

GÜVEN YENMİŞ

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA LİS.
EĞT. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



DOKTORA TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2018

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

METFORMİNİN YAŞLANMA VE KANSER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

GÜVEN YENMİŞ

DANIŞMAN
PROF.DR. ALİ NUR TURGUT ULUTİN

II. DANIŞMAN
PROF.DR. GÖNÜL KANIGÜR SULTUYBEK

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

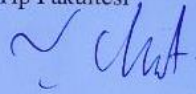
İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

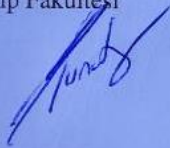
Bu çalışma 20.12.2018 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul
edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

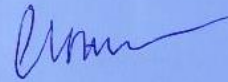
Prof. Dr. Ali Nur Turgut Ulutin
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi



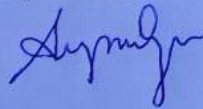
Prof. Dr. Matem Tunçdemir
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi



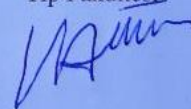
Prof. Dr. M.Cengiz Yakıcıer
Acıbadem Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Ayşe Özer
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Mustafa Akkiprik
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.


GÜVEN YENMİŞ



İTHAF

Bahtışan ve çocuklarım Doruk ve ınar'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Daha tez konusunun ne olacağına karar verildiği o ilk gün başlayan itirazlarımıza, bitmeyen direnmemize rağmen, kararlılığı, dik duruşu, sahip olduğu donanıma olan güveniyle bir anne edasıyla kendisine duyduğum güveni perçinleyen, tezimin mimarı çok sevgili hocam Prof. Dr. Gönül Kanıgür'e, bir yol ayrımındayken bir can simidi misali olası karmaşadan beni çekip alıp danışmanlığımı üstlenen, tezi bitirme konusundaki motivasyonu beni de bu günlere güvenle sürükleyen sevgili hocam Prof. Dr. Turgut Ulutin'e, bana akademik dünya dışında da bir mentor misali yol gösteren, deneyim ve tavsiyelerinden hemen hemen hergün yararlandığım sevgili hocam Prof. Dr. Mustafa Cengiz Yakıcıer'e, her konudaki soğukkanlılığı ve donanımıyla içine düştüğümüz ve dipsiz olduğunu düşündüğümüz kör kuyularda bile bize ışık tutan, herkesin ağabeyi benim sevgili hocam Prof. Dr. Matem Tuçdemir'e,

Bütün laboratuvarını benim için seferber eden, tezimin laboratuvar çalışmalarının başlayabilmesi için gerekli her türlü imkanı sağlayan, kendisine duyulan güveni hiçbir zaman boşa çıkarmayan, sadece yaptıklarıyla değil yapacaklarıyla da gurur duyduğum sevgili hocam Prof. Dr. Ercüment Ovalı'ya, tezim için seferber olan Acıbadem Labcell ekibine, arka plandaki desteğini ve bana sağladığı motivasyonu hayatımın hiçbir anında unutmayacağım değerli ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Cumhuri Gökhan Ekmekçi'ye, tezin başlayabilmesi konusunda kelimeleri yetersiz bırakan desteği dolayısıyla çok sevgili kardeşim Muhammet Yılandı'ya, tez için gerekli hasta örneklerinin tedarikinden sorumlu genel cerrah Yrd. Doç. Dr. Kazım Şenol'a, ortağım, iş ve akademi paydaşım, arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Fatma Sinem Hocaoglu Emre'ye, tecrübeleriyle tez çalışmamın şekillenmesinde tarifi imkansız destekleri dolayısıyla Labcell Ar-Ge sorumlusu Dr. Derya Dilek Kaçağı ve Labcell Ar-Ge Danışmanı Dr. Cihan Taşdan'a,

Tezimi sahiplenerek laboratuvar kısmında ve bir türlü yetemediğim bürokrasi konularında öne çıkarak tezin bu şekilde ortaya çıkmasına olanak sağlayan kardeşim Nail Beşli'ye, ekibimin tez çalışmamdaki motivasyon destekçisi Tuğba Soydaş ve tecrübe ve birikimiyle kendisinden çok şey öğrendiğim ve öğrenmeye devam etmekte olduğum sevgili Elif Yaprak Saraç'a, doktora sürecine beraber girdiğim, sıkıştığım her noktada elini uzatarak beni destekleyen arkadaşım Hülya Arkan'a, laboratuvar

çalışmamda sorun çözen, hızlı destek ekip arkadaşlarım Jülide Coşkun ve Murat Kolay'a, malzeme ve lojistik konularındaki desteği için arkadaşım Türker Toktay'a,

“Herşey onlar için” diye yola çıktığım, hayatımı anlamlandıran oğullarım Doruk ve Çınar'a, teşekkürün en özelini hak eden, ders çalışabilmem için her türlü sıkıntıyı göğüsleyen, benimle ders çalışan, benimle düşünen, benimle gülen, benimle üzülen ama beni her geçen gün daha çok büyüten, hayatımın tam olarak bedene bürünmüş hali olan sevgili eşim Bahtışan'a minnetle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24066.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	7
TABLolar LİSTESİ.....	10
ŞEKİLLER LİSTESİ	11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	13
ÖZET	15
ABSTRACT.....	17
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	19
2. GENEL BİLGİLER	20
2.1. Meme Kanseri Sınıflandırması	20
2.2. Moleküler Sınıflandırma	20
2.2.1. Endokrin Reseptörler	21
2.2.1.1. Östrojen Reseptörü.....	21
2.2.1.2. Progesteron Reseptörü	22
2.2.1.3. HER2.....	24
2.2.1.4. Androjen Reseptörü (AR)	25
2.2.2. Proliferasyon Belirteçleri	26
2.2.2.1. KI67.....	26
2.2.2.2. TOP2A	27
2.2.2.3. Hücre Döngüsü Genleri.....	27
2.2.3. İnvazyon ve Metastaz Aktivasyonu	27
2.2.3.1. Bazal Belirteçler	27
2.2.3.2. Kök Hücre Belirteçleri	29
2.2.3.3. Matriks Metalloproteinaz 2 ve 9	30
2.2.4. Bağışıklık Sisteminin İşgal Edilmesi	33
2.2.4.1. İmmün yanıt genleri ER-PR-HER2-tümörlerini kurtarır	33
2.2.5. Hücre Ölümüne Direnç Gösterme.....	33

2.2.5.1. BCL2 tümör prognoz sonucu ve tahmini üzerinde çift rol üstlenir	33
2.2.6. Genom Mutasyonları ve Düzensizliği.....	34
2.2.6.1. TP53 disfonksiyonu tümörün ilaç direncini artırır.....	34
2.3. Meme Kanseri Histolojik Alt Tipleri.....	34
2.3.1. Histolojik Alt tipler	35
2.3.2. Moleküler Alt tipler	37
2.4. Kanser ve Yaşlanma	39
2.4.1. Yaşlanma sinyalleri NF-KB aktivatörleridir.....	42
2.4.1.1. Oksidatif Stres	42
2.4.1.2. Genotoksik Stres	43
2.4.1.3. Kalıtsal bağışıklık: PAM'lar ve DAMP'lar	43
2.4.1.4. TNF Super ailesi	44
2.4.1.5. Insulin/IGF Sinyalleşme.....	44
2.4.1.6. Protein modifikasyonları: Asetilasyon ve O-glikozilasyon	45
2.4.2. Uzun Ömür Faktörleri NF-kB Sinyalleşmesini İnhibe Eder.....	45
2.4.2.1. p53.....	45
2.4.2.2. Isı şok proteinleri (HSP).....	45
2.4.2.3. Mikro RNA'lar.....	46
2.4.3. Kalori kısıtlaması, uzun ömür faktörleri ve NF-kB Sinyalleşmesi.....	48
2.4.4. Bir sağ kalım faktörü: NF-KB Sinyalleşmesi	48
2.5. Metformin ve Kanser	49
2.5.1. Neden Metformin ve Kanser?.....	49
2.5.2. Metforminin Anti-diyabetik Ajan olarak Etki Mekanizması.....	50
2.5.3. Metforminin Kanser Hücre Biyoenerjisindeki Etki Mekanizması.....	51
2.5.4. Metformin: Bir anti-metabolit ilaç.....	52
2.5.5. Metforminin Taşınması.....	53
2.5.6. Metforminin diğer mekanizmaları	54
2.5.7. Metforminin In vitro ve In vivo Etkisi: Konsantrasyon Problemi	54
2.6. Proteomik Analizi	56
2.6.1. Meme Kanseri ve Proteomiks	56
2.6.1.1. Çalışmada anlamlı olarak saptanan proteinler	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Kitler	61

3.2. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler	62
3.3. Primer Hücre Kültürü	64
3.3.1. Taşıma solüsyonunun hazırlanması	64
3.3.2. Dokunun işlenmesi.....	64
3.3.3. Pasajlama	65
3.4. Hücre Canlılığı.....	65
3.4.1. Deneyin kurulması	66
3.5. Proliferasyon Miktarının Hesaplanması (BrdU).....	67
3.6. MMP-2, MMP-9 ve NF-kB ifadelerinin immünoSitokimyasal olarak saptanması68	
3.7. NF-kB aktivitesinin ELISA yöntemiyle saptanması.....	69
3.8. MMP-2, MMP-9 ve NF-kB genlerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesiyle ekspresyonlarının saptanması.....	70
3.8.1. Ters Transkriptaz Tepkimesi	72
3.8.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi.....	72
3.9. Apoptoz.....	73
3.10. Protein Karakterizasyonu.....	73
4. BULGULAR.....	75
4.1. Canlılık.....	75
4.2. Proliferasyon	76
4.3. MMP-2 ekspresyonunun immünoSitokimyasal ve gerçek zamanlı polimeraz tepkimesi yöntemleriyle gösterilmesi	78
4.4. MMP-9 ekspresyonunun immünoSitokimyasal ve gerçek zamanlı polimeraz tepkimesi yöntemleriyle gösterilmesi	80
4.5. NF-kB ekspresyonunun immünoSitokimyasal ve gerçek zamanlı polimeraz tepkimesi yöntemleriyle gösterilmesi	83
4.6. Apoptoz Değişiminin Akım Sitometri Yöntemiyle Gösterilmesi.....	86
4.7. Proteomiks	89
5. TARTIŞMA.....	93
KAYNAKLAR	103
ETİK KURUL KARARI	157
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	158
ÖZGEÇMİŞ	159

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Histolojik derecelendirmede modifiye edilmiş Bloom-Richardson Sistemi.	36
Tablo 2-2: Histolojik Tip Puanlama Tablosu	36
Tablo 2-3: Majör moleküler alt tiplerin gen ekspresyon profillerine göre değerlendirilmesi	38
Tablo 3-1: Gerçek zamanlı PCR tepkimesi için kullanılan primer dizileri	72
Tablo 4-1: Farklı dokular (tümör ve non-tumoral) arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan proteinleri etkileyen proteinler.....	90
Tablo 4-2: Farklı dokular (tümör ve non-tumoral) arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan proteinlere ait etkiyen ve bu proteinlerle etkileşen protein sayıları	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Metformin, NF-kB ve MMP ilişkisi.....	32
Şekil 2-2: Metforminin taşınması ve AMPK-p53 ve NFKB ilişkisi	51
Şekil 4-1: Tümör ve non-tumoral primer hücre kültürlerinde farklı metformin dozlarında 24. ve 72. saat sonundaki canlılık profilleri.....	75
Şekil 4-2: Non-tumoral primer kültürüne ait farklı dozlardaki metformin uygulaması sonrası BRDU boyama profilleri. A) 0 mM Metformin, B) 5 mM Metformin, C) 10 mM Metformin, D) 25 mM Metformin.....	76
Şekil 4-3: Tümör primer kültürüne ait farklı dozlardaki metformin uygulaması sonrası BRDU boyama profilleri. A) 0mM Metformin, B) 5 mM Metformin, C) 10 mM Metformin, D) 25 mM Metformin.....	77
Şekil 4-4: Farklı dozlardaki metforminin tümör ve non-tumoral primer hücrelerinde proliferasyona olan etkisinin BRDU boyama profile.	77
Şekil 4-5: Tümör ve non-tumoral primer kültürlerine ait immünohistokimyasal MMP-2 boyama profilleri. A) Non-tumoral (0 mM), B) Non-tumoral (25 mM), C)Tümör (0 mM), B) Tümör (25 mM).	78
Şekil 4-6: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve tümör non-tumoral primer hücrelerdeki immünohistokimyasal MMP-2 boyama profillerin grafiksel değerlendirmesi.....	79
Şekil 4-7: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve tümör dışı hücrelerdeki gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle saptanan MMP-2 ekspresyonlarının grafiksel değerlendirmesi.....	80
Şekil 4-8: Tümör ve non-tumoral primer kültürlerine ait immünohistokimyasal MMP9 boyama profilleri. A) Non-tumoral (0 mM), B) Non-tumoral (25 mM), C)Tümör (0 mM), B) Tümör (25 mM).	81
Şekil 4-9: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki immünohistokimyasal MMP-9 boyama profillerin grafiksel değerlendirmesi.....	81
Şekil 4-10: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle saptanan MMP-9 ekspresyonlarının grafiksel değerlendirmesi.....	82

Şekil 4-11: Tümör ve non-tumoral primer hücre kültürlerine ait immünohistokimyasal NF- κ B boyama profilleri. A) Non-tumoral (0 mM), B) Non-tumoral (25 mM), C) Tümör (0 mM), D) Tümör (25 mM).....	83
Şekil 4-12: Farklı hastalara ait (n=5) non-tumoral ve tümör primer kültürleri içerisinde farklı (0 mM ve 25 mM) metformin konsantrasyonlarındaki Nükleer ve Sitoplazmik NF- κ B değişimi (%).	84
Şekil 4-13: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle saptanan NF- κ B ekspresyonlarının grafiksel değerlendirmesi.	85
Şekil 4-14: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki ELISA yöntemiyle saptanan NF- κ B (p65) aktivitesinin grafiksel değerlendirmesi.	86
Şekil 4-15: Non-tumoral örneklerle ait 0-25 mM metformin konsantrasyonlarındaki apoptoz değişimi.	87
Şekil 4-16: Tümör örneklerine ait 0-25 mM metformin konsantrasyonlarındaki apoptoz değişimi.....	87
Şekil 4-17: Meme tümörü ile non-tumoral primer hücre kültürü arasında farklı (0 mM ve 25 mM) metformin konsantrasyonlarında apoptoz değişimi (%).	88
Şekil 4-18: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki akım sitometri yöntemiyle saptanan apoptoz değişimlerinin grafiksel değerlendirmesi.	89
Şekil 4-19: İstatistiksel olarak anlamlı bulunan GARS, ANP32A, NEFM, KRT7 ve THAP3 proteinlerine ait STRING analizi.	91
Şekil 4-20: Saptanan proteinlere ait PANTHER analizi.....	92

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

NF-kB: NUKLEAR FAKTÖR KAPPA B
MMP: MATRIKS METALLOPROTEINAZ
DNA: DEOKSİRIBONÜKLEİK ASIT
RNA: RIBONÜKLEİK ASIT
IHK: İMMÜNOHISTOKİMYA
ÖR: ÖSTROJEN RESEPTÖRÜ
PR: PROGESTERON RESEPTÖRÜ
HER2: EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ 2
RT-PCR: GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ
EBFR: EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ
GEP: GEN EKSPRESYONU PROFİLLEME
AR: ANDROJEN RESEPTÖRÜ
CMF: SİKLOFOSFAMİD, METOTREKSAT, 5-FLOROURASİL
TOP2A: TOPOİZOMERAZ 2 ALFA
CK: SİTOKERATİN
TP53: TÜMÖR PROTEİN 53
BRCA1: MEME KANSERİ 1 GENİ
EMT: EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ
CLDN: KLAUDİN
ECM: EKSTRASELÜLER MATRIKS
IKB: İNHİBİTÖR KAPPA B
BCL2: B HÜCRE LENFOMA 2
TNM: TÜMÖR NOD METASTAZ PARAMETRELERİ
AIO: AVRUPA ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
ROS: REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ
MTDNA: MITOKONDRIYAL DNA
NIK: NF-KB UYARICI KİNAZ
ATM: ATAKSİ TELANJİYEKTAZİSİ MUTASYONLU

ATR: ATM VE RAD 3-İLİŞKİLİ

PAMP: PATOJEN-İLİŞKİLİ MOLEKÜLER PATERNLER

PRR: PATERN TANIMA RESEPTÖRLERİ

TLR: TOLL BENZERİ RESEPTÖR

IL: İNTERLÖKİN

TNF: TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ A

IGF: İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ

HSP: ISI ŞOK PROTEİNLERİ

RISC: RNA KAYNAKLI SUSTURUCU KOMPLEKSİNE

PTEN: FOSFATAZ VE TENSİN HOMOLOĞU

PDCD4: PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜM 4 PROTEİNİ

KK: KALORI KISITLAMASI

IAP: APOPTOZ İNHİBİTÖRÜ

T2DM: TIP 2 DİYABET MELİTUS

AMPK: AMP İLE AKTİVE OLAN PROTEİN KİNAZ

CAMP: SIKLIK AMP

PKA: CAMP' YE BAĞLI PROTEİN KİNAZ

HIF: HIPOKSI İLE İNDÜKLENEBİLİR FAKTÖR

KKH: MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ

OCT: ORGANİK KATYON TAŞIYICILARI

HCC: HEPATOSELÜLER KARSİNOM

MS: KÜTLE SPEKTROMETRİSİ

MALDI TOF/TOF-MS: MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION
TIME-OF- FLIGHT, MASS SPECTROMETRY

DMEM: DULBECCO'NUN MODİFİYE EAGLE MEDYUMU

ÖZET

Yenmiş, G. (2018). Metforminin Yaşlanma Ve Kanser Üzerindeki Etkisinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Epidemiyolojik veriler, biguanidin, yani 1960'lı yıllardan beri tip 2 diyabette ilk basamak tedavi olan metforminin, kanser insidansı ve mortalitesindeki potansiyelini incelemek için birçok in vitro ve in vivo çalışmaların yanı sıra çok sayıda klinik çalışma yapıldığını vurgulamaktadır. Metformin yaygın olarak reçete edilen bir anti-diyabetik ilaçtır ve kullanımı daha düşük kanser insidansı ile ilişkilidir. Metforminin tümörogenezi zayıflattığı mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, bu bileşiğin veya ilgili biguanilerin antineoplastik aktiviteye sahip olabileceği düşünülmektedir. Mevcut kanıtlar, NF-kB sinyal yolunun anormal aktivasyonunun karsinogenez ile ilişkili olduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir. Her ikisi de kanserin gelişmesinde önemli olan immün yanıtı ve apoptoz gibi bir dizi anahtar hücresel süreç, bu yolun etkileyicileri tarafından yönetilmektedir. Matriks metalloproteinazlar (MMP) da tümör metastazı için önemli ajanlardır ve tümör tanısı için muhtemel adaylardır. Bu nedenle, etkili bir doz ile metforminin, NF-kB sinyalini azaltarak tümör proliferasyonunu ve MMP-2 ve MMP-9 ifadelerini inhibe edebileceği hipotezini oluşturduk. İmmünohistokimya yöntemiyle MMP-2, MMP-9 ve NF-kB protein miktarlarına, gerçek zamanlı PCR ile MMP-2, MMP-9 ve NF-kB ekspresyonlarına, ELISA yöntemiyle NF-kB aktivitesine, akım sitometri ile apoptoz değişimine ve MALDI/TOF-MS ile protein profillerine bakıldı. Tümör hücrelerinin proliferasyonunun, 25 mM metformin dozunda 24 saat sonrasında inhibe edildiği, metformin dozlarının artmasıyla NF-kB aktivitesinin azaldığı gözlemlendi. Tümör hücrelerinde apoptoz 25 mM metformin dozunda artarken tümör dışı meme dokusu hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. MMP-2 ve MMP-9 ekspresyon seviyelerinde metformin uygulaması sonrasında anlamlı düşüşler gözlemlendi. Yine metformin uygulaması sonrasında kanser hücrelerindeki apoptoz miktarlarında artma gözlemlendi. Bu sonuçlar, metforminin meme kanseri üzerindeki anti-kanser etkisinin invazyonu engelleme ve apoptozu teşvik etme şeklinde olduğu sonucunu doğrular. Proteomik veriler, tümör ve tümör dışı hücrelerin farklı protein profillerine sahip olduğunu göstermiştir. Tümör regresyonunda in vivo olarak metforminin kısa süreli yararı olmamasına rağmen, meme kanserine karşı önleyici bir rolü vardır; bu kısmen tümör proliferasyonunun zayıflamasına atfedilebilir. Yine de metforminin anti-proliferatif etkisini tümöre özgü olup olmadığını değerlendirmek için daha fazla araştırma gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Metformin, NF-kB, Matrix Metalloproteinazlar, Primer kültür.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24066



ABSTRACT

Yenmiş, G. (2018). Investigation of the Molecular Mechanisms of the Effect of Metformin on Aging and Cancer. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Doctoral Thesis. Istanbul.

Epidemiologic data have highlighted the positive effects of a biguanide, namely metformin, which is the first-line treatment for type 2 diabetes since the 1960's, to reduce cancer incidence and mortality, many in vitro and in vivo studies, as well as a large number of clinical trials, have been conducted in order to study its potential. Metformin is a widely prescribed anti-diabetic drug and its use is associated with lower cancer incidence. Although the mechanisms by which metformin attenuates tumorigenesis are not clearly understood, it has been proposed that this compound or related biguanides may have antineoplastic activity. Current evidence strongly suggests that aberrant activation of the NF- κ B signaling pathway is associated with carcinogenesis. A number of key cellular processes such as immune responses and apoptosis, both crucial in the development of cancer, are governed by the effectors of this pathway. The matrix metalloproteinases are also key agent for tumor metastasis and to be the probable candidates for tumor diagnosis. We, therefore, hypothesized that metformin with an effective dose can inhibit tumor proliferation and MMP-2 and MMP-9 expressions via decreasing NF- κ B signaling. MMP-2, MMP-9 and NF- κ B protein content are determined by immunocytochemistry, MMP-2, MMP-9 and NF- κ B expressions by real-time PCR, NF- κ B activity by ELISA method, apoptosis change by flow cytometry and protein profiles by MALDI / TOF-MS. The proliferation of tumor cells is inhibited in 24 hours time at metformin dose of 25 mM. NF- κ B activity is decreased by increasing metformin doses. Apoptosis in tumor cells is increased at 25mM metformin dose, while no significant change was observed in non-tumoral breast tissue cells. MMP-2 and MMP-9 expression levels were significantly lower after metformin application. Increased levels of apoptosis in cancer cells were observed after metformin administration. These results may suggest that the anti-cancer effect of metformin on breast cancer is to prevent invasion and promote apoptosis. The proteomics data has shown the different protein patterns of the tumor and non-tumoral cells. Despite the lack of short-term benefit of metformin in tumor regression in vivo, a preventive role of metformin against breast cancer was implicated, which is at least partially attributable to the attenuation of tumor proliferation, regulation of MMP-2 and MMP-9 expression, and NF- κ B activity. Further investigation is required to evaluate whether the anti-proliferative effect of metformin is tumor-specific.

Key Words: Breast cancer, Metformin, NF- κ B, Matrix Metalloproteinases, Primer culture.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 24066



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, ölümlerle sonuçlanan dünya geneli kadın kanserleri içerisinde akciğer kanseriyle birlikte ilk sırada yer almaktadır. Bunun en temel sebebi, hastalığın oluşmasından çok, ortaya çıkması sonrasında tedavisinin bireysel olarak farklılık göstermesi ve hastaların DNA profillerine spesifik tedavi yöntemi ihtiyacı olarak göze çarpmaktadır. Kanserlerin ölümlerle sonuçlanmasının en temel sebebi metastaz adını verdiğimiz, kanserin ortaya çıktığı lokasyondan kan ve / veya lenf damar sistemlerine sızarak vücudun başka yerlerine göçmesi ve burada daha farklı kanserlere sebep olmasıdır. Bunu ekstraselüler matriksi (ECM) parçalayan matriks metalloproteinazları (MMP) kullanarak yaparlar. Nükleer faktör kappa b (NF-kB) sade bir transkripsiyon faktörü olarak bilirse de proliferasyondan farklılaşmaya, apoptozdan otofajiye kadar birçok olayda merkezi rol oynamaktadır. Özellikle inflamasyon belirteci olduğu düşünülünce kanserleşme sürecindeki etkisi kaçınılmazdır. Proteomiks, 21. yüzyılda genomiksin alternatifi olarak kullanılacak bir yöntem olarak göze çarpmaktadır. Kanser hücrelerindeki protein profilindeki değişiklikler hastalığı anlayabilmemiz konusunda bize yol gösterici olabilecektir. Bir Tip 2 diyabet tedavi ajanı olarak kullanılan metforminin, son senelerde kanserogenezi yavaşlattığı ve kimi zaman durdurabildiği bilinmektedir. Bu ajanın meme kanserindeki etkisi bilinmekte ama etkin dozdaki farklılıklar, etki mekanizması gibi önemli kriterler henüz aydınlatılamamıştır. Bu parametreleri birlikte düşündüğümüzde, aynı hastaya ait tümör ve non-tumoral dokular arasında NF-kB merkezli metalloproteinaz, proliferasyon ve protein profilleri arasındaki farklılıkların etkin bir metformin dozunda hastalığa olan etkisinin araştırılması ve aydınlatılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Meme kanseri, gelişmiş ülkelerin çoğunda yeni teşhis edilen malignitelerin üçte birini oluşturan kadınlar arasında en sık görülen neoplazmdır (Spitale ve ark., 2008). Özgül patolojik özellikler ve birtakım farklı biyolojik davranışları olan oldukça heterojen bir hastalıktır (Spitale ve ark., 2008; Tang ve ark., 2008). Farklı meme tümörü alt tiplerinin farklı risk faktörleri, klinik prezentasyonu, histopatolojik özellikleri, sonuçları ve sistemik tedaviye yanıtı vardır (Desmedt ve ark., 2009; Iwamoto ve Pusztai, 2010; Jorge S Reis-Filho ve ark., 2010; Sotiriou ve Pusztai, 2009; Britta ve ark., 2010). Bu nedenle, klinik olarak ilgili alt tipler tarafından meme kanserinin sınıflandırılması gerekmektedir. İmmünohistokimya (IHK) belirteçleri ile birlikte tümör boyutu, tümör derecesi, nodal tutulum, histolojik tip ve cerrahi sınırlar gibi klinikopatolojik değişkenler, prognoz, tahmin ve tedavi seçimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cheang ve ark., 2009; Vallejos ve ark., 2010). 1970'li yıllarda, meme kanseri iki alt tipe ayrılmıştır. Östrojen reseptörü (ÖR) cevabının olup olmaması bilinen tek sınıflandırma yöntemi olarak kabul görmüştür. Yeni teknolojilerin ortaya çıkması ve karmaşık tümör oluşumunun ilerlemesinin artmasıyla yeni biyobelirteçler ve yeni alt tipler tanımlanmıştır. Bu, bir yandan, daha doğru hastalık yönetiminde bize yardımcı olmakla birlikte, öte yandan, meme kanseri heterojenliğine karşı anlayışımızı karmaşıklştırmaktadır.

2.1. Meme Kanseri Sınıflandırması

Meme kanseri sınıflandırması yaygın olarak 2 şekilde yapılmaktadır: Moleküler ve Histolojik sınıflandırma.

2.2. Moleküler Sınıflandırma

Moleküler sınıflandırmada esas alınan kriterlere göre bu sınıflandırma dallanabilmektedir. Buna göre moleküler sınıflandırma vaka durumundaki çeşitlilik dolayısıyla farklılık da gösterebilmektedir. Moleküler sınıflandırmada hormon ve büyüme reseptörleri, meme tümörü temel moleküler alt tiplerini tanımlar.

Meme tümörü moleküler alt sınıflandırması için klasik olarak ÖR, progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) dahil olmak üzere immünohistokimya (IHK) belirteçleri kullanılmaktadır (Fulford ve ark., 2006). Bu

belirteçleri test eden deneyler, patoloji laboratuvarlarında rutin olarak gerçekleştirilmektedir (Spitale ve ark., 2008). Bu hormon ve büyüme reseptörlerinin hücre büyümesi sinyalleşmesine aracılık ettiği bilinmektedir. Mesela östrojenin, meme kanserinin gelişimini desteklediği ve östrojen reseptörlerine sahip meme kanseri hücre hatlarının in vitro büyümesini uyardığı bilinmektedir (Lippman ve ark., 1976; Moon ve ark., 1981). Meme tümörleri, bu belirteçlere göre dört temel alt gruba ayrılır. [ÖR + | PR +] HER2- (ÖR veya PR pozitifliği olan ve HER2 negatifliği olan tümörler), [ÖR + | PR +] HER2 + (ÖR veya PR pozitifliği olan ve HER2 pozitifliği olan tümörler), ÖR-PR-HER2 + (ÖR ve PR negatifliği olan ve HER2 pozitif olan tümörler), ÖR-PR-HER2- (ÖR, PR, HER2 negatifliği olan tümörler, başka bir deyişle "üçlü negatif"). Genel olarak, ÖR-PR-tümörleri (hem ÖR hem de PR negatif olan tümörler), [ÖR + | PR +] tümörlerinden (ÖR veya PR pozitif olan tümörler) kıyasla daha kötü prognoza sahiptir.

2.2.1. Endokrin Reseptörler

2.2.1.1. Östrojen Reseptörü

ÖR, meme kanseri sınıflandırması için en önemli ve yaygın biyobelirteçtir. İlk olarak 1960'larda tanımlanmış ve meme kanseri klinik yönetiminde 1970'lerin ortalarından beri endokrin yanıtının birincil göstergesi ve erken nüks için prognostik faktör olarak kullanılmaktadır (Rakha ve ark., 2010). Meme kanserogenezinde önemli rol oynayan ÖR'nin inhibisyonu meme kanseri endokrin tedavisinin temelini oluşturur. ÖR pozitif tümörler, tüm meme kanseri hastalarının % 75 kadarını oluşturur ve 50 yaşın altındakilerde bu oran % 65 iken 50 yaşın üzerindeki hastalarda % 80 civarındadır (Anderson ve ark., 2002). ÖR pozitif tümörler büyük ölçüde iyi ayırt edilebilir, daha az agresif ve cerrahi operasyon sonrası ÖR-negatif olanlardan daha iyi sonuçlar verebilmektedir (Putti ve ark., 2005). ÖR, tek başına, hastanın uzun süreli sağ kalımının değerlendirilmesi göz önüne alındığında küçük bir farkla sınırlı prognostik değer sağladığı halde (Lancet, 2005), meme kanserinde tanımlanan en güçlü tek öngörebilir faktör olarak kabul edilmiştir (Badve ve Nakshatri, 2009; Lancet, 2005; Oh ve ark., 2006; Sørli ve ark., 2003). Genel olarak, ÖR negatif tümörlerin endokrin tedavisine yanıt vermesi olası değildir ve ÖR-pozitif hastaların ancak yarısı, anti-östrojen veya aromataz inhibitörlerine yanıt vermektedir (Lancet, 1998). ÖR-negatif tümörlerinin küçük bir oranının da hormonal tedaviye yanıt verdiği bilinmektedir (Dowsett ve ark., 2006; Esserman ve ark., 2005). ÖR tedavisine farklı yanıt veren ÖR-pozitif

tümörlerdeki farklılık transkripsiyonel düzeyde (Dai ve ark., 2014; Perou ve ark., 2000; Sørlie ve ark., 2003) ya da hastalar arasındaki genetik farklılık / karmaşıklık olabilmektedir (Chin ve ark., 2006; Natrajan ve ark., 2009; Natrajan ve ark., 2010).

2.2.1.2. Progesteron Reseptörü

Bir iç salgı tarafından indüklenen PR aktivasyonu aslında aktif bir ÖR sinyaline işaret eder (Horwitz ve McGuire, 1975; Horwitz ve ark., 1978; Lanari ve ark., 2009; Walker, 2008). Meme kanserinin % 65-75'inde PR-pozitif tümörler bulunmaktadır ve birçok çalışma bu tümörlerin meme kanseri sınıflandırmasındaki klinik etkilerine dikkat çekmektedir (Colomer ve ark., 2005; Elledge ve ark., 2000; Ravdin ve ark., 1992; Regan ve ark., 2006; Ryden ve ark., 2005; Stendahl ve ark., 2006). Bununla birlikte, PR'nin endokrin terapötik yanıtla ilgili ÖR üzerindeki öngörücü rolünü destekleyen kanıt eksikliği nedeniyle birçok araştırmacı tarafından sınıflandırmadaki rolü sorgulanmıştır (Lancet, 1998, 2005; Olivotto ve ark., 2004). PR-pozitif tümörler nadiren ÖR-negatiftir (Olivotto ve ark., 2004) ve kullanılan yöntemin hassasiyetine göre bu oran % 0.2- 10 arasındadır (Allred, 2008; de Cremoux ve ark., 2002; Rakha ve ark., 2010; Viale ve ark., 2007; Yu ve ark., 2008). Bu nedenle, ÖR-negatif bir vakada güçlü PR pozitifliği, hastaya rutin pratikte de sıklıkla karşılaşılan yanlış ÖR-negatif sonucu verilmesine neden olabilmektedir (Allred, 2008). ÖR-pozitif tümörlerin yaklaşık %40'ı PR-negatiftir (Rakha ve ark., 2007). Özellikle tamoxifen tedavisi gören metastatik tümörlerde (Elledge ve ark., 2000; Ravdin ve ark., 1992), ÖR+ PR- tümörleri, ÖR + PR + tümörlere göre endokrin tedavisine daha az yanıt vermektedir. ÖR-pozitif tümörlerde PR ekspresyonunun olmaması, daha sonradan tamoxifen direncine de sebep olması muhtemel bozulmuş büyüme faktörü sinyalleşmesini düşündürebilir (Arpino ve ark., 2005; Bardou ve ark., 2003; Ferno ve ark., 2000; Rakha ve ark., 2007). PR geleneksel olarak meme tümörü alt tiplemesinde ÖR ile birlikte kullanılır, yani ÖR + PR +, ÖR + PR-, ÖR-PR +, ÖR-PR- olarak sınıflandırılır. Çift pozitif grup (ÖR + PR +), meme tümörlerinin % 55-65'ini oluşturur (Anderson ve ark., 2001; Dunnwald ve ark., 2007; Rakha ve ark., 2007) ve bunların % 75-85'i endokrin tedavisine yanıt vermektedir (Dowsett ve ark., 2006). Diğer alt gruplarla karşılaştırıldığında, bu tümörler yaşlılık, düşük histolojik derece, daha küçük tümör boyutu ve daha düşük ölüm oranı ile ilişkilendirilmişlerdir. Çift negatif grup (ÖR-PR-) tümörlerin %18-25'ini oluşturur ve bunların % 85'i histolojik derece 3'tür. Bu tümörler daha yüksek nüks oranı, azalmış sağ

kalım süresi ile ilişkili olup endokrin tedavisine cevap vermemektedir (Anderson ve ark., 2001; Bardou ve ark., 2003; Elledge ve ark., 2000; Kinne ve ark., 1987; Parl ve ark., 1984; Ravdin ve ark., 1992). ÖR ve PR'nin eşzamanlı negatifliği olan tümörlerde, genel olarak, preoperatif taksan/antrasiklin bazlı tedavide iyi yanıt alınabilmektedir (Maggie CU Cheang ve ark., 2009; M Dowsett ve ark., 2006). Birçok kanıt, bu sınıftaki tümörlerin oldukça heterojen olduğunu (Britta Weigelt ve ark., 2010; Weigelt ve Reis-Filho, 2009) ve HER2 gibi diğer belirteçlerin durumuna göre birçok alt gruba ayrılabilirliğini göstermektedir (Sorlie ve ark., 2001; Sørlie ve ark., 2003). Meme kanseri hastalarının tek pozitif fenotipli görünme sıklıkları ÖR + PR- için % 12 -17 (Anderson ve ark., 2001; Dunnwald ve ark., 2007; Rakha ve ark., 2007), ÖR-PR + için ise % 0.2-10 arasındadır. Çift pozitif tümörlerle karşılaştırıldığında, bu kanserlerde daha yüksek histolojik derece, daha büyük tümör boyutu ve kromozomal anöploid olma olasılığı daha artmıştır ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EBFR) ve HER2 gibi proliferasyonla ilişkili genlerin ekspresyonunu daha yüksektir (Arpino ve ark., 2005; Rakha ve ark., 2007). Tek hormon reseptörü pozitifliği olan tümörler, sadece hormonal manipulasyona % 40 yanıt vermekle birlikte (M Dowsett ve ark., 2006), aslında, endokrin tedavisine, çift pozitif hormon reseptörleri barındıranlara göre daha az iyi yanıt verirler (Bardou ve ark., 2003; Osborne ve ark., 1980; Ravdin ve ark., 1992), Tek pozitif grubun, çift pozitif ve çift negatif grup arasında kalan biyolojik ara sınıf özelliği gösterdiği bilinmektedir (Blenkiron ve ark., 2007; Rakha ve ark., 2007; Sundblad ve Caprarulo, 1996). Alt tiplerede reseptör durumunun tanımlanması için ikili gösterimin yani pozitif ve negatifin kullanılması yerine, tümörlerin endokrin tedavisine yanıtını öngörmek için ÖR ve PR ekspresyon seviyeleri kullanılmaktadır (Goldhirsch ve ark., 2007). ÖR + PR + tümörleri iki kategoride değerlendirilmektedir, yani, hem ÖR hem de PR'yi aşırı eksprese eden tümörler (ÖR > %50 ve PR > %50) ya da her iki reseptör seviyesini de düşük eksprese eden tümörler (%10 < ÖR < %50 veya PR < %50). İlk kategorinin hormon tedavisine son derece duyarlı olduğu ve ikinci grupta ise endokrin yanıtının olmadığı bildirilmiştir. Öte yandan, ÖR- / PR- grubu (ÖR < %10 ve PR < %10), endokrin tedaviden fayda görememektedir (Goldhirsch ve ark., 2007). Bir meta analiz, 5 yıllık tamoksifen tedavisinin kadınlardaki etkisinin ÖR düzeyiyle orantılı olduğunu göstermektedir (Lancet, 1998). Stendahl ve ark. klinik pratiğinde hem ÖR hem de PR'nin iki zıt gruba ayrılmış immünohistokimyasal değerlendirmesinden ziyade parçalara ayrılmış bir kullanımını önermektedir (Stendahl ve ark., 2006). Birlikte ele

alındığında, birleşik ÖR ve PR değerlendirmesi, meme kanseri varyantlarını tek başına kullanmaktan daha iyi ayırt edebilmektedir. İki reseptör tarafından sınıflandırılan meme kanseri alt tipleri ÖR + PR +, ÖR + PR-, ÖR-PR +, ÖR-PR- olarak değerlendirilirken; tümör boyutu, tümör derecesi, hormonal tedaviye cevap, tedavi sonrası sağ kalım süresi düşünüldüğünde ÖR + PR + en uygun ve ÖR-PR- en agresif kanserler olarak sıralanabilir (Anderson ve ark., 2001; Arpino ve ark., 2005; Bardou ve ark., 2003; Dowsett ve ark., 2005; Dunnwald ve ark., 2007; Elledge ve ark., 2000; Ferno ve ark., 2000; Rakha ve ark., 2007; Ravdin ve ark., 1992).

2.2.1.3. HER2

HER2 amplifikasyonunun klinik etkileri 1987'den beri bilinmektedir (Slamon ve ark., 1987). Çok sayıda çalışma, HER2 gen amplifikasyonu veya protein aşırı ekspresyonunun, zayıf prognoz ve sistemik kemoterapi tedavisi alındığında iyi klinik sonuçla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Bartlett ve ark., 2003; Chia ve ark., 2008; Wolff ve ark., 2007). HER2 proteininin aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu, invazif duktal meme kanserinin % 13-20'sinde gözlenmekte olup bu hastaların yarısından fazlası (yaklaşık % 55) ÖR-PR- fenotipindedir (Dandachi ve ark., 2002; Quenel ve ark., 1995; Slamon ve ark., 1987). HER2 pozitifliğinin prognostik değeri, lenf nodu (lenf düğümü)-pozitif olanlarda negatif olan hastalara göre daha yüksektir.

HER2 pozitifliğini sorgulamak, trastuzumabın ileri tümörlere uygulanması veya potansiyel HER2-pozitif erken evre hastalara adjuvan tedavi uygulanmasından önce rutin bir klinik uygulama olarak kullanılmıştır (Piccart-Gebhart ve ark., 2005; Slamon ve ark., 2001). HER2 pozitifliğinin varlığı yine Anthracycline temelli kemoterapi tedavisine iyi yanıtla ilişkilendirilmiştir (Thor ve ark., 1998; Wood ve ark., 1994). HER2 pozitifliği, endokrin tedavilere mutlak dirençle ilişkili değil, göreceli olarak ilişkilidir (Konecny ve ark., 2003), ki bu da HER2'nin ÖR / PR ekspresyonuyla ters ilişkisiyle tutarlıdır (Quenel ve ark., 1995). Yukarıda belirtilen tedavilere ve stratejilere rağmen, HER2, HER2 proteininin iç tirozin kinaz kısmını hedefleyen lapatinib ve aşılarda dahil olmak üzere çeşitli yeni kanser terapilerinin önemli bir hedefidir.

Bu üç reseptörün (ÖR, PR ve HER2) iki fazlı immünohistokimyasal değerlendirmesini kullanarak, meme tümörleri [ÖR + | PR +] HER2 -, [ÖR + | PR +] HER2 +, ÖR-PR-HER2 + ve ÖR-PR-HER2- olarak sınıflandırılabilir. [ÖR + | PR +] HER2- ve [ÖR + | PR +] HER2 +, gen ekspresyonu profillemeye (GEP) isimlendirmesi ile

tanımlanan lümen A ve lümen B tümörlerine benzerdir (Carey ve ark., 2006; Matos, Dufloth ve ark., 2005). Bununla birlikte, IHK ve GEP sınıflandırması arasındaki böyle bir dönüşüm üzerinde hala fikir ayrılıkları bulunmaktadır. Klinik öncesi ve klinik veriler, HER2'nin aşırı ekspresyonunun, ÖR + veya PR + tümörlerde hormonal tedaviye karşı içsel direnç sağladığını göstermektedir; bu da, [ÖR + | PR +] HER2 + tümörlerinin, tek ajanlık hormon terapisinden çok fayda sağlayamayacağına işaret etmektedir. [ÖR + | PR +] HER2 + postmenopozal hastalarda hormon tedavisini ve hedefe yönelik anti-HER2 tedavisini birleştiren randomize klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bu yeni çift hedefleme stratejisinin hasta sağlığını önemli ölçüde düzeltebildiğini göstermektedir (Cuzick ve ark., 2009). Konecny ve ark. HER2 ekspresyonunun ÖR ile ters orantılı olduğunu ve [ÖR + | PR +] HER2 + tümörlerdeki hormon tedavisine direncin [ÖR + | PR +] HER2- alt tipi ile karşılaştırıldığında kısmen azalmasını, azalmış ÖR ya da PR ekspresyonuyla ya da ÖR ve PR de HER2'den daha fazla proliferasyon hızıyla ilişkilendirmişlerdir (Konecny ve ark., 2003). Diğer çalışmalar, [ÖR + | PR +] HER2 + meme kanserinin anti-HER2 terapisinin kemoterapiyle birlikte daha fazla fayda sağlayabileceğini düşündürmektedir (Hu ve ark., 2006). Patolojik tam yanıtın (meme bölgesinde ve en yakın aksiller lenf nodu bölgesinde rezidüel invazif kanserin yokluğu olarak tanımlanan (Nikas ve ark., 2012) başarısına bakılmaksızın [ÖR + | PR +] HER2 + tümörlerinin iyi prognoza sahip olduğu, buna karşılık ÖR-PR-HER2 + ve ÖR-PR-HER2-fenotipindeki hastaların prognozunun en kötü olduğu gösterilmiştir (Lehmann ve ark., 2011). Hayes ve ark. HER2 + tümörlerinin, ÖR-statüsünden bağımsız olarak, ÖR-HER2-tümörlerinin bu tür tedaviden az fayda sağlamasına rağmen, doksorubisin ve siklofosamid ile adjuvan tedaviden sonra paklitaksel ilavesinden yararlandıklarını göstermişlerdir (Hayes ve ark., 2007). Mevcut tüm kanıtlar, [ÖR + | PR +] HER2 tümörlerinin hormon tedavisine en iyi prognoza ve yanıtı sahip olduğunu göstermektedir. ÖR-PR-HER2 + ve ÖR-PR-HER2-tümörleri kötü diferansiye, agresif davranış ve kötü sonuç gösterirler ve hormon tedavisine çok az yanıt verirler.

2.2.1.4. Androjen Reseptörü (AR)

ÖR, PR ve HER2 yanı sıra, androjen reseptörü (AR) de meme kanseri alt sınıflandırmasında kullanılmaktadır. AR, ÖR-pozitif tümörlerin % 90'ında ve ÖR-negatif tümörlerin % 55'inde eksprese edilen yaygın seks steroid hormon reseptörüdür

(Hu ve ark., 2011; Ogawa ve ark., 2008). Meme kanserinde potansiyel bir prognostik belirteç ve terapötik hedeftir. HER2 ile benzer bir rol oynar gibi görünmektedir. Lakis ve ark. ÖR-PR-tümörleri ÖR-PR-AR + ve hormon reseptör negatif (ÖR-PR-AR-) karsinomlar olarak sınıflandırmışlardır (Farmer ve ark., 2005; Lakis ve ark., 2014) ve ÖR-PR-HER2+ ile ÖR-PR-AR+ tümörler arasında belirgin bir örtüşme gözlenmiştir. ÖR-PR-AR+ fenotip tüm meme kanseri vakalarının % 13.2'sini oluşturur ve genellikle KI67 + ile karakterizedir (Lakis ve ark., 2014). Hastanın relaps ve ölümüyle ilgili ÖR-PR-tümörlerinin yüksek riskine rağmen, ÖR-PR-AR+ tümörleri [ÖR + | PR +] tümörler ile karşılaştırılabilir derecede iyi hasta sonuçlarına sahiptir (Farmer ve ark., 2005; Lakis ve ark., 2014). Birlikte ele alındığında, klasik meme kanseri moleküler alt tipleri, en önemli kanser belirteciye göre, yani, "proliferatif sinyalleşmeyi sürdürme" ye göre, hormonal ve büyüme reseptörleri tarafından tanımlanmaktadır. Proliferatif sinyallere karşı azalmış yanıt ile meme kanserlerinin agresifliği artmakta ve mevcut hedefe yönelik muhtemel farklı tedavi sayısını azaltmaktadır. Üç hormonal reseptör (ÖR, PR, AR) ve HER2 arasında ÖR, meme tümörlerini proliferasyon kabiliyetleri (proliferatif sinyalleşmenin sürdürülmesi) ile ilgili olarak ayırt etmede belirleyici bir rol oynamaktadır.

2.2.2. Proliferasyon Belirteçleri

Hormonal reseptörlerden daha çok kabul gören proliferasyon belirteçleri, meme tümör sınıflandırmasında özellikle [ÖR + | PR +] HER2-tümörlerinde kullanılmaktadır. Hücre proliferasyonunun artmasının meme kanseri hastalarında klinik sonucun önemli bir belirleyicisi olduğu yaygın bir şekilde kabul edilmektedir (van Diest ve ark., 2004). CMF (siklofosfamid, metotreksat, 5-florourasil), taksan ve antrasiklin bazlı tedavileri içeren kemoterapi ajanları hücre bölünmesi veya DNA sentezini etkilemektedir. Böylelikle, proliferasyon ve konvansiyonel IHK belirteçlerinin eş zamanlı değerlendirilmesi, tek başına IHK kullanmaktan daha fazla öngörü ve daha kesin klinik çıkarımlar sağlayabilmektedir.

2.2.2.1. KI67

Ağırlıklı olarak normal hücre döngüsü içerisindeki KI67, meme kanserinde en yaygın kullanılan proliferasyon belirteçidir (Colozza ve ark., 2005). KI67, neoadjuvan yanıtı (Ellis ve ark., 2008; Jacquemier ve ark., 2009; Miglietta ve ark., 2009; Viale ve

ark., 2008; Vincent-Salomon ve ark., 2004) veya meme kanseri için adjuvan kemoterapi (ÖR-pozitif tümörler için endokrin tedavisi) sonucunu tahmin etmek için kullanılmaktadır. Chang ve ark. meme tümörlerini sınıflandırmak için ÖR, PR ve HER2'ye ek olarak KI67 kullanmışlar, burada [ER+ | PR+] tümörler KI67 ve HER2'nin ekspresyonuna dayanarak üç prognostik olarak farklı alt sınıflara ayrılmışlardır (Cheang ve ark., 2009). Çalışmalarında [ER+ | PR+] HER2-tümörleri [ER+ | PR+] HER2-KI67-ve [ER+ | PR+] HER2-KI67 + olarak sınıflandırılmışlardır.

2.2.2.2. TOP2A

Topoizomeraz II alfa (TOP2A), çift iplikçikli DNA'nın kopmasını ve birleşmesini katalize ederek, DNA süper sarmallarının gevşemesine yol açan bir proteindir (Nielsen ve ark., 2008). DNA replikasyonu, transkripsiyon, kromozom yapısı, kondensasyon ve segregasyon (Nielsen ve ark., 2008) gibi bir dizi temel nükleer proseste önemli rol oynayarak hücre proliferasyonunu büyük ölçüde etkiler. TOP2A ekspresyonu KI67'ninki ile ilişkili olup (Cardoso ve ark., 2004; Mueller ve ark., 2004), TOP2A 'daki sapma, HER2- fenotipindeki meme kanserinde sıklıkla bulunur ve bu tümörlerin yaklaşık %30-90'ını oluşturur. Antrasiklin temelli kemoterapiye yanıtın artmış olması ile ilişkili olan anormalliklerle birlikte potansiyel bir biyobelirteç olarak gösterilmektedir (Ejlertsen ve ark., 2010; Knoop ve ark., 2005; Nielsen ve ark., 2008; Press ve ark., 2011).

2.2.2.3. Hücre Döngüsü Genleri

KI67'den başka, diğer proliferasyon belirteçleri de, [ER+ | PR+] tümörlerini ayırmada önemini ortaya koymuştur. Aşırı ekspresyonu varlığında kötü klinik sonuçların prognostik olduğu proliferasyonun hücre döngüsü genleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Proliferasyon belirteçlerinin aşırı ekspresyonu, [ER+ | PR+] HER2-tümörlerinde proliferatif sinyalleşmeyi sürdürmeyi hızlandırarak daha kötü klinik sonuçlara yol açar.

2.2.3. İnvazyon ve Metastaz Aktivasyonu

2.2.3.1. Bazal Belirteçler

ÖR-PR-HER2-tümörleri, hedefe yönelik tedavilerin eksikliği ve agresif klinik davranışları göz önüne alındığında, meme tümörleri arasındaki en uygun alt tiplerden

biridir. Bu hastalar, davranışları, sonuçları ve terapötik olarak farklı olan en az iki ayrı molekül sınıfına, yani bazal fenotip ve bazal olmayan ÖR-PR-HER2 tümörlerinde sınıflandırılmıştır (Carey ve ark., 2006; Hennessy ve ark., 2009; Matos ve ark., 2005; Rakha ve Ellis, 2009; Rakha ve ark., 2009; Winger ve ark., 2009). Bazal tümörlerin tanımlanması için sayıca çok bazal IHK belirteçler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olarak kabul edilenler arasında sitokeratinler (CK) 5/6, 14, 17, 8/18 ve EGFR bulunmaktadır (Carey ve ark., 2006; Cheang ve ark., 2008; Fulford ve ark., 2006; Matos ve ark., 2005; Rakha ve ark., 2007; Rakha ve Ellis, 2009; Rakha ve ark., 2009; Romer ve ark., 2009; Yousefian ve ark., 2010). Bazal alt tiplerini tanımlamak için bu bazal belirteçlerin çeşitli kombinasyonları kullanılmıştır. Bazal alt tipin en pragmatik ve geniş kabul görmüş tanımı CK5 / 6 ve EGFR'nin pozitif ekspresyonunun gözlemlendiği ÖR-PR-HER2- tümörlerdir (Carey ve ark., 2006; Cheang ve ark., 2008). Rakha ve ark. ÖR-PR-HER2- kanserlerinin bazal tümörlerini karakterize etmede CK5 / 6, CK14, CK17 ve EGFR kullanımını önermektedirler (Rakha ve ark., 2009). Matos ve ark., P-kaderin, TP63 ve CK5'in kombine değerlendirmesinin ÖR-PR-HER2- tümörlerin bazal alt tipinin immünoprofillemeye yoluyla ayırt edilmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir (Matos ve ark., 2005). Sitokeratinler de tek başına bazal alt tipi tanımlamak için kullanılmaktadırlar. Örneğin, CK5 / 6 ve CK14, bazal alt tipi tanımlamada birlikte değerlendirilmiş (Rakha ve ark., 2007) tek başına CK14'ün, bazal karsinom ile güçlü bir şekilde ilişkili morfolojik özellikler gösteren meme tümörlerinin bir kısmını tanımladığı bildirilmiştir (Fulford ve ark., 2006). Üçlü negatif meme tümörü sınıflandırmasında bazal belirteçlerin çeşitli inklüzyonlarına rağmen, bu sınıfın belirteçleri kanserle ilişkilidir. Son çalışmalar, sitokeratinlerin, P-kaderin ve vimentinin kanserogenez ve metastaz ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Sitokeratinler, epitelyal dokunun intrasitoplazmik sitoskeletonunda keratin içeren ara filamanların proteinleridir. Vimentin mezenkimal hücrelerin majör ara filament proteinidir (Pan ve ark., 2010). Sitoiskelet proteinler (sitokeratinler dahil) ve hücre adezyon molekülleri (P-kaderin gibi) arasındaki etkileşimi düzenler ve böylelikle tümör hücrelerinde hücre adezyonu, migrasyon, invazyon ve hücre sinyal transdüksiyonuna katılır (Pan ve ark., 2010). Meme kanserlerinin % 10-25'ini oluşturan bazal tümörler (Perou, 2011), diğer ÖR-PR-HER2-meme tümörlerinden daha kötü prognoza sahiptirler. Bu iki alt tip farklı moleküler ve biyolojik özelliklere sahiptir ve neoadjuvan kemoterapiye yanıtlarında farklılık gösterirler (Fan ve ark., 2006; Swenson ve ark., 2009). Birden fazla bazal

keratin ekspresyonu olan tümörlerin işlev bozukluğu olan BRCA1 yoluna sahip olma olasılıkları daha yüksektir (Turner ve ark., 2007). Bununla uyumlu olarak, diğer birkaç çalışma da BRCA1 mutasyonu üzerindeki bazal keratinlerin prediktif değerini dikkat çekmektedir (Maro ve ark., 2009; Quach ve ark., 2009). Bazal belirteçler esas olarak ÖR-PR-HER2-tümörleri ve özellikle de bazal alt tip olarak eksprese edilmesine rağmen, hormonal reseptör pozitifliği olan tümörlerin küçük bir yüzdesi de bazal belirteç ekspresyonu gösterir (yaklaşık % 1- 18 [ÖR+ | PR+] tümörler). Bu durum, bu hastaların luminal veya bazal tümörlere ait olup olmadığı ve buna karşılık gelen tedavinin nasıl verilmesi gerektiği sorularına yol açmıştır. Bazal belirteç ekspresyonu olan [ÖR+ | PR+] tümörlerin konvansiyonel luminal tümörlerden daha kötü prognoz sergiledikleri gözlenmiştir (Rakha ve ark., 2010). Bu, lümen B ve bazal meme tümörleri arasında potansiyel bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir (Sorlie ve ark., 2001; Sørli ve ark., 2003). Bunun yanı sıra, bazal belirteçlerin, HER2 pozitif tümörlerin küçük bir oranında mevcut olduğu da bildirilmektedir ki bunlar Herseptin tedavisine klasik HER2+ tümörlerden daha az yanıt vermektedirler (Harris ve ark., 2007). Üçlü negatif tümörlerin zayıf prognozu, 'aktive eden invazyon ve metastaz' işareti ile ilişkilidir. Bazal belirteçler dahil edildiğinde tümör sınıflandırmasında sergilenen belirsizlikler, bir zamanlar 'aktive edici invazyon ve metastazda ayırt edici özelliği barındıran meme tümörlerinin, bir kez daha kötü prognoz (bazal belirteçli luminal tümörler) veya ilaç direnci sergilediğini düşündürmektedir.

2.2.3.2. Kök Hücre Belirteçleri

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), hareketli, çok kutuplu veya iğ şekilli mezenkimal hücrelerden epitel denilen kutuplaşmış hücrelerin düzlemsel dizilerine geçişi içeren tersine çevrilebilir bir biyolojik işlemdir. EMT, metastaz için gerekli bir işlemdir. EMT'nin belirteçleri, VIM, SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2, ZEB1, ZEB2, CDH1, CLDN3 (klaudin 3), CLDN4 (klaudin 4), CLDN7 (klaudin 7)'dir (Palmer ve ark., 2006; West ve ark., 2005). Klasik olarak kök hücre belirteçleri olarak kabul edilen moleküller arasında CD44, CD24, EpCAM, CD10, CD49, CD29, MUC1, THY1 ve ALDH1A1 bulunur (Creighton ve ark., 2009). Bu belirteçler tarafından sağlanan iki grup meme tümörü, yani, klaudin-düşük ve metaplastik meme kanseri, ÖR-PR-HER2 tümörlerinden daha farklı olarak ayrılabilir. Her iki alt tipte de tümör özellikleri, genomik bozukluklar, ilaç yanıtı ve klinik sonuçlarla ilgili birçok benzerlik vardır.

Bunlar, EMT belirteçleri için zenginleştirilmiş ve kök hücre karakteristiklerini gösteren GATA3 geni ile düzenlenmiş ve hücre-hücre adezyon genlerinin düşük ekspresyonu ile karakterize edilmektedirler (Hennessy ve ark., 2009; Prat ve Perou, 2011). Her iki meme tümörü alt tiplerinin, EMT ve kök hücre belirteçleri ile anlamlı bir benzerliği olmasına rağmen, metaplastik meme kanseri, PIK3CA, AKT veya KRAS mutasyonlarına sahip olduğu için klauidin-düşük tümörlerden farklıdır (Hennessy ve ark., 2009).

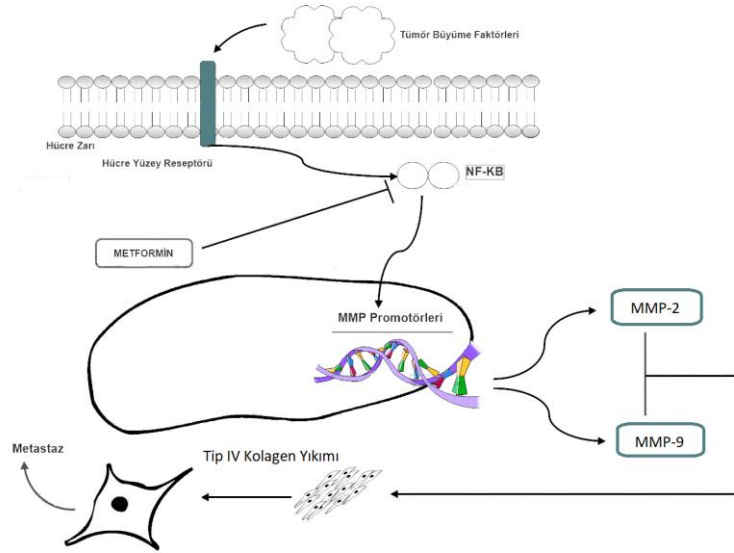
2.2.3.3. Matriks Metalloproteinaz 2 ve 9

Bir tümörün agresifliği esas olarak komşu dokuyu işgal etme ve uzak bölgelere metastaz yapma yeteneğine bağlıdır. Bazal membranın ve ECM'nin proteolitik bozunması, neovaskülarizasyon, yara iyileşmesi ve malign büyüme gibi fizyolojik ve patolojik doku-yeniden modelleme işlemlerinin merkezinde bulunur.

Meme kanserinde, uzak metastazlar başlıca ölüm nedenidir. Uzak metastaz oluşumundaki temel süreç, tümör hücrelerinin lokal dokuya ve oradaki kan damarlarını işgal etmesine ve böylelikle yeni metastatik formasyonlar oluşturmaya izin veren hücre dışı matrisin parçalanmasıyla başlamaktadır. Bu işlem esas olarak tümör tarafından salgılanan proteinazların aktivitesinden etkilenir. Günümüzde en az dört proteinaz sınıfı bilinmektedir: Serin proteinazlar, Aspartatik proteinazlar, Sistein proteinazlar ve MMP'ler (Nagase ve ark., 2006; Page-McCaw ve ark., 2007; Stamenkovic, 2000). Toplu olarak, bu proteinazlar, ECM'nin tüm bileşenlerini parçalayabilir. Fizyolojik koşullar altında (örneğin, doku yeniden şekillenmesi, anjiyogenez, ovülasyon, yara iyileşmesi), proteolitik yıkım ve proteolizin düzenleyici inhibisyonu arasında kesin bir düzenleme vardır (Garbett ve ark., 2000; Nagase ve ark., 2006; Page-McCaw ve ark., 2007; Stamenkovic, 2000). Bu fizyolojik denge kanser varlığında bozulmaktadır. MMP'ler hemen hemen her tip kanserde düzenlenir ve bunların ekspresyonu genellikle hastalar için kötü prognozla ilişkilidir (Curran ve ark., 2004; Forget ve ark., 1999). Yapılan çalışmalarda, MMP'lerin ekspresyonunun ve ilerlemesinin meme kanserinin ileri evresine, tümör hücrelerinin invazyonuna ve metastatik oluşumların oluşturulmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (Duffy ve ark., 2000). MMP'ler yapısal ve fonksiyonel olarak birbirine benzeyen endopeptidaz ailesidir. Bunlar, MMP-11 dışında, inaktif zimogenler olarak salgılanır ve diğer aktive edilmiş MMP'ler veya serin proteazlar (örneğin tripsin, plazmin, kallikrein) (Nagase ve

ark., 2006; Page-McCaw ve ark., 2007; Stamenkovic, 2000) tarafından hücrenin dışında aktive edilir. Aktivasyonları için, propeptid alanın proteolitik olarak çıkarılması gereklidir. Bu, MMP'lerin katalitik alanına erişim sağlar. Aktifleştirilmiş MMP'ler tarafından ECM'nin parçalanması, tümör hücrelerinin istilasını ve ayrıca ECM bağlı büyüme faktörlerinin (ör. İnsülin benzeri büyüme faktörleri ve fibroblast büyüme faktörleri) salınmasını kolaylaştırır. Yine, ortaya çıkan ECM-protein fragmanlarının bir kısmı (Laminin-5 veya kolajen tip IV'ün bölünmesi gibi) yeni biyolojik fonksiyonlar kazanarak farklı hücre tiplerinin göçünü önleyebilen kriptik bölgelerinin ortaya çıkarılmasına neden olur (Nagase ve ark., 2006; Page-McCaw ve ark., 2007; Stamenkovic, 2000). Hâlihazırda, insanlarda MMP ailesinin 23 üyesi bilinmektedir. Substrat özgünlüğüne göre, bunlar altı alt sınıfa ayrılır: kolajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrizinler, membran-tipi MMP'ler ve diğerleri (Nagase ve ark., 2006). Yakın zamana kadar, çoğu araştırmacı, tip IV kolajeni yıkabilen iki jelatinazın -72 kDa tip IV kolajenaz (MMP-2, jelatinaz A) ve 92 kDa tip IV kolajenaz- ekspresyon profilleri üzerine odaklanmıştır (Giambardi ve ark., 1998; Iwasaki ve ark., 2002). Tip IV kolajen, epitelyal hücreleri hemen altındaki stromadan ayıran bazal membranlarda bol miktarda bulunur. Bu subendotelyal taban zarının yıkılması, kanser hücrelerinin intravazasyonu ve ekstrasvazasyonuna doğru ilk adımdır. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin aromataz-inhibitör letrozol ile in vitro tedavisinde, MMP-2 ve -9 seviyelerinin etkili bir şekilde azaldığı gözlemlendi ve bu inhibitörün hem meme kanseri büyümesini hem de invazyonu baskıladığını düşündürdü (Mitropoulou ve ark., 2003). Yine farklı meme kanseri çalışmalarında, Northern blot analiziyle normal meme dokusuna kıyasla MMP-9 ve -11 ekspresyonlarında (Kossakowska ve ark., 1996) aynı teknikle başka bir çalışmada artmış MMP-2, -7, -9 ve -11 ekspresyonları gözlenirken (Pacheco ve ark., 1998), ELISA tekniği ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada MMP-1 ve -9 protein içeriği tespit edilmiştir (Przybylowska ve ark., 2006). Substrat zimografisi kullanılarak gerçekleşen başka bir çalışmada ise MMP-1, -2, -3 ve -9, sağlıklı numunelere kıyasla tümör dokularında daha yüksek bir aktivite göstermiştir (Garbett ve ark., 2000). Bu bağlamda, meme kanseri hastalarının kanser dokularında MMP-2'nin artan ekspresyonuyla hayatta kalma oranının azalması arasında bir korelasyon (Talvensari-Mattila ve ark., 1998) ve ayrıca meme kanseri dokularında MMP-9 seviyelerinin artması ile tümör derecesi arasında bir ilişki (Li ve ark., 2004) tanımlanmıştır. Kısacası, çok erken evre meme kanserinde MMP-2 eksprese edilmekte

ve tümör oluşumuna yol açan ilk olaylara katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Garbett ve ark., 2000). Normal yetişkin meme dokusunda büyük oranda MMP-2 yoktur, ancak fibroadenomlar (Curran ve ark., 2004) gibi bazı iyi huylu tümörlerde eksprese edilir. Ekspresyonu, tümör derecesinin artmasıyla daha tutarlı hale gelir ve MMP-2 immünoaktivitesinin, meme kanseri hastalarının azalmış sağ kalım süresinin bağımsız bir ön göstergesi olduğu bulunmuştur (Duffy ve ark., 2000; Forget ve ark., 1999; Giamberti ve ark., 1998). MMP-9, aynı zamanda, insan meme karsinomu dokusunda yüksek oranda eksprese edilir ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Iwasaki ve ark., 2002). Çoğu durumda, bu iki MMP malign epitelyum tarafından üretilmemektedir, bunun yerine etraftaki tümör stroması tarafından üretilmektedirler: In situ hibridizasyon deneyleri MMP-2'nin çevreleyen tümör hücre kümeleri fibroblastları tarafından sentezlendiğini göstermektedir. Birkaç grup, tümör invazyonuna komşu olan stromalarda seçici protein ekspresyonu bildirmiştir (Forget ve ark., 1999). Meme kanserinde MMP-9 mRNA da tümör stromasında lokalize olmakla birlikte, ekspresyonu daha fazla bölgesel olma eğilimindedir (Mitropoulou ve ark., 2003). Her iki ekspresyon paterni, tümör hücreleri ve stromal ortamları arasında karşılıklı ilişki olduğunu göstermektedir (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Metformin, NF-kB ve MMP ilişkisi

2.2.4. Bağışıklık Sisteminin İşgal Edilmesi

2.2.4.1. İmmün yanıt genleri ER-PR-HER2-tümörlerini kurtarır

İnterferonla düzenlenen genlerin aşırı ekspresyonuyla karakterize olan, interferonca zengin alt tip ÖR-PR-HER2-tümörlerinden yakın zamanda, tanımlanmıştır (Hu ve ark., 2006; Teschendorff ve ark., 2007). Bu tümörler meme tümörü olgularının yaklaşık % 10'udur (Hu ve ark., 2006). Bu alt-tipin tümörlerini diğer ÖR-PR-HER2-kanserlerinden ayıran, interferonla düzenlenmiş genler arasındaki STAT1 ve SP110'dan, STAT1 'in interferonla düzenlenmiş gen ekspresyonuna aracılık eden transkripsiyon faktörü olduğu (Hu ve ark., 2006) ve SP110'un ise prognostik değere sahip olduğu bildirilmiştir (Teschendorff ve ark., 2007). İnterferonca zengin meme tümörlerinin relapsız (hastalık nüksetmeden) sağ kalımı, bazal kanserler (ÖR-PR-HER2 + ile karşılaştırılabilir) ve luminal A tümörleri arasında bir yeredir ve luminal B tümörleriyle karşılaştırılabilir (Hu ve ark., 2006). Bu durum da tümörlerin bağışıklık sistemini daha kolay ateşlediğini ve böylece hastaların daha iyi sonuç ve daha uygun terapötik stratejisiyle değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

2.2.5. Hücre Ölümüne Direnç Gösterme

2.2.5.1. BCL2 tümör prognoz sonucu ve tahmini üzerinde çift rol üstlenir

BCL2 proteini, çeşitli in vitro ve in vivo deneylerde doğrulanmış olan bir apoptoz baskılayıcıdır (Henderson ve ark., 1991; McDonnell ve ark., 1989; Vanhaesebroeck ve ark., 1993). İfadesi TP53 ile ters orantılı, fonksiyonu bir TP53 mutasyonu ile değiştirilebilir (Haldar ve ark., 1994). BCL2'nin prognostik değeri birçok çalışma ile araştırılmıştır (Hwang ve ark., 2012; Joensuu ve ark., 1994). Orta ve güçlü BCL2 ekspresyonunun (BCL2 + tümörleri olarak kısaltılmış), düşük mitotik sayım, düşük S-fazı fraksiyon büyüklüğü, düşük katepsin D ekspresyonu, yüksek histolojik farklılaşma derecesi, p53 ekspresyonu ve tümör nekrozu olmaması gibi birçok olumlu prognostik özellik ile yoğun bir şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, BCL2 + tümörleri olan hastalar, kısa vadeli fakat benzer uzun dönem meme kanserine özgü ölümlerde BCL2-tümörleri taşıyanlara kıyasla daha avantajlıdır (Joensuu ve ark., 1994). ÖR-PR-HER2-meme tümörleri için BCL2'nin prediktif değeri olduğu, ER-PR-HER2-BCL2- hastalarında antrasiklin bazlı tedavinin başarılı olduğu bulunmuştur (Abdel-Fatah ve ark., 2013).

2.2.6. Genom Mutasyonları ve Düzensizliği

2.2.6.1. TP53 disfonksiyonu tümörün ilaç direncini artırır

Tümör baskılayıcı TP53, hücre proliferasyonunu, hücre sağ kalımı, apoptoz ve en önemlisi genomik bütünlüğü kontrol eden birçok hücrel sinyalleşmede kritik bir rol oynar (Haldar ve ark., 1994; Olivier ve ark., 2006). Hücreler, DNA hasarı, hipoksi ve onkogen aktivasyonu gibi stres koşullarını tecrübe ettiğinde genomun bir kapıcısı olarak görev yapar. Böylece, TP53 eksikliği, genomik düzenin engellenmesi nedeniyle hasarlı hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açabilir ve bu da daha artan bir mutasyon hızına yol açar. Tümörlerin yaklaşık % 25-30'unda TP53 geninde mutasyon vardır (Borresen-Dale, 2003; Fitzgibbons ve ark., 2000; Lacroix ve ark., 2006). Bu durum, tümör büyüklüğünden, lenf nodu durumundan ve hormon reseptör içeriğinden bağımsız olarak meme kanserinde önemli bir prognostik belirteç olarak rapor edilmiştir (Olivier ve ark., 2006). TP53 ve PR arasındaki bir etkileşim ortaya çıkmakta olup, TP53-PR tümörlerinin tüm meme kanserleri arasında en kötü prognozla ilişkili olduğu, p53 mutasyonunun tamoksifene karşı meme kanseri yanıtını olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir (Olivier ve ark., 2006). Artan kanıtlar, TP + disfonksiyonunun ÖR + tümörlerinde anti-östrojen direncinin geliştirilmesinden sorumlu olduğunu göstermiştir (Rahko ve ark., 2006; Sayeed ve ark., 2007) ve ÖR-TP53-tümörleri kemoterapi tedavisi başarısızlığından sıkıntı yaşamaktadır (Borresen-Dale, 2003; Kandioler-Eckersberger ve ark., 2000; Lonning ve ark., 2007).

Bu kanıtlar, "genom dengesizliği ve mutasyonunun", ait olduğu alt tipten bağımsız olarak, tümör ilaç direncine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

2.3. Meme Kanseri Histolojik Alt Tipleri

İnvazif meme kanseri şu anda spesifik olmayan duktal karsinom ve spesifik alt tipler olarak sınıflandırılmaktadır. Meme kanserinin özel alt tiplerinin spesifik tanımları vardır, spesifik olmayan tip ise spesifik alt tipler dışındaki tüm karsinomları içeren bir çöplüğe benzemektedir. Spesifik olmayan invaziv duktal karsinomlar tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 60-75'ini oluşturur. Spesifik tipler % 20-25'ini oluşturur ve bu gruptaki en yaygın tipler lobüler, tübüler, papiller ve müsinöz tümörlerdir (Weigelt ve Reis-Filho, 2009). Tek bir tümör (intratümöral) veya morfolojik olarak aynı tipteki tümörler (intertümöral) arasındaki heterojenite şu anda iyi bilinmektedir ve kabul

edilmektedir. Bu nedenle, patologlar, klinisyenlerin hastalarını daha iyi izleyebilmeleri için yeni sistemler üretmeye çalışmışlardır. Patoloji raporlarının mutlak gerekli bir bileşeni “histolojik derece”dir ve tümör farklılaşma derecesinin (tübül oluşumu), nükleer pleomorfizm (nükleus yapısı) ve proliferasyonun (mitoz oranı) değerlendirilmesi ile belirlenir.

2.3.1. Histolojik Alt tipler

Meme Karsinomunda Mikroskopik Derecelendirme (Bloom-Richardson sisteminin Nottingham Modifikasyonu):

a. Tübül oluşumu

1 puan: Tübül oluşumu tümörün % 75’inden fazlasını oluşturur.

2 puan: Tübül oluşumu tümörün % 10-75’ini oluşturur.

3 nokta: Tübül oluşumu tümörün % 10’undan daha azını oluşturur.

Bu noktada, tübül oluşumu değerlendirmesi için tüm tümör dikkate alınmaktadır.

b. Nükleer pleomorfizm

1 puan: Çekirdek şekli ve boyut farkı hafif,

2 puan: Çekirdek şekli ve boyut farkı orta derecede,

3 puan: Çekirdek şekli ve boyut farkı belirgin.

Bu noktada özellikle nükleer pleomorfizmi olan hücreler içeren alanlar değerlendirilmelidir.

c. Mitoz Sayısı (x25,alan çapı 0.59 mm-10 alan)

Mitotik sayım işlemi sadece tümörün periferinde yapılmalı ve en aktif mitotik bölgelerden başlanmalıdır. Sayım sırasında daha çok normal meme dokusu bulunmayan, tümör bakımından zengin bölgeler mümkün olduğunca tercih edilmekte, profaz evresindeki hücreler sayılmamaktadır. Değişen marka mikroskoplar nedeniyle görüntü alanındaki farklılıklar nedeniyle, mitotik sayının sayısı için belirlenmiş ve kabul edilen değerler vardır. Bu değerlere dayanarak mitotik sayım 0-9 arasında 1, 10-19 sayım arası için 2 ve >20 için 3 olarak puanlanır (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Histolojik derecelendirmede modifiye edilmiş Bloom-Richardson Sistemi

Meme Kanseri Histolojik Değerlendirmesinde Kullanılan Modifiye edilmiş Bloom-Richardson Sistemi	Puan
Tübül Varlığı	
Tümörü oldukça kaplamış (>%75)	1
Tümöre orta derecede dağılmış (%10-75)	2
Tümörde çok az ya da yok (<%10)	3
Nükleus Yapısı	
Küçük tektip hücreler	1
Orta derecede şekil ve boyut farkı, nükleol varlığı	2
Belirgin derecede şekil ve boyut farkı, artmış nükleol varlığı	3
Mitoz Sayısı (alan çapı 0.59-10 mm, x25)	
0-9 Mitoz	1
10-19 Mitoz	2
>20 Mitoz	3

Tübül oluşumu, nükleer pleomorfizm ve mitotik sayım puanları ile toplam puan elde edilir. Histolojik derece, Tablo 2-2'de gösterildiği gibi elde edilen toplam puana göre belirlenir.

Tablo 2-2: Histolojik Tip Puanlama Tablosu

Histolojik Tip Puanlaması	
Toplam Puan	Histolojik Derece (Grade)
3-5	I
6-7	II
8-9	III
Toplam Puan = Tübül varlığı puanı + Nükleus Yapısı Puanı + Mitoz Sayısı Puanı	

Bu yöntemle yapılan histolojik değerlendirme, yarı kantitatifdir, ancak hasta prognozunun belirlenmesinde çok güçlü bir öngörü sağlar (Rakha, Reis-Filho, Baehner, ve ark., 2010). Buna ek olarak, histolojik puanlamanın histolojik tipleme yanında

östrojen-progesteron reseptör ekspresyonu ve HER-2 amplifikasyonu gibi moleküler değişiklikler ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Rakha ve ark., 2010). Geleneksel yaklaşımda, tümör boyutu ve yayılma durumu (özellikle lenf nodu tutulum durumu) gibi bir dizi güçlü parametreler hastalığın evresini belirler. Tüm kanser türlerine uygulanabilen evreleme sistemi prensipleri ve tümör, nod, metastaz parametreleri (TNM), Pierre Denoix tarafından tanımlanmış ve kısa bir zaman içerisinde geniş kabul görmüştür (Aujaleu ve Denoix, 1952). TNM sistemi tüm dünyada yaygın olarak tedavi merkezleri arasında ortak bir dil olarak kullanılmakta, tedavi planlamasına rehberlik etmekte, izlem sırasında tedavinin etkinliğini gösterme ve prognozu öngörme olanağı sunmaktadır. Bununla birlikte meme kanseri teşhisi ve tedavisinde gelişmeler, teknolojinin geliştirilmesi ve bilgi artışı, tümör biyolojisini ayrıntılı olarak değerlendirmek için girişimler, en prognostik faktörlerin tümörün biyolojik özellikleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. En önemlisi yeni verilerin toplanması aynı TNM grubu ve aynı histolojik tipteki tümörlerde gözlenen çok farklı sağ kalım oranları için alternatif çözüm arayışlarına yol açmıştır.

TNMEIO sistemi, tedavi kararlarını etkileyen tümör özelliklerini TNM sistemine dahil etmek amacıyla Avrupa Onkoloji Enstitüsü (EIO) tarafından önerilmiştir (Veronesi ve ark., 2006). Bu sistemde tümörün ÖR, PR, HER-2 gibi tüm anatomik ve biyolojik özellikleri yer almaktadır. Meme karsinomunun çapı 1.3 cm ise, T1.3 olarak tanımlanmaktadır. Lenf nodu invazyonu için benzer uygulama, sentinel lenf dahil olmak üzere incelenen tüm lenf nodu sayısı (örn. N0 / 1, N3 / 9, Ns0 / 9, s: sentinel lenf nodu) ve metastaz bölgesi M (MH: Hepatik metastaz, ML: Akciğer metastazı) şeklindedir. Bu sisteme göre, boyutu 1.6 cm, ÖR pozitif, PR pozitif, HER2 negatif, karaciğer metastazı olan ve 23 lenf nodunun 4'ünde invazyon olan bir tümör T1.6, ÖR +, PR-, HER2 +, N4 / 23, MH. Bazı merkezler lenfo-vasküler invazyonu olan tümörlerde daha agresif tedavi yöntemlerini tercih edebilmektedir.

2.3.2. Moleküler Alt tipler

Mevcut moleküler sınıflandırma meme kanserini luminal A, luminal B, HER-2, bazal ve normal meme gibi beş gruba ayırır. Moleküler alt sınıflandırma, birkaç immünohistokimyasal belirteç kullanılarak sağlanabilir. ÖR, PR, HER2, Ki-67, EGFR ve bazal sitokeratinler (CK14 ve CK5 / 6 vb.) içeren bir panel "luminal", HER2 ve üçlü negatif tümörleri ayırt etmek için kullanılabilir. Aslında, "bazal" tümörleri

tanımlayan belirteçler üzerinde bir fikir birliği yoktur, ancak EGFR ve CK5 / 6'nın kullanımının bu alt grubun belirlenmesinde ve prognozu öngörmede yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Cheang ve ark., 2008). ÖR ve HER-2'nin yanı sıra özellikle ÖR-pozitif tümörlerde moleküler alt gruplarda proliferasyon belirteçleri çok önemlidir. Bununla birlikte, Ki67 veya daha ayrıntılı mitotik indeks puanlama sisteminin bir proliferasyon belirteci olarak kullanılmasının uygunluğu sorgulanmaktadır. Ki67 skorlamasının hasta takibi ve tedavisinde pozitif / negatif veya yüksek / düşük olarak uygulanması hala tartışılmaktadır ve henüz bu konuda bir fikir birliği yoktur. Luminal tümörlerin alt gruplara ayrılması temel olarak proliferasyon yoğunluğuna dayanır. Bu nedenle luminal B tümörlerinden luminal bir tümörün ayırt edilmesi için rutin olarak kullanılacak Ki67 sınır değerini belirlemek için IHC ile bir gen ekspresyonu profillemeye çalışması rapor edilmiştir (Cheang ve ark., 2009). Her bir tümörün beş temel moleküler alt tipten (luminal veya luminal B, normal meme benzeri, HER2 ve bazal) birinde sınıflandırılması için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir (Hu ve ark., 2006; Parker ve ark., 2009; Sørlie ve ark., 2003). Majör moleküler alt tipler meme kanserinde gen ekspresyon profillerine göre Tablo 2-3'de özetlenmiştir (Correa Geyer ve Reis-Filho, 2009; Schnitt, 2010).

Tablo 2-3: Majör moleküler alt tiplerin gen ekspresyon profillerine göre değerlendirilmesi

	Luminal A	Luminal B	Her2/neu	Bazal Benzeri
Gen Ekspresyonu Durumu	Luminal(düşük molekül ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu, hormon reseptörlerinin ve ilgili genlerin yüksek ekspresyonu	Luminal (düşük molekül ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu, hormon reseptörlerinin ve ilgili genlerin orta ve düşük ekspresyonu	HER2/neu'nun yüksek ekspresyonu,ÖR'nin ve ilgili genlerin düşük ekspresyonu	Bazal epitelyal genlerin ve bazal sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu,OR ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu, HER2 / neu'nun düşük ekspresyonu
Klinik ve Biyolojik Özellikler	İnvazif meme kanserlerinin %50'si, OR/PR Pozitif, HER2/neu Negatif	İnvazif meme kanserlerinin % 20'si, OR / PR pozitif, HER2 /neu ekspresyonu değişken, Luminal A'dan daha yüksek proliferasyon, Luminal A'dan daha yüksek histolojik derece	İnvazif meme kanserlerinin % 15'i, ÖR / PR negatif, HER2 /neu pozitif, yüksek proliferasyon, yaygın TP53 mutasyonu, yüksek histolojik derece ve nodal pozitifliği	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık % 15'i,çoğu ÖR / PR / HER2 / neu negatif (üçlü negatif),yüksek proliferasyon,yaygın TP53 mutasyonu, BRCA1 disfonksiyonu (gemlme, sporadik)
Histolojik Korelasyon	Tübüler Karsinom, Kribriform Karsinom, Düşük dereceli invazif duktal karsinom, Klasik Lobüler Karsinom	İnvazif duktal karsinom Mikropapiller karsinom	Yüksek dereceli invazif duktal karsinom	Yüksek dereceli invazif duktal karsinom,Metaplastik karsinom,Medüller karsinom
Tedaviye Yanıt ve Prognoz	Endokrin tedavisine yanıt Kemoterapiye değişken yanıt,İyi prognoz	Luminal A kadar iyi olmayan endokrin tedavisi yanıtı (tamoxifen ve aromataz inhibitörleri), Luminal A'dan daha iyi değişken kemoterapik yanıt, Luminal A kadar iyi olmayan prognoz	Trastuzumab'a (Herceptin) Yanıt, Antracyclinle kemoterapiye yanıt, genellikle olumsuz prognoz	Endokrin tedavisine veya Trastuzumab'a yanıt yok, Platin grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlı,şamamı olmasa da genellikle en kötü prognoz

2.4. Kanser ve Yaşlanma

Model organizmalarda yaşlanma mekanizmaları üzerindeki moleküler çalışmalar, yaşlanma sürecini geciktiren ve ömrünü uzatan birkaç uzun ömür geni tanımlamıştır. İnsan genomu, bu genlerin homologlarını içerir, ancak uzun ömürlülüğün düzenlenmesi ile açık bir ilişkisi olmamıştır. Öte yandan, çeşitli gözlemler, yaşlanma sürecinin genetik olarak programlanmadığı, ancak moleküler uygunluk kaybını ve daha sonra hücrel homeostazı bozan atık ürünlerin birikimini içeren rastlantısal bir süreç olduğu hipotezini desteklemektedir. Hücrel strese ve çevresel tehditlere karşı direnç,

başarılı bir yaşlanma sürecine ve uzun ömürlü bir hayata olanak sağlayabilir. İlginç bir şekilde, son çalışmalar, yaşam süresinin, daha düşük organizmalarda genetik, beslenme ve farmakolojik müdahalelerle uzatılabileceğini göstermiştir (Vijg ve Campisi, 2008). Bununla birlikte, kalori kısıtlaması tüm türlerde yaşam süresini uzatmanın tek ortak yolu olarak görünmektedir (Bishop ve Guarente, 2007). Yaşlanma sırasında, DNA hasarı miktarı sadece nükleer DNA'da değil, mitokondriyal DNA'da (mtDNA) da artmaktadır (Khrapko ve Vijg, 2009; Kukat ve Trifunovic, 2009). Reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve verimsiz DNA onarımı, mitokondriyi mtDNA'daki mutasyon birikimine maruz bırakmaktadır. MtDNA'nın heteroplazması, mutasyonları yaymakta ve yaşlanma sırasında oksidatif metabolizmayı bozabilmektedir. Hala bu değişikliklerin yaşlanmanın nedenini veya sonucunu temsil edip etmediği sorusu sorulmaktadır. Yaşlanma sürecinin genetik olarak programlanmamış olduğu, aksine nükleer ve mitokondriyal DNA'ya zarar vermenin moleküler uygunluğu azaltabildiği ve art arda bozulan fizyolojik komponentlerin birikimine yol açarak fonksiyonel bozulmalara neden olduğu düşünülebilir. DNA bütünlüğündeki bozulma hücrel uygunluğu bozan ve hem hücrel hem de organizma düzeylerinde yaşlanmaya neden olan rastlantısal süreçlerdir. Bu süreç, yaşla ilişkili entropi artışını temsil etmektedir (Hayflick, 2007). Konak savunması rastgele bir süreç değildir, ancak tehlike tanıma ve transkripsiyonel olarak aracılık edilen adaptif bağışıklık tepkisi arasındaki çok katmanlı bir sinyal ağını kullanır. NF-kB sinyalizasyon sisteminin, akut transkripsiyonel yanıtları tehlike tanımaya bağlayan odak noktasında olduğunu gösteren kapsamlı çalışmalar bulunmaktadır. Yaşlanma ve yaşla ilişkili hastalık varlığında NF-kB sisteminin aktive olması şaşırtıcı değildir, çünkü yaşlanma sinyallerin ve koşulların çoğu net bir şekilde tanımlanmış NF-kB sistemi indükleyicileridir; ör. oksidatif stres DNA hasarı ve bağışıklık savunması. Bununla birlikte, homeostazın sağlanabilmesi için, NF-kB sinyalleşmesinin aşırı aktivasyonuna karşı bir frenleme sistemi kaçınılmazdır. Çarpıcı bir şekilde, uzun ömürlülük faktörlerinin birçoğu, doğrudan ya da dolaylı olarak NF-kB sinyalleşmesinin inhibitörleridir. NF-kB transkripsiyon faktörüdür, fakat aynı zamanda ilk olarak immünooglobulin güçlendiricisinde gözlenen sekanslar ile etkileşebilen gen ekspresyonunun bir pleiotropik düzenleyicisidir (Sen ve Baltimore, 1986). NF-kB sisteminin yapısal ve fonksiyonel özellikleri son yirmi yıl boyunca kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Hayden ve Ghosh, 2004; Perkins, 2007; Siebenlist ve ark., 1994; Vallabhapurapu ve Karin, 2009). Memeli Rel / NF-kB ailesi, iki NF-kB bileşeni olan

p50 (ve onun prekürsörü p105) ve p52 (ve prekürsör p100) olarak üç Rel proteinini, RelA / p65, RelB ve c-Rel 'i içerir. Birkaç inhibitör IκB proteine (IκBz, IκBe, IκBb, IκBa ve Bcl-3) bağlı şekilde, sitoplazmaya sıkışmış bu bileşenler inhibitörden kurtulup birbirleriyle dimerik kompleksler oluştururlar. Bazı protein kinazlar IκB proteinlerini fosforile edebilir ve bu şekilde NF-κB komplekslerinin IκB proteinlerinden serbest kalmasına olanak sağlarlar. Daha sonra bu kompleksler, hedef genlerin, özellikle inflamatuvar genlerin ekspresyonunu uyaracakları nükleus bölgesine geçiş sağlarlar. IKK'lar (IκB kinazlar a ve b) ve NIK (NF-κB-uyarıcı kinaz), NF-κB komplekslerini aktive eden başlıca protein kinazlardır. NEMO (temel bir NF-κB modülatör) proteini, IκB kinaz (IKK) kompleksinin düzenleyici alt birimidir ve IKK kinaz kompleksinin aktivasyonunu düzenlemektedir (Sebban ve ark., 2006). Memeli NF-κB sistemi, evrim sırasında farklı sinyalleşme formlarına ayrılan eski bir konak savunma sistemini temsil etmektedir (Friedman ve Hughes, 2002). Özellikle, NF-κB sistemi, hem bağışıklık ataklarıyla hem de oksidatif stres, genotoksik stres ve doku yaralanmaları gibi, dış ve iç tehlike sinyallerinin çokluğu ile aktive edilebilen sitoplazmik bir sensördür (Perkins, 2007; Schreck ve ark., 1992; Vallabhapurapu ve Karin, 2009). Savunma görevlerinin bir sonucu olarak, NF-κB sistemi, çeşitli yaşla ilişkili hastalıklarda büyük ölçüde aktive olmaktadır (Kumar ve ark., 2004). Protein karakterizasyonu, eski kemirgenlerin nükleer lizatlarında p52 ve p65 düzeylerinin açıkça arttığını ortaya çıkarmıştır. Diğer çalışmalar, IκK inhibitörlerinin protein seviyelerinin yanı sıra aktive edici kinaz IKKa, IKKb ve NIK düzeylerinin yaşlanmadan etkilenmediğini ortaya çıkarmıştır (Helenius ve ark., 1996a, 1996b; Helenius ve ark., 2001). Çarpıcı bir şekilde, p52 ve p65'in ekspresyon seviyelerinde, yaşlanma sırasında mRNA seviyelerinde artma gözlenmemektedir (Helenius ve ark., 2001). Bu, NF-κB proteinlerinin hücre çekirdeği içerisine girişinin, yaşlanma ile arttığını açıkça ortaya koymuştur. Bunu takiben, NF-κB veya IκB bileşeni mRNA'larının ekspresyon seviyelerinde herhangi bir yaşa bağlı değişiklik saptayamayan birkaç mikrodizi profillemesi çalışması da bu sonucu desteklemektedir. Tüm gözlemler, yaşlanma sürecinin NF-κB komplekslerinin, NF-κB-bağımlı genlerin bir kümesinin transkripsiyonunu güçlendirebilecekleri çekirdeklere tutulmasını indükleyerek aktivasyon seviyesini arttırdığı senaryosunu desteklemektedir. NF-κB sisteminin çok yönlü olduğu göz önünde bulundurulduğunda, yaşa bağlı yanıt, birkaç adımda, yani karmaşık formasyonda, çekirdeklere tutunmada, koaktivatörler ve

baskılayıcılarla etkileşimde ve son olarak da kromatin seviye düzenleme yoluyla gerçekleşebilir.

2.4.1. Yaşlanma sinyalleri NF-KB aktivatörleridir

2.4.1.1. Oksidatif Stres

Serbest radikal kuramı, 1956'da Denham Harman'ın ileri sürdüğü klasik yaşlanma teorisidir (Harman, 1956). Oksijen, aerobik solunuma dayalı yaşamın evrimi sırasında çok önemli bir moleküldür. Bununla birlikte, oksijenin metabolik kullanımı, süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi çeşitli ROS üretebilir. Mitokondrideki oksidatif fosforilasyon, ROS'un başlıca endojen üreticisi olup, bunun yanında 5-lipoksijenaz ve NADPH oksidaz gibi birçok enzim de hücrelerde oksit artıkları üretebilir. ROS, DNA, proteinler ve lipitler ile reaksiyona girebilir ve toksik bileşiklere dönüşebilir. Dahası, son çalışmalar, ROS'un çeşitli sinyal yollarında haberci moleküller olabileceğini ortaya koymuştur (Gloire ve ark., 2006; Nakano ve ark., 2006). Evrim sırasında, ROS'un antioksidatif sistemi olarak adlandırılan kompleks bir detoksifikasyon sistemi, hücrelerdeki oksidatif stresi ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir.

1990'ların başlarında, oksidatif stresi indükleyen tehditlerin aynı zamanda NF-kB sinyalizasyon yolunu aktive ettiği gösterilmiştir (Schreck ve ark., 1992). ROS aracılığıyla oksidatif stresin, NF-kB sisteminin aktivasyonunu çağrıştırabilen tek sinyal olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, sonraki çalışmalar NF-kB sinyalini tetikleyebilen başka mekanizmaların olduğunu da ortaya çıkarmıştır. NF-kB sinyalleşmesinin ROS-güdümlü aktivasyonu, farklı hücre tipleri için oldukça spesifik görünmektedir ve uyarılar arasındaki farklılıkları göstermektedir (Gloire ve ark., 2006). ROS'un, IKK'ların aktivasyonunu içeren klasik yol aracılığıyla NF-kB sinyalini arttırdığı görülmektedir. Wuerzberger-Davis ve ark., oksidatif stresin yanı sıra genotoksik stres ve ısı şokunun, IKK kompleksini aktive eden sumolasyona bağlı NEMO kaskadını tetikleyebileceğini göstermiştir (Wuerzberger-Davis ve ark., 2007). NF-kB sinyalleşmesi, çeşitli antiapoptotik genlerin ekspresyonunu indükleyerek apoptoza karşı da mücadele eder, örn. c-FLIP, Bcl-xL, XIAP (Nakano ve ark., 2006). Sonuç olarak, yaşa bağlı oksidatif stresin hücrelerin apoptotik hücre ölümüne karşı savunması için NF-kB sistemini harekete geçirdiği, diğer taraftan hücre içi problemleri

arttırdığını, diğer bir deyişle hücrelerin kendilerini entropik bir konak savunmasına maruz bırakarak hayatta kalabildiklerini göstermektedir.

2.4.1.2. Genotoksik Stres

Genomik düzensizlik, yaygın rastlantısal bir yaşlanma mekanizması gibi görünmektedir (Lombard ve ark., 2005; Schumacher ve ark., 2008; Vijg ve Suh, 2005). Birçok çalışma, serbest radikallerin ve oksidatif stresin, muhtemelen yaşa bağlı DNA mutasyonlarının en önemli kaynağı olduğunu göstermiştir. DNA hasarı sonrasında ATM (Ataksi Telanjyektazisi Mutasyonlu) ve ATR (ATM ve Rad 3-ilişkili) kinazların aktive edilmesi karmaşık bir konakçı savunma sistemini tetikleyen hücrel homeostaziye korumaya yönelik bir girişimdir (Harrison ve Haber, 2006). Genotoksik stres tarafından tetiklenen başlıca sinyal yolları p53, NF-kB ve PARP-1'dir (Janssens ve Tschopp, 2006; Sancar ve ark., 2004; Schreiber ve ark., 2006). Son zamanlarda, NF-kB sinyalleşmesinin aktivasyonunun DNA hasarı ile uyarılan hücrel özelliklerinden biri olduğu gösterilmiştir (Habraken ve Piette, 2006; Janssens ve Tschopp, 2006; Wu ve Miyamoto, 2007). NEMO proteini, moleküler basamakta merkezi bir role sahiptir ve DNA hasarından sonra NF-kB sinyalleşmesinin aktivasyonunu indükler. Sitoplazmada, NEMO / ATM proteinleri IKK ve ELKS 'ye bağlanır ve böylece NF-kB sinyalini tetikleyen IKK kinazları aktive eder. Genotoksik streste NF-kB aktivasyonunun amacının, p53 ile indüklenen apoptozun önlenmesi olduğu görülmektedir. Bu varsayım, IKK'nin p53 proteinini fosforile edebildiği ve daha sonra proteazomlar tarafından bozunmasını indükleyebildiği gözlemiyle desteklenmektedir (Xia ve ark., 2009).

2.4.1.3. Kalıtsal bağışıklık: PAM'lar ve DAMP'lar

Büyük bir araştırma grubu, yaşlanma sürecinin pro-inflamatuar değişikliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir (de Magalhaes ve ark., 2009; Franceschi ve ark., 2007; Franceschi ve ark., 2000; Salminen ve ark., 2008; Sarkar ve Fisher, 2006). Yaşlanma sırasında adaptif immünite, immünoşenesens denen şeyi açıkça reddeder (Larbi ve ark., 2008). Doğuştan gelen bağışıklık, çok hücreli organizmalarda eski bir konak savunma sistemidir (Danilova, 2006). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, PAMP'lar (patojen-ilişkili moleküler paternler) adı verilen istilacı patojen yapıları ve aynı zamanda tehlike ile ilişkili endojen moleküler paternler olan DAMP'leri de tanır (Bianchi, 2007; Medzhitov ve Janeway, 2000). PAMP'ler ve DAMP'lar, esas olarak NF-kB

sinyalizasyon yoluna bağı olan çeşitli PRR'ler (patern tanıma reseptörleri) tarafından tanınabilmektedir. TLR'ler (Toll benzeri reseptörler), evrimsel olarak korunan bir PRR sistemini temsil etmektedir (Kaisho ve Akira, 2006; Medzhitov ve Janeway, 2000; Trinchieri ve Sher, 2007). TLR sinyalleşmesinin ana yolu, NF-kB sistemine IKKb üzerinden bağlanmaktadır (Kaisho ve Akira, 2006).

2.4.1.4. TNF Super ailesi

Yaşlanma sırasında doğuştan gelen bağışıklığın aktivasyonu, yaşlanma sırasında sitokinlerin çoğunlukla daha yüksek düzeyde olduğu gözlemlenen bir grup inflamatuvar ürün üretir (Bruunsgaard ve ark., 2001; Danilova, 2006; Johnson, 2006; Krabbe ve ark., 2004). Bazı sitokinler NF-kB sinyal yolunu aktive edebilir ve bu şekilde inflamatuvar değişiklikleri çoğaltır ve şiddetlendirir. IL-6 (interlökin-6) ve TNF-a (tümör nekroz faktörü-a), yaşlanmayla açık bir şekilde düzenlenmiştir, ancak yaşlanma sürecindeki tam rolleri, karmaşık, hücre tipi özel fonksiyonlara sahip oldukları için netlik kazanmamıştır (Gupta ve Gollapudi, 2005; Huang ve ark., 2005; Maggio ve ark., 2006). Örneğin, TNF-a, adaptif immüniteyi düzenleyebilir ve immünoşenesens oluşumuna dahil olabilir (Gupta ve Gollapudi, 2005; Huang ve ark., 2005; Larbi ve ark., 2008).

2.4.1.5. İnsulin/IGF Sinyalleşme

Memeli insülin / IGF yolundaki eksiklikler, en azından kemirgenlerde uzamış yaşam süresiyle ilişkili bir cüce fenotipinin görünümüne neden olmaktadır (Bartke ve Brown-Borg, 2004; Brown-Borg, 2009). Bu durum yaşlanma araştırmalarında insülin / IGF paradoksu olarak adlandırılmıştır. İnsülin / IGF paradoksu, ileri yaşlarda aşırı insülin / IGF sinyalleşmesinin yaşlanma sürecini hızlandırabileceğine dikkati çekmektedir. Birçok çalışma, insülin / IGF sinyalinin, IKKa / b kompleksinin aktivasyonu yoluyla NF-kB sistemini uyarabildiğini göstermiştir. Bu sinyal, inflamatuvar yanıtları arttırabilir (Che ve ark., 2002; Iwasaki ve ark., 2009; Martins ve ark., 2009) ve apoptoza direnci destekler (Bertrand ve ark., 1999; Mitsiades ve ark., 2002). İnsülin / IGF-1 reseptörlerinin uzamış yaşam süresi ilişkili sinyalleşmesine PI-3K / AKT yolu aracılık eder. PI-3K / AKT kinazların aktivasyonu FOXO uzamış yaşam süresi faktörünü inhibe eder ancak IKK / NF-kB sinyalini tetikler. Madrid ve ark., AKT kinazın, p65 bileşenine ait transaktivasyon bölgesindeki Ser 529 ve 536 kalıntılarını fosforile eden IKKb ve p38 kinazları aktive edebildiğini göstermiştir. Bu değişiklikler,

NF-kB kompleksinin transaktivasyon verimliliğini açık bir şekilde arttırmaktadır (Madrid ve ark., 2001). Tanaka ve ark., bir AKT kinaz olan PDK1'in aktivasyonunun ayrıca IKKb kinaz'ı aktive edip NF-kB sinyalini tetiklediğini ortaya çıkarmıştır (Tanaka ve ark., 2005).

2.4.1.6. Protein modifikasyonları: Asetilasyon ve O-glikozilasyon

NF-kB sinyal yolunun temel bileşenlerinin birkaç post-translasyonel modifikasyonu, yolun aktivasyonunu tetikleyebilir, aynı zamanda NF-kB sisteminin transkripsiyonel verimliliğini de düzenleyebilir (Perkins, 2006). Fosforilasyon ve ubiquitinasyon aktivasyon aşamasında başlıca düzenleyici modifikasyonlardır, ancak asetilasyon ve O-glikozilasyon NF-kB'ye bağlı transkripsiyonun etkinliğini kontrol edebilir (Calao ve ark., 2008; Chen ve Greene, 2003; Perkins, 2006). Yaşlanma ile ilgili olarak, asetilasyon ve O-glikozilasyon, stres sırasında NF-kB sinyalini arttıran önemli modifikasyonlar gibi görünmektedir.

2.4.2. Uzun Ömür Faktörleri NF-kB Sinyalleşmesini İnhibe Eder

2.4.2.1. p53

P53 tümör baskılayıcı protein, hem kanser hem de yaşlanma sürecinde önemli bir role sahiptir, ancak organizmanın yaşlanmasındaki işlevi açıklığa kavuşturulamamıştır (Campisi, 2005; Papazoglu ve Mills, 2007). P53 proteini, karmaşık sinyal yolları ağında yer alan ve çeşitli fonksiyonların bütünlüğünü -genom stabilitesi, DNA onarımı ve mitokondriyal metabolizma- önemli bir proteindir (Chumakov, 2007; Olovnikov ve ark., 2009). Ayrıca hücre yaşlanma ve apoptotik hücre ölümlerinin düzenlenmesinde de yer alır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, enerji metabolizmasında, özellikle mitokondriyal solunum ve glikolizin dengelenmesinde önemli rolünün altını çizmiştir (Bensaad ve Vousden, 2007; Ma ve ark., 2007). Birçok çalışma, metabolik hızın maksimum yaşam süresinin düzenlenmesinde önemli bir parametre olduğunu, yani daha yüksek bir metabolik hızın daha kısa bir yaşam süresine dönüştüğünü göstermiştir (Hulbert ve ark., 2007).

2.4.2.2. Isı şok proteinleri (HSP)

Strese karşı artmış direnç, tüm uzun ömürlü mutantların, *C. elegans*, *Drosophila* ve hatta fareler vb. özelliklerinden biridir (Johnson ve ark., 2000; Munoz, 2003;

Murakami, 2006; Vermeulen ve Loeschcke, 2007). Moleküler şaperonların, özellikle de HSP'lerin, uzun ömürlülüğü arttıran stres direnci özelliklerini geliştirdikleri gösterilmiştir (Hsu ve ark., 2003; Morley ve Morimoto, 2004; Munoz, 2003; Murakami, 2006; Soti ve Csermely, 2000). Etki, dokuya özgü olsa da, en azından memelilerde, HSP yanıtlarının yaşlanma sırasında açıkça azaldığı iyi bilinmektedir. Memeli HSP sistemi HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük HSP'lerin ailelerini içermektedir (Jolly ve Morimoto, 2000). Hücresel streste, HSP'ler protein denatürasyonunu ve agregasyonunu önleyebilir ve stres sonrası proteinin yeniden katlama işlemine yardımcı olabilir. Birçok çalışma, hücresel HSP seviyelerinin yükselmesini içeren hücresel stresin, NF-kB aracılı inflamatuvar tepkileri baskılayabildiğini göstermiştir (Chen ve ark., 2007; DeMeester ve ark., 2001; Malhotra ve Wong, 2002). Agou ve ark. ve Ran ve ark., HSP70'in IKK kompleksinin NEMO düzenleyici birimine (IKKg) bağlanabildiğini ve NEMO proteinlerinin oligomerizasyonunu bozduğunu ve bu şekilde aktif IKK kompleksinin oluşumunu bozduğunu göstermişlerdir (Agou ve ark., 2002; Ran ve ark., 2004). Yine Weiss ve ark., IKK kompleksindeki HSP70'in varlığının, IκBa proteininin fosforilasyonunu ve proteazomal bozulmasını ve sonuç olarak NF-kB sinyalini önleyebildiğini gözlemlemiştir (Weiss ve ark., 2007). Ayrıca, HSP70 ekspresyonunun sıçanlarda sepsis kaynaklı akut respiratuvar distres sendromuna karşı koruyabildiğini de göstermişlerdir. Küçük bir HSP proteini olan HSP27'nin, IKK kompleksine bağlanabildiği ve NF-kB sinyalini aktive etme kapasitesini önleyebildiği de bilinmektedir (Park ve ark., 2003).

2.4.2.3. Mikro RNA'lar

İnsanlarda miRNA'lar, protein kodlayan genlerin %30'una kadarının transkripsiyon sonrası kontrolünde kilit bir role sahip olan ve gelişim ve yetişkin yaşamı sırasında birçok hücresel işlemi düzenleyen yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA'lardır. MikroRNA'lar, meme kanseri hücrelerinde kendini yenileme ve tümör oluşumu (Yu ve ark., 2007) ve aynı zamanda invazyon ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli hücre süreçlerini düzenlemektedirler (Ma ve ark., 2007; Tavazoie ve ark., 2008).

Kanonik miRNA biyogenez yolu nükleusta başlar (van Schooneveld ve ark., 2015). MiRNA'lar ilk olarak primer RNA'lar oluşturmak üzere pri-miRNA'lar (uzun miRNA öncüleri) olarak adlandırılan yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki transkriptler

olarak RNA polimeraz II tarafından kopyalanıp, DROSHA RNaz III enzimi tarafından işlenerek öncü primer miRNA haline getirilirler (Smith-Vikos ve Slack, 2012). Son olarak, dubleksin iki şeridi, Dicer-TRBP kompleksi ile birbirinden ayrılır. Daha sonra spesifik miRNA'lar, komplementer olarak Argonaute proteini ve hedef mRNA'dan oluşan RNA kaynaklı susturucu kompleksine (RISC) bağlanır. Sonuç olarak, hedef mRNA'ların translasyonu, translasyonel susturma ile bastırılır (Bullrich ve ark., 2001; Jung ve Suh, 2014; Smith-Vikos ve Slack, 2012). Son araştırmalar, miRNA'ların, spesifik hedef genleri ile çoklu ilişki içinde işlev gösterdiğini göstermiştir. Bu nedenle, belirli bir miRNA, bin mRNA'ya kadar olan ekspresyonu düzenleyebilir ve spesifik bir mRNA, çok sayıda miRNA'lar tarafından koordine edilebilir, bu da, miRNA'ların yaşlanma, inflamasyon ve kanser süreçlerindeki etkileşiminin karmaşık olduğunu göstermektedir (Huang ve ark., 2014). MikroRNA'lar, doğrudan ve dolaylı olarak insan uzun yaşam ağı (Human Longevity Network) üzerinden yaşlanma ve tümör oluşumunu birbirine bağlar (Huang ve ark., 2014; Lee ve Calin, 2011). Ayrıca, mayadan fareye, hücrel yaşlanma genlerinin evrimsel korunum paterni, kanserle ilişkili genleriyle hemen hemen aynıdır, bu benzerlik, bu iki süreç arasındaki ortak hedefin bir sonucudur. Yine, hücrel yaşlanma, malign transformasyon için risk altında kalan hücrelerin tutulduğu bir moleküler programın tümör destekleyici mekanizması olarak düşünülebilir. Hücrel yaşlanma, uzun ömürlülük ve kanser genleri miRNA'lar aracılığıyla bağlanabilir. 39 miRNA'nın hedefi olan 40 hücrel yaşlanma geni saptanmıştır. Bu miRNA'lardan birçoğunun (miR-21, MiR-17, miR-29b dahil), diğer yaşla ilişkili hastalıklar ve uzun sağ kalım ile ilişkili olan kanserlerle ilgili hedefleri vardır (Bullrich ve ark., 2001; Huang ve ark., 2014; Piano ve Titorenko, 2015; Smith-Vikos ve Slack, 2012; van Schooneveld ve ark., 2015). Araştırmacılar, kanser (oncomiRs), inflamasyon (inflammamiR'ler) ve yaşlanma (SA-miR'ler) ile ilişkili olabilecek miRNA'ları rapor etmişlerdir. Bunlardan üçü, yani miR-21, miR-126 ve miR-146a ve bunların hedef mRNA'ları, yaşa bağlı hastalıklarda pro-inflamatuar durumun ana modülatörü olan NF-kB yolağının bir parçasıdır (Bonafe ve Olivieri, 2015; Olivieri ve ark., 2013; Sikora ve ark., 2010; Sood ve ark., 2015). Örneğin, invaziv meme tümörlerinde yüksek seviyelerde miR-21 eksprese edilir. MiR-21 hedefleri arasında iki tümör baskılayıcı vardır: tropomiyosin I ve fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), ve bunlara ek olarak baskılama, invazyon ve metastaz yapan proteinler: programlanmış hücre ölüm 4 proteini (PDCD4) ve maspin (Chen ve ark., 2015; LeBlanc ve Morin,

2015; Qi ve ark., 2009). Kanser hücrelerinde, tüm bu proteinler yüksek düzeyde Mir-21 tarafından inhibe edilirken, bu miRNA'nın inhibisyonu tümör hücrelerinin büyüme, göç ve invazyonunun azaltılmasında ters etkiye sahiptir (Fatima ve ark., 2015). Son zamanlarda miR-146a'nın doğal immün yanıtın modülasyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Labbaye ve Testa, 2012). Çeşitli çalışmalar meme kanserinde NF-kB / miR-146a'nın artmış regülasyonunun hastalık patogeneziyle ilgisini göstermiştir. Ek olarak, hücrel yaşlanmanın pro-inflamatuar etkilerine karşı koymak suretiyle miR-146, anti-inflamatuar ve genel baskılayıcı etki sağlar (Olivieri ve ark., 2013).

2.4.3. Kalori kısıtlaması, uzun ömür faktörleri ve NF-kB Sinyalleşmesi

Kalorik kısıtlama (KK), memelilerde, özellikle de kemirgenlerde yaşam süresini uzatmanın en etkili yoludur (Bishop ve Guarente, 2007; Weindruch, 1996). KK'nın ayrıca IKK / NF-kB sinyalizasyon yolunun aktivasyonunu da azaltabildiğini gösteren yeni kanıtlar vardır. Sonuç olarak KK'nın vücutta bir stres tepkisi oluşturduğu ve uzun ömürlü faktörlerin NF-kB sinyalleşmesinin inhibisyonu dahil olmak üzere stres direncini indükleyebileceği ve bu şekilde yaşa bağlı inflammatuar ve dejeneratif değişikliklerin önlenebileceği düşünülmektedir.

2.4.4. Bir sağ kalım faktörü: NF-KB Sinyalleşmesi

NF-kB sistemi, hem yararlı hem de zararlı geri dönüşleri olan, zıt etkiler gösteren bir pleiotropik regülatördür. Ana fonksiyonu, doğuştan gelen bağışıklık reaksiyonlarına ve apoptotik hücre ölümüne neden olabilecek doku hasarına karşı güçlü bir koruma sağlamaktır (Dutta ve ark., 2006; Karin ve Lin, 2002). NF-kB sistemi, IAP'lerin (apoptoz inhibitörü) ve JNK sinyalinin inhibitörü Gadd45b gibi çeşitli sağ kalım genlerinin ekspresyonunu aktive edebilir (van Uden ve ark., 2008). HIF-1, glikolitik enerji üretimini ve glikozitik enerji üretimini artıran ve bu şekilde farklı patolojik durumlarda dokuların hayatta kalmasını arttıran glikolitik enzimlerin ve glikoz taşıyıcıların ekspresyonunun güçlü bir indükleyicisidir (Marin-Hernandez ve ark., 2009). Genel olarak, geçici NF-kB sinyalleşmesinin yararlı etkileri olduğu, ancak aşırı ve / veya uzun süreli aktivasyonun zararlı etkilere yol açtığı görülmektedir. IκB protein ekspresyonunun indüksiyonu iyi bilinen bir mekanizmadır, ancak NF-kB aktivasyonu aynı zamanda NF-kB komplekslerinin aktivasyonunu inhibe eden A20 ve Cezanne gibi

deubikutinleştirici enzimlerin transkripsiyonunu da indükleyebilir (Coornaert ve ark., 2009; Enesa ve ark., 2008).

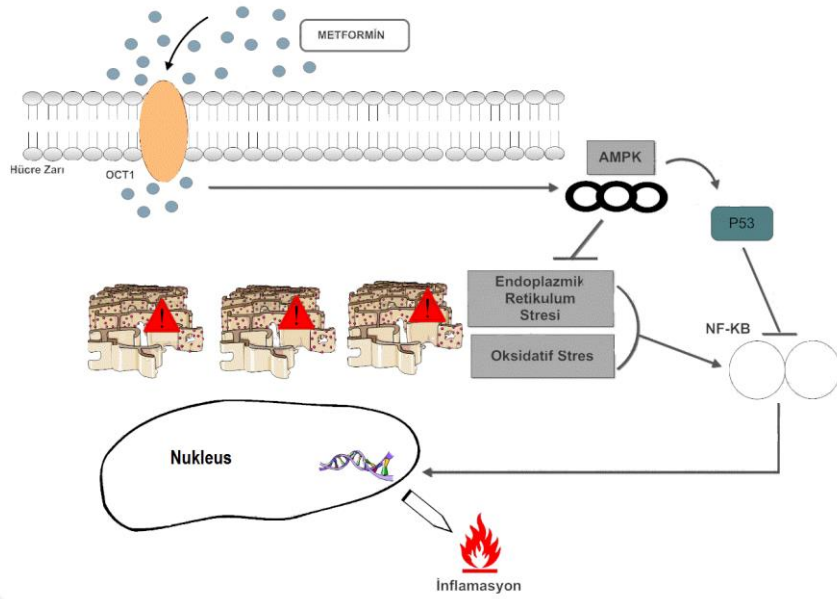
2.5. Metformin ve Kanser

2.5.1. Neden Metformin ve Kanser?

Bir biguanid olan metformin, on yıllardır T2DM için ilk basamak tedavi olan ve en yaygın olarak reçete edilen bir anti-hiperglisemik ajandır. 40 yıl boyunca anti-diyabetik olarak yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, memelilerdeki antikanser etkisini ilk kez gösteren rapor 2001'de yayınlanmıştır (Schneider ve ark., 2001) ve yine metformin ile tedavi edilen T2DM hastalarında azalmış kanser riskinin gösterildiği ilk rapor sadece 13 yıl önce yayınlanmıştır (Evans ve ark., 2005). Amerikan Diyabet Derneği ve Amerikan Kanser Derneği konsensüs raporuna göre diyabet hastalarında diyabet olmayanlara karşın göreceli risk karaciğer, pankreas ve endometriyum kanserleri için yaklaşık iki kat veya daha yüksek iken; kolon, rektum, meme ve mesane kanserleri için yaklaşık 1.2-1.5 kat olarak bildirilmiştir (Giovannucci ve ark., 2010). Klinik gözlemler yeni tanı konmuş kanser hastalarında diyabet prevalansının % 8 ile % 18 arasında değiştiğini ve bu iki hastalık arasında çift yönlü bir ilişki olduğunu göstermektedir (Barone ve ark., 2010; Richardson ve Pollack, 2005). Diyabet ve kanser ilişkisi ilk olarak 1932'de rastlantısal bir bulgu olarak bildirilmiştir (Smith ve Gale, 2009). Günümüzde bu birliktelik iyi bilinmektedir, ancak yoğun çalışmalara rağmen mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır. T2DM ve kanserin yaşlanma, cinsiyet, obezite, fiziksel hareketsizlik, diyet, alkol ve sigara içimi gibi bazı potansiyel risk faktörlerini paylaştığı konusunda genel bir kanı vardır. T2DM'de insülin direnci ve hiperinsülinemi, kanser gelişimi için bağımsız risk faktörleri olarak kabul edilir (Azar ve Lyons, 2010; Smith ve Gale, 2010). Ek olarak, hiperglisemi ile ilişkili oksidatif stres, ileri glikolizasyon son ürünlerinin birikimi ve düşük dereceli inflamasyon da malign transformasyon riskini artırabilir (Azar ve Lyons, 2010; Drzewoski ve ark., 2011) Çok sayıda prelinik, epidemiyolojik ve klinik çalışmanın sonuçları, metformin kullanımının, diğer hipoglisemik ilaçların kullanıcılarıyla karşılaştırıldığında kanser hücre büyümesinin ve tüm kanser vakalarında proliferasyonun önlenmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

2.5.2. Metforminin Anti-diyabetik Ajan olarak Etki Mekanizması

Metforminin bir antihiperглиsemik ilaç olarak etki mekanizmasını açıklayan ilk hipotez, kas tarafından glikoz alımının uyarılması üzerine kurulmuştur (Klip ve Leiter, 1990). Metforminin antidiyabetik ajan olarak birincil etkisinin, glukoneogenez inhibisyonunun bir sonucu olarak hepatik glukoz üretimini azaltmak olduğu yönündeki giderek artan kanıtlar mevcuttur (Song ve ark., 2001). Ayrıca, birkaç rapor metformin uygulamasının karaciğerdeki ATP ve ATP / ADP oranında bir azalmaya yol açtığını ve bunun da hücrel biyoenerjide bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir (Argaud ve ark., 1993; Hawley ve ark., 2010). Moleküler düzeyde, metforminin en çok tarif edilen etkisi, elektron transport zincirinin ilk bileşeni olan mitokondriyal kompleks I (NADH ubiquinone oxidoreductase) inhibisyonudur (Drahota ve ark., 2014). Metformin ile kompleks I inhibisyonu, mitokondriyal solunumu kesintiye uğratar, protonla uyarılan ATP üretiminde bir azalmaya neden olur ve bu durum sonuç olarak AMP / ATP oranında bir enerji stresine ve azalmaya neden olabilmektedir. Son yıllarda, AMP / ATP oranının azalmasının AMP ile aktive olan protein kinazı (AMPK) uyardığı ve bu enzimin bu nedenle metforminin glikoz düşürücü etkisinin önemli bir sensörü ve aracı olduğu düşünülmüştür (Ouyang ve ark., 2011; G. Zhou ve ark., 2001). Kasta AMPK aktivasyonu da glikoz tüketimini artırabilir ve hepatik AMPK aktivasyonu glukoneogenezini inhibe ederken glikolizi aktive edebilir (Hardie ve Alessi, 2013). Metforminin bu etkilerinin her ikisi de kan şekerini düşürebilir ve tip II diyabette anti-hiperглиsemik etkiye katkıda bulunabilir. AMPK-dan bağımsız olan mekanizmaya göre ise metformin, glukagon-bağımlı siklik AMP (cAMP) sinyalleşmesi ile antagonize edilebilir (Miller ve ark., 2013). Bu şekilde, metformin adenilil siklazın glukagon aktivasyonunu ve sonuç olarak cAMP üretimini bozarak cAMP'ye bağlı protein kinazın (PKA) aktivasyonunu inhibe eder. PKA aktivasyonu, fruktoz-2,6, -bisfosfat seviyelerini düşürür, böylece karaciğerde glukoneogenezini ve kan glikoz seviyelerini arttırır (Cao ve ark., 2014) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Metforminin taşınması ve AMPK-p53 ve NFκB ilişkisi

2.5.3. Metforminin Kanser Hücresi Biyoenerjisindeki Etki Mekanizması

Metforminin kanser hücrelerinde mitokondriyal kompleks I'ı inhibe ettiği gösterilmiş olmasına rağmen, metformin ile NADPH redüktaz arasındaki etkileşimin bugüne kadar moleküler bir tanımı yoktur. Metformin, izole mitokondride oksijen tüketimini süksinat gibi kompleks II substratların varlığında değil yalnızca kompleks I substratların (malat ve piruvat) varlığında inhibe eder (Andrzejewski ve ark., 2014). Metforminin etkilerinde kompleks I'in rolüyle ilgili Wheaton ve ark. metforminin kolon kanseri hücrelerinde antiproliferatif bir etki yaptığını, ancak *Saccharomyces cerevisiae*'den metformine dirençli bir NADH redüktazın (NDI1) aşırı ekspres edildiğinde bu etkinin ortadan kalktığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar, NDI1 proteinini aşırı ifade eden farelerde de doğrulanmıştır (Wheaton ve ark., 2014). Enerjik bir dengesizliğe katkıda bulunmanın yanı sıra, mitokondriyal kompleks I'in inhibisyonu, insülin / insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) sinyalleşmesinde bir azalmayla ve rapamisin'in memeli hedefinin (mTOR) inhibisyonuyla, AMPK aktivasyonu ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimindeki azalma ve ilişkili DNA hasarı ile ilişkilendirilmiştir (Algire ve ark., 2012; Gandini ve ark., 2014; Gwinn ve ark., 2008; Memmott ve ark., 2010). AMPK ve mTOR sinyalleşmesi, tümör proliferasyonunda merkezi bir rol üstlenir (Faubert ve ark., 2015) ve meme kanseri (Dowling ve ark., 2007; Guo ve ark.,

2015), özofagus kanseri (Honjo ve ark., 2014), pankreatik kanser (Nair ve ark., 2014) ve mide kanseri (Han ve ark., 2015) gibi kanserlerdeki metformin aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Katı tümörlerin ana ve iyi bilinen özelliklerinin, hem glukoz hem de oksijenin varlığını etkileyen ve tümör hücrelerinin habis fenotipini arttıran vaskülarizasyonda bir azalma olduğu unutulmamalıdır. Moleküler olarak, hipoksi ile indüklenebilir faktörlerin (HIF'ler) stabilizasyonu, düşük oksijen ortamına adaptasyona izin veren metabolik değişikliklerin kabul görmesi önemli bir adımdır. Sonuç olarak, HIF'lerin aktivasyonu (HIF-1a gibi) birkaç kanser türünde bildirilmiştir (Maftouh ve ark., 2014; Xiong ve ark., 2015; Yoshida ve ark., 2009). Bu ortamda metforminin kısa süre önce hipoksi ile indüklenen HIF-1a stabilizasyonunu ve tümör hücrelerinde HIF hedef genlerinin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Wheaton ve ark., 2014). Bu etkiler, metforminin, hipoksik koşullar altında hayatta kalmak için HIF sinyaline bağımlı olan kanserlerde de terapötik bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

2.5.4. Metformin: Bir anti-metabolit ilaç

Folat metabolizması kemoterapötik ilaçlar için önemli bir hedef olarak vurgulanmıştır. Kanser hücrelerinde folat metabolizması, nükleotid sentezi, metionin döngüsü, glutatyon sentezi, poliamin metabolizması ve diğer metabolik yolları bütünleştiren “tek karbonlu” metabolizmayla tümör hücresi sağkalımı ve / veya kemoterapide direnç için önemli süreçleri içerir (Locasale, 2013). Metformin ve folat metabolizması değişiklikleri arasındaki ilişki, metformin ile uzun dönem tedavi edilen T2DM olan hastalarda homosistein artışı ve folat ve B12 vitamini düşüşünü bildiren çeşitli çalışmalara üzerine kurulmuştur (Aarsand ve Carlsen, 1998; de Jager ve ark., 2010; Ham ve ark., 2014; Ko ve ark., 2014; Sahin ve ark., 2007). Homosistein, folat metabolizmasına, bir metil grubu donörü olan 5-metil-tetrahidrofolat ve ana kofaktör olarak B12 vitaminini kullanarak, homosisteini metile eden bir enzim olan metionin sentazın etkisi ile bağlıdır (Locasale, 2013). Ancak, folat metabolizması ile metforminin antitümör etkisi arasındaki ilişki henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. 2012 yılında Corominas-Faja ve ark. metformin, meme kanseri hücrelerinde (MCF-7, BT-474 ve MDA-MB-231 hücre dizileri) folat metabolizmasını değiştirdiğini, son sitotoksik etki olarak da timidin ve purin nükleotidlerinin de novo sentezinin inhibisyonunu indüklediğini bildirmiştir (Corominas-Faja ve ark., 2012). Bu folat metabolizması değişikliği de glutatyon sentezinde azalma ile bağlantılıdır. Kanser hücrelerindeki

metformin, aynı zamanda, homosistein birikimini de arttırmakta, ancak indirgenmiş glutatyon düzeylerini ve bu tiyolün disülfid formunu azaltmaktadır (Corominas-Faja ve ark., 2012). Bu sonuçlardan sonra Janzer ve ark. metformin ile tedavi edilen meme kanseri kök hücreleri (KKH'ler), homosistein seviyelerinde bir artış ve trifosfat nükleotidlerinde HPLC / MS ile ölçüldüğü üzere önemli bir düşüş göstermişlerdir. İlginç bir şekilde, KKH'lerde metformin glikolitik ara ürünleri veya trikarboksilik asit döngü ürünlerini değiştirmez, bu durum da hücrelerde mitokondri homeostazında bir değişiklik olmadığını göstermektedir (Janzer ve ark., 2014). Ek olarak Cioce ve ark. kemoterapiye dirençli meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, BT-474 ve SUM 159 hücre çizgilerinden türetilen) kültür ortamının metabolit profilini değerlendirmiş ve metformin ile tedavi edilen hücrelerden alınan kültür ortamının azalmış hücre içi glutatyon seviyelerine paralel olarak daha yüksek seviyelerde piroglutamat içerdiği gösterilmiştir (Cioce ve ark., 2014).

2.5.5. Metforminin Taşınması

SLC22 ailesindeki birçok taşıyıcı gibi organik katyon taşıyıcıları (OCT), 12 alfa-heliks transmembran domaini (TMD'ler), bir hücre içi N terminali, bir hücre içi C terminali, TMD 1 ve 2 arasında bulunan geniş glikozile olmuş hücre dışı bir ilmek ve TMD 6 ve 7 arasında fosforilasyon bölgeleri olan hücre içi büyük bir ilmek bulunan tahmini bir membran topolojisine sahiptir. OCT'ler dengeleyici taşıyıcılardır. Katyonların bu taşıyıcılar tarafından translokasyonu da elektrojeniktir. Böylece, membran potansiyeli konsantrasyon gradyanına ek olarak bir itici güç olarak etki edebilmektedir. Çok çeşitli moleküler yapılarla çok çeşitli substratları translokasyona uğrattırılır ve benzer şekilde, translokasyon yapılmadan taşıyıcılar ile etkileşime girebilen çok sayıda bileşik tarafından da inhibe edilebilirler (Volk ve ark., 2009). OCT1, kromozom 6.q26-7 bölgesinde bulunan, 11 ekson ve 10 intron içeren SLC22A1 geni tarafından kodlanır (Koepsell ve ark., 2007). OCT1 proteini çoğunlukla epitel hücrelerinde eksprese edilir. Doku dağılımı ile ilgili olarak, OCT1 esas olarak hepatositlerin sinüzoidal membranında yer aldığı karaciğerde eksprese edilir (Nies ve ark., 2009). OCT1 ayrıca, akciğer, bronş epitel hücrelerinin lümen membranında; kalp; iskelet kası; mikrodamarların endotel hücrelerinde beyin; plasenta; meme bezi; böbreküstü bezi; göz, korneada ve kan retina bariyerinde; yağ dokusu,bağışıklık hücreleri ve ince bağırsak dahil çok çeşitli doku ve organlarda da ifade edilir (Gilchrist

ve Alcorn, 2010; Han ve ark., 2013; Jonker ve Schinkel, 2004; Koepsell ve ark., 2007; Lin ve ark., 2010; Minuesa ve ark., 2008; Moreno-Navarrete ve ark., 2011; Nishimura ve Naito, 2005; Zhang ve ark., 2008). Tümörlerde de OCT1 ekspresyonunun etkisi geniş ölçüde bilinmektedir (Gupta ve ark., 2012; Koepsell ve ark., 2007; More ve ark., 2010; Schaeffeler ve ark., 2011), ancak bazı vakalarda karaciğer kanseri için son zamanlarda gösterildiği gibi, ekspresyon seviyeleri çevredeki normal doku ile karşılaştırıldığında azalmış olarak rapor edilmiştir (Martinez-Becerra ve ark., 2012). Metformin hidrofilik yapıda (pH 6.0'da 26.13 logD) ve tüm fizyolojik pH değerlerinde elektriksel olarak yüklü (pKa 12.4) bir ajandır (Schaeffeler ve ark., 2011). Bu nedenle, hücre zarı boyunca pasif difüzyon yaparak hücreye giremez ve hücre içi hedef olan AMPK'yi harekete geçirebileceği hücreye girmek için katyon seçici taşıyıcılara ihtiyaç duymaktadır (Martinez-Becerra ve ark., 2012). Organik katyon taşıyıcılar (OCT) (SLC22A1-3), plazma monoamin taşıyıcı (PMAT) (SLC29A4) ve çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyon proteinleri (MATE1 ve 2) (SLC47A1 ve SLC47A2) gibi taşıma proteinleri, bağırsak, karaciğer ve böbrek gibi farklı organlarda metformin trafiğini kolaylaştırır (Giacomini ve ark., 2010; Tachampa ve ark., 2008). Karaciğerde, metformin, ağırlıklı olarak OCT1 yoluyla hepatositlere alınır ve böylece bu taşıyıcı, metforminin antidiyabetik etkisinde kritik bir rol oynar.

2.5.6. Metforminin diğer mekanizmaları

Hepatoselüler karsinomda, metformin, siklin D1 ve siklin E (Miyoshi ve ark., 2014; Qu ve ark., 2012) gibi hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin modülasyonu yoluyla hem *in vitro* hem de *in vivo* bir inhibitör etki gösterir. Ek olarak, c-MYC geninin karsinogenezin bir pivotal aracı olduğu öne sürülen HCC'lerde (Blandino ve ark., 2012), metformin tedavisinin tümör süpresörü let-7 ailesi üyeleri mikroRNA'ları up-regüle ederek *in vitro* c-MYC ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Miyoshi ve ark., 2014).

2.5.7. Metforminin In vitro ve In vivo Etkisi: Konsantrasyon Problemi

Metforminin etki tarzını açıklamayı amaçlayan *in vitro* deneylerle ilgili en yaygın eleştiri kullanılan konsantrasyondur. Metformin plazma konsantrasyonunun farmakokinetik analizleri, 3 gr / gün (terapötiklerde izin verilen maksimum doz) düzenli bir uygulamadan sonra ortalama konsantrasyonun yaklaşık 1.5 mg / L olduğunu ortaya

çıkarmıştır; metforminin molekül ağırlığı (129.2 g / mol) dikkate alındığında, plazmadaki ortalama molar konsantrasyon yaklaşık olarak 11 uM'dir (Duong ve ark., 2013; Graham ve ark., 2011). Bununla birlikte, metforminin mitokondriyal aktivitesini araştıran deneyler, insanlarda plazma konsantrasyonlarından en az 50 kat daha fazla olan, 0.5 ila 10 mM'lik konsantrasyonları kullanmıştır (Algire ve ark., 2012; Andrzejewski ve ark., 2014; Menendez ve ark., 2012; Wheaton ve ark., 2014; Zakikhani ve ark., 2006; Zhuang ve ark., 2014). Ek olarak, bazı raporlar ilacın antifolat aktivitesinin de plazma konsantrasyonundan daha büyük olan 0.3 ve 1 mM konsantrasyonlarda gözlemlendiğine dair kanıtlar sağlamaktadır (Cioce ve ark., 2014; Corominas-Faja ve ark., 2012; Janzer ve ark., 2014). In vitro ve in vivo verilerden kaynaklanan bir başka endişe, kültür ortamındaki glikozun metformin metabolizmasına müdahale edebileceğidir. Gözden geçirilen çalışmaların çoğunda, sırasıyla 24 ve 17.5 mM glukoz içeren kültür ortamı olarak DMEM veya DMEM / F12 kullanılmıştır; bununla birlikte, plazmadaki normal glukoz konsantrasyonu aralığı 7 mM'nin altındadır. Bu bağlamda, Zhuang ve ark. metforminin sitotoksik etkisinin düşük glikoz ortamında güçlü olduğunu kanıtlamıştır, bu da in vitro deneylerde yüksek bir metformin konsantrasyonunun gerekliliğinin, glikozun uyguladığı maskeleyme etkisine bağlı olduğunu göstermekte böylece bu deneylerde elde edilen verilerin geçersiz olmadığını göstermektedir (Zhuang ve ark., 2014).

Bir çalışmada kullanılan metformin konsantrasyonları, metformin tedavisi altındaki diyabetiklerde metformin serum düzeylerine göre 1000 kat daha yüksek olarak rapor edilmiştir (Frid ve ark., 2010). Başka bir çalışmada ise prostat kanseri hücrelerini inhibe etmek için de yine benzer metformin dozları (5 mM) uygulanmıştır (Ben Sahra ve ark., 2008). Bununla birlikte, bir in vivo xenograft modelinde, aynı yazarlar, hastalar için kullanılan aynı metformin dozu ile prostat kanseri hücre büyümesinin güçlü bir şekilde durdurulduğunu rapor etmişlerdir. Yine başka bir klinik çalışmada, kolorektal epitelyal proliferasyonu baskılamak için daha düşük bir metformin dozunun (250 mg / d) yeterli olduğu bildirilmiştir (Hosono ve ark., 2010). Bu veriler, in vitro olarak kullanılan metforminin supratherapötik dozlarının, in vivo olarak metforminin proliferasyonu durdurma etkisini elde etmek için zorunlu olmadığını düşündürmektedir.

Aslında, anti-diyabetik biguanid metforminin in vitro kültüre edilmiş kanser hücrelerinde hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe etme kabiliyeti, çoğunlukla

milimolar aralıkta yeterli olmaktadır (Martin-Castillo ve ark., 2010; Vazquez-Martin ve ark., 2010). Yine, son derece yüksek miktarda büyüme faktörü ve glukoz içeren kültür ortamlarında rutin olarak çoğaltılan tümör hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmek için metforminin millimolar konsantrasyonları kullanılmaktadır. Çoğu sağlıklı, diyabetik olmayan yetişkinler 5 mmol / L civarında açlık glukoz seviyelerini korurken, ortalama doku kültür ortamı 10 ila 25 mmol / L arasında ve ayrıca insülin açısından zengin fetal sığır serumu (% 5-10 v / v) arasında glukoz konsantrasyonlarına sahiptir. Glukoz seviyeleri sırasıyla metabolik sendrom ve diyabetik hastalarda 7 mmol / L ile 10 mmol / L arasında değiştiğinden ve bir konak yanıtı in vitro olarak kabul edilemediğinden, birçok bilim adamı çoğu durumda sezgisel dozda birleşmekte, doğrudan (insülin bağımsız) metformin etkilerinin, kanser hastalarının klinik durumları ile ilişkili olmayacağını düşünmektedir (Bonanni ve ark., 2012; Dowling ve ark., 2012; Kourelis ve Siegel, 2012; Martin ve Marais, 2012).

2.6. Proteomik Analizi

30 yılı aşkın bir süredir, kütle spektrometresi (MS) ve moleküler tekniklerdeki ilerlemeler neticesinde protein çalışmaları gelişim göstermiştir ve proteomiks bilimsel araştırmalar için etkili bir araç olarak kabul edilmiştir (Mishra, 2011; SS, 2008). Proteomun incelenmesi, daha önce oluşturulmuş veri tabanlarındaki sonuçların karşılaştırılması yoluyla proteinlerin yapısını, işlevini ve birbirleriyle olan etkileşimlerini ortaya çıkarmakta ve yeni proteinlerin ve sinyal mekanizmalarının tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (Mishra, 2011). Proteomik çalışmaları ile hücrelerdeki bütün proteinlerin tanımlanması, karşılıklı etkileşim ve yolak analizleriyle kanserlerin erken evrede yakalanabilmesi ve önleyici biyomarkerların saptanması mümkün olabilmektedir (Al-Zaidan ve ark., 2017).

2.6.1. Meme Kanseri ve Proteomiks

Birçok çalışmayla birlikte proteomiks tabanlı çalışmalar yardımıyla meme kanserinin moleküler biyolojisi de detaylandırılmaya çalışılmaktadır.

Proteomiks ve meme kanseri ile ilgili, Al Zaidan ve ark.'nin yaptığı meme kanseri için güvenli ve alternatif tedavi seçenekleri keşfetmek olan proteomiks bazlı çalışmada meme kanserine özgü, biyobelirteç olarak da kullanılabilecek proteinler saptanmıştır (Sacco ve ark., 2016). Yine Sacco ve ark., metformin kullanımının hücre

proliferasyonu üzerinde etkisinin olduğunu derin proteomiks verilerini kullanarak göstermişlerdir (Mi ve ark., 2017). Hastalara ait örneklerden üretilen primer hücre kültürlerinde yapılan proteomiks çalışmasıyla ortaya konulacak hedef proteinler meme kanserine erken evrede tanı konulmasına, hastalığın ilerleyişini önlemeye, hastalık patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve daha geniş bir tabirle tedavi alternatifleri adına yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

2.6.1.1. Çalışmada anlamlı olarak saptanan proteinler

Hastalara ait tümör ve non-tümoral primer kültürleri arasında istatistiksel anlamlılık farklılık gösteren, MALDI TOF/TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry) analizine tabi tutulan protein spotlarında tanımlanan proteinlerin aşağıda verilmiştir.

A. GARS

Glisil-tRNA sentetazı olup Glisinin tRNA'ya bağlanmasını katalize eder. Ayrıca hücre düzenleme yolları için gerekli olan evrensel bir pleiotropik sinyal molekülü olan diadenosin tetraposfat (Ap4A) üretebilir (UNIPROT ID: P41250). GARS ile etkileşen proteinlerden;

EPRS-glutamil-prolil-tRNA sentetazı; iki aşamalı bir reaksiyonda kognat amino asitin karşılık gelen tRNA'ya bağlanmasını katalize eder. İnflamasyon işlemlerinde interferon-gama kaynaklı transkript-selektif translasyon inhibisyonuna aracılık eden GAIT (gama interferon-aktive edici inhibitör inhibitörü) kompleksinin bileşenidir. 1512 amino asit uzunluğundadır.

IARS-İzolusil-tRNA sentetaz 1262 amino asit uzunluğundadır.

AARS-Alanil-tRNA sentetazı, iki aşamalı bir reaksiyon-alanin içindeki alaninin tRNA'ya bağlanmasından sorumludur. 968 amino asit uzunluğundadır.

YARS-Tirosil-tRNA sentetaz, iki aşamalı bir reaksiyon-tirosin içinde tirozinin tRNA'ya bağlanmasından sorumludur. 528 amino asit uzunluğundadır.

TARS-treonil-tRNA sentetaz 723 amino asit uzunluğundadır.

B. NEFM

Nörofilament, medyum polipeptid adlı bu protein nörofilamentler genellikle üç ara filament proteini içerirler - L, M ve H, nöronal kalibrenin bakımında rol alırlar. NEFM 916 aminoasitlik peptid dizisine sahiptir (UNIPROT ID: P07197). NEFM ile etkileşen proteinlerden;

MAPK11-Mitojenle uyarılan protein kinaz 11; MAP kinaz sinyal iletim yolunun temel bir bileşeni olarak işlev gören serin / treonin kinazdır. MAPK11, proinflamatuvar sitokinler veya transkripsiyon faktörlerinin doğrudan aktivasyonuna yol açan fiziksel stres gibi hücre dışı uyarılar tarafından uyarılan hücresel tepkilerin kaskadlarında önemli bir rol oynayan dört p38 MAPK'lerden biridir. 364 amino asit uzunluğundadır.

MAPK14-Mitojenle uyarılan protein kinaz 14, MAP kinaz sinyal iletim yolunun temel bir bileşeni olarak işlev gören serin / treonin kinazdır. 360 amino asit uzunluğundadır.

PRPH-Periferin, Sınıf III nöronal ara filament proteindir. 470 amino asit uzunluğundadır.

MAPK12-Mitojenle uyarılan protein kinaz 12, MAP kinaz sinyal iletim yolunun temel bir bileşeni olarak işlev gören serin / treonin kinazdır. 367 amino asit uzunluğundadır.

MAPK13-Mitojenle uyarılan protein kinaz 13, MAP kinaz sinyal iletim yolunun temel bir bileşeni olarak işlev gören serin / treonin kinazdır. 365 amino asit uzunluğundadır.

C. THAP3

THAP bölgesi içeren, apoptosis ile ilişkili protein 3 adlı bu protein RRM1 transkripsiyon aktivitesinin düzenlenmesi için gerekli olan THAP1 / THAP3-HCFC1-OGT kompleksinin bileşenidir. 239 amino asit uzunluğundadır (UNIPROT ID: Q8WTV1). THAP3 ile etkileşen proteinlerden;

THAP11-THAP bölgesi içeren 11, embriyonik kök (ES) hücrelerinin embriyogenez ve pluripotensi için merkezi bir rol oynayan transkripsiyon baskılayıcısıdır. Anahtar genetik lokuslara doğrudan bağlanarak ve epigenetik modifiye edicilerle (benzerliğe göre) pluripotent ES hücrelerinde gen ekspresyonunu baskılayan sekansa spesifik DNA-bağlama faktörüdür. 314 amino asit uzunluğundadır.

PRKRIR-Protein-kinaz, interferon ile indüklenebilir çift zincirli RNA'ya bağlı inhibitör adlı bu protein, interferon kaynaklı serin / treonin protein kinaz R yukarı akış regülatörünün baskılayıcısıdır. 761 amino asit uzunluğundadır.

HCFC1-Konakçı hücre faktörü C1 (VP16-yardımcı protein), hücre döngüsünün kontrolünde yer alır. EGR2 ve GABP2 için koaktivatördür. Kromatin, Set1 / Ash2 histon H3 "Lys-4" metiltransferaz ve Sin3 histon deasetilaz komplekslerini (sırasıyla, transkripsiyonun aktivasyonu ve baskılanması) modifiye eder. 2035 amino asit uzunluğundadır.

BLZF1-Temel lösin fermuar nükleer faktör 1, normal golgi yapısı ve endoplazmik retikulumdan golgi aparatı aracılı hücre yüzeyine protein aktarımı için gereklidir. 400 amino asit uzunluğundadır.

RFESD-Rieske (Fe-S) bölgesi içeren protein olup 210 amino asit uzunluğundadır.

D. ANP32A

Asidik (lösin bakımından zengin) nükleer fosfoprotein 32 ailesi, üye A adlı protein proliferasyon, farklılaşma, kaspaz bağımlı ve kaspazdan bağımsız apoptoz, transformasyonun baskılanması (tümör baskılayıcı), protein fosfataz 2A'nın inhibisyonu, mRNA trafiğinin düzenlenmesi ve ELAVL1 ile birlikte stabilite dahil olmak üzere bir dizi hücresel işlemlerde ve INHAT (histon asetiltransferazların inhibitörü) kompleksinin bir parçası olarak asetiltransferazların inhibisyonunda ve E4F1 aracılı transkripsiyonel baskıda rol oynar. 249 aminoasitlik peptid dizisine sahiptir (UNIPROT ID: P39687). ANP32A ile etkileşen proteinlerden;

SET-SET Nükleer onkogen, Apoptoz, transkripsiyon, nükleozom kompleksi ve histon şaperonla ilgili çok görevli bir proteindir. 290 amino asit uzunluğundadır.

APEX1-APEX nükleaz (çok fonksiyonlu DNA onarım enzimi) 1, oksidatif strese hücresel cevapta merkezi bir rol oynayan çok fonksiyonlu bir proteindir. 318 amino asit uzunluğundadır.

ELAVL1-ELAV (embriyonik ölümcül, anormal görüş, Drosophila) -benzeri 1 (Hu antijeni R); MRNA'ların 3'-UTR bölgesine bağlanan ve stabiliteelerini arttıran RNA bağlayıcı proteindir. 326 amino asit uzunluğundadır.

HMGB2-Yüksek hareketlilik grup kutusu 2, farklı hücresel bölmelerde çeşitli rollere sahip çok fonksiyonlu bir proteindir.Çekirdekte, transkripsiyon, kromatin yeniden biçimlenmesi ve V (D) J rekombinasyonu ve muhtemelen başka süreçlerde yer alan bol kromatin ilişkili histonik olmayan bir proteindir. 209 amino asit uzunluğundadır.

NME1-NME / NM23 nükleosit difosfat kinaz 1, ATP dışındaki nükleosit trifosfatların sentezinde önemli rol oynar.Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gelişimi, sinyal transdüksiyonu, G proteinine bağlı reseptör endositozu ve gen ekspresyonunda etkindir. 177 amino asit uzunluğundadır.

E. KRT

Keratin 7 adı verilen KRT7, interferon bağımlı interfazı bloke eder ve hücrelerde DNA sentezini uyarır. İnsan papilloma virüsü tip 16 E7 mRNA'nın (HPV16 E7) translasyonel düzenlemesinde yer almaktadır. 469 amino asit uzunluğundadır (UNIPROT ID: P08729). KRT7 ile etkileşen proteinlerden;

SLC4A3-Çözücü taşıyıcı ailesi 4, anyon değiştirici, üye 3 adlı bu protein geniş dağılımlı plazma membran anyon değişim proteinidir. Kardiyak miyositlerde Cl (-) / HCO₃ (-) değişiminin en azından bir kısmına aracılık eder. Hem BAE3 hem de CAE3, Cl (-)taşıma yapar. 1259 amino asit uzunluğundadır.

CDX2-Kaudal tipi homeobox 2; Bağırsak epitelyumunda eksprese edilen çoklu genlerin transkripsiyonal regülasyonunda etkindir.

CEACAM5-Karsinoembriyonik antijen ile ilişkili hücre adezyon molekölü 5; Hücre yapışmasında ve hücre içi sinyalleşmede rol oynayan hücre yüzeyi glikoproteinidir. 702 amino asit uzunluğundadır.

NKX2-1-Tiroglobulin, tiroperoksidaz ve tirotropin reseptörü gibi tiroid spesifik genlerin promotörünü bağlayan ve aktive eden transkripsiyon faktörüdür. Tiroid farklılaşma fenotipinin bakımında çok önemlidir. Akciğer gelişimi ve sürfaktan homeostazında rol oynayabilir. Akciğer epitel hücre morfojenezi ve farklılaşmasını koordine eden GRHL2 ile düzenleyici bir döngü oluşturur. 401 amino asit uzunluğundadır.

PIP-Prolaktinle uyarılmış protein adındaki bu protein 146 amino asit uzunluğundadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Kitler

- ❖ AEC staining kit (Invitrogen)
- ❖ Annexin V-FITC Apoptosis Detection KIT(eBioscience)
- ❖ Antikor sulandırıcı (Zymed)
- ❖ Anti Br-dU antikor (Santa Cruz)
- ❖ Betamercaptoetanol (Applichem)
- ❖ Borik asit (Sigma)
- ❖ DMEM/F12 (HAM) 1:1 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biological Industries)
- ❖ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(PBS) (Biological Industries)
- ❖ Etanol (Millipore)
- ❖ FBS (Fetal Bovine Serum) (gibco)
- ❖ FxCycle PI/RNase Staining Solution (Thermofisher)
- ❖ Gentamisin (Wisent)
- ❖ Gliserol (Sigma)
- ❖ Halt Protease Inhibitor Cocktail(Thermoscientific)
- ❖ HRP Large Volume AEC Substrate System(Thermofisher)
- ❖ H₂O₂ (Hidrojen peroksit) (Merck)
- ❖ Metformin
- ❖ NF-KB aktivasyon elisa kiti (Cayman)
- ❖ NF-KB Primer antikor (NFKB p65 Polyclonal Antibody) (Thermofisher)
- ❖ MMP-2 Primer antikor(MMP-2 Monoclonal Antibody (MMP2/2C1) (Thermofisher)
- ❖ MMP-9 Primer antikor (MMP-9 Monoclonal Antibody; 5G3) (Thermofisher)

- ❖ Mouse and Rabbit Specific HRP / AEC (ABC) detection IHC Kit (ab93705)
- ❖ Penisilin (Wisent)
- ❖ Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen)
- ❖ QIAamp® RNA Blood Kit (Qiagen)
- ❖ Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen)
- ❖ Ringer Solüsyonu (Baxter)
- ❖ Sentetik Primerler
- ❖ Streptomisin (Wisent)
- ❖ Trypan Blue Solution (Sigma)
- ❖ Trypsin Edta Solution C (Biological Industries)
- ❖ UPX™ Universal Protein Extraction Kit (Expedeon)

3.2. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

- ❖ Akım Sitometri Cihazı (MacsQuant Analyzer 10)
- ❖ Akım Sitometri Programı (MacsQuantify Version 2.8 Flow Cytometry Screening System)
- ❖ Buzdolabı ve Derin Dondurucu (Beko, Arçelik)
- ❖ Derin Dondurucu (-80°C) (Sanyo)
- ❖ Elisa okuyucu (Synergy ht-BIOTEK)
- ❖ Enjektör
- ❖ Etüv (Heraeus)
- ❖ Gerçek Zamanlı PCR cihazı (Rotorgene Q-Qiagen)
- ❖ Güç Kaynağı (Olympus Europe)
- ❖ Hassas Terazi (Ohaus)
- ❖ Hücre Sayım Cihazı (TC 20 Automated Cell Counter)(Biorad)
- ❖ Isı Döngü Cihazları-Thermal Cyclers (Veriti-AppliedBiosystems)
- ❖ Işık Mikroskobu (Olympus)

- ❖ İmaj Görüntüleme (MD80-Mshot Digital Imaging System)
- ❖ İnkübatör (Hera Cell)
- ❖ İnvirt Mikroskop (Olympus)
- ❖ Karıştırıcılı Isıtıcı (Biosan)
- ❖ Kriyojenik tüpler (Santa Cruz)
- ❖ Kütle Spektrometresi (Xevo G2-XS QToF Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer-Waters)
- ❖ Laminar Akım Kabini (Hera Safe)
- ❖ Manyetik Karıştırıcı (VELP Scientifica)
- ❖ Membran filtre (0.22 µm) (Millipore)
- ❖ Mikropipetler (Gilson)
- ❖ Otoklav (Harvey)
- ❖ pH Metre (inolab)
- ❖ Progenesis QI Software (Waters)
- ❖ Saf Su Cihazı (Millipore Elix 3)
- ❖ Santrifüj (Heraeus)
- ❖ Santrifüj tüpü (15, 50 ml) (Corning)
- ❖ Serolojik Pipetler (Hirschmann)
- ❖ Soğutmalı mikrosantrifüj(VWR)
- ❖ Steril pipet uçları (10,100, 1000 µl) (Axygen)
- ❖ Su Banyosu (Boekel Scientific)
- ❖ Thoma Lamı
- ❖ Vorteks (Biosan)
- ❖ Yuvarlak Lamel (15 mm)
- ❖ 6, 12 ve 24 kuyucuklu plakalar (SPL Life Sciences)
- ❖ 25 cm² ,75 cm² ve 175 cm² kültür kapları (Falcon)

3.3. Primer Hücre Kültürü

3.3.1. Taşıma solüsyonunun hazırlanması

Taşıma solüsyonu, içerisinde % 1 penisilin+streptavidin olan ringer solüsyonu olarak hazırlandı. Daha sonra bu solüsyonlar 5 ml'lik miktarlarda falkon tüpleriyle örneklerin alınacağı merkezlere gönderildi.

3.3.2. Dokunun işlenmesi

Bursa Eğitim Araştırma Hastanesi'nden temin edilen dokular, Acıbadem LABCELL Kök Hücre Laboratuvarı'nın imkanları kullanılarak kültüre edilmiş, çalışmanın moleküler genetik kısmı Acıbadem LABGEN Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nde tamamlanmıştır. Hastalar 50-65 yaş arası, post-menaposal dönemde olan, mastektomi yapılmış, ÖR+, PR+ ve HER2- kadın hastalardan seçilmiştir. Hastanede patolog tarafından ayrılarak laboratuvarımıza ringer solüsyonu içerisinde gönderilen dokular, laminar flow kabini içerisinde steril bir petri kabına aktarıldı. Ringer solüsyonu aspire edildi. Dokunun üzerine yeteri miktarda PBS eklendi ve doku steril bir cımbız yardımıyla ters-düz edilerek yıkandı, petri kabındaki bu kirli PBS aspire edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

Bir bistüri yardımıyla doku, pirinç tanesi boyutlarında parçalara ayrıldı. Bu parçalar 4-5 adet şeklinde daha sonra hücre kültürünün gerçekleştirileceği 25 cm² alana sahip flaskların içerisine cımbızla üzerlerine basınç uygulayarak yapıştırıldı. Şişeler yapıştırılan doku parçaları ters duracak şekilde 37⁰C %5 CO₂ ayarındaki etüvde yaklaşık 5 dakika bekletilerek daha sıkı yapışmalarına olanak sağlandı. Süre sonunda içerisine dokulara herhangi bir temas olmadan 2 ml içerisinde %5 FBS bulunan DMEM/F12 solüsyonu eklendi ve bu besiyerin dokulara temasına olanak verildikten sonra şişeler yapıştırılan doku parçaları ters duracak şekilde 37⁰C %5 CO₂ ayarındaki etüvde yaklaşık 2 saat daha bekletildi. Süre sonunda 2 ml lik hacim üzerine 3 ml daha besiyer eklenerek 5 ml ye tamamlandı ve ters duran besiyer şişeleri yeniden düz hale getirilerek dokuların besiyer içerisine gömülmesi sağlandı ve etüvde inkübasyona bırakıldı. 3 günlük periyotlarla bu şişeler içerisindeki besiyerin yarısı dokulara zarar vermeden boşaltıldı ve yerine taze besiyer eklendi.

3.3.3. Pasajlama

Dokunun durumu her gün ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Dokunun besiyer şişesi yüzeyine doğru proliferasyon yapması beklendi. Yaklaşık 2 hafta sonra doku şişe yüzeylerinde yeterince proliferasyon gerçekleştirdiğinden bu proliferasyon gözlenen hücre kümelerinin merkezinde duran ata doku steril cımbız kullanılarak şişelerden ayrıldı ve proliferasyonun şişe içerisinde yaklaşık %70'lik alanı kaplamasına kadar düzenli aralıklarla besiyer tazeleme işlemi gerçekleştirildi. Uygun yoğunluğa gelen hücrelerin bulunduğu 25cm² lik besiyer şişelerinden besiyerler aspire edildi. Hücrelerin proliferasyon gösterdiği tarafa temas etmeden şişe içerisine 2 ml PBS eklendi ve hücreler yavaşça bu PBS'le temas ettirilerek yıkandı. Kirli PBS aspire edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Yıkama işleminden hemen sonra şişelere yüzeyi kaplayacak kadar (yaklaşık 2 ml) tripsin edta eklendi ve etüvde 10 dakika inkübe edilerek hücrelerin tutundukları yüzeyden koparılması sağlandı. İnkübasyonu takiben her şişeye uygulanan tripsinin 1/10'u kadar (2ml tripsin için yaklaşık 200 µl) FBS eklenerek enzimin nötralizasyonu sağlandı. Bu şekilde kaldırılan hücreler daha sonra 15 ml'lik falkon tüplerine alınarak 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet halindeki hücreler yeniden 2 ml PBS ile çözülerek yıkandı ve hücreler yeniden 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. Son santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücreler daha önce ışık mikroskobunda gözlemlenen yoğunluklarına uygun şekilde yaklaşık 4-5 ml besiyer içerisinde çözülerek çalışmaya hazır hücre süspansiyonu haline getirildi.

3.4. Hücre Canlılığı

Süspansiyon içerisindeki hücreler pipetaj yapılarak besiyer içerisinde tamamen çözüldükten sonra bu süspansiyondan 100 µl, sayım için kullanılan cam tüplere aktarıldı. Üzerine aynı miktarda Trypan Blue (Tripan mavisi) eklenerek karıştırıldı. Hemasitometre lamının (Bürker Türrk Lamı-Millipore) üzerine lamel kapatıldı ve tripan mavisiyle hazırlanan karışımdan 10µl alınarak 45⁰lik açıyla lamelle lamın arasından bırakıldı. Lamelin altına, lam üzerine yayılan karışım içerisindeki hücreler inverted mikroskop yardımıyla sayıldı. Tripan mavisiyle boyanan hücreler "ölü" diye nitelendirilirken, boyanmayan hücreler "canlı" olarak değerlendirildi. Toplam hücre sayısının da belirlenmesini takiben [(Toplam Hücre Sayısı-Ölü Hücre Sayısı) / Toplam Hücre Sayısı] x 100 algoritması kullanılarak Canlı Hücre yüzdesi hesaplandı.

3.4.1. Deneyin kurulması

Deney içerisinde etkisine bakılacak olan metformin Stok (100 mM) olarak hazırlandı. Bunun için 0.828 gr. toz metformin ($MA=165.625$ gr/mol) üzerine % 10 FBS içeren DMEM/F12 medyumundan toplam hacim 50 ml olacak şekilde eklenerek 100mM stok metformin solüsyonu elde edildi. Daha sonra bu solüsyon filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Deneyde kullanılacak farklı dozlarda metformin hazırlanan 100mM stok metforminin seyreltilmesi ile hazırlandı. 25 mM metformin solüsyonu için 100 mM stok solüsyonundan 12.5 ml alınarak bir falkon tüpüne aktarıldı. Daha sonra üzerine % 10 FBS içeren DMEM/F12 medyumundan toplam hacim 50 ml olacak şekilde eklenerek 25mM konsantrasyonunda metformin solüsyonu elde edildi.

10mM metformin solüsyonu için 100 mM stok solüsyonundan 5 ml alınarak bir falkon tüpüne aktarıldı. Daha sonra üzerine % 10 FBS içeren DMEM/F12 medyumundan toplam hacim 50 ml olacak şekilde eklenerek 5 mM konsantrasyonunda metformin solüsyonu elde edildi.

5 mM metformin solüsyonu için 100 mM stok solüsyonundan 2.5 ml alınarak bir falkon tüpüne aktarıldı. Daha sonra üzerine %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumundan toplam hacim 50 ml olacak şekilde eklenerek 2.5 mM konsantrasyonunda metformin solüsyonu elde edildi.

Çalışmamız, aynı bireye ait non-tumoral ve Tümör Dokuların ayrı ayrı ilaç (metformin) uygulamasına verdiği cevabı sorgulamak olduğu için tripsinle kaldırılan farklı flasklardaki tümör ve non-tumoral doku primer hücreleri canlılık ölçümünden sonra 6 kuyulu tabaklara yaklaşık 300.000 hücre gelecek şekilde dağıtılması planlandı. Öncesinde geniş bir petri kabına lameller konularak üzerlerine %70'lik alkol solüsyonu eklendi. Steril bir cımbız kullanılarak bu petri kabındaki lameller ters-düz edilerek yıkandı ve kurutma kağıdı üzerine alınarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan lameller daha sonra 6 kuyulu tabakların kuyularına yerleştirildi. Üzerlerine içerisindeki hücre sayısı 300.000/ml ve son hacim 3 ml olacak şekilde hücre ve besiyer eklendi ve etüvde inkübasyona bırakıldı.

24 saatin sonunda kuyuların içerisindeki medyumlar bir steril plastik pastör pipet kullanılarak aspire edildi. Kuyulara başka bir pastör pipetle kuyu yüzeyini kaplayacak

kadar PBS eklendi ve tabak hafifçe sallanarak hücrelerin yıkanması sağlandı. Kirli PBS, ölü hücre kalıntılarıyla birlikte aspire edildi. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Hemen sonrasında 0 mM, 5 mM, 10 mM ve 25mM metformin normal ve tümör primer hücrelerine her bir hücre tipinden her doz için 3 tekrar olacak şekilde (triplicate) uygulandı ve yine etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak metforminin farklı dozlardaki olası etkisinin saptanması amaçlandı. Geçen 24 saatin sonunda aynı şekilde steril bir pastör pipet kullanılarak besiyer ve besiyer içerisine karışan artıklar aspire edildi ve daha önce de yapıldığı gibi hücreler PBS kullanılarak 2 kez yıkandı. Her kuyuya kuyu dip yüzeyini örtecek kadar (yaklaşık 1 ml) tripsin eklendi ve 10 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası yüzeyden kaldırılan hücre-tripsin süspansiyonuna nötralizasyonu sağlamak amacıyla 100 µl FBS eklendi ve art arda PBS ile yıkamayla geçen 2 santrifüj sonrasında pellet haline getirilen hücreler 4-5ml besiyer içerisinde çözülerek değerlendirme yapmaya hazır hale getirildi.

Hücre süspansiyonlarından alınan 100 µl örnekler aynı miktardaki tripan mavisi ile karıştırılarak canlılık kontrol edildi.

3.5. Proliferasyon Miktarının Hesaplanması (BrdU)

Stok 20 mM BrdU (5-Bromo-2-deoksiüridin-MA= 307.098 gr/mol) hazırlamak için 0.03 gr BrdU, 5 ml disitile su içerisinde çözüldü. Yine %70 Etil alkol elde etmek için hacmen % 96'lık Etil alkolden 35 ml alınarak bir falkon tüpüne aktarıldı. Daha sonra üzerine disitile sudan toplam hacim 50 ml olacak şekilde eklenerek %70 oranında Etil Alkol elde edildi.

Borat Tampon Çözeltisi ise 2 stok çözelti (Stok A ve Stok B) şeklinde hazırlandı. Stok A çözeltisi 0.62 gr Borik Asitin 50 ml disitile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Stok B çözeltisi 0.95 gr Sodyumtetraboratın 50 ml disitile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Daha sonra ihtiyaca göre 4.5x Stok A ve 5.5x Stok B çözeltileri karıştırılarak Borat tampon çözeltisi elde edildi.

BRDU çalışması için ayrı ayrı dozlar için her hasta için farklı tabaklarda olmak üzere, üzerine lameller yerleştirilen 6 kuyulu tabaklar hazırlandı ve etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübe edilen Kontrol (0 mM), 2 mM, 10 mM, 50 mM konsantrasyonlardaki her bir kuyucuğa 50 µl Brdu eklenerek 60dk etüvde inkübe edildi. 60 dakikanın sonunda kuyucuklardan besiyer aspire edildi ve 3 kez lamelin üzerini kaplayacak kadar (4-5 damla) PBS kullanılarak yıkandı. Yıkama sonrasında aspire

edilen PBS'in yerine kuyulara aynı miktarda % 70 etil alkol 10 dakika süreyle uygulandı, böylelikle fiksasyon tamamlandı. Kuyulardaki alkol aspire edildikten sonra ise PBS ile yıkama işlemi tekrarlandı. Kuyulara 2 M HCl uygulandı ve 30 dakika süreyle etüvde inkübe edildi. Herhangi bir yıkama işlemine gerek duyulmadan, sadece nötralizasyon için hemen süre bitiminde aynı miktarda Borat Buffer eklenerek etüvde 10 dakika inkübe edildi. PBS'le yıkama işlemi tekrarlandı. 1:200 oranında seyreltilen BrdU antikor ((Bu20A): sc-20045 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) yine kuyu yüzeyini kaplayacak kadar (yaklaşık 3-4 damla) olacak şekilde uygulandı. Bu anti-BrdU antikor uygulaması, ışıkla olası temasını kesmek adına alüminyum kağıtla kaplanarak gece boyu +4°C de inkübe edildi. Geceboyu inkübasyon sonrası kuyucuklardaki bağlanmamış antikorlar aspire edildi ve PBS'le yıkama tekrarlandı. Yıkamayı takiben sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Mouse and Rabbit specific HRP) yaklaşık üç damla (150 ul) uygulandı ve yine alüminyum kağıtla kaplanarak oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki bağlanmamış antikorlar aspire edildi ve PBS'le yıkama tekrarlandı. Kuyucuklara daha sonra HRP peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, Mouse and Rabbit specific HRP) yaklaşık üç damla (150 ul) uygulandı ve yine alüminyum kağıtla kaplanarak oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Kalan enzim aspire edildi ve PBS'le yıkama tekrarlandı. AEC boyama protokolüne göre kromojen uygulaması sonrasında invert mikroskop altında hücrelerin boyanıp boyanmadığı kontrol edildi, boyanma gözlenen kuyulardaki tepkimeler PBS eklenerek durduruldu. Bir cımbız yardımıyla kuyucukların diplerindeki lameller kaldırılarak bir cam lam üzerine isimlendirilmeler de yapılarak balsam kullanılarak kapatıldı ve invert mikroskop kullanılarak hücre sayımları yapıldı.

3.6. MMP-2, MMP-9 ve NF-kB ifadelerinin immünohistokimyasal olarak saptanması

MMP-2, MMP-9 ve NF-kB çalışmalarında ayrı ayrı dozlar için her hasta farklı tabaklarda olmak üzere, lameller yerleştirilen 6 kuyulu tabaklar hazırlandı ve etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübe edilen kontrol (0 mM), 2m M, 10 mM, 50 mM konsantrasyonlardaki her bir kuyucuk içerisindeki besiyerler aspire edildi ve 3 kez lamelin üzerini kaplayacak kadar (4-5 damla) PBS kullanılarak yıkandı. Yıkama sonrasında aspire edilen PBS'in yerine kuyulara aynı miktarda %70 etil alkol 10 dakika

süreyile uygulandı, böylelikle fiksasyon tamamlandı. Alkolün aspirasyonu sonrasında PBS ile yıkanan kuyucuklara, yaklaşık üç damla (150 ul) olacak şekilde NFKB (1/100), MMP-2 (1/100), ve MMP-9 (1/400)'a ait primer antikolar uygulandı ve alüminyum kağıda sarılan tabaklar +4⁰C de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Geceboyu inkübasyon sonrası kuyucuklardaki bağlanmamış antikolar aspire edildi ve PBS'le yıkama tekrarlandı. Yıkamayı takiben sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Mouse and Rabbit specific HRP) yaklaşık üç damla (150 ul) uygulandı ve yine alüminyum kağıtla kaplanarak oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki bağlanmamış antikolar aspire edildi ve PBS'le yıkama tekrarlandı. Kuyucuklara daha sonra HRP peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, Mouse and Rabbit specific HRP) yaklaşık üç damla (150 ul) uygulandı ve yine alüminyum kağıtla kaplanarak oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Kalan enzim aspire edildi ve PBS'le yıkama tekrarlandı. Çalışma için AEC Substrat Tamponu hazırlandı. Bunun için 4 ml AEC Substrat Tamponu içerisinde 80µl AEC chromogene çözüldü. AEC boyama protokolüne göre kromojen uygulaması sonrasında invert mikroskop altında hücrelerin boyanıp boyanmadığı kontrol edildi, boyanma gözlenen kuyulardaki tepkimeler PBS eklenerek durduruldu. Bir cımbız yardımıyla kuyucukların diplerindeki lameller kaldırılarak bir cam lam üzerine isimlendirilmeler de yapılarak balsam kullanılarak kapatıldı ve invert bilgisayar kullanılarak hücre sayımları yapıldı.

3.7. NF-kB aktivitesinin ELISA yöntemiyle saptanması

NF-kB aktivitesine bakılabilmesi için ayrı ayrı dozlar için her hasta için farklı tabaklarda olmak üzere 6 kuyulu tabaklar hazırlandı ve etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübe edilen control (0 mM), 2 mM, 10 mM, 50 mM konsantrasyonlardaki her bir kuyucuk içerisindeki besiyerler aspire edildi ve 3 kez lamelin üzerini kaplayacak kadar (4-5 damla) PBS kullanılarak yıkandı. Yıkamayı takiben her bir kuyuya 1ml tripsin-EDTA eklendi ve etüvde yaklaşık 10 dakika inkübe edilerek hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkmaları sağlandı. İnkübasyonu takiben her kuyuya uygulanan tripsinin 1/10'u kadar (1 ml tripsin için yaklaşık 100 µl) FBS eklenerek enzimin nötralizasyonu sağlandı. Bu şekilde kaldırılan hücreler daha sonra 1.5ml'lik falkon tüplerine alınarak 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet halindeki hücreler yeniden 2 ml PBS ile çözülerek yıkandı ve hücreler yeniden 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. Son santrifüj sonrası süpernatant

atıldıktan sonra içerisinde hücre pelletleri bulunan tüplere içerisinde 1/1000 oranında DTT ve PIC bulunan Pre-Extraction Tampon Çözeltisinden 100 µl eklenerek çözüldü ve buz üzerinde 10 dakika ara ara vortekslenerek inkübe edildi. Süre sonunda tüpler 12.000 rpm de 1 dakika çevrildi. İçerisinde 1/1000 oranında DTT ve PIC bulunan Extraction Tampon Çözeltisinden 50 µl eklenerek pellet halindeki hücreler çözüldü ve buz üzerinde 15 dakika her 3 dakikada bir vortekslenmesi şartıyla inkübe edildi. Parçalanmış hücre lizatları daha sonra 14.000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmındaki nükleer ekstrakt ayrı bir tüpe alınarak deney başlatıldı.

Nükleer ekstraktlar 1/10 oranında toplamda 100µl olacak şekilde, pozitif kontroller ise yine toplamda 100µl olacak şekilde 1/1, 1/2 ve 1/4 oranlarında CTFB solüsyonu ile seyreltildi. Referans olacak kuyulara sadece CTFB solüsyonu eklendi. ELISA kuyularına bu oranlarda eklenen örnekler +4 °C de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bağlanmamış ve artık kısımlar aspire edilerek uzaklaştırıldı. 1X yıkama solüsyonu ile kuyular 5 kez yıkandı. Yıkama sonrasında referans dışında kalan kuyulara 100 µl seyreltilmiş NF-kB (p65) antikoru eklendi ve alüminyum kağıda sarılan ELISA tabağı oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bağlanmamış ve artık kısımlar aspire edilerek uzaklaştırıldı. 1X yıkama solüsyonu ile kuyular 5 kez yıkandı. Yıkama sonrasında referans dışında kalan kuyulara 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor eklendi ve alüminyum kağıda sarılan ELISA tabağı oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bağlanmamış ve artık kısımlar aspire edilerek uzaklaştırıldı. 1X yıkama solüsyonu ile kuyular 5 kez yıkandı. Yıkamış kuyulara 100 µl Developing solüsyonu eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 100 µl durdurma solüsyonu eklenen kuyulardaki NF-kB (p65) aktivitesi 450 nm deki absorbance ölçümüyle saptandı.

3.8. MMP-2, MMP-9 ve NF-kB genlerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesiyle ekspresyonlarının saptanması

mRNA ekspresyonu bakılabilmesi için 0 mM ve 25 mM metformin dozlarının uygulanmasına karar verildi. Her hasta için farklı tabaklarda olmak üzere 6 kuyulu tabaklar hazırlandı ve etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübe edilen kontrol (0 mM) ve 25 mM konsantrasyonlardaki her bir kuyucuk içerisindeki besiyerler aspire edildi ve kuyu yüzeyinin üzerini kaplayacak kadar (4-5 damla) PBS kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkamayı takiben her bir kuyuya 1ml tripsin-EDTA eklendi ve etüvde yaklaşık

10 dakika inkübe edilerek hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkmaları sağlandı. İnkübasyonu takiben her kuyuya uygulanan tripsinin 1/10'u kadar (1 ml tripsin için yaklaşık 100 µl) FBS eklenerek enzimin nötralizasyonu sağlandı. Bu şekilde kaldırılan hücreler daha sonra 1.5ml'lik falkon tüplerine alınarak 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet halindeki hücreler yeniden 2 ml PBS ile çözülerek yıkandı ve hücreler yeniden 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. Pelletler daha sonra RNA izolasyonu yapılabilmesi için üzerlerine 350 µl Betamerkaptoetanol eklenerek vortekslendi ve -80°C'ye kaldırıldı.

RNA izolasyonu için QIAamp® RNA Blood kit kullanıldı. Kit içerisinden çıkan RLT tampon çözeltisinde 50 ml alınarak 500 µl Betamerkaptoetanol ile karıştırılarak izolasyon için kullanılacak seyreltik Betamerkaptoetanol elde edildi. Yine izolasyonda kullanılmak üzere mutlak etanol (%96 hacmen) disitile su ile hacmen %70 olacak şekilde seyreltilti.

-80°C'den alınan hücre pelletleri çözünmeleri için oda sıcaklığında bırakıldı. Bu pelletler üzerine dondurulmadan önce eklenen seyreltik betamerkaptoetanolla birlikte üzerine mor renkli filtre yerleştirilen toplama tüplerinin filtrelerine aktarılarak 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası mor filtreler atıldı ve toplama tüpleri içerisine süzülen hücre lizatı üzerine hücreler dondurulmadan önce eklenen seyreltik betamerkaptoetanol miktarı kadar (350 µl) %70'lik etanol eklendi ve pipet yardımıyla karıştırılarak üzerine beyaz renkli filtre yerleştirilen toplama tüplerinin filtrelerine aktarılarak 11.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Bu santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak beyaz filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve filtreye 700 µl RW1 tampon çözeltisinden eklenerek 11.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Benzer şekilde toplama tüpü atılarak beyaz filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl RPE tampon çözeltisinden eklenerek 11.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. RPE ile bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. İlkinden farklı olarak ikinci yıkamada santrifüj 11.000 rpm'de 15 saniye yerine 13.000 rpm'de 2 dakika olarak uygulandı. Bu santrifüj sonrası yeni bir toplama tüpüne aktarılan filtreye 50 µl RNAz içermeyen su eklendi ve tüm filtre yüzeyine dağılabilmesi için oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Hemn sonrasında 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre atıldı ve filtreden süzülen RNA Saflık ve konsantrasyon ölçümünün nanospectrophotometer ile yapılmasını takiben ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere hızlıca -80°C'ye kaldırıldı.

3.8.1. Ters Transkriptaz Tepkimesi

RNA'dan ekspresyon çalışması için önce RNA'lardan kopya DNA elde edildi. Bu işlem Qiagen Quantitech Reverse Transcription Kit ile gerçekleştirildi. 80°C'den alınan RNA örnekleri oda sıcaklığına gelmelerini takiben olası DNA kontaminasyonunu en asgari seviyeye indirmek amacıyla kit içerisinden çıkan gDNA wipe out ve nukleaz içermeyen su ile karıştırılarak (2 µl RNA + 2 µl gDNA wipe out + 10 µl nukleaz içermeyen su) 42°C'de 3 dakika inkübe edildi.

Hemen inkübasyon sonrası bu 14 µl olan karışım kit içerisinden çıkan diğer enzim ve kimyasallardan oluşturulan 6 µl lik karışıma (1 µl Q Reverse Transcriptase + 4 µl RT Buffer 5x + 1 µl RT Primer Mix) eklenerek 20 µl lik bu karışım termal bloklarda önce 42 °C'de 30 dakika hemen devamında 95 °C'de 3 dakika inkübasyona bırakılarak kopya DNA elde edildi. Bu kopya DNA'lar ekspresyon çalışmasına kadar muhafaza edilme üzere hızlıca -80 °C'ye kaldırıldı.

3.8.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

Sipariş verilen primerler (Tablo 3-1) sentezi yapan firmanın direktifleri doğrultusunda TE tampon çözeltisi ile 100 pmol olacak şekilde çözüldü ve kullanılacağı zamana kadar -20°C'ye kaldırıldı. İfade çalışması için Qiagen Quantitect SYBR Green PCR Kit kullanıldı. Kit içerisinden çıkan reaktiflerle hazırlanan karışım (12.5 µl SYBR Green Master Mix + 11.2 µl disitile su + 0.15 µl (~7.5 pmol) F primer + 0.15 µl (~7.5 pmol) R primer + 1 µ kopya DNA) gerçek zamanlı PCR cihazına (Rotor-Gene Q- Qiagen) ekspresyon çalışması için yüklendi. Cihazdaki termal koşullar 95°C'de 15 dakika ve 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 15 saniye, 52°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olarak belirlendi. Cihazıçi sıcaklık değişim hızı da 2°C/sn olacak şekilde ayarlandı. Bu amplifikasyonu takiben bir erime eğrisi protokolu uygulandı. Sıcaklık 65°C'den 95°C'ye sıcaklık değişim hızı da 1°C/sn olacak şekilde çıkarılarak erime eğrisi grafiği çıkarıldı. Işıma yeşil renkte tespit edildi. Elde edilen sonuçlar excel dosyası şeklinde cihazdan alınarak istatistiksel programlar kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 3-1: Gerçek zamanlı PCR tepkimesi için kullanılan primer dizileri

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Gen	Ekzon	Amplikon Boyu(bç)
NFKB_F NFKB_R	ggaggaaatctgacttgaaa ggaaatccatagtggggaag	NFKB1	11-13	235
MMP2_F MMP2_R	ccaccacctacaacttgaga cagaagccatacttctgtcg	MMP2	5-6	217
MMP9_F MMP9_R	acaagctcttcggctctg ttctgtcgtgtcaaagtc	MMP9	6-7	184
ACTB_F ACTB_R	atctggcaccacacttcta agcctggatagcaacgtaca	ACTB (house-keeping)	3-4	162

3.9. Apoptoz

Tripsinle kaldırılıp, 2 kere PBS ile yıkamadan sonra uzaklaştırılan PBS in yerine 100 µl olacak şekilde Annexin Binding Buffer eklendi. Hemen sonrasında bu hücre lizatlarının üzerine 5 µl fluorochrome-conjugated Annexin V eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında ışıktan uzak ortamda inkübasyona bırakıldı. 30 dakikanın sonunda üzerine 400 µl daha Annexin Binding Buffer eklendi ve buz üzerine alınarak hızlıca akım sitometri cihazında hücrelerin apoptoz dağılımları ölçüldü.

3.10. Protein Karakterizasyonu

Protein çalışması için ekilen hücreler, yeterli hücre sayısına ulaşıncaya kadar 2 farklı dozda (0 mM ve 25 mM) metformin eklenerek 24 saat 37 °C lik etüvde inkübe edildi. 24 saatin sonunda hücrelerin üzerindeki medyum atılarak, hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve tripsinle kaldırılıp, 2 kere soğuk PBS ile yıkandı ve PBS'in de uzaklaştırılmasıyla ve hücre pelletleri çalışmaya alınmak üzere +4°C ye kaldırıldı. Protein ekstraksiyonu için hücre pelleti Universal Protein Extraction (UPX) Kit (Expedeon-44101) ve proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Sci.-87785) ile karıştırıldı. Örnekler, 5x10 sn döngü ve döngüler arası 30 sn buz üstünde soğutma yapılacak şekilde sonike edildi. Sonikasyon sonrası örnekler buz üstünde bekletilerek soğutulduktan sonra 1000 rpm hızda, 95°C'de 10 dk, karıştırılarak, kaynatıldı. 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant atılarak, pelletler yeni tüplere alındı. Peptid eldesi FASP Protein Digestion Kit (Expedeon-44250) ve tripsin enzimi (Pierce-90057) kullanılarak yapıldı.

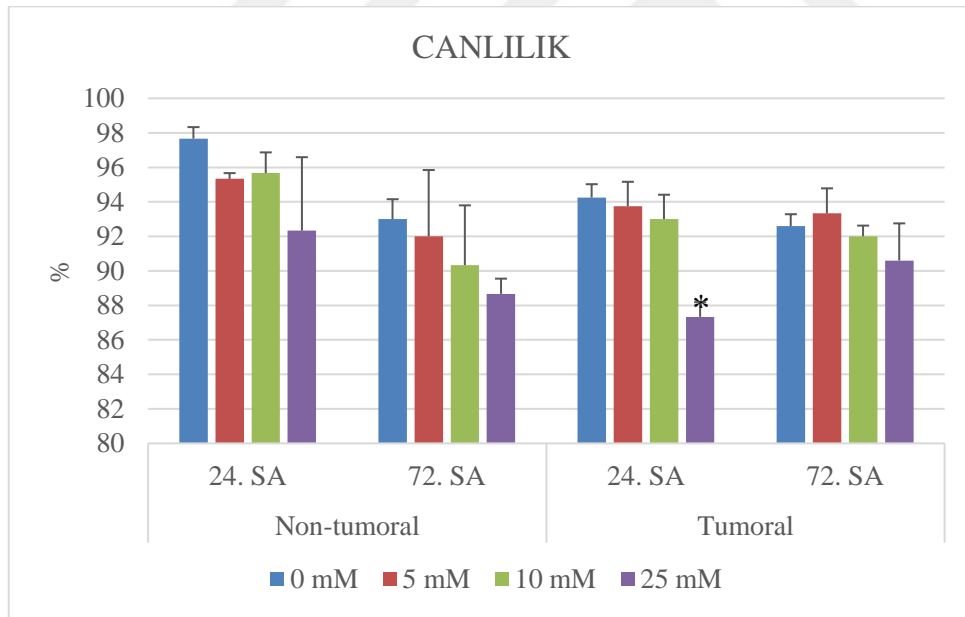
Son konsantrasyon 200 ng/ μ L olacak şekilde örnekler %0,1 formik asit ile seyreltildi ve cihaza özgü tüplere aktarıldı.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS Q TOF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı (V4.1-Waters) aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapıldı. Metod SONAR ve sensitivite moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 (Waters-186008818) kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlandı. Asetonitril %5-35 aralığında artırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında, m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0.7sn kadar kütle spektrometresi (MS) analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0.7 sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı. Protein tanımlamaları yapılırken UniProt protein veri bankasındaki insana ait protein sekans bilgisi kullanıldı. Progenesis QIP yazılımı (Waters-2018) kullanarak protein tanımlaması ve istatistiksel analizi yapıldı. İstatistiksel analiz sonrasında anlamlı bulunan proteinler <https://thebiogrid.org/> online proteomiks aracı kullanılarak sınıflandırıldı ve Panther (Mi ve ark., 2017) ve STRING (<https://string-db.org/>) analizi kullanılarak karşılıklı etkileşim ve yolak analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Canlılık

Tümör ve non-tumoral primer hücre kültürlerine farklı dozlarda (0 mM, 5 mM, 10 mM ve 25 mM) metformin uygulandı. 24. ve 72. saatin sonunda bu farklı dozların hücre canlılıklarına olan etkisi araştırıldı. 24. saatin sonunda yapılan hücre sayımı sonunda tümör primer hücrelerinde farklı dozlardaki metforminin canlılığı azalttığı, sadece 25 mM'lık dozun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0,045$). 24. saatin sonunda yapılan hücre sayımı sonunda non-tumoral primer hücrelerinde ise farklı dozlardaki metforminin canlılığa anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlendi ($p=0,46$). 72. saatin sonunda non-tumoral ve tümör primer kültürlerinde farklı dozlarda uygulanan metforminin hücre canlılığına istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (tümör $p=0,73$ ve non-tumoral $p=0,082$) (Şekil 4-1).



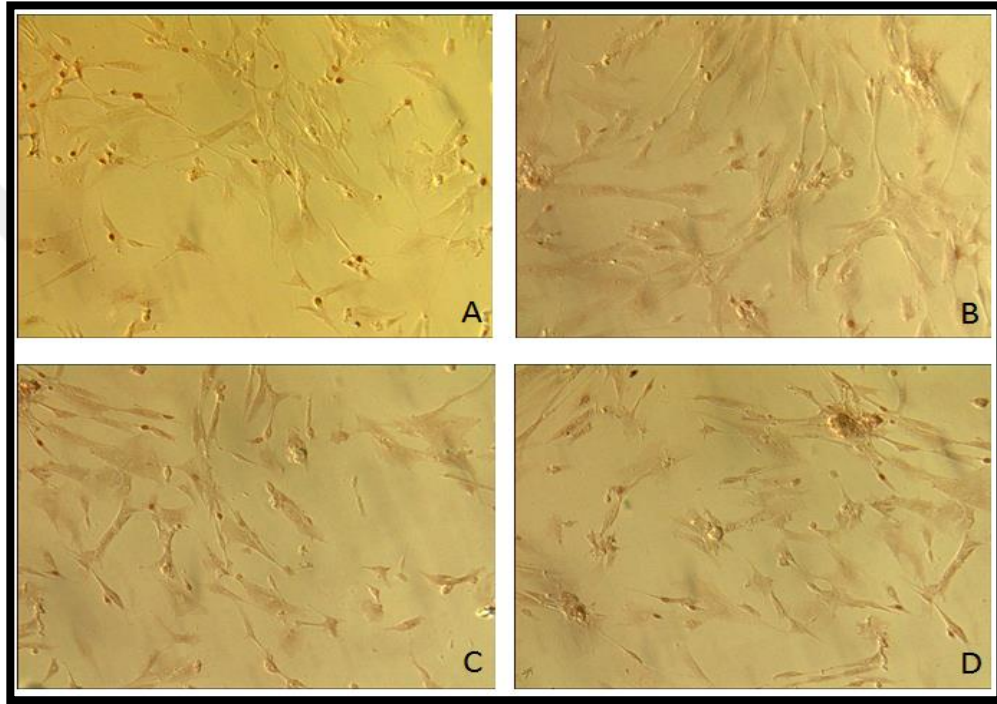
Şekil 4-1: Tümör ve non-tumoral primer hücre kültürlerinde farklı metformin dozlarında 24. ve 72. saat sonundaki canlılık profilleri.

* $P<0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Metforminin uygulamadan 24 saat sonraki etkisinin hücrelerindeki canlılığı anlamlı düzeyde durdurduğu ($p=0,045$) gözlemlendiği için deneylerin bundan sonraki kısımlarında deney süresi 24 saat olarak tercih edildi.

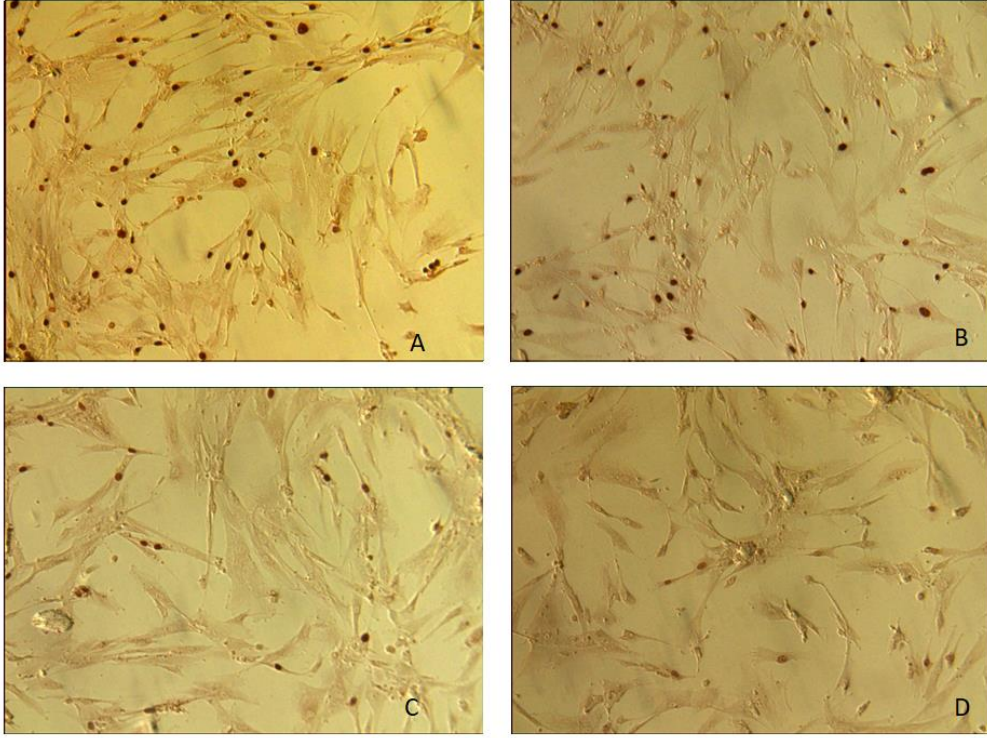
4.2. Proliferasyon

Tümör ve non-tumoral primer hücre kültürlerine farklı dozlarda (0 mM, 5 mM, 10 mM ve 25 mM) metformin uygulandı. Metforminin etkisinin 24. saatin sonunda gözlenmesi dolayısıyla hücrelerin BrdU boyama işlemi 24. saatin sonunda gerçekleştirildi. Primer kültürler için BrdU boyama sonuçları Şekil 4-2 (non-tumoral) ve Şekil 4-3 (tümör)'de gösterilmiştir.

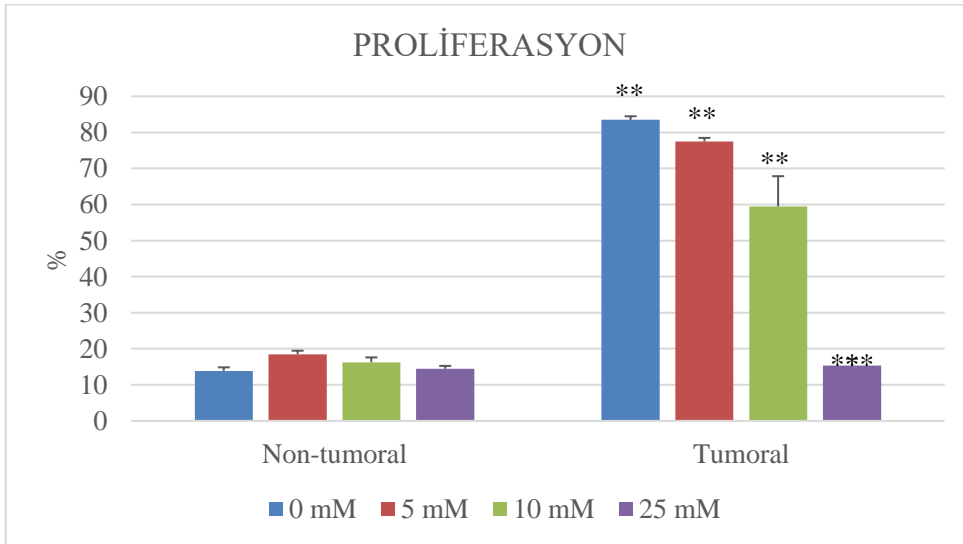


Şekil 4-2: Non-tumoral primer kültürüne ait farklı dozlardaki metformin uygulaması sonrası BrdU boyama profilleri. A) 0 mM Metformin, B) 5 mM Metformin, C) 10 mM Metformin, D) 25 mM Metformin.

24. saatin sonunda yapılan hücre boyama sonunda 0 mM, 5 mM, 10 mM ve 25 mM dozlardaki tümör primer hücreleri kendi içerisinde karşılaştırıldığında 25 mM metformindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$). Buna karşılık, non-tumoral primer hücrelerinde farklı dozlardaki metformin dozlarının anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlendi ($p = 0,46$). 0 mM, 5 mM ve 10 mM metforminin proliferasyonu inhibe edici etkisinin tümör ve non-tumoral hücrelerinde arasında istatistiksel olarak farklı olduğu gözlemlendi ($p = 0,0091$). 25 mM doz metforminin tümör ve non-tumoral kültürleri arasında istatistiksel bir anlamlılığı olmadığı gözlemlendi ($p = 0,905$) (Şekil 4-4).



Şekil 4-3: Tumor primer kültürüne ait farklı dozlardaki metformin uygulaması sonrası BRDU boyama profilleri. A) 0mM Metformin, B) 5 mM Metformin, C) 10 mM Metformin, D) 25 mM Metformin.



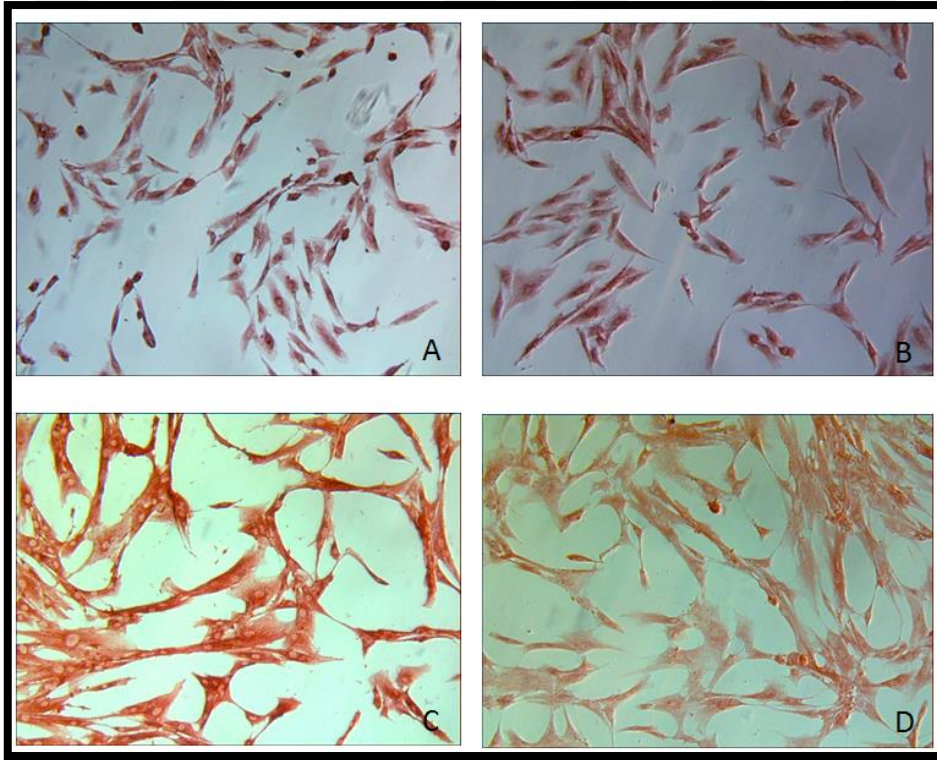
Şekil 4-4: Farklı dozlardaki metforminin tumor ve non-tumoral primer hücrelerinde proliferasyona olan etkisinin BRDU boyama profile.

P<0,05 ve *P<0,001 non-tumoral gruplarıyla karşılaştırıldı.

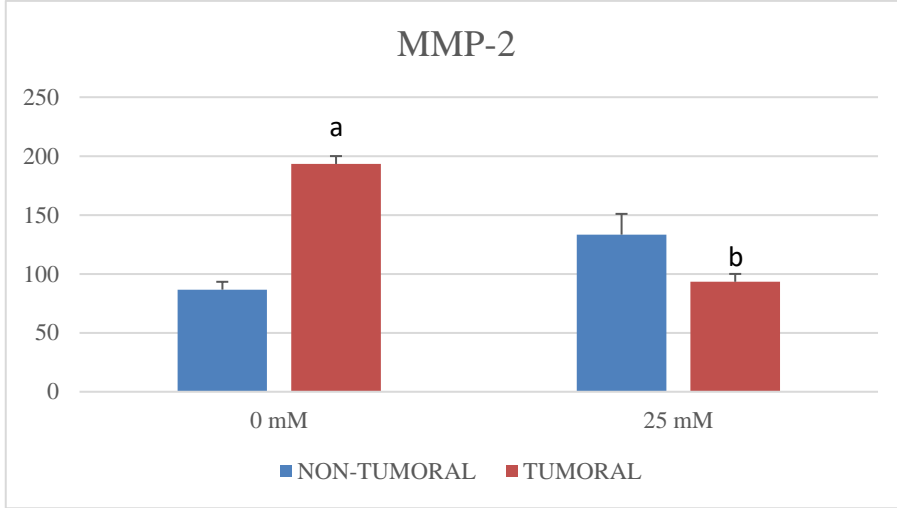
Metforminin 25 mM dozunun tümör hücrelerindeki proliferasyonu dramatik düzeyde durdurduğu ($p < 0,0001$) gözlemlendiği için deneylerin bundan sonraki kısımlarında ilaç dozu olarak 25 mM metformin tercih edildi ve ekspresyon, immünohistokimya, aktivite ve proteomik çalışmalarını gerçekleştirildi.

4.3. MMP-2 ekspresyonunun immünohistokimyasal ve gerçek zamanlı polimeraz tepkimesi yöntemleriyle gösterilmesi

24. saatin sonunda seçilen iki dozda (kontrol-0 mM ve 25 mM) MMP-2 antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonunda elde edilen hücre profilleri Şekil 4-5'te gösterilmiştir.



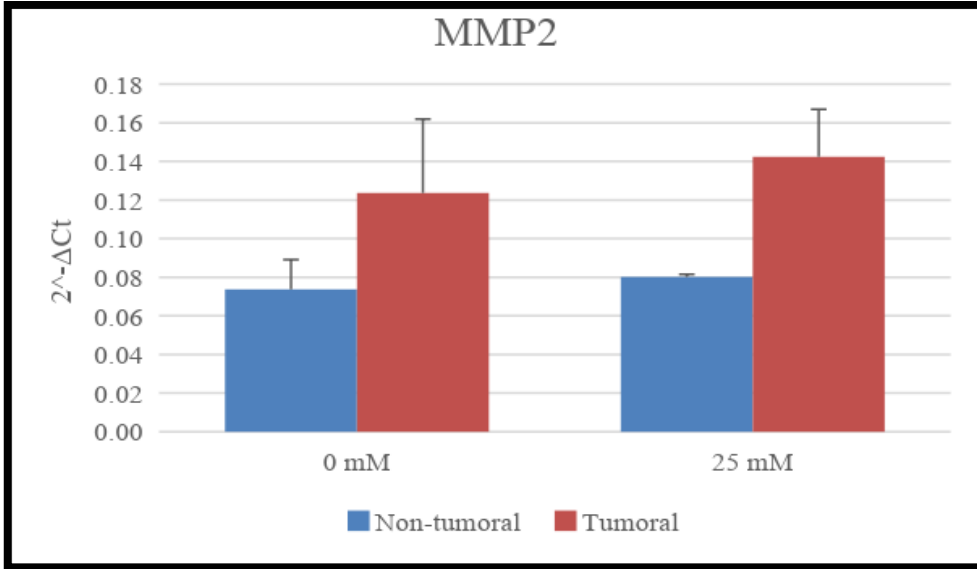
Şekil 4-5: Tümör ve non-tumoral primer kültürlerine ait immünohistokimyasal MMP-2 boyama profilleri. A) Non-tumoral (0 mM), B) Non-tumoral (25 mM), C) Tümör (0 mM), D) Tümör (25 mM).



Şekil 4-6: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve tümör non-tumoral primer hücrelerdeki immünohistokimyasal MMP-2 boyama profillerinin grafiksel değerlendirilmesi.

a $P < 0,001$ ve b $P < 0,001$ non-tumoral gruplarla karşılaştırıldı.

İmmünohistokimyasal MMP-2 boyaması sonrasında değerlendirilen hücrelere ait grafik Şekil 4-6'da verilmiştir. Tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki farklılık 0 mM metformin varlığında istatistiksel olarak anlamlı olarak gözlemlendi [$p(a) = 0,0003$]. MMP-2 ekspresyonunda non-tumoral kültürün farklı (0 mM ve 25 mM) metformin dozlarındaki değişimi istatistiksel olarak anlamlı gözlenmedi ($p = 0,12$). Tümör meme kültüründe 25 mM metforminin MMP-2 reaktivitesini azaltması istatistiksel olarak anlamlı bulundu [$p(b) = 0,0004$]. MMP-2 ekspresyonunun 25 mM metformin dozunda tümör ve non-tumoral primer kültürlerinde istatistiksel bir anlamlılık gözlenmedi ($p = 0,18$).

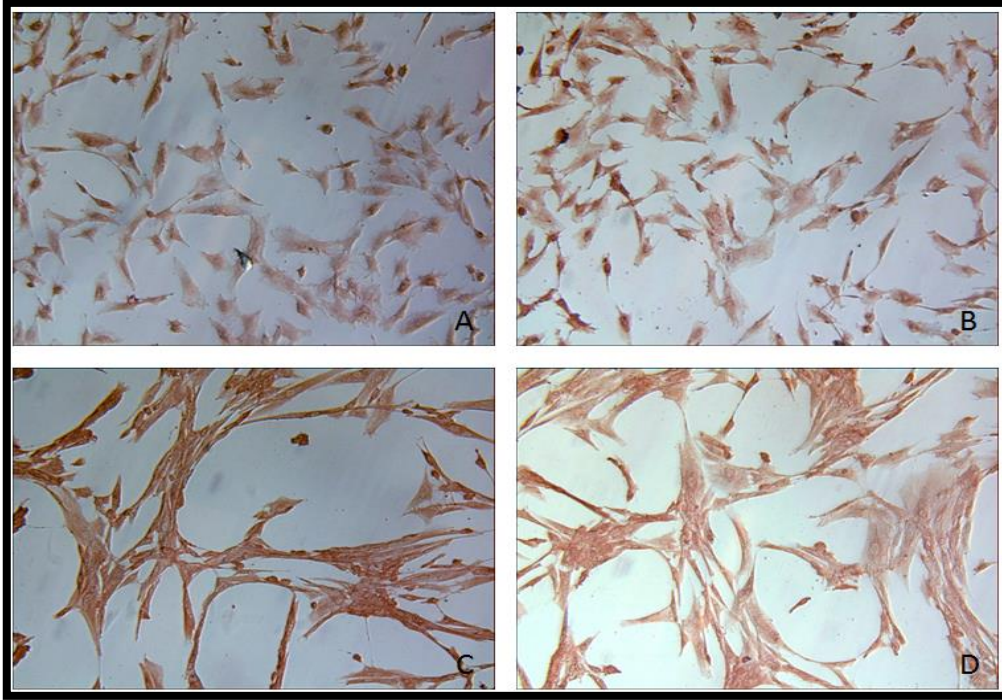


Şekil 4-7: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve tümör dışı hücrelerdeki gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle saptanan MMP-2 ekspresyonlarının grafiksel değerlendirilmesi.

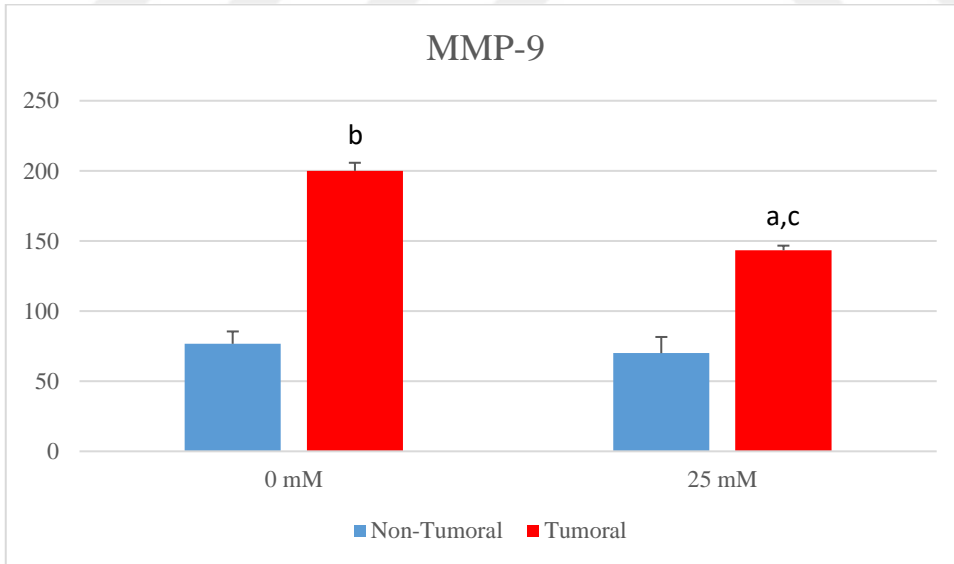
Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle 0 mM ve 25 mM metformin dozlarındaki MMP-2 ekspresyonu değişim grafiği Şekil 4-7’de gösterilmiştir. 0 mM metformin varlığında tümör ve non-tumoral primer kültürleri arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmedi ($p=0,19$). Yine 25 mM metformin varlığında tümör ve non-tumoral primer kültürleri arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmedi ($p=0,06$). Non-tumoral primer kültüründe değişen dozlardaki metformin varlığında MMP-2 ekspresyonunda istatistiksel anlamlılık gözlenmedi ($p=0,40$). Tümör primer kültüründe de değişen dozlardaki metformin varlığında MMP-2 ekspresyonunda istatistiksel anlamlılık gözlenmedi ($p=0,73$).

4.4. MMP-9 ekspresyonunun immünohistokimyasal ve gerçek zamanlı polimeraz tepkimesi yöntemleriyle gösterilmesi

24. saatin sonunda seçilen iki dozda (kontrol-0 mM ve 25 mM) MMP-9 antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonunda elde edilen hücre profilleri Şekil 4-8’de gösterilmiştir.



Şekil 4-8: Tumor ve non-tumoral primer kültürlerine ait immünohistokimyasal MMP9 boyama profilleri. A) Non-tumoral (0 mM), B) Non-tumoral (25 mM), C) Tumor (0 mM), D) Tumor (25 mM).

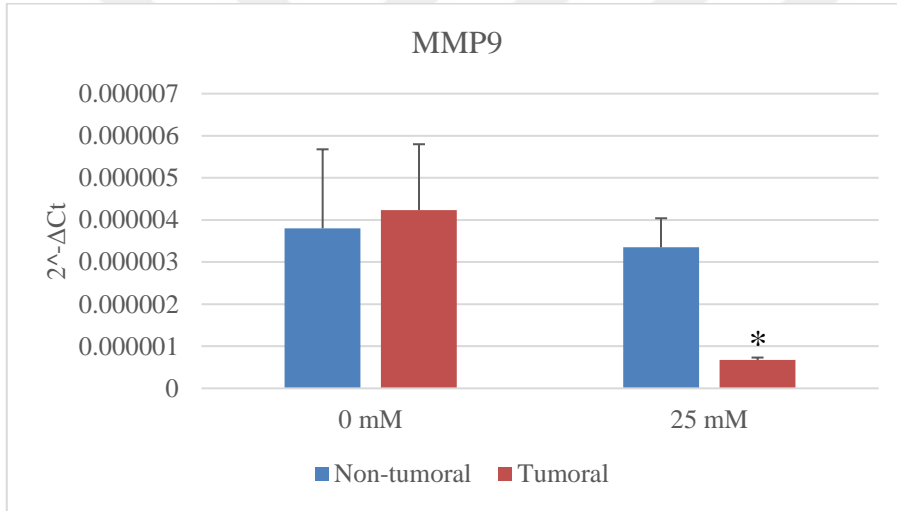


Şekil 4-9: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tumor ve non-tumoral primer hücrelerdeki immünohistokimyasal MMP-9 boyama profillerinin grafiksel değerlendirmesi.

a $P < 0,01$, b $P < 0,01$ non-tumoral gruplarla ile karşılaştırıldı

c $P < 0,001$ 0 mM tumor grubu ile karşılaştırıldı.

İmmünohistokimyasal MMP-9 boyaması sonrasında değerlendirilen hücelere ait grafik Şekil 4-9’da verilmiştir. MMP-9 ekspresyonunda tümör meme kültürünün 25 mM metformin dozundaki azalması istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi [p (a)=0,0021]. Tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki farklılık 0 mM metformin varlığında istatistiksel olarak anlamlı olarak gözlemlendi [p (b)=0,0017]. MMP-9 ekspresyonunda non-tumoral kültürün farklı (0 mM ve 25 mM) metformin dozlarındaki değişimi istatistiksel olarak anlamlı gözlemlenmedi (p=0,29). MMP-9 ekspresyonunun 25 mM metformin dozunda non-tumoral primer hücrelerine göre tümör kültürlerinde hala yüksek seviyelerde olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu [p (c)=0,0008].



Şekil 4-10: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle saptanan MMP-9 ekspresyonlarının grafiksel değerlendirmesi.

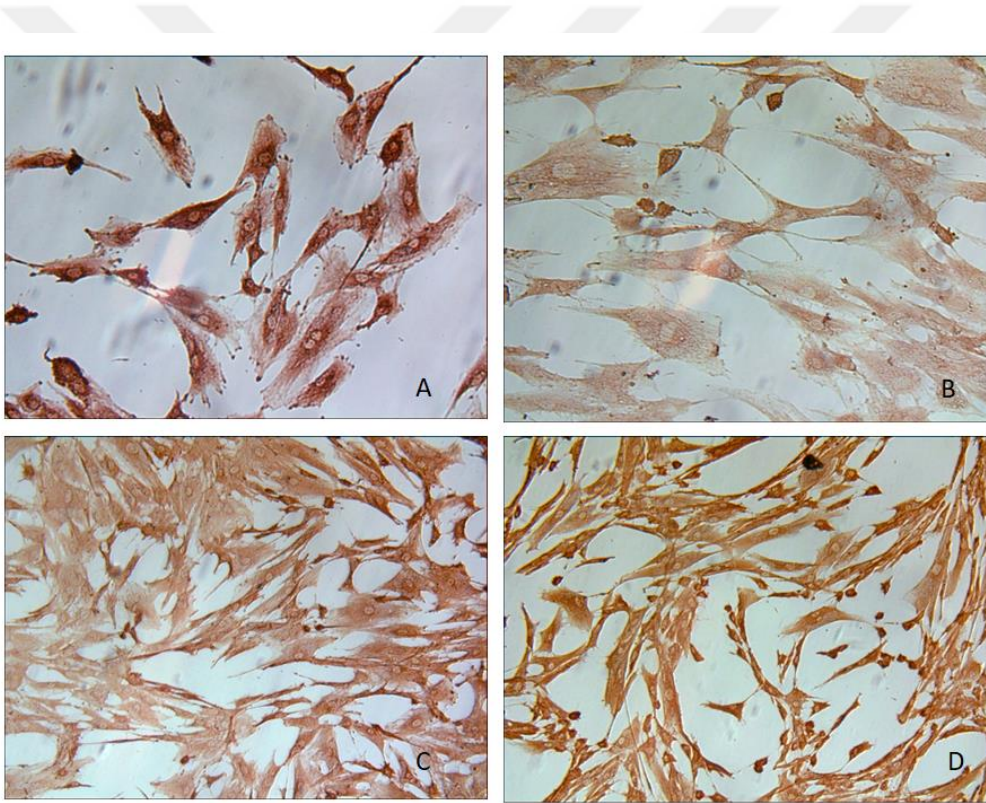
*P<0,05 non-tumoral grup ile karşılaştırıldı.

Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle 0 mM ve 25 mM metformin dozlarındaki MMP-9 ekspresyonu değişim grafiği Şekil 4-10’da gösterilmiştir. 25 mM metformin varlığında tümör ve non-tumoral primer kültürleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi (p=0,03). 0 mM metformin varlığında tümör ve non-tumoral primer kültürleri arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık

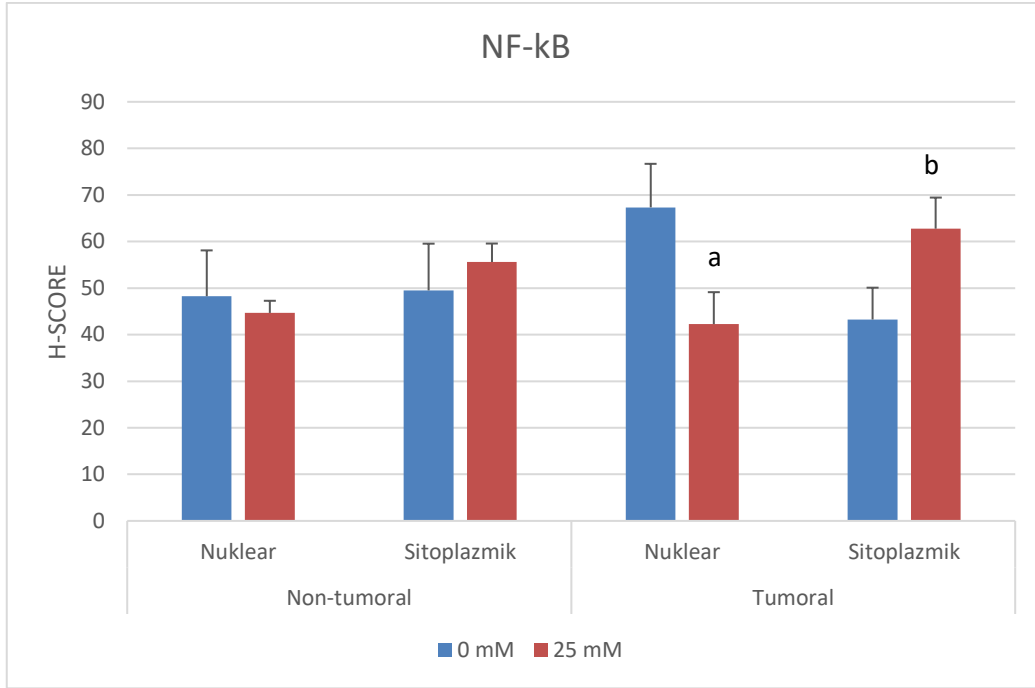
gözlenmedi ($p=0,50$). Non-tumoral primer kültüründe değişen dozlardaki metformin varlığında MMP-9 ekspresyonunda istatistiksel anlamlılık gözlenmedi ($p=0,35$).

4.5. NF-kB ekspresyonunun immünohistokimyasal ve gerçek zamanlı polimeraz tepkimesi yöntemleriyle gösterilmesi

NF-kB ekspresyonunun immünohistokimyasal ve gerçek zamanlı polimeraz tepkimesi yöntemleriyle gösterilmesi 24. saatin sonunda seçilen iki dozda (kontrol-0 mM ve 25 mM) N-kB antikoları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonunda elde edilen hücre profilleri Şekil 4-11'de gösterilmiştir.



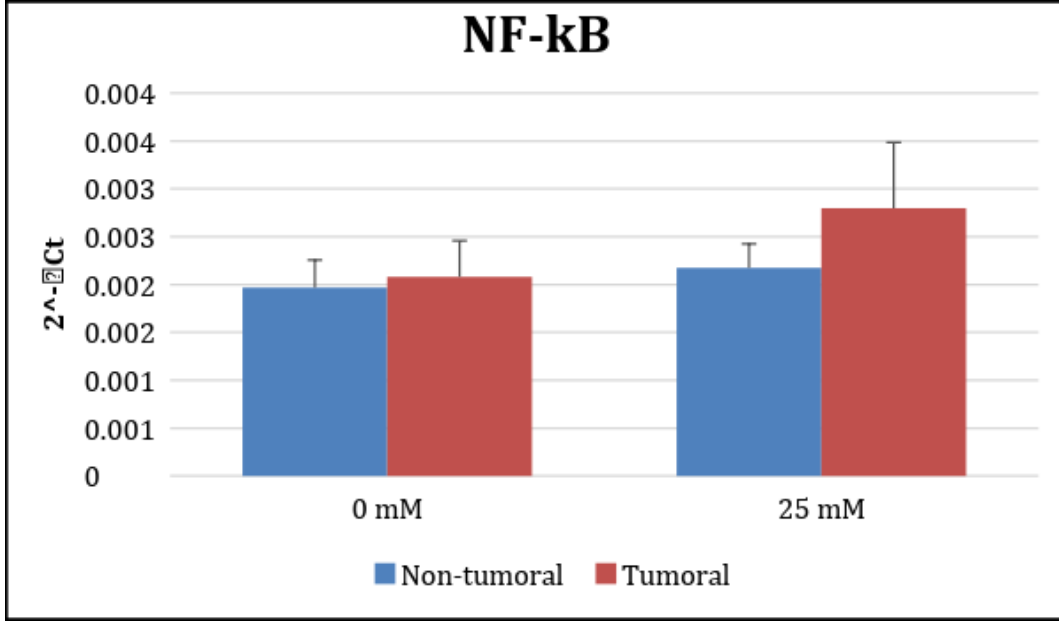
Şekil 4-11: Tumor ve non-tumoral primer hücre kültürlerine ait immünohistokimyasal NFKB boyama profilleri. A) Non-tumoral (0 mM), B) Non-tumoral (25 mM), C)Tumor (0 mM), D) Tumor (25 mM).



Şekil 4-12: Farklı hastalara ait (n=5) non-tumoral ve tümör primer kültürleri içerisinde farklı (0 mM ve 25 mM) metformin konsantrasyonlarındaki Nükleer ve Sitoplazmik NF-kB değişimi (%).

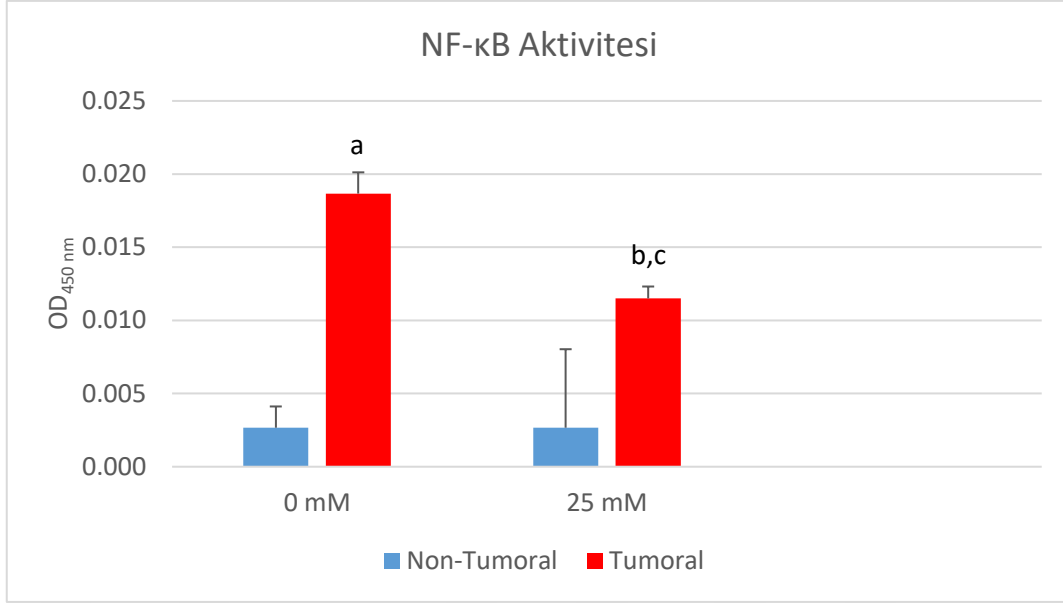
*P<0,05 0 mM grubu ile karşılaştırıldı.

İmmünohistokimyasal NF-kB boyaması sonrasında değerlendirilen hücelere ait grafik Şekil 4-12'de verilmiştir. Non-tumoral kültürün farklı (0 mM ve 25 mM) metformin dozlarındaki nükleer ve sitoplazmik NF-kB immunoreaktivite değişimleri istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi (sırasıyla p=0,40 ve p=0,90). Buna karşın tümör hücrelerinin 25 mM metformin dozu uygulandığında nükleer NF-kB reaktivitede anlamlı düzeyde düşüş görülürken sitoplazmik NF-kB reaktivitelerinde ise anlamlı düzeyde artış kaydedildi (sırasıyla p=0,029 ve p=0,024).



Şekil 4-13: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle saptanan NF-kB ekspresyonlarının grafiksel değerlendirmesi.

Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle 0 mM ve 25 mM metformin dozlarındaki N-kB ekspresyonu değişim grafiği Şekil 4-13'de gösterilmiştir. 0 mM ve 25 mM dozlarda metformin varlığında tümör ve non-tumoral primer kültürleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi (sırasıyla $p=0,79$ ve $p=0,52$). Tümör ve non-tumoral primer kültürlerinde de değişen dozlardaki metformin varlığında NF-kB ekspresyonlarında herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmedi (sırasıyla $p=0,52$ ve $p=0,69$).



Şekil 4-14: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki ELISA yöntemiyle saptanan NF-κB (p65) aktivitesinin grafiksel değerlendirmesi.

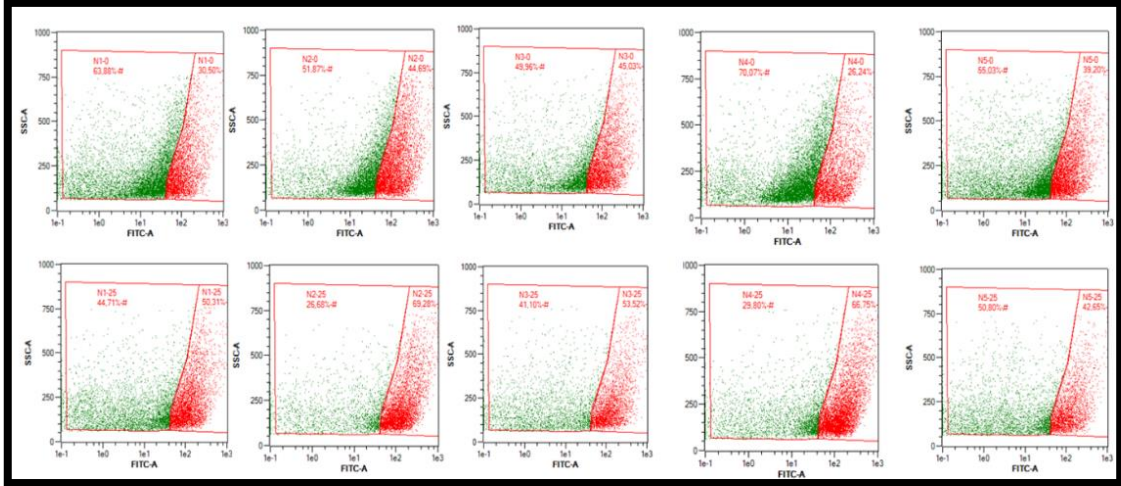
a $P < 0,01$ ve b $P < 0,05$ non-tumoral gruplarla karşılaştırıldı

c $P < 0,05$ 0 mM grubu ile karşılaştırıldı.

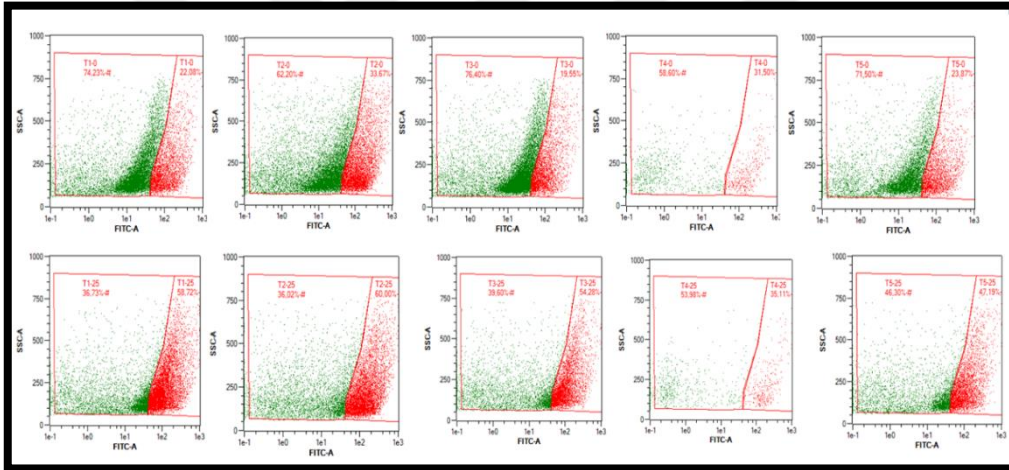
ELISA yöntemiyle 0 mM ve 25 mM metformin dozlarındaki NF-κB (p65) aktivite değişim grafiği Şekil 4-14'de gösterilmiştir. Metformin yokluğunda veya varlığında tümör hücrelerinin NF-κB (p65) aktivitelerinin non-tumoral primer hücrelerine kıyasla dramatik düzeyde yüksek olduğu izlendi [$p(a) = 0,0015$ ve $p(b) = 0,0496$]. Ancak 25 mM metformin varlığında tümör hücrelerinde NF-κB (p65) aktivitesinin 0 mM metformin dozuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi [$p(c) = 0,017$].

4.6. Apoptoz Değişiminin Akım Sitometri Yöntemiyle Gösterilmesi

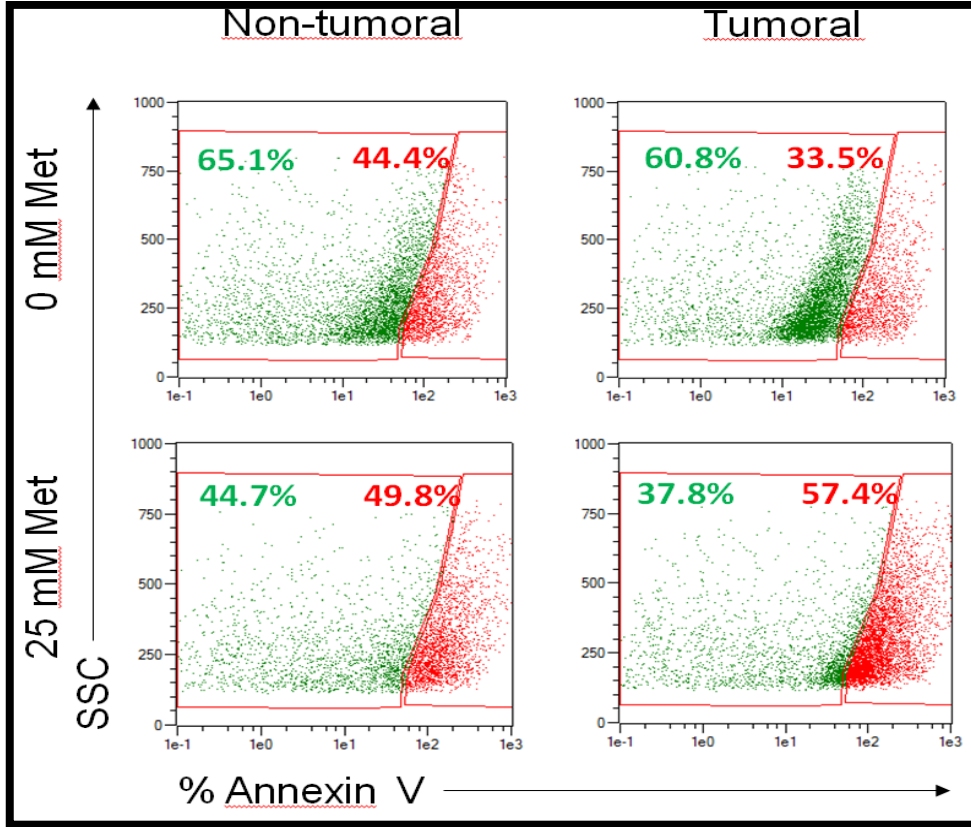
24. saatin sonunda seçilen iki dozda (kontrol, 0 mM ve 25 mM) Annexin V antikorları kullanılarak yapılan boyama sonunda elde edilen hücre profilleri akım sitometri cihazında görüntülendi. Çalışmaya ait 5 farklı hastanın non-tumoral primer kültürlerindeki farklı dozlardaki (0 mM ve 25 mM) metformin dağılımındaki profilleri Şekil 4-15'te, aynı hastaların tümör primer kültürlerindeki farklı dozlardaki (0 mM ve 25 mM) metformin dağılımındaki profilleri Şekil 4-16'da gösterilmiştir. Hastalara ait genel apoptoz değişim grafiği Şekil 4-17'de verilmiştir.



Şekil 4-15: Non-tumoral örneklere ait 0-25 mM metformin konsantrasyonlarındaki apoptoz değişimi.

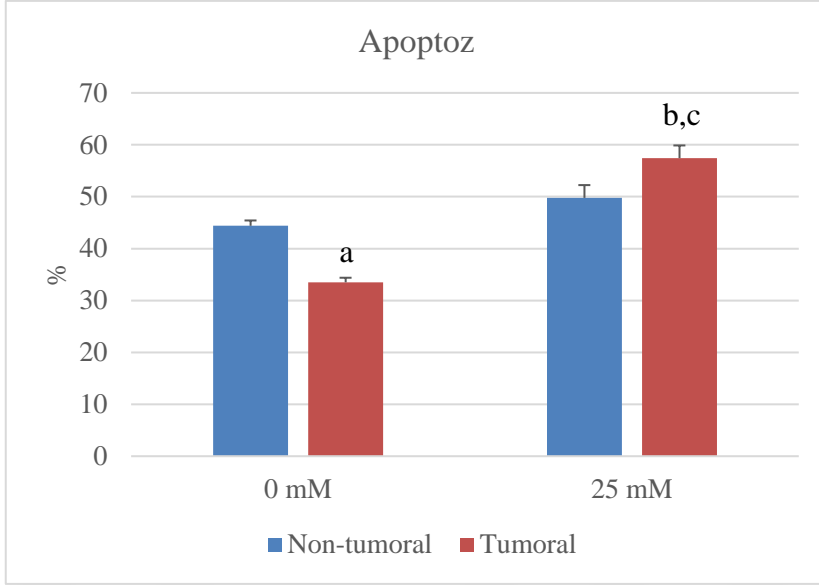


Şekil 4-16: Tümör örneklerine ait 0-25 mM metformin konsantrasyonlarındaki apoptoz değişimi



Şekil 4-17: Meme tümörü ile non-tumoral primer hücre kültürü arasında farklı (0 mM ve 25 mM) metformin konsantrasyonlarında apoptoz değişimi (%).

Akım sitometri yöntemiyle 0 mM ve 25 mM metformin dozlarındaki apoptoz değişim grafiği Şekil 4-18’de gösterilmiştir. 0 mM metformin varlığında tümör ve non-tumoral primer kültürleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi [$p(a) = 0,008$]. Yine 25 mM metformin varlığında tümör ve non-tumoral primer kültürleri arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlemlendi [$p(c) = 0,03$]. Tümör primer kültüründe de değişen dozlardaki metformin varlığında apoptozun artması istatistiksel olarak anlamlı bulundu [$p(b) < 0,0001$]. Non-tumoral primer kültüründe değişen dozlardaki metformin varlığında apoptozun artması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p = 0,10$)



Şekil 4-18: Farklı dozlardaki metformin (0 mM ve 25 mM) koşullarında tümör ve non-tumoral primer hücrelerdeki akım sitometri yöntemiyle saptanan apoptoz değişimlerinin grafiksel değerlendirilmesi.

a $P < 0,01$ ve b $P < 0,05$ non-tumoral gruplarla karşılaştırıldı

c $P < 0,001$ 0 mM grubu ile karşılaştırıldı.

4.7. Proteomiks

Non-tumoral primer hücre kültürü ile meme tümörü primer kültürlerinde yapılan proteomiks çalışması sonucu maksimum güvenlik seviyesinde, istatistiksel anlamı olan 5 farklı protein saptandı: GARS, NEFM, KRT7, ANP32A ve THAP3. Bu proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri Tablo 4-1’de gösterilmiştir. Non-tumoral primer hücre kültüründe tümör primer hücrelerine kıyasla bu proteinlerden ANP32A 15.8 kat, GARS 5.7 kat ve KRT7 6.6 kat yüksek saptanmıştır. Yine tümör primer hücre kültüründe non-tumoral primer hücre kültürüne kıyasla bu proteinlerden THAP3 9.4 kat, NEFM ise 41.2 kat yüksek olarak saptanmıştır.

Tablo 4-1: Farklı dokular (tümör ve non-tumoral) arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan proteinleri etkileyen proteinler

Protein	Proteini Etkileyen (Uyaran, Durduran) Proteinler (interactors)*
GARS	IARS-Izolüsin-tRNA sentetaz EEF1D-Ökaryotik translasyon elongasyon faktörü 1 delta
THAP3	HCFC1-Konak Hücre Faktör C1
KRT7	-----
ANP32A	SET-SET Nükleer Proto-onkogen HIST1H3A-Histone Cluster 1,H3a
NEFM	-----

*Güvenilirlik Seviyesi ≥ 3 GARS:Glisin tRNA sentetaz, THAP3: THAP domain içeren protein 3,

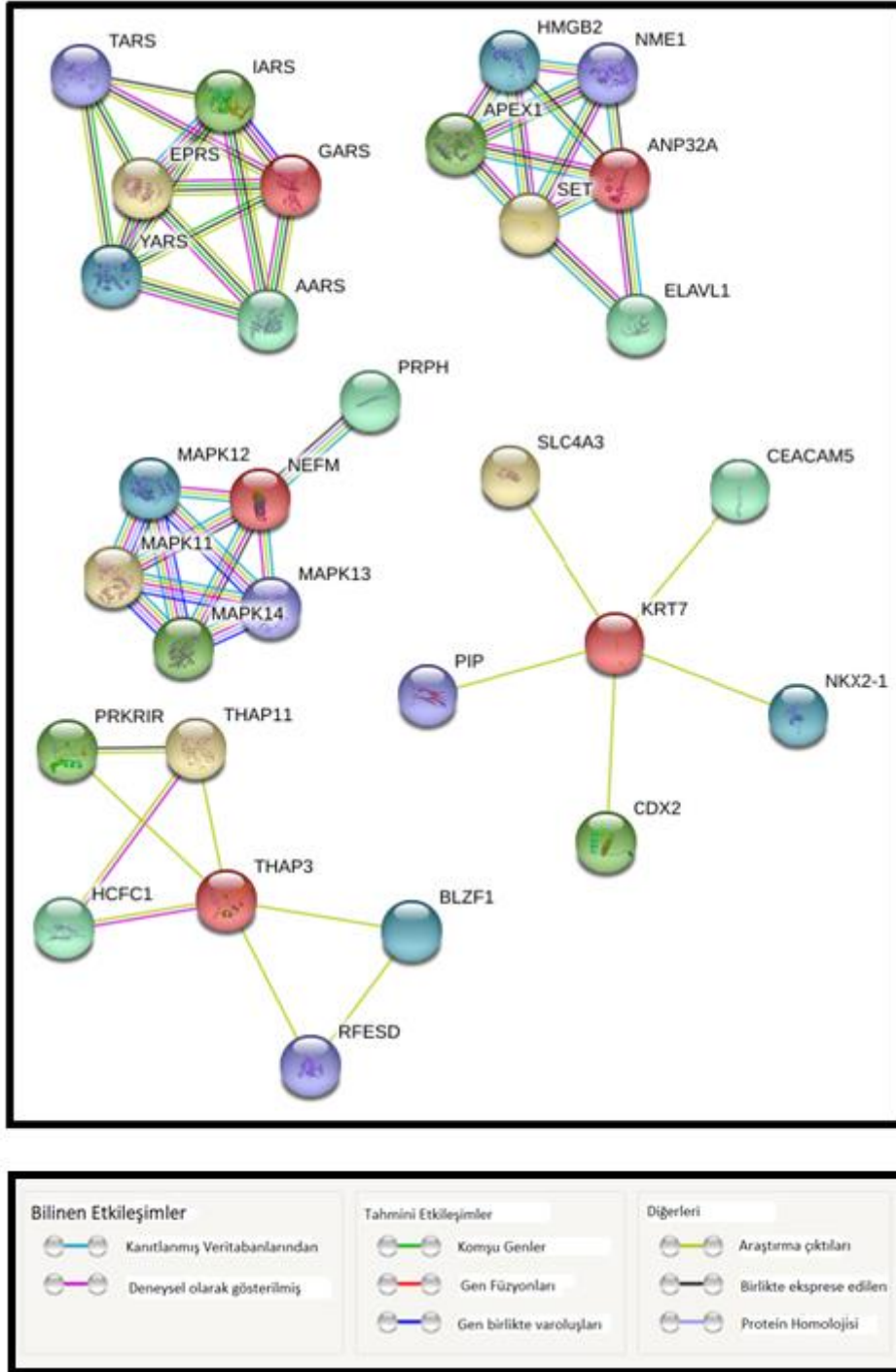
KRT7: Keratin 7, ANP32A: Asidik lösince zengin nükleer fosfoprotein 32A, NEFM : Nörofilament medyum

Saptanan proteinlere ait STRING analizleri Şekil 4-19'da, bu proteinlerle etkileşen (interactions) ve bu proteinleri etkileyen (interactors) proteinlerin güvenlik seviyesinin ≥ 3 olduğu koşullardaki durumu Tablo 4-1 ve Tablo 4-2'de gösterilmiştir. Bu proteinleri etkileyen proteinler (güvenlik seviyesi ≥ 3) Tablo 4-1'de, bu proteinlerle etkileşen (interactions) ve bu proteinleri etkileyen (interactors) proteinlerin (güvenlik seviyesi ≥ 3) sayıları Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-2: Farklı dokular (tümör ve non-tumoral) arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan proteinlere ait etkileyen ve bu proteinlerle etkileşen protein sayıları

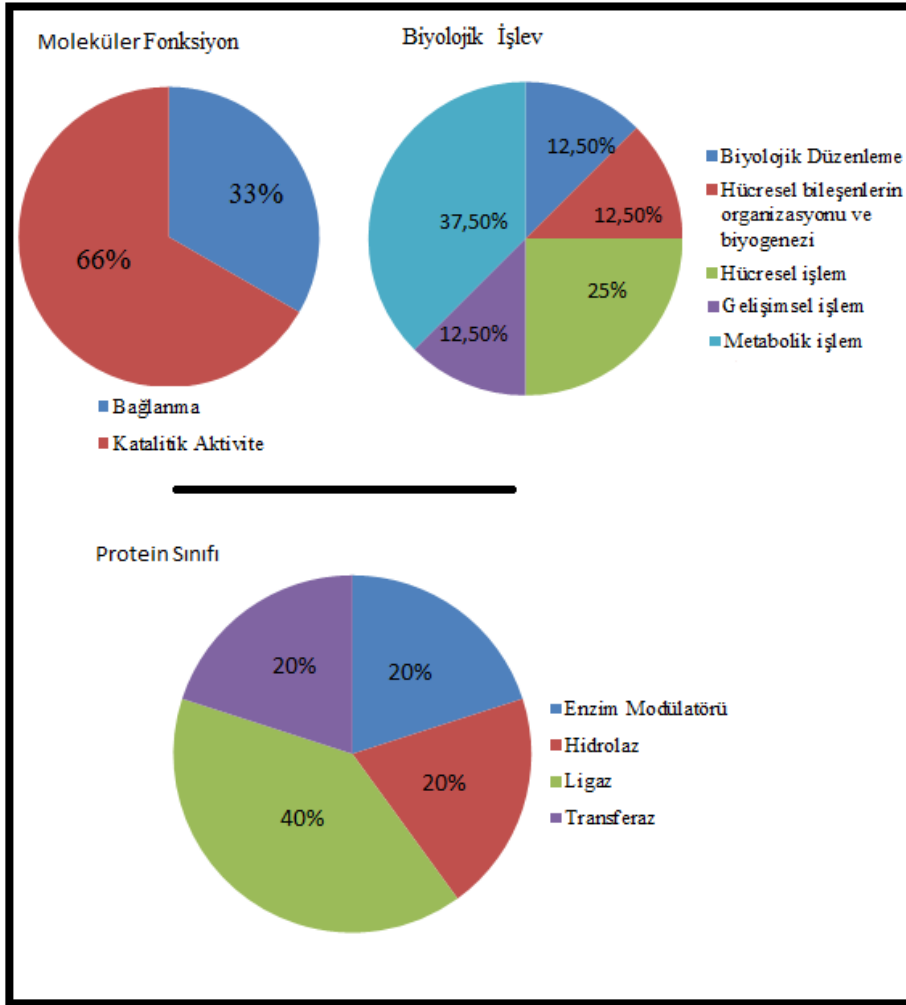
Protein	Proteini Etkileyen (Uyaran, Durduran) Protein Sayısı (interactors) (n)	Proteinin Etkileşimde olduğu Proteinler (interactions)* (n)
KRT7	14	12
NEFM	49	48
GARS	96	98
ANP32A	59	37
THP3	6	5

*Güvenilirlik Seviyesi ≥ 3



Şekil 4-19: İstatistiksel olarak anlamlı bulunan GARS, ANP32A, NEFM, KRT7 ve THAP3 proteinlerine ait STRING analizi.

Saptanan proteinlere ait PANTHER analizi Şekil 4-20’de gösterilmiştir.



Şekil 4-20: Saptanan proteinlere ait PANTHER analizi.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, 2015 yılında kadınlarda en sık rastlanan kanser türlerinden biri olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca, güncel kadın kanserleri istatistiklerinde meme kanseri oranının % 29 civarında olması beklenmektedir (Siegel ve ark., 2015). Hastaya kesin tanı koymak için yeterli olmasa da özellikle popülasyon taramalarında mamografi kullanılmaktadır. Mamografinin en temel problemi, meme kanseri hastalarının %10 kadarına tanı koyduramamasıdır (Schummer ve ark., 2010). 5 mm'den küçük tümörlere tanı konmasına olanak sağlayamamakta ve dahası, meme dokusu yoğun genç kadınlarda mamografik duyarlılığı azalttığı durumlarda etkinliği saptanamamaktadır (Ugnat ve ark., 2004).

Bu nedenlerle, meme kanseri tanısını iyileştirmek ve bu hastalık tanısı alan hastaların genel ve hastalısız sağ kalım oranlarını arttırmak için yeni yaklaşımlar geliştirilmelidir. Haliyle, meme kanseri erken tanısı için biyobelirteçlere çok ciddi ihtiyaç olmasına rağmen şu anda mevcut bir parametre bulunmamakta ve halk sağlığına etkisinin önemi hala gereken saygıyı görmemektedir (Li, 2011). Biyobelirteçler, gözlem ve analitik epidemiyoloji, randomize klinik çalışmalar, tarama, tanı ve prognoz uygulamalarıyla malignitelerin spektrumunu anlamak için güçlü ve dinamik bir yaklaşım sağlayabilecektir (Kumar ve ark., 2006).

Metformin, çeşitli süreçleri modüle eden pleiotropik bir ilaçtır (Wang ve ark., 2012). Retrospektif insan çalışmaları, metforminin daha düşük kanser insidansı ile ilişkili olduğunu (Ahn ve ark., 2007; Sachs ve ark., 2005) ve her ne kadar asıl kullanım amacı Tip 2 diyabette kalori kısıtlama yaparak hiperglisemiyi engellemek olsa da tümör progresyonunu azalttığını ortaya koymuştur (Evans ve ark., 2005; Ueda ve ark., 1996). Mekanik olarak, metforminin, in vitro ve in vivo olarak bir mitokondriyal kompleks I inhibitörü olarak işlev gördüğü gösterilmişse de (Greco ve ark., 2006; Porat ve ark., 2011) kanser hücrelerinin onkojenik potansiyellerini sınırlamak için azalan mitokondriyal oksidatif fosforilasyon kaynaklı metabolik pertürbasyona nasıl tepki verdiği çok net değildir.

Metformin, NF-kB ve meme kanseri arasındaki moleküler mekanizmaları araştırdığımız çalışmamızda birbirinden farklı 5 hastaya ait meme tümör ve non-tumoral örneklerden yapılan primer hücre kültürü deneylerinde birbirinden farklı metformin

dozlarında 24. Saat ve 72. Saat sonlarında canlılık çalışması gerçekleştirildi. Buna göre 25 mM metforminin tümör hücrelerine 24. saatin sonunda anti-proliferatif etki göstermesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,045$). Bu yüzden etkin zaman aralığı 24 saat seçilerek çalışmanın kalan kısımlarında deney süresi 24 saat olarak kabul edildi.

Aynı çalışmanın immünositokimya kısmında hücreler 24 saatlik zaman aralığında etkin dozu belirleyebilmek için farklı metformin dozlarında (0 mM, 5 mM, 10 mM ve 25 mM) BRDU yöntemiyle boyandı. Buna göre 25 mM metformin dozunda tümör primer hücre kültürü proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptandı ($p<0,0001$). Bu yüzden etkin metformin dozu 25 mM seçilerek çalışmanın kalan kısımlarında metforminin hücre canlılığına etkisi 25 mM olarak kabul edildi.

Sonuçlarımızda da görüldüğü üzere önemli ve klasik kanser ilaçlarının aksine, metformin in vitro sitotoksik olmayan konsantrasyonlarında antitümör aktivitesi gösterdiği için tipik bir sitotoksik ilaç gibi davranmamakta (Ueda ve ark., 1996) daha çok hücre metabolizması üzerinde etkili olup ve çoklu mekanizmalarla hücre proliferasyonunu baskılamaktadır (Pernicova ve Korbonits, 2014). Kim ve ark. MCF-7 meme kanseri hücre serisi ile antikanser biyobelirteç arayışı amaçlı yaptıkları çalışmada 15, 20 ve 25 mM metformin tercihinde bulunmuş, kontrol gruplarına kıyasla metformin uygulanan hücrelerde proliferasyonda metformin dozuna bağlı artan inhibisyon gözlemlemişlerdir (Kim ve ark., 2016). Yine Liu ve ark. MCF-7, BT-474 ve T47D meme kanseri hücre serileriyle yaptıkları çalışmada 0.01 mM ile 25 mM metformin aralığında dozlarla çalışmış, benzer şekilde kontrol gruplarında herhangi bir proliferasyon inhibisyonu gözlemlememiş, aynı çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücre serisinde ise metforminin 30 ve 50 mM dozdaki etkisine bakmışlardır (Liu ve ark., 2012). Sena ve ark. ise kolon kanserinde metforminin antikanser etkisi üzerine yaptıkları çalışmada 10, 25 ve 50 mM dozlarında metformin uygulamış, en etkin dozun 48 saat süreyle uygulanan 50 mM metformin olduğu sonucuna varmışlardır (Sena ve ark., 2018). Daha önce, 20 mmol / L'deki metforminin meme kanserine (Zakikhani ve ark., 2006), melanoma (Janjetovic ve ark., 2011) ve mide kanserine (Kato ve ark., 2012) karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Tip 2 diyabetik hastalara uygulanan metformin konsantrasyonu yaklaşık olarak 30-60 mol / L'dir (Martin-Castillo ve ark., 2010). Bu nedenle, kanser hücrelerine karşı etkili olduğu gösterilen metforminin

dozları, diyabetik bozukluklar için rutin olarak uygulanan dozdan yaklaşık 300-600 kat (yaklaşık 20 mmol / L) daha büyüktür ve ortak uygulamada kullanılan yaklaşık 1000 kat daha fazladır (He ve Wondisford, 2015). Bu açıdan bakıldığında da sonuçlarımız, metforminin düşük dozlarda bile etkili olduğunu, toksik olan yüksek metformin konsantrasyonlarının apoptoza yol açacağını doğrulamaktadır.

Çoğu meme kanseri tümöründe sık görülen bir özellik, hücre sağkalımı, proliferasyon, inflamasyon ve bağışıklıkta kritik rol oynayan transkripsiyon faktörleri ailesi olan NF-kB'nin konstitütif aktivasyonudur (Hayden ve Ghosh, 2004). Bozulan NF-kB aktivasyonu, p50, p52, p65, cRel ve RelB gibi proteinlerin kalıcı nükleer lokalizasyonu ile sonuçlanır, bu da anti-apoptotik proteinlerin upregülasyonu yoluyla hücre proliferasyonu ve ölüm arasındaki dengenin bozulmasına neden olur (Karin ve Lin, 2002). Gerçekten de, EGF'nin reseptörüne (epidermal büyüme faktörü reseptörü - EGFR) bağlanması nihayetinde NF-kB'yi aktive etmekte ve ÖR-negatif meme kanseri hücrelerinde bu transkripsiyon faktörünün artmış etkinliğine büyük olasılıkla katkıda bulunmaktadır (Shostak ve Chariot, 2011). ÖR fonksiyonunun kaybı, nihayetinde agresif, metastatik, hormona dirençli kanserler ile sonuçlanan sitokin ve büyüme faktörlerinin konstitütif sekresyonundan dolayı, NF-kB aktivitesi ve hiperaktif MAPK ile ilişkilidir (Ali ve Coombes, 2002). Progesteron reseptörünün aktivasyonu, DNA bağlanması ve transkripsiyon aktivitesini azaltarak NF-KB ile uyarılan gen ekspresyonunun inhibisyonuna yol açabilir (Kalkhoven ve ark., 1996). HER-2, şaşırtıcı bir şekilde IKKa'yı içeren kanonik yolak üzerinden NF-kB'yi aktive eder (Merkhofer ve ark., 2010). NF-kB aktivasyonu, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar. NF-kB ile ilişkili olduğu bilinen en temel meme kanseri, İnflamatuar Meme Kanseri'(IBC) olup, IBC'yi diğer meme kanseri tiplerinden ayıran başlıca özellikler, hızlı bir şekilde ilerleyen meme iltihaplanmasını ve aşırı bir metastaz eğilimi içeren benzersiz bir fenotipidir. Üç yıllık sağ kalım oranı, inflammatuar olmayan meme kanserinde % 85 iken, IBC'de yaklaşık % 40'tır (Jaiyesimi ve ark., 1992). NF-kB-düzenlenmiş genler invazyon, proliferasyon, anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve inflamasyonda rol oynarlar ve IBC'ye ait özellikleri açıklamak için iyi adaylardır (Aggarwal, 2004; Karin ve ark., 2002). Artan kanıtlar, NF-kB ile ilişkili yolların meme kanseri de dahil olmak üzere birçok malignitede bozulmuş olduğunu göstermektedir (Biswas ve ark., 2004; Cao ve Karin, 2003; Cogswell ve ark., 2000; Huber ve ark., 2004; Nakshatri ve ark., 1997). Tümör hücrelerinde apoptozu negatif olarak düzenleyen çeşitli gen ürünleri NF-kB

aktivasyonu ile kontrol edilmektedir (Sethi ve ark., 2008). C. Montagut ve ark. sitoplazmik veya nükleer NF-kB ekspresyonu ile tümör boyutu, nodal durumu, grade, histolojik tip, ÖR ve HER-2 / neu dahil olmak üzere klinik patolojik özellikler arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadığını ancak p65 aktivasyonunun neoadjuvan kemoterapiye dirençle bağlantılı olduğunu rapor etmiştir (Liu ve ark., 2006). Yamei Zhou ve ark. NF-kB'nin aktivasyonunun, hormona bağımlı meme kanserlerinin yüksek riskli bir alt kümesini tanımladığını göstermiştir (Zhou ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda ise NF-kB'nin farklı metformin dozlarındaki (0 mM ve 25 mM) etkisine bakıldığında 25 mM metformin varlığında non-tumoral primer hücre kültüründe istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı değişiklik gözlenmedi. Tümör primer kültüründe ise 25 mM metformin varlığında nuklear NF-KB ekspresyonunda anlamlı bir düşüş gözlenirken (0,029), sitoplazmik NF-kB ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (p=0,024). Aynı ekspresyon çalışması gerçek zamanlı polimeraz tepkimesiyle de tekrarlanmasına rağmen metformin varlığında/olmadığında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi.

NF-kB'ye ait aktivasyon çalışmasında ise hem metformin varlığında hem de metformin yokluğunda NF-kB aktivitesi non-tumoral hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla 0,049 ve 0,015). 25 mM metformin varlığında tümör hücrelerindeki NF-kB aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (p<0,0001).

Meme kanseri olan hastaların yaklaşık % 40'ında mikrometastaz olduğu bilinmektedir. Bu saptanamayan kansere bağlı sorun, hastaların gelecekte ölümlerine yol açabilmektedir (Liu ve ark., 2006). Ekstraselüler matriksin bozulması, tümör hücrelerinin lokal doku ve kan damarlarını istila etmesine ve yeni bir metastatik konuma geçmesine izin veren önemli bir işlemdir. Tümör hücreleri büyük ölçüde tümör invazyonu ve metastazını etkileyen serin proteinazlar, aspartik proteinazlar, sistein proteinazlar ve MMPLer salgılar (Nagase ve ark., 2006; Page-McCaw ve ark., 2007; Stamenkovic, 2000). MMPLer hemen hemen her tip kanserde düzenlenir ve ekspresyonları proliferasyon, invazyon, epitelyal-mezenkimal transformasyon, metastaz ve anjiyogenez dahil olmak üzere kanser progresyonunun çeşitli vital yönleriyle bağlantılıdır (Benson ve ark., 2013). MMP'ler genellikle kötü bir prognozla ilişkilidir (Curran ve ark., 2004). Özellikle, MMP-1, -2, -3, -7, -9 ve -14'ün, tümör invazyonu,

metastaz ve anjiyogenezde kilit faktörler olduğu düşünülmektedir (Chabottaux ve ark., 2006; Pivetta ve ark., 2011; Sternlicht ve Bergers, 2000; Surowiak ve ark., 2001). MMP-1 ve -9, kanser hücresi proliferasyonu, tümör invazyonu ve epitelyal-mezenkimal transformasyonla ilişkilendirilmiştir (Balduyck ve ark., 2000; Basset ve ark., 1990; Chabottaux ve ark., 2006; Delassus ve ark., 2008; Hegedus ve ark., 2008). Meme kanseri dokusunda, ELISA ile normal meme dokusuna kıyasla daha yüksek bir MMP-1 ve -9 protein konsantrasyonu rapor edilmiştir (Przybylowska ve ark., 2006). Birçok çalışma, MMP sayısının genel ekspresyonunun meme tümörü progresyonu ile birlikte arttığını ve bazı MMP'lerin tümör invazyonu, metastaz veya daha kötü sonuçla ilişkili olduğunu göstermiştir (Song ve ark., 2013). MMP-9 potansiyel bir biyobelirteçtir ve yüksek ekspresyonu birçok kanser türünde gösterilmiştir (Kim ve ark., 2006), bununla birlikte ekspresyonu meme kanseri üzerinde yapılan tüm çalışmalarda tutarlı değildir. İnvazif duktal karsinomada artan MMP-9 ekspresyonunun bazı çalışmalarda potansiyel bir biyobelirteç olduğu rapor edilmiştir (Fernandez-Guinea ve ark., 2013; Sullu ve ark., 2011). Çalışmamızda MMP-9'un farklı metformin dozlarındaki (0 mM ve 25 mM) etkisine bakıldığında, 0 mM metformin varlığında MMP-9 ekspresyonunun tümör primer hücrelerinde non-tumoral olanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu saptandı ($p=0,0017$). 25 mM metformin varlığında tümör primer hücre kültüründeki MMP-9 ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,0021$). Aynı ekspresyon çalışması gerçek zamanlı polimeraz tepkimesiyle de tekrarlandığında ise tümör primer kültürlerinde 25 mM metformin varlığındaki MMP-9'daki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,03$)

Feng ve ark. tarafından sunulan bir mikrodizi deneyine dayanan sonuçlarda, MMP-2'nin, "yüksek riskli grup" 'de tarif edilen hastalarda aşırı eksprese edildiği gösterildi (Feng ve ark., 2007). Tüm kanserlerinde MMP-2 tutulumunu doğrulayan birkaç prelinik yayın bulunmaktadır. Mide, pankreas ve prostat kanserleri olan hastalarda yüksek MMP-2 seviyesinin olumsuz sonuçları öngördüğü gösterilmiştir (Agnantis ve ark., 2004). Di Carlo ve ark., MMP-9 / MMP-2 oranının benign hastalıklar ve sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında kanser hastalarında daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, tümör hücrelerinde, stromal fibroblastlarda gözlemlenen ve tümör hücrelerinde infiltre olan bu proteazın yüksek konsantrasyonu, tümör invazyonu, metastatik potansiyel ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Di Carlo ve ark., 2005). Ogasawara ve ark. ayrıca insan meme kanseri dokusu ve hücre serilerinde yüksek

seviyelerde MMP-2'ye dikkat çekmiştir (Ogasawara ve ark., 2005). İlginç olarak, bazı tümörlerde, lenf nodu metastazları ve azalan MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri arasında bir korelasyon gözlenmektedir (Hao ve ark., 2004). Talvensaari-Mattila ve ark. MMP-2'nin, hormon reseptörü negatif kötü prognoz alt grubundaki hastalarda yer alan geniş bir seride meme karsinomunda prognostik faktör olarak rolünü göstermiştir (Talvensaari-Mattila ve ark., 1998). İlginç bir şekilde, meme kanseri tümörlerinde yüksek seviyelerde MMP-2'nin, agresif hastalık belirteci olan HER2 / neu gen amplifikasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Decock ve ark., 2007; Decock ve ark., 2005; La Rocca ve ark., 2004). MMP-2 ekspresyonu, invaziv meme kanseri hücre dizisi MDA-MB-231'de invaziv olmayan MCF-7 veya referans HBL-100 meme hücresi soyuna kıyasla daha yüksek olarak gözlenmektedir (Jeziarska ve ark., 2006; Jeziarska ve ark., 2006). Mendes ve ark., beyinde MMP-2 aktivitesinin eşlik ettiği mikro-metastaz gelişimini gözlemlemiş, meme kanseri beyin metastazının gelişimini hayvanlarda önemli ölçüde azaltabildikleri ve seçici sentetik MMP inhibitörü olan PD 166793 ile tedavi ile ENU1546'nın invaziv hücre davranışını azaltabildiklerini göstermiştir (Mendes ve ark., 2007; Mendes ve ark., 2005). Liu ve ark. tümör dokusunda saptanan MMP-2 düzeyinin meme kanseri hastalarının tümör boyutu ile anlamlı derecede pozitif korelasyon gösterdiğini belirtmiştir (Liu ve ark., 2006). MMP-2 ve diğer metalloproteinazların, örneğin MMP-9'un birlikte ekspresyonu, tanısı konan nod-negatif meme kanseri hastalarında da anlamlı prognostik değere sahiptir (Kim ve ark., 2006). Bizim çalışmada ise MMP-2'nin farklı metformin dozlarındaki (0 mM ve 25 mM) etkisine bakıldığında ilk anda MMP-2 ekspresyonunun tümör primer hücrelerinde non-tumoral olanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu saptandı ($p=0,0003$). 25 mM metformin varlığında tümör primer hücre kültüründeki MMP-2 ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0004$). Aynı ekspresyon çalışması gerçek zamanlı polimeraz tepkimesiyle de tekrarlanmasına rağmen metformin varlığında ya da hiç uygulanmadığında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi.

Kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması, genetik olarak programlanmış hücre ölümünün -apoptozun azalan seviyesi ile ilişkilidir (Waxman ve Schwartz, 2003). Apoptoz, hücre ölümünü başlatmak için çeşitli moleküllerin aktivasyonu dahil, sıkı bir şekilde düzenlenmiş programlanmış hücre ölüm sürecidir. Tümör hücrelerinde apoptozun spesifik aktivasyonu kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım

sunmaktadır. Hücrenin programlanmış hücre ölümü için doğal mekanizması olan apoptoz, özellikle uzun ömürlü memelilerde (Danial ve Korsmeyer, 2004) homeostazın yanı sıra gelişimde kritik bir rol oynadığı için önemlidir (Hassan ve ark., 2014). DNA hasarı veya kontrolsüz proliferasyon dahil olmak üzere apoptotik yolun aktive olmasına neden olacak çok çeşitli koşullar vardır (Lopez ve Tait, 2015). Apoptotik kontrolün kaybı, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmalarına ve tümör ilerlemesi sırasında invazyonu arttırabilen, anjiyojenezi uyarabilen, hücre proliferasyonunu deregüle edebilen ve farklılaşmayı engelleyebilen mutasyonların birikmesi için daha fazla zaman sağlar (Hassan ve ark., 2014). Bu nedenle kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen sitotoksik ajanlar antikanser kemoterapötik ajanlar olarak kullanılır (Hickman, 1992). Haliyle, kemoterapi, radyasyon ve hormonal tedavileri içeren geleneksel tedavilerin tümü, meme kanseri hücrelerini yok etmek için büyük ölçüde apoptozu dayanır (Parton ve ark., 2001). Yasmeen ve ark., over kanserinde apoptoz etkenine baktıkları bir çalışmada metforminin, OVCAR-3 hücre serisinde daha belirgin bir etki göstermekle birlikte OVCAR-3 ve OVCAR-4 hücre serilerinde doza bağlı (0 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM) apoptozu neden olduğunu rapor etmişlerdir (Yasmeen ve ark., 2011). Malki ve ark., bir başka apoptoz çalışmasında MCF-7 meme kanseri hücre serisinde 10 mM metformin dozunda metformin verilmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede apoptotik hücre ölümü olduğunu rapor etmişlerdir (Malki ve Youssef, 2011). Karşılaştırmalı olarak yaptığımız akım sitometri yöntemiyle yapılan apoptoz çalışmasında, ilk anda apoptoz oranları non-tumoral olanlarda tümör hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,008$). 25 mM metformin varlığında tümör hücrelerinde apoptozdaki artış non-tumoral hücrelerdekilere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,03$). Tümör hücreleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise 25 mM metformin varlığında apoptozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$).

Fosforilasyonlar, asetilasyonlar, glikozilasyonlar, alternatif RNA ekleme, translasyon sonrası modifikasyonlar ve protein kırılmaları dahil olmak üzere proteinlerin ifadesi 1 000 000'a kadar çıkabilir (Andersson ve ark., 2007). Gen dizisi ve hücre fizyolojisi arasında doğrudan bağlantı sağlayan proteomiklerin, hastalık gelişimi, prognozu ve tedaviye yanıtı değerlendirmek için genomik analizleri tamamlaması beklenmektedir (Fink-Retter ve ark., 2009). Son yıllarda kullanılan proteomik yöntemler giderek artmaktadır. Yüksek verimle, proteomik teknikleri kullanarak çok

sayıda proteinlerin eşzamanlı analizinin yapılması, yanlış protein biyobelirteçlerinin keşfine sebep olabilmektedir (Zakharchenko ve ark., 2011). Bu nedenle, proteomik çalışmalar için önerilmiş olan bireysel biyobelirteçlerin tanımlanmasını ve ifade değişimini teyit etmek için ikinci bir bağımsız teknik (örneğin, immünoablota) kullanılmaktadır. Tarif edilen proteomik metodolojiler varsayılan protein biyobelirteçlerinin hücrel lokalizasyonu ile ilgili herhangi bir bilgi sağlamadığından, gerekli klinik bilgilerle yeterli sayıda uygun klinik numunenin mevcudiyetine dayanarak klinik validasyon sağlayabilen yöntemler kullanılarak daha fazla analiz yapılması bir gereklilik arz etmektedir. Kanseri göstergelerinin tanımlanmasında, proteomik teknolojiler, farklılaşma, fonksiyonel ve düzenleyici yolları tanımlama, doku ve biyolojik sıvılardaki hastalığa neden olan moleküllerin yapısını belirleme, hastalığa veya kişiye özgü farklılıklar ve hastalık aşamalarını ortaya koyma gibi değerli bilgiler üretilmektedir.

Bununla birlikte kanserin, büyüme kontrolü, yaşlanma, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi bir takım hücrel süreçlerdeki ardışık genetik değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Mommers ve ark., 1999; J. S. Reis-Filho ve Lakhani, 2003). Sonuç olarak, araştırmacılar başlangıçta yeni biyobelirteçler sağlayan genomik ve transkriptomik yaklaşımlar kullanarak, yeni biyobelirteçler kanserin genetik temeline dair anlayışımızı genişletecek çalışmalar yapmışlardır (Miki ve ark., 1994; van 't Veer ve ark., 2002; Vogelstein ve Kinzler, 1994; Wang ve ark., 2005). Bununla birlikte, şu anda, gen analizinin kendi başına tamamlanmamış bir resim sağladığı anlaşılmaktadır. Hem mRNA'nın hem de proteinlerin alternatif birleşmesinden dolayı, 100'den fazla benzersiz post-translasyonel modifikasyonla birleştirildiğinde, bir gen birden fazla protein türüne neden olabilmektedir (Banks ve ark., 2000). Proteome analizi, gen dizisi ve hücrel fizyoloji arasındaki bağlantıyı sağlayabildiğinden (Dove, 1999), proteomiklerin hastalık gelişimi, prognozu ve tedaviye yanıtı değerlendirmek için gen analizlerini tamamlaması beklenir (Clarke ve ark., 2003). 2-DE analizini ve MALDI-TOF MS'yi kullanarak, Liu ve arkadaşları 14-3-3 σ ekspresyonunu artıran insan kanserine ait hücre dizilerinin, ilaç direncine katkıda bulunduğunu, böyle bir değişikliğin klinik kemoterapiye dirençle ilişkili olduğunu gösterdi (Liu ve ark., 2006).

Homo sapiens keratin 7, tip II (KRT7), bir protein kodlayıcı gen olup Tip II sitokeratinler, heterotipik keratin zincirlerinin çiftleri halinde düzenlenmiş ve basit ve

tabakalı epitelyal dokuların farklılaşması sırasında birlikte eksprese edilen bazik veya nötr proteinlerdir (Karantza, 2011). KRT7 aşırı ekspresyonu servikal (Lambaudie ve ark., 2014) ve kolorektal kanserler (Harbaum ve ark., 2011) dahil olmak üzere birçok neoplastik hastalıkta gözlenmekte ve sitoskeletal sinyalleşme ve EGFR1 yolu dahil olmak üzere çeşitli kanser ile ilişkili yollarda rol oynamaktadır (Kanduc, 2002; Pujal ve ark., 2009; Sandilands ve ark., 2013). Gastrik kanserde (Huang ve ark., 2016) ve mesane kanserinde up-regüle olduğu gösterilmiştir (Aaboe ve ark., 2005). KRT7, buna karşın bizim ilk andaki protein karakterizasyonu çalışmamızda non-tumoral primer kültüründe tümör hücrelerine kıyasla 15.8 kat yüksek olarak saptanmıştır.

GARS bir tRNA ligaz olup RNA polimeraz II aracılı transkripsiyon düzenlemesinde aktif rol üstlenmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda (Yao ve Fox, 2013) ve özellikle kolorektal kanserlerde (Croner ve ark., 2017) ekspresyonunda artış gözlenmiştir. GARS, buna karşın bizim ilk andaki protein karakterizasyonu çalışmamızda non-tumoral primer kültüründe tümör hücrelerine kıyasla 5.7 kat yüksek olarak saptanmıştır.

Fonksiyonel olarak, ANP32A katı tümörlerde onkogen veya tümör supresörü olarak görev yapabilir. Prostat kanserinde (Kadkol ve ark.,1998), kolorektal kanserde (Shi ve ark., 2011), yumurtalık kanserinde (Li ve ark., 2012; Ouellet ve ark., 2006) ve karaciğer kanserinde (Li ve ark., 2012) yüksek ANP32A ekspresyonu gözlenmiştir. Bir ksenograft modelinde karaciğer kanserinin büyümesini teşvik ettiği (Zhu ve ark., 2010) ve kötü diferansiye prostat karsinom hücrelerinin proliferasyonunu koruduğu rapor edilmiştir (Brody ve ark., 2004). Diğer taraftan, ANP32A'nın onkojen aracılı transformasyonu ve apoptoz aktivasyonu yoluyla servikal kanser hücresi büyümesini bastırdığı gösterilmiştir (Pan ve ark., 2009). ANP32A'nın bu karşıt işlevleri, ilgili hücrelerin farklı genetik geçmişine atfedilebilir. ANP32A, apoptoz mekanizmalarının sağlam olduğu hücrelerde hücre ölümüne neden olurken, apoptoz yolları bozulmuş hücrelerin proliferasyonunu indükleyebilir (Reilly ve ark., 2014). ANP32A, buna karşın bizim ilk andaki protein karakterizasyonu çalışmamızda non-tumoral primer kültüründe tümör hücrelerine kıyasla 6.6 kat yüksek olarak saptanmıştır.

NEFM'nin prostat kanserlerinde ekspresyonel olarak azaldığı (Penney ve ark., 2015) ve özellikle kanser gelişiminde metilasyona uğradığı gösterilmiştir (Calmon ve ark., 2015). NEFM, buna karşın bizim ilk andaki protein karakterizasyonu

çalışmamızda tümör hücrelerinde non-tumoral primer kültürüne kıyasla 41.2 kat yüksek olarak saptanmıştır.

Meme kanseri, önümüzdeki yıllarda kadın ölüm nedenleri arasında zirvede olacak gibi görünmektedir. Erken tanının hayat kurtardığı düşünüldüğünde bu hastalığa ait kesin bir biyobelirtecin henüz bulunamamış olması hem bu hastalık üzerinde çalışan araştırmacı sayısını arttırmakta hem de bu hastalık için biyobelirteç ararken tesadüfi de olsa başka hastalıklar için yeni tanı malzemeleri edinmeyi kolaylaştırmaktadır. Meme kanseri de diğer kanserler gibi inflamasyon seviyesinin belirgin bir şekilde arttığı bir hastalıktır. İnflamasyonun beyni olarak nitelendirilen NF-kB metformin ile birlikte etki ettikleri doğru yolağın keşfi neticesinde meme kanseri tedavisinde olumlu sonuçlar verebilir gibi görünmektedir. Yine kontrollü deneylerle yapılan çalışmalar neticesinde örneklerden yapılacak bir proteomiks analiz, eldeki makroskopik ve moleküler verilerin birbiriyle olan ilişkisini kurgulamaya yardımcı olabilecektir.

KAYNAKLAR

Aaboe, M., Marcussen, N., Jensen, K. M., Thykjaer, T., Dyrskjot, L., ve Orntoft, T. F. (2005). Gene expression profiling of noninvasive primary urothelial tumours using microarrays. *Br J Cancer*, 93(10), 1182-1190.

doi:10.1038/sj.bjc.6602813

Aarsand, A. K., ve Carlsen, S. M. (1998). Folate administration reduces circulating homocysteine levels in NIDDM patients on long-term metformin treatment. *J Intern Med*, 244(2), 169-174.

Abdel-Fatah, T. M., Perry, C., Dickinson, P., Ball, G., Moseley, P., Madhusudan, S., . . . Chan, S. Y. (2013). Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Ann Oncol*, 24(11), 2801-2807. doi:10.1093/annonc/mdt277

Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, 6(3), 203-208. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.003

Agnantis, N. J., Goussia, A. C., Batistatou, A., ve Stefanou, D. (2004). Tumor markers in cancer patients. an update of their prognostic significance. Part II. *In Vivo*, 18(4), 481-488.

Agou, F., Ye, F., Goffinont, S., Courtois, G., Yamaoka, S., Israel, A., ve Veron, M. (2002). NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J Biol Chem*, 277(20), 17464-17475. doi:10.1074/jbc.M201964200

Ahn, J. H., McAvoy, T., Rakhilin, S. V., Nishi, A., Greengard, P., ve Nairn, A. C. (2007). Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(8), 2979-2984.

doi:10.1073/pnas.0611532104

Al-Zaidan, L., El Ruz, R. A., ve Malki, A. M. (2017). Screening Novel Molecular Targets of Metformin in Breast Cancer by Proteomic Approach. *Front Public Health*, 5, 277. doi:10.3389/fpubh.2017.00277

Algire, C., Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., Amrein, L., Petrucci, L., Birman, E., . . . Pollak, M. N. (2012). Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5(4), 536-543. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0536

Ali, S., ve Coombes, R. C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, 2(2), 101-112. doi:10.1038/nrc721

Allred, D. C. (2008). Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. *Oncologist*, 13(11), 1134-1136. doi:10.1634/theoncologist.2008-0184

Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., Brawley, O. W. J. B. c. r., ve treatment. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. 76(1), 27-36.

Anderson, W. F., Chu, K. C., Chatterjee, N., Brawley, O., ve Brinton, L. A. (2001). Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol*, 19(1), 18-27. doi:10.1200/JCO.2001.19.1.18

Andersson, T., Johansson, M., Bolmsjo, G., ve James, P. (2007). Automating MALDI sample plate loading. *J Proteome Res*, 6(2), 894-896. doi:10.1021/pr0603607

Andrzejewski, S., Gravel, S. P., Pollak, M., ve St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab*, 2, 12. doi:10.1186/2049-3002-2-12

Argaud, D., Roth, H., Wiernsperger, N., ve Leverve, X. M. (1993). Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 213(3), 1341-1348.

Arpino, G., Weiss, H., Lee, A. V., Schiff, R., De Placido, S., Osborne, C. K., ve Elledge, R. M. (2005). Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative

breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst*, 97(17), 1254-1261. doi:10.1093/jnci/dji249

Aujaleu, M., ve Denoix, M. (1952). [Orientation of the battle against cancer in France]. *Tech Hosp Med Soc Sanit*, 7(77), 28-31.

Azar, M., ve Lyons, T. J. (2010). Diabetes, insulin treatment, and cancer risk: what is the evidence? *F1000 Med Rep*, 2. doi:10.3410/M2-4

Badve, S., ve Nakshatri, H. J. J. o. c. p. (2009). Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. *62*(1), 6-12.

Balduyck, M., Zerimech, F., Gouyer, V., Lemaire, R., Hemon, B., Grard, G., . . . Huet, G. (2000). Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis*, 18(2), 171-178.

Banks, R. E., Dunn, M. J., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C., Blackstock, W., Pappin, D. J., ve Selby, P. J. (2000). Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*, 356(9243), 1749-1756. doi:10.1016/S0140-6736(00)03214-1

Bardou, V. J., Arpino, G., Elledge, R. M., Osborne, C. K., ve Clark, G. M. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*, 21(10), 1973-1979. doi:10.1200/JCO.2003.09.099

Barone, B. B., Yeh, H. C., Snyder, C. F., Peairs, K. S., Stein, K. B., Derr, R. L., . . . Brancati, F. L. (2010). Postoperative mortality in cancer patients with preexisting diabetes: systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(4), 931-939. doi:10.2337/dc09-1721

Bartke, A., ve Brown-Borg, H. (2004). Life extension in the dwarf mouse. *Curr Top Dev Biol*, 63, 189-225. doi:10.1016/S0070-2153(04)63006-7

Bartlett, J., Mallon, E., ve Cooke, T. (2003). The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol*, 199(4), 411-417. doi:10.1002/path.1354

Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., . . . Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, 348(6303), 699-704. doi:10.1038/348699a0

Ben Sahra, I., Laurent, K., Loubat, A., Giorgetti-Peraldi, S., Colosetti, P., Auberger, P., . . . Bost, F. (2008). The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*, 27(25), 3576-3586. doi:10.1038/sj.onc.1211024

Bensaad, K., ve Vousden, K. H. (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol*, 17(6), 286-291. doi:10.1016/j.tcb.2007.04.004

Benson, C. S., Babu, S. D., Radhakrishna, S., Selvamurugan, N., ve Ravi Sankar, B. (2013). Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis Markers*, 34(6), 395-405. doi:10.3233/DMA-130986

Bertrand, F., Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Prunier, C., Robin, H., Capeau, J., . . . Cherqui, G. (1999). Insulin antiapoptotic signaling involves insulin activation of the nuclear factor kappaB-dependent survival genes encoding tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and manganese-superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 274(43), 30596-30602.

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 81(1), 1-5. doi:10.1189/jlb.0306164

Bishop, N. A., ve Guarente, L. (2007). Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet*, 8(11), 835-844. doi:10.1038/nrg2188

Biswas, D. K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A. B., ve Iglehart, J. D. (2004). NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and

its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(27), 10137-10142. doi:10.1073/pnas.0403621101

Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., . . . Strano, S. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nat Commun*, 3, 865. doi:10.1038/ncomms1859

Blenkiron, C., Goldstein, L. D., Thorne, N. P., Spiteri, I., Chin, S. F., Dunning, M. J., . . . Miska, E. A. (2007). MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*, 8(10), R214. doi:10.1186/gb-2007-8-10-r214

Bonafe, M., ve Olivieri, F. (2015). Circulating microRNAs in aging. *Oncotarget*, 6(3), 1340-1341. doi:10.18632/oncotarget.3175

Bonanni, B., Puntoni, M., Cazzaniga, M., Pruneri, G., Serrano, D., Guerrieri-Gonzaga, A., . . . Decensi, A. (2012). Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *J Clin Oncol*, 30(21), 2593-2600. doi:10.1200/JCO.2011.39.3769

Borresen-Dale, A. L. (2003). TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*, 21(3), 292-300. doi:10.1002/humu.10174

Brody, J. R., Kadkol, S. S., Hauer, M. C., Rajaii, F., Lee, J., ve Pasternack, G. R. (2004). pp32 reduction induces differentiation of TSU-Pr1 cells. *Am J Pathol*, 164(1), 273-283. doi:10.1016/S0002-9440(10)63117-3

Brown-Borg, H. M. (2009). Hormonal control of aging in rodents: the somatotropic axis. *Mol Cell Endocrinol*, 299(1), 64-71. doi:10.1016/j.mce.2008.07.001

Bruunsgaard, H., Pedersen, M., ve Pedersen, B. K. (2001). Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol*, 8(3), 131-136.

Bullrich, F., Fujii, H., Calin, G., Mabuchi, H., Negrini, M., Pekarsky, Y., . . . Croce, C. M. (2001). Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL:

identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer Res*, 61(18), 6640-6648.

Calao, M., Burny, A., Quivy, V., Dekoninck, A., ve Van Lint, C. (2008). A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends Biochem Sci*, 33(7), 339-349. doi:10.1016/j.tibs.2008.04.015

Calmon, M. F., Jeschke, J., Zhang, W., Dhir, M., Siebenkas, C., Herrera, A., . . . Ahuja, N. (2015). Epigenetic silencing of neurofilament genes promotes an aggressive phenotype in breast cancer. *Epigenetics*, 10(7), 622-632. doi:10.1080/15592294.2015.1050173

Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120(4), 513-522. doi:10.1016/j.cell.2005.02.003

Cao, J., Meng, S., Chang, E., Beckwith-Fickas, K., Xiong, L., Cole, R. N., . . . He, L. (2014). Low concentrations of metformin suppress glucose production in hepatocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem*, 289(30), 20435-20446. doi:10.1074/jbc.M114.567271

Cao, Y., ve Karin, M. (2003). NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8(2), 215-223.

Cardoso, F., Durbecq, V., Larsimont, D., Paesmans, M., Leroy, J. Y., Rouas, G., . . . Di Leo, A. (2004). Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol*, 24(1), 201-209.

Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., . . . Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492-2502. doi:10.1001/jama.295.21.2492

Chabottaux, V., Sounni, N. E., Pennington, C. J., English, W. R., van den Brule, F., Blacher, S., . . . Noel, A. (2006). Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res*, *66*(10), 5165-5172. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3012

Che, W., Lerner-Marmarosh, N., Huang, Q., Osawa, M., Ohta, S., Yoshizumi, M., . . . Abe, J. (2002). Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Circ Res*, *90*(11), 1222-1230.

Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., . . . Parker, J. S. J. J. J. o. t. N. C. I. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *101*(10), 736-750.

Cheang, M. C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., . . . Nielsen, T. O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*, *14*(5), 1368-1376. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1658

Chen, J., Xu, T., ve Chen, C. (2015). The critical roles of miR-21 in anti-cancer effects of curcumin. *Ann Transl Med*, *3*(21), 330. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.20

Chen, L. F., ve Greene, W. C. (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med (Berl)*, *81*(9), 549-557. doi:10.1007/s00109-003-0469-0

Chen, Y., Voegeli, T. S., Liu, P. P., Noble, E. G., ve Currie, R. W. (2007). Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm Allergy Drug Targets*, *6*(2), 91-100.

Chia, S., Norris, B., Speers, C., Cheang, M., Gilks, B., Gown, A. M., . . . Gelmon, K. (2008). Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol*, *26*(35), 5697-5704. doi:10.1200/JCO.2007.15.8659

Chin, K., DeVries, S., Fridlyand, J., Spellman, P. T., Roydasgupta, R., Kuo, W.-L., . . . Ryder, T. J. C. c. (2006). Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *10*(6), 529-541.

Chumakov, P. M. (2007). Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc)*, *72*(13), 1399-1421.

Cioce, M., Valerio, M., Casadei, L., Pulito, C., Sacconi, A., Mori, F., . . . Blandino, G. (2014). Metformin-induced metabolic reprogramming of chemoresistant ALDHbright breast cancer cells. *Oncotarget*, *5*(12), 4129-4143.
doi:10.18632/oncotarget.1864

Clarke, W., Zhang, Z., ve Chan, D. W. (2003). The application of clinical proteomics to cancer and other diseases. *Clin Chem Lab Med*, *41*(12), 1562-1570.
doi:10.1515/CCLM.2003.239

Cogswell, P. C., Guttridge, D. C., Funkhouser, W. K., ve Baldwin, A. S., Jr. (2000). Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*, *19*(9), 1123-1131.
doi:10.1038/sj.onc.1203412

Colomer, R., Beltran, M., Dorcas, J., Cortes-Funes, H., Hornedo, J., Valentin, V., . . . Ciruelos, E. (2005). It is not time to stop progesterone receptor testing in breast cancer. *J Clin Oncol*, *23*(16), 3868-3869; author reply 3869-3870.
doi:10.1200/JCO.2005.05.203

Colozza, M., Azambuja, E., Cardoso, F., Sotiriou, C., Larsimont, D., ve Piccart, M. J. (2005). Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol*, *16*(11), 1723-1739.
doi:10.1093/annonc/mdi352

Coornaert, B., Carpentier, I., ve Beyaert, R. (2009). A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem*, *284*(13), 8217-8221.
doi:10.1074/jbc.R800032200

Corominas-Faja, B., Quirantes-Pine, R., Oliveras-Ferraros, C., Vazquez-Martin, A., Cufi, S., Martin-Castillo, B., . . . Menendez, J. A. (2012). Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging (Albany NY)*, 4(7), 480-498. doi:10.18632/aging.100472

Correa Geyer, F., ve Reis-Filho, J. S. (2009). Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *Int J Surg Pathol*, 17(4), 285-302. doi:10.1177/1066896908328577

Creighton, C. J., Li, X., Landis, M., Dixon, J. M., Neumeister, V. M., Sjolund, A., . . . Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), 13820-13825. doi:10.1073/pnas.0905718106

Croner, L. J., Dillon, R., Kao, A., Kairs, S. N., Benz, R., Christensen, I. J., . . . Wilcox, B. (2017). Discovery and validation of a colorectal cancer classifier in a new blood test with improved performance for high-risk subjects. *Clin Proteomics*, 14, 28. doi:10.1186/s12014-017-9163-z

Curran, S., Dundas, S. R., Buxton, J., Leeman, M. F., Ramsay, R., ve Murray, G. I. (2004). Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res*, 10(24), 8229-8234. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0424

Cuzick, J., Dowsett, M., Wale, C., Salter, J., Quinn, E., Zabaglo, L., . . . Forbes, J. (2009). Prognostic Value of a Combined ER, PgR, Ki67, HER2 Immunohistochemical (IHC4) Score and Comparison with the GHI Recurrence Score—Results from TransATAC. In: AACR.

Dai, X., Chen, A., ve Bai, Z. J. S. r. (2014). Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. 4, 6566.

Dandachi, N., Dietze, O., ve Hauser-Kronberger, C. (2002). Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the

detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest*, 82(8), 1007-1014.

Danial, N. N., ve Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.

Danilova, N. (2006). The evolution of immune mechanisms. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 306(6), 496-520. doi:10.1002/jez.b.21102

de Cremoux, P., Tran-Perennou, C., Elie, C., Boudou, E., Barbaroux, C., Poupon, M. F., . . . Magdelenat, H. (2002). Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. *Biochem Pharmacol*, 64(3), 507-515.

de Jager, J., Kooy, A., Lehert, P., Wulffele, M. G., van der Kolk, J., Bets, D., . . . Stehouwer, C. D. (2010). Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ*, 340, c2181. doi:10.1136/bmj.c2181

de Magalhaes, J. P., Curado, J., ve Church, G. M. (2009). Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*, 25(7), 875-881. doi:10.1093/bioinformatics/btp073

Decock, J., Hendrickx, W., Drijkoningen, M., Wildiers, H., Neven, P., Smeets, A., ve Paridaens, R. (2007). Matrix metalloproteinase expression patterns in luminal A type breast carcinomas. *Dis Markers*, 23(3), 189-196.

Decock, J., Hendrickx, W., Wildiers, H., Christiaens, M. R., Neven, P., Drijkoningen, M., ve Paridaens, R. (2005). Plasma gelatinase levels in patients with primary breast cancer in relation to axillary lymph node status, Her2/neu expression and other clinicopathological variables. *Clin Exp Metastasis*, 22(6), 495-502. doi:10.1007/s10585-005-3992-2

Delassus, G. S., Cho, H., Park, J., ve Eliceiri, G. L. (2008). New pathway links from cancer-progression determinants to gene expression of matrix

metalloproteinases in breast cancer cells. *J Cell Physiol*, 217(3), 739-744.
doi:10.1002/jcp.21548

DeMeester, S. L., Buchman, T. G., ve Cobb, J. P. (2001). The heat shock paradox: does NF-kappaB determine cell fate? *FASEB J*, 15(1), 270-274.
doi:10.1096/fj.00-0170hyp

Desmedt, C., Sotiriou, C., ve Piccart-Gebhart, M. J. J. C. i. (2009). Development and validation of gene expression profile signatures in early-stage breast cancer. 27(1), 1-10.

Di Carlo, A., Terracciano, D., Mariano, A., ve Macchia, V. (2005). Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 type IV collagenases in serum of patients with pleural effusions. *Int J Oncol*, 26(5), 1363-1368.

Dove, A. (1999). Proteomics: translating genomics into products? *Nat Biotechnol*, 17(3), 233-236. doi:10.1038/6972

Dowling, R. J., Niraula, S., Stambolic, V., ve Goodwin, P. J. (2012). Metformin in cancer: translational challenges. *J Mol Endocrinol*, 48(3), R31-43.
doi:10.1530/JME-12-0007

Dowling, R. J., Zakikhani, M., Fantus, I. G., Pollak, M., ve Sonenberg, N. (2007). Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res*, 67(22), 10804-10812.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2310

Dowsett, M., Cuzick, J., Wale, C., Howell, T., Houghton, J., ve Baum, M. (2005). Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study. *J Clin Oncol*, 23(30), 7512-7517. doi:10.1200/JCO.2005.01.4829

Dowsett, M., Houghton, J., Iden, C., Salter, J., Farndon, J., A'hern, R., . . . Baum, M. J. A. o. O. (2006). Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. 17(5), 818-826.

Drahota, Z., Palenickova, E., Endlicher, R., Milerova, M., Brejchova, J., Vosahlikova, M., . . . Cahova, M. (2014). Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res*, 63(1), 1-11.

Drzewoski, J., Drozdowska, A., ve Sliwinska, A. (2011). Do we have enough data to confirm the link between antidiabetic drug use and cancer development? *Pol Arch Med Wewn*, 121(3), 81-87.

Duffy, M. J., Maguire, T. M., Hill, A., McDermott, E., ve O'Higgins, N. (2000). Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*, 2(4), 252-257.

Dunnwald, L. K., Rossing, M. A., ve Li, C. I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 9(1), R6. doi:10.1186/bcr1639

Duong, J. K., Kumar, S. S., Kirkpatrick, C. M., Greenup, L. C., Arora, M., Lee, T. C., . . . Day, R. O. (2013). Population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects and patients with type 2 diabetes mellitus: simulation of doses according to renal function. *Clin Pharmacokinet*, 52(5), 373-384. doi:10.1007/s40262-013-0046-9

Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., ve Gelinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*, 25(51), 6800-6816. doi:10.1038/sj.onc.1209938

Ejlertsen, B., Jensen, M. B., Nielsen, K. V., Balslev, E., Rasmussen, B. B., Willemsen, G. L., . . . Brunner, N. (2010). HER2, TOP2A, and TIMP-1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 28(6), 984-990. doi:10.1200/JCO.2009.24.1166

Elledge, R. M., Green, S., Pugh, R., Allred, D. C., Clark, G. M., Hill, J., . . . Osborne, C. K. (2000). Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry

in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer*, 89(2), 111-117.

Ellis, M. J., Tao, Y., Luo, J., A'Hern, R., Evans, D. B., Bhatnagar, A. S., . . . Dowsett, M. (2008). Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst*, 100(19), 1380-1388. doi:10.1093/jnci/djn309

Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong le, A., Rawlinson, L., Mason, J. C., . . . Evans, P. C. (2008). NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J Biol Chem*, 283(11), 7036-7045. doi:10.1074/jbc.M708690200

Esserman, L. J., Ozanne, E. M., Dowsett, M., ve Slingerland, J. M. J. B. C. R. (2005). Tamoxifen may prevent both ER+ and ER-breast cancers and select for ER-carcinogenesis: an alternative hypothesis. 7(6), R1153.

Evans, J. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R., ve Morris, A. D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, 330(7503), 1304-1305. doi:10.1136/bmj.38415.708634.F7

Fan, C., Oh, D. S., Wessels, L., Weigelt, B., Nuyten, D. S., Nobel, A. B., . . . Perou, C. M. (2006). Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*, 355(6), 560-569. doi:10.1056/NEJMoa052933

Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., . . . Iggo, R. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, 24(29), 4660-4671. doi:10.1038/sj.onc.1208561

Fatima, R., Akhade, V. S., Pal, D., ve Rao, S. M. (2015). Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther*, 3, 5. doi:10.1186/s40591-015-0042-6

Faubert, B., Vincent, E. E., Poffenberger, M. C., ve Jones, R. G. (2015). The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett*, 356(2 Pt A), 165-170. doi:10.1016/j.canlet.2014.01.018

Feng, Y., Sun, B., Li, X., Zhang, L., Niu, Y., Xiao, C., . . . Hao, X. (2007). Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 103(3), 319-329. doi:10.1007/s10549-006-9385-7

Fernandez-Guinea, O., Alvarez-Cofino, A., Eiro, N., Gonzalez, L. O., del Casar, J. M., Fernandez-Garcia, B., . . . Vizoso, F. J. (2013). Low microvascular density at the tumor center is related to the expression of metalloproteases and their inhibitors and with the occurrence of distant metastasis in breast carcinomas. *Int J Clin Oncol*, 18(4), 629-640. doi:10.1007/s10147-012-0428-2

Ferno, M., Stal, O., Baldetorp, B., Hatschek, T., Kallstrom, A. C., Malmstrom, P., . . . Ryden, S. (2000). Results of two or five years of adjuvant tamoxifen correlated to steroid receptor and S-phase levels. South Sweden Breast Cancer Group, and South-East Sweden Breast Cancer Group. *Breast Cancer Res Treat*, 59(1), 69-76.

Fink-Retter, A., Czerwenka, K., Gschwantler-Kaulich, D., Hudelist, G., Pischinger, K., Manavi, M., . . . Singer, C. F. (2009). Proteomics in mammary cancer research. *Eur J Gynaecol Oncol*, 30(6), 635-639.

Fitzgibbons, P. L., Page, D. L., Weaver, D., Thor, A. D., Allred, D. C., Clark, G. M., . . . Schnitt, S. J. (2000). Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 124(7), 966-978. doi:10.1043/0003-9985(2000)124<0966:PFIBC>2.0.CO;2

Forget, M. A., Desrosiers, R. R., ve Beliveau, R. (1999). Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol*, 77(7), 465-480.

Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., . . . Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on

aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*, 128(1), 92-105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016

Franceschi, C., Valensin, S., Bonafe, M., Paolisso, G., Yashin, A. I., Monti, D., ve De Benedictis, G. (2000). The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol*, 35(6-7), 879-896.

Frid, A., Sterner, G. N., Londahl, M., Wiklander, C., Cato, A., Vinge, E., ve Andersson, A. (2010). Novel assay of metformin levels in patients with type 2 diabetes and varying levels of renal function: clinical recommendations. *Diabetes Care*, 33(6), 1291-1293. doi:10.2337/dc09-1284

Friedman, R., ve Hughes, A. L. (2002). Molecular evolution of the NF-kappaB signaling system. *Immunogenetics*, 53(10-11), 964-974. doi:10.1007/s00251-001-0399-3

Fulford, L., Easton, D., Reis-Filho, J., Sofronis, A., Gillett, C., Lakhani, S., ve Hanby, A. J. H. (2006). Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *49*(1), 22-34.

Gandini, S., Puntoni, M., Heckman-Stoddard, B. M., Dunn, B. K., Ford, L., DeCensi, A., ve Szabo, E. (2014). Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)*, 7(9), 867-885. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0424

Garbett, E. A., Reed, M. W., Stephenson, T. J., ve Brown, N. J. (2000). Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol*, 53(2), 99-106.

Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., . . . Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 9(3), 215-236. doi:10.1038/nrd3028

Giambernardi, T. A., Grant, G. M., Taylor, G. P., Hay, R. J., Maher, V. M., McCormick, J. J., ve Klebe, R. J. (1998). Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol*, 16(8), 483-496.

Gilchrist, S. E., ve Alcorn, J. (2010). Lactation stage-dependent expression of transporters in rat whole mammary gland and primary mammary epithelial organoids. *Fundam Clin Pharmacol*, 24(2), 205-214. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00760.x

Giovannucci, E., Harlan, D. M., Archer, M. C., Bergenstal, R. M., Gapstur, S. M., Habel, L. A., . . . Yee, D. (2010). Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*, 33(7), 1674-1685. doi:10.2337/dc10-0666

Gloire, G., Legrand-Poels, S., ve Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*, 72(11), 1493-1505. doi:10.1016/j.bcp.2006.04.011

Goldhirsch, A., Wood, W. C., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thurlimann, B., Senn, H. J., ve th St. Gallen, c. (2007). Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol*, 18(7), 1133-1144. doi:10.1093/annonc/mdm271

Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J. K., . . . Williams, K. M. (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*, 50(2), 81-98. doi:10.2165/11534750-000000000-00000

Greco, S., Storelli, C., ve Marsigliante, S. (2006). Protein kinase C (PKC)-delta/-epsilon mediate the PKC/Akt-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in MCF-7 cells stimulated by bradykinin. *J Endocrinol*, 188(1), 79-89. doi:10.1677/joe.1.06433

Guo, L. S., Li, H. X., Li, C. Y., Zhang, S. Y., Chen, J., Wang, Q. L., . . . Wu, Y. J. (2015). Synergistic antitumor activity of vitamin D3 combined with metformin in human breast carcinoma MDA-MB-231 cells involves m-TOR related signaling pathways. *Pharmazie*, 70(2), 117-122.

Gupta, S., ve Gollapudi, S. (2005). Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 1034-1042. doi:10.1016/j.biocel.2004.08.013

Gupta, S., Wulf, G., Henjakovic, M., Koepsell, H., Burckhardt, G., ve Hagos, Y. (2012). Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. *J Pharmacol Exp Ther*, *341*(1), 16-23. doi:10.1124/jpet.111.190561

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., . . . Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, *30*(2), 214-226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003

Habraken, Y., ve Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol*, *72*(9), 1132-1141. doi:10.1016/j.bcp.2006.07.015

Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S., ve Croce, C. M. (1994). Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*, *54*(8), 2095-2097.

Ham, A. C., Enneman, A. W., van Dijk, S. C., Oliai Araghi, S., Swart, K. M., Sohl, E., . . . van der Velde, N. (2014). Associations between medication use and homocysteine levels in an older population, and potential mediation by vitamin B12 and folate: data from the B-PROOF Study. *Drugs Aging*, *31*(8), 611-621. doi:10.1007/s40266-014-0192-2

Han, G., Gong, H., Wang, Y., Guo, S., ve Liu, K. (2015). AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. *Cancer Biol Ther*, *16*(1), 77-87. doi:10.4161/15384047.2014.987021

Han, T. K., Everett, R. S., Proctor, W. R., Ng, C. M., Costales, C. L., Brouwer, K. L., ve Thakker, D. R. (2013). Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes. *Mol Pharmacol*, *84*(2), 182-189. doi:10.1124/mol.112.084517

Hao, X., Sun, B., Hu, L., Lahdesmaki, H., Dunmire, V., Feng, Y., . . . Zhang, W. (2004). Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer*, *100*(6), 1110-1122. doi:10.1002/cncr.20095

Harbaum, L., Pollheimer, M. J., Kornprat, P., Lindtner, R. A., Schlemmer, A., Rehak, P., ve Langner, C. (2011). Keratin 7 expression in colorectal cancer-- freak of nature or significant finding? *Histopathology*, *59*(2), 225-234.

doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03694.x

Hardie, D. G., ve Alessi, D. R. (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol*, *11*, 36. doi:10.1186/1741-7007-11-36

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, *11*(3), 298-300.

Harris, L. N., You, F., Schnitt, S. J., Witkiewicz, A., Lu, X., Sgroi, D., . . . Winer, E. P. (2007). Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*, *13*(4), 1198-1207. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1304

Harrison, J. C., ve Haber, J. E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet*, *40*, 209-235.

doi:10.1146/annurev.genet.40.051206.105231

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., ve Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, *2014*, 150845.

doi:10.1155/2014/150845

Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., Fogarty, S., . . . Hardie, D. G. (2010). Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab*, *11*(6), 554-565.

doi:10.1016/j.cmet.2010.04.001

Hayden, M. S., ve Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, *18*(18), 2195-2224. doi:10.1101/gad.1228704

Hayes, D. F., Thor, A. D., Dressler, L. G., Weaver, D., Edgerton, S., Cowan, D., . . . Leukemia Group, B. I. (2007). HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med*, *357*(15), 1496-1506.

doi:10.1056/NEJMoa071167

Hayflick, L. (2007). Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both. *PLoS Genet*, 3(12), e220. doi:10.1371/journal.pgen.0030220

He, L., ve Wondisford, F. E. (2015). Metformin action: concentrations matter. *Cell Metab*, 21(2), 159-162. doi:10.1016/j.cmet.2015.01.003

Hegedus, L., Cho, H., Xie, X., ve Eliceiri, G. L. (2008). Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *J Cell Physiol*, 216(2), 480-485. doi:10.1002/jcp.21417

Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S. K., ve Salminen, A. (1996a). Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, 28(3), 487-498. doi:10.1006/jmcc.1996.0045

Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S. K., ve Salminen, A. (1996b). Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem J*, 318 (Pt 2), 603-608.

Helenius, M., Kyrylenko, S., Vehvilainen, P., ve Salminen, A. (2001). Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor-kappa B binding activity. *Antioxid Redox Signal*, 3(1), 147-156. doi:10.1089/152308601750100669

Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., . . . Rickinson, A. (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, 65(7), 1107-1115.

Hennessy, B. T., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Gilcrease, M. Z., Krishnamurthy, S., Lee, J. S., . . . Mills, G. B. (2009). Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*, 69(10), 4116-4124. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3441

Hennessey, M. B., Schiml-Webb, P. A., ve Deak, T. (2009). Separation, Sickness, and Depression: A New Perspective on an Old Animal Model. *Curr Dir Psychol Sci*, 18(4), 227-231. doi:10.1111/j.1467-8721.2009.01641.x

Hickman, J. A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 11(2), 121-139.

Honjo, S., Ajani, J. A., Scott, A. W., Chen, Q., Skinner, H. D., Stroehlein, J., . . . Song, S. (2014). Metformin sensitizes chemotherapy by targeting cancer stem cells and the mTOR pathway in esophageal cancer. *Int J Oncol*, 45(2), 567-574. doi:10.3892/ijo.2014.2450

Horwitz, K., ve McGuire, W. J. S. (1975). Specific progesterone receptors in human breast cancer. 25(4), 497-505.

Horwitz, K. B., Koseki, Y., ve McGUIRE, W. L. J. E. (1978). Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. 103(5), 1742-1751.

Hosono, K., Endo, H., Takahashi, H., Sugiyama, M., Sakai, E., Uchiyama, T., . . . Nakajima, A. (2010). Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(9), 1077-1083. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0186

Hsu, A. L., Murphy, C. T., ve Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, 300(5622), 1142-1145. doi:10.1126/science.1083701

Hu, R., Dawood, S., Holmes, M. D., Collins, L. C., Schnitt, S. J., Cole, K., . . . Tamimi, R. M. (2011). Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res*, 17(7), 1867-1874. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2021

Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., . . . Perou, C. M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 7, 96. doi:10.1186/1471-2164-7-96

Huang, B., Song, J. H., Cheng, Y., Abraham, J. M., Ibrahim, S., Sun, Z., . . . Meltzer, S. J. (2016). Long non-coding antisense RNA KRT7-AS is activated in gastric cancers and supports cancer cell progression by increasing KRT7 expression. *Oncogene*, 35(37), 4927-4936. doi:10.1038/onc.2016.25

Huang, H., Patel, D. D., ve Manton, K. G. (2005). The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Front Biosci*, 10, 192-215.

Huang, J. T., Wang, J., Srivastava, V., Sen, S., ve Liu, S. M. (2014). MicroRNA Machinery Genes as Novel Biomarkers for Cancer. *Front Oncol*, 4, 113. doi:10.3389/fonc.2014.00113

Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., . . . Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*, 114(4), 569-581. doi:10.1172/JCI21358

Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., ve Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev*, 87(4), 1175-1213. doi:10.1152/physrev.00047.2006

Hwang, K. T., Woo, J. W., Shin, H. C., Kim, H. S., Ahn, S. K., Moon, H. G., . . . Noh, D. Y. (2012). Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. *Int J Cancer*, 131(7), E1109-1119. doi:10.1002/ijc.27539

Iwamoto, T., ve Pusztai, L. J. G. m. (2010). Predicting prognosis of breast cancer with gene signatures: are we lost in a sea of data? , 2(11), 81.

Iwasaki, M., Nishikawa, A., Fujimoto, T., Akutagawa, N., Manase, K., Endo, T., . . . Kudo, R. (2002). Anti-invasive effect of MMI-166, a new selective matrix metalloproteinase inhibitor, in cervical carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol*, 85(1), 103-107. doi:10.1006/gyno.2001.6573

Iwasaki, Y., Nishiyama, M., Taguchi, T., Asai, M., Yoshida, M., Kambayashi, M., . . . Hashimoto, K. (2009). Insulin exhibits short-term anti-

inflammatory but long-term proinflammatory effects in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, 298(1-2), 25-32. doi:10.1016/j.mce.2008.09.030

Jacquemier, J., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Esterni, B., Extra, J. M., Houvenaeghel, G., . . . Birnbaum, D. (2009). Association of GATA3, P53, Ki67 status and vascular peritumoral invasion are strongly prognostic in luminal breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11(2), R23. doi:10.1186/bcr2249

Jaiyesimi, I. A., Buzdar, A. U., ve Hortobagyi, G. (1992). Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol*, 10(6), 1014-1024. doi:10.1200/JCO.1992.10.6.1014

Janjetovic, K., Harhaji-Trajkovic, L., Misirkic-Marjanovic, M., Vucicevic, L., Stevanovic, D., Zogovic, N., . . . Trajkovic, V. (2011). In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *Eur J Pharmacol*, 668(3), 373-382. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.004

Janssens, S., ve Tschopp, J. (2006). Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ*, 13(5), 773-784. doi:10.1038/sj.cdd.4401843

Janzer, A., German, N. J., Gonzalez-Herrera, K. N., Asara, J. M., Haigis, M. C., ve Struhl, K. (2014). Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(29), 10574-10579. doi:10.1073/pnas.1409844111

Jeziarska, A., Matysiak, W., ve Motyl, T. (2006). ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. *Med Sci Monit*, 12(8), BR263-273.

Jeziarska, A., Olszewski, W. P., Pietruszkiewicz, J., Olszewski, W., Matysiak, W., ve Motyl, T. (2006). Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion. *Med Sci Monit*, 12(7), BR245-256.

Joensuu, H., Pylkkanen, L., ve Toikkanen, S. (1994). Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol*, 145(5), 1191-1198.

Johnson, T. E. (2006). Recent results: biomarkers of aging. *Exp Gerontol*, 41(12), 1243-1246. doi:10.1016/j.exger.2006.09.006

Johnson, T. E., Cypser, J., de Castro, E., de Castro, S., Henderson, S., Murakami, S., . . . Link, C. (2000). Gerontogenes mediate health and longevity in nematodes through increasing resistance to environmental toxins and stressors. *Exp Gerontol*, 35(6-7), 687-694.

Jolly, C., ve Morimoto, R. I. (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*, 92(19), 1564-1572.

Jonker, J. W., ve Schinkel, A. H. (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther*, 308(1), 2-9. doi:10.1124/jpet.103.053298

Jung, H. J., ve Suh, Y. (2014). Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet*, 5, 472. doi:10.3389/fgene.2014.00472

Kadkol, S. S., Brody, J. R., Epstein, J. I., Kuhajda, F. P., ve Pasternack, G. R. (1998). Novel nuclear phosphoprotein pp32 is highly expressed in intermediate- and high-grade prostate cancer. *Prostate*, 34(3), 231-237.

Kaisho, T., ve Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 117(5), 979-987; quiz 988. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023

Kalkhoven, E., Wissink, S., van der Saag, P. T., ve van der Burg, B. (1996). Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor. *J Biol Chem*, 271(11), 6217-6224.

Kandioler-Eckersberger, D., Ludwig, C., Rudas, M., Kappel, S., Janschek, E., Wenzel, C., . . . Jakesz, R. (2000). TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 6(1), 50-56.

Kanduc, D. (2002). Translational regulation of human papillomavirus type 16 E7 mRNA by the peptide SEQIKA, shared by rabbit alpha(1)-globin and human cytokeratin 7. *J Virol*, 76(14), 7040-7048.

Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*, 30(2), 127-138. doi:10.1038/onc.2010.456

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., ve Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 301-310. doi:10.1038/nrc780

Karin, M., ve Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 3(3), 221-227. doi:10.1038/ni0302-221

Kato, K., Gong, J., Iwama, H., Kitanaka, A., Tani, J., Miyoshi, H., . . . Masaki, T. (2012). The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 11(3), 549-560. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0594

Khrapko, K., ve Vijg, J. (2009). Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? *Trends Genet*, 25(2), 91-98. doi:10.1016/j.tig.2008.11.007

Kim, H. J., Park, C. I., Park, B. W., Lee, H. D., ve Jung, W. H. (2006). Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Yonsei Med J*, 47(3), 333-342. doi:10.3349/ymj.2006.47.3.333

Kim, J., Lee, J., Jang, S. Y., Kim, C., Choi, Y., ve Kim, A. (2016). Anticancer effect of metformin on estrogen receptor-positive and tamoxifen-resistant breast cancer cell lines. *Oncol Rep*, 35(5), 2553-2560. doi:10.3892/or.2016.4675

Kinne, D. W., Butler, J. A., Kimmel, M., Flehinger, B. J., Menendez-Botet, C., ve Schwartz, M. (1987). Estrogen receptor protein of breast cancer in patients with positive nodes. High recurrence rates in the postmenopausal estrogen receptor-negative group. *Arch Surg*, 122(11), 1303-1306.

Klip, A., ve Leiter, L. A. (1990). Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care*, 13(6), 696-704.

Knoop, A. S., Knudsen, H., Balslev, E., Rasmussen, B. B., Overgaard, J., Nielsen, K. V., . . . Danish Breast Cancer Cooperative, G. (2005). retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 23(30), 7483-7490. doi:10.1200/JCO.2005.11.007

Ko, S. H., Ko, S. H., Ahn, Y. B., Song, K. H., Han, K. D., Park, Y. M., . . . Kim, H. S. (2014). Association of vitamin B12 deficiency and metformin use in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*, 29(7), 965-972. doi:10.3346/jkms.2014.29.7.965

Koepsell, H., Lips, K., ve Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*, 24(7), 1227-1251. doi:10.1007/s11095-007-9254-z

Konecny, G., Pauletti, G., Pegram, M., Untch, M., Dandekar, S., Aguilar, Z., . . . Slamon, D. J. (2003). Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95(2), 142-153.

Kossakowska, A. E., Huchcroft, S. A., Urbanski, S. J., ve Edwards, D. R. (1996). Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br J Cancer*, 73(11), 1401-1408.

Kourelis, T. V., ve Siegel, R. D. (2012). Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Med Oncol*, 29(2), 1314-1327. doi:10.1007/s12032-011-9846-7

Krabbe, K. S., Pedersen, M., ve Bruunsgaard, H. (2004). Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol*, 39(5), 687-699.

doi:10.1016/j.exger.2004.01.009

Kukat, A., ve Trifunovic, A. (2009). Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp Gerontol*, 44(1-2), 101-105. doi:10.1016/j.exger.2008.05.006

Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M., ve Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, 82(7), 434-448.

doi:10.1007/s00109-004-0555-y

Kumar, S., Mohan, A., ve Guleria, R. (2006). Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers*, 11(5), 385-405. doi:10.1080/13547500600775011

La Rocca, G., Pucci-Minafra, I., Marrazzo, A., Taormina, P., ve Minafra, S. (2004). Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer*, 90(7), 1414-1421. doi:10.1038/sj.bjc.6601725

Labbaye, C., ve Testa, U. (2012). The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol*, 5, 13.

doi:10.1186/1756-8722-5-13

Lacroix, M., Toillon, R. A., ve Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer*, 13(2), 293-325. doi:10.1677/erc.1.01172

Lakis, S., Kotoula, V., Eleftheraki, A. G., Batistatou, A., Bobos, M., Koletsa, T., . . . Fountzilias, G. (2014). The androgen receptor as a surrogate marker for molecular apocrine breast cancer subtyping. *Breast*, 23(3), 234-243.

doi:10.1016/j.breast.2014.02.013

Lambaudie, E., Chereau, E., Pouget, N., Thomassin, J., Minsat, M., Charafe-Jauffret, E., . . . Houvenaeghel, G. (2014). Cytokeratin 7 as a predictive factor for response to concomitant radiochemotherapy for locally advanced cervical cancer: a preliminary study. *Anticancer Res*, 34(1), 177-181.

Lanari, C., Lamb, C. A., Fabris, V. T., Helguero, L. A., Soldati, R., Bottino, M. C., . . . Molinolo, A. (2009). The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, *16*(2), 333-350. doi:10.1677/ERC-08-0244

Lancet, E. B. C. T. C. G. J. T. (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *351*(9114), 1451-1467.

Lancet, E. B. C. T. C. G. J. T. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *365*(9472), 1687-1717.

Larbi, A., Franceschi, C., Mazzatti, D., Solana, R., Wikby, A., ve Pawelec, G. (2008). Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda)*, *23*, 64-74. doi:10.1152/physiol.00040.2007

LeBlanc, V. C., ve Morin, P. (2015). Exploring miRNA-Associated Signatures with Diagnostic Relevance in Glioblastoma Multiforme and Breast Cancer Patients. *J Clin Med*, *4*(8), 1612-1630. doi:10.3390/jcm4081612

Lee, S. K., ve Calin, G. A. (2011). Non-coding RNAs and cancer: new paradigms in oncology. *Discov Med*, *11*(58), 245-254.

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., ve Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, *121*(7), 2750-2767. doi:10.1172/JCI45014

Li, C., Ruan, H. Q., Liu, Y. S., Xu, M. J., Dai, J., Sheng, Q. H., . . . Zeng, R. (2012). Quantitative proteomics reveal up-regulated protein expression of the SET complex associated with hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*, *11*(2), 871-885. doi:10.1021/pr2006999

Li, C. I. (2011). Discovery and validation of breast cancer early detection biomarkers in preclinical samples. *Horm Cancer*, *2*(2), 125-131. doi:10.1007/s12672-010-0061-3

Li, H. C., Cao, D. C., Liu, Y., Hou, Y. F., Wu, J., Lu, J. S., . . . Shao, Z. M. (2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 88(1), 75-85. doi:10.1007/s10549-004-1200-8

Lin, C. J., Tai, Y., Huang, M. T., Tsai, Y. F., Hsu, H. J., Tzen, K. Y., ve Liou, H. H. (2010). Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents. *J Neurochem*, 114(3), 717-727. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06801.x

Lippman, M., Bolan, G., ve Huff, K. J. C. R. (1976). The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *36*(12), 4602-4609.

Liu, H., Scholz, C., Zang, C., Schefe, J. H., Habel, P., Regierer, A. C., . . . Eucker, J. (2012). Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro. *Anticancer Res*, 32(5), 1627-1637.

Liu, S. C., Yang, S. F., Yeh, K. T., Yeh, C. M., Chiou, H. L., Lee, C. Y., . . . Hsieh, Y. S. (2006). Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. *Clin Chim Acta*, 371(1-2), 92-96. doi:10.1016/j.cca.2006.02.026

Liu, Y., Liu, H., Han, B., ve Zhang, J. T. (2006). Identification of 14-3-3sigma as a contributor to drug resistance in human breast cancer cells using functional proteomic analysis. *Cancer Res*, 66(6), 3248-3255. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3801

Locasale, J. W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*, 13(8), 572-583. doi:10.1038/nrc3557

Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., ve Alt, F. W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 120(4), 497-512. doi:10.1016/j.cell.2005.01.028

Lonning, P. E., Knappskog, S., Staalesen, V., Chrisanthar, R., ve Lillehaug, J. R. (2007). Breast cancer prognostication and prediction in the postgenomic era. *Ann Oncol*, 18(8), 1293-1306. doi:10.1093/annonc/mdm013

Lopez, J., ve Tait, S. W. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*, 112(6), 957-962. doi:10.1038/bjc.2015.85

Ma, L., Teruya-Feldstein, J., ve Weinberg, R. A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449(7163), 682-688. doi:10.1038/nature06174

Ma, W., Sung, H. J., Park, J. Y., Matoba, S., ve Hwang, P. M. (2007). A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. *J Bioenerg Biomembr*, 39(3), 243-246. doi:10.1007/s10863-007-9083-0

Madrid, L. V., Mayo, M. W., Reuther, J. Y., ve Baldwin, A. S., Jr. (2001). Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem*, 276(22), 18934-18940. doi:10.1074/jbc.M101103200

Maftouh, M., Avan, A., Sciarrillo, R., Granchi, C., Leon, L. G., Rani, R., . . . Giovannetti, E. (2014). Synergistic interaction of novel lactate dehydrogenase inhibitors with gemcitabine against pancreatic cancer cells in hypoxia. *Br J Cancer*, 110(1), 172-182. doi:10.1038/bjc.2013.681

Maggio, M., Guralnik, J. M., Longo, D. L., ve Ferrucci, L. (2006). Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(6), 575-584.

Malhotra, V., ve Wong, H. R. (2002). Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Crit Care Med*, 30(1 Supp), S89-S95.

Malki, A., ve Youssef, A. (2011). Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling. *Oncol Res*, 19(6), 275-285.

Marin-Hernandez, A., Gallardo-Perez, J. C., Ralph, S. J., Rodriguez-Enriquez, S., ve Moreno-Sanchez, R. (2009). HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem*, 9(9), 1084-1101.

Maro, J. C., Platt, R., Holmes, J. H., Strom, B. L., Hennessy, S., Lazarus, R., ve Brown, J. S. (2009). Design of a national distributed health data network. *Ann Intern Med*, 151(5), 341-344.

Martin-Castillo, B., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., ve Menendez, J. A. (2010). Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell Cycle*, 9(6), 1057-1064.
doi:10.4161/cc.9.6.10994

Martin, M., ve Marais, R. (2012). Metformin: a diabetes drug for cancer, or a cancer drug for diabetics? *J Clin Oncol*, 30(21), 2698-2700.
doi:10.1200/JCO.2012.42.1677

Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M. R., Lozano, E., Anadon, C., Macias, R. I., . . . Marin, J. J. (2012). No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm*, 9(6), 1693-1704. doi:10.1021/mp300028a

Martins, J. O., Zanoni, F. L., Martins, D. O., Coimbra, R., Krieger, J. E., Jancar, S., ve Sannomiya, P. (2009). Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor-kappaB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. *Shock*, 31(4), 404-409.
doi:10.1097/SHK.0b013e318186275e

Matos, I., Dufloth, R., Alvarenga, M., Zeferino, L. C., ve Schmitt, F. (2005). p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal

phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*, 447(4), 688-694.

doi:10.1007/s00428-005-0010-7

McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J. P., ve Korsmeyer, S. J. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57(1), 79-88.

Medzhitov, R., ve Janeway, C., Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, 173, 89-97.

Memmott, R. M., Mercado, J. R., Maier, C. R., Kawabata, S., Fox, S. D., ve Dennis, P. A. (2010). Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(9), 1066-1076. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0055

Mendes, O., Kim, H. T., Lungu, G., ve Stoica, G. (2007). MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. *Clin Exp Metastasis*, 24(5), 341-351. doi:10.1007/s10585-007-9071-0

Mendes, O., Kim, H. T., ve Stoica, G. (2005). Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model. *Clin Exp Metastasis*, 22(3), 237-246. doi:10.1007/s10585-005-8115-6

Menendez, J. A., Oliveras-Ferraros, C., Cufi, S., Corominas-Faja, B., Joven, J., Martin-Castillo, B., ve Vazquez-Martin, A. (2012). Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle*, 11(15), 2782-2792. doi:10.4161/cc.20948

Merkhofer, E. C., Cogswell, P., ve Baldwin, A. S. (2010). Her2 activates NF-kappaB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKalpha. *Oncogene*, 29(8), 1238-1248. doi:10.1038/onc.2009.410

Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., ve Thomas, P. D. (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D183-D189. doi:10.1093/nar/gkw1138

Miglietta, L., Vanella, P., Canobbio, L., Parodi, M. A., Guglielmini, P., ve Boccardo, F. (2009). Clinical and pathological response to primary chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer grouped according to hormonal receptors, Her2 status, grading and Ki-67 proliferation index. *Anticancer Res*, 29(5), 1621-1625.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., . . . et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71.

Miller, R. A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., ve Birnbaum, M. J. (2013). Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*, 494(7436), 256-260. doi:10.1038/nature11808

Minuesa, G., Purcet, S., Erkizia, I., Molina-Arcas, M., Bofill, M., Izquierdo-Useros, N., . . . Martinez-Picado, J. (2008). Expression and functionality of anti-human immunodeficiency virus and anticancer drug uptake transporters in immune cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 324(2), 558-567. doi:10.1124/jpet.107.131482

Mishra, N. C. (2011). *Introduction to proteomics: principles and applications* (Vol. 148): John Wiley & Sons.

Mitropoulou, T. N., Tzanakakis, G. N., Kletsas, D., Kalofonos, H. P., ve Karamanos, N. K. (2003). Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer*, 104(2), 155-160. doi:10.1002/ijc.10941

Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., . . . Anderson, K. C. (2002). Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*, 21(37), 5673-5683. doi:10.1038/sj.onc.1205664

Miyoshi, H., Kato, K., Iwama, H., Maeda, E., Sakamoto, T., Fujita, K., . . . Masaki, T. (2014). Effect of the anti-diabetic drug metformin in hepatocellular

carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 45(1), 322-332.

doi:10.3892/ijo.2014.2419

Mommers, E. C., van Diest, P. J., Leonhart, A. M., Meijer, C. J., ve Baak, J. P. (1999). Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*, 58(2), 163-169.

Moon, R. C., Pike, M., Siiteri, P., ve Welsch, C. J. B. r. (1981). Influence of pregnancy and lactation on experimental mammary carcinogenesis. 8, 353-364.

More, S. S., Li, S., Yee, S. W., Chen, L., Xu, Z., Jablons, D. M., ve Giacomini, K. M. (2010). Organic cation transporters modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue. *Mol Cancer Ther*, 9(4), 1058-1069. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1084

Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F. J., Rodriguez-Hermosa, J. I., Sabater, M., Pardo, G., Ricart, W., ve Fernandez-Real, J. M. (2011). OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects. *Diabetes*, 60(1), 168-176. doi:10.2337/db10-0805

Morley, J. F., ve Morimoto, R. I. (2004). Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell*, 15(2), 657-664. doi:10.1091/mbc.e03-07-0532

Mueller, R. E., Parkes, R. K., Andrulis, I., ve O'Malley, F. P. (2004). Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer*, 39(4), 288-297. doi:10.1002/gcc.20008

Munoz, M. J. (2003). Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*, 124(1), 43-48.

Murakami, S. (2006). Stress resistance in long-lived mouse models. *Exp Gerontol*, 41(10), 1014-1019. doi:10.1016/j.exger.2006.06.061

Nagase, H., Visse, R., ve Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002

Nair, V., Sreevalsan, S., Basha, R., Abdelrahim, M., Abudayyeh, A., Rodrigues Hoffman, A., ve 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(40), 27692-27701. doi:10.1074/jbc.M114.592576

Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J. H., Xue, X., ve Okumura, K. (2006). Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ*, 13(5), 730-737. doi:10.1038/sj.cdd.4401830

Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr., ve Sledge, G. W., Jr. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol*, 17(7), 3629-3639.

Natrajan, R., Lambros, M. B., Rodríguez-Pinilla, S. M., Moreno-Bueno, G., Tan, D. S., Marchiό, C., . . . Fulford, L. G. J. C. c. r. (2009). Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. *15(8)*, 2711-2722.

Natrajan, R., Weigelt, B., Mackay, A., Geyer, F. C., Grigoriadis, A., Tan, D. S., . . . treatment. (2010). An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. *121(3)*, 575-589.

Nielsen, K. V., Ejlersen, B., Moller, S., Jorgensen, J. T., Knoop, A., Knudsen, H., ve Mouridsen, H. T. (2008). The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. *Acta Oncol*, 47(4), 725-734. doi:10.1080/02841860801995396

Nies, A. T., Koepsell, H., Winter, S., Burk, O., Klein, K., Kerb, R., . . . Schaeffeler, E. (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*, 50(4), 1227-1240. doi:10.1002/hep.23103

Nikas, J. B., Low, W. C., ve Burgio, P. A. (2012). Prognosis of treatment response (pathological complete response) in breast cancer. *Biomark Insights*, 7, 59-70. doi:10.4137/BMLS9387

Nishimura, M., ve Naito, S. (2005). Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*, 20(6), 452-477.

Ogasawara, S., Yano, H., Momosaki, S., Nishida, N., Takemoto, Y., Kojiro, S., ve Kojiro, M. (2005). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues. *Oncol Rep*, 13(6), 1043-1048.

Ogawa, Y., Hai, E., Matsumoto, K., Ikeda, K., Tokunaga, S., Nagahara, H., . . . Nishiguchi, Y. (2008). Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol*, 13(5), 431-435. doi:10.1007/s10147-008-0770-6

Oh, D. S., Troester, M. A., Usary, J., Hu, Z., He, X., Fan, C., . . . Perou, C. M. J. J. C. O. (2006). Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. 24(11), 1656-1664.

Olivier, M., Langerod, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., . . . Borresen-Dale, A. L. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12(4), 1157-1167. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1029

Olivieri, F., Rippo, M. R., Monsurro, V., Salvioli, S., Capri, M., Procopio, A. D., ve Franceschi, C. (2013). MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev*, 12(4), 1056-1068. doi:10.1016/j.arr.2013.05.001

Olivotto, I. A., Truong, P. T., Speers, C. H., Bernstein, V., Allan, S. J., Kelly, S. J., ve Lesperance, M. L. (2004). Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. *J Clin Oncol*, 22(9), 1769-1770. doi:10.1200/JCO.2004.99.251

Olovnikov, I. A., Kravchenko, J. E., ve Chumakov, P. M. (2009). Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin Cancer Biol*, 19(1), 32-41. doi:10.1016/j.semcancer.2008.11.005

Osborne, C. K., Yochmowitz, M. G., Knight, W. A., 3rd, ve McGuire, W. L. (1980). The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, 46(12 Suppl), 2884-2888.

Ouellet, V., Le Page, C., Guyot, M. C., Lussier, C., Tonin, P. N., Provencher, D. M., ve Mes-Masson, A. M. (2006). SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 119(9), 2119-2126. doi:10.1002/ijc.22054

Ouyang, J., Parakhia, R. A., ve Ochs, R. S. (2011). Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem*, 286(1), 1-11. doi:10.1074/jbc.M110.121806

Pacheco, M. M., Mourao, M., Mantovani, E. B., Nishimoto, I. N., ve Brentani, M. M. (1998). Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico-pathological correlations. *Clin Exp Metastasis*, 16(7), 577-585.

Page-McCaw, A., Ewald, A. J., ve Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 221-233. doi:10.1038/nrm2125

Palmer, C., Diehn, M., Alizadeh, A. A., ve Brown, P. O. (2006). Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics*, 7, 115. doi:10.1186/1471-2164-7-115

Pan, W., da Graca, L. S., Shao, Y., Yin, Q., Wu, H., ve Jiang, X. (2009). PHAPI/pp32 suppresses tumorigenesis by stimulating apoptosis. *J Biol Chem*, 284(11), 6946-6954. doi:10.1074/jbc.M805801200

Pan, Y., Han, J., Zhang, Y., ve Li, X. J. (2010). [Role of vimentin in tumor metastasis and drug research]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 41(6), 413-416.

Papazoglu, C., ve Mills, A. A. (2007). p53: at the crossroad between cancer and ageing. *J Pathol*, 211(2), 124-133. doi:10.1002/path.2086

Park, K. J., Gaynor, R. B., ve Kwak, Y. T. (2003). Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem*, 278(37), 35272-35278. doi:10.1074/jbc.M305095200

Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., . . . Bernard, P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 27(8), 1160-1167. doi:10.1200/JCO.2008.18.1370

Parl, F. F., Schmidt, B. P., Dupont, W. D., ve Wagner, R. K. (1984). Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading. *Cancer*, 54(10), 2237-2242.

Parton, M., Dowsett, M., ve Smith, I. (2001). Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*, 322(7301), 1528-1532.

Penney, K. L., Sinnott, J. A., Tyekucheva, S., Gerke, T., Shui, I. M., Kraft, P., . . . Stampfer, M. J. (2015). Association of prostate cancer risk variants with gene expression in normal and tumor tissue. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(1), 255-260. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0694-T

Perkins, N. D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*, 25(51), 6717-6730. doi:10.1038/sj.onc.1209937

Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1), 49-62. doi:10.1038/nrm2083

Pernicova, I., ve Korbonits, M. (2014). Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*, *10*(3), 143-156. doi:10.1038/nrendo.2013.256

Perou, C. M. (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, *16 Suppl 1*, 61-70. doi:10.1634/theoncologist.2011-S1-61

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Akslen, L. A. J. n. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *406*(6797), 747.

Piano, A., ve Titorenko, V. I. (2015). The Intricate Interplay between Mechanisms Underlying Aging and Cancer. *Aging Dis*, *6*(1), 56-75. doi:10.14336/AD.2014.0209

Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., . . . Herceptin Adjuvant Trial Study, T. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, *353*(16), 1659-1672. doi:10.1056/NEJMoa052306

Pivetta, E., Scapolan, M., Pecolo, M., Wassermann, B., Abu-Rumeileh, I., Balestreri, L., . . . Spessotto, P. (2011). MMP-13 stimulates osteoclast differentiation and activation in tumour breast bone metastases. *Breast Cancer Res*, *13*(5), R105. doi:10.1186/bcr3047

Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., . . . Dor, Y. (2011). Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab*, *13*(4), 440-449. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.012

Prat, A., ve Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, *5*(1), 5-23. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003

Press, M. F., Sauter, G., Buyse, M., Bernstein, L., Guzman, R., Santiago, A., . . . Slamon, D. J. (2011). Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast

cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol*, 29(7), 859-867. doi:10.1200/JCO.2009.27.5644

Przybyłowska, K., Kluczna, A., Zadrozny, M., Krawczyk, T., Kulig, A., Rykala, J., . . . Blasiak, J. (2006). Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 95(1), 65-72. doi:10.1007/s10549-005-9042-6

Pujal, J., Huch, M., Jose, A., Abasolo, I., Rodolosse, A., Duch, A., . . . Real, F. X. (2009). Keratin 7 promoter selectively targets transgene expression to normal and neoplastic pancreatic ductal cells in vitro and in vivo. *FASEB J*, 23(5), 1366-1375. doi:10.1096/fj.08-115576

Putti, T. C., El-Rehim, D. M. A., Rakha, E. A., Paish, C. E., Lee, A. H., Pinder, S. E., ve Ellis, I. O. J. M. P. (2005). Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *18(1)*, 26.

Qi, L., Bart, J., Tan, L. P., Platteel, I., Sluis, T., Huitema, S., . . . Berg, A. (2009). Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer*, 9, 163. doi:10.1186/1471-2407-9-163

Qu, Z., Zhang, Y., Liao, M., Chen, Y., Zhao, J., ve Pan, Y. (2012). In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 42(9), 922-933. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01007.x

Quach, S., Hennessy, D. A., Faris, P., Fong, A., Quan, H., ve Doig, C. (2009). A comparison between the APACHE II and Charlson Index Score for predicting hospital mortality in critically ill patients. *BMC Health Serv Res*, 9, 129. doi:10.1186/1472-6963-9-129

Quenel, N., Wafflart, J., Bonichon, F., de Mascarel, I., Trojani, M., Durand, M., . . . Coindre, J. M. (1995). The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat*, 35(3), 283-291.

Rahko, E., Blanco, G., Bloigu, R., Soini, Y., Talvensaari-Mattila, A., ve Jukkola, A. (2006). Adverse outcome and resistance to adjuvant antiestrogen therapy in node-positive postmenopausal breast cancer patients-The role of p53. *Breast*, 15(1), 69-75. doi:10.1016/j.breast.2005.04.004

Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., Paish, E. C., Lee, A. H., ve Ellis, I. O. (2007). Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*, 50(4), 434-438. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02638.x

Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., Paish, E. C., Powe, D. G., Gee, J., . . . Ellis, I. O. (2007). Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol*, 25(30), 4772-4778. doi:10.1200/JCO.2007.12.2747

Rakha, E. A., ve Ellis, I. O. (2009). Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*, 41(1), 40-47. doi:10.1080/00313020802563510

Rakha, E. A., Elsheikh, S. E., Aleskandarany, M. A., Habashi, H. O., Green, A. R., Powe, D. G., . . . Ellis, I. O. (2009). Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*, 15(7), 2302-2310. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2132

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., . . . Ellis, I. O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*, 12(4), 207. doi:10.1186/bcr2607

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., ve Ellis, I. O. (2010). Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 120(2), 293-308. doi:10.1007/s10549-010-0746-x

Ran, R., Lu, A., Zhang, L., Tang, Y., Zhu, H., Xu, H., . . . Sharp, F. R. (2004). Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev*, 18(12), 1466-1481. doi:10.1101/gad.1188204

Ravdin, P. M., Green, S., Dorr, T. M., McGuire, W. L., Fabian, C., Pugh, R. P., . . . et al. (1992). Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, *10*(8), 1284-1291. doi:10.1200/JCO.1992.10.8.1284

Regan, M. M., Viale, G., Mastropasqua, M. G., Maiorano, E., Golouh, R., Carbone, A., . . . International Breast Cancer Study, G. (2006). Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst*, *98*(21), 1571-1581. doi:10.1093/jnci/djj415

Reilly, P. T., Yu, Y., Hamiche, A., ve Wang, L. (2014). Cracking the ANP32 whips: important functions, unequal requirement, and hints at disease implications. *Bioessays*, *36*(11), 1062-1071. doi:10.1002/bies.201400058

Reis-Filho, J. S., ve Lakhani, S. R. (2003). The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res*, *5*(6), 313-319. doi:10.1186/bcr650

Reis-Filho, J. S., Weigelt, B., Fumagalli, D., ve Sotiriou, C. J. S. t. m. (2010). Molecular profiling: moving away from tumor philately. *2*(47), 47ps43-47ps43.

Richardson, L. C., ve Pollack, L. A. (2005). Therapy insight: Influence of type 2 diabetes on the development, treatment and outcomes of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, *2*(1), 48-53. doi:10.1038/ncponc0062

Romer, D., Sznitman, S., DiClemente, R., Salazar, L. F., Venable, P. A., Carey, M. P., . . . Juzang, I. (2009). Mass media as an HIV-prevention strategy: using culturally sensitive messages to reduce HIV-associated sexual behavior of at-risk African American youth. *Am J Public Health*, *99*(12), 2150-2159. doi:10.2105/AJPH.2008.155036

Ryden, L., Jonsson, P. E., Chebil, G., Dufmats, M., Ferno, M., Jirstrom, K., . . . South-East Swedish Breast Cancer, G. (2005). Two years of adjuvant tamoxifen

in premenopausal patients with breast cancer: a randomised, controlled trial with long-term follow-up. *Eur J Cancer*, 41(2), 256-264. doi:10.1016/j.ejca.2004.06.030

Sacco, F., Silvestri, A., Posca, D., Pirro, S., Gherardini, P. F., Castagnoli, L., . . . Cesareni, G. (2016). Deep Proteomics of Breast Cancer Cells Reveals that Metformin Rewires Signaling Networks Away from a Pro-growth State. *Cell Syst*, 2(3), 159-171. doi:10.1016/j.cels.2016.02.005

Sachs, K., Perez, O., Pe'er, D., Lauffenburger, D. A., ve Nolan, G. P. (2005). Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data. *Science*, 308(5721), 523-529. doi:10.1126/science.1105809

Sahin, M., Tutuncu, N. B., Ertugrul, D., Tanaci, N., ve Guvener, N. D. (2007). Effects of metformin or rosiglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, 21(2), 118-123. doi:10.1016/j.jdiacomp.2005.10.005

Salminen, A., Huuskonen, J., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., ve Suuronen, T. (2008). Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev*, 7(2), 83-105. doi:10.1016/j.arr.2007.09.002

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., ve Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73, 39-85. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723

Sandilands, A., Smith, F. J., Lunny, D. P., Campbell, L. E., Davidson, K. M., MacCallum, S. F., . . . McLean, W. H. (2013). Generation and characterisation of keratin 7 (K7) knockout mice. *PLoS One*, 8(5), e64404. doi:10.1371/journal.pone.0064404

Sarkar, D., ve Fisher, P. B. (2006). Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett*, 236(1), 13-23. doi:10.1016/j.canlet.2005.04.009

Sayeed, A., Konduri, S. D., Liu, W., Bansal, S., Li, F., ve Das, G. M. (2007). Estrogen receptor alpha inhibits p53-mediated transcriptional repression: implications for the regulation of apoptosis. *Cancer Res*, 67(16), 7746-7755. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3724

Schaeffeler, E., Hellerbrand, C., Nies, A. T., Winter, S., Kruck, S., Hofmann, U., . . . Schwab, M. (2011). DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med*, 3(12), 82. doi:10.1186/gm298

Schneider, M. B., Matsuzaki, H., Haorah, J., Ulrich, A., Standop, J., Ding, X. Z., . . . Pour, P. M. (2001). Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology*, 120(5), 1263-1270. doi:10.1053/gast.2001.23258

Schnitt, S. J. (2010). Will molecular classification replace traditional breast pathology? *Int J Surg Pathol*, 18(3 Suppl), 162S-166S. doi:10.1177/1066896910370771

Schreck, R., Albermann, K., ve Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*, 17(4), 221-237.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C., ve de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), 517-528. doi:10.1038/nrm1963

Schumacher, B., Garinis, G. A., ve Hoeijmakers, J. H. (2008). Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet*, 24(2), 77-85. doi:10.1016/j.tig.2007.11.004

Schummer, M., Beatty, D., ve Urban, N. (2010). Breast cancer genomics: normal tissue and cancer markers. *Ann N Y Acad Sci*, 1210, 78-85. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05803.x

Sebban, H., Yamaoka, S., ve Courtois, G. (2006). Posttranslational modifications of NEMO and its partners in NF-kappaB signaling. *Trends Cell Biol*, 16(11), 569-577. doi:10.1016/j.tcb.2006.09.004

Sen, R., ve Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5), 705-716.

Sena, P., Mancini, S., Benincasa, M., Mariani, F., Palumbo, C., ve Roncucci, L. (2018). Metformin Induces Apoptosis and Alters Cellular Responses to Oxidative Stress in Ht29 Colon Cancer Cells: Preliminary Findings. *Int J Mol Sci*, 19(5). doi:10.3390/ijms19051478

Sethi, G., Sung, B., ve Aggarwal, B. B. (2008). Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(1), 21-31. doi:10.3181/0707-MR-196

Shi, H., Hood, K. A., Hayes, M. T., ve Stubbs, R. S. (2011). Proteomic analysis of advanced colorectal cancer by laser capture microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteomics*, 75(2), 339-351. doi:10.1016/j.jprot.2011.07.025

Shostak, K., ve Chariot, A. (2011). NF-kappaB, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res*, 13(4), 214. doi:10.1186/bcr2886

Siebenlist, U., Franzoso, G., ve Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 10, 405-455. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.002201

Siegel, R. L., Miller, K. D., ve Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1), 5-29. doi:10.3322/caac.21254

Sikora, E., Scapagnini, G., ve Barbagallo, M. (2010). Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun Ageing*, 7(1), 1. doi:10.1186/1742-4933-7-1

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., ve McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177-182.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., . . . Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344(11), 783-792. doi:10.1056/NEJM200103153441101

Smith-Vikos, T., ve Slack, F. J. (2012). MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci*, 125(Pt 1), 7-17. doi:10.1242/jcs.099200

Smith, U., ve Gale, E. A. (2009). Does diabetes therapy influence the risk of cancer? *Diabetologia*, 52(9), 1699-1708. doi:10.1007/s00125-009-1441-5

Smith, U., ve Gale, E. A. (2010). Cancer and diabetes: are we ready for prime time? *Diabetologia*, 53(8), 1541-1544. doi:10.1007/s00125-010-1815-8

Song, J., Su, H., Zhou, Y. Y., ve Guo, L. L. (2013). Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in breast cancer patients: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(3), 1615-1621.

Song, S., Andrikopoulos, S., Filippis, C., Thorburn, A. W., Khan, D., ve Proietto, J. (2001). Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(2), E275-282. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.2.E275

Sood, S., Gallagher, I. J., Lunnon, K., Rullman, E., Keohane, A., Crossland, H., . . . Timmons, J. A. (2015). A novel multi-tissue RNA diagnostic of healthy ageing relates to cognitive health status. *Genome Biol*, 16, 185. doi:10.1186/s13059-015-0750-x

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., . . . Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874. doi:10.1073/pnas.191367098

Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., . . . Geisler, S. J. P. o. t. n. a. o. s. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *100*(14), 8418-8423.

Soti, C., ve Csermely, P. (2000). Molecular chaperones and the aging process. *Biogerontology*, *1*(3), 225-233.

Sotiriou, C., ve Pusztai, L. J. N. E. J. o. M. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *360*(8), 790-800.

Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., Mazzucchelli, L., ve Bordoni, A. J. A. o. o. (2008). Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *20*(4), 628-635.

SS, D. (2008). *Cancer Proteomics: From Bench to Bedside*: SpringerLink.

Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*, *10*(6), 415-433. doi:10.1006/scbi.2000.0379

Stendahl, M., Ryden, L., Nordenskjold, B., Jonsson, P. E., Landberg, G., ve Jirstrom, K. (2006). High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, *12*(15), 4614-4618. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0248

Sternlicht, M. D., ve Bergers, G. J. E. T. T. (2000). Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects. *4*(5), 609-633.

Sullu, Y., Demirag, G. G., Yildirim, A., Karagoz, F., ve Kandemir, B. (2011). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract*, *207*(12), 747-753. doi:10.1016/j.prp.2011.09.010

Sundblad, A. S., ve Caprarulo, L. (1996). [Immunohistochemical characteristics of mammary carcinomas with estrogen-negative and progesterone-positive receptors]. *Medicina (B Aires)*, *56*(6), 683-689.

Surowiak, P., Dziegiel, P., Zabel, M., Matkowski, R., ve Kornafel, J. (2001). Analysis of estrogen receptor (ER) and estrogen-dependent pS2 protein expression in cells of mammary ductal carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*, 39(2), 141-142.

Swenson, R. R., Rizzo, C. J., Brown, L. K., Payne, N., DiClemente, R. J., Salazar, L. F., . . . Hennessy, M. (2009). Prevalence and correlates of HIV testing among sexually active African American adolescents in 4 US cities. *Sex Transm Dis*, 36(9), 584-591. doi:10.1097/OLQ.0b013e3181b4704c

Tachampa, K., Takeda, M., Khamdang, S., Noshiro-Kofuji, R., Tsuda, M., Jariyawat, S., . . . Endou, H. (2008). Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins. *J Pharmacol Sci*, 106(3), 435-443.

Talvensaari-Mattila, A., Paakko, P., Hoyhtya, M., Blanco-Sequeiros, G., ve Turpeenniemi-Hujanen, T. (1998). Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer*, 83(6), 1153-1162.

Tanaka, H., Fujita, N., ve Tsuruo, T. (2005). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated I κ B kinase beta (I κ B) phosphorylation activates NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*, 280(49), 40965-40973. doi:10.1074/jbc.M506235200

Tang, P., Wang, J., ve Bourne, P. J. H. p. (2008). Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? , 39(4), 506-513.

Tavazoie, S. F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P. D., . . . Massague, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 451(7175), 147-152. doi:10.1038/nature06487

Teschendorff, A. E., Miremadi, A., Pinder, S. E., Ellis, I. O., ve Caldas, C. (2007). An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol*, 8(8), R157. doi:10.1186/gb-2007-8-8-r157

Thor, A. D., Berry, D. A., Budman, D. R., Muss, H. B., Kute, T., Henderson, I. C., . . . Liu, E. T. (1998). erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90(18), 1346-1360.

Trinchieri, G., ve Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, 7(3), 179-190. doi:10.1038/nri2038

Turner, N. C., Reis-Filho, J. S., Russell, A. M., Springall, R. J., Ryder, K., Steele, D., . . . Tutt, A. N. (2007). BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, 26(14), 2126-2132. doi:10.1038/sj.onc.1210014

Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., ve Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem*, 271(38), 23512-23519.

Ugnat, A. M., Xie, L., Morriss, J., Semenciw, R., ve Mao, Y. (2004). Survival of women with breast cancer in Ottawa, Canada: variation with age, stage, histology, grade and treatment. *Br J Cancer*, 90(6), 1138-1143. doi:10.1038/sj.bjc.6601662

Vallabhapurapu, S., ve Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 27, 693-733. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132641

Vallejos, C. S., Gómez, H. L., Cruz, W. R., Pinto, J. A., Dyer, R. R., Velarde, R., . . . Miguel, A. J. C. b. c. (2010). Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *10(4)*, 294-300.

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., . . . Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536. doi:10.1038/415530a

van Diest, P. J., van der Wall, E., ve Baak, J. P. (2004). Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol*, 57(7), 675-681. doi:10.1136/jcp.2003.010777

van Schooneveld, E., Wildiers, H., Vergote, I., Vermeulen, P. B., Dirix, L. Y., ve Van Laere, S. J. (2015). Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res*, 17, 21. doi:10.1186/s13058-015-0526-y

van Uden, P., Kenneth, N. S., ve Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*, 412(3), 477-484. doi:10.1042/BJ20080476

Vanhaesebroeck, B., Reed, J. C., De Valck, D., Grooten, J., Miyashita, T., Tanaka, S., . . . Fiers, W. (1993). Effect of bcl-2 proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Oncogene*, 8(4), 1075-1081.

Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Cufi, S., Martin-Castillo, B., ve Menendez, J. A. (2010). Metformin and energy metabolism in breast cancer: from insulin physiology to tumour-initiating stem cells. *Curr Mol Med*, 10(7), 674-691.

Vermeulen, C. J., ve Loeschke, V. (2007). Longevity and the stress response in Drosophila. *Exp Gerontol*, 42(3), 153-159. doi:10.1016/j.exger.2006.09.014

Veronesi, U., Viale, G., Rotmensz, N., ve Goldhirsch, A. (2006). Rethinking TNM: breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research. *Breast*, 15(1), 3-8. doi:10.1016/j.breast.2005.11.011

Viale, G., Giobbie-Hurder, A., Regan, M. M., Coates, A. S., Mastropasqua, M. G., Dell'Orto, P., . . . Breast International Group, T. (2008). Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*, 26(34), 5569-5575. doi:10.1200/JCO.2008.17.0829

Viale, G., Regan, M. M., Maiorano, E., Mastropasqua, M. G., Dell'Orto, P., Rasmussen, B. B., . . . Coates, A. S. (2007). Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a

randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol*, 25(25), 3846-3852. doi:10.1200/JCO.2007.11.9453

Vijg, J., ve Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*, 454(7208), 1065-1071. doi:10.1038/nature07216

Vijg, J., ve Suh, Y. (2005). Genetics of longevity and aging. *Annu Rev Med*, 56, 193-212. doi:10.1146/annurev.med.56.082103.104617

Vincent-Salomon, A., Rousseau, A., Jouve, M., Beuzeboc, P., Sigal-Zafrani, B., Freneaux, P., . . . Breast Cancer Study, G. (2004). Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline-based preoperative chemotherapy. *Eur J Cancer*, 40(10), 1502-1508. doi:10.1016/j.ejca.2004.03.014

Vogelstein, B., ve Kinzler, K. W. (1994). Has the breast cancer gene been found? *Cell*, 79(1), 1-3.

Volk, C., Gorboulev, V., Kotzsch, A., Muller, T. D., ve Koepsell, H. (2009). Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone. *Mol Pharmacol*, 76(2), 275-289. doi:10.1124/mol.109.054783

Walker, R. A. (2008). Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *J Clin Pathol*, 61(6), 689-696. doi:10.1136/jcp.2006.041830

Wang, J., Gallagher, D., DeVito, L. M., Cancino, G. I., Tsui, D., He, L., . . . Miller, F. D. (2012). Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell*, 11(1), 23-35. doi:10.1016/j.stem.2012.03.016

Wang, Y., Klijn, J. G., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Look, M. P., Yang, F., . . . Foekens, J. A. (2005). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*, 365(9460), 671-679. doi:10.1016/S0140-6736(05)17947-1

Waxman, D. J., ve Schwartz, P. S. (2003). Harnessing apoptosis for improved anticancer gene therapy. *Cancer Res*, 63(24), 8563-8572.

Weigelt, B., Baehner, F. L., Reis-Filho, J. S. J. T. J. o. P. A. J. o. t. P. S. o. G. B., ve Ireland. (2010). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *220(2)*, 263-280.

Weigelt, B., ve Reis-Filho, J. S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*, 6(12), 718-730. doi:10.1038/nrclinonc.2009.166

Weindruch, R. (1996). The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicol Pathol*, 24(6), 742-745. doi:10.1177/019262339602400618

Weiss, Y. G., Bromberg, Z., Raj, N., Raphael, J., Goloubinoff, P., Ben-Neriah, Y., ve Deutschman, C. S. (2007). Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of IkappaB kinase in experimental acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 35(9), 2128-2138.

West, R. B., Nuyten, D. S., Subramanian, S., Nielsen, T. O., Corless, C. L., Rubin, B. P., . . . van de Rijn, M. (2005). Determination of stromal signatures in breast carcinoma. *PLoS Biol*, 3(6), e187. doi:10.1371/journal.pbio.0030187

Wheaton, W. W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., . . . Chandel, N. S. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*, 3, e02242. doi:10.7554/eLife.02242

Winger, M., Volz, T., Tarel, G., Portolan, S., Badolato, A., Hennessy, K. J., . . . Imamoglu, A. (2009). Explanation of photon correlations in the far-off-resonance optical emission from a quantum-dot-cavity system. *Phys Rev Lett*, 103(20), 207403. doi:10.1103/PhysRevLett.103.207403

Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., . . . American Society of Clinical Oncology/College of American, P. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 131(1), 18-43. doi:10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2

Wood, W. C., Budman, D. R., Korzun, A. H., Cooper, M. R., Younger, J., Hart, R. D., . . . et al. (1994). Dose and dose intensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node-positive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 330(18), 1253-1259. doi:10.1056/NEJM199405053301801

Wu, Z. H., ve Miyamoto, S. (2007). Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med (Berl)*, 85(11), 1187-1202. doi:10.1007/s00109-007-0227-9

Wuerzberger-Davis, S. M., Nakamura, Y., Seufzer, B. J., ve Miyamoto, S. (2007). NF-kappaB activation by combinations of NEMO SUMOylation and ATM activation stresses in the absence of DNA damage. *Oncogene*, 26(5), 641-651. doi:10.1038/sj.onc.1209815

Xia, Y., Padre, R. C., De Mendoza, T. H., Bottero, V., Tergaonkar, V. B., ve Verma, I. M. (2009). Phosphorylation of p53 by IkappaB kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(8), 2629-2634. doi:10.1073/pnas.0812256106

Xiong, J., Zhu, F. F., ve Nie, M. F. (2015). Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) mediates the effects of hypoxia on the promotion of HeLa cell viability, colony formation, and invasion capacity in vitro. *Genet Mol Res*, 14(2), 3281-3292. doi:10.4238/2015.April.13.7

Yao, P., ve Fox, P. L. (2013). Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. *EMBO Mol Med*, 5(3), 332-343. doi:10.1002/emmm.201100626

Yasmeen, A., Beauchamp, M. C., Piura, E., Segal, E., Pollak, M., ve Gotlieb, W. H. (2011). Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer:

involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecol Oncol*, 121(3), 492-498.
doi:10.1016/j.ygyno.2011.02.021

Yoshiba, S., Ito, D., Nagumo, T., Shiota, T., Hatori, M., ve Shintani, S. (2009). Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol*, 45(2), 109-115.
doi:10.1016/j.oraloncology.2008.04.002

Yousefian, A., Hennessy, E., Umstattd, M. R., Economos, C. D., Hallam, J. S., Hyatt, R. R., ve Hartley, D. (2010). Development of the Rural Active Living Assessment Tools: measuring rural environments. *Prev Med*, 50 Suppl 1, S86-92.
doi:10.1016/j.ypped.2009.08.018

Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., . . . Song, E. (2007). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131(6), 1109-1123. doi:10.1016/j.cell.2007.10.054

Yu, K. D., Di, G. H., Wu, J., Lu, J. S., Shen, K. W., Liu, G. Y., . . . Shao, Z. M. (2008). Breast cancer patients with estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive tumors: being younger and getting less benefit from adjuvant tamoxifen treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134(12), 1347-1354.
doi:10.1007/s00432-008-0414-2

Zakharchenko, O., Greenwood, C., Lewandowska, A., Hellman, U., Alldridge, L., ve Souchelnytskyi, S. (2011). Meta-data analysis as a strategy to evaluate individual and common features of proteomic changes in breast cancer. *Cancer Genomics Proteomics*, 8(1), 1-14.

Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I. G., Sonenberg, N., ve Pollak, M. (2006). Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*, 66(21), 10269-10273. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1500

Zhang, H., Massey, D., Tremelling, M., ve Parkes, M. (2008). Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull*, 87, 17-30.
doi:10.1093/bmb/ldn031

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., . . . Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108(8), 1167-1174. doi:10.1172/JCI13505

Zhou, Y., Eppenberger-Castori, S., Marx, C., Yau, C., Scott, G. K., Eppenberger, U., ve Benz, C. C. (2005). Activation of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 1130-1144. doi:10.1016/j.biocel.2004.09.006

Zhu, B. D., Li, X. L., Liu, Y., Chang, J., Liu, Y., Zhang, D. D., . . . Cui, C. P. (2010). Involvement of hepatopoietin Cn in the development of human hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 27(8), 571-580. doi:10.1007/s10585-010-9346-8

Zhuang, Y., Chan, D. K., Haugrud, A. B., ve Miskimins, W. K. (2014). Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo. *PLoS One*, 9(9), e108444. doi:10.1371/journal.pone.0108444

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 15/07/2016-257133



* B E K R K H E M 7 *



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 83045809-604.01.02-
Konu : Güven Yenmiş'in etik kurul kararı

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi : 17.06.2016 tarih, 66018902-050.99-223747 sayılı yazı

Anabilim Dalımız öğretim üyesi **Prof.Dr.Gönül KANIGÜR**'ün danışmanlığında **Doktora Öğrencisi Tıbbi Biyolog Güven YENMİŞ**'in yürütücülüğünde **Doç.Dr.Pınar Çiğdem KOCAEL** ve **Doç.Dr.Sema Sırma EKMEKÇİ**'nin yardımcılıklarında "**Metforminin Yaşlanma ve Kanser Üzerindeki Etkisinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması**" başlıklı Doktora Tezi hakkında **12 Temmuz 2016** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için: http://194.27.128.66/envision.Sorgula/Validate_Doc.aspx?V=BEKRKHEM7

Ayrıntılı bilgi için araba : Güler SOYDANER Dahili : 22300

Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa İSTANBUL

Tel : 0 (212) 414 30 00 21107-21108 Fax : 0 (212) 632 00 33

e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METFORMİNİN YAŞLANMA VE KANSER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%7	%4	%3	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	www.thejournalofbreasthealth.com İnternet Kaynağı	%1
3	mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
6	cloneresources.com İnternet Kaynağı	<%1
7	ÇAĞLAR, Hasan Onur, YILMAZ SÜSLÜER, Sunde, KAVAKLI, Şebnem, GÜNDÜZ, Cumhur, ERTÜRK, Biray, ÖZKINAY, Ferda and	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Güven	Soyadı	Yenmiş
Doğ.Yeri	İskenderun	Doğ.Tar.	14.06.1982
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	11243327328
Email	guven.yenmis@yahoo.com	Tel	0535 787 7337

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Cerrahpaşa,Lisanüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2018
Yük.Lis.	Marmara Üniversitesi Tıp Fak., Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2010
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2006
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Moleküler Biyolog	Acıbadem Sağlık Hizmetleri-LABGEN	2006-2018
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	YÖKDİL Puanı
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi		80

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
DNA Star	Çok iyi

Graphpad Prism	Çok iyi
----------------	---------

Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Idris Kına, Gonul Kanigur Sultuybek, Tugba Soydas, **Güven Yenmis**, Huseyin Biceroglu, Ahmet Dirican, Mustafa Uzan and Turgut Ulutin. Variations in Toll-like receptor and nuclear factor-kappa B genes and the risk of glioma. Br J Neurosurg (2018) DOI: 10.1080/02688697.2018.1540764

Yenmis G., Soydas T., Arkan H., Tasan E., Kanigur Sultuybek G. Genetic variation in NFKB1 gene influences liver enzyme levels in Morbidly Obese Women. Arch Iran Med. 2018 Jan 1;21(1):13-18.

Tunçdemir M., **Yenmiş G.**, Tombultürk K., Arkan H., Soydas T., Tek B., Altıntaş Ö., Özkara H., Kanıgür-Sultuybek G., NFKB1 rs28362491 and pre-miRNA-146a rs2910164 SNPs on E-Cadherin expression in case of idiopathic oligospermia. Int J Reprod Biomed (Yazd). 2018 Apr;16(4):247-254

Oner T., Arslan C., **Yenmis G.**, Arapi B., Tel C., Aydemir B. and Sultuybek G. K. Association of NFKB1A and microRNAs variations and the susceptibility to atherosclerosis. J. Genet. 2017 95;1-9 doi:10.1007/s12041-017-0768-9

Altinoz MA, Elmaci I, Bolukbasi FH, Ekmekci CG, **Yenmis G**, Sari R, Sav A. MGMT gene variants, temozolomide myelotoxicity and glioma risk. A concise literature survey including an illustrative case. J Chemother. 2017 Apr 23:1-7. doi: 10.1080/1120009X.2017.1312752. [Epub ahead of print]

Hocaoglu-Emre FS, Saribal D, **Yenmis G**, Guvenen G. Vascular Cell Adhesion Molecule 1, Intercellular Adhesion Molecule 1, and Cluster of Differentiation 146 Levels in Patients with Type 2 Diabetes with Complications. Endocrinol Metab (Seoul). 2017 Mar;32(1):99-105. doi: 10.3803/EnM.2017.32.1.99.

Tiftikçi A, Kutsal E, Altıok E, İnce Ü, Çicek B, Saruç M, Türkel N, Ersoy Ö, **Yenmiş G**, Tözün N. Analyzing esophageal squamous cell papillomas for the presence of human papilloma virus. Turk J Gastroenterol. 2017 Mar 17. doi: 10.5152/tjg.2017.16636. [Epub ahead of print]

Hocaoglu-Emre FS, **Yenmis G**, Yakicier C. First observation of Hb Ullevaal [β78(EF2) Leu>Val] in Turkey. Rev Bras Hematol Hemoter. 2017 Jan - Mar;39(1):63-65. doi: 10.1016/j.bjhh.2016.09.013. Epub 2016 Nov 10

Soydas T, Karaman O, Arkan H, **Yenmis G**, Ilhan MM, Tombulturk K, Tasan E, Kanigur Sultuybek G. The Correlation Of Increased Crp Levels With NFKB1 And TLR2 Polymorphisms In Case Of Morbid Obesity. Scand J Immunol. 2016 Aug 10. doi: 10.1111/sji.12471

Oner T, **Yenmis G**, Tombulturk K, Cam C, Kucuk OS, Yakicier MC, Dizman D, Sultuybek GK. Association of Pre-miRNA-499 rs3746444 and Pre-miRNA-146a rs2910164 Polymorphisms and Susceptibility to Behcet's Disease, Genet Test Mol Biomarkers. 2015 Aug;19(8):424-30

Sultuybek KG, **Yenmis G**, Koc A. Review: A general sight about linking *PARP-1* and *NFKB1* variations to the inflammatory events. Biomedical Journal, Kasim 2014,doi:10.4172/ijm.1000117

Yenmis G., Oner T., Cam C., Koc A., Kucuk OS., Yakicier MC., Dizman D., Sultuybek GK. Association of NFKB1 and NFKBIA polymorphisms in relation to susceptibility of Behçet's Disease. Scand J Immunol. 2014 Nov 3. doi: 10.1111/sji.12251.

Okan G, Ayan I, Karlioglu S, Altioek E, **Yenmis G**, Vural G. Conjunctival papilloma caused by human papillomavirus type 11 treated with systemic interferon in a five-year-old boy. Turkish Journal of Pediatrics 52 (1), 97-100 (2010 Jan-Feb)

Gülen Hatemi, Izzet Fresko, Sebahattin Yurdakul, Huri Ozdogan, Hasan Yazici, Enger Altioek, **Guven Yenmis**. Reply to letter by Priori et al commenting on whether Behcet's syndrome patients with acne and arthritis comprise a true subset. Arthritis & Rheumatology 12/2009; 62(1):305 - 306