformin hücre çoğalma hızına etkisinin tripan mavisi deneyi ile belirlenmesi. (* $p < 0,05$)

Sonuç olarak 10 mM metformin, 48 sa uygulama sürecinde MDA-MB-231 meme kanseri hücre canlılığını azaltmış, hücre proliferasyonunu baskılamış ve hücre ölümünü MMP kaybını tetikleyerek arttırmıştır.

4.3 Zamana bağlı Metformin uygulaması MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin apoptotik hücre ölümünü arttırmıştır

Son çalışmalar, metforminin birçok kanser türünde tümör büyümesini baskıyalabileceğini, kanser riskini azaltabileceği ve kanserli hastalarda iyileştirilmiş prognoz ile ilişkili olduğu göstermiştir [104,105,106].



Şekil 15. a) Metformin uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeline etkisinin incelenmesi. b) Zamana bağlı metformin tedavisi sonucunda oluşan kolonilerin sayısının Image J programı kullanılarak gösterimi (****p<0,0001)

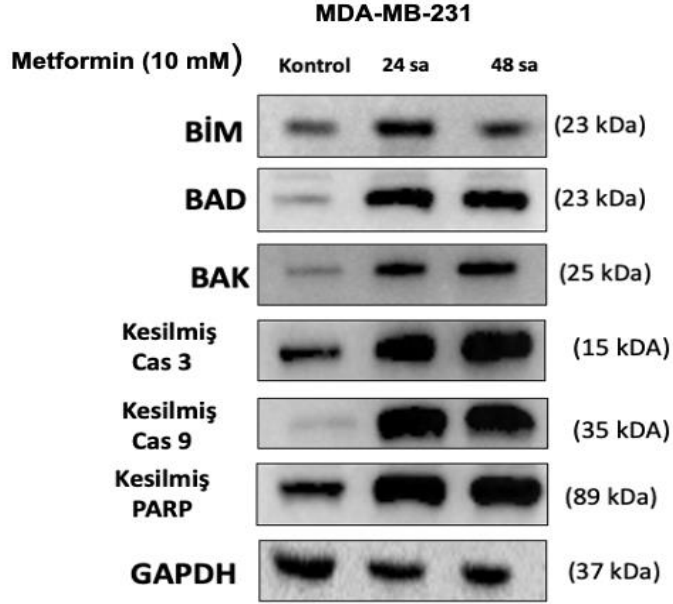
Bu alışmalar referans alınarak Metforminin MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri hedeflenerek hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek için koloni oluşumu deneyi gerçekleştirilmiştir. Metforminin uzun süreli etkisi incelendiğinde 24 sa ve 48 sa uygulamalarının koloni oluşturma potansiyeline etkileri kontrol grubuna (410 koloni) kıyasla sırasıyla 265 ve 72 koloni olarak belirlenmiştir. Koloni sayısı ve koloni çapları dikkate alındığına 10 mM metforminin 48 sa uygulaması anlamlı ölçüde hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (şekil 15a-b).

Metforminin apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkisini gözlemlemek için hücreler 24 ve 48 saat boyunca seçili konsantrasyon 10 mM metformin ile muamele edilmiş ve ardından toplam protein izolasyonu yapılmıştır. Apoptozla ilişkili proteinler (BİM, BAD, BAK, kesilmiş kaspaz 3, kesilmiş kaspaz 9 ve PARP) ifadeleindeki değişim immnoblottlama ile incelenmiştir. Apoptotik hücre ölümü hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik proteinler tarafından düzenlenmektedir. Pro-apototik protein olan BİM normal doku homeostazı için gerekli hücre ölümü ve hayatta kalmayı düzenlemek için BAD gibi pro-apototik proteinler ile çalışır. Kanseri hücrelerinde azalmış BİM ekspresyonu tümör oluşumunu indüklemektedir. Çalışmamızda metformin 24sa ve 48sa uygulamalarını takiben Bim, Bad ve Bak pro-apototik proteinleri incelenmiştir. Bunun sonucunda Bad, Bak protein ifadelerinde kontrol grubuna kıyasla 4 kat artış ve Bim protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 2 kat artış gözlenmiştir (şekil 16a-b).

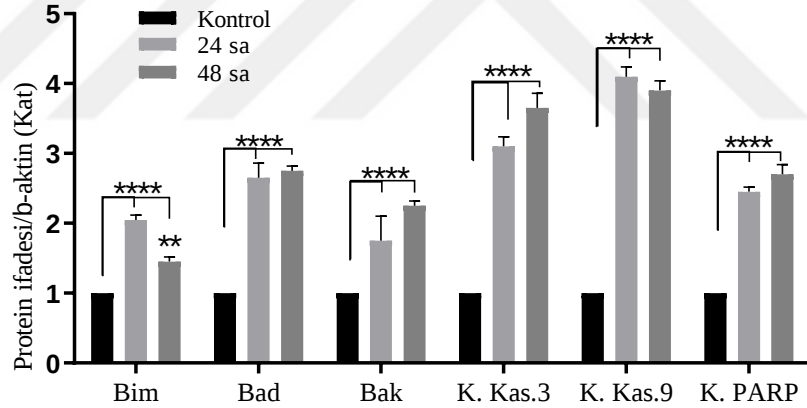
Apoptotik hücre ölümünde etkili olan bir diğeri proteinler ise kaspazlardır. Uygun sinyal gelene kadar inaktif durumda bulunan kaspazlar aktifleştikten sonra apoptotik yolda görev alırlar. Aktifleşen kaspaz 9 parçalanarak başlatıcı kaspaz görevi görerek efektör kaspaz olan kaspaz 3'n aktifleşmesini sağlar ve bu şekilde içsel apoptotik yol üzerinden hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar.

Metformin uygulamasının kaspaz 3 ve kaspaz 9'a apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkisini göstermek için immnoblottlama gerçekleştirilmiştir. Kesilmiş kaspaz 9 ve buna bağlı olarak kesilmiş kaspaz 3 protein ifadelerinde meformin uygulamasından sonra zamana bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla 4 kat artış gözlenlenmiştir (şekil 16).

a)



b)



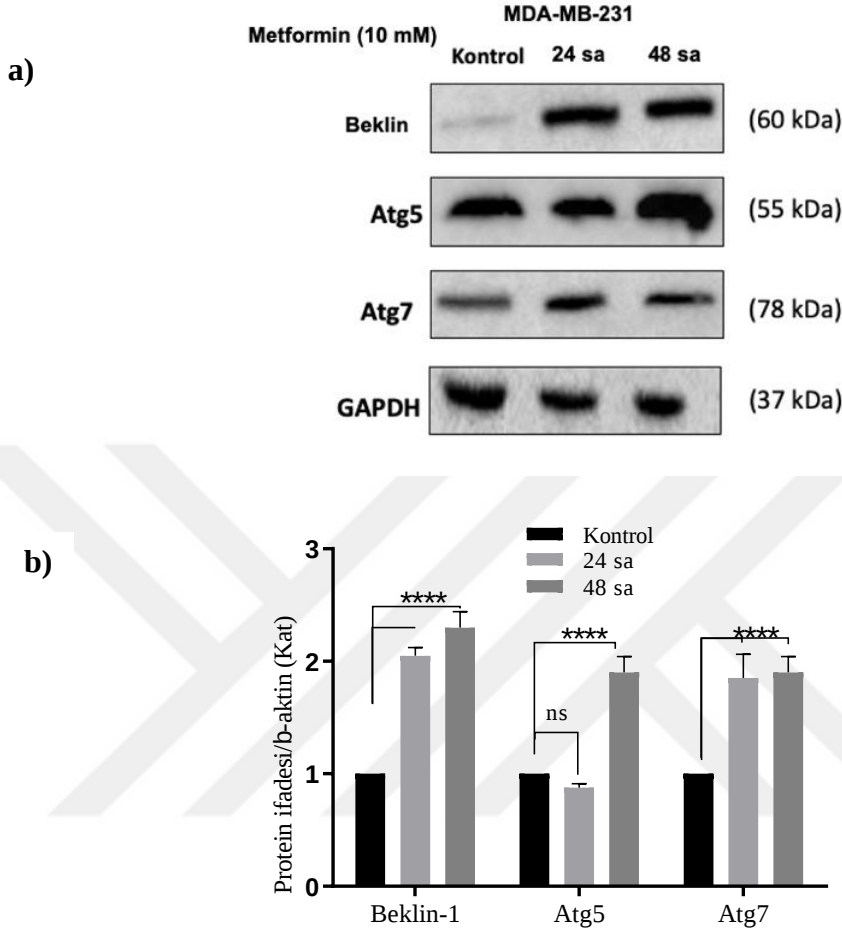
Şekil 16. a) MDA-MB-231 hücrelerinde Metformin uygulamasını takiben apoptoz belirteç proteinlerinin anlatımlarının GAPDH kontrol kullanılarak ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi. b) Image J programı kullanılarak, zamana bağlı metformin uygulamasına bağlı apoptotik proteinlerin anlatımlarındaki değişmelerin grafiksel gösterimi. (****p<0,0001)

Kaspaz aracılı apoptotik hücre ölümü PARP'ın bölünmesi yoluyla gerçekleşmektedir. Kaspaz 3 ekspresyonundaki artışa bağlı olarak kesilmiş PARP ifadesinde de artış gözlemlenmektedir (Şekil 16).

Sonuç olarak Metformin uygulaması ile MDA-MB-231 hücrelerinde uygulama süresine bağlı olarak, koloni oluşumunda 4 kat azalma meydana geldiği, proliferasyonun baskılandığı ve apoptotik belirteçlerin ifadelerindeki artış ile apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir.

4.4 Zamana bağlı metformin uygulaması ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde otofaji mekanizmasına etkisi

Organel hasarı, anormal proteinlerin varlığı ve besin yoksunluğu gibi çeşitli stresli koşullar altında meydana gelen hücre homeostazını düzenleyen bir süreç olan otofaji apoptotik olmayan hücre ölümüyle bağlantılı olmasına rağmen, hücre içi dengeyi sağlamasından dolayı bir hayatta kalma mekanizması olarak düşünülmektedir. Zamana bağlı metformin uygulamasının otofajiye bağlı hücre ölümü üzerindeki etkisini göstermek için 24 ve 48 saat metformin uygulamasından sonra otofajiyle ilişkili proteinler (Atg5, Atg7, Beklin-1) ile immünoiblottama incelenmiştir. Beklin-1 proteini otofajinin merkezi düzenleyicisidir. Ayrıca meme, yumurtalık gibi birçok kanser türünde ekspresyonunda azalma gözlemlenen bir tümör baskılayıcıdır. Bu nedenle azalmış Beklin-1 ekspresyonu tümörögenез ile ilişkilendirilmiştir. 24 ve 48 saat boyunca etkin doz olan 10 mM Metformin uygulaması sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde Beklin-1 ifadesinde sırasıyla 2 kat ve 2,3 kat artış gözlenmiştir. Bir diğer otofaji düzenleyicisi olan Atg5 otofagazom uzamasına katılımı açısından otofaji için gerekli merkezi bir düzenleyicidir. Yapılan çalışmalarda Atg5'in inhibe edilmesi kemoterapiye kısmi direnç neden olmuştur. Otofajinin düzenlenmesinde görev alan Atg7 eksikliği otofajiden yoksun bir fenotip ortaya çıkmasına ve hücre homeostazının bozulmasına neden olmaktadır. Hücreler 10 mM Metformin ile 24 ve 48 saat muamele edildikten sonra immünoiblottama gerçekleştirilerek Atg5 ve Atg7 protein ekspresyonundaki değişim gözlenmiştir (Şekil 17 a-b).

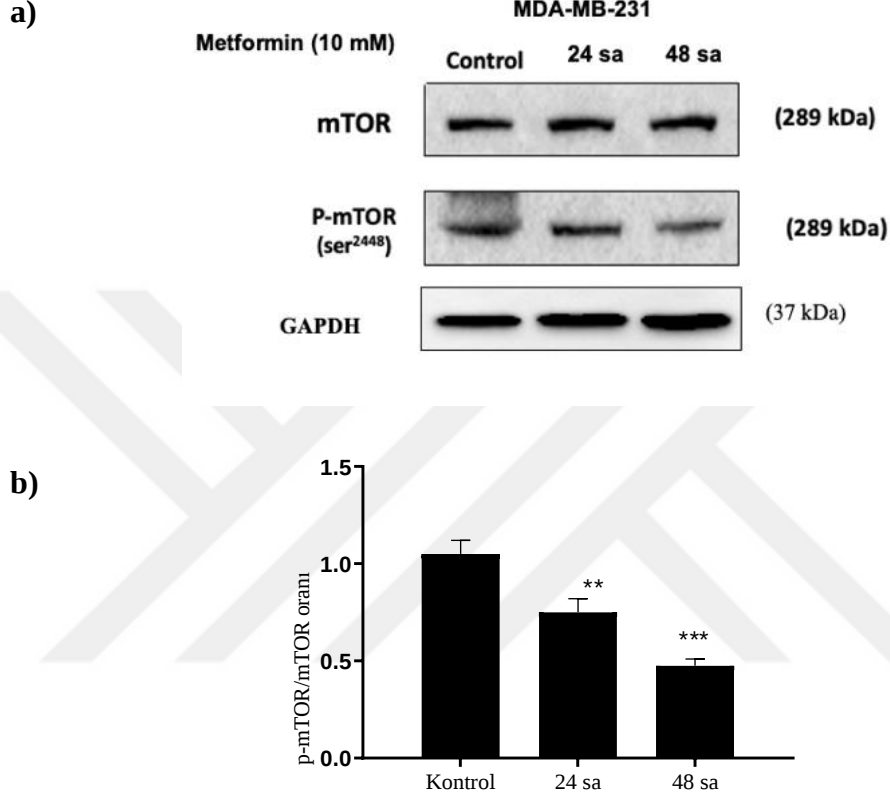


Şekil 17. a) Metformin uygulamasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde GAPDH kontrol kullanılarak otofaji belirteç protein anlatımlarının ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı kullanılarak gösterilmesi. b) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında zamana bağlı 10 mM Metformin ile tedavisi sonucunda otofaji belirteç proteinlerinin anlatımında meydana gelen değişikliklerin Image J programı kullanılarak grafiksel gösterimi. (****p<0,0001)

İmmünoiblotlama sonucunda önemli otofaji düzenleyicisi olan Atg5 ifadesinde 24 saat metformin uygulaması ile anlamlı bir fark gözlenmezken, 48 saat metformin Atg5 ifadesin 2 kat artışa sebep olmuştur. Atg7 ifadesinde hem 24 sa hem de 48 sa metformin uygulama süresine bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla 2 kat artış gözlenmiştir (Şekil 17 a-b).

48 saat metformin uygulaması sonrası fosforile mTOR (Ser2448) ifade seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 2 kat azalma gözlemlenmiş ancak total mTOR ifadesinde

metformin uygulamasına bağılı olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Şekil 18 a-b). mTOR aktivitesi otofaji mekanizması ile zıt çalışan bir mekanizmayı hücre sağkalımı ve enerji metabolizmasını desteklemektedir.



Şekil 18. a) Metformin uygulamasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde GAPDH kontrol kullanılarak mTOR ve p-mTOR protein anlatımlarının ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi. b) Zamana bağılı 10 mM Metformin ile tedavi sonucunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında otofajiye etkisi olan mTOR ve p-mTOR protein anlatım oranlarının Image J programı kullanılarak grafiksel anlatımı. (** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

Sonuç olarak, Metformin uygulaması, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptotik ölüme ek olarak mTOR aktivitesinin inhibisyonu yoluyla otofajiyi indüklediği ve otofajiye bağılı hücre ölümü kaynaklı tümör büyümesini inhibe edici etki gösterdiği gözlenmiştir.

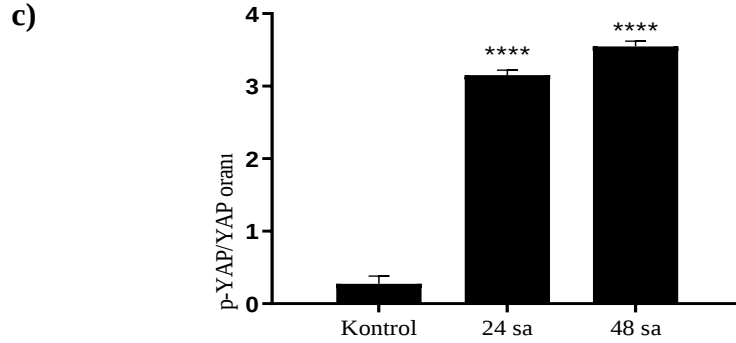
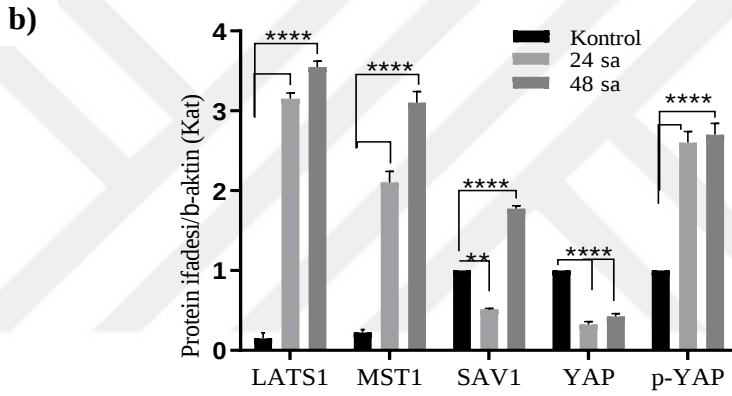
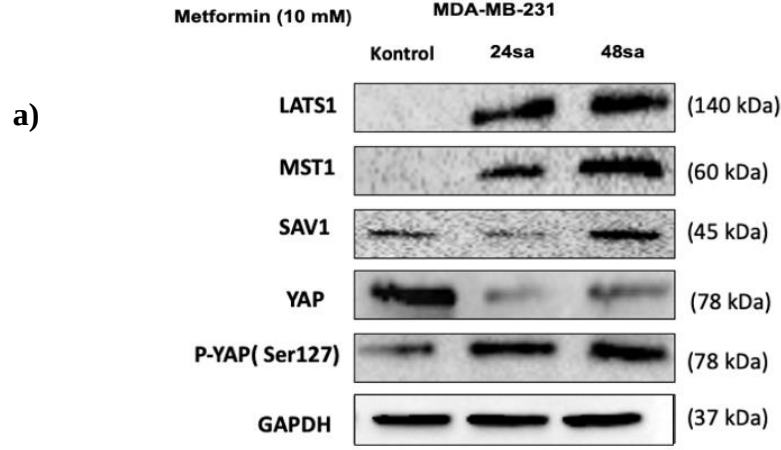
4.5 Metformin Hippo sinyal yolunun aktivasyonu ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu baskılamıştır

Hücre ölümü, hücre çoğalması ve hücre farklılaşmasını modüle eden hippo sinyal yolu hücre sayısını düzenleyerek, hücre homeostazında görev almaktadır. Birbiriyle ilişkili iki transkripsiyonel faktör olan YAP ve TAZ doku onarımında, organ boyut kontrolünde kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmada metformin uygulanan MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde Hippo sinyal yolu üzerindeki etkisini gözlemek için metformin ile 24 ve 48 saatlik uygulamaları takiben Hippo sinyal yolu belirteçleri olan YAP, TAZ ve p-YAP protein ifadelerindeki değişimler immunoblot analizi ile incelendi. Anti-apoptotik, hücre göçünü ve invazyonu destekleyici etkiye sahip olan YAP protein ifadesinin kontrol grubuna oranla 24 ve 48 saatlik metformin uygulamalarından sonra sırasıyla 0,3 kat ve 0,4 kat seviyelerine azaldığı gözlenmiştir (Şekil 19a-b).

Metformin 24 ve 48 saat uygulamaları YAP fosforilasyonunu sağlayarak apoptotik etkinliği arttıran p-YAP seviyesinde kontrol gruba kıyasla sırasıyla 2,6 ve 2,7 kat artışa neden olmuştur (Şekil 19a-b). p-YAP ifadesi total Yap ifadesine oranlandığında 24 sa metformin uygulaması 3 kat ve 48 sa metformin 3,5 kat artış sağlamıştır (Şekil 19c).

Birçok kanser türünde yüksek ekspresyon gösteren anti-apoptotik etkiye sahip Hippo sinyal yolu düzenleyicisi olan TAZ ekspresyonundaki artış kanser metabolizmasıyla ilişkilidir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda Metformin ile tedavinin YAP inhibisyonu üzerinde, MST1 ve LATS1 etkileşimi ve ekspresyonundaki artışa bağımlı veya bağımsız etki gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 19. a) Metformin uygulamasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde Hippo sinyal yolağı belirteç protein anlatımlarının gösterilmesi. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Proteinlerin ifadelerindeki değişimlerinin Image J programı kullanılarak grafiksel anlatımı. c) 10 mM Metformin uygulaması (24-48 sa) sonucunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında YAP ve p-YAP protein anlatım oranlarının Image J programı kullanılarak grafiksel anlatımı. (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$)

Bu çalışmada 24 ve 48 sa metformin uygulaması MST1 ifadesini sırasıyla 3,2 ve 3,6 kat ve LATS1 anlatım seviyesini sırasıyla 2,1 ve 3,1 kat arttırmıştır. Buna bağlı olarak YAP ifadesinde baskılanmaya neden olmuştur. Birçok kanser türünde tümör baskılayıcı etki gösteren SAV1 proteinin ifadesi metformin uygulamasından sonra MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde de 24 saat uygulama ile 0,5 kat azalmışken, 48 saat metformin uygulamasıyşa 1,8 kat artmıştır (şekil 19 a-b).

Sonuç olarak metformin 48 saat uygulamalarını takiben hippo sinyal yolu aktivasyonuna bağlı olarak apoptotik hücre ölümünde artış gözlenmiştir.



5 TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kanser nedenli kadın ölümlerinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır [3]. Meme kanseri duktal ya da lobular olarak gelişim göstermektedir. Birçok faktör meme kanseri gelişmesine neden olmaktadır. Bunların başında menopoza yaşı, genetik faktörler, ailesel ve bireysel kanser öyküsü ve çevresel etmenler gelmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda diyabetli kadınların meme kanseri olma oranının diyabetli olmayanlara göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur [9]. Günümüzde meme kanseri tedavisini ışıltı tutmak amacıyla birçok çalışma gerçekleştirilmekte ve çeşitli teröpatik ajanların meme kanseri üzerindeki etkisi incelenmektedir. Özellikle meme kanserinin bir alt tipi olan ve tüm meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturan üçlü negatif meme kanseri östrojen, progesteron hormonları ya da HER2 proteini kaynaklı olmadığı için hormonal tedavi için kullanılan teröpatik ajanlar ile tedaviye yanıt vermemektedir. Bu nedenle TNBC için alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Metformin tip 2 diyabet mellitus tedavisinde ve aşırı kilolu kişilerde kan şekerini düzenlemede kullanılan birinci basamak bir anti diyabetik ilaçtır. Diyabet hastası olan kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı sağlıklı kişilere göre artmaktadır, özellikle meme, pankreas, kolon, karaciğer ve rahim kanseri riski diyabetli kişilerde artış göstermektedir. Yapılan bir meta analizde uzun süreli Metformin tedavisinin T2D ile ilişkili meme kanseri riskini azaltacağı gösterilmiştir [108]. 2010 yılında Phoenix ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, uzun süreli Metformin ile tedavinin birincil tümör büyümesinde etkili olduğu gösterilmiştir [109]. Bu bilgiler ışığında Metforminin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattındaki etki mekanizmaları ve sinyal yolları araştırılmış ve araştırmalar in-vitro deneyler ile desteklenmiştir. MTT tekniği kullanılarak MDA-MB-231 hücrelerinin ilaç dozuna bağlı canlılık seviyesi belirlenmiştir. Tetrazolium tuzlarını mitokondrisi işlevsel hücrelerde NADH tarafında mor formazon kristallerine indirgenmesi sonucu meydana gelen renk değişimiyle hücre canlılığı ölçülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı zamana ve doza bağlı olarak 48 saatte 10 mM ilaç uygulamasıyla %50 azalmıştır. Liu ve arkadaşlarının 2020 yılında

metforminin ilaç dirençli meme kanseri hücrelerinde Metforminin hücre çoğalmasını göstermek için gerçekleştirdiği çalışmada da çalışmamıza benzer şekilde 10 mM Metformin 24 ve 48 saat uygulanmıştır.

Metformin birçok kanser türünde tümör büyümesini baskılayabildiği, kanser riskini azaltıcı etki gösterdiği ve kanserli hastalarda iyileştirilmiş hastalık seyri ile ilişkilidir [106]. Metforminin hücre çoğalması üzerinde etkisi yapılan koloni oluşum deneyi ile gösterilmiştir. 10 mM Metformin 48 saat süre boyunca MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine uygulandığında koloni oluşumunda azalma gözlemlenmiştir koloni oluşumundaki azalmaya bağlı olarak sağ kalım deneyi yapılmış ve bu deney sonucunda da metformin ile tedavinin kanser hücrelerinin sağ kalımını önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Koloni oluşumu ve proliferasyon kanser hücresinin metastazıyla ilişkilidir. Koloni oluşumu ve proliferasyonu baskılanamayan meme kanseri hücreleri çevre doku ve organlara geçiş yaparak diğer doku ve organlarda meme kanseri kökenli metastatik tümörler oluşmasına eden olur. Ayrıca sürekli proliferasyonla tümörün biyolojik davranışında proagresif değişiklikler ortaya çıkar. Metformin koloni oluşumunun ve proliferasyonun inhibisyonunu sağlayarak meme kanseri hastalarında iyileştirilmiş prognozla ilişkilendirilir.

Apoptoz, örneğin embriyonik gelişim sırasında veya yetişkin organizmalarda doku homeostazını korumak için istenmeyen veya hatalı gelişim gösteren hücrelerin immünolojik olarak yok edilmesini sağlayan programlanmış hücre ölümü şeklindedir [110]. Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2, p53 ve kaspazlar rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesi genlerin homodimer ya da heterodimer olması hücrenin apoptoza eğilimli olup olmamasına bağlıdır. Hücrenin apoptoza eğilimli olması proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 aile üyelerine bağlıdır; proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir. Sitozolda yer alan proapoptotik proteinler; Bim, Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Noxa ve Puma'dır. Bu proteinler apoptozu indükleyici görevlerini Sitokrom-c ve Apoptoz indükleyici faktör salınımını arttırarak göstermektedir. Metformin proapoptotik proteinler Bim, Bad, Bak ve Bax ekspresyonunda artış sağlayarak over kanser hücrelerinde apoptoza eğilimi

arttırmaktadır. Metforminin yumurtalık kanseri hücrelerinde hücre büyümesi ve hücre göçü üzerindeki etkisini göstermek için gerçekleştirilen çalışmada Bad, Bak, Bax ve Bim protein seviyelerinde artış gözlemlenmiştir [111]. Çalışmamızda da gerçekleştirilen bu çalışmayla benzer sonuçlar elde edilmiştir. 10 mM Metformin ile 24 ve 48 saat boyunca tedavi sonrası MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkiyi göstermek için proapoptotik proteinler olan Bad, Bak ve Bim ekspresyonu immünoiblotlama tekniği ile ölçülmüştür. İmmünoiblotlama sonrası proapoptotik proteinler olan Bad, Bak ve Bim protein ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Metformin proapoptotik protein ifadesinde artış sağlayarak, meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükler.

Bir başka apoptoz düzenleyici proteinde kaspazlardır. Sistein proteaz olan kaspazlar hücrede inaktiftirler, proteinleri parçalama yeteneği sayesinde birbirlerini aktiveleştirirler ve farklı proteinleri parçalayarak apoptozu indüklerler [112]. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2,8,9,10), Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7) ve İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Kaspazlar hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarında geri dönüşsüz bir parçalanmaya neden olurlar. Jang ve arkadaşlarının T24 mesane kanseri hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada doza bağlı Metformin ile muameleden sonra kaspaz 3 ve PARP aktivitelerinde artış olduğu ve buna bağlı olarak apoptotik hücrelerde önemli bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir [113]. İçsel apoptoz yolu üyeleri olan kaspazlar sırasıyla aktive olarak hücrenin apoptoza gitmesini sağlarlar. Kaspaz 9, Bax proteini aktive edilir ve mitokondriden sitokrom c salınımı sağlanır. Kaspaz protein parçalanmasıyla kesilmiş (kırılmış) kaspaz 9'a dönüşerek aktive olur ve kaspaz 3 kesilimini ve buna bağlı PARP kesilimini sağlar ve hücrede apoptozu indükler. PARP çok çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyona sahip hücresel moleküldür. İlk başta DNA hasarlarının onarımında görevli olan PARP'ın ilerleyen süreçlerde apoptotik bir molekül olduğunda kanıtlanmıştır. PARP kaspazların bilinen birkaç hücresel substratından biridir. PARP'ı kaspazlar tarafından bölünmesi apoptozun bir özelliği olarak kabul edilir [114]. PARP kaspaz 3 ve kaspaz 7 tarafından bölünmesi aktivitesinin kaybına yol açarak DNA onarımının baskılanmasına neden olmaktadır. PARP'ın kaspaz bölünmesi, DNA bağlama alanının yakınında bir nükleer lokalizasyon sinyali içinde

meydana gelir ve 24 kDa ve 89 kDa fragmanlarının oluşumuyla sonuçlanır [115]. Çalışmamızda önemli apoptoz belirteçleri olan kesilmiş kaspaz 3, kesilmiş kaspaz 9 ve kesilmiş-PARP ifadelerinde metformin uygulamasına bağlı olarak artış meydana gelmiştir. Jang ve ark. T4 mesane kanseri hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışmaya [113] benzer olarak, çalışmamızda da Metformin tedavisi sonrası kaspaz bağımlı apoptoz üzerinde pozitif etki gözlemlenmiştir. Metformin ile tedavi meme kanseri hücrelerinde içsel apoptoz yolağı belirteçlerinin ekspresyonunda artışa neden olarak hücrenin programlanmış hücre ölümüne gitmesini sağlamıştır.

Otofaji besin yoksunluğu gibi olumsuz koşullara adaptasyon sağlamak için bir yanıt olarak, lizozomlar aracılığıyla oldukça sıkı kontrol altında olan hücrenin kendi kendini yok etme (self-eating) süreci olarak hücre homeostazını sağlar. Otofaji mekanizmasında hücreler kaspaz bağımsız yoldan hücre ölümüne gider. Hücrede otofajik hücre ölümünü düzenleyen mekanizmalar bulunmaktadır. Gözüaçık ve Kimchi'nin 2006 yılında yaptığı çalışmada antiapoptotik bir sinyal yolağında etkili olan mTOR aktivitesinin inhibe edilmesiyle, p53 aktivasyonu otofajiyi uyarır [116]. Burdan yola çıkarak çalışmamızda Western blot analiziyle mTOR ve p-mTOR protein ekspresyon seviyeleri ölçülerek Metforminin otofaji üzerindeki etkisinin mTOR mekanizmasına bağlı olup olmadığı incelenmiştir. Metforminin zamana bağlı uygulanması sonucunda mTOR ekspresyon seviyesi sabit kalırken p-MTOR ekspresyon seviyesinde zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir. Buna bağlı olarak Metforminin otofaji uyarıcı etkisinin mTOR sinyalleşmesine bağlı olduğu gösterilmiştir. Fagofor oluşumu ve otofagazom oluşumunda farklı moleküller görev almaktadır. Otofajinin ilk aşamasında fagofor oluşumu meydana gelir, fagofor kapandıktan Atg proteinleri uzaklaştırılarak Otofaglizozom oluşumu meydana gelir. Atg5, Atg7 ve Beclin önemli otofaji belirteçleridir. Atg7 tarafından aktive edilerek Atg12 ve Atg16 ile kompleks oluşturan Atg5 otofajik veziküllerde fagoforik membranın uzatılmasında rol oynamaktadır. Fagofor oluşumundan sonraki aşama olan otofagolizozom oluşumunun ilk aşamasında Beclin proteinleri yer alır. Metforminin mide kanseri hücrelerinde Becline bağımlı otofaji üzerindeki etkisini göstermek için yapılan çalışmada p-mTOR protein seviyesinde azalma meydana gelerek ve buna bağlı olarak Beclin protein seviyesine artma meydana gelerek mide kanseri hücrelerinde otofajinin

indüklendiği gösterilmiştir [117]. Gerçekleştirilen çalışmamızda metformin ile tedavi sonrasında MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde tedavi süresine bağlı olarak Beklin-1, Atg5 ve Atg7 preotein ifadelerinde artış gözlenmiştir. Sonuç olarak metformin ile tedavi üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde fagafor ve otofagazom oluşumunu destekleyerek ve mTOR inhibisyonuna bağımlı olarak otofajinin indüklenmesini sağlar.

İlk olarak *Drosophila melanogaster* model organizmasında keşfedilen Hippo sinyal yolağı organ büyüklüğü ve doku homeostazının merkezi bir düzenleyicisidir. Memeli Hippo sinyal yolu üzerinde yapılan çalışmalarda bu sinyal yolunun bazı üyelerinin kanser gelişiminde role sahip olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkarılmıştır, MST1/2, LATS1/2, YAP1/2, TAZ1/2, SAV kanser gelişiminde rol oynayan hippo sinyal yolu belirteçleridir [118]. Hippo sinyal yolu proliferasyonu inhibe ederek, apoptozu indükleyerek organ boyutunu ve tümör oluşumunu üzerinde anahtar tol oynamaktadır. Fosforilasyon yoluyla düzenleme mekanizmasına sahip Hippo sinyal yolağında, yukarı akış kinazları ya da kendiliğinden aktive olan MST1 ve aşağı akış kinazları tarafından aktive olan LATS1 YAP/TAZ'ın fosforilasyonunu sağlar. Güçlü bir onkogen olan YAP, DNA hasarı olduğu durumlarda YAP tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda, Hippo sinyal yolu tarafından düzenlenen efektör YAP proteinin DNA hasarı sonrası verdiği tepkiye dayanarak, Hippo sinyal yolunun YAP proteini aracılığıyla apoptozu kontrol edebileceği ileri sürülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda YAP aktivasyonun kanser tedavisinde ilaç direnci ile ilişkili olduğu ileri sürülmüş ve yapılan deneyler sonucunda ilaca duyarlı meme kanseri hücrelerinde direnç göstermeyenlere kıyasla daha fazla YAP ekspresyonu olduğu gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak yapılan in vivo deneylerde nükleusta bulunan YAP seviyesinin metformin ile tedaviden sonra aşağı regüle edildiği gösterildi [119]. Fosforillenmiş YAP sitozolde lokalize olur ve tümör büyümesinde azalmayı sağlar ancak fosforile edilmemiş YAP çekirdekte lokalizedir hücre ve tümör büyümesini destekler. YAP ekspresyonu çeşitli insan kanserleri ile ilişkilendirilmiştir. Hippo sinyal yolu belirteci olan SAV1'in pankreas kanseri gelişimi üzerindeki rolü ve mekanizmasını göstermek için yapılan çalışmada; Pankreas kanseri metastazı ve apoptozu üzerindeki SAV1 etkisi değerlendirildi ve SAV1'in aşırı ekspresyonunun hücre göçü ve istilasını baskıladığı ve apoptozu desteklediği gösterildi

[120]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Metformin uygulamasından sonra Hippo sinyal yolu belirteçleri ve düzenleyicileri olan MST1, LATS1, YAP, p-YAP ve SAV1 protein seviyelerindeki değişimi ve bunun apoptoza etkisini göstermek istedik. İmmunoblotlama tekniği kullanılarak MST1, LATS1, YAP, p-YAP ve SAV1 protein ekspresyonlarındaki değişimler ölçüldü. Bunun sonucunda YAP fosforilasyonunda görevli olan MST1 ve LATS1 ve p-YAP protein seviyelerinde zamana ve metformin uygulamasına bağlı olarak artış meydana geldiği gözlemlenirken YAP protein seviyesinde azalma meydana geldi. Metastaz ve apoptoz üzerinde etkili olduğu bilinen SAV1 ekspresyonunda artış gözlemlendi (Şekil 15). MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde metformin muamelesi ile Hippo sinyal yoluna bağlı apoptozun indüklendiği ve hücre göçü ve hücre istilasında azalma olduğu gösterildi. Yapılan deneyler sonucunda Hippo sinyal yolağı belirteçleri MST-1, LATS-1 ve p-YAP protein ekspresyonlarındaki artışa bağlı olarak Metformin ile tedavi sonucunda Hippo sinyal yolağının hücre ölümü üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen deneyler ışığında Metformin uygulamasının MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde Hippo sinyal yoluna bağlı apoptozun indüklenmesinde ve yine aynı yolağa bağlı olarak hücre göçünün ve hücre istilasının inhibe edilmesini sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca metformin uygulamasının meme kanseri hücrelerinde mTOR inhibisyonuna bağlı olarak otofaji mekanizmasının indüklenmesini sağladığı gösterilmiştir.

Deneylerden elde edilen verilerin gelecekte in vivo çalışmalarda ve bu çalışmalar bağlı olarak faz çalışmalarında öncü veri olarak kullanılması hedeflenmektedir. Son yıllarda tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan inkretin grubu bir molekül olan Liraglutide ile birlikte tedavi uygulanarak metformin etkisi arttırılarak tedaviye daha fazla katkı sağlaması ve son yıllarda incelenmeye başlanılan Hippo sinyal yolağı üzerinde çalışmalara katkı sağlaması beklenmektedir.

6 KAYNAKÇA

- 1) Organization., W.H., A Report About Cancer (February 2018).
- 2) Organization., W.H., Cancer Tomorrow, “Estimated Number of New Cases from 2020 to 2040, Females, Age [0-85+].”
- 3) Organization., W.H., Cancer Today, “Estimated number of incident cases and deaths Turkey, females, all ages (2020).”
- 4) Erices, R., Cubillos, S., Aravena, R., Santoro, F., Marquez, M., Orellana, R., Ramírez, C., González, P., Fuenzalida, P., Bravo, M. L., Oliva, B., Kato, S., Ibañez, C., Brañes, J., Bravo, E., Alonso, C., García, K., Arab, C., Torres, V. A., ... Owen, G. I., Diabetic concentrations of metformin inhibit platelet-mediated ovarian cancer cell progression. *Oncotarget*, 2017. 8(13), p. 20865–20880.
- 5) Davies, G., Lobanova, L., Dawicki, W., Groot, G., Gordon, J. R., Bowen, M., Harkness, T., & Arnason, T., Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer. *PLOS ONE*, 2017. 12(12).
- 6) Liang, P., Jiang, B., Li, Y., Liu, Z., Zhang, P., Zhang, M., Huang, X., & Xiao, X., Autophagy promotes angiogenesis via AMPK/AKT/mTOR signaling during the recovery of heat-denatured endothelial cells. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(12).
- 7) Bu, H., Liu, D., Zhang, G., Chen, L., & Song, Z., AMPK/mtor/ULK1 axis-mediated pathway participates in apoptosis and autophagy induction by Oridonin in colon cancer DLD-1 cells. *OncoTargets and Therapy*, 2020. Volume 13, p. 8533–8545.
- 8) Wei, C., Wang, Y., & Li, X., The role of Hippo Signal Pathway in breast cancer metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 2018. Volume 11, p. 2185–2193.
- 9) Yuan, X., Wei, W., Bao, Q., Chen, H., Jin, P., & Jiang, W., Metformin inhibits glioma cells stemness and epithelial-mesenchymal transition via regulating YAP activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018. 102, p. 263–270.

- 10) Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C., On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 2013. 18(1- 2), p. 43–73.
- 11) Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K., Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018. 51(6), p. 2647–2693.
- 12) Pagliarini, R., Shao, W., & Sellers, W. R., Oncogene addiction: Pathways of Therapeutic Response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO Reports*, 2018. 16(3), p. 280–296.
- 13) Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., & Dobariya, C., Oral cancer: Etiology and risk factors: A Review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2018.
- 14) Dey, B., & Kumar, A., An Review Article on Breast Cancer. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*, 2018. 11(2), p. 284–298.
- 15) Üstün, F. (2019). Nuclear Medicine Seminar (pp. 30–39).
- 16) Girardi, F., Fersht, N., Coleman, M. P., & Allemani, C., Global trends in population-based survival for 303,169 adults diagnosed with glioblastoma in 44 countries during 2000-2014 (concord-3). *Annals of Oncology*, 2019. 30, v150.
- 17) *Turkey fact sheets - international agency for research on ...* (n.d.). Retrieved December 5, 2021, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>.
- 18) Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A., *Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*, American Cancer Society Journals, 2018.
- 19) Kaminska, M., Ciszewski, T., Szatan, K., Miotla, P., & Staroslawka, E., Breast Cancer Risk Factors. 14(3), p. 196–202.

- 20) Zhao, X.-B., & Ren, G.-S., Diabetes mellitus and prognosis in women with breast cancer. *Medicine*, 2016. 95(49).
- 21) Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R., & Slingerland, J. M., Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2017. 67(5), p. 378–397.
- 22) Borgquist, S., Hall, P., Lipkus, I., & Garber, J. E., Towards prevention of breast cancer: What are the clinical challenges? *Cancer Prevention Research*, 2018. 11(5), p. 255–264.
- 23) Çapanoğlu, G., & Bakar, E., Meme Kanseri ve Meme Kanseri Metastazında Rol Oynayan Moleküler Prognostik Faktörler. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2018. 3(2), p. 40–48.
- 24) Matsuda, N., Lim, B., Wang, X., & Ueno, N. T., Early Clinical Development of epidermal Growth Factor Receptor Targeted Therapy in Breast Cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017. p. 463–479.
- 25) Sengodan, S. K., K.H., S., Nadhan, R., & Srinivas, P., Regulation of epithelial to mesenchymal transition by BRCA1 in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2018. 123, p. 74–82.
- 26) Duffy, M. J., Synnott, N. C., & Crown, J., Mutant p53 in breast cancer: Potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2018. 170(2), p. 213–219.
- 27) Akdeniz, D., Tunçer, Ş. B., & Yazıcı, H. (20). PTEN Gen Yolağı ve Meme Kanseri Arasındaki İlişki. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2018. 71(2), p. 105–110.
- 28) Alkabban, F. M., & Ferguson, T., Breast Cancer, 2020.

- 29) Lee, A., Moon, B.-I., & Kim, T. H., BRCA1/BRCA2 pathogenic variant breast cancer: Treatment and prevention strategies. *Annals of Laboratory Medicine*, 2020. 40(2), p. 114–121.
- 30) Davies, G., Lobanova, L., Dawicki, W., Groot, G., Gordon, J. R., Bowen, M., Harkness, T., & Arnason, T., Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer, *Plos One*, 2017. 12(12).
- 31) Riis, M., Modern surgical treatment of breast cancer, *Annals of Medicine and Surgery*, 2020. 56, p. 95–107.
- 32) Jordan, R. M., & Oxenberg, J., Breast Cancer Conservation Therapy, 2020.
- 33) Nijenhuis, M. V., & Rutgers, E. J. T., Who should not undergo breast conservation? *The Breast*, 2013. 22.
- 34) Cardoso, F., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rubio, I. T., Zackrisson, S., & Senkus, E., Early breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 2019. 30(10), p. 1674.
- 35) McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P., & Freedman, G. M., Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer, *J Nucl Med* 2016, 2016. p. 9–16.
- 36) Xu, G., Zhao, L., & He, Z., Performance of whole-body PET/CT for the detection of distant malignancies in various cancers: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Nuclear Medicine*, 2012. 53(12), p. 1847–1854.
- 37) Samiian, L., Modern Breast Surgery: New Techniques, Better Outcomes, 2016. p. 4–8.
- 38) Sharek, D., Zuley, M. L., Zhang, J. Y., Soran, A., Ahrendt, G. M., & Ganott, M. A., Radioactive seed localization versus wire localization for lumpectomies: A comparison of outcomes, *American Journal of Roentgenology*, 2015. 204(4), p. 872–877.

- 39) Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M., Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.*, 2018. **p.** 339–354.
- 40) Al-Mahayri, Z. N., Patrinos, G. P., & Ali, B. R., Toxicity and pharmacogenomic biomarkers in breast cancer chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 2020.
- 41) Twelves, C., Jove, M., Gombos, A., & Awada, A., Cytotoxic chemotherapy: Still the mainstay of clinical practice for all subtypes metastatic breast cancer, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016. *100*, **p.** 74–87.
- 42) Sacco, K., & Grech, G., Actionable pharmacogenetic markers for prediction and prognosis in breast cancer, *EPMA Journal*, 2015, *6*(1).
- 43) Piccart, M., Hortobagyi, G. N., Campone, M., Pritchard, K. I., Noguchi, S., Rugo, H., Gnant, M., Feng, W., Taran, T., & Baselga, J., 1LBA everolimus plus exemestane for hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor-2-negative (HER2–) advanced breast cancer (BC): Overall survival results from bolero-2, *European Journal of Cancer*, 2014, **p.** 50.
- 44) Prat, A., Faculty opinions recommendation of BUPARLISIB Plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (belle-2): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*, 2017.
- 45) Awada, A., Faculty opinions recommendation of monarch 2: Abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2- advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy, *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*, 2019.
- 46) Smith, B., & Reddy, J., Faculty opinions recommendation of partial-breast radiotherapy after breast conservation surgery for patients with early breast cancer (UK import low trial): 5-year results from a multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-

inferiority trial. *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*, 2018.

47) NHS. (n.d.). NHS choices. Retrieved December 5, 2021.

48) Metformin, *Reactions Weekly*, 2019. 1784(1), **p.** 169–169.

49) Wang, Y.-W., He, S.-J., Feng, X., Cheng, J., Luo, Y.-T., Tian, L., & Huang, Q., Metformin: A review of its potential indications. *Drug Design, Development and Therapy*, 2017. *Volume 11*, **p.** 2421–2429.

50) Vancura, A., Bu, P., Bhagwat, M., Zeng, J., & Vancurova, I., Metformin as an anticancer agent. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2018. 39(10), **p.** 867–878.

51) Sabit, H., E Abdel-Ghany, S., Said, O. A. M., Mostafa, M. A., & El-Zawahry, M., METformin Reshapes the METHylation Profile in Breast and Colorectal Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018. 19(10), **p.** 2991–2999.

52) Wu, L., Zhou, B., Oshiro-Rapley, N., Li, M., Paulo, J. A., Webster, C. M., Mou, F., Kacergis, M. C., Talkowski, M. E., Carr, C. E., Gygi, S. P., Zheng, B., & Soukas, A. A., An ancient, unified mechanism for metformin growth inhibition in *C. elegans* and cancer, *Cell*, 2018, 167(7).

53) Podhorecka, M., Ibanez, B., & Cmoszynska, A., Metformin-its potential anti cancer and anti-aging effects, 2017. **p.** 170–175.

54) Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J., AMPK phosphorylation of Raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, 2008. 30(2), **p.** 214–226.

55) Buzzai, M., Jones, R. G., Amaravadi, R. K., Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., Zhao, F., Viollet, B., & Thompson, C. B., Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth, *Cancer Research*, 2017. 67(14), **p.** 6745–6752.

- 56) Yun, H., Park, S., Kim, M.-J., Yang, W. K., Im, D. U., Yang, K. R., Hong, J., Choe, W., Kang, I., Kim, S. S., & Ha, J., AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FOXO1. *FEBS Journal*, 2014. 281(19), p. 4421–4438.
- 57) Zou, J., Hong, L., Luo, C., Li, Z., Zhu, Y., Huang, T., Zhang, Y., Yuan, H., Hu, Y., Wen, T., Zhuang, W., Cai, B., Zhang, X., Huang, J., & Cheng, J., Metformin inhibits estrogen-dependent endometrial cancer cell growth by activating the AMPK – FOXO 1 signal pathway, *Cancer Science*, 2016. 107(12), p. 1806–1817.
- 58) Lu, C.-C., Chiang, J.-H., Tsai, F.-J., Hsu, Y.-M., Juan, Y.-N., Yang, J.-S., & Chiu, H.-Y., Metformin triggers the intrinsic apoptotic response in human AGS gastric adenocarcinoma cells by activating AMPK and suppressing mTOR/Akt signaling, *International Journal of Oncology*, 2019.
- 59) Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer, *National Review Endocrinol*, 2014. p. 143–156.
- 60) Pierotti, M. A., Berrino, F., Gariboldi, M., Melani, C., Mogavero, A., Negri, T., Pasanisi, P., & Pilotti, S., Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: Metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene*, 2012. 32(12), p. 1475–1487.
- 61) Lei, Y., Yi, Y., Liu, Y., Liu, X., Keller, E. T., Qian, C.-N., Zhang, J., & Lu, Y., Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 2017, 36(1).
- 62) Kim, H. G., Hien, T. T., Han, E. H., Hwang, Y. P., Choi, J. H., Kang, K. W., Kwon, K.-il, Kim, B.-H., Kim, S. K., Song, G. Y., Jeong, T. C., & Jeong, H. G., Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF-KB pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *British Journal of Pharmacology*, 2011. 162(5), p. 1096–1108.

- 63) Galluzi, L., & Vitale, I., Molecular mechanism of cell death: recommendations of the Nomenclature on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 2018. **p.** 486–541.
- 64) Current understanding of apoptosis - programmed cell death. 2018.
- 65) Jan, R., & Chaudhry, G.-e-S., Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2019. 9(2), **p.** 205–218.
- 66) Lamkanfi. M., Opdenbosch, N., *Caspases in cell death, inflammation, and disease*. Immunity, 2019. **p.** 1352-1364.
- 67) Cullen, S. P., & Martin, S. J., Caspase activation pathways: Some recent progress. *Cell Death & Differentiation*, 2009. 16(7), **p.** 935–938.
- 68) Banjara, S., Suraweera, C. D., Hinds, M. G., & Kvansakul, M., The bcl-2 family: Ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms. *Biomolecules*, 2020. 10(1), **p.** 128.
- 69) Adams, C. M., Clark-Garvey, S., Porcu, P., & Eischen, C. M., Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 2019.
- 70) Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G., Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies, *Aging*, 2016. 8(4), **p.** 603–619.
- 71) Trejo-Solís, C., Serrano-Garcia, N., Escamilla-Ramírez, Á., Castillo-Rodríguez, R., Jimenez-Farfan, D., Palencia, G., Calvillo, M., Alvarez-Lemus, M., Flores-Nájera, A., Cruz-Salgado, A., & Sotelo,, Autophagic and apoptotic pathways as targets for chemotherapy in glioblastoma, *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. 19(12), **p.** 3773.
- 72) Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C., Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 2019, 39(1).

- 73) You, Y., Cheng, A.-C., Wang, M.-S., Jia, R.-Y., Sun, K.-F., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Chen, S., Liu, M.-F., Zhao, X.-X., & Chen, X.-Y., The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(4).
- 74) Jiang, G.-M., Tan, Y., Wang, H., Peng, L., Chen, H.-T., Meng, X.-J., Li, L.-L., Liu, Y., Li, W.-F., & Shan, H., The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy, *Molecular Cancer*, 2019, 18(1).
- 75) Chen, Y., Henson, E. S., Xiao, W., Huang, D., McMillan-Ward, E. M., Israels, S. J., & Gibson, S. B., Tyrosine kinase receptor EGFR regulates the switch in cancer cells between cell survival and cell death induced by autophagy in hypoxia, *Autophagy*, 2016. 12(6), p. 1029–1046.
- 76) Karadağ, A. Y., Otafaji: Programlı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2016. 15, p. 20–26.
- 77) Gross, A. S., & Graef, M., Mechanism of autophagy in metabolic Stress Response. *Journal Of Molecular Biology*, 2020. p. 28–52.
- 78) Chava, S., Lee, C., Aydin, Y., Chandra, P. K., Dash, A., Chedid, M., Thung, S. N., Moroz, K., Wu, T., Nayak, N. C., & Dash, S., Chaperone-mediated autophagy compensates for impaired macroautophagy in the cirrhotic liver to promote hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2017. 8(25), p. 40019–40036.
- 79) Ghosh, R., & Pattison, J. S., Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in heart failure: The known and the unknown. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. p. 1–22.
- 80) Manzoni, C., Mamais, A., Dihanich, S., Soutar, M. P. M., Plun-Favreau, H., Bandopadhyay, R., Abeti, R., Giunti, P., Hardy, J., R. Cookson, M., Tooze, S. A., & Lewis, P. A., MTOR independent alteration in ULK1 ser758 phosphorylation following chronic LRRK2 kinase inhibition, *Bioscience Reports*, 2018, 38(2).

- 81) Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W., Autophagy as a promoter of longevity: Insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018. 19(9), p. 579–593.
- 82) Tong, X., Cohen, R, Thompson, Mei, Y., *Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases*. Biochimica et biophysica acta, 2014. 1852(2), p. 243-251.
- 83) Schuck, S., Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of Cell Science*, 2020, 133(17).
- 84) Alfaro, I. E., Albornoz, A., Molina, A., Moreno, J., Cordero, K., Criollo, A., & Budini, M., Chaperone mediated autophagy in the crosstalk of Neurodegenerative Diseases and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 9.
- 85) Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., & Ha, J. (2016). AMPK activators: Mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine*, 2016, 48(4).
- 86) Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A., AMPK: An energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 190–201.
- 87) Ciccarese, F., Zulato, E., & Indraccolo, S., LKB1/AMPK pathway and drug response in cancer: A therapeutic perspective. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, p. 1–16.
- 88) Tamargo-Gómez, I., & Mariño, G., AMPK: Regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. 19(12), p. 3812.
- 89) Zhang, C.-S., Hawley, S. A., Zong, Y., Li, M., Wang, Z., Gray, A., Ma, T., Cui, J., Feng, J.-W., Zhu, M., Wu, Y.-Q., Li, T. Y., Ye, Z., Lin, S.-Y., Yin, H., Piao, H.-L., Hardie, D. G., & Lin, S.-C., Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature*, 2017. 548(7665), p. 112–116.

- 90) Garcia, D., & Shaw, R. J., AMPK: Mechanisms of cellular energy sensing and restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell*, 2016. 66(6), p. 789–800.
- 91) Kosztelnik, M., Kurucz, A., Papp, D., Jones, E., Sigmond, T., Barna, J., Traka, M. H., Lorincz, T., Szarka, A., Banhegyi, G., Vellai, T., Korcsmaros, T., & Kapuy, O., Suppression of AMPK/AAK-2 by Nrf2/SKN-1 down-regulates autophagy during prolonged oxidative stress. *The FASEB Journal*, 2018. 33(2), p. 2372–2387.
- 92) Kişmiroğlu, C., Cengiz, S., & Yaman, M., AMPK'nin Biyokimyas: Etki Mekanizmaları ve Diyabetin Tedavisindeki Önemi. *Avrupa Bilim Ve Teknoloji Dergisi*, 2020. 18, p. 162–170.
- 93) Zhang, H., Xu, H.-L., Wang, Y.-C., Lu, Z.-Y., Yu, X.-F., & Sui, D.-Y., 20(s)-protopanaxadiol-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cell line through the inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. 19(4), p. 1053.
- 94) Zhang Y., Kwok-Shing Ng P., Kucherlapati M., Chen F., Liu Y., Tsang YH., de Velasco G., Jeong KJ., Akbani R., *A pan-cancer proteogenomic atlas of PI3K/AKT/mTOR pathway alterations*, *Cancer cell*, 2017. 31(6), p. 820-823.
- 95) Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, L. (2021, August 6). *Retracted article: Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours - Cell & Bioscience*, 2020. p. 1-12.
- 96) Cheng, H., Jiang, X., Zhang, Q., Ma, J., Cheng, R., Yong, H., Shi, H., Zhou, X., Ge, L., & Gao, G., Naringin inhibits colorectal cancer cell growth by repressing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020. p. 3798-3804.
- 97) Magaway, C., Kim, E., & Jacinto, E., Targeting mTOR and metabolism in cancer: Lessons and innovations. *Cells*, 2019. 8(12), p. 1584.

- 98) Lee, H., Venkatarama Gowda Saralamma, V., Kim, S., Ha, S., Raha, S., Lee, W., Kim, E., Lee, S., Heo, J., & Kim, G., Pectolarigenin induced cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cell via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Nutrients*, 2018. 10(8), p. 1043.
- 99) Boopathy, G. T., & Hong, W., Role of hippo pathway-yap/taz signaling in angiogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019, 7.
- 100) Yu, F.-X., & Guan, K.-L., The hippo pathway: Regulators and regulations. *Genes & Development*, 2013. 27(4), p. 355–371.
- 101) Han, Y., Analysis of the role of the Hippo Pathway in Cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1).
- 102) Mo, Y. et al., *The hippo signaling pathway in Stem Cell Biology and cancer*. EMBO reports, 2014.
- 103) Moroishi, T., Hansen, C. G., & Guan, K.-L., The emerging roles of yap and taz in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2015. 15(2), p. 73–79.
- 104) St John, M. A., Tao, W., Fei, X., Fukumoto, R., Carcangiu, M. L., Brownstein, D. G., Parlow, A. F., McGrath, J., & Xu, T., Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature Genetics*, 1999. 21(2), p. 182–186.
- 105) Yang, X., Li, D.-ming, Chen, W., & Xu, T., Human homologue of drosophila lats, LATS1, negatively regulate growth by inducing G2/M arrest or apoptosis. *Oncogene*, 2001. 20(45), p. 6516–6523.
- 106) Zhou, P.-J., Xue, W., Peng, J., Wang, Y., Wei, L., Yang, Z., Zhu, H. H., Fang, Y.-X., & Gao, W.-Q., Elevated expression of PAR3 promotes prostate cancer metastasis by forming a PAR3/apkc/kibra complex and inactivating the hippo pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017, 36(1).

- 107) Mohamed, Z., Hassan, M. K., Okasha, S., Mitamura, T., Keshk, S., Konno, Y., Kato, T., EL-Khamisy, S. F., Ohba, Y., & Watari, H., Mir-363 confers taxane resistance in ovarian cancer by targeting the hippo pathway member, LATS2. *Oncotarget*, 2018. 9(53), p. 30053–30065.
- 108) Park, Y.-M. M., Bookwalter, D. B., O'Brien, K. M., Jackson, C. L., Weinberg, C. R., & Sandler, D. P., A prospective study of type 2 diabetes, metformin use, and risk of breast cancer. *Annals of Oncology*, 2021. 32(3), p. 351–359.
- 109) Phoenix, K. N., Vumbaca, F., Fox, M. M., Evans, R., & Claffey, K. P., Dietary energy availability affects primary and metastatic breast cancer and metformin efficacy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2009. 123(2), p. 333–344.
- 110) Flores-Romero, H., Hohorst, L., John, M., Albert, M. C., King, L. E., Beckmann, L., Szabo, T., Hertlein, V., Luo, X., Villunger, A., Frenzel, L. P., Kashkar, H., & Garcia-Saez, A. J. (2021). BCL-2-family protein tBID can act as a bax-like effector of apoptosis. *The EMBO Journal*, 2021, 41(2).
- 111) Zheng, Y., Zhu, J., Zhang, H., Liu, Y., & Sun, H., Metformin inhibits ovarian cancer growth and migration in vitro and in vivo by enhancing cisplatin cytotoxicity. *American Journal of Translational Research*, 2018. p. 3086–3098.
- 112) Coşkun, G., & Özgür, H., Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması, 2011. p. 145–158.
- 113) Jang, J. H., Sung, E.-G., Song, I.-H., Lee, T.-J., & Kim, J.-Y., Metformin induces caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anti-Cancer Drugs*, 2020. 31(7), p. 655–662.
- 114) Chaitanya, G. V., Alexander, J. S., & Babu, P. P., PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 2010, 8(1).

- 115) Mashimo, M., Onishi, M., Uno, A., Tanimichi, A., Nobeyama, A., Mori, M., Yamada, S., Negi, S., Bu, X., Kato, J., Moss, J., Sanada, N., Kizu, R., & Fujii, T., The 89-KDA PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic par carrier to induce AIF-mediated apoptosis, *Journal of Biological Chemistry*, 2021. **p.** 296.
- 116) Karadağ, A., Otofaji: Programlı Hücre Ölümü, *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2016. **p.** 19–26.
- 117) Liu, S., Yue, C., Chen, H., Chen, Y., & Li, G., Metformin promotes beclin1-dependent autophagy to inhibit the progression of gastric cancer. *OncoTargets and Therapy*, 2020. *Volume 13*, **p.** 8181–8182.
- 118) Fallahi, E., O'Driscoll, N., & Matallanas, D., The MST/hippo pathway and cell death: A non-canonical affair. *Genes*, 2016. 7(6), **p.** 28.
- 119) Liu, J., Li, J., Chen, H., Wang, R., Li, P., Miao, Y., & Liu, P., Metformin suppresses proliferation and invasion of drug-resistant breast cancer cells by activation of the hippo pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. 24(10), **p.** 5786–5796.
- 120) Wang, L., Wang, M., Hu, C., Li, P., Qiao, Y., Xia, Y., Liu, L., & Jiang, X., Protein salvador homolog 1 acts as a tumor suppressor and is modulated by hypermethylation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 2017. 8(38), **p.** 62953–62961.

7 EKLER

7.1 EK A HÜCRE KÜLTÜRÜ

Tablo 1. Kullanan hücre kültür ekipmanları

Adı	Katalog Numarası	Firma Adı
DMEM	41966-029	Gibco
Trypsin-EDTA	P10-0231	Pan Biotech
PBS	BE17-51-5F	LONZA
FBS	P290310	Pan Biotech
Penisilin /Streptomisin	P06-07100	Pan Biotech
MDA-MB-231	ATCC HTB-26	ATCC
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Dondurma Medyası		
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
100 mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
Hemositometre	-	Neubauer
Kriyovial tüp	V7634	NUNC
Laminar Flow	124692	Thermo Scientific
Etüv	Heracell 1150	Thermo Scientific
Mikropipet uçları (10 -100 -1000 µl)	-	CAPP
Enjektör set	21G	ASTRAJE CT

7.2 EK B KULLANILAN CİHAZLAR

Tablo 2. Kullanılan cihazlar.

Adı	Firma Adı	Katalog numarası
Santrifüj	Eppendorf	5417R
Hassas tartı	Sartorius	LE6202S
Otoklav	Nüve	OTO32
Buzdolabı	Arçelik	4263TMB
İnkübatör	Nüve	EN 025
Çalkalayıcı	BioRad	-
Floresan Mikroskopu	Olympus	Model:XDS-1B
Laminar Flow	124692	Thermo
-80°C	New Brunswick Scientific	U725 innova
Derin dondurucu	Arçelik	2041D
Sıvı azot tankı	Air Liquid	Arpege
Mikropipet (0.5-10µl)	Thermo Scientific	EH52836
Mikropipet (10-100 µl)	Thermo Scientific	EH46925
Mikropipet (100-1000 µl)	Thermo Scientific	T27274
PVDF Membran	Thermo Scientific	88518
Mikroplaka okuyucu	BioRad	680
İnverted mikroskop	SOIF	Model: XDS-1B
Akış Sitometri cihazı	BD Acuri C6	AC6531280147
Kar-Buz makinesi	ScorsMan	AF80
Transfer Cihazı	BioRad	10016505C
Elektroforez sistemi	BioRad	165-8000
Güç Kaynağı	BioRad	PowerPac/B
Spin mini spin olus	LabNet	SN0708
Distile su cihazı	TKA-Pacific	D56412
Yatay Elektroforez sistemi	BioRad	Gel XL ultra V-2
Vortex	Stuart equipment	SA8
Laminar Flow	Nüve	LN090

7.3 EK C KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler.

Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Ethanol	ALKO MED	CAS 64-17-5
DMSO	MERCK	K46505343 517
DMSO	Sigma Aldrich	A9099
DiOC ₆ Boya	Fluka	2129966
DAPI Boya		
PI Boya	Sigma Aldrich	P4170-100MG
FBS	Pan Biotech	P290310
MTT Solüsyonu	Sigma Aldrich	M2128-5G
PBS	Lonza	BE17-51-5F
SDS	Applchem	UN1888
Agaroz	Sigma Aldrich	A9539
Yağsız süt tozu		

7.3 EK D KULLANILAN ANTİKORLAR

Tablo 4. Kullanılan antikorlar

Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
BİM	Cell Signaling Technology	293
BAD	Sigma Aldrich	HPA028185
BAK	Sigma Aldrich	PRS3347
Cleaved-Cas3	Cell Signaling Technology	9661
Cleaved-Cas9	Cell Signaling Technology	2974
Cleaved-PARP	Cell Signaling Technology	5625
Beclin	Cell Signaling Technology	3495
Atg5	Cell Signaling Technology	12994
Atg7	Cell Signaling Technology	8558
mTOR	Cell Signaling Technology	2974
p-mTOR	Cell Signaling Technology	2974
LATS1	Sigma Aldrich	MABS1823
MST1	Sigma Aldrich	SAB1410800
SAV1	Sigma Aldrich	HPA001808
YAP	Sigma Aldrich	SAB4500094
p-YAP	Sigma Aldrich	SAB5700541
GABDH	Sigma Aldrich	SAB2108668

7.4 KULLANILAN ÇÖZELTİLER

7.4.1 Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı

9ml Fetal sığır serumu (FBS)

1 ml Dimetil sülfoksit (DMSO)

FBS ve DMSO kullanılarak hücre kültürüne uygun olarak medya hazırlanır ve hazırlanan medya 0.22 mm'lik filtre kullanılarak süzülür. Elde edilen dondurma medyası -20 °C'de muhafaza edilir.

7.4.2 Bradford Çözeltisinin Hazırlanışı

25,0 mg Coomassie mavisi

12,5 ml %95 Ethanol

25,0 ml %85 Asetik asit

212,5 ml Distile su

Coomassie mavisi, %95 Ethanol, %85 asetik asit ve distile su kullanarak hazırlanan karışım +4°C 'de muhafaza edilir.

7.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için)

10,0 gr SDS

100 ml Distile su

SDS ve distile su kullanılarak hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.4.4 10X Yürütme Tamponu Hazırlanışı

30,3 gr Tris-baz

144,0 gr Glisin

10,0 gr SDS

1000 ml Distile su

Tris ve glisin 800 ml distile su içerisinde çöölerek pH8,3'e ayarlanır. Çözelti hacmi 1000 ml'e tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.4.5 10X Transfer Tamponu Hazırlanışı

30,3 gr Tris-baz

144,0 gr Glisin

1000 ml Distile su

Tris-baz ve glisin 800 ml distile suyun içinde çözdürülerek pH 8,3'e ayarlanır. Çözelti hacmi 1000 ml'e tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.4.6 10X Tris tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı

12,11 gr Tris-baz

86,6 gr Sodyum klorür (NaCl)

1000 ml distile su

Tris-baz ve NaCl 800 ml suyun içinde çözdürülerek pH 7,62 ye ayarlanır. Çözelti hacmi 1000 ml'e tamamlanır. TBS-Twen çözeltisi için 1X TBS içerisine 1:1000 oranında Twen eklenerek çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.4.7 %5 Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)

2,5 gr yağsız süt tozu

50 ml 1X TBS-T çözeltisi

Çözelti hazırlanarak -20°C'de muhafaza edilir.

7.4.8 Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için)

M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent 10 ml

Roche® PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli 1 tablet

Roche® proteaz inhibitör kokteyli 1 tablet

+4°C'de muhafaza edilir.

7.4.9 5X Laemli Tamponunun Hazırlanışı (10 ml için)

1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8) 2,0 ml

Bromofenol mavisi (%1(ağırlık/hacim)) 0,5 ml Gliserol 5,0 ml

β-merkaptoetanol 2,5 ml

Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) 2,0 gr

-20°C'de muhafaza edilir.

7.4.10 %30 (v/v) Akrlamid/Bis-Akrlamid Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml)

29,2 gr Akrlamid (C₃H₅N₂O₂)

0,8 gr Bisakrlamid (C₇H₅N₂O₂)

100 ml Distile su

Çözelti hazırlanarak +4°C’de muhafa edilir.

7.4.11 %10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml)

1,0 gr Amonyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₈)

10 ml Distile su

Çözelti hazırlanarak -20°C’de muhafaza edilir.

7.4.12 Tris-Baz Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 8,8)

90,8 gr Tris-baz (C₄H₁₁NO₃)

1000 ml Distile su

800 ml distile su içinde belirtilen miktarda tris-baz çözülerek pH 8,8’e ayarlanır, Çözeltinin hacmi 1000 ml’e tamamlanır.

7.4.13. Tris-Baz Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 6,8)

30,25 gr Tris-baz (C₄H₁₁NO₃)

1000 ml Distile su

800 ml distile su içinde belirtilen miktarda tris-baz çözülerek pH 6,8’e ayarlanır, Çözeltinin hacmi 1000 ml’e tamamlanır.

7.4.14 %12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

Alt Jel (2 jel için)

Distile su	3,4 ml
Tris-baz çözeltisi (pH 8,8)	2,5 ml
%10 SDS	0,1 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4,0 ml
APS	0,05 ml
Tetrametiletildiamin (TEMED)	0,005 ml

Üst Jel (2 jel için)

Distile su	3,075 ml
Tris-baz çözeltisi (pH 6,8)	1,125 ml
%10 SDS	0,05 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	0,67 ml
APS	0,025 ml
Tetrametiletildiamin (TEMED)	0,005 ml

7.4.15 Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml)

0,15 gr p-Kumarik asit ($C_9H_8O_3$)

10 ml Dimetilsülfoksit (DMSO)

Çözelti hazırlanarak $+4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

7.4.16 Tris-Baz Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 8,5)

60,5 gr Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$)

500 ml Distile su

Çözelti hazırlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.4.17 Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml)

0,44 gr Luminol ($C_8H_7N_3O_2$)

10 ml Dimetilsülfoksit (DMSO)

Çözelti hazırlanarak $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

7.4.18 Kemiluminesans Çözeltisinin Hazırlanışı

Kemiluminesans A Çözeltisi

Distile su	9,0 ml
1M Tris-baz çözeltisi(pH 8,5)	1,0 ml
Kumarik asit çözeltisi	45,0 µl
Luminol çözeltisi	100,0 µl

Kemiluminesan B Çözeltisi

Distile su	9,0 ml
1M Tris-baz çözeltisi (pH 8,5)	1,0 ml
Hidrojenperoksit (H ₂ O ₂)	6,0 µl