

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**METFORMİNİN LARENKS KANSERİ HÜCRE HATTI
HEP-2 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ VE 5-FLOROURASİL İLE SİNERJİSTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Neslişah BARLAK

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ocak, 2018

ERZURUM

Her Hakkı Saklıdır

**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ETİK
KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

ETÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “METFORMİNİN LARENKS KANSERİ HÜCRE HATTI HEP-2 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ VE 5-FLOROURASİL İLE SİNERJİSTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03.01.2018

Neslişah BARLAK

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**METFORMİNİN LARENKS KANSERİ HÜCRE HATTI HEP-2 HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ VE 5-FLOROURASİL İLE
SİNERJİSTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Neslişah BARLAK
Erzurum Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Larenks kanseri (LKa) en yaygın görülen baş boyun kanseridir ve dünya çapında tüm insan kanserlerinin %1-2,5'ini oluşturur. LKa için yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilmesine rağmen son otuz yılda 5 yıllık sağ kalım oranında önemli bir azalma görülmemiştir. LKa tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajan olan 5-FU'nun LKa hastalarının sağ kalım süresine belirgin bir katkısı olmamıştır. Metformin Tip-2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan oral anti-diyabetik bir ilaçtır ve son zamanlarda anti-kanser aktivitesi olduğu birçok kanser çeşidinde gösterilmiştir. Literatürde metforminin farklı kemoterapötik ilaçlarla birlikte alındığında kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırabileceği yönünde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ayrıca metforminin insan LKa hücre hattı olan Hep-2 hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkileri olabileceğine dair bulgular da mevcuttur. Tez kapsamında metforminin tek başına ve 5-FU ile kombine kullanımının Hep-2 hücreleri üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda metformin ve 5-FU tek başlarına ve kombine halde hücrelere uygulanmış ve metforminin Hep-2 hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücre çoğalmasını baskıladığı, ayrıca hücre göçünü inhibe ettiği ortaya konulmuştur. 5-FU ile birlikte hücrelere uygulandığında ise hücreler üzerinde sinerjistik olarak apoptozu indüklediği, hücre çoğalması ve göçünü ise inhibe ettiği gösterilmiştir. Beklenmedik bir şekilde, metforminin Hep-2 hücre invazyonunu artırdığı ve 5-FU'nun hücre invazyonunu inhibe edici etkisini ise azalttığı bulunmuştur. Bu bulgular doğrultusunda, metforminin LKa tedavisinde destekleyici ajan olarak kullanılabilirliği ilk defa bu çalışma ile ortaya koyulmuştur, ancak, metforminin kanser hücrelerinin invaziv potansiyelini artırma potansiyeli göz ardı edilmemelidir.

2018, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler: Larenks Kanseri, Kemoterapi, Metformin, 5-FU

ABSTRACT
MASTER THESIS

**IDENTIFICATION OF THE EFFECTS OF METFORMIN ON THE
LARYNGEAL CANCER HEP-2 CELLS AND INVESTIGATION OF ITS
SYNERGISTIC IMPACTS WITH 5-FLUOROURACIL**

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Larynx cancer (LCA) is the most common head and neck cancer and accounts for 1-2.5% of all human cancers worldwide. Despite development of novel diagnostic and therapeutic tools for LCA, there has been no significant reduction in the 5-year survival rate over the past 30 years. 5-FU is a widely used chemotherapeutic agent in the treatment of LCA, however, it did not contribute much to the LCA patients' overall survival. Metformin is an oral anti-diabetic drug widely used in the treatment of Type 2 diabetes and has been recently shown to have anti-cancer activity in a variety of cancer types. There are several studies in the literature that suggest that metformin might sensitize the cancer cells to chemotherapeutic drugs. There is also evidence that metformin might have anti-proliferative potential on the human LCA cell line Hep-2 cells. In this thesis, it is aimed at exploring the anti-cancer effects of metformin alone and in combination with 5-FU on Hep-2 cells. When Hep-2 cells are treated with metformin alone, it inhibited cell proliferation by inducing apoptosis and suppressed cell migration in Hep-2 cells. Besides, metformin and 5-FU synergistically induced apoptosis in cells, while inhibiting cell proliferation and migration. Unexpectedly, metformin was found to enhance cellular invasion and reverse the inhibitory effect of 5-FU on the invasive potential of Hep-2 cells. To the best of our knowledge, our findings suggest for the first time in the literature, that metformin can be used as an adjuvant agent in the treatment of LCA. However, the potential of metformin to promote the invasion of cancer cells should not be neglected.

2018, 72 pages

Key words: Larynx Cancer, Chemotherapy, Metformin, 5-FU

TEŞEKKÜR

Akademik hayata attığım bu ilk adımda ve lisansüstü eğitiminin tamamlanması ile ilgili çalışmalarında bilgi, deneyim ve tecrübelerinin yanı sıra manevi olarak da desteğini her zaman hissettiğim her türlü anlayış, ilgi ve sabrı gösteren kendisiyle çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ'a

Bilimsel ve deneysel anlamda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Fatma ŐANLI, Özel ÇAPIK, Elanur TUYSUZ ve Merve DEMİRBAĞ'a

Eğitim hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu süreçte de bana destek olarak yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1 GİRİŞ	13
1.1 Kanser Tanımı ve Tarihçesi	13
1.2 Larenks Kanseri	14
1.3 Larenks Kanseri Tedavi Yaklaşımları	17
1.4 5-FU	19
1.5 Metformin Tarihçe	20
1.6 Metforminin Etki Mekanizması	21
1.7 Metforminin Kullanım Alanları	22
1.7.1 Polikistik Over Sendromu	22
1.7.2 Yaşlanma	23
1.7.3 Kardiyovasküler Hastalıklar	23
1.7.4 Diyabet	24
1.7.5 Kanser	24
1.8 Metformin ve Larenks Kanseri	26
2 ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	28
3 MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Cihazlar	30
3.2 Yöntem	33
3.2.1 Hücre Kültürü	33
3.2.2 Hücre Sayım	33
3.2.3 Hücrelerin 96 Kuyucuklu Platelere Ekilmesi	33
3.2.4 Metforminin Hazırlanışı	33
3.2.5 5-FU'in Hazırlanışı	33
3.2.6 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	34
3.2.7 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Klonogenitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	34
3.2.8 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Apoptozu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	35
3.2.9 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Hücre Göçü Kapasitesi Üzerindeki Etkisinin Yara Testi ile Araştırılması	35
3.2.10 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Hücre Göçü Kapasitesi Üzerindeki Etkisinin Transwell Testi ile Araştırılması	36

3.2.11	Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Hücre İnvazyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	36
3.2.12	Hücrelerden TRIzol ile RNA İzolasyonu	36
3.2.13	cDNA Sentezi	37
3.2.14	Moleküler Toksikoloji Paneli	37
3.2.15	İstatistiksel Analiz	37
4	ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1	Metforminin Hep-2 hücre proliferasyonu ve klonogenitesi üzerindeki etkileri.....	38
4.2	Metforminin Hep-2 hücre apoptozu üzerindeki etkileri	40
4.3	Metforminin Hep-2 hücre göçü üzerindeki etkileri.....	41
4.4	Metforminin Hep-2 hücre invazyonu üzerindeki etkileri	43
4.5	Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkileri44	
4.6	Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinin klonogenitesi üzerindeki sinerjistik etkileri46	
4.7	Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre apoptozu üzerindeki sinerjistik etkileri .47	
4.8	Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (yara kapama) üzerindeki sinerjistik etkileri48	
4.9	Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (Transwell testi) üzerindeki sinerjistik etkileri	49
4.10	Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre invazyonu (Transwell Matrigel testi) üzerindeki sinerjistik etkileri.....	50
4.11	Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 hücreleri üzerindeki anti-kanser potansiyelinin moleküler toksikoloji paneli ile araştırılması	51
5	TARTIŞMA VE SONUÇ	56
	KAYNAKLAR	60
	ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kanser hücrelerin kontrolsüz bölünmesi neticesinde oluşur	13
Şekil 1.2 Irk/etnik köken ve cinsiyete göre 100.000 kişide yeni vaka sayısı.	15
Şekil 1.3 Yaş grubuna göre yeni LKa olgularının yüzdesi	16
Şekil 1.4 Yaş gruplarına göre LKa ölüm oranları.....	16
Şekil 1.5 1975'ten günümüze yeni vaka ve ölüm oranları	17
Şekil 1.6 5-FU kimyasal yapısı.....	19
Şekil 4.1 Metforminin Hep-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki doza ve zamana bağlı etkileri	38
Şekil 4.2 Metforminin Hep-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 4.3 Metforminin Hep-2 hücrelerinin oluşturduğu koloni büyüklükleri üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 4.4 Metforminin Hep-2 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisi	41
Şekil 4.5 Metforminin Hep-2 hücrelerinin göçü üzerindeki etkisinin yara testi ile gösterilmesi.....	42
Şekil 4.6 Metforminin Hep-2 hücrelerinin göçü üzerindeki etkisinin Transwell hücre göçü testi ile gösterilmesi	43
Şekil 4.7 Metforminin Hep-2 hücrelerinin invazyonu üzerindeki etkisi	44
Şekil 4.8 5-FU'nun Hep-2 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi	45
Şekil 4.9 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkileri	46
Şekil 4.10 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre klonogenitesi üzerindeki sinerjistik etkileri	47
Şekil 4.11 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre apoptozu üzerindeki sinerjistik etkileri	48
Şekil 4.12 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (yara kapama) üzerindeki sinerjistik etkileri	49
Şekil 4.13 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (Transwell testi) üzerindeki sinerjistik etkileri	50
Şekil 4.14 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre invazyonu üzerindeki sinerjistik etkileri	51

Şekil 4.15 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinde sebep olduğu moleküler toksikoloji ile ilgili gen ifade değişimlerinin heat-map görüntüsü..... 53



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1 Hep-2 hücrelerinin Metformin ve 5-FU ile muamele edilmesinde sonra ifadesi değişen genlerde görülen kat değişimleri	54
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
nm	Nanomolar
μ l	Mikrolitre
ng	Nanogram
<	Küçük
α	Alfa
γ	Gama
β	Beta

Kısaltmalar

Açıklama

LKa	Larenks kanseri
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
SEER	Ulusal Kanser Enstitüsü Sağlık Epidemiyolojisi ve Sonuçları
5-FU	5-Fluorouracil
TS	Timidilat sentaz
FDA	Food and Drug Administration
OCT1	Organik katyon taşıyıcı 1
AMP	Adenozin Monofosfat
AMPK	Adenozin Monofosfat aktive edici protein kinazı
mTOR	Rapamisininin memelilerdeki hedefi
PKOS	Polikistik over sendromu
IGF-1	İnsülin like growth factor
ROS	Reaktif oksijen türleri
GLP-1	Glukagon benzeri peptid 1

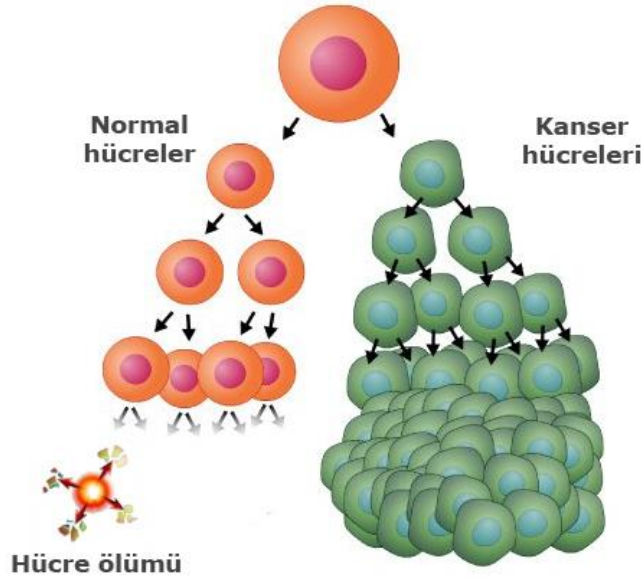
ADA	Amerikan Diyabet Derneği
EASD	Avrupa Diyabet Birliği
AICAR	5- aminoimidazol-4-karboksamit ribonükleozid
ACC	Asetil-CoA karboksilaz
S6K	S6 kinaz
4EBP1	Translasyon başlatıcı faktör 4E bağlayıcı protein 1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
TNF α	Tümör nekroz faktörü alfa
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMSO	Dimetil sülfoksit
CCK-8	Cell Counting Kit-8

1 GİRİŞ

1.1 Kanser Tanımı ve Tarihçesi

Kanser, genetik yapısı değişmiş hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz proliferasyonu sonucunda oluşan ve meydana geldiği dokuların işlevini ve organizasyonunu kaybetmesine sebep olan bir hastalıktır (Griss ve ark., 2015). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı kanseri, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren kötü urlar olarak tanımlanmaktadır.

Kanser vücudumuzun değişik bölgelerindeki hücrelerin edindikleri genetik ve epigenetik düzeydeki hatalar neticesinde büyüme avantajı kazanmaları ve kontrolsüz bölünmeleri sonucunda ortaya çıkar (Şekil 1.1)(Koutsogiannouli ve ark., 2013). Onkogenlerde veya tümör süpresörlerde meydana gelen genetik değişiklikler çoğalma, sinyal iletimi, hücre döngüsünün ve apoptozun düzenlenmesi gibi çeşitli mekanizmalarda anormallikler oluşmasına sebep olur (Yokota, 2000).



Şekil 1.1 Kanser hücrelerin kontrolsüz bölünmesi neticesinde oluşur (Karatas, 2014)'den değiştirilerek alınmıştır.

Yerleşik oldukları organ ya da dokuya ve köken aldıkları hücre çeşitlerine göre 100'ü aşkın kanser çeşidi tanımlanmış ve tahmini olarak 200'den fazla sayıda kanser türü olabileceği ifade edilmiştir (Sawyers ve ark., 2013).

İlk kanser bulgularına eski Mısır'daki insan mumyaları ve antik el yazmalarında rastlanılmıştır. M.Ö. 15. yüzyılda yazılmış olan Ebers Papirüsünde tümör tarif edilmiş ve karşılaşılan vakalarda meme ülseri veya tümörünün yakılarak çıkarıldığından, ayrıca hastalığın tedavisinin olmadığından bahsedilmiştir (Karatat, 2014). Hipokrat (M.Ö. 460-377) ise organizmada iyileşmeyen yeni yapılanmalar olarak tarif ettiği tümörleri tanımlamak için “*carcinosa*” ve “*carcinoma*” terimlerini kullanmıştır (Atıcı, 2007).

Kanser hem dünyada hem de ülkemizde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedenidir ve her geçen gün ciddi bir toplumsal sağlık problemi haline gelmektedir (Birsen, 2007). Birçok hastada yol açtığı psikolojik travmalar ve tedavi yöntemlerinin yetersiz olması korkulan bir hastalık olarak algılamasına neden olmaktadır. Kanser görülme sıklığındaki artış ve ülkelerin kansere harcadığı bütçenin her geçen gün artması nedeniyle kanserin etkili bir şekilde tedavi edilebilmesine yönelik yeni çalışmaların yapılması bir zorunluluk haline gelmiştir (Tuncer 2009).

18. yüzyıla kadar kanserle başa çıkmak için diyet önerilmiş ve bu doğrultuda ülser benzetilen kanseri tedavi etmek amacıyla ülser tedavisinde sıklıkla kullanılan metalik tuzların kullanılması önerilmiştir. Geçmişte ayrıca hayvansal ve bitkisel karışımlar da kanser tedavisinde kullanılmıştır (Atıcı, 2007).

Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyüüp farklı yayılma biçimleri gösterdikleri için her bir kanser çeşidi tedaviye farklı yanıtlar verir. Bu nedenle günümüzde kanser hastalarının tedavisinde, kanser türüne göre farklı tedaviler uygulanabilmektedir. Kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olmak üzere başlıca üç tedavi yaklaşımı kullanılmaktadır. Bazı kanserler cerrahi tedavi yöntemleri olmaksızın tedavi edilmezken diğerleri için kemoterapiye ek tedavi yaklaşımları uygun bir seçenek olabilmektedir (Society, 2015).

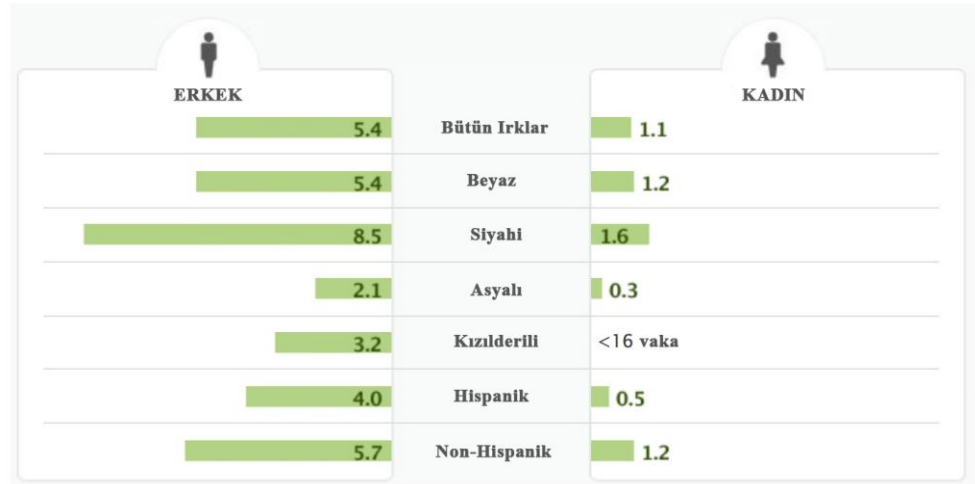
1.2 Larenks Kanseri

Larenks kanseri (LKa) en yaygın görülen baş boyun kanseridir ve dünya genelinde tüm insan kanserlerinin %1-2,5'ini oluşturmaktadır (Karatat ve ark., 2016). Yaklaşık 100.000'de 3,1 insidansı olan LKa erkeklerde kadınlara göre daha yüksek insidansa

sahiptir. İnsidansı bütün kanser türleri arasında altıncı sırada yer alan LKa'nın 5 yıllık sağ kalım oranları yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilmiş olmasına rağmen son 30 yıl içerisinde değişiklik göstermeden %60'lar civarında seyretmiştir (Howlader N ve ark., 2016; Yao ve ark., 2017).

LKa Türkiye'de toplam nüfus içerisinde (aynı zamanda erkeklerde) en sık görülen 8. kanser çeşididir ve insidansı son 10 yıl içerisinde çok fazla değişiklik göstermeden 100.000'de 10 civarında seyretmiştir (Karatas, 2015).

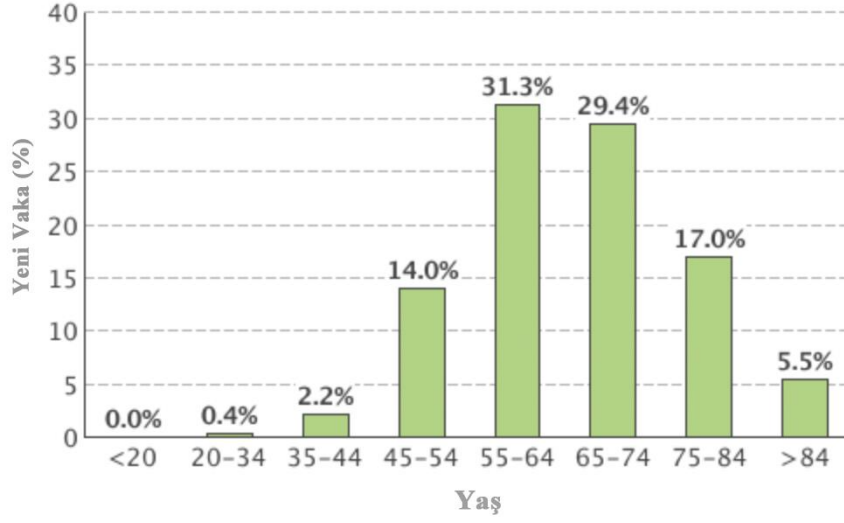
Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Ulusal Kanser Enstitüsü Sağlık Epidemiyolojisi ve Sonuçları (SEER) veritabanı verilerine göre ABD'de 2012-2014 yılları arasında mortalite ve insidans bilgileri kullanılarak hayat boyu kansere yakalanma riski ve kanser sebebiyle ölme riski LKa'da erkeklerde sırasıyla 100.000'de 5,4 ve 1,9 iken kadınlarda 1,1 ve 0,4 olarak hesaplanmıştır (Şekil 1.2) (Howlader N ve ark., 2016).



Şekil 1.2 Irk/etnik köken ve cinsiyete göre 100.000 kişide yeni vaka sayısı.

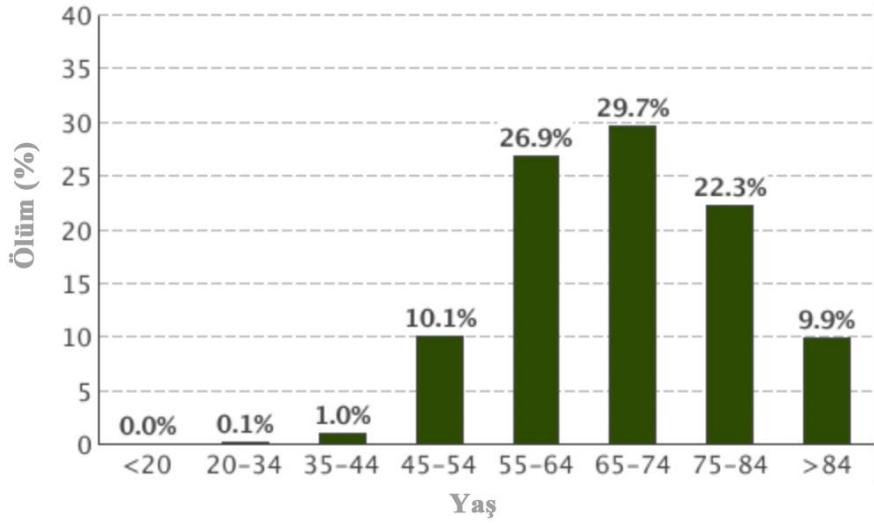
(Howlader N ve ark., 2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.

LKa tanısı sıklıkla 55-64 yaşları arasında konulmaktadır ve medyan tanı yaşı 65 olarak hesaplanmıştır (Şekil 1.3) (Howlader N ve ark., 2016).



Şekil 1.3 Yaş grubuna göre yeni LKa olgularının yüzdesi
(Howlader N ve ark., 2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.

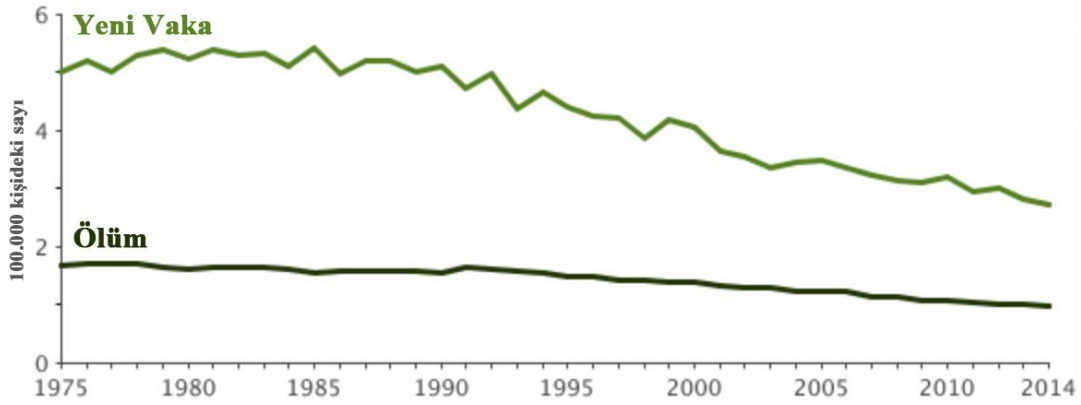
LKa nedeniyle ölüm 55-85 yaş arası bireylerde daha sık görülmekle birlikte en fazla 65-74 yaşları arasında gerçekleşmektedir ve medyan ölüm yaşı 68'dir (Şekil 1.4) (Howlader N ve ark., 2016).



Şekil 1.4 Yaş gruplarına göre LKa ölüm oranları

(Howlader N ve ark., 2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.

LKa'nın insidansı son 30 yılda azalmış fakat ölüm oranlarındaki azalma yeni vaka sayısındaki azalma kadar güçlü olmamış ve 5 yıllık sağ kalım oranında belirgin bir azalma meydana gelmemiştir (Şekil 1.5) (Howlader N ve ark., 2016).



Şekil 1.5 1975'ten günümüze yeni vaka ve ölüm oranları
(Howlader N ve ark., 2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.

1.3 Larenks Kanseri Tedavi Yaklaşımları

Larenks soluma ve yutma gibi işlevlere sahip olması nedeniyle tedavisi yaşam kalitesini önemli derecede etkilemektedir (Sanabria ve ark., 2017). LKa'nın tedavisine yönelik tedavi yaklaşımları LKa'nın karmaşık moleküler arkaplanı dolayısıyla önemli oranda geliştirilememiştir. LKa için yaygın kullanılan tedavi şekilleri total larenjektomi, radyoterapi ve kombine kemoterapidir. Her tedavi yönteminin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Tümörün yeri, yayılımı, evresi, metastaz varlığı, hastanın yaşı, genel sağlık durumu kullanılacak tedavi yönteminin seçimini etkileyen faktörler arasındadır.

Erken evre LKa hastalarının tedavisinde kullanılan cerrahi rezeksiyon ve radyoterapi gibi mevcut terapi yaklaşımları oldukça pozitif sonuçlar vermektedir. 1873'den beri yaygın olarak kullanılan total larenjektomi LKa'nın her evresinde kullanılan bir tedavi yöntemidir (Rosenberg, 1971). Radyoterapi yüksek enerjili ışınları kullanarak kanser hücrelerini öldürmeyi hedefleyen tedavi yöntemidir ve radyoterapinin verilme şekli tedavi edilen kanserin türüne ve şekline bağlıdır. Radyoterapi erken evre LKa tedavisinde etkili olurken ilerleyen evrelerde sağkalım açısından hiçbir yararı olmadığı gösterilmiştir (Melo ve ark., 2017).

İleri evre LKa hastaları tedavi edilemez olarak düşünülür ve bu hastalarda kemoterapi tedavisi sadece hafifletici bir tedavi seçeneği olarak kullanılır (Haigentz ve ark., 2010; Karatas, 2015). Bununla birlikte kemoterapi LKa için standart terapötik

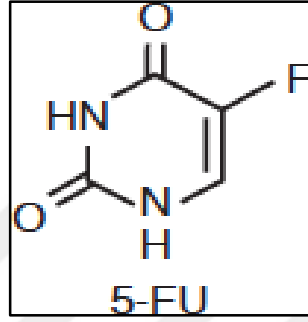
yöntemlerden biri olarak uygulanmaya başlanmış ve günümüzde özellikle lokal olarak gelişmiş tümörü olan ve ameliyat edilemeyen hastalarda kanser hücrelerinin sistemik öldürülmesi ve radyoterapiye hassaslaştırılması için kullanılmaktadır (Adelstein ve ark., 2003; Haigentz ve ark., 2010).

Ayrıca, cerrahi rezeksiyon yerine kemoterapi gibi tedavi yöntemlerin kullanılması solunum, konuşma ve yutma fonksiyonları için ihtiyaç duyulan larenksin korunmasına yardım eder (Sanabria ve ark., 2017). Yine de, bazı vakalarda kemoterapiden sonra tamamen iyileşme görülmesine rağmen mevcut kemoterapi ilaçları yalnız veya diğer tedavi yöntemleri ile kombine halde tam olarak başarılı klinik sonuçlar sağlayamaz (Haigentz ve ark., 2010). Dahası, kemoterapötik ilaçlarla ilgili çözüme kavuşturulması gereken hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen toksisite problemi vardır. Kemoterapi tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edip onları yok ederken normal hücreleri de aynı zamanda öldürmektedir (Alvero ve ark., 2009). Ayrıca, LKa hücrelerinin kemoterapiye direnci de tedavi için büyük bir engel oluşturur (Liang ve ark., 2014).

Bahsi geçen standart tedavi yöntemleri klinikte yaygın olarak kullanılmasına rağmen LKa hastalarının mortalite ve 5 yıllık sağkalım oranında belirgin bir azalma görülmemesi, aynı zamanda Türkiye’de ve dünyada mortalite ve insidansının artacağı beklentisi ile yeni tedavi yaklaşımlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır. (Howlader N ve ark., 2016).

1.4 5-FU

Birçok insan epitelyal tümörünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan 5-Fluorouracil (5-FU), C-5 konumunda hidrojen yerine flor atomu taşıyan bir urasil (pirimidin) analogu anti-metabolittir (Şekil 1.6) (Longley ve ark., 2003). 5-FU'nun etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması yeni kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlamıştır.



Şekil 1.6 5-FU kimyasal yapısı

(Adjei, 1999)'dan değiştirilerek alınmıştır.

5-FU hücre üzerine sitotoksik etki ile aktivasyonunu gösterir. 5-FU metaboliti olan FdUMP timidilat sentaza (TS) geri dönüşümsüz olarak bağlanarak DNA sentezini durdurur, ayrıca aynı yolla RNA'ya da bağlanır veya doğrudan nükleotid olarak RNA yapısına girerek RNA'nın işlevini bozar. 5-FU'nun RNA'nın işlevini bozması farklı mekanizmalarla gerçekleşebilir; 1- mRNA ifade seviyelerini değiştirir, 2- mRNA splyasını inhibe eder, 3- pre-mRNA oluşumunu inhibe eder ve 4- tRNA modifikasyonlarını değiştirir (Ghoshal ve Jacob, 1994).

Yaklaşık 50 yıldır klinik onkoloji uygulamalarında 5-FU kullanılmaktadır ve ilacın plazma seviyeleri ile tedavinin klinik etkinliği ve biyolojik etkileri arasında iyi bir korelasyon olduğu bilinmektedir. 5-FU tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde çok sayıda farklı malinitenin tedavisinde kullanılır. Göğüs kanseri, özellikle kolon kanserleri olmak üzere gastrointestinal sistem ve yumurtalık kanserlerinde ağrı ve sorunları azaltma özelliğine sahip olduğu ve invaziv olmayan karsinomların tedavisinde iyileştirici olduğu gösterilmiştir (Diasio ve Harris, 1989).

Ayrıca, baş boyun kanserleri tedavisinde uygun terapötik dozda kullanıldığında klinik etkinlik ve güvenlik bakımından en iyi sonuç veren optimal molekül olduğu gösterilmiştir. 5-FU'nun klinik aktivitesi standart dozlarda çok etkili değildir ve genel olarak dozu artırma güvenlik profili ile sınırlıdır, kemik iliği depresyonu ve gastrointestinal toksisite en sık görülen yan etkilerdir. Biyokimyasal modülasyon, uygulama zamanlarındaki değişiklikler ve oral olarak kullanımı gibi 5-FU'nun klinik etkinliğini arttırmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Toksik yan etkileri ile plazma konsantrasyonu ve klinik etkinlik arasında bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar, farmakokinetik olarak düzenlenen doz ayarlamaları ile 5-FU'nun tedavi indeksini önemli ölçüde artırabildiğini göstermiştir (Saif ve ark., 2009; Galbiatti ve ark., 2014)

1.5 Metformin Tarihçe

1800'lü yıllarda *Galega officinalis* (*G. officinalis*) bitkisinin guanidin ve türevi bazı bileşiklerce zengin olduğu bulunmuş ve bu bileşiklerin bir kısmının toksik olmasına rağmen özellikle biguanidlerin oldukça faydalı oldukları keşfedilmiştir (Witters, 2001; Bailey, 2017). 1918'lerde guanidinin hayvanlarda kan glikozunu düşürdüğü tespit edilmiş ardından 1920'lerde galegin ve diğer guanidin türevlerinin de kan glikozunu düşürdüğü gözlemlenmiştir (Bailey, 2017).

1950'lerde diyabet terapisi için fenformin, buformin ve metformin olmak üzere 3 biguanid keşfedilmiştir. 1960'larda şeker hastalığının tedavisinde fenformin ve buforminin kullanımı yaygın hale gelmiş, fakat laktik asit toksisitesi ve artan kardiyak mortalite nedeniyle kullanımı sınırlandırılmıştır (Witters, 2001). Metformin *G. officinalis* bitkisinin doğal bir ürünü olan galeginden üretilmektedir (Viollet and Foretz, 2013). Başlangıçta metforminin glikoz düşürücü etkisi keşfedilmiş fakat ileri çalışmalar yapılmaya değer bulunmamıştır. Ne var ki, 1940'larda antimalarial ajanlar araştırılırken guanidin temelli ajanların hayvanlarda kandaki glikoz seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiş ve 1957'de diyabet tedavisinde kullanılmak üzere yeniden çalışılmaya başlanmıştır (Witters, 2001).

Metforminin diğer biguanid türlerine göre daha az laktik asit toksisitesi gösterdiği ve bu noktada daha güvenilir bir anti-diyabetik ajan olduğu belirlenmiştir. Avrupa'da 20 yıl kullanıldıktan sonra Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi, 29 Aralık 1994'te diyabet hastalığının tedavisinde kullanımını onaylamış ve ABD'de 1995 yılında piyasaya sürülmüştür (Witters, 2001; Bailey, 2017)

1.6 Metforminin Etki Mekanizması

Metformin diabetes mellitus (tip-2 diyabet) tedavisi için yaygın kullanılan, kolaylıkla temin edilebilen anti-diyabetik bir ilaçtır (Bannister ve ark., 2014).

Metformin, glikozun bağırsaktan emilimini azaltarak, kandaki glikoz alımını artırıp plazmadaki insülin seviyesini düşürerek ve insülin duyarlılığını artırarak, belirgin hipoglisemiye neden olmadan kan glikoz konsantrasyonunun azalmasını sağlar (Grzybowska ve ark., 2011). Metformin yağ dokusu lipolizini inhibe eder ve dolaşımdaki serbest yağ asitlerini azaltır (Matthaei ve Greten, 1991; Bailey ve Turner, 1996). Bunlara ek olarak solunum zincir kompleks 1'i hedefleyerek mitokondriyal solunumu inhibe eder (El-Mir ve ark., 2000; Owen ve ark., 2000). Metforminin hücresel süreçlerdeki etkinliği, Metforminin hücresel alımını kolaylaştıran organik katyon taşıyıcı 1 (OCT1) aracılığıyla hücre içerisine alınması ile sağlanır (Shu ve ark., 2007).

Metformin, Adenozin Monofosfat (AMP) aktive edici protein kinazı (AMPK) aktive ederek dolaşımdaki glikoz, insülin seviyesini düşürür (Lin ve ark., 2017), glikoneogenezisi inhibe eder ve glikoz homeostasisinin korunmasını sağlar (Wang ve ark., 2017).

AMPK serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir (Hardie ve Carling, 1997; Hardie ve ark., 1998; Kemp ve ark., 1999). AMPK iki düzenleyici alt birimden oluşan heterotrimerik bir enzimdir. α katalitik alt birimi oluştururken, β ve γ diğer düzenleyici alt birimi oluşturmaktadır. Enzimin β ve γ alt birimleri α alt birimine bağlanarak enzimin aktivitesini ve hedeflerini belirler (Crute ve ark., 1998).

AMPK aktivitesindeki artış karaciğerdeki glikoz üretiminin baskılanması, iskelet kasındaki glikoz alımının artırılması, kolesterol ve trigliserid sentezinin inhibisyonu, yağ asidi metabolizmasının oksidasyon yoluyla artması ve lipolizin inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır (Hayashi ve ark., 2000; Lochhead ve ark., 2000; Bergeron ve ark., 2001; Musi ve ark., 2002).

AMPK aktivitesinin düzenlenmesi farklı mekanizmalar aracılığıyla ve karmaşıktır. AMP ve ATP aracılı mekanizma AMPK aktivitesinin düzenlenmesinde temel mekanizmadır. AMP'nin ATP'ye oranındaki artış AMPK'nın aktive olmasını sağlar (Foretz ve ark., 2010). AMPK aktivasyonu genellikle ATP üretimini artıran katabolik yolları tetiklerken, ATP tüketimini artıran anabolik yolları durdurur (Long ve Zierath,

2006). AMPK hücrede glikozun azaldığı ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun engellendiği ATP üretiminin azalması durumunda AMP/ATP oranını değiştiren çeşitli metabolik streslere yanıt olarak aktive edilir (Foretz ve ark., 2010). Aktifleştirilmiş AMPK ATP tüketimini azaltarak kısıtlı miktarda enerjiyle hücresel işlevin sürdürülmesini sağlar (Foretz ve ark., 2010). Glikoz ve lipit metabolizmasını kontrol ederek, enerji dengesini korur. Enzim AMP ve ATP'ye olan duyarlılığı ile hücre içerisindeki çok küçük ATP değişikliklerini bile algılayabilir. (Long and Zierath, 2006)

Metforminin AMPK'ya bağımlı olmayan bir yolla kandaki glikoz seviyesini düzenlediğini gösteren çalışmalar da vardır. Metformin rapamisinin memelilerdeki hedefi (mTOR) sinyal yolağını baskılayarak glikoz alımını artırır (Kalender ve ark., 2010). AMPK'dan bağımsız hareket ederek karaciğer glikoz sentezini inhibe eder (Foretz ve ark., 2010).

1.7 Metforminin Kullanım Alanları

1.7.1 Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS) yaklaşık olarak her beş kadından birini etkileyen yaygın endokrin ve metabolik üreme bozukluğudur. İnsülin direnci, hiperinsülinemi, glikoz intoleransı, obezite, inflamasyon, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklarla karakterizedir (Bargiota ve Diamanti-Kandarakis, 2012). PKOS ilk kez 1980 yılında raporlanmış (Legro ve ark., 1999) ve PKOS hastalarının %50-70'inde hiperinsülinemi ve insülin direnci olduğu doğrulanmıştır (Dunaif, 1997; Ovalle ve Azziz, 2002; Carmina ve Lobo, 2004). Bu gözlemler sonucunda benzer bulgular gösteren tip-2 diyabetin tedavisinde kullanılan metforminin PKOS tedavisinde de kullanılabileceği düşünülmüştür. Metformin PKOS hastalığının tedavisinde 1994'ten beri kullanılarak PKOS'un neden olduğu metabolik anormalliklerin çoğunda olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Velazquez ve ark., 1994). Metforminin insülin duyarlılığını, östrojen hormonu salgılanmasının artırılması, androjen yapımının azaltılması ve seks hormon bağlayıcı globülin yapımının artırılması ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Moggetti ve ark., 2000; Glueck ve ark., 2001). Metformin PKOS'lu kadınlarda glikoz emilimini ve insülin duyarlılığını artırarak kan glikozu ve androjen düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Bargiota ve Diamanti-Kandarakis, 2012). Metforminin ayrıca PKOS'lu kadınların metabolik anormallikleri üzerine çok sayıda katkısının bulunduğu saptanmıştır.

1.7.2 Yaşlanma

Yaşlanma, hasar birikimi, çeşitli doku ve organların işlev kaybı nedeniyle ölümle sonuçlanan karmaşık bir süreçtir. Metforminin yaşlanmaya karşı koruyucu etkisinin bulunduğu, yaşlanmayla ilişkili çok sayıda mekanizmayı hedeflediği ortaya konulmuştur. Yaşlanmayla ilişkili olarak, metforminin insülin seviyesinin ve insülin like growth factor (IGF-1) sinyalinin azaltılmasının (Liu ve ark., 2011) yanı sıra, büyüme ve çoğalmayla ilişkili mTOR sinyal yolunun inhibe edilmesi (Nair ve ark., 2014; Pérez-Revuelta ve ark., 2014), reaktif oksijen türlerinin (ROS) endojen üretiminin azaltılması (Zheng ve ark., 2012; Bridges ve ark., 2014) ve elektron taşıma zincirinde mitokondriyal kompleks 1'in inhibe edilmesi gibi işlevler üstlendiği çok sayıda çalışma ile bildirilmiştir. İnflamasyon, otofaji ve hücre yaşlanmayla ilişkili birçok metabolik süreci etkileyen metforminin (Saisho, 2015), DNA hasarını azaltıcı etkileri olduğu gösterilmiştir (Algire ve ark., 2012; Barzilai ve ark., 2016). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda metforminin insanlar üzerinde yaşlanmaya karşı koruyucu etkisinin bulunduğu henüz bilimsel verilerle gösterilmemiş olsa da mevcut veriler metforminin bu potansiyeline işaret etmektedir (Wang ve ark., 2017).

1.7.3 Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar diyabette mortalite ve morbiditeye önemli katkıda bulunmaktadır (Younk ve ark., 2016). Hastalığın nedenleri arasında serumda artan lipit düzeyi, obezite, hipertansiyon, insülin direnci bulunmaktadır. Serumda değişen LDL ve HDL seviyeleri ve trigliserid düzeyindeki artış kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir (Machover, 1989; Younk ve ark., 2016).

Metformin diğer antidiyabetik ilaçlarla karşılaştırıldığında kardiyovasküler hastalıkların mortalitesini ve insidansını azalttığı bildirilmiştir (Hesen ve ark., 2017). Metforminin koruyucu etkileri AMPK yolağının aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir. Metformin AMPK aktivasyonu ile HDL kolesterolünü değiştirmeden LDL kolesterol düzeyini düşürerek lipid metabolizmasını düzenleyebilir (Wang ve ark., 2017). Metformin ayrıca CD34+ hücrelerinin anjiyogenik potansiyelini arttırarak artan anjiyogenez vasıtasıyla vasküler koruyucu etkilere de sahip olabilir (Xu ve Rajaratnam, 2017). Buna ek olarak, metformin oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtı hafifletebilir, aynı zamanda endotel hücre fonksiyonunu iyileştirebilir (Isoda ve ark., 2006; Wan ve ark., 2013).

Yapılan klinik çalışmalarla metforminin plazmada dipeptidil peptidaz-4 aktivitesini azaltarak vasküler sistemin koruyan glukagon benzeri peptit 1'in (GLP-1) dolaşımdaki seviyelerini artırabileceğini göstermektedir (Cuthbertson ve ark., 2009; Oeseburg ve ark., 2010; Maida ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmayla metforminin insülin direncini ve plazma insülinini azaltarak sistolik kan basıncını düşürebileceği de gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017).

1.7.4 Diyabet

Dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu haline gelen tip-2 diyabet yaygın bir kronik hastalıktır ve son on yılda hasta sayısı giderek artmaktadır. İnsülin direnciyle karakterize edilen tip-2 diyabet (Ristic ve ark., 2006) Amerikan Diyabet Derneği ve Avrupa Diyabet Birliği'nin 2015 verilerine göre tip-2 diyabet tedavisi için metformin birinci basamak tedavidir (Schommers ve ark., 2017).

Metformin temel olarak tip-2 diyabet hastalarında hiperglisemiyi tedavi etmek için yaygın kullanılan ve ilk tercih edilen ilaçlardan biridir. Metformin hepatik glikoz üretimini baskılayıp insülin duyarlılığını artırarak, glikozun bağırsak emilimini azaltarak hipoglisemiye neden olmadan kan glikoz seviyesini düşürerek anti-hiperglisemik ajan olarak işlev görür (Bailey ve Turner, 1996). Metforminin başlangıçta belirlenen etki mekanizması mitokondrideki oksijen tüketimi inhibisyonudur (Chappell, 1963).

Metforminin temel işlevi glikoneogenezisi inhibe ederek hepatik glikoz üretimini azaltmaktır. AMPK aktivasyonu Metforminin plazma glikoz seviyesini düşürürken gerçekleştirdiği en temel mekanizmadır (Viollet ve ark., 2012). Metformin mitokondriyal solunum zincirini kısmi olarak inhibe ederek ATP ve AMP konsantrasyonlarının düzenlenmesinde anahtar bir molekül olan AMPK'yı dolaylı olarak aktive eder (Chong ve Chabner, 2009), glikoneogenez için gerekli olan enerji tedarikini engeller (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2010). Karaciğer birincil hedefi olmasına rağmen iskelet kası, yağ dokusu, endotel ve yumurtalık üzerinde etkisini gösterir. Metformin karaciğerde glikolitik enzimleri aktive ederek karaciğere glikoz giriş çıkışını engeller, insülin reseptörü ve reseptör substratını fosforilleyerek glikoneogenez baskılar (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2010).

1.7.5 Kanser

Metformin insülin düzeyini düzenleyerek dolaylı yoldan tümör gelişimini azalttığı yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir (Hwang ve ark., 2015). Metforminin anti-kanser

özelliğinin 2 farklı mekanizmaya bağlı olduğu düşünülmektedir; 1) IGF-1 reseptör ifadesinin azaltılması, 2) AMPK aracılığıyla mTOR sinyalinin baskılanması (Bodmer ve ark., 2011).

İnsülin hücrelerde reseptörüne bağlanarak PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını aktive eder ve bu durum proliferatif ve antiapoptotik mekanizmaları etkinleştirerek kanserleşme sürecine katkıda bulunur. Metformin hiperinsülinemik hastalarda glikoz metabolizmasını düzenleyerek anti-proliferatif etki gösterir (Jalving ve ark., 2010). Bu durum, insülin ve insülin bağımlı proteinlerin seviyesini etkileyerek, hücre canlılığı ve mitozu uyaran potansiyel büyüme faktörü IGF-1 seviyesinin düşürülmesi ile gerçekleştirilir (Ding ve ark., 2000; Jalving ve ark., 2010; Draznin, 2011; Dowling ve ark., 2012) ve böylece hücre büyümesi yavaşlatılır (Dowling ve ark., 2012). Metforminin tümör hücrelerinin oksijen tüketimini inhibe ederek tümör hücrelerinin radyasyona yanıtlarını artırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Han ve ark., 2016).

AMPK'nın yetersiz aktivitesi kontrolsüz hücre çoğalmasına izin verir. AMPK sinyal yolunun aktive edilmesi metforminin önemli bir anti-kanser mekanizmasıdır (Wang ve ark., 2017). Klinik kullanımları metforminin kanser önleyici etkilerini göstermektedir (Jalving ve ark., 2010). Aktive edilmiş AMPK hücrelerin büyüme ve çoğalması için harcanan enerji proseslerini koruma altına alır. Kanser hücreleri kanda artan hiperinsülemiye karşı insülin reseptörlerinin ifadelerinin düşürülmesi yeteneklerini kaybeder (Xiao ve ark., 2007).

Metformin AMPK'yı aktive ederek hücre bölünmesi ve metabolizmasını düzenleyen PI3K/AKT/mTOR yolağını baskılar. mTOR S6 kinazı (S6K) ve translasyon başlatıcı faktör 4E bağlayıcı protein 1'i (4EBP1) aktive ederek onkojenik sürece katkıda bulunur (Dowling ve ark., 2007). Metforminin AMPK aracılığıyla mTOR yolağını negatif olarak düzenlediği, bu şekilde çeşitli kanser türlerinde hücrelerin büyüme ve çoğalmasını inhibe ederek kanser gelişimini durdurduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Inoki ve ark., 2003; Inoki ve ark., 2005; Gwinn ve ark., 2008).

Metformin aracılığıyla tümör hücrelerinin yeniden programlanması p53 aktivasyonu ile da gerçekleşir. p53 hücre büyümesini ve DNA hasar onarımını kontrol ederek hücrelerin apoptoza giderek ölmelerini sağlar. Tümör hücrelerinde metforminin aktive ettiği AMPK p53'ü fosforilleyerek aktifleştirir, hücre bölünmesini ve apoptozu

indükler. Metformin aracılığıyla AMPK aktivasyonunun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte kolon kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediği görülmüştür (Jalving ve ark., 2010).

Metforminin uygun dozda kullanılarak anjiyogenezi inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Metformin Polikistik over sendromlu insülin direnci olan kadınlarda plazmada anjiyogenik faktörlerin miktarını azaltır. Obez diyabetik hastalarda anjiyogenik faktör olan vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) düzeyini düşürdüğü görülmüştür (Ersoy ve ark., 2008). Metforminin muhtemelen mTOR sinyal yolağının inhibisyonuyla HIF-1a, tümör nekroz faktör alfa, plazminojen aktivatör inhibitör-1 antijen, von Willebrand faktör gibi aracı molekülleri inhibe ederek anjiyogenezi ve inflamasyonu baskıladığını gösteren *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır (Lund ve ark., 2008)

Yapılan yeni çalışmalarla metforminin miRNA ekspresyonunu düzenleyerek anti-kanser etki meydana getirebileceği de gösterilmiştir (Li ve ark., 2012)

1.8 Metformin ve Larenks Kanseri

LKa dünya genelinde yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Metformin glikoz homeostasini düzenleyen, iyi tolere edilen anti-diyabetik bir ajandır ve düşük toksisitesi ve minimal yan etkileri dolayısıyla sıklıkla hastalarda tedavi amaçlı kullanılır ve son zamanlarda anti-kanser aktivitesiyle ilgi görmektedir (Dowling ve ark., 2011; Gou ve ark., 2013; Quattrini ve ark., 2014) Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla metforminin çok sayıda kanser çeşidinin insidansını %50'ye varan oranlarda düşürdüğünün (Decensi ve ark., 2010; Ge ve ark., 2015) ve tümörün tekrarlamasına karşı koruyucu etkilerinin olduğunu gösterilmesiyle (Rieken ve ark., 2013; Rieken ve ark., 2014) LKa'daki potansiyel anti-kanser rolü araştırılmıştır. Yapılan klinik çalışmalarla metformin kullanımının LKa hastalığına yakalanma riskinin azalttığı gösterilmiş (Becker ve ark., 2014), ayrıca metformin kullanan diyabet hastaları ile metformin kullanmayan diyabetik olmayan hastalar karşılaştırılarak metforminin LKa hastalarının sağ kalımlarını artırdığı bildirilmiştir (Sandulache ve ark., 2014). Ayrıca baş boyun kanserli hastalarda tekrar etmiş lezyonların tedavisinde adjuvan metformin tedavisinin kullanılmasının cerrahi tedaviye ihtiyaç duyulmadan lezyonlarda tam ve kısmi iyileşmeye sebep olduğu ortaya konulmuştur (Lerner ve ark., 2017). Elde edilen klinik bulgular metforminin LKa

tedavisinde kullanılma potansiyeline işaret etmektedir.

Bu doğrultuda tez çalışmamızda metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte kullanımının insan LKa hücre hattı olan Hep-2 hücrelerinin proliferasyon, klonogenite, apoptoz, migrasyon ve invazyon özellikleri üzerindeki etkilerinin araştırılarak metforminin LKa tedavisinde kullanılabilme potansiyelinin ortaya konulması amaçlanmıştır.



2 ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

(Zhao ve ark., 2011) Metforminin nazofarinjiyal kanserde doza ve zamana bağlı olarak hücrelerin proliferasyonu ve koloni oluşturma kapasitelerini baskıladığını göstermişlerdir. Ayrıca metforminin siklin D1 ifadesini protein düzeyinde azaltarak G0/G1 fazındaki hücrelerin sayısını artırdığını tespit etmişlerdir.

(Chen ve ark., 2012) Metforminin baş ve boyun kanserlerinden tiroit kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre döngüsünü inhibe ettiği gösterilmiş, bunun yanı sıra insülinin hücre proliferasyonunu teşvik edici etkisini de ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, metforminin tiroit kanser hücrelerini doksorubisin ve cisplatin benzeri kemoterapi ilaçlarının hücreler üzerindeki anti-kanser etkisine hassaslaştırdığı ortaya konulmuştur.

(Luo ve ark., 2012) Metforminin oral skuamöz hücreli karsinom hücreleri üzerinde hem *in vitro* hem *in vivo* anti-kanser etki gösterdiği ve insan oral skuamöz hücreli karsinom için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için potansiyel bir aday olabileceği bulunmuştur.

(Vitale-Cross ve ark., 2012) Çalışmada metforminin baş ve boyun kanseri oluşumu riskini azaltıp azaltmadığı incelenmiştir. Elde edilen bulgular, fare modellerinde metforminin kanserojen kaynaklı oral kanser lezyonların sayısını ve büyüklüğünü önemli ölçüde azaltarak spontan baş ve boyun kanseri gelişimini engellediğini gösterilmiştir.

(Skinner ve ark., 2013) 285 adet metformin alan hastada neo-adjuvan kemo-radyoterapi ile tedavi edilen özofagus adenokarsinomunun radyografik ve patolojik yanıt oranının araştırıldığı çalışmada metformin kullanımının özofagus kanserinde kemo-radyasyon tedavisine karşı hastaların gösterdiği doza bağımlı artmış yanıt ile ilişkili olduğu, dolayısıyla metforminin bu tedaviye duyarlılaştırıcı olabileceği ortaya konulmuştur.

(Sandulache ve ark., 2014) Metforminin larenks kanseri hastalarının sağkalımları üzerindeki etkisinin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada metformin kullanan diyabet hastalarında erken evre tümörler oluştuğu ve metformin kullanmayan ve diyabetik olmayan hastalara kıyasla metformin kullanan LKa hastalarının sağ kalımlarının daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur.

(Becker ve ark., 2014) Vaka-kontrol analizi yapılan çalışmada metforminin uzun

süre kullanımının LKa riskini azalttığı bildirilmiştir.

(Lerner ve ark., 2017) Daha önce tedavi edilen diyabetik olmayan baş ve boyun kanserli 3 hastada tekrar etmiş ve multifokal displastik lezyonların tedavisinde adjuvan metformin tedavisinin kullanılmış ve 3 hastada da mukozal lezyonların tam veya kısmi iyileşme gösterdiği ve herhangi bir ek cerrahi işlem gerektirmedikleri ortaya konulmuştur.



3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Cihazlar

- Derin Dondurucu (-20°C) **Tempow**
- Buzdolabı (4 °C) **Edesa**
- Derin Dondurucu (-80°C) **ESCO Lexicon®**
- Epoch Spektrofometre **Biotek EPOCH**
- Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet) **ESCO NordicSafe™**
- CO₂ İnkübatör **ESCO Celculture CO2 Incubator**
- Akım Sitometre **Partec**
- Mikropipet **Axypet**
- Mini Santrifüj **WiseSpin**
- Soğutmalı Santrifüj **Hettich Zentrifugen**
- Termal döngü cihazı (PZR) **SensQuest Labcycler**
- Vorteks **Wisd Wisemix VM-10**
- Su Banyosu **Wisd WiseBath**
- İnvart Mikroskop **Leica**
- Otoklav **Tomy SX-500E**
- Hassas Terazı **Shimadzu ATX224**
- Saf Su Cihazı **Millipore Direct- Q-3 UV**
- qRT PCR **Qiagen**

Sarf Malzeme, Kimyasal ve Kitler

- Eppendorf tüpler (0,2 - 0,5 - 1,5 ml) **IsoLab**
- 96 kuyucuklu plate **Corning® Costar®**
- 6 kuyucuklu plate **Corning® Costar®**
- 25 cm² hücre büyüme kapları **Corning® Costar®**
- 75 cm² hücre büyüme kapları **Corning® Costar®**
- Steril serolojik pipetler (5, 10 ml) **LP Italiana**
- Falkon tüpleri (15, 50 ml) **LP Italiana**
- Pens
- RPMI 1640 besi yeri **Gibco®**
- RPMI 1640 2X besi yeri **Multicell**
- Tripsin **Gibco®**
- Fetal Bovine Serum (FBS) **Gibco®**
- Penisilin-Streptomisin **Gibco®**
- Tripan mavisi **Sigma-Aldrich®**
- L-Glutamin **Sigma-Aldrich®**
- UltraPure LMP Agarose **ThermoFisher**
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x **Sigma-Aldrich®**
- TRIzol **Gibco®**
- DMSO (Dimetil sülfoksit) **Sigma-Aldrich®**
- Kloroform **Sigma-Aldrich**
- İzopropanol **Sigma-Aldrich**
- Etanol **Merck**

- cDNA Sentez Kiti **Applied Biosystems**
- TaqMan Universal Master Mix **Applied Biosystems**
- Cell Counting Kit-8 (CCK-8) **Dojindo**



3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Kültürü

Tez kapsamında Şap Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen Hep-2 LKα hücre hattı kullanıldı. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besi yeri içerisinde 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edilerek çoğaltıldı. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel amaca bağlı olarak hücreler pasajlandı.

3.2.2 Hücre Sayım

T75 flasklarda %70-80 konfluensiye ulaşmış hücreler Tripsin yardımıyla kaldırıldı ve 5 ml taze besi yeri içerisinde çözülüp tek tek hücrelerden oluşan homojen bir karışım elde edildi. Hücre sayımı hemositometre lamı ile gerçekleştirildi. Sayım öncesinde hemositometre lamı ve lamel %70 alkolle temizlendi ve lamel hemositometrenin üzerine yerleştirildi. Hücre sayımı için 15 µl Trypan Blue ile 15 µl hücre solüsyonu karıştırıldı.

Bu karışımdan 15 µl alınıp hemositometre lamı ile lamel arasındaki boşluğa yüklendi ve invert mikroskopta hücre sayımı yapıldı. 1 ml besi yerinde bulunan canlı hücre sayısı (3.1) numaralı formüle göre hesaplandı;

$$\text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10.000 \quad (3.1)$$

3.2.3 Hücrelerin 96 Kuyucuklu Platelere Ekilmesi

Hücre sayımı yapıldıktan sonra hücreler 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğunda 100 µl besi yeri ve 3000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücre ekimi yapıldıktan sonra plateler 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.2.4 Metforminin Hazırlanışı

Ticari olarak satın alınan metformin üretici firmanın protokolüne uygun olarak hazırlandı. 5 mg metformin hassas terazi yardımıyla tartıldı. 3019 µl moleküler grade suda çözülerek 10 mM stok metformin solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon 200µl'lik alikotlar halinde bölünerek kullanılacağı zamana kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.5 5-FU'in Hazırlanışı

Ticari olarak satın alınan 5-FU üretici firmanın protokolüne uygun olarak hazırlandı. 10 mg 5-FU hassas terazi yardımıyla tartıldı. 3843 µl moleküler grade suda çözülerek 20 mM stok 5-FU solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon 200 µl'lik alikotlar halinde bölünerek kullanılacağı zamana kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.6 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

96 kuyucuklu platelere ekilen hücreler 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra her kuyudaki besiyeri çekildi. Hücrelere 8 tekrarlı olacak şekilde 0,5, 1, 2 ve 4 mM konsantrasyonlarda metformin veya 10, 20, 40 ve 80 µM konsantrasyonlarda 5-FU içeren besi yerleri verildi. Metformin ve 5-FU'nun hücrelerin çoğalma kapasiteleri üzerindeki etkileri 24 ve 48 saat sonra sadece besi yeri ile muamele edilmiş kontrol hücreleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Hücre proliferasyon testi 'Hücre Sayım Kiti-8' (CCK-8, Dojindo) kullanılarak üretici firmanın protokolü izlenerek yapıldı. Kısaca, kuyucuklardaki besiyeri boşaltıldı ve her bir kuyucuğa %10 WST1 solüsyonu içeren taze besi yeri eklendi. Hücreler formazan kristallerinin oluşması için 37 °C'de karanlıkta 3 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılığı Epoch 2 Microplate Spectrophotometer cihazı kullanılarak 490 nm'de abzorban ölçümü yapılarak değerlendirildi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda metformin ile 5-FU'nun hücre canlılığı üzerindeki sinerjistik etkilerini incelemek için hücreler 2 mM metformin ve 40µM 5-FU içeren besi yeri ile muamele edildi. Hücre canlılığı 24, 48 ve 72 saat sonra sadece metformin, sadece 5-FU veya sadece besi yeri ile muamele edilmiş kontrol hücreleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.2.7 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Klonogenitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte hücre klonogenitesi üzerine etkilerinin araştırılması için soft agar testi yapıldı. Soft agar testi kısaca aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. UltraPure Low Melting Point Agarose'dan 360 mg tartıldı ve 30 ml moleküler grade su içerisinde çözülerek %0,6 konsantrasyonda alt agar hazırlandı. Hazırlanan agar steril bir falkon tüpe alınarak 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda sıcaklığı 37 °C'ye gelinceye kadar bekletildi. Sonrasında %20 FBS %2 penisilin/streptomisin ile hazırlanmış 2X RPMI-1640 ile 1:1 oranında seyreltildi. Hazırlanan karışımdan 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 1 ml eklendi ve kuyucukların yüzeylerini tamamen kaplayacak şekilde dağılması sağlandı. Alt agarın katılaşması için oda sıcaklığında 30-40 dk bekletildi.

Daha sonra UltraPure Low Melting Point Agarose'dan 180 mg tartıldı ve 30 ml moleküler grade su içerisinde çözülerek %0,3 konsantrasyonda üst agar hazırlandı.

Hazırlanan agar tüpe alınarak 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda sıcaklığı 37°C'ye gelinceye kadar bekletildi. Sonrasında %20 FBS %2 penisilin/streptomisin ile hazırlanmış 2X RPMI-1640 ile 1:1 oranında seyreltildi. Hazırlanan karışıma platenin her bir kuyucuğuna 3000 hücre düşecek şekilde Hep-2 hücreleri eklendi ve içerisinde hücrelerin olduğu üst agar 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 1 ml gelecek şekilde kuyucuklara eklendi. Üst agarın katılması için oda sıcaklığında plateler 40-60 dk bekletildi.

Sonrasında 6 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara 2 mM metformin, 40µM 5-FU veya 2 mM metformin ile 40µM 5-FU içeren besi yeri eklendi. Besi yeri her 2-3 günde bir değiştirilerek hücreler 21 gün 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edildi. 21 gün sonunda oluşan koloniler 10% etanol ve 0,01% Crystal Violet içeren solüsyonla 30 dk muamele edilerek fikse edilip boyandı. İvert mikroskop kullanılarak her bir kuyucukta bulunan koloniler sayıldı. Ayrıca her bir kuyucukta farklı 10 bölgeden görüntüler alınarak koloni büyüklükleri karşılaştırıldı.

3.2.8 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Apoptozu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Metformin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte hücre apoptozu üzerine etkilerinin araştırılması için hücreler 6 kuyucuklu platelere kuyucuk başına 100.000 hücre düşecek şekilde iki tekrarlı olarak ekildi. Hücreler 2 mM metformin, 40µM 5-FU veya 2 mM metformin ile 40µM 5-FU içeren besi yeri ile muamele edildikten 48 saat sonra hücreler toplandı ve PBS ile yıkandı. Hücrelerdeki apoptotik aktivite değişimi Annexin V-FITC Apoptosis Kiti ile üretici firmanın protokolü takip edilerek CyFlow® Cube 6 akım sitometri cihazı ile ölçüldü.

3.2.9 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Hücre Göçü Kapasitesi Üzerindeki Etkisinin Yara Testi ile Araştırılması

Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte hücre göçü üzerine etkileri ilk olarak yara testi ile karşılaştırıldı. Öncelikle 6 kuyucuklu platelere kuyucuk başına 500.000 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı ve hücreler %100 konfluensiye ulaşıncaya tek tabakalı hücrelere 200 µL'lik pipet ucu ile tek bir çizgi halinde "yara" oluşturuldu. Hücreler 2 mM metformin, 40µM 5-FU veya 2 mM metformin ile 40µM 5-FU içeren besi yeri ile muamele edildikten 24 saat sonra hücrelerin göç etme potansiyelleri yara kapama miktarları karşılaştırılarak değerlendirildi. Hücre fotoğrafları invert mikroskop

kullanılarak çekildi.

3.2.10 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Hücre Göçü Kapasitesi Üzerindeki Etkisinin Transwell Testi ile Araştırılması

Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte hücre göçü üzerine etkileri ayrıca Transwell insert testi kullanılarak karşılaştırıldı. Hücreler 500 µl serum içermeyen RPMI-1640 içerisinde süspanse edildi ve iki tekrarlı olacak şekilde insertlere ekildi (kuyucuk başına 50.000 hücre). Sonrasında insertlerin içerisine konulduğu 24 kuyucuklu platenin kuyucuklarına %10 FBS içeren RPMI-1640 besi yeri eklendi. Hücreler 37 °C de 24 saat inkübe edildikten sonra insert membranı üzerinde kalan hücreler pamuk swap kullanılarak uzaklaştırıldı, 8 µm'lik gözeneklerden geçerek filtrenin alt yüzeyine göç eden hücreler fikse edildi, % 0.1 Crystal Violet ile boyanarak görüntülendi ve sayım işlemi yapıldı.

3.2.11 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 Hücrelerinin Hücre İnvazyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte hücrelerin invazyon kapasitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 'Corning BioCoat™ Matrigel Invasion Chamber'lar kullanıldı. Hücreler 500 µl serum içermeyen RPMI-1640 içerisinde süspanse edildi ve iki tekrarlı olacak şekilde önceden Matrigel ile kaplanmış insertlere ekildi (kuyucuk başına 50.000 hücre). Sonrasında insertlerin içerisine konulduğu 24 kuyucuklu platenin kuyucuklarına %10 FBS içeren RPMI-1640 besi yeri eklendi. Hücreler 37 °C de 24 saat inkübe edildikten sonra insert membranı üzerindeki Matrigel ve hücreler pamuk swap kullanılarak uzaklaştırıldı. Matrigel'in içinden invaze olup, 8 µm'lik gözeneklerden geçerek filtrenin alt yüzeyine göç eden hücreler fikse edildi, %0,1 Crystal Violet ile boyanarak görüntülendi ve sayım işlemi yapıldı.

3.2.12 Hücrelerden TRIzol ile RNA İzolasyonu

Kontrol hücreleri, metformin, 5-FU veya metformin ile birlikte 5-FU ile 48 saat muamele edilen Hep-2 hücreleri Tripsin ile kaldırıldıktan sonra sayıldı. Her örnek için eşit miktarda (1×10^6) hücre kullanıldı. Hücreler 1 ml PBS ile iki kez yıkandı. 500 µl TRIzol solüsyonu içerisinde pipet yardımıyla iyice homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler TRIzol içerisinde oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek örneklerin iyice parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin nükleik asitlerden tamamen

ayrışması sağlandı. Sonrasında örneklere 100 µl kloroform eklendi ve örnekler iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Sonrasında 4 °C’de 12000g’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Faz ayrışması sonrasında üstteki RNA içeren organik fazlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Organik fazlara 250 µl izopropanol eklenerek örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 4 °C’de 12000g’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüpün alt kısmında beyaz renkte ya da renksiz çökelti şeklinde görülebilen RNA’lar %75 etil alkolle yıkanarak 4 °C’de 7500g’de 5 dakika santrifüjlendi. Kurumaya bırakılan RNA’lar iyice kuruduktan sonra nükleaz içermeyen moleküler grade su içerisinde çözüldü. RNA konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

3.2.13 cDNA Sentezi

Kontrol hücreleri, metformin, 5-FU veya metformin ile birlikte 5-FU ile 48 saat muamele edilen Hep-2 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinden 1000’er ng kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez işlemleri ‘High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit’ (Thermo, ABD) üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

3.2.14 Moleküler Toksikoloji Paneli

Gen ekspresyon analizleri gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) SYBR Green metodu ile üretici firmanın protokolüne göre Rotor-Gene qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca cDNA örnekleri SYBR® Green PCR Master Mix ile karıştırıldıktan sonra 84 adet moleküler toksikoloji ile ilişkili ve 5 adet housekeeping gen için primer içeren 96 kuyucuklu RT² mRNA PCR Array platelerine üretici firmanın protokolü takip edilerek eklendi. PCR işlemi 95°C’de 10 dakika süren ilk denatürasyon, sonrasında 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakikadan oluşan 40 döngü ile gerçekleştirilmiştir. Rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapılmış heat-map görüntüsü RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 kullanılarak oluşturulmuştur (Livak and Schmittgen, 2001).

3.2.15 İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiş, ve istatistiksel anlamlılıklar Student’s t test kullanılarak değerlendirilmiştir. 0,05’ ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

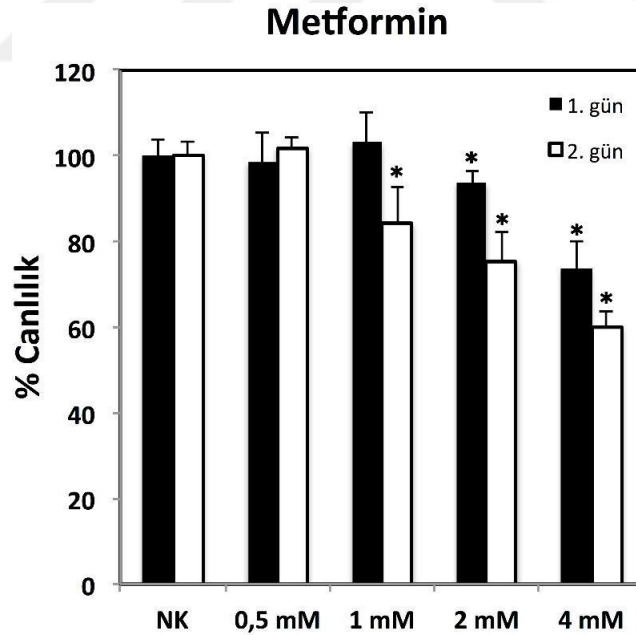
4 ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Metforminin Hep-2 hücre proliferasyonu ve klonogenitesi üzerindeki etkileri

Metforminin Hep-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi CCK-8 testi kullanılarak değerlendirildi. 0,5, 1, 2 ve 4 mM konsantrasyonlarda metformin içeren besi yeri ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinde hücre canlılığının hem zamana hem de doza bağlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.1).

24 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığının 2 mM konsantrasyondan itibaren azaldığı, 48 saatlik uygulama sonrasında ise hücre canlılığının 1 mM konsantrasyondan itibaren azaldığı bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 48 saat sonunda 2 mM konsantrasyonda Metforminin hücre canlılığını %75'e, 4 mM konsantrasyonda

Metforminin ise hücre canlılığını %59'a kadar düşürdüğü görüldü (Şekil 4.1 p<0,001). Elde edilen bulgular doğrultusunda 48 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını yaklaşık %30 oranında azaltan doz olan 2 mM konsantrasyonun ileri çalışmalarda optimum doz olarak kullanılmasına karar verildi.

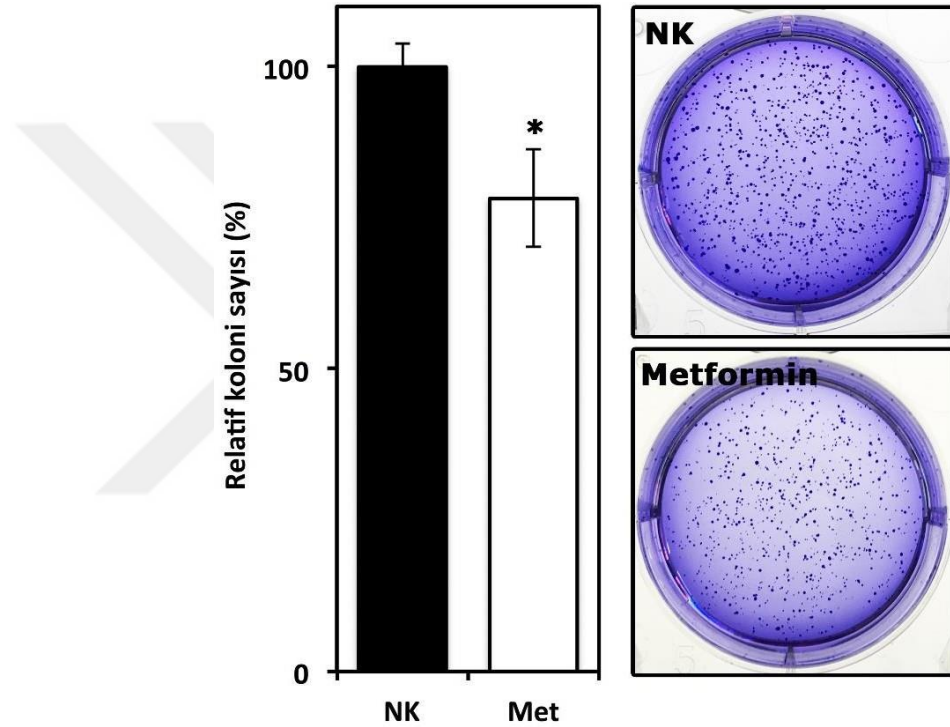


Şekil 4.1 Metforminin Hep-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki doza ve zamana bağlı etkileri

Metforminin Hep-2 hücre klonogenitesi üzerine etkilerinin araştırılması için ise Soft agar testi kullanıldı. Kanser hücrelerinin agar içerisinde koloni oluşturma yeteneği

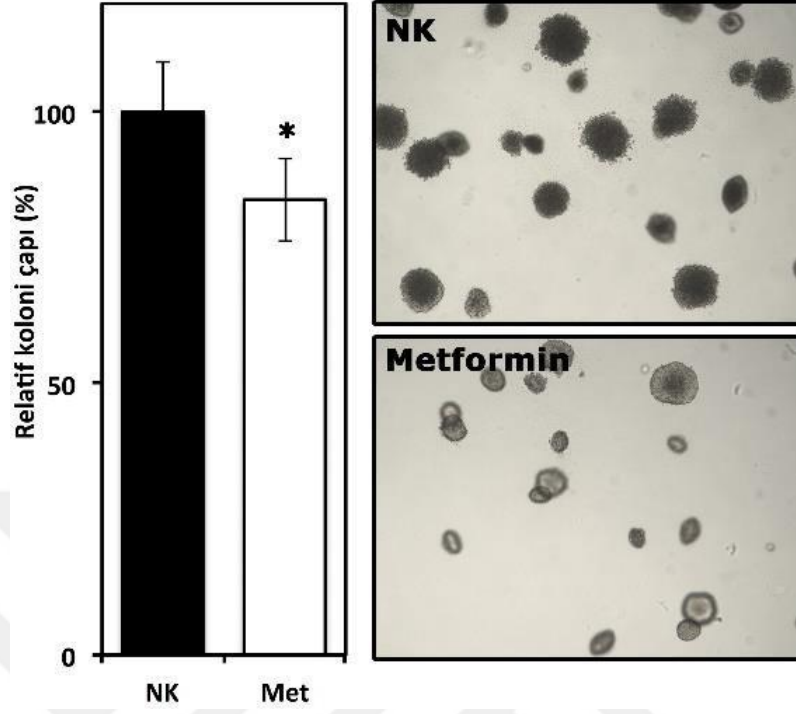
hücrelerin herhangi bir yüzeye tutunmadan çoğalma kapasitelerinin bir göstergesidir ve kanser hücrelerinin agresiflik potansiyelleri ile ilişkilidir.

Soft agar testi 2mM metformin uygulanan Hep-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerinin anlamlı olarak azaldığını ve oluşan koloni sayısının kontrolle karşılaştırıldığında %22 daha az olduğunu ortaya koydu (Şekil 4.2, $p<0,05$).



Şekil 4.2 Metforminin Hep-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri üzerindeki etkisi

Metforminin Hep-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri üzerindeki etkisini değerlendirmek adına ayrıca oluşan kolonilerin büyüklükleri karşılaştırıldı. 2mM metformin ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinin oluşturduğu kolonilerin çapları kontrol hücrelerin oluşturduğu kolonilerin çapları ile karşılaştırıldığında daha küçük kolonilerin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.3, $p<0,001$).

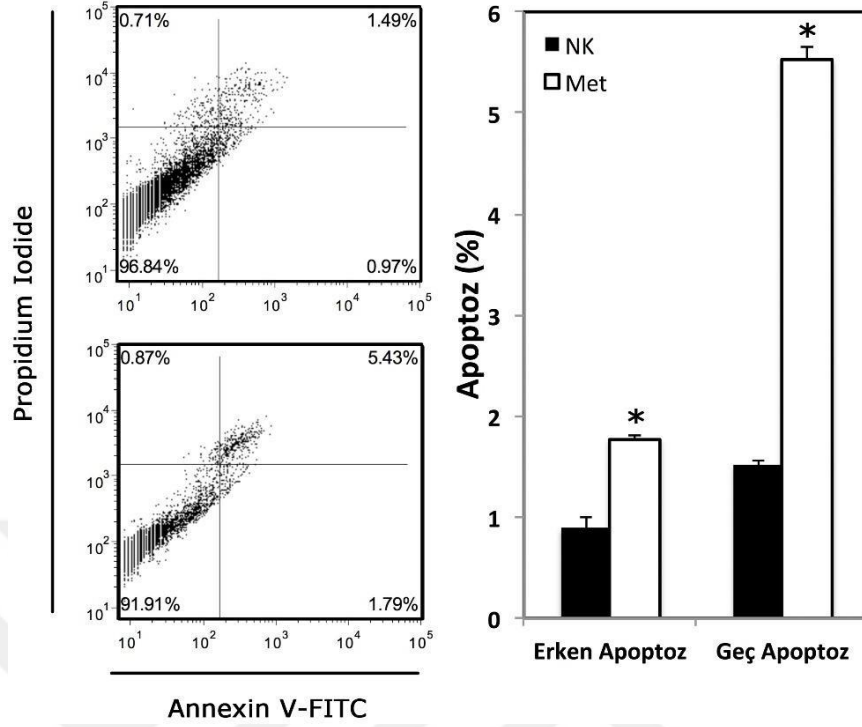


Şekil 4.3 Metforminin Hep-2 hücrelerinin oluşturduğu koloni büyüklükleri üzerindeki etkisi

4.2 Metforminin Hep-2 hücre apoptozu üzerindeki etkileri

Metforminin Hep-2 hücreleri üzerindeki proliferasyon azaltıcı etkisinin apoptozun tetiklenmesi ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için Annexin V-FITC Apoptosis Kiti kullanılarak apoptoz değerlendirildi.

Hücreler 48 saat 2 mM konsantrasyonda metformin ile muamele edildikten sonra Flow sitometri ile üretici firmanın protokolü takip edilerek analiz yapıldı. Kontrol Hep-2 hücreleri ve 2 mM metformin ile muamele edilen Hep-2 hücreleri karşılaştırıldığında erken ve geç apoptotik hücrelerin yüzdesinde anlamlı bir artış olduğu ortaya koyulmuştur. 2mM metformin ile muamele edildikten sonra erken apoptotik hücrelerin kontrol hücrelere göre %0,97'den %1,79'a, geç apoptotik hücrelerin ise yüzdesi %1,49'dan %5,43'e yükseldiği görülmüştür.

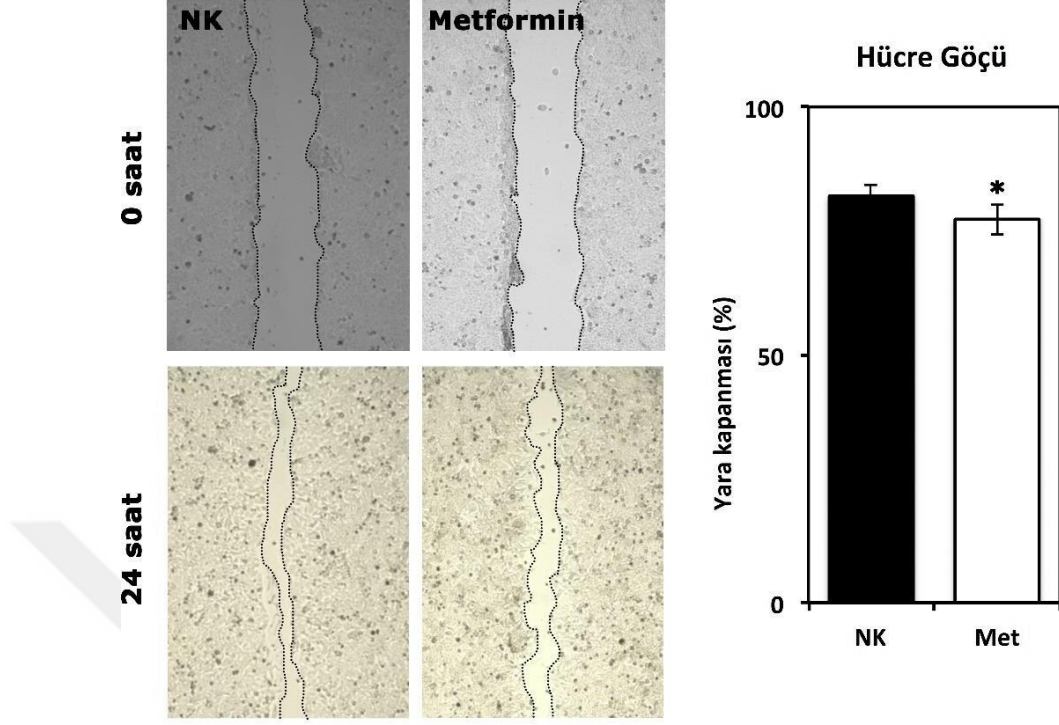


Şekil 4.4 Metforminin Hep-2 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisi

4.3 Metforminin Hep-2 hücre göçü üzerindeki etkileri

Metforminin Hep-2 hücrelerinin göç etme kapasiteleri üzerindeki etkisinin araştırılması için 2 mM metformine maruz bırakılan hücelere öncelikle yara testi yapıldı.

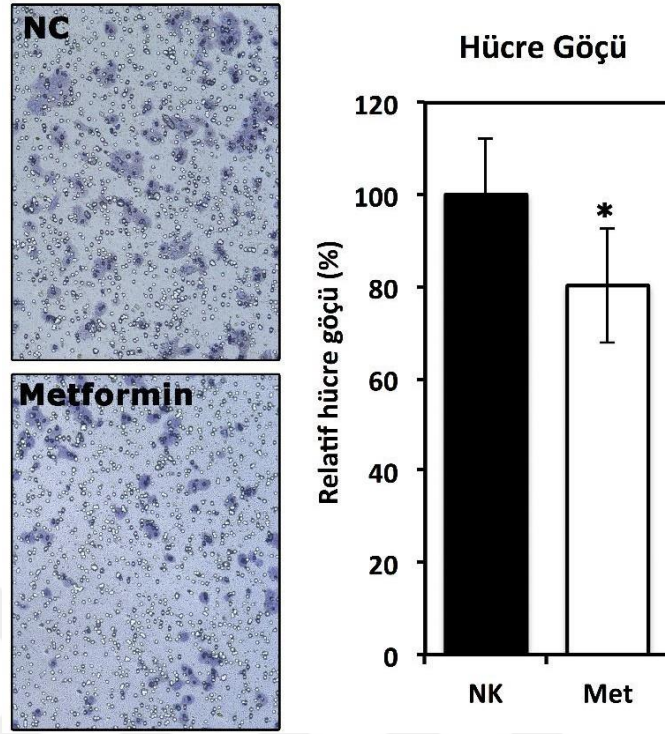
Yara testi Metformin ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinin hücre göçü potansiyellerinin kontrol hücelere göre azaldığını gösterdi. Hücre göçü inhibisyonunun kantitatif değerlendirilmesi için hücrelerin oluşturulan yaraları kapatma yüzdeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar metformine maruz bırakılan hücelerde yaranın yaklaşık %75 oranında kapatıldığını gösterirken, kontrol hücrelerin yaranın %80'inden fazlasını kapattığı görüldü (Şekil 4.5, $p < 0.01$).



Şekil 4.5 Metforminin Hep-2 hücrelerinin göçü üzerindeki etkisinin yara testi ile gösterilmesi

Metforminin Hep-2 hücrelerinin hücre göçüne etkisinin araştırılmasına Transwell insert testi kullanılarak devam edildi.

2 mM metformin muamelesinin hücre göçü üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde metformin ile muamele edilen hücrelerin göç potansiyelinin kontrol hücrelere göre %20 oranında azaldığı görüldü (Şekil 4.6, $p < 0.001$).

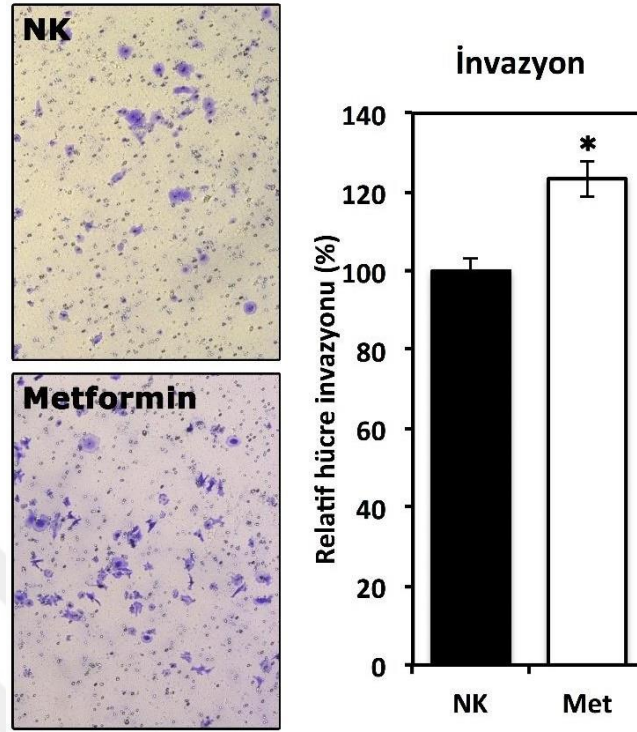


Şekil 4.6 Metforminin Hep-2 hücrelerinin göçü üzerindeki etkisinin Transwell hücre göçü testi ile gösterilmesi

4.4 Metforminin Hep-2 hücre invazyonu üzerindeki etkileri

Metforminin Hep-2 hücrelerinin hücre invazyonu üzerine etkisinin araştırılması için Transwell Matrigel invasion assay kullanıldı.

Transwell Matrigel invazyon testi ile metformin ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinin invaziv potansiyeli kontrol hücrelerinin invaziv potansiyeli ile karşılaştırıldı. Beklenmedik bir şekilde metformin ile muamele edilen hücrelerin invaziv potansiyelinin kontrol hücrelere göre %23 oranında arttığı görüldü (Şekil 4.7, $p < 0.05$).



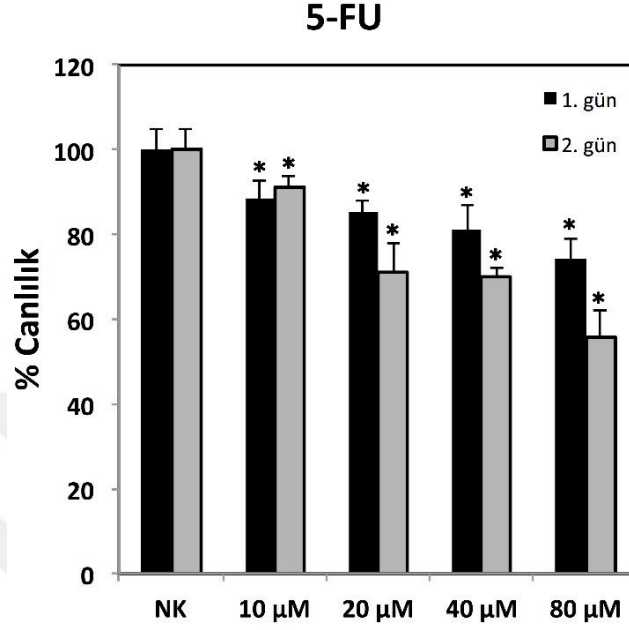
Şekil 4.7 Metforminin Hep-2 hücrelerinin invazyonu üzerindeki etkisi

4.5 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkileri

Metforminin kanser agresifliği ile alakalı hücre çoğalması, apoptozu, göçü ve invazyonu gibi parametreleri etkilediğinden dolayı, olası adjuvan bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilme potansiyelini değerlendirmek için 5-FU ile birlikte Hep-2 hücreleri üzerindeki sinerjistik etkileri değerlendirildi. Bu doğrultuda öncelikle hücre proliferasyonunu değerlendirmek için CCK-8 testi kullanıldı. 10, 20, 40 ve 80 μ M konsantrasyonlarda 5-FU içeren besi yeri ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinde hücre canlılığının hem zamana hem de doza bağlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.8).

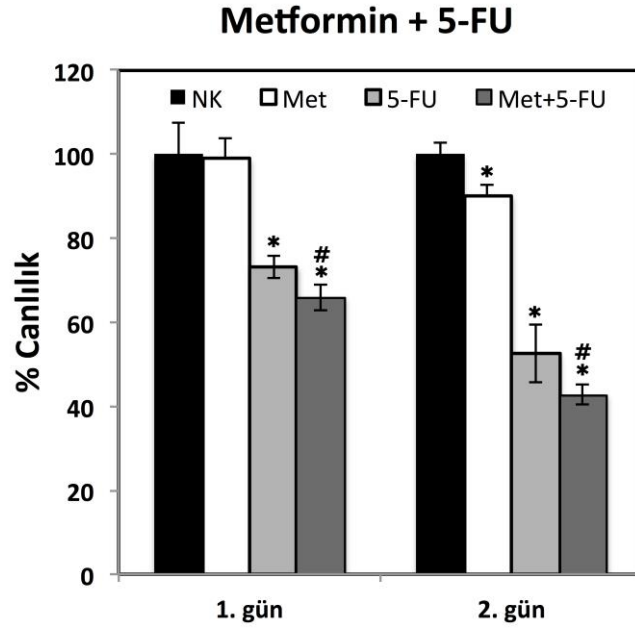
Hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığının 10 μ M konsantrasyondan itibaren azaldığı bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 48 saat sonunda 80 μ M konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılığını %55'e, 4 mM konsantrasyonda 5-FU'nun ise hücre canlılığını %71'e kadar düşürdüğü görüldü (Şekil 4.1 $p < 0,001$). Elde edilen bulgular doğrultusunda 48 saatlik uygulama sonrasında hücre

canlılığını yaklaşık %30 oranında azaltan doz olan 40 μ M konsantrasyonun ileri çalışmalarda optimum doz olarak kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.8 5-FU'nun Hep-2 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi

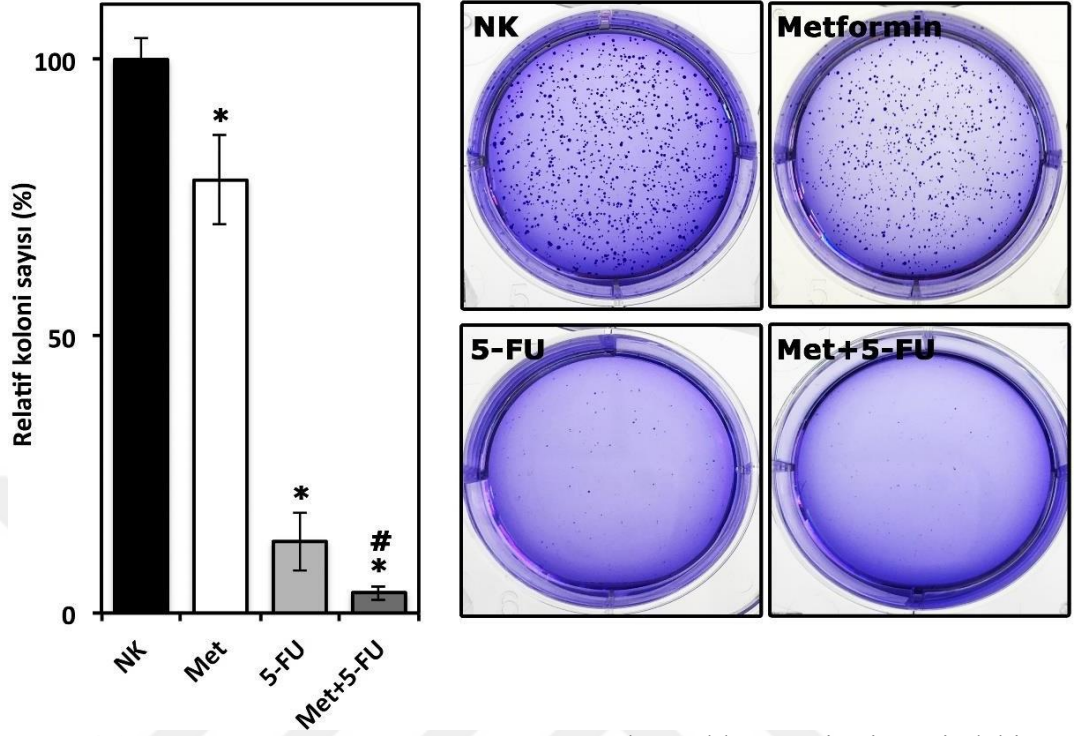
Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkileri değerlendirmek için hücreler 2 mM metformin ve 40 μ M 5-FU içeren besi yeri ile 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücrelerin proliferasyon kapasiteleri kontrol Hep-2 hücreleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2. gün sonunda metformin tek başına hücre canlılığını %90'a düşürürken, 5-FU tek başına %52'ye düşürdü. Hücelere metformin ve 5-FU birlikte verildiğinde ise hücre canlılığının 5-FU'nun ya da metforminin tek başına verildiği gruplara göre daha etkili bir şekilde azaldığı ve %42'ye kadar düştüğü bulundu (Şekil 4.9 p<0.001).



Şekil 4.9 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkileri

4.6 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinin klonogenitesi üzerindeki sinerjistik etkileri

Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre klonogenitesi üzerindeki sinerjistik etkilerinin araştırılması için Soft Agar testi kullanıldı. Soft Agar testi metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelini hem metforminin tek başına hem de 5-FU'nun tek başına verildiği gruplara göre anlamlı olarak azalttığı gösterildi. 2 mM metformin ve 40 µM 5-FU ile muamele edilen hücreler kontrolle karşılaştırıldığında koloni sayısında anlamlı derecede azalma görüldü (Şekil 4.10, $p < 0.05$).



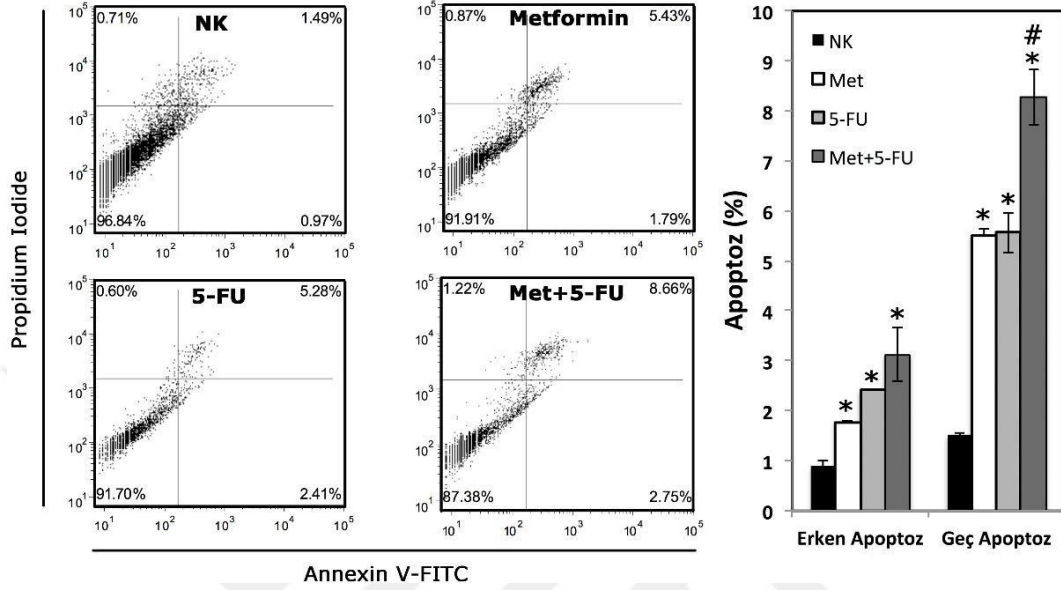
Şekil 4.10 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre klonogenitesi üzerindeki sinerjistik etkileri

4.7 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre apoptozu üzerindeki sinerjistik etkileri

Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkilerinin apoptozun tetiklenmesi ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için Annexin V-FITC Apoptosis Kiti kullanılarak apoptoz değerlendirildi.

Hücreler 48 saat 2 mM metformin ve 40 μ M 5-FU ile birlikte muamele edildikten sonra Flow sitometri ile üretici firmanın protokolü takip edilerek analiz yapıldı. Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerde erken ve geç apoptotik hücrelerin yüzdesinde hem metforminin tek başına hem de 5-FU'nun tek başına verildiği gruplara göre anlamlı olarak artış olduğu ortaya koyuldu. 2mM metformin ve 40 μ M 5-FU ile muamele edilen hücrelerde 40 μ M 5-FU ile muamele edilen hücelere göre erken apoptotik hücrelerin %2,41'den %2,75'e, geç apoptotik hücrelerin ise yüzdesi %5,28'den %8,66'ya yükseldiği görülmüştür (Şekil 4.11, # $p < 0.05$). Bu durum metformin ve 5-FU'nun hücelere birlikte verildiğinde daha etkili bir şekilde apoptozu indükleyerek

hücre proliferasyonunu azalttığına işaret etmektedir.

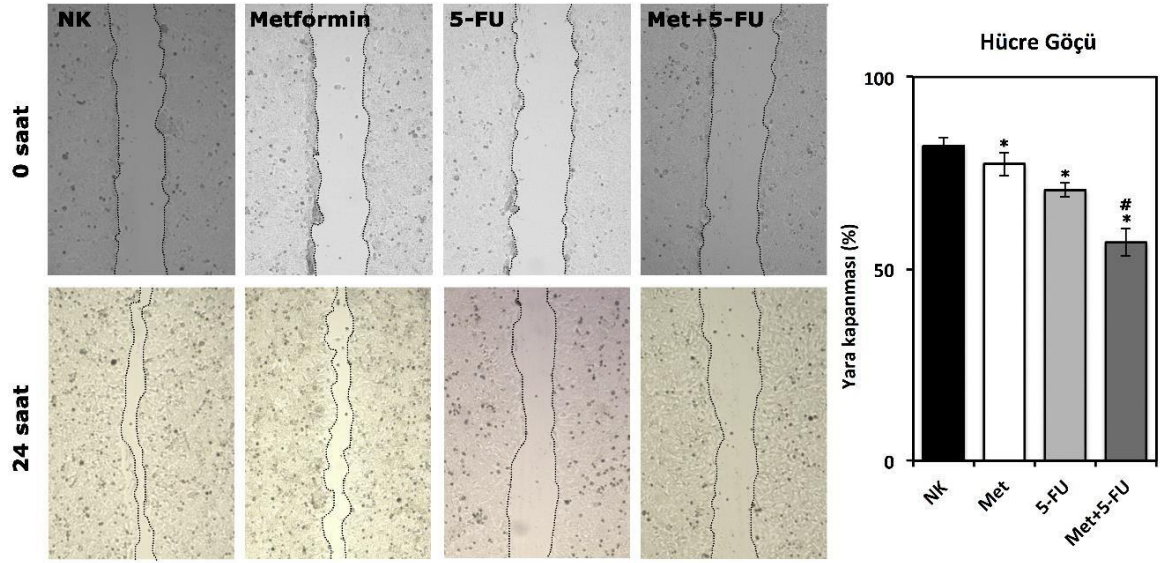


Şekil 4.11 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre apoptozu üzerindeki sinerjistik etkileri

4.8 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (yara kapama) üzerindeki sinerjistik etkileri

Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (yara kapama) üzerindeki sinerjistik etkilerinin araştırılması için 2 mM metformin ve 40 μ M 5-FU'ya birlikte maruz bırakılan hücrelere yara testi yapıldı.

Yara testi metformin ve 5-FU ile birlikte muamele edilen Hep-2 hücrelerinin hücre göçü potansiyellerinin daha etkin bir şekilde azaldığı görüldü. Hücre göçü inhibisyonunun kantitatif değerlendirmesi için hücrelerin oluşturulan yaraları kapatma yüzdeleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar metformin ve 5-FU ile birlikte muamele edilen hücrelerde yaranın %56 oranında kapatıldığını gösterirken, sadece 5-FU ile muamele edilen hücrelerin yaranın sadece %70'ini kapattığı görüldü (Şekil 4.12, # $p < 0.001$).

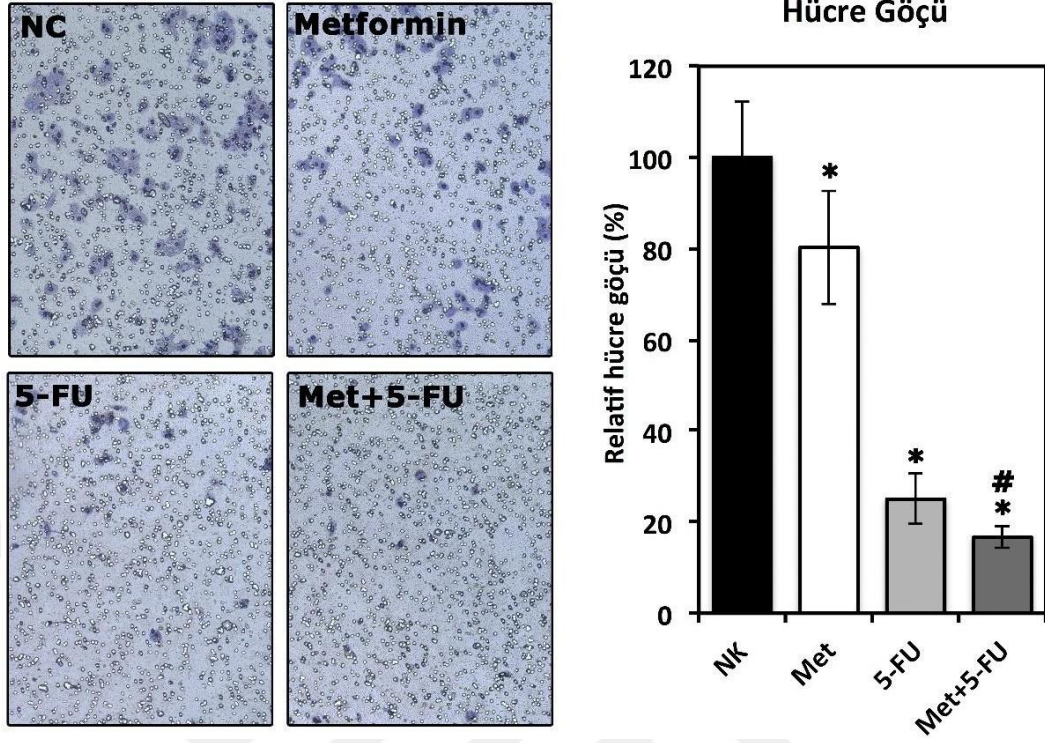


Şekil 4.12 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (yara kapama) üzerindeki sinerjistik etkileri

4.9 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (Transwell testi) üzerindeki sinerjistik etkileri

Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinin hücre göçü üzerindeki etkisinin araştırılmasına Transwell insert testi ile devam edildi.

Transwell insert testi de metformin ve 5-FU ile birlikte muamele edilen Hep-2 hücrelerinin hücre göçü potansiyellerinin daha etkin bir şekilde azaldığını gösterdi. 2 mM metformin ve 40 μ M 5-FU'nun birlikte muamelesinin hücre göçü üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sadece 5-FU ile muamele edilen hücreler kontrol hücrelere göre %75 azaltırken, 5-FU'ya ek olarak metformin verildiğinde hücrelerin göç potansiyellerinin %84 oranında azaldığı görüldü (Şekil 4.13, # $p < 0.01$).

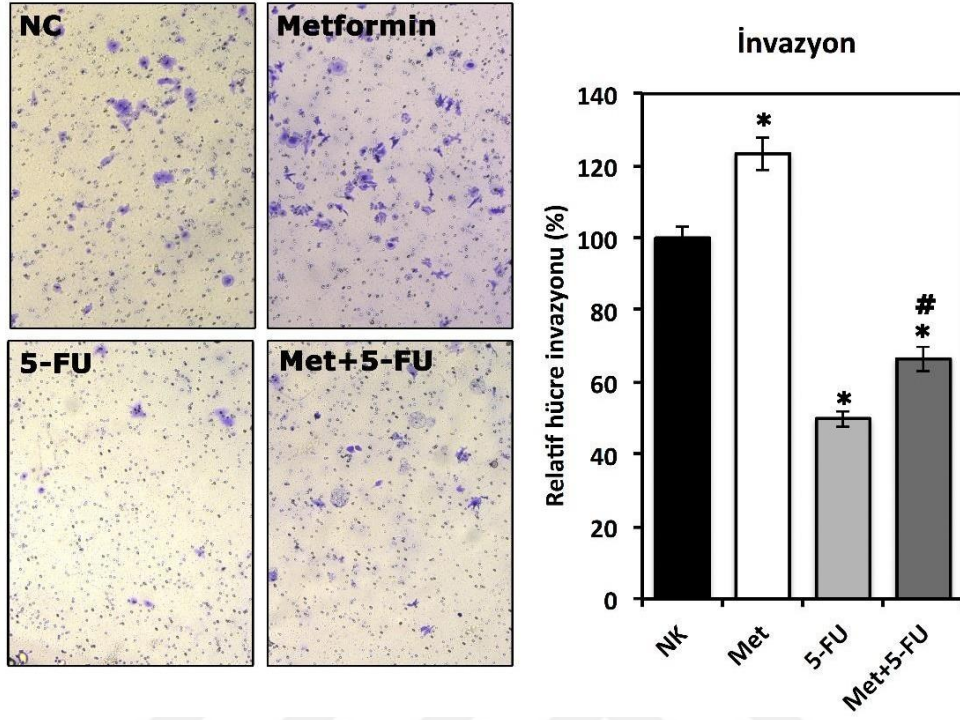


Şekil 4.13 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre göçü (Transwell testi) üzerindeki sinerjistik etkileri

4.10 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre invazyonu (Transwell Matrigel testi) üzerindeki sinerjistik etkileri

Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinin hücre invazyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için Transwell Matrigel invazyon testi kullanıldı.

Transwell Matrigel invazyon testi ile metformin ve 5-FU ile birlikte muamele edilen Hep- 2 hücrelerinin invaziv potansiyeli 5-FU ile tek başına muamele edilen hücrelerin invaziv potansiyeliyle karşılaştırıldı. Hep-2 hücrelerinin metformin ve 5-FU ile birlikte muamelesinin hücre invazyonu üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirildi. Metformin ve 5-FU ile birlikte muamele edilen hücrelerin invaziv potansiyelinin sadece 5-FU uygulanan hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. (Şekil 4.14, $p < 0.05$). Bu durum sadece metformin uygulanan hücrelerde kontrol hücrelere göre artan invazyon potansiyeli ile paralellik göstermektedir.

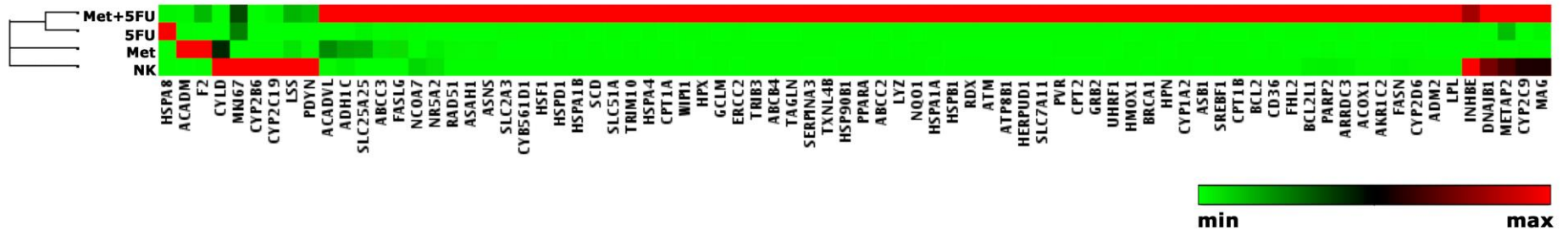


Şekil 4.14 Metforminin 5-FU ile birlikte Hep-2 hücre invazyonu üzerindeki sinerjistik etkileri

4.11 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 hücreleri üzerindeki anti-kanser potansiyelinin moleküler toksikoloji paneli ile araştırılması

Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte hücelere verildiğinde hücrelerde oluşan anti-kanser etkilerin gen ifadesi düzeyinde ne gibi değişikliklere neden olduğunun araştırılması için 84 adet moleküler toksikoloji ile ilişkili gen ve 5 adet housekeeping gen için primer içeren 96 kuyucuklu RT² mRNA PCR Array plateleri kullanılarak rölatif gen ifade değişimleri incelendi. Kullanılan panelde apoptoz, nekroz, DNA tamir ve hasarı, mitokondriyal enerji metabolizması, yağ asidi metabolizması, oksidatif stres ve antioksidan cevap, heat shock cevabı, endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı, sitokrom p450'ler ve faz I ilaç metabolizmaları, steatosis, kolestosis, fosfolipidoz ve immünotoksisite dahil toplamda 13 yolakla ilgili genlerin ifade değişimleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular ifadeleri sadece metformin ve sadece 5-

FU tarafından indüklenen veya baskılanan genlerin olduğunu, aynı zamanda bir kısmı genlerin ifadesinin metformin ile 5-FU'nun birlikte muamelesi sonrasında azaldığını, çok sayıda genin ifadelerinin ise metformin ile 5-FU'nun birlikte muamelesi sonrasında indüklendiği ortaya koymuştur (Tablo 4.1). Metformin ve 5-FU tek başına FASLG, RAD51, ERCC2, ATM ve BRCA1 gibi apoptozla ilişkili genlerin ifadesini artırmazken, iki ajan birlikte verildiğinde hücrelerde bu genlerin ifadeleri önemli miktarda artış göstermiştir. Ayrıca, CYLD ve MKI67 gibi hücre çoğalması ile ilgili genlerin ifadelerinde de hücrelerin metformin ve/veya 5-FU ile muamelesi sonrasında azalma görüldüğü bulunmuştur. Elde edilen bulgular metforminin hem tek başına hem de 5-FU ile birlikte sinerjistik olarak moleküler toksikoloji ile ilintili çok sayıda genin ifadesinde değişime neden olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.15 Metforminin tek başına ve 5-FU ile birlikte Hep-2 hücrelerinde sebep olduğu moleküler toksikoloji ile ilgili gen ifade değişimlerinin heat-map görüntüsü

Tablo 4.1 Hep-2 hücrelerinin Metformin ve 5-FU ile muamele edilmesinde sonra ifadesi değişen genlerde görülen kat değişimleri

Gen	Kat Değişimi (Kontrol grubuna göre)		
	Metformin	5-FU	Met+5-FU
ABCB4	0,6071	0,0053	>100
ABCC2	0,2952	0,0026	>100
ABCC3	>100	810,084	>100
ACADM	>100	18,404	362,523
ACADVL	21,259	0,0037	937,015
ACOX1	0	0	>100
ADH1C	6,498	0	383,193
ADM2	0,0001	0,0021	970,059
AKR1C2	0	0,0034	>100
AKT1	0,0552	505,626	>100
ARRDC3	0,0004	0,4204	557,152
ASAH1	2	0,0013	>100
ASB1	>100	>100	>100
ASNS	47,899	0,0131	>100
ATM	0	0,0008	>100
ATP8B1	0	0,0002	>100
BCL2	0	0,0027	>100
BCL2L1	0	0,0002	468,507
BRCA1	345,353	>100	>100
CASP8	1	0,0171	13,947
CASP9	0,1368	0	0,0308
CD36	0,2285	0,0196	>100
CDKN1A	0,3299	0,0029	0,0679
CPT1A	0,1267	0	>100
CPT1B	0,551	0,0041	>100
CPT2	>100	108,528	>100
CYB561D1	0,6071	>100	>100
CYLD	0,4263	0	0,0023
CYP1A2	2,395	0	>100
CYP2B6	0,0016	0	0
CYP2C19	0,0027	0	0,0158
CYP2C9	0,0029	0	17,901
CYP2D6	0,1321	0,005	1,004,268
DNAJB1	0,0012	0	13,566
DNAJB9	>100	>100	>100
ERCC2	>100	1,815	>100
F2	>100	0,0102	>100
FASLG	>100	>100	>100
FASN	0,0608	0,0045	766,386
FHL2	0,0049	0,1276	>100

GCLM	256,342	0,6242	>100
GRB2	750,614	>100	>100
HERPUD1	0,6071	976,806	>100
HMOX1	0,6071	0,2222	>100
HPN	0,6071	37,842	>100
HPX	>100	>100	>100
HSF1	0,6071	>100	>100
HSP90B1	0	0,1303	>100
HSPA1A	15,583	>100	>100
HSPA1B	0	0,0162	>100
HSPA4	0	0,5	>100
HSPA8	0,6071	>100	>100
HSPB1	0,0041	235,883	>100
HSPD1	0,0021	0,0004	>100
INHBE	0	0,0017	0,8236
LPL	0	0,0044	924,115
LSS	0,0508	0	0,1416
LYZ	0,0001	0,0012	>100
MAG	0,0002	0,0278	18,025
MDM2	0,017	0,0625	0,9862
METAP2	0,0001	0,1934	15,692
MKI67	0,0001	0,25	0,356
NCOA7	0	0,0349	139,288
NQO1	0,0001	0	>100
NR5A2	0,5285	0,0004	206,776
SLC51A	0	0,0235	>100
PARP2	0,0016	0	377,918
PDYN	0,0071	0,001	0,1199
PPARA	0	0,0188	>100
PVR	114,716	27,321	>100
RAD51	145,203	0,0872	>100
RDX	0,0006	55,404	>100
SCD	0,0144	0	>100
SERPINA3	>100	>100	>100
SLC25A25	>100	391,245	>100
SLC2A3	0,0066	24,453	>100
SLC7A11	0,9461	280,514	>100
SREBF1	121,257	0,5434	>100
TAGLN	0,9138	0,0056	>100
TRIB3	631,189	0,0004	>100
TRIM10	0,3299	0,0087	>100
TXNL4B	>100	8,515	>100
UHRF1	0,6071	>100	>100
WIPI1	0	0,2832	>100

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Baş ve boyun bölgesinde yaygın görülen tümörlerden biri olan LKa, son 20 yıl içerisinde neredeyse değişmeden ~%50 oranında kalan beş yıllık sağkalım oranı ile dünya genelinde hızlı bir artış gösteren insidans ve ölüm oranına sahiptir (Siegel ve ark., 2013; Karatas ve ark., 2016; von Mässenhausen ve ark., 2016; Zhang ve Hu, 2017). Sıklıkla görülen metastaz ve nüksetme kötü klinik sonuçların temel sebebi olarak görülür (Zhang, 2017). Terapötik alternatifleri göz önüne alındığında, erken aşama LKa olgularında mevcut temel tedavi stratejileri iyileştirme amaçlı cerrahi ve radyoterapidir (Haigentz ve ark., 2010). Diğer taraftan uzak metastatik lezyonları olan veya primer radyoterapiden sonra lokal nüks gösteren LKa hastaları çoğunlukla tedavi edilemez olarak düşünülür ve bu hastalarda kemoterapi sadece hafifletici bir tedavi seçeneği olarak kullanılır (Haigentz ve ark., 2010). Bununla birlikte kemoterapi LKa için standart terapötik yöntemlerden biri olarak uygulanmaya başlanmış ve günümüzde özellikle lokal olarak gelişmiş tümörü olan ve ameliyat edilemeyen hastalarda kanser hücrelerinin sistemik öldürülmesi ve radyoterapiye hassaslaştırılması için kullanılmaktadır (Adelstein ve ark., 2003; Haigentz ve ark., 2010). Ayrıca, cerrahi rezeksiyon yerine kemoterapi gibi tedavi yöntemlerin kullanılması solunum, konuşma ve yutma fonksiyonları için ihtiyaç duyulan larenksin korunmasına yardım eder (Sanabria ve ark., 2017). Yine de, bazı vakalarda kemoterapiden sonra tamamen iyileşme görülmesine rağmen mevcut kemoterapi ilaçları kendi başlarına veya diğer tedavi yöntemleri ile kombine halde tam olarak başarılı klinik sonuçlar sağlayamaz (Haigentz ve ark., 2010). Dahası, kemoterapötik ilaçlarla ilgili çözüme kavuşturulması gereken hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen toksisite problemi vardır.

C-5 pozisyonunda hidrojen atomu yerine florin atomu taşıyan bir urasil analogu olan 5-FU, LKa tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir (Peng ve ark., 2017). 5-FU'nun hücrede metabolize edilmesi sonucunda ortaya çıkan aktif metabolitleri, DNA ve RNA üzerinden etkili olan sitotoksik etkilere neden olur (Longley ve ark., 2003; Yao ve ark., 2017; Mynhardt ve ark., 2018). Fakat, LKa tedavisinde sıklıkla kullanılmasına rağmen, LKa hastalarının sağ kalımlarının artırılması hususunda etkili olmamıştır. Bu nedenle, mevcut tedavi yöntemlerinin başarısını artırmak için yeni ajanların ve stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Farklı kemoterapötik ilaçların kombinasyonu son zamanlarda birçok kanser tedavisinde oldukça başarılı sonuçlar vermiştir (Marin ve ark., 2012). İlginç bir şekilde, yeni bulgular, kemoterapi alan hastalarda normal hücrelerde oluşan toksisitenin azaltılması için kanser hücrelerinde bozulan metabolik yolların hedeflenmesinin önemine işaret etmiştir (Ward and Thompson, 2012; Peng ve ark., 2017). Bir metabolizma modülatörü olan metformin, kanser hücrelerinin anormal metabolizmasını hedefleyerek kombine terapide önemli bir destekleyici ajan olarak görev yapabilir. Metformin glikoz homeostasını düzenleyen, iyi tolere edilen anti-diyabetik bir ajandır ve düşük toksisitesi ve minimal yan etkileri dolayısıyla sıklıkla hastalarda tedavi amaçlı kullanılır (Dowling ve ark., 2011; Gou ve ark., 2013; Quattrini ve ark., 2014).

Anti-diyabetik potansiyelinin yanı sıra, çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, diyabetik hastalarda kanser riskini azaltan metforminin anti-kanser potansiyeline işaret etmektedir (Evans ve ark., 2005; Landman ve ark., 2010; Singh ve ark., 2013). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, metforminin çok sayıda kanser çeşidinin insidansını %50'ye varan oranlarda düşürdüğünü (Decensi ve ark., 2010; Ge ve ark., 2015) ve tümörün tekrarlamasına karşı koruyucu etkilerinin olduğunu göstermiştir (Rieken ve ark., 2013; Rieken ve ark., 2014). Bu bulgular doğrultusunda Becker ve arkadaşları metforminin uzun süre kullanımının LKa riskini azalttığını bildirmiştir (Becker ve ark., 2014). Ayrıca, Sandulache ve arkadaşları, metformin kullanan diyabet hastalarında erken evre tümörler oluştuğunu ve metformin kullanmayan ve diyabetik olmayan hastalara kıyasla metformin kullanan LKa hastalarının sağ kalımlarının daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Sandulache ve ark., 2014).

Çeşitli pre-klinik çalışmalar metforminin kanser hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* proliferasyonunu baskıladığını (Kotsopoulos ve ark., 2017) ve hücrel yaşlanmayı indüklediğini göstermiştir (Menendez ve ark., 2011). Çalışmamızda metforminin Hep-2 hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücrelerin proliferatif ve klonojenik potansiyelini önemli ölçüde azalttığı ortaya koyularak metforminin LKa için anti-kanser potansiyeline sahip önemli bir ajan olduğunu tespit edildi.

Buna ek olarak, çeşitli çalışmalar, metforminin kemoterapi aracılığıyla tetiklenen *in vitro* ve *in vivo* sitotoksiteyi arttırdığını göstermiştir (Gotlieb ve ark., 2008; Jalving ve ark., 2010; Rattan ve ark., 2011). Çalışmamızda, metformin aynı zamanda Hep-2 hücrelerini 5-FU muamelesine duyarlı hale getirmiştir, bu durum 5-FU'nun sitotoksik

potansiyelini artırarak ve hücrelerin sinerjistik bir şekilde öldürülmesine sebep olmuştur.

Ayrıca, metformin Hep-2 hücrelerinin göç potansiyelini önemli derecede azaltmış ve 5-FU'nun Hep-2 hücrelerinin göç potansiyeli üzerindeki inhibe edici fonksiyonunu artırmıştır. Bununla birlikte, metformin beklenmedik bir şekilde, Hep-2 hücrelerinin invaziv özelliğini artırmış ve 5-FU'nun Hep-2 hücrelerinin invazyon kapasiteleri üzerindeki inhibisyon rolünü azaltmıştır. Literatürde, metforminin metastatik kanser hücre hatlarındaki hücre göçünü baskıladığı bildirilmiştir (Yu ve ark., 2017). Dahası, metforminin over kanser hücrelerinde trombosit kaynaklı hücre göçünü belirgin olarak inhibe ettiği bulunmuş, ancak trombosit kaynaklı hücre invazyonunu etkilemediği bildirilmiştir (Erices ve ark., 2017). İlginç olarak, metforminin, tümör hücresi göçünde önemli olan fokal adezyon kinaz'ın (FAK) fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Yu ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, melanom hücrelerinde FAK'ın ifadesinin susturulmasının hücre invazyonu artırdığı fakat hücre göçünü azalttığı bulunmuş, çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir (Kolli-Bouhafs ve ark., 2014).

Dahası, metforminin Hep-2 hücreleri üzerindeki anti-kanser rolünü gen ifade seviyesinde analiz etmek için yaptığımız gen ifade analizi, moleküler toksikoloji ile ilişkili birçok genin, 5-FU ve metforminin birlikte kullanılması ile indüklendiğini gösterirken, 5-FU veya metforminin tek başına kullanıldığı durumlarda bu genlerin ifadesinde değişiklik gözlenmemiştir. Örneğin, apoptozla ilişkili ATM, ERCC2, BRCA1, FASLG ve RAD51 ile nekroz ile alakalı PARP2 geninin ifadeleri sadece iki ajan birlikte verildiği durumda önemli ölçüde artış göstermiştir. Ayrıca, ilginç bir şekilde, metformin ayrıca hücrelerin invaziv potansiyelini indükleyen (Lu ve ark., 2015) F2 geninin ifadesini anlamlı bir şekilde artırmıştır. 5-FU'nun tek başına F2 ifadesini indüklememesine rağmen 5-FU ve metforminin birlikte verildiği hücrelerde F2 ifadesinin artması metforminin hücrelerin invaziv potansiyelini artırması ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular, ayrıca yakın bir geçmişte elde edilen metforminin kanserli diyabetik hastalarda kemoterapi başarısını arttırabildiği (Jiralerspong ve ark., 2009) ve neo-adjuvan ajan olarak kullanımının cerrahi rezeksiyon sonrasında klinik sonuçları iyileştirebildiği yönündeki (Niraula ve ark., 2012; Schuler ve ark., 2015) bulgular göz önüne alındığında, metforminin LKa'ya karşı terapötik bir ajan olarak (veya kombine tedavide destekleyici olarak) kullanılabileceği ileri sürülebilir.

Ancak, metforminin kanser hücresinin invaziv potansiyelini artırabileceği yönündeki bulgularımız göz ardı edilmemelidir.



KAYNAKLAR

- Adelstein, D.J., Li, Y., Adams, G.L., Wagner, H., Kish, J.A., Ensley, J.F., Schuller, D.E. and Forastiere, A.A., 2003. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol* 21, 92-8.
- Adjei, A.A., 1999. A review of the pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer. *Br J Clin Pharmacol* 48, 265-77.
- Algire, C., Moiseeva, O., Deschênes-Simard, X., Amrein, L., Petrucci, L., Birman, E., Viollet, B., Ferbeyre, G. and Pollak, M.N., 2012. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev Res (Phila)* 5, 536-43.
- Alvero, A.B., Chen, R., Fu, H.H., Montagna, M., Schwartz, P.E., Rutherford, T., Silasi, D.A., Steffensen, K.D., Waldstrom, M., Visintin, I. and Mor, G., 2009. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle* 8, 158-66.
- Arai, M., Uchiba, M., Komura, H., Mizuochi, Y., Harada, N. and Okajima, K., 2010. Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 206-13.
- Atıcı, E., 2007. Tıp tarihinde kanser ve lösemi.
- Bailey, C.J., 2017. Metformin: historical overview. *Diabetologia* 60, 1566-1576.
- Bailey, C.J. and Turner, R.C., 1996. Metformin. *N Engl J Med* 334, 574-9.
- Bannister, C.A., Holden, S.E., Jenkins-Jones, S., Morgan, C.L., Halcox, J.P., Schernthaner, G., Mukherjee, J. and Currie, C.J., 2014. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes Obes Metab* 16, 1165-73.
- Bargiota, A. and Diamanti-Kandarakis, E., 2012. The effects of old, new and emerging medicines on metabolic aberrations in PCOS. *Ther Adv Endocrinol Metab* 3, 27-47.
- Barzilai, N., Crandall, J.P., Kritchevsky, S.B. and Espeland, M.A., 2016. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab* 23, 1060-1065.
- Becker, C., Jick, S.S., Meier, C.R. and Bodmer, M., 2014. Metformin and the risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Diabetes Obes Metab* 16, 1148-54.
- Bergeron, R., Previs, S.F., Cline, G.W., Perret, P., Russell, R.R., Young, L.H. and Shulman, G.I., 2001. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 50, 1076-82.
- Birsen, T., 2007. Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutatyon S-Transferazlar, in: Peri, A.S. (Ed.).
- Bodmer, M., Becker, C., Meier, C., Jick, S.S. and Meier, C.R., 2011. Use of metformin and the risk of ovarian cancer: a case-control analysis. *Gynecol Oncol* 123, 200-4.
- Bridges, H.R., Jones, A.J., Pollak, M.N. and Hirst, J., 2014. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J* 462, 475-87.
- Carmina, E. and Lobo, R.A., 2004. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 82, 661-5.
- Chappell, J.B., 1963. The effect of alkylguanidines on mitochondrial metabolism. *J Biol Chem* 238, 410-7.
- Chen, G., Xu, S., Renko, K. and Derwahl, M., 2012. Metformin inhibits growth of thyroid carcinoma cells, suppresses self-renewal of derived cancer stem cells, and potentiates the effect of chemotherapeutic agents. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E510-20.
- Chong, C.R. and Chabner, B.A., 2009. Mysterious metformin. *Oncologist* 14, 1178-81.

- Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E. and Witters, L.A., 1998. Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 35347-54.
- Cuthbertson, J., Patterson, S., O'Harte, F.P. and Bell, P.M., 2009. Investigation of the effect of oral metformin on dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) activity in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 26, 649-54.
- Decensi, A., Puntoni, M., Goodwin, P., Cazzaniga, M., Gennari, A., Bonanni, B. and Gandini, S., 2010. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 1451-61.
- Diamanti-Kandarakis, E., Christakou, C.D., Kandaraki, E. and Economou, F.N., 2010. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 162, 193-212.
- Diasio, R.B. and Harris, B.E., 1989. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 16, 215-37.
- Ding, X.Z., Fehsenfeld, D.M., Murphy, L.O., Permert, J. and Adrian, T.E., 2000. Physiological concentrations of insulin augment pancreatic cancer cell proliferation and glucose utilization by activating MAP kinase, PI3 kinase and enhancing GLUT-1 expression. *Pancreas* 21, 310-20.
- Dowling, R.J., Goodwin, P.J. and Stambolic, V., 2011. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Med* 9, 33.
- Dowling, R.J., Niraula, S., Stambolic, V. and Goodwin, P.J., 2012. Metformin in cancer: translational challenges. *J Mol Endocrinol* 48, R31-43.
- Dowling, R.J., Zakikhani, M., Fantus, I.G., Pollak, M. and Sonenberg, N., 2007. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res* 67, 10804-12.
- Draznin, B., 2011. Mechanism of the mitogenic influence of hyperinsulinemia. *Diabetol Metab Syndr* 3, 10.
- Dunaif, A., 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18, 774-800.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M. and Leverve, X., 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 275, 223-8.
- 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., Godoy, A.S., Pereira, J., Bustos, G., Cardenas, J.C., Cuello, M.A. and Owen, G.I., 2017. Diabetic concentrations of metformin inhibit platelet-mediated ovarian cancer cell progression. *Oncotarget* 8, 20865-20880.
- Ersoy, C., Kiyici, S., Budak, F., Oral, B., Guclu, M., Duran, C., Selimoglu, H., Erturk, E., Tuncel, E. and Imamoglu, S., 2008. The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 81, 56-60.
- Evans, J.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R. and Morris, A.D., 2005. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304-5.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F. and Viollet, B., 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 120, 2355-69.
- Fullerton, M.D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.P., O'Neill, H.M., Ford, R.J., Palanivel, R., O'Brien, M., Hardie, D.G., Macaulay, S.L., Schertzer, J.D., Dyck, J.R., van Denderen, B.J., Kemp, B.E. and Steinberg, G.R., 2013. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-

- sensitizing effects of metformin. *Nat Med* 19, 1649-54.
- Galbiatti, A.L., Caldas, H.C., Maniglia, J.V., Pavarino, E.C. and Goloni-Bertollo, E.M., 2014. Gene expression profile of 5-fluorouracil metabolic enzymes in laryngeal cancer cell line: predictive parameters for response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Biomed Pharmacother* 68, 515-9.
- Ge, R., Wang, Z., Wu, S., Zhuo, Y., Otsetov, A.G., Cai, C., Zhong, W., Wu, C.L. and Olumi, A.F., 2015. Metformin represses cancer cells via alternate pathways in N-cadherin expressing vs. N-cadherin deficient cells. *Oncotarget* 6, 28973-87.
- Ghoshal, K. and Jacob, S.T., 1994. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 54, 632-6.
- Glueck, C.J., Wang, P., Fontaine, R., Tracy, T. and Sieve-Smith, L., 2001. Metformin to restore normal menses in oligo-amenorrhagic teenage girls with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Adolesc Health* 29, 160-9.
- Gotlieb, W.H., Saumet, J., Beauchamp, M.C., Gu, J., Lau, S., Pollak, M.N. and Bruchim, I., 2008. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110, 246-50.
- Gou, S., Cui, P., Li, X., Shi, P., Liu, T. and Wang, C., 2013. Low concentrations of metformin selectively inhibit CD133⁺ cell proliferation in pancreatic cancer and have anticancer action. *PLoS One* 8, e63969.
- Griss, T., Vincent, E.E., Egnatchik, R., Chen, J., Ma, E.H., Faubert, B., Viollet, B., DeBerardinis, R.J. and Jones, R.G., 2015. Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis. *PLoS Biol* 13, e1002309.
- Grzybowska, M., Bober, J. and Olszewska, M., 2011. [Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 65, 277-85.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E. and Shaw, R.J., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-26.
- Hagentz, M., Silver, C.E., Hartl, D.M., Takes, R.P., Rodrigo, J.P., Robbins, K.T., Rinaldo, A. and Ferlito, A., 2010. Chemotherapy regimens and treatment protocols for laryngeal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 11, 1305-16.
- Han, K., Pintilie, M., Lipscombe, L.L., Lega, I.C., Milosevic, M.F. and Fyles, A.W., 2016. Association between Metformin Use and Mortality after Cervical Cancer in Older Women with Diabetes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25, 507-12.
- Hardie, D.G. and Carling, D., 1997. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246, 259-73.
- Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M., 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67, 821-55.
- Hayashi, T., Hirshman, M.F., Fujii, N., Habinowski, S.A., Witters, L.A. and Goodyear, L.J., 2000. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 49, 527-31.
- Hesen, N.A., Riksen, N.P., Aalders, B., Ritskes-Hoitinga, M., El Messaoudi, S. and Wever, K.E., 2017. A systematic review and meta-analysis of the protective effects of metformin in experimental myocardial infarction. *PLoS One* 12, e0183664.
- Hosono, K., Endo, H., Takahashi, H., Sugiyama, M., Uchiyama, T., Suzuki, K., Nozaki, Y., Yoneda, K., Fujita, K., Yoneda, M., Inamori, M., Tomatsu, A., Chihara, T., Shimpo, K., Nakagama, H. and Nakajima, A., 2010. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Mol Carcinog* 49, 662-71.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M,

- Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ and KA, C., 2016. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014.
- Hwang, I.C., Park, S.M., Shin, D., Ahn, H.Y., Rieken, M. and Shariat, S.F., 2015. Metformin association with lower prostate cancer recurrence in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 16, 595-600.
- Inoki, K., Corradetti, M.N. and Guan, K.L., 2005. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37, 19-24.
- Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K.L., 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-90.
- Isoda, K., Young, J.L., Zirlik, A., MacFarlane, L.A., Tsuboi, N., Gerdes, N., Schönbeck, U. and Libby, P., 2006. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 611-7.
- Jalving, M., Gietema, J.A., Lefrandt, J.D., de Jong, S., Reyners, A.K., Gans, R.O. and de Vries, E.G., 2010. Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer* 46, 2369-80.
- Jiralerspong, S., Palla, S.L., Giordano, S.H., Meric-Bernstam, F., Liedtke, C., Barnett, C.M., Hsu, L., Hung, M.C., Hortobagyi, G.N. and Gonzalez-Angulo, A.M., 2009. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 27, 3297-302.
- Kalender, A., Selvaraj, A., Kim, S.Y., Gulati, P., Brûlé, S., Viollet, B., Kemp, B.E., Bardeesy, N., Dennis, P., Schlager, J.J., Marette, A., Kozma, S.C. and Thomas, G., 2010. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11, 390-401.
- Karatas, O.F., 2015. MicroRNA Profiling in Cancer Stem Cells of Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Investigation of miR-145 Function in Larynx Cancer and Larynx Cancer Stem Cells, Institute of Health Science, Department of Genetics. Istanbul University, Istanbul.
- Karatas, O.F., Suer, I., Yuceturk, B., Yilmaz, M., Oz, B., Guven, G., Cansiz, H., Creighton, C.J., Ittmann, M. and Ozen, M., 2016. Identification of microRNA profile specific to cancer stem-like cells directly isolated from human larynx cancer specimens. *BMC Cancer* 16, 853.
- Karatas, Ö.F., 2014. İnsan Skuamöz Hücreli Larenks Karsinomunda Kanser Kök Hücrelerine Özgü miRNA'ların Profillenmesi ve miR-145'in Larenks Kanseri ve Kanser Kök Hücrelerindeki Fonksiyonunun Araştırılması.
- Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Michell, B.J., Chen, Z.P. and Witters, L.A., 1999. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 24, 22-5.
- Kolli-Bouhafs, K., Sick, E., Noulet, F., Gies, J.P., De Mey, J. and Rondé, P., 2014. FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. *Cell Death Dis* 5, e1379.
- Kotsopoulos, J., Singer, C. and Narod, S.A., 2017. Can we prevent BRCA1-associated breast cancer by RANKL inhibition? *Breast Cancer Res Treat* 161, 11-16.
- Koutsogiannouli, E., Papavassiliou, A.G. and Papanikolaou, N.A., 2013. Complexity in cancer biology: is systems biology the answer? *Cancer Med* 2, 164-77.
- Landman, G.W., Kleefstra, N., van Hateren, K.J., Groenier, K.H., Gans, R.O. and Bilo, H.J., 2010. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care* 33, 322-6.
- Legro, R.S., Kunselman, A.R., Dodson, W.C. and Dunaif, A., 1999. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 165-9.
- Lerner, M.Z., Mor, N., Paek, H., Blitzer, A. and Strome, M., 2017. Metformin Prevents the Progression of Dysplastic Mucosa of the Head and Neck to Carcinoma in Nondiabetic

- Patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 126, 340-343.
- Li, W., Yuan, Y., Huang, L., Qiao, M. and Zhang, Y., 2012. Metformin alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Diabetes Res Clin Pract* 96, 187-95.
- Liang, D.P., Huang, T.Q., Li, S.J. and Chen, Z.J., 2014. Knockdown of S100A4 chemosensitizes human laryngeal carcinoma cells in vitro through inhibition of Slug. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18, 3484-90.
- Lin, J., Gill, A., Zahm, S.H., Carter, C.A., Shriver, C.D., Nations, J.A., Anderson, W.F., McGlynn, K.A. and Zhu, K., 2017. Metformin use and survival after non-small cell lung cancer: A cohort study in the US Military health system. *Int J Cancer* 141, 254-263.
- Liu, B., Fan, Z., Edgerton, S.M., Yang, X., Lind, S.E. and Thor, A.D., 2011. Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle* 10, 2959-66.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-8.
- Lochhead, P.A., Salt, I.P., Walker, K.S., Hardie, D.G. and Sutherland, C., 2000. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49, 896-903.
- Long, Y.C. and Zierath, J.R., 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116, 1776-83.
- Longley, D.B., Harkin, D.P. and Johnston, P.G., 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330-8.
- Lu, Q., Lv, M., Xu, E., Shao, F., Feng, Y., Yang, J. and Shi, L., 2015. Recombinant hirudin suppresses the viability, adhesion, migration and invasion of Hep-2 human laryngeal cancer cells. *Oncol Rep* 33, 1358-64.
- Lund, S.S., Tarnow, L., Stehouwer, C.D., Schalkwijk, C.G., Teerlink, T., Gram, J., Winther, K., Frandsen, M., Smidt, U.M., Pedersen, O., Parving, H.H. and Vaag, A.A., 2008. Impact of metformin versus repaglinide on non-glycaemic cardiovascular risk markers related to inflammation and endothelial dysfunction in non-obese patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 158, 631-41.
- Luo, Q., Hu, D., Hu, S., Yan, M., Sun, Z. and Chen, F., 2012. In vitro and in vivo anti-tumor effect of metformin as a novel therapeutic agent in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 12, 517.
- Machover, S., 1989. Relationship of muscle strength of back and upper extremity with level of physical activity in healthy women. *Am J Phys Med Rehabil* 68, 300-1.
- Maida, A., Lamont, B.J., Cao, X. and Drucker, D.J., 2011. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia* 54, 339-49.
- Marin, J.J., Sanchez de Medina, F., Castaño, B., Bujanda, L., Romero, M.R., Martinez-Augustin, O., Moral-Avila, R.D. and Briz, O., 2012. Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug Metab Rev* 44, 148-72.
- Matthaei, S. and Greten, H., 1991. Evidence that metformin ameliorates cellular insulin-resistance by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters to the plasma membrane. *Diabete Metab* 17, 150-8.
- Melo, G.M., Souza, P.D., Bastos, L.C., Neves, M.C., Espirito Santo, K.S.D., Cervantes, O. and Abrahão, M., 2017. Laryngeal chondroradionecrosis following radiotherapy. *Rev Col Bras Cir* 44, 374-382.
- Menendez, J.A., Cufi, S., Oliveras-Ferraros, C., Martin-Castillo, B., Joven, J., Vellon, L. and Vazquez-Martin, A., 2011. Metformin and the ATM DNA damage response (DDR): accelerating the onset of stress-induced senescence to boost protection against cancer.

- Aging (Albany NY) 3, 1063-77.
- Moggetti, P., Castello, R., Negri, C., Tosi, F., Perrone, F., Caputo, M., Zanolin, E. and Muggeo, M., 2000. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 139-46.
- Musi, N., Hirshman, M.F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., Zhou, G., Williamson, J.M., Ljunqvist, O., Efendic, S., Moller, D.E., Thorell, A. and Goodyear, L.J., 2002. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2074-81.
- Mynhardt, C., Damelin, L.H., Jivan, R., Peres, J., Prince, S., Veale, R.B. and Mavri-Damelin, D., 2018. Metformin-induced alterations in nucleotide metabolism cause 5-fluorouracil resistance but gemcitabine susceptibility in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem* 119, 1193-1203.
- Nair, V., Sreevalsan, S., Basha, R., Abdelrahim, M., Abudayyeh, A., Rodrigues Hoffman, A. and Safe, S., 2014. Mechanism of metformin-dependent inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) and Ras activity in pancreatic cancer: role of specificity protein (Sp) transcription factors. *J Biol Chem* 289, 27692-701.
- Niraula, S., Dowling, R.J., Ennis, M., Chang, M.C., Done, S.J., Hood, N., Escallon, J., Leong, W.L., McCready, D.R., Reedijk, M., Stambolic, V. and Goodwin, P.J., 2012. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res Treat* 135, 821-30.
- Oeseburg, H., de Boer, R.A., Buikema, H., van der Harst, P., van Gilst, W.H. and Silljé, H.H., 2010. Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1407-14.
- Ovalle, F. and Azziz, R., 2002. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril* 77, 1095-105.
- Owen, M.R., Doran, E. and Halestrap, A.P., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 348 Pt 3, 607-14.
- Peng, M., Darko, K.O., Tao, T., Huang, Y., Su, Q., He, C., Yin, T., Liu, Z. and Yang, X., 2017. Combination of metformin with chemotherapeutic drugs via different molecular mechanisms. *Cancer Treat Rev* 54, 24-33.
- Pérez-Revuelta, B.I., Hettich, M.M., Ciociaro, A., Rotermund, C., Kahle, P.J., Krauss, S. and Di Monte, D.A., 2014. Metformin lowers Ser-129 phosphorylated α -synuclein levels via mTOR-dependent protein phosphatase 2A activation. *Cell Death Dis* 5, e1209.
- Quattrini, I., Conti, A., Pazzaglia, L., Novello, C., Ferrari, S., Picci, P. and Benassi, M.S., 2014. Metformin inhibits growth and sensitizes osteosarcoma cell lines to cisplatin through cell cycle modulation. *Oncol Rep* 31, 370-5.
- Rattan, R., Graham, R.P., Maguire, J.L., Giri, S. and Shridhar, V., 2011. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* 13, 483-91.
- Rieken, M., Xylinas, E., Kluth, L., Crivelli, J.J., Chrystal, J., Faison, T., Lotan, Y., Karakiewicz, P.I., Fajkovic, H., Babjuk, M., Kautzky-Willer, A., Bachmann, A., Scherr, D.S. and Shariat, S.F., 2013. Association of diabetes mellitus and metformin use with oncological outcomes of patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int* 112, 1105-12.
- Rieken, M., Xylinas, E., Kluth, L., Crivelli, J.J., Chrystal, J., Faison, T., Lotan, Y., Karakiewicz, P.I., Sun, M., Fajkovic, H., Babjuk, M., Bachmann, A., Scherr, D.S. and Shariat, S.F., 2014. Effect of diabetes mellitus and metformin use on oncologic outcomes of patients treated with radical cystectomy for urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 32, 49.e7-14.

- Ristic, S., Collober-Maugeais, C., Pecher, E. and Cressier, F., 2006. Comparison of nateglinide and gliclazide in combination with metformin, for treatment of patients with Type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on maximum doses of metformin alone. *Diabet Med* 23, 757-62.
- Rosenberg, P.J., 1971. Total laryngectomy and cancer of the larynx. A historical review. *Arch Otolaryngol* 94, 313-6.
- Saif, M.W., Choma, A., Salamone, S.J. and Chu, E., 2009. Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J Natl Cancer Inst* 101, 1543-52.
- Saisho, Y., 2015. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15, 196-205.
- Sanabria, A., Chaves, A.L.F., Kowalski, L.P., Wolf, G.T., Saba, N.F., Forastiere, A.A., Beitler, J.J., Nibu, K.I., Bradford, C.R., Suárez, C., Rodrigo, J.P., Strojan, P., Rinaldo, A., de Bree, R., Haigentz, M., Takes, R.P. and Ferlito, A., 2017. Organ preservation with chemoradiation in advanced laryngeal cancer: The problem of generalizing results from randomized controlled trials. *Auris Nasus Larynx* 44, 18-25.
- Sandulache, V.C., Hamblin, J.S., Skinner, H.D., Kubik, M.W., Myers, J.N. and Zevallos, J.P., 2014. Association between metformin use and improved survival in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 36, 1039-43.
- Sawyers, C.L., Abate-Shen, C., Anderson, K.C., Barker, A., Baselga, J., Berger, N.A., Foti, M., Jemal, A., Lawrence, T.S., Li, C.I., Mardis, E.R., Neumann, P.J., Pardoll, D.M., Prendergast, G.C., Reed, J.C., Weiner, G.J. and Committee, A.C.P.R.W., 2013. AACR Cancer Progress Report 2013. *Clin Cancer Res* 19, S4-98.
- Sağlık, B. <http://www.thsk.saglik.gov.tr/2013-10-01-11-00-51/halk-sagligina-yonelik-bilgiler/312-kanser-genel-tanimi.html>.
- Schommers, P., Thurau, A., Bultmann-Mellin, I., Guschlbauer, M., Klatt, A.R., Rozman, J., Klingenspor, M., de Angelis, M.H., Alber, J., Gründemann, D., Sterner-Kock, A. and Wiesner, R.J., 2017. Metformin causes a futile intestinal-hepatic cycle which increases energy expenditure and slows down development of a type 2 diabetes-like state. *Mol Metab* 6, 737-747.
- Schuler, K.M., Rambally, B.S., DiFurio, M.J., Sampey, B.P., Gehrig, P.A., Makowski, L. and Bae-Jump, V.L., 2015. Antiproliferative and metabolic effects of metformin in a preoperative window clinical trial for endometrial cancer. *Cancer Med* 4, 161-73.
- Shu, Y., Sheardown, S.A., Brown, C., Owen, R.P., Zhang, S., Castro, R.A., Ianculescu, A.G., Yue, L., Lo, J.C., Burchard, E.G., Brett, C.M. and Giacomini, K.M., 2007. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 117, 1422-31.
- Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A., 2013. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63, 11-30.
- Singh, S., Singh, P.P., Singh, A.G., Murad, M.H. and Sanchez, W., 2013. Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 108, 881-91; quiz 892.
- Sinnathuray, T.A., 1979. Reproduction research and health. Part. I: maternal health. *Med J Malaysia* 34, 80-5.
- Skinner, H.D., McCurdy, M.R., Echeverria, A.E., Lin, S.H., Welsh, J.W., O'Reilly, M.S., Hofstetter, W.L., Ajani, J.A., Komaki, R., Cox, J.D., Sandulache, V.C., Myers, J.N. and Guerrero, T.M., 2013. Metformin use and improved response to therapy in esophageal adenocarcinoma. *Acta Oncol* 52, 1002-9.
- Society, A.c., 2015.
- Tuncer, M.A., 2009. Türkiye'de kanser kontrolü.
- Velazquez, E.M., Mendoza, S., Hamer, T., Sosa, F. and Glueck, C.J., 1994. Metformin therapy in

- polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 43, 647-54.
- Viollet, B. and Foretz, M., 2013. Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. *Ann Endocrinol (Paris)* 74, 123-9.
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M. and Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* 122, 253-70.
- Vitale-Cross, L., Molinolo, A.A., Martin, D., Younis, R.H., Maruyama, T., Patel, V., Chen, W., Schneider, A. and Gutkind, J.S., 2012. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)* 5, 562-73.
- von Mässenhausen, A., Sanders, C., Thewes, B., Deng, M., Queisser, A., Vogel, W., Kristiansen, G., Duensing, S., Schröck, A., Bootz, F., Brossart, P., Kirfel, J., Heasley, L., Brägelmann, J. and Perner, S., 2016. MERTK as a novel therapeutic target in head and neck cancer. *Oncotarget* 7, 32678-94.
- Wan, X., Huo, Y., Johns, M., Piper, E., Mason, J.C., Carling, D., Haskard, D.O. and Boyle, J.J., 2013. 5'-AMP-activated protein kinase-activating transcription factor 1 cascade modulates human monocyte-derived macrophages to atheroprotective functions in response to heme or metformin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2470-80.
- Wang, Y.W., He, S.J., Feng, X., Cheng, J., Luo, Y.T., Tian, L. and Huang, Q., 2017. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther* 11, 2421-2429.
- Ward, P.S. and Thompson, C.B., 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297-308.
- Witters, L.A., 2001. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest* 108, 1105-7.
- Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F.C., Leone, P., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L., Eccleston, J.F., Davis, C.T., Martin, S.R., Carling, D. and Gamblin, S.J., 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449, 496-500.
- Xu, J. and Rajaratnam, R., 2017. Cardiovascular safety of non-insulin pharmacotherapy for type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 16, 18.
- Yao, X.D., Li, P. and Wang, J.S., 2017. MicroRNA differential expression spectrum and microRNA-125a-5p inhibition of laryngeal cancer cell proliferation. *Exp Ther Med* 14, 1699-1705.
- Yokota, J., 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497-503.
- Younk, L.M., Lamos, E.M. and Davis, S.N., 2016. Cardiovascular effects of anti-diabetes drugs. *Expert Opin Drug Saf* 15, 1239-57.
- Yu, T., Wang, C., Yang, J., Guo, Y., Wu, Y. and Li, X., 2017. Metformin inhibits SUV39H1-mediated migration of prostate cancer cells. *Oncogenesis* 6, e324.
- Zhang, Y., 2017. Long non-coding RNA CCAT1/miR-218/ZFX axis modulates the progression of laryngeal squamous cell cancer, in: Hu, H. (Ed.).
- Zhang, Y. and Hu, H., 2017. Long non-coding RNA CCAT1/miR-218/ZFX axis modulates the progression of laryngeal squamous cell cancer. *Tumour Biol* 39, 1010428317699417.
- Zhao, L., Wen, Z.H., Jia, C.H., Li, M., Luo, S.Q. and Bai, X.C., 2011. Metformin induces G1 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Anat Rec (Hoboken)* 294, 1337-43.
- Zheng, Z., Chen, H., Li, J., Li, T., Zheng, B., Zheng, Y., Jin, H., He, Y., Gu, Q. and Xu, X., 2012. Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes* 61, 217-28.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2012 yılında girdiği Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2016 yılında başarıyla mezun oldu. Aynı yıl Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimini 2018 yılında tamamladı.

