

T. C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI



**METFORMİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hüsamettin ESKİOCAK

**Danışman**

Dr. Öğr. Üyesi Arash ALİZADEH YEGANİ

**HATAY – 2019**

T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**METFORMİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hüsamettin ESKİOCAK

**Danışman**

Dr. Öğr. Üyesi Arash ALİZADEH YEGANİ

**HATAY – 2019**

T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**METFORMİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Hüsamettin ESKİOCAK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından ....../....../ 2019 günü sözlü olarak yapılan  
tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri başkanı.....( )  
Üye: .....( )  
Üye: .....( )

Bu tez, Enstitümüz .....Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Akademik Unvanı, Adı Soyadı  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında desteklerini esirgemeyen tez danıőmanım Dr. Öğr. Üyesi Arash Alizadeh YEGANİ' ye,

Çalıőmalarımın her aşamasında bana manevi desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Fatih SAKİN'e,

Tez yazım süresince her türlü bilgi birikimini bana aktaran Arő. Gör. Seydi Ahmet ŐENGÜL'e,

Bu çalışmanın ortaya konulmasında bana her türlü maddi katkılarını sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT .....	X
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Meme Kanseri Sınıflandırması .....	2
2.2. Moleküler Sınıflandırma .....	2
2.2.1. Endokrin Reseptörler.....	2
2.2.1.1. Östrojen Reseptörü .....	2
2.2.1.2. Progesteron Reseptörü.....	3
2.2.1.3. HER2 .....	5
2.2.1.4. Androjen Reseptörü (AR) .....	7
2.2.2. Proliferasyon Belirteçleri.....	7
2.2.2.1. KI67 .....	8
2.2.2.2. TOP2A.....	8
2.2.2.3. Hücre Döngüsü Genleri .....	8
2.2.3. İnvazyon ve Metastaz Aktivasyonu.....	9
2.2.3.1. Bazal Belirteçler .....	9
2.2.3.2. Kök Hücre Belirteçleri.....	10
2.2.3.3. Matriks Metalloproteinaz 2 ve 9 .....	11
2.2.4. Bağışıklık Sisteminin İşgal Edilmesi .....	13
2.2.4.1. İmmün yanıt genleri ER-PR-HER2-tümörlerini kurtarır.....	13
2.2.5. Hücre Ölümüne Direnç Gösterme.....	14
2.2.5.1. BCL2 tümör prognoz sonucu ve tahmini üzerinde çift rol üstlenir.....	14
2.2.6. Genom Mutasyonları ve Düzensizliği.....	14
2.2.6.1. TP53 disfonksiyonu tümörün ilaç direncini artırır .....	14
2.3. Meme Kanseri Histolojik Alt Tipleri.....	15
2.3.1. Histolojik Alt tipler.....	15
2.3.2. Moleküler Alt tipler .....	18
2.4. Kanser ve Yaşlanma .....	19
2.4.1. Yaşlanma sinyalleri NF-KB aktivatörleridir .....	22
2.4.1.1. Oksidatif Stres.....	22

2.4.1.2. Genotoksik Stres .....	23
2.4.1.3. Kalıtsal bağışıklık: PAM'lar ve DAMP'lar .....	23
2.4.1.4. TNF Super ailesi.....	24
2.4.1.5. Insulin/IGF Sinyalleşme .....	24
2.4.1.6. Protein modifikasyonları: Asetilasyon ve O-glikozilasyon .....	25
2.4.2. Uzun Ömür Faktörleri NF-kB Sinyalleşmesini İnhibe Eder .....	25
2.4.2.1. p53 .....	25
2.4.2.2. Isı şok proteinleri (HSP) .....	25
2.4.2.3. Mikro RNA'lar .....	26
2.4.3. Kalori kısıtlaması, uzun ömür faktörleri ve NF-kB Sinyalleşmesi.....	28
2.4.4. Bir sağ kalım faktörü: NF-KB Sinyalleşmesi .....	28
2.5. Metformin ve Kanser.....	28
2.5.1. Neden Metformin ve Kanser.....	28
2.5.2. Metforminin Anti-diyabetik Ajan olarak Etki Mekanizması .....	29
2.5.3. Metforminin Kanser Hücre Biyoenerjisindeki Etki Mekanizması .....	30
2.5.4. Metformin: Bir anti-metabolit ilaç .....	31
2.5.5. Metforminin Taşınması.....	32
2.5.6. Metforminin diğer mekanizmaları .....	34
2.5.7. Metforminin In vitro ve In vivo Etkisi: Konsantrasyon Problemi .....	34
2.6. Proteomik Analizi .....	35
2.6.1. Meme Kanseri ve Proteomiks .....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Hücre kültürü .....	37
3.2. Doku Homojenizasyonu .....	37
3.3. Protein Miktar Tayini .....	37
3.4. Elisa Deneyleleri.....	37
4. BULGULAR .....	38
5. TARTIŞMA .....	41
6. SONUÇ.....	44
7. KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	57

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2: Metforminin taşınması ve AMPK-p53 ve NFkB ilişkisi.....	30
Şekil 4.1: Metforminin meme kanserindeki bcl-2 proteinine etkisi (n=6).....	38
Şekil 4.2: Metforminin meme kanserindeki kaspas-3 proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student t test. (* : Kontrole göre P<0.05.).....	39
Şekil 4.3: Metforminin meme kanserindeki bax proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. student t test. (* : Kontrole göre P<0.05.).....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1:</b> Histolojik derecelendirmede modifiye edilmiş Bloom-Richardson Sistemi.....	16
<b>Çizelge 2.2:</b> Histolojik Tip Puanlama Çizelge .....	17
<b>Çizelge 2.3:</b> Majör moleküler alt tiplerin gen ekspresyon profillerine göre değerlendirilmesi.....	19
<b>Çizelge 4.1:</b> Wee1, AIF, gladd153, grp78 analiz sonuçları.....	40





## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AR : Androjen Reseptörü

CK : Sitokeratin

EBFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

ECM : Ekstraselüler Matriks

EMT : Epitelyal Mezenkimal Geçiş

EIO : Avrupa Onkoloji Enstitüsü

GEP : Gen Ekspresyonu Profilleme

HER2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

IHK : İmmünohistokimya

KK : Kalorik Kısıtlama

MMP : Matriks metalloproteinaz

ÖR : Östrojen Reseptörü

PR : Progesteron Reseptörü

RIPA : Radio-Immunoprecipitation Assay

T2DM : Tip 2 Diabetes Mellitus

TNM : Tümör Nod Metastaz

TOP2A : Topoizomeraz II Alfa

## ÖZET

### **Metforminin Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**

Kanserlerde kemoterapötiklere gösterilen dirençte ve kanser gelişiminde apoptozisin önemli rolü vardır. Metforminin güvenli, ucuz, etkili ve sık kullanılan bir ilaç olduğu düşünülürse, bu ilacın potansiyel apoptotik etkileri büyük önem arz etmektedir. Apoptotik yollar, kanserlerde kemoterapötiklere gösterilen dirençte ve kanser gelişiminde önemlidir. Bu nedenle, meme kanseri hücrelerinin metformin ile muamelesinin kaspaz-3, bax ve bcl-2 protein düzeylerini ve aktivitelerini nasıl etkileyeceğini planladık. Bu amaçla, meme kanseri hücre kültürü yapıldı. Daha sonra bu hücreler metformin ile muamele edilip hücrelerdeki kaspaz-3, bax, bcl-2, wee 1 gadd153, grp78, ve AIF protein düzeyleri ve aktiviteleri ELISA yöntemiyle analiz edildi. Bu amaçla, insan meme kanseri hücre kültürü yapıldı. Daha sonra bu hücreler metformin ile muamele edilip hücrelerdeki kaspaz-3, bax, bcl-2, wee 1 gadd153, grp78, ve AIF protein düzeyleri ve aktiviteleri ELISA yöntemiyle analiz edildi. Çalışmamız metforminin kanser hücrelerinin üremesini ve proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azalttığını ve antiapoptotik proteinleri artırdığını göstermiştir. Sonuç olarak çalışmamız metforminin insan meme kanseri üzerinde apoptotik etkileri olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metformin, meme kanseri, kaspaz-3, bax, bcl-2

## ABSTRACT

### Investigating of Effects of Metformine On Human Mammary Cancer

Apoptotic pathways are important for resistance to chemotherapeutics drugs and cancer development. If metformine are thought to be safe, cheap and effective drugs, the potentially apoptotic effects of these drugs are of great importance. Therefore we planned to investigate kaspase-3, bax and bcl-2 protein levels and activity in metformin treated skin cancer cells. For this propose we do culture of mammary cancer cells then these cells will treat with metformin and it will be analyzed kaspase-3, bax, bcl-2, wee 1, gadd153, grp78, and AIF protein levels and activity by ELISA on these cells. For this propose we did culture of human mammary cancer cells then these cells treated with metformine and it was analyzed kaspase-3, bax, bcl-2, wee 1, gadd153, grp78, and AIF protein levels and activity by ELISA on these cells. Treatment of metformine increased of proapoptotic proteins and decreased antiopoptotic protein. In conclusion our study showed that metformine has apoptotic effen on human mammary cancer cells.

**Key words:** Metformine, mammary cancer, kaspase-3, bax, bcl-2

# 1. GİRİŞ

Kanserde kemoterapötiklere gösterilen dirençte apoptozisin önemli bir rolü bulunmaktadır. Galena officinalis bitkisinden elde edilen ve diyabet tedavisinde sık kullanılan bir molekül olan metforminin özellikle meme kanserinde apoptik etkilerini gösteren ve tedavide tercih edilmesini destekleyen yayılar bulunmaktadır.( Cazzaniga ve ark. 2009)

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). 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. GENEL BİLGİLER

### 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'lerde 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 (Lancet 2005, Oh ve ark. 2006, Sorlie 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, Sorlie 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, 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 ve 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 düşündürülebilir (Arpino ve ark. 2005, Bardou ve ark. 2003, 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, 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 (Weigelt ve Reis-Filho 2009) ve HER2 gibi diğer belirteçlerin durumuna göre birçok alt gruba ayrılabilceğini göstermektedir (Sorlie ve ark. 2001, Sorlie 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 anöploidi 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, 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, 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). 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 ekspresyonu ile 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 profillemesi (GEP) isimlendirmesi ile tanımlanan lümen A ve lümen B tümörlerine benzerdir (Carey ve ark. 2006, Matos Dufloth ve ark. 2005). Bununla birlikte, IHC 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 düzelttiğini 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 ekspresyonu ile 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 siklofosfamid 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 ). Meme kanserinde potansiyel bir prognostik belirteç ve terapötik hedefdir. 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 belirteçine 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 değerlendirmesi, 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, Viale ve ark. 2008) 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) 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, Nielsen ve ark. 2008).

### **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). 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). 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 gözlendiği 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). 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, Sorlie 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 klaudin-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 kriptomik 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, stromelinler, matrinler, 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 (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 ekstravazasyonuna 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 gerçekleştirilen 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 (Talvensaaari-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 immünoreaktivitesinin, meme kanseri hastalarının azalmış sağ kalım süresinin bağımsız bir ön göstergesi olduğu bulunmuştur (Duffy ve ark. 2000, Forget ve ark. 1999). 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

#### **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 yerdedir 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). 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 hücre sel 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). 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) ve ÖR-TP53-tümörleri kemoterapi tedavisi başarısızlığından sıkıntı yaşamaktadır (Borresen-Dale. 2003, Kandioler-Eckersberger ve ark. 2000).

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 puan: 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 sayımın 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 (Çizelge 2.1).

**Çizelge 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) Tümöre orta derecede dağılmış (%10-75) Tümörde çok az ya da yok (<%10)	1 2 3
Nükleus Yapısı Küçük tektip hücreler Orta derecede şekil ve boyut farklı nükleol varlığı Belirgin derecede şekil ve boyut farkı artmış nükleol varlığı	1 2 3
Mitoz Sayısı (alan çapı 0.59-10 mm=x25) 0-9 Mitoz 10-19 Mitoz >20 Mitoz	1 2 3

Tübül oluşumu, nükleer pleomorfizm ve mitotik sayım puanları ile toplam puan elde edilir. Histolojik derece, çizelge 2.2’de gösterildiği gibi elde edilen toplam puana göre belirlenir.

**Çizelge 2.2: Histolojik Tip Puanlama Çizelgesi**

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

Bu yöntemle yapılan histolojik değerlendirme, yarı kantitatifdir, ancak hasta prognozunun belirlenmesinde çok güçlü bir öngörü sağlar (Rakha ve ark. 2010). Buna ek olarak, histolojik puanlamanın histolojik tiplere 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 IHK ile bir gen ekspresyonu profillemesi 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, Sorlie ve ark. 2003). Majör moleküler alt tipler meme kanserinde gen ekspresyon profillerine göre Çizelge 2.3'de özetlenmiştir (Correa Geyer ve Reis-Filho 2009; Schnitt 2010).

Çizelge 2.3: Majör moleküler alt tiplerin gen ekspresyon profillerine göre değerlendirilmesi

	<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B</b>	<b>Her2/neu</b>	<b>Bazal Benzeri</b>
<b>Gen Ekspresyonu Durumu</b>	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 PR genlerin düşük ekspresyonu	Bazal epitelial genlerin ve bazal sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu, ÖR ve PR genlerin düşük ekspresyonu, HER2 / neu'nun düşük ekspresyonu
<b>Klinik ve Biyolojik Özellikler</b>	İnvazif meme kanserlerinin %50'si. ÖR ve 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	İnvazif meme kanserlerinin yaklaşık % 15'i, çoğu ÖR PR / HER2 neu negatif (üçlü negatif). yüksek proliferasyonu yaygın TP53 mutasyonu, BRCA1 dış fonksiyonu (germim, sporadik)
<b>Histolojik Korelasyon</b>	Tübüler Karsinom, Kribriform Karsinom. Düşük dereceli invazif duktal karsinom. Klasik Lobüler Karsinom	İnvazif duktal karsinom Mikropapdler karsinom	Yüksek dereceli invazif duktal karsinom	Yüksek dereceli ivazif duktal karsinom. Metaplastik karsinom. Medüller karsinom
<b>Tedaviye Yanıt ve Prognoz</b>	Endokrin tedavisine yanıt Kemoterapiye değişken yanıt iyi prognoz	Luminal A kadar iyi olmayan endokrin tedavisi yanıtı (tamoxifen ve aromataz inhibitörleri). Luinmal A dan daha iyi değişken kemoterapik yanıt Luminal A kadar iyi olmayan prognoz	Trastuzumaba (Herceptin) yanıt Antracydinle kemoterapiye yanıt genellikle olumsuz prognoz	Endokrin tedavisine veya Trastuzumaba yanıt yok, Platin grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlı tamamı 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 immüoglobulin 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, 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-kB 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-kB-uyarıcı kinaz), NF-kB komplekslerini aktive eden başlıca protein kinazlardır. NEMO (temel bir NF-kB modülatör) proteini, IκB kinaz (IKK) kompleksinin düzenleyici alt birimidir ve IKK kinaz kompleksinin aktivasyonunu düzenlemektedir (Sebban ve ark. 2006). Memeli NF-kB sistemi, evrim sırasında farklı sinyalleşme formlarına ayrılan eski bir konak savunma sistemini temsil etmektedir (Friedman ve Hughes 2002). Özellikle, NF-kB 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-kB 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, IκB inhibitörlerinin protein seviyelerinin yanı sıra aktive edici kinaz IKKa, IKKb ve NIK düzeylerinin yaşlanmadan etkilenmediğini ortaya çıkarmıştır (Helenius ve ark. 1996, 1996, 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-kB proteinlerinin hücre çekirdeği içerisine girişinin, yaşlanma ile arttığını açıkça ortaya koymuştur. Bunu takiben, NF-kB 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-kB komplekslerinin, NF-kB-bağımlı genlerin bir kümesinin transkripsiyonunu güçlendirebilecekleri çekirdeklere tutulmasını indükleyerek aktivasyon seviyesini arttırdığı senaryosunu desteklemektedir. NF-kB 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 uyaranlar 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, 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 homeostaziyi 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). 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, IKKb'nin p53 proteinini fosforile edebildiği ve daha sonra proteazomlar tarafından bozunmasını indükleyebildiği gözlemlenmiştir (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). 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 bağlı 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). 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 ubikitinasyon 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). 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, Vermeulen ve Loeschke 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, 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 strese, 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, Malhotra ve Wong 2002). Agou ve ark. ve Ran ve arkadaşları 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, Ikb $\alpha$  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).

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 genlerinkiyle 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 inflamatuvar 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. 2007). 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

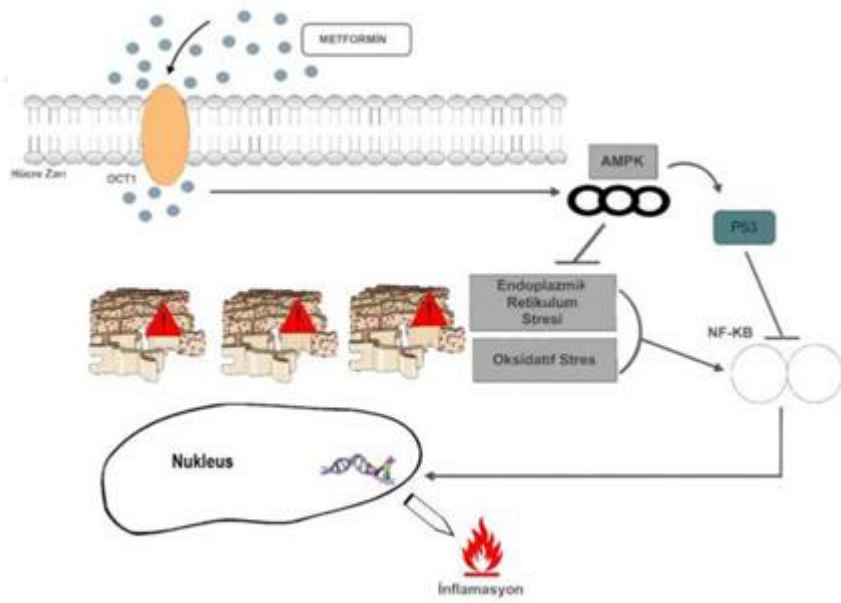
tedavi edilen T2DM hastalarında azalmış kanser riskinin gösterildiği ilk rapor sadece 13 yıl önce yayınlanmıştır (Evans ve ark. 2005). Amerikan Diyabet Derneği ve Amerikan Kanser Derneği konsensüs raporuna göre diyabet hastalarında diyabet olmayanlara karşın göreceli risk karaciğer, pankreas ve endometriyum 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). 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 (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 ( 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 antihyperglisemik 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 hücre biyoenerjide bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir ( 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 hepatic AMPK aktivasyonu glukoneogenezi inhibe ederken glikolizi aktive edebilir (Hardie ve Alessi 2013). Metforminin bu etkilerinin her ikisi de kan şekerini düşürebilir ve tip II diyabette anti-hiperglisemik 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 glukoneogenezi ve kan glikoz seviyelerini artırır (Cao ve ark. 2014) (Şekil 2.1).



Şekil 2-1: Metforminin taşınması ve AMPK-p53 ve NFKB ilişkisi

### 2.5.3. Metforminin Kanser Hücresi Biyoenerjisindeki Etki Mekanizması

Metforminin kanser hücrelerinde mitokondriyal kompleks I'i 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 ekspresyon 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). 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, 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, glutasyon 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 artışını ve folat ve B12 vitamini düşüşünü bildiren çeşitli çalışmalara üzerine kurulmuştur (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 glutasyon sentezinde azalma ile bağlantılıdır. Kanser hücrelerindeki metformin, aynı zamanda, homosistein birikimini de arttırmakta, ancak indirgenmiş glutasyon 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 glutasyon 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 uğrattırır 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, Moreno-Navarrete ve ark. 2011, 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 taşıyıcısı (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). Karaciğerde, metformin, ağırlıklı olarak OCT1 yoluyla hepatositlere alınır ve böylece bu taşıyıcı, metforminin antidiyabetik etkisinde kritik bir rol oynar.

### **2.5.6. Metforminin diğerk 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 karsinojenezin 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 glukoz ortamında güçlü olduğunu kanıtlamıştır, bu da in vitro deneylerde yüksek bir metformin konsantrasyonunun gerekliliğinin, glukozun uyguladığı maskeleyen 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. Glikoz 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, 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). 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 kullanılabilir 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.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü

Meme kanseri hücreleri (MCF7), %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), %1 L-Glutamine (Hyclone), %1 Penisillinstreptomisin (Hyclone), Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) besiyerinde yetiştirildi. Hücreler 24'lük standart hücre kültürü platelerinde  $1 \times 10^5$  sayısında tek tabaka halinde yetiştirildi. 37°C sıcaklıkta ve %5'lik CO<sup>2</sup>'li etüvde inkübe edildi. Bu hücreler 48 saat 10µM metformin ile muamele edilip ELISA yöntemiyle protein analizleri için homojenize edildi.

#### 3.2. Doku homojenizasyonu

Hücrelerin üzerine gram başına 3ml RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer, 30µl PMSF (fenylmetanesulfonilfluoride), 30µl sodyum vanadat, 30µl proteaz inhibitörü eklendi ve ultrasonic parçalama cihazıyla buz üzerinde dokuların parçalanarak homojenatlar elde edildi. Homojenatlar 10.000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilip üstte ayrılan kısımlar (süpernatantlar) alındı, alttaki çökeltiler (pelletler) atıldı.

#### 3.3. Protein miktar tayini

Homojenize edilmiş hücrelerin protein miktar tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Sığır serum albumini (1µg/ml) kullanılarak 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 (µg/ml) konsantrasyonlarda standart hazırlanıp her bir örnekten 10 µl alınarak distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Standart ve örneklerin üzerine 1ml Bradford solüsyonu eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda absorbans miktarları manuel olarak ölçüldü. Prism programında çizilen standart eğriye göre protein miktar tayini µg/µl cinsinden yapıldı. Protein miktar tayini ELISA deneylerinin standardizasyonu için yapıldı.

#### 3.4. ELISA deneyleri

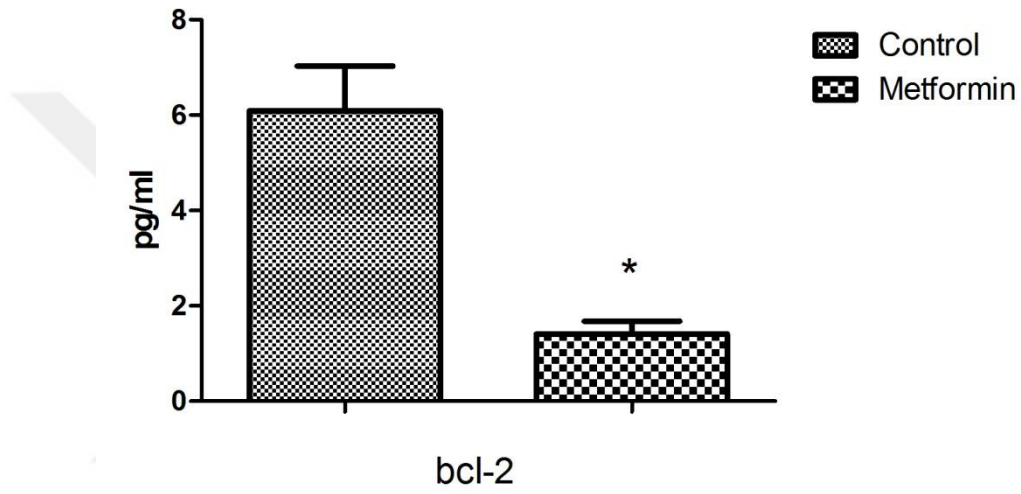
Kaspaz-3, bax ve bcl-2 protein düzeyleri ELISA testi ile incelendi. ELISA kitlerinin deney protokolleri herbir kit için değişkenlik göstermektedir.



## 4. BULGULAR

### ELİSA Bcl-2 Protein Miktar Tayini

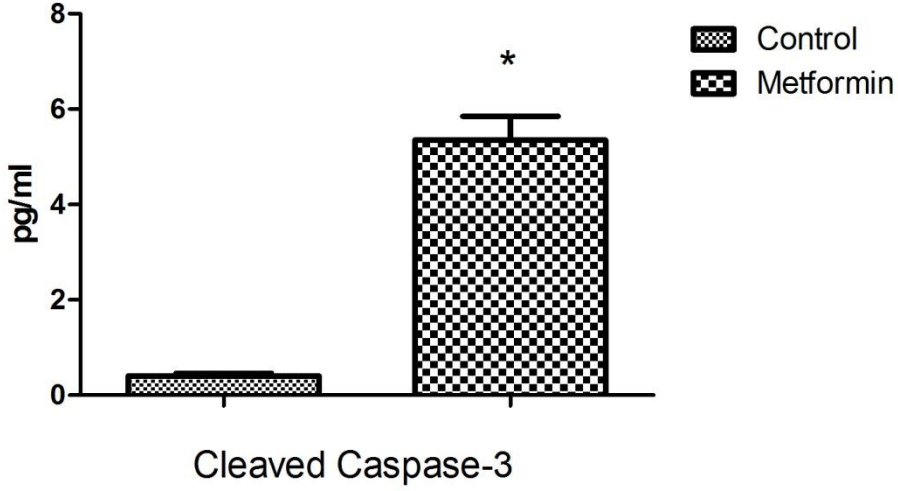
Hücrelere metformin uygulaması anti apoptotik protein olan bcl-2'nin ekspresyonunu anlamlı olarak artırdı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Metforminin meme kanserindeki bcl-2 proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student t test. (\* : Kontrole göre P<0.05.).

### ELİSA Kaspaz-3 Enzim Miktar Tayini

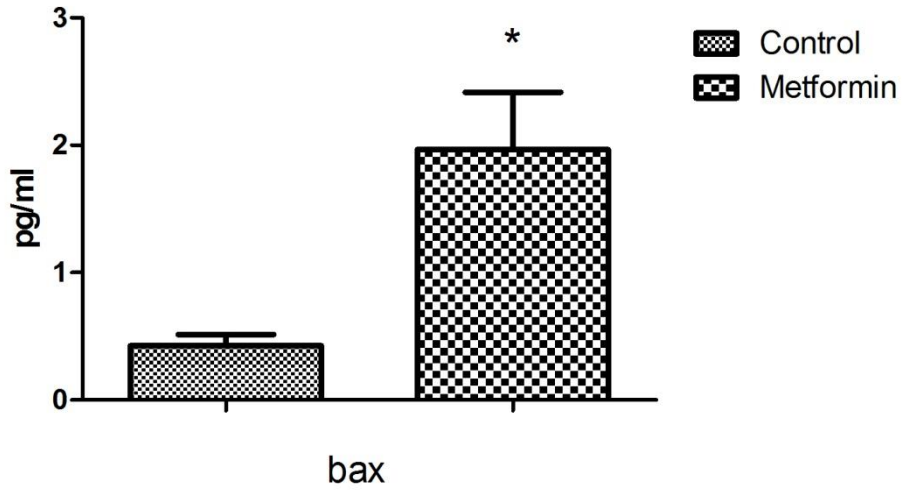
Hücrelere metformin uygulaması kaspaz-3'ü anlamlı olarak artırmıştır(Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Metforminin meme kanserindeki kaspaz-3 proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student t test. (\* : Kontrole göre P<0.05.).

### ELİSA Bax Protein Miktar Tayini

Hücrelere metformin uygulaması bax'ı anlamlı olarak artırmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Metforminin meme kanserindeki bax proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. student t test. (\* : Kontrole göre P<0.05.).

### ELİSA wee 1 Protein Miktar Tayini

Metformin wee-1'i anlamlı olarak artırmıştır (Çizelge 4.1).

### ELİSA AIF Protein Miktar Tayini

Metformin AIF'i anlamlı olarak artırmıştır(Çizelge 4. 1).

### ELİSA 1 gadd153 Protein Miktar Tayini

Metformin gadd153'ü anlamlı olarak artırmıştır(Çizelge 4.1).

### ELİSA grp78Protein Miktar Tayini

Metformin gadd153 anlamlı olarak artırmıştır(Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** wee1, AIF, gladd153, grp78 analiz sonuçları. (Sonuçlar mean±SE olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analiz: Student t test.) (\* : Kontole göre P < 0.05)

Çizelge 4.1	Control	Metformin
wee 1	0.38±0.12 pg/ml	0.78±0.02 pg/ml*
AIF	0.33±0.01 pg/ml	1.55±0.028 pg/ml*
gadd153	0.23±0.02pg/ml	1.85±0.04 pg/ml*
grp78	0.66±0.03 pg/ml	1.35±0.07 pg/ml*

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda apoptoz yolağında görev alan bax, bcl-2, kaspaz-3, wee 1 gadd153, grp78, ve AIF proteinlerini değerlendirdik. Çalışmamızda metformin proapoptotik proteinleri olan bax ve kaspaz-3'ü artırıp, anti apoptotik protein olan bcl-2'yi azaltmıştır. Diğer bir ifade ile metforminin kanser hücrelerinin üremesini ve proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azalttığını ve antiapoptotik proteinleri artırdığı gösterilmiştir.

Apoptoz embriyogenez aşamasında istenmeyen dokuların ortadan kaldırılmasında ve dokunun yeniden şekillendirilmesinde; daha sonraki yıllar da gelişim, homeostazın sağlanması ve yaşlanmada, tüm yaşam süreci boyunca hasar görmüş transformasyona uğramış, enfektif dokunun ve yaşam süresini doldurmuş sağlıklı dokunun elimine edilmesinde fonksiyon gören programlanmış hücre ölümüdür.

Bcl-2 ailesi ve kaspazlar apoptotik yolda temel mediyatörlerdir. Entrensek yolak kaspaz-8 ve 10'un aktivasyonu ve ölüm indükleyici sinyal kompleksi oluşumuyla, ekstrensek yolak kaspaz-9 aktivasyonu ve apoptozom kompleksi oluşumuyla, kaspaz-3'ü indüklemektedir. Bu son basamakta kaspaz-3 tipik DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır. Bcl-2 ailesi hem apoptotik hem anti apoptotik üyelere sahiptir. Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye göre proapoptotik veya antiapoptotik sinyaller mitokondriyi etkilemektedir. Apoptotik sinyaller baskınsa sitokrom c apoptozom kompleksini oluşturmak için mitokondriden ayrılır. Tetiklenmiş apoptoz organ yetmezliğine neden olurken, apoptozun engellenmesi hiperplazi ve kansere neden olmaktadır.

Apoptoz defektleri gelişimsel, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklarda ve kanser gelişiminde önemlidir (Evans ve ark. 2005). Metformin ile tedavi edilen T2DM hastalarında azalmış kanser riskinin gösterildiği ilk rapor sadece 13 yıl önce yayınlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar da metformin ile tedavi edilen bu hastalarda kanser insidansı ve mortalite riskinin daha az olduğunu göstermiştir. (Evans ve ark. 2005, Libby G ve ark. 2009). Yapılan kapsamlı bir meta-analiz çalışmasında metforminin pankreas kanseri, hepatoselüler karsinoma ve kolon kanserinde kanser insidansını %30-50 azalttığı tespit edilmiştir (Decensi ve ark. 2010). Metforminin antikanser etkilerinin hangi

mekanizmalar aracılığıyla oluştuğu halen kesin olarak belirlenemese de bu etkilerini doğrudan veya dolaylı birçok mekanizma ile gösterdiği tespit edilmiştir. Bu mekanizmalardan biri AMPK aktivasyonu ile fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) yolağının baskılanmasıdır. Bu yolak hücre büyümesini ve metabolizmayı düzenleyen korunmuş bir sinyal yolağıdır. mTOR, S6 kinaz (S6K) ve translasyon başlatma faktörünün 4E binding protein 1 (4EBP1) gibi protein sentezinde yer alan iki önemli hedefi doğrudan aktive etmektedir (Pulito ve ark. 2014). mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) mTOR'un iki fonksiyonel kompleksinden biridir ve AMPK ile negatif yönde regüle edilmektedir. AMPK, mTORC1 yolağını doğrudan inhibe; mTOR yolağını inhibe eden tuberous sclerosis complex protein 2'yi (TSC2) ise dolaylı yoldan fosforile ederek, protein sentezinin ve hücre büyümesinin azalmasına yol açmaktadır (Hay ve ark. 2004). Metforminin AMPK modülasyonu yoluyla mTOR aktivitesini inhibe ederek çeşitli kanser türlerinin progresyonunda olumlu etkiler sağladığını bildiren çalışmalar vardır (Dowling ve ark. 2007, Han ve ark. 2015, Honjo ve ark. 2014). Bunun yanında metforminin mTORC1'i AMPK ve TSC2 yolağından bağımsız RAG GTPase aracılıklı inhibe ettiği de bulgular arasındadır (Kalender ve ark. 2010). Metforminin anti-neoplastik aktivitesinin olabileceğini gösteren ilk çalışma Zakikhani ve arkadaşlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattında mTOR/S6 kinaz yolağını baskılayıp doz bağımlı bir büyüme inhibitörü rol aldığını tespit ettikleri çalışmadır (Zakikhani ve ark. 2006).

Kanser ve diyabet arasında önemli biyolojik bağlantılar vardır. Bunlardan en dikkat çekicisi insülin/insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) sinyal yolağıdır. Kandaki insülin/IGF1 düzeyinin artması ve insülin/IGF reseptör sinyal yolaklarının upregülasyonu birçok kanser türünün oluşumunda rol oynadığı ortaya konmuştur (LeRoith ve ark. 2003). Metforminin bu yolağın inhibisyonu üzerinden kanser hücrelerinde hücre metabolizmasını değiştirdiği tespit edilmiştir (Karnevi ve ark. 2013). Ayrıca lipogenez ve kolesterol sentezi gibi iki önemli anabolik sürecin AMPK aktivasyonu aracılığıyla metformin tarafından inhibe edilmesi de metforminin kanser üzerindeki etkileriyle ilişkilendirilmektedir (Li D. 2011). Metforminin yağ asidi sentezini doğrudan inhibe ederek pankreatik tümör hücrelerinin çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir (Cantoria ve ark. 2014). Metformin ayrıca insan meme kanseri hücrelerinde, mTOR yolağını inhibe ederek, HER-2 (Human epidermal growth factor receptor) protein ekspresyonunu azaltmaktadır. Bu etkinin mTOR efektörü p70S6K1'in inhibisyonu ile meydana geldiği

düşünülmektedir. p70S6K, S6 ribozomal proteinin fosforilasyondan, yani ribozomda protein sentezinden sorumlu bir kinazdır (Vazquez-Martin ve ark. 2014).

Birçok organizmada kanseri baskılamak için çok önemli bir protein olan p53'ün AMPK ile ekspresyonu ve fosforilasyonunun metforminin antikanser etki mekanizmasındaki rolü ise halen tartışılmakta olan bir konudur. Bazı çalışmalar metforminin p53 aktivitesinde bir değişiklik olmadan hücre döngüsünü G0/G1 fazında bloke ettiğini gösterse de (Nelson ve ark. 2012) metforminin kanser üzerindeki inhibitör etkisinin hem kanser hem de yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynayan p53 aktivitesi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur(Cerezo ve ark. 2013, Li ve ark. 2015).

## 6. SONUÇ

Meme kanserleri oldukça yaygın görülen, insidansı giderek artan ve topluma oldukça yüklü bir maliyete sebep olan ciddi bir sağlık problemidir. Kanser tedavisi sırasında anti kanserojen etkinliği gösterilen metforminin potansiyel apoptik etkileri ortaya konmuştur. Bu nedenle metforminin meme kanseri hücrelerinin apoptoz yolağına etkisi merak uyandırmaktadır. Bu amaçla meme kanseri hücre hatları hücre kültüründe alınarak metforminin bu hücrelerdeki apoptoz mediyatörleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Kanserlerde kemoterapötiklere gösterilen dirençte ve kanser gelişiminde apoptozisin önemli rolü vardır. Metformin güvenli, ucuz ve etkili ilaçlar olduğu düşünülürse yararlı etkileri büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızda metforminin meme kanseri hücrelerinde, kaspaz-3, bax, bcl-2, wee 1 gadd153, grp78, ve AIF protein düzeylerini ve aktivitelerini nasıl etkileyeceğinin araştırılması yapılmıştır. Bu çalışmanın neticesinde metformin proapoptotik proteinleri olan bax ve kaspaz-3'ü artırıp, anti apoptotik protein olan bcl-2'yi azaltmıştır. Çalışmamız metforminin kanser hücrelerinin üremesini ve proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azalttığını ve antiapoptotik proteinleri artırdığını göstermiştir. Sonuç olarak çalışmamız metforminin insan meme kanseri üzerinde apoptotik etkileri olduğunu göstermiştir. T2DM tedavisi için metformin kullanan ve bu sırada meme kanseri teşhisi alan hastaların T2DM tedavilerine metformin ile devam etmesi, mevcut meme kanseri hastalarından yeni T2DM teşhisi konulan hastaların farmakoterapisi planlanırken metforminin de güçlü bir şekilde düşünülmesi gerekmektedir. Bu bağlamda metforminin potansiyel apoptotik etkilerinin araştırılması amacıyla ilave bilimsel çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

## 7.KAYNAKLAR

1. **Abdel-Fatah T. M., Perry C., Dickinson, P., Ball, G., Moseley, P., Madhusudan, S., Chan, S. Y.** 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*, **2013**, 24(11), 2801-2807.
2. **Agou F., Ye F., Goffinont S., Courtois G., Yamaoka S. ve ark.** NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J Biol Chem*, 277(20), **2002**, 17464-17475.
3. **Algire C., Moiseeva O., Deschenes-Simard X., Amrein L. ve ark.** Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5(4), **2012**, 536-543.
4. **Allred D. C.** Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. *Oncologist*, 13(11), **2008**, 1134-1136.
5. **Anderson W. F., Chu K. C., Chatterjee N., Brawley O., ve Brinton L. A.** 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), **2001**, 18-27.
6. **Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., Brawley ve ark.** Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **2002**, 76(1), 27-36.
7. **Andrzejewski, S., Gravel, S. P., Pollak, M., ve St-Pierre, J.** Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab*, 2, **2014**, s12.
8. **Arpino G., Weiss H., Lee A. V., Schiff R., De Placido S. ve ark.** Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst*, 97(17), **2005**, 1254-1261.
9. **Bardou V. J., Arpino G., Elledge R. M., Osborne C. K., ve Clark G. M.** 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), **2003**, 1973-1979.
10. **Barone B. B., Yeh H. C., Snyder C. F., Peairs K. S., Stein K. B. ve ark.** Postoperative mortality in cancer patients with preexisting diabetes: systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(4), **2010**, 931-939.
11. **Bartke A. ve Brown-Borg H.** Life extension in the dwarf mouse. *Curr Top Dev Biol*, 63, **2004**, 189-225.
12. **Bartlett J., Mallon E. ve Cooke T.** The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol*, 199(4), **2003**, 411-417.
13. **Ben Sahra I., Laurent K., Loubat A., Giorgetti-Peraldi S., Colosetti P. ve ark.** The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*, 27(25), **2008**, 3576-3586.
14. **Bensaad K. ve Vousden K. H. (2007).** p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol*, 17(6), 286-291.
15. **Bertrand F., Desbois-Mouthon C., Cadoret, A., Prunier, C., Robin, H., ve ark.** 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), **1999**, 30596-30602.
16. **Bianchi M. E.** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 81(1), **2007**, 1-5.
17. **Bishop N. A., ve Guarente L.** Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet*, 8(11), **2007**, 835-844.
18. **Blandino G., Valerio M. Cioce, M., Mori, F., Casadei, L. ve ark.** Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nat Commun*, 3, **2012**, 865.
19. **Blenkiron C., Goldstein L. D., Thorne N. P., Spiteri I., Chin S. F. ve ark.** MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*, 8(10), **2007**, R214.
20. **Bonafe M., ve Olivieri F.** Circulating microRNAs in aging. *Oncotarget*, 6(3), **2015**, 1340-1341.
21. **Bonanni B., Puntoni M., Cazzaniga M., Pruneri G., Serrano D. ve ark.** Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *J Clin Oncol*, 30(21), **2012**, 2593-2600.
22. **Borresen-Dale A. L.** TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*, 21(3), **2003**, 292-300.
23. **Brown-Borg H. M.** Hormonal control of aging in rodents: the somatotrophic axis. *Mol Cell Endocrinol*, 299(1), **2009**, 64-71.
24. **Bruunsgaard H., Pedersen M., ve Pedersen B. K.** Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol*, 8(3), **2001**. s131-136.



25. **Bullrich F., Fujii H., Calin G., Mabuchi H., Negrini M., ve ark.** Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer Res*, **2001**, 61(18), 6640-6648.
26. **Calao M., Burny A., Quivy V., Dekoninck A., ve Van Lint C.** A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends Biochem Sci*, **2008**, 33(7), 339-349.
27. **Campisi J.** Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, **2005**, 120(4), 513-522.
28. **Cantoria M.J., Boros L.G. ve Meuillet E.J.** Contextual inhibition of fatty acid synthesis by metformin involves glucose-derived acetyl-CoA and cholesterol in pancreatic tumor cells. *Metabolomics*, **2014**; 10:91-104
29. **Cao J., Meng S., Chang E., Beckwith-Fickas K., Xiong L. ve ark.** Low concentrations of metformin suppress glucose production in hepatocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem*, **2014**, 289(30), 20435-20446.
30. **Cardoso F., Durbecq V., Larsimont D., Paesmans M., Leroy J. Y. ve ark.** 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*, **2004**, 24(1), 201-209.
31. **Carey L. A., Perou C. M., Livasy C. A., Dressler L. G., Cowan D. ve ark.** Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, **2006**, 295(21), 2492-2502.
32. **Cerezo M., Tichet M., Abbe P. ve ark.** Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/ p53-dependent manner. *Mol Cancer Ther*, **2013**; 12:1605-15.
33. **Cazzaniga M, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga A, Decensi A.** Is it time to test metformin in breast cancer clinical trials? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2009**; 18:701–5.
34. **Che W., Lerner-Marmarosh N., Huang Q., Osawa M., Ohta S. ve ark.** 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*, **2002**, 90(11), 1222-1230.
35. **Cheang M. C., Voduc D., Bajdik C., Leung S., McKinney S. ve ark.** Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*, **2008**, 14(5), 1368-1376.
36. **Cheang M. C., Chia S. K., Voduc D., Gao D., Leung S. ve ark.** Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **2009**, 101(10), 736-750.
37. **Chen Y., Voegeli T. S., Liu P. P., Noble E. G., ve Currie R. W.** Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm Allergy Drug Targets*, **2007**, 6(2), 91-100.
38. **Chen J., Xu T., ve Chen C.** The critical roles of miR-21 in anti-cancer effects of curcumin. *Ann Transl Med*, **2015**, 3(21), 330.
39. **Chen L. F., ve Greene W. C.** Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med (Berl)*, **2003**, 81(9), 549-557.
40. **Chia S., Norris B., Speers C., Cheang M., Gilks B. ve ark.** 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*, **2008**, 26(35), 5697-5704.
41. **Chin K., DeVries S., Fridlyand J., Spellman P. T., Roydasgupta R. ve ark.** Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. **2006**, 10(6), 529-541.
42. **Chumakov P. M.** Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc)*, **2007**, 72(13), 1399-1421.
43. **Cioce M., Valerio M., Casadei L., Pulito C., Sacconi A. ve ark.** Metformin-induced metabolic reprogramming of chemoresistant ALDHbright breast cancer cells. *Oncotarget*, **2014**, 5(12), 4129-4143.
44. **Colomer R., Beltran M., Dorcas J., Cortes-Funes H., Hornedo J. ve ark.** It is not time to stop progesterone receptor testing in breast cancer. *J Clin Oncol*, **2005**, 23(16), 3868-3869; author reply 3869-3870.
45. **Colozza M., Azambuja E., Cardoso F., Sotiriou C., Larsimont D. ve ark.** Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol*, **2005**, 16(11), 1723-1739.
46. **Coornaert B., Carpentier I., ve Beyaert R.** A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem*, **2009**, 284(13), 8217-8221.
47. **Corominas-Faja B., Quirantes-Pine R., Oliveras-Ferraros C., Vazquez-Martin A., Cufi S. ve ark.** Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging (Albany NY)*, **2012**, 4(7), 480-498.
48. **Correa Geyer F. ve Reis-Filho J. S.** Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for

- breast cancer management: are we there yet? *Int J Surg Pathol*, **2009**, *17*(4), 285-302.
49. **Creighton C. J., Li X., Landis M., Dixon J. M., Neumeister V. M. ve ark.** (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2009**, *106*(33), 13820-13825.
  50. **Curran S., Dundas S. R., Buxton J., Leeman M. F., Ramsay R. ve ark.** Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res*, **2004**, *10*(24), 8229-8234.
  51. **Cuzick J., Dowsett M., Wale C., Salter J., Quinn E. ve ark.** Prognostic Value of a Combined ER, PgR, Ki67, HER2 Immunohistochemical (IHC4) Score and Comparison with the GHI Recurrence Score—Results from TransATAC. In: AACR. **2009**.
  52. **Dai X., Chen A., ve Bai Z. J. S. r.** Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. **2014**, *4*, 6566.
  53. **Dandachi N., Dietze O., ve Hauser-Kronberger C.** Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the 112 detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest*, **2002**, *82*(8), 1007-1014.
  54. **Danilova N.** The evolution of immune mechanisms. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **2006**, *306*(6), 496-520.
  55. **de Jager J., Kooy A., Lehert P., Wulffele M. G., van der Kolk J. ve ark.** Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ*, **2010**, *340*, c2181.
  56. **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
  57. **Decensi A., Puntoni M., Goodwin P., Cazzaniga M., Gennari A. ve ark.** Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2010** Nov; *3*(11):1451-61
  58. **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.
  59. **Dowling R. J., Zakikhani M., Fantus I. G., Pollak M., ve Sonenberg N.** Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res*, **2007**, *67*(22), 10804-10812.
  60. **Dowling R. J., Niraula S., Stambolic V. ve Goodwin P. J.** Metformin in cancer: translational challenges. *J Mol Endocrinol*, **2012**, *48*(3), R31-43.
  61. **Dowsett M., Cuzick J., Wale C., Howell T., Houghton J. ve ark.** Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study. *J Clin Oncol*, **2005**, *23*(30), 7512-7517.
  62. **Dowsett M., Houghton J., Iden C., Salter J., Farndon J. ve ark.** Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. **2006**, *17*(5), 818-826.
  63. **Drahota Z., Palenickova E., Endlicher R., Milerova M., Brejchova J. ve ark.** Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res*, **2014**, *63*(1), 1-11.
  64. **Drzewoski J., Drozdowska A., ve Sliwinska A.** Do we have enough data to confirm the link between antidiabetic drug use and cancer development? *Pol Arch Med Wewn*, **2011**, *121*(3), 81-87.
  65. **Duffy M. J., Maguire T. M., Hill A., McDermott E. ve O'Higgins N.** Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*, **2000**, *2*(4), 252-257.
  66. **Dunnwald L. K., Rossing M. A., ve Li C. I.** Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, **2007**, *9*(1), R6.
  67. **Duong J. K., Kumar S. S., Kirkpatrick C. M., Greenup L. C., Arora M. ve ark.** Population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects and patients with type 2 diabetes mellitus: simulation of doses according to renal function. *Clin Pharmacokinet*, **2013**, *52*(5), 373-384.
  68. **Dutta J., Fan Y., Gupta N., Fan G., ve Gelinas C.** Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*, **2006**, *25*(51), 6800-6816.
  69. **Ejlertsen B., Jensen M. B., Nielsen K. V., Balslev E., Rasmussen B. B. ve ark.** HER2, TOP2A, and TIMP-1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol*, **2010**, *28*(6), 984-990.
  70. **Elledge R. M., Green S., Pugh R., Allred D. C., Clark G. M., Hill, J. Osborne C. K.** 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*, **2000**, *89*(2), 111-117.
  71. **Ellis M. J., Tao Y., Luo J., A'Hern R., Evans D. B. ve ark.** Outcome prediction for estrogen

- receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst*, **2008**, *100*(19), 1380-1388.
72. **Enesa K., Zakkar M., Chaudhury H., Luong le A., Rawlinson L. ve ark.** NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J Biol Chem*, **2008**, *283*(11), 7036-7045.
  73. **Esserman L. J., Ozanne E. M., Dowsett M. ve Slingerland J. M. J. B. C. R.** Tamoxifen may prevent both ER+ and ER-breast cancers and select for ER-carcinogenesis: an alternative hypothesis. **2005**, *7*(6), R1153.
  74. **Evans J. M., Donnelly L. A., Emslie-Smith A. M., Alessi D. R. ve Morris A. D.** Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, **2005**, *330*(7503), 1304-1305.
  75. **Fan C., Oh D. S., Wessels L., Weigelt B., Nuyten D. S. ve ark.** (2006). Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*, **2006**, *355*(6), 560-569.
  76. **Farmer P., Bonnefoi H., Becette V., Tubiana-Hulin M., Fumoleau P. ve ark.** Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, **2005**, *24*(29), 4660-4671.
  77. **Fatima R., Akhade V. S., Pal D., ve Rao S. M.** Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther*, **2015**, *3*, 5.
  78. **Forget M. A., Desrosiers R. R., ve Beliveau R.** Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol*, **1999**, *77*(7), 465-480.
  79. **Franceschi C., Valensin S., Bonafe M., Paolisso G., Yashin A. L ve ark.** The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol*, **2000**, *35*(6-7), 879-896.
  80. **Franceschi C., Capri M., Monti D., Giunta S., Olivieri F. ve ark.** Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*, **2007**, *128*(1), 92-105.
  81. **Frid A., Sterner G. N., Londahl M., Wiklander C., Cato A. ve ark.** Novel assay of metformin levels in patients with type 2 diabetes and varying levels of renal function: clinical recommendations. *Diabetes Care*, **2010**, *33*(6), 1291-1293.
  82. **Friedman R., ve Hughes A. L.** Molecular evolution of the NF-kappaB signaling system. *Immunogenetics*, **2002**, *53*(10-11), 964-974.
  83. **Fulford L., Easton D., Reis-Filho J., Sofronis A., Gillett C. ve ark.** Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. **2006**, *49*(1), 22-34.
  84. **Gandini S., Puntoni M., Heckman-Stoddard B. M., Dunn B. K., Ford L. ve ark.** Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2014**, *7*(9), 867-885.
  85. **Garbett E. A., Reed M. W., Stephenson T. J., ve Brown N. J.** Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol*, **2000**, *53*(2), 99-106.
  86. **Giacomini K. M., Huang S. M., Tweedie D. J., Benet L. Z., Brouwer K. L. ve ark.** Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, **2010**, *9*(3), 215-236.
  87. **Gilchrist S. E., ve Alcorn J.** Lactation stage-dependent expression of transporters in rat whole mammary gland and primary mammary epithelial organoids. *Fundam Clin Pharmacol*, **2010**, *24*(2), 205-214.
  88. **Giovannucci E., Harlan D. M., Archer M. C., Bergenstal R. M., Gapstur S. M. ve ark.** Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*, **2010**, *33*(7), 1674-1685.
  89. **Gloire G., Legrand-Poels S. ve Piette J.** NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*, **2006**, *72*(11), 1493-1505.
  90. **Goldhirsch A., Wood W. C., Gelber R. D., Coates A. S., Thurlimann B. ve ark.** Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol*, **2007**, *18*(7), 1133-1144.
  91. **Graham G. G., Punt, J., Arora M., Day R. O., Doogue M. P. ve ark.** Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*, **2011**, *50*(2), 81-98.
  92. **Guo L. S., Li H. X., Li C. Y., Zhang S. Y., Chen J. ve ark.** Synergistic antitumor activity of vitamin D3 combined with metformin in human breast carcinoma MDA-MB-231 cells involves m-TOR related signaling pathways. *Pharmazie*, **2015**, *70*(2), 117-122.
  93. **Gupta S., Wulf G., Henjakovic M., Koepsell H., Burckhardt G. ve ark.** Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. *J Pharmacol Exp Ther*, **2012**, *341*(1), 16-23.
  94. **Gupta S., ve Gollapudi S.** Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**, *37*(5), 1034-1042.
  95. **Habraken Y., ve Piette J.** NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol*, **2006**, *72*(9), 1132-1141.
  96. **Haldar S., Negrini M., Monne M., Sabbioni S. ve Croce C. M.** Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*, **1994**, *54*(8), 2095-2097.

97. **Ham A. C., Enneman A. W., van Dijk S. C., Oliai Araghi S., Swart K. M. ve ark.** 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*, **2014**, *31*(8), 611-621.
98. **Han T. K., Everett R. S., Proctor W. R., Ng C. M., Costales C. L. ve ark.** Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes. *Mol Pharmacol*, **2013**, *84*(2), 182-189.
99. **Han G., Gong H., Wang Y., Guo S. ve Liu K.** AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. *Cancer Biol Ther*, **2015**, *16*(1), 77-87.
100. **Hardie D. G. ve Alessi D. R.** LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol*, **2013**, *11*, 36.
101. **Harman D.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, **1956**, *11*(3), 298-300.
102. **Harris L. N., You F., Schnitt S. J., Witkiewicz A., Lu X. ve ark.** Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*, **2007**, *13*(4), 1198-1207.
103. **Harrison J. C. ve Haber J. E.** Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet*, **2006**, *40*, 209-235.
104. **Howley S. A., Ross F. A., Chevtzoff C., Green K. A., Evans A. ve ark.** Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab*, **2010**, *11*(6), 554-565.
105. **Hay N., Sonenberg N.** Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, **2004** Aug 15; *18*(16):1926-45.
106. **Hayden M. S. ve Ghosh S.** Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **2004**, *18*(18), 2195-2224.
107. **Hayes D. F., Thor A. D., Dressler L. G., Weaver D., Edgerton S. ve ark.** HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med*, **2007**, *357*(15), 1496-1506.
108. **Hayflick L.** Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both. *PLoS Genet*, **2007**, *3*(12), e220.
109. **Helenius M., Hanninen M., Lehtinen S. K. ve Salminen A.** Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, **1996a**, *28*(3), 487-498.
110. **Helenius M., Hanninen M., Lehtinen S. K., ve Salminen A.** Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem J*, **1996b**, *318* ( Pt 2), 603-608.
111. **Helenius M., Kyrilenko S., Vehvilainen P. ve Salminen A.** Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor-kappa B binding activity. *Antioxid Redox Signal*, **2001**, *3*(1), 147-156.
112. **Henderson S., Rowe M., Gregory C., Croom-Carter D., Wang F. ve ark.** Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, **1991**, *65*(7), 1107-1115.
113. **Hennessy B. T., Gonzalez-Angulo A. M., Stenke-Hale K., Gilcrease M. Z., Krishnamurthy S. ve ark.** Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*, **2009**, *69*(10), 4116-4124. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3441
114. **Honjo S., Ajani J. A., Scott A. W., Chen Q., Skinner H. D. ve ark.** Metformin sensitizes chemotherapy by targeting cancer stem cells and the mTOR pathway in esophageal cancer. *Int J Oncol*, **2014**, *45*(2), 567-574.
115. **Horwitz K. B., Koseki Y., ve McGuire W. L. J. E.** Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. **1978**, *103*(5), 1742-1751.
116. **Horwitz K., ve McGuire W. J. S.** Specific progesterone receptors in human breast cancer. **1975**, *25*(4), 497-505.
117. **Hosono K., Endo H., Takahashi H., Sugiyama M., Sakai E. ve ark.** Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2010**, *9*(9), 1077-1083.
118. **Hsu A. L., Murphy C. T., ve Kenyon C.** Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, **2003**, *300*(5622), 1142-1145.
119. **Hu Z., Fan C., Oh D. S., Marron J. S., He X. ve ark.** The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, **2006**, *7*, 96.
120. **Hu R., Dawood S., Holmes M. D., Collins L. C., Schnitt S. J. ve ark.** Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res*, **2011**, *17*(7), 1867-1874.
121. **Huang H., Patel D. D., ve Manton K. G.** The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Front Biosci*, **2005**, *10*, 192-215.

122. **Huang J. T., Wang J., Srivastava V., Sen S. ve Liu S. M.** MicroRNA Machinery Genes as Novel Biomarkers for Cancer. *Front Oncol*, **2014**, *4*, 113.
123. **Hulbert A. J., Pamplona R., Buffenstein R., ve Buttemer W. A.** Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev*, **2007**, *87*(4), 1175-1213.
124. **Hwang K. T., Woo J. W., Shin H. C., Kim H. S., Ahn, S. K. ve ark.** Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. *Int J Cancer*, **2012**, *131*(7), E1109-1119.
125. **Iwamoto T., ve Pusztai L. J. G. m.** Predicting prognosis of breast cancer with gene signatures: are we lost in a sea of data? , **2010**, *2*(11), 81.
126. **Iwasaki M., Nishikawa A., Fujimoto T., Akutagawa N., Manase K. ve ark.** Anti-invasive effect of MMI-166, a new selective matrix metalloproteinase inhibitor, in cervical carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol*, **2002**, *85*(1), 103-107.
127. **Iwasaki Y., Nishiyama M., Taguchi T., Asai M., Yoshida M. ve ark.** Insulin exhibits short-term anti-inflammatory but long-term proinflammatory effects in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, **2009**, *298*(1-2), 25-32.
128. **Janssens S., ve Tschopp J.** Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ*, **2006**, *13*(5), 773-784.
129. **Janzer A., German N. J., Gonzalez-Herrera K. N., Asara J. M., Haigis M. C., ve ark.** 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*, **2014**, *111*(29), 10574-10579.
130. **Joensuu H., Pylkkanen L., ve Toikkanen S.** Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol*, **1994**, *145*(5), 1191-1198.
131. **Johnson T. E., Cypser J., de Castro E., de Castro S., Henderson S. ve ark.** Gerontogenes mediate health and longevity in nematodes through increasing resistance to environmental toxins and stressors. *Exp Gerontol*, **2000**, *35*(6-7), 687-694.
132. **Johnson T. E.** Recent results: biomarkers of aging. *Exp Gerontol*, **2006**, *41*(12), 1243-1246.
133. **Jolly C., ve Morimoto R. I.** Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*, **2000**, *92*(19), 1564-1572.
134. **Jonker J. W., ve Schinkel A. H.** Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther*, **2004**, *308*(1), 2-9.
135. **Jung H. J., ve Suh Y.** Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet*, **2014**, *5*, 472.
136. **Kaisho T., ve Akira S.** Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, **2006**, *117*(5), 979-987
137. **Kalender A., Selvaraj A., Kim S.Y. et al.** Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*, **2010**; *11*:390-401.
138. **Kandioler-Eckersberger D., Ludwig C., Rudas M., Kappel S., Janschek E. ve ark.** TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **2000**, *6*(1), 50-56.
139. **Karin M., Cao Y., Greten F. R. ve Li Z. W.** NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, **2002**, *2*(4), 301-310.
140. **Karnevi E., Said K., Andersson R. ve Rosendahl A.H.** Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*, **2013** May 10; *13*:235.
141. **Khrapko K., ve Vijg J.** Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? *Trends Genet*, **2009**, *25*(2), 91-98.
142. **Klip A., ve Leiter L. A.** Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care*, **1990**, *13*(6), 696-704.
143. **Ko S. H., Ko S. H., Ahn Y. B., Song K. H., Han K. D. ve ark.** Association of vitamin B12 deficiency and metformin use in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*, **2014**, *29*(7), 965-972.
144. **Koepsell H., Lips K., ve Volk C.** Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*, **2007**, *24*(7), 1227-1251.
145. **Konecny G., Pauletti G., Pegram M., Untch M., Dandekar S. ve ark.** Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **2003**, *95*(2), 142-153
146. **Kossakowska A. E., Huchcroft S. A., Urbanski S. J. ve Edwards D. R.** 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*, **1996**, *73*(11), 1401-1408.
147. **Krabbe K. S., Pedersen M., ve Bruunsgaard H.** Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol*, **2004**, *39*(5), 687-699.
148. **Kukat A., ve Trifunovic A.** Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp Gerontol*, **2009**

- 44(1-2), 101-105.
149. **Kumar A., Takada Y., Boriek A. M. ve Aggarwal B. B.** Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, **2004**, 82(7), 434-448.
  150. **Labbaye C., ve Testa U.** The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol*, **2012**, 5, 13.
  151. **Lakis S., Kotoula V., Eleftheraki A. G., Batistatou A., Bobos M. ve ark.** The androgen receptor as a surrogate marker for molecular apocrine breast cancer subtyping. *Breast*, **2014**, 23(3), 234-243.
  152. **Lanari C., Lamb C. A., Fabris V. T., Helguero L. A., Soldati R. ve ark.** The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **2009**, 16(2), 333-350.
  153. **Lancet E. B. C. T. C. G. J. T** Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. . **1998**, 351(9114), 1451-1467.
  154. **Lancet E. B. C. T. C. G. J. T.** Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **2005**, 365(9472), 1687-1717.
  155. **Larbi A., Franceschi C., Mazzatti D., Solana R., Wikby A., ve ark.** Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda)*, **2008**, 23, 64-74.
  156. **LeBlanc V. C., ve Morin P.** Exploring miRNA-Associated Signatures with Diagnostic Relevance in Glioblastoma Multiforme and Breast Cancer Patients. *J Clin Med*, **2015**, 4(8), 1612-1630.
  157. **Lee S. K., ve Calin G. A.** Non-coding RNAs and cancer: new paradigms in oncology. *Discov Med*, **2011**, 11(58), 245-254.
  158. **Lehmann B. D., Bauer J. A., Chen X., Sanders, M. E., Chakravarthy A. B.ve ark.** Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, **2011**, 121(7), 2750-2767.
  159. **LeRoith D. ve Roberts C.T. Jr.** Insulin-like growth factors and cancer. *Cancer Lett*, **2003** Jun 10; 195(2):127-37
  160. **Li D.** Metformin as an antitumor agent in cancer prevention and treatment. *J Diabetes*, **2011** Dec; 3(4):320-7.
  161. **Li H. C., Cao D. C., Liu Y., Hou Y. F., Wu J. ve ark.** Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, **2004**, 88(1), 75-85.
  162. **Li P., Zhao M., Parris A.B., Feng X. ve Yang X.** p53 is required for metformin-induced growth inhibition, senescence and apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2015** Sep 4; 464(4):1267-74.
  163. **Libby G, Donnelly L.A., Donnan P.T., Alessi D.R. ve ark.** New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **2009**; 32: 1620-1625. 65
  164. **Lin C. J., Tai Y., Huang M. T., Tsai Y. F., Hsu H. J. ve ark.** 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*, **2010**, 114(3), 717-727.
  165. **Lippman M., Bolan G. ve Huff K. J. C. R.** The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. **1976**, 36(12), 4602-4609.
  166. **Locasale J. W.** Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*, **2013**, 13(8), 572-583.
  167. **Lombard D. B., Chua K. F., Mostoslavsky R., Franco S., Gostissa M. ve ark.** DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, **2005**, 120(4), 497-512.
  168. **Ma L., Teruya-Feldstein J., ve Weinberg R. A.** Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, **2007**, 449(7163), 682-688.
  169. **Maftouh M., Avan A., Sciarrillo R., Granchi C. Leon L. G. ve ark.** Synergistic interaction of novel lactate dehydrogenase inhibitors with gemcitabine against pancreatic cancer cells in hypoxia. *Br J Cancer*, **2014**, 110(1), 172-182.
  170. **Maggio M., Guralnik J. M., Longo D. L., ve Ferrucci L.** Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **2006**, 61(6), 575-584.
  171. **Malhotra V., ve Wong H. R.** Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Crit Care Med*, **2002**, 30(1 Supp), S89-S95.
  172. **Maro J. C., Platt R., Holmes J. H., Strom B. L., Hennessy S. ve ark.** Design of a national distributed health data network. *Ann Intern Med*, **2009**, 151(5), 341-344.
  173. **Martin M., ve Marais R.** Metformin: a diabetes drug for cancer, or a cancer drug for diabetics? *J Clin Oncol*, **2012**, 30(21), 2698-2700.
  174. **Martin-Castillo B., Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C. ve Menendez J. A.** Metformin and

- cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell Cycle*, **2010**, 9(6), 1057-1064.
175. **Martinez-Becerra P., Vaquero J., Romero M. R., Lozano E., Anadon C. ve ark.** No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm*, **2012**, 9(6), 1693-1704.
176. **Martins J. O., Zaroni F. L., Martins D. O., Coimbra R., Krieger J. E. ve ark.** Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor-kappaB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. *Shock*, **2009**, 31(4), 404-409.
177. **Matos I., Duffloth R., Alvarenga M., Zeferino L. C. ve Schmitt F.** p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*, **2005**, 447(4), 688-694.
178. **McDonnell T. J., Deane N., Platt F. M., Nunez G., Jaeger U. ve ark.** bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, **1989**, 57(1), 79-88.
179. **Medzhitov R. ve Janeway C. Jr.** Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, **2000**, 173, 89-97.
180. **Menendez J. A., Oliveras-Ferraro C., Cufi S., Corominas-Faja B., Joven J. ve ark.** Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle*, **2012**, 11(15), 2782-2792.
181. **Mi H., Huang X., Muruganujan A., Tang H., Mills C. ve ark.** PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res*, **2017**, 45(D1), D183-D189.
182. **Miller R. A., Chu Q., Xie J., Foretz M., Viollet B. ve ark.** Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*, **2013**, 494(7436), 256-260.
183. **Mishra N. C.** *Introduction to proteomics: principles and applications* (Vol. 148): John Wiley & Sons. **2011**.
184. **Mitropoulou T. N., Tzanakakis G. N., Kletsas D., Kalofonos H. P. ve Karamanos N. K.** 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*, **2003**, 104(2), 155-160.
185. **Mitsiades C. S., Mitsiades N., Poulaki V., Schlossman R., Akiyama M. ve ark.** 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*, **2002**, 21(37), 5673-5683.
186. **Miyoshi H., Kato K., Iwama H., Maeda E., Sakamoto T. ve ark.** Effect of the anti-diabetic drug metformin in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, **2014**, 45(1), 322-332.
187. **More S. S., Li S., Yee S. W., Chen L., Xu Z. ve ark.** Organic cation transporters modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue. *Mol Cancer Ther*, **2010**, 9(4), 1058-1069.
188. **Moreno-Navarrete J. M., Ortega F. J., Rodriguez-Hermosa J. I., Sabater M., Pardo G. ve ark.** OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects. *Diabetes*, **2011**, 60(1), 168-176.
189. **Morley J. F. ve Morimoto R. I.** Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell*, **2004**, 15(2), 657-664.
190. **Munoz M. J.** Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*, **2003**, 124(1), 43-48.
191. **Nagase H., Visse R. ve Murphy G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, **2006**, 69(3), 562-573.
192. **Nair V., Sreevalsan S., Basha R., Abdelrahim M., Abudayyeh A. ve ark.** 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*, **2014**, 289(40), 27692-27701.
193. **Nakano H., Nakajima A., Sakon-Komazawa S., Piao J. H., Xue X. ve ark.** Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ*, **2006**, 13(5), 730-737.
194. **Natrajan R., Lambros M. B., Rodriguez-Pinilla S. M., Moreno-Bueno G., Tan D. S. ve ark.** Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. *Clinical Cancer Research*. **2009**, 15(8), 2711-2722.
195. **Natrajan R., Weigelt B., Mackay A., Geyer F. C., Grigoriadis A. ve ark.** An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, **2010**, 121(3), 575-589.
196. **Nelson L.E., Valentine R.J., Cacicedo J.M. ve ark.** A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPK/SIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose-exposed HepG2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2012**; 303:C4-13. 31
197. **Nielsen K. V., Ejlersten B., Moller S., Jorgensen J. T., Knoop A. ve ark.** The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. *Acta Oncol*, **2008**, 47(4), 725-734.

198. Nies A. T., Koepsell H., Winter S., Burk O., Klein K. ve ark. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*, **2009**, 50(4), 1227-1240.
199. Nikas J. B., Low W. C. ve Burgio P. A. Prognosis of treatment response (pathological complete response) in breast cancer. *Biomark Insights*, **2012**, 7, 59-70.
200. Oh D. S., Troester M. A., Usary J., Hu Z., He X. ve ark. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *Journal of Clinical Oncology*. **2006**, 24(11), 1656-1664.
201. Olivier M., Langerod A., Carrieri P., Bergh J., Klaar S. ve ark. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, **2006**, 12(4), 1157-1167.
202. Olivieri F., Rippo M. R., Monsurro V., Salvioli S., Capri M. ve ark. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev*, **2013**, 12(4), 1056-1068.
203. Olivotto I. A., Truong P. T., Speers C. H., Bernstein V., Allan S. J. ve ark. Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. *J Clin Oncol*, **2004**, 22(9), 1769-1770.
204. Ouyang J., Parakhia R. A., ve Ochs R. S. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem*, **2011**, 286(1), 1-11.
205. Pacheco M. M., Mourao M., Mantovani E. B., Nishimoto I. N. ve Brentani M. M. Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico-pathological correlations. *Clin Exp Metastasis*, **1998**, 16(7), 577-585.
206. Page-McCaw A., Ewald A. J. ve Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**, 8(3), 221-233.
207. Palmer C., Diehn M., Alizadeh A. A., ve Brown P. O. Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics*, **2006**, 7, 115.
208. Pan Y., Han J., Zhang Y., ve Li X. J. [Role of vimentin in tumor metastasis and drug research]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **2010**, 41(6), 413-416.
209. Papazoglu C., ve Mills A. A. p53: at the crossroad between cancer and ageing. *J Pathol*, **2007**, 211(2), 124-133.
210. Park K. J., Gaynor R. B. ve Kwak Y. T. 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*, **2003**, 278(37), 35272-35278.
211. Parker J. S., Mullins M., Cheang M. C., Leung S., Voduc D. ve ark. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, **2009**, 27(8), 1160-1167.
212. Perkins N. D. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*, **2006**, 25(51), 6717-6730.
213. Perkins N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**, 8(1), 49-62.
214. Perou C. M., Sørlie T., Eisen M. B., Van De Rijn M., Jeffrey S. S. ve ark. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. **2000**, 406(6797), 747.
215. Perou C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, **2011**, 16 Suppl 1, 61-70.
216. Piano A. ve Titorenko V. I. The Intricate Interplay between Mechanisms Underlying Aging and Cancer. *Ageing Dis*, **2015**, 6(1), 56-75.
217. Piccart-Gebhart M. J., Procter M., Leyland-Jones B., Goldhirsch A., Untch M. ve ark. Adjuvant Trial Study Team; Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, **2005**, 353(16), 1659-1672.
218. Prat A. ve Perou C. MDeconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, **2011**, 5(1), 5-23.
219. Przybylowska K., Kluczna A., Zdrozny M., Krawczyk T., Kulig A. ve ark. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **2006**, 95(1), 65-72.
220. Pulito C., Donzelli S., Muti P., Puzzo L., Strano S. ve ark. microRNAs and cancer metabolism reprogramming: the paradigm of metformin. *Ann Transl Med*, **2014** Jun; 2(6):58.
221. Putti T. C., El-Rehim D. M. A., Rakha E. A., Paish C. E., Lee A. H. ve ark. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Modern Pathology*, **2005**, 18(1), 26.
222. Qi L., Bart J., Tan L. P., Platteel I., Sluis T. ve ark. 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*, **2009**, 9, 163.
223. Qu Z., Zhang Y., Liao M., Chen Y., Zhao J. ve ark. In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, **2012**, 42(9), 922-933.



224. **Quach S., Hennessy D. A., Faris P., Fong A., Quan H., ve ark.** A comparison between the APACHE II and Charlson Index Score for predicting hospital mortality in critically ill patients. *BMC Health Serv Res*, **2009**, *9*, 129.
225. **Quenel N., Wafflart J., Bonichon F., de Mascarel I., Trojani M. ve ark.** The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat*, **1995**, *35*(3), 283-291.
226. **Rahko E., Blanco G., Bloigu R., Soini Y., Talvensaari-Mattila A. ve ark.** Adverse outcome and resistance to adjuvant antiestrogen therapy in node-positive postmenopausal breast cancer patients-The role of p53. *Breast*, **2006**, *15*(1), 69-75.
227. **Rakha E. A., El-Sayed M. E., Green A. R., Paish E. C., Lee A. H., ve ark.** Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*, **2007**, *50*(4), 434-438.
228. **Rakha E. A. ve Ellis I. O.** Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*, **2009**, *41*(1), 40-47.
229. **Rakha E. A., Reis-Filho J. S., Baehner F., Dabbs D. J., Decker T. ve ark.** Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*, **2010**, *12*(4), 207.
230. **Ran R., Lu A., Zhang L., Tang Y., Zhu H. ve ark.** Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev*, **2004**, *18*(12), 1466-1481.
231. **Ravdin P. M., Green S., Dorr T. M., McGuire W. L., Fabian C. ve ark.** 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*, **1992**, *10*(8), 1284-1291.
232. **Ravdin P. M., Green S., Dorr T. M., McGuire W. L., Fabian C., ve ark.** 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*, **1992**, *10*(8), 1284-1291.
233. **Ryden L., Jonsson P. E., Chebil G., Dufmats M., Ferno M. ve ark.** South-East Swedish Breast Cancer G. Two years of adjuvant tamoxifen in premenopausal patients with breast cancer: a randomised, controlled trial with long-term follow-up. *Eur J Cancer*, **2005**, *41*(2), 256-264.
234. **Sacco F., Silvestri A., Posca D., Pirro S., Gherardini P. F. ve ark.** Deep Proteomics of Breast Cancer Cells Reveals that Metformin Rewires Signaling Networks Away from a Pro-growth State. *Cell Syst*, **2016**, *2*(3), 159-171.
235. **Sahin M., Tutuncu N. B., Ertugrul D., Tanaci N. ve Guvener N. D.** Effects of metformin or rosiglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, **2007**, *21*(2), 118-123.
236. **Salminen A., Huuskonen J., Ojala J., Kauppinen A., Kaarniranta K. ve ark. (2008).** Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev*, **2008**, *7*(2), 83-105.
237. **Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K., ve Linn S.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, **2004**, *73*, 39-85.
238. **Schaeffeler E., Hellerbrand C., Nies A. T., Winter S., Kruck S. ve ark.** DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med*, **2011**, *3*(12), 82.
239. **Schneider M. B., Matsuzaki H., Haorah J., Ulrich A., Standop J. ve ark.** Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology*, **2001**, *120*(5), 1263-1270.
240. **Schnitt S. J.** Will molecular classification replace traditional breast pathology? *Int J Surg Pathol*, **2010**, *18*(3 Suppl), 162S-166S.
241. **Schreck R., Albermann K., ve Baeuerle P. A.** Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*, **1992**, *17*(4), 221-237.
242. **Schreiber V., Dantzer F., Ame J. C. ve de Murcia G.** Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2006**, *7*(7), 517-528.
243. **Sikora E., Scapagnini G. ve Barbagallo M.** Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun Ageing*, **2010**, *7*(1), 1. 1
244. **Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G., Levin W. J. ve ark.** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **1987**, *235*(4785), 177-182
245. **Smith U. ve Gale E. A.** Does diabetes therapy influence the risk of cancer? *Diabetologia*, **2009**, *52*(9), 1699-1708.
246. **Smith U. ve Gale E. A.** Cancer and diabetes: are we ready for prime time? *Diabetologia*, **2010**, *53*(8), 1541-1544.
247. **Smith-Vikos T. ve Slack F.** MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci*, **2012**, *125*(Pt 1), 7-17.
248. **Song S., Andrikopoulos S., Filippis C., Thorburn A. W., Khan D. ve ark.** Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2001**, *281*(2), E275-282.

249. **Sood S., Gallagher I. J., Lunnon K., Rullman E., Keohane A. ve ark.** A novel multi-tissue RNA diagnostic of healthy ageing relates to cognitive health status. *Genome Biol*, **2015**, *16*, 185.
250. **Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S. ve ark.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, *8*(19), 10869-10874.
251. **Soti C. ve Csermely P.** Molecular chaperones and the aging process. *Biogerontology*, **2000**, *1*(3), 225-233.
252. **Sotiriou C. ve Pusztai L. J.** Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. **2009**, 790-800.
253. **Spitale A., Mazzola P., Soldini D., Mazzucchelli L. ve Bordoni A. J.** Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Annals of Oncology*, **2008**, *20*(4), 628-635.
254. **Sayed S. D.** *Cancer Proteomics: From Bench to Bedside*: SpringerLink. **2008**.
255. **Stamenkovic I.** Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*, **2000**, *10*(6), 415-433.
256. **Stendahl M., Ryden L., Nordenskjold B., Jonsson P. E., Landberg G. ve ark.** High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **2006**, *12*(15), 4614-4618.
257. **Sundblad A. S., ve Caprarulo L.** Immunohistochemical characteristics of mammary carcinomas with estrogen-negative and progesterone-positive receptors. *Medicina (B Aires)*, **1996**, *56*(6), 683-689.
258. **Talvensaari-Mattila A., Paakko P., Hoyhtya M., Blanco-Sequeiros G., ve Turpeenniemi-Hujanen T.** Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer*, **1998**, *83*(6), 1153-1162.
259. **Tanaka H., Fujita N., ve Tsuruo T.** 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated IkkappaB kinase beta (IkkB) phosphorylation activates NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*, **2005**, *280*(49), 40965-40973.
260. **Tang P., Wang J. ve Bourne P. J.** Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? *Human Pathology*, **2008**, *39*(4), 506-513.
261. **Teschendorff A. E., Miremadi A., Pinder S. E., Ellis I. O. ve Caldas C.** An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol*, **2007**, *8*(8), R157.
262. **Thor A. D., Berry D. A., Budman D. R., Muss H. B., Kute T. ve ark.** erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **1998**, *90*(18), 1346-1360.
263. **Turner N. C., Reis-Filho J. S., Russell A. M., Springall R. J., Ryder K. ve ark.** BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, **2007**, *26*(14), 2126-2132.
264. **Vallabhapurapu S., ve Karin M.** Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **2009**, *27*, 693-733.
265. **Vallejos C. S., Gómez H. L., Cruz W. R., Pinto J. A., Dyer R. R. ve ark.** Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clinical Breast Cancer*, **2010**, *10*(4), 294-300.
266. **van 't Veer L. J., Dai H., van de Vijver M. J., He Y. D., Hart A. A. ve ark.** Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, **2002**, *415*(6871), 530-536.
267. **van Schooneveld E., Wildiers H., Vergote I., Vermeulen P. B., Dirix L. Y., ve ark.** Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res*, **2015**, *17*, 21.
268. **van Uden P., Kenneth N. S. ve Rocha S.** Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*, **2008**, *412*(3), 477-484.
269. **Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C. ve Menendez J.A.** The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle*, **2009**; *8*:88-96. 66
270. **Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C., Cufi S., Martin-Castillo B. ve Menendez J. A.** Metformin and energy metabolism in breast cancer: from insulin physiology to tumour-initiating stem cells. *Curr Mol Med*, **2010**, *10*(7), 674-691.
271. **Vermeulen C. J. ve Loeschcke V.** Longevity and the stress response in Drosophila. *Exp Gerontol*, **2007**, *42*(3), 153-159.
272. **Veronesi U., Viale G., Rotmensz N. ve Goldhirsch A.** Rethinking TNM: breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research. *Breast*, **2006**, *15*(1), 3-8.
273. **Viale G., Giobbie-Hurder A., Regan M. M., Coates A. S., Mastropasqua M. G. ve ark. Breast International Group Team.** 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*, **2008**, 26(34), 5569-5575.
274. **Viale G., Regan M. M., Maiorano E., Mastropasqua M. G., Dell'Orto P. ve ark.** 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*, **2007**, 25(25), 3846-3852.
275. **Vijg J. ve Suh Y.** Genetics of longevity and aging. *Annu Rev Med*, **2005**, 56, 193-212.
276. **Volk C., Gorboulev V., Kotzsch A., Muller T. D. ve Koepsell H.** 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*, **2009**, 76(2), 275-289.
277. **Walker R. A.** Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *J Clin Pathol*, **2008**, 61(6), 689-696.
278. **Weigelt B. ve Reis-Filho J. S.** Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*, **2009**, 6(12), 718-730.
279. **Weiss Y. G., Bromberg Z., Raj N., Raphael J., Goloubinoff P. ve ark.** Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of IkappaB kinase in experimental acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, **2007**, 35(9), 2128-2138.
280. **West R. B., Nuyten D. S., Subramanian S., Nielsen T. O., Corless C. L. ve ark.** Determination of stromal signatures in breast carcinoma. *PLoS Biol*, **2005**, 3(6), e187.
281. **Wheaton W. W., Weinberg S. E., Hamanaka R. B., Soberanes S., Sullivan L. B. ve ark.** Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*, **2014**, 3, e02242.
282. **Wolff A. C., Hammond M. E., Schwartz J. N., Hagerty K. L., Allred D. C. ve ark.** 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*, **2007**, 131(1), 18-43.
283. **Wood W. C., Budman D. R., Korzun A. H., Cooper M. R., Younger J. ve ark.** Dose and dose intensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node-positive breast carcinoma. *N Engl J Med*, **1994**, 330(18), 1253-1259.
284. **Wuerzberger-Davis S. M., Nakamura Y., Seufzer B. J. ve Miyamoto S.** NF-kappaB activation by combinations of NEMO SUMOylation and ATM activation stresses in the absence of DNA damage. *Oncogene*, **2007**, 26(5), 641-651.
285. **Xia Y., Padre R. C., De Mendoza T. H., Bottero V., Tergaonkar V. B. ve ark.** Phosphorylation of p53 by IkappaB kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2009**, 106(8), 2629-2634.
286. **Yoshida S., Ito D., Nagumo T., Shiota T., Hatori M. ve ark.** Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol*, **2009**, 45(2), 109-115.
287. **Yu F., Yao H., Zhu P., Zhang X., Pan Q. ve ark.** Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, **2007**, 131(6), 1109-1123.
288. **Yu K. D., Di G. H., Wu J., Lu J. S., Shen K. W. ve ark.** 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*, **2008**, 134(12), 1347-1354.
289. **Zakikhani M., Dowling R., Fantus I. G., Sonenberg N. ve Pollak M.** Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*, **2006**, 66(21), 10269-10273.
290. **Zhang H., Massey D., Tremelling M. ve Parkes M.** Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull*, **2008**, 87, 17-30.
291. **Zhuang Y., Chan D. K., Haugrud A. B., ve Miskimins W. K.** Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo. *PLoS One*, **2014**, 9(9), e108444.

## ÖZGEÇMİŞ

1992 yılı Antakya - Hatay'da doğumludur. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesini kazanmış ve 2015 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Antakya ilçesinde serbest eczanesini açmış olup, halen mesleğini sürdürmektedir. İyi derece İngilizce ve Arapça bilmektedir.

