



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METFORMİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA TEK
BAŞINA, 5-FLOROURASİL VE OKSALİPLATİN İLE
KOMBİNASYONUNUN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Ezgi BOZKURT

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK-2016

BOLU



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METFORMİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA TEK
BAŞINA, 5-FLOROURASİL VE OKSALİPLATİN İLE
KOMBİNASYONUNUN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Ezgi BOZKURT

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Özge UZUN

Yrd. Doç. Dr. Recep BAYRAM

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 2015.08.36.829)

OCAK-2016

BOLU

Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Farmakoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN*

(imza)

Farmakoloji, AİBÜ

Prof. Dr. Özge UZUN**

(imza)

Farmakoloji, AİBÜ

Prof. Dr. Güler BUĞDAYCI

(imza)

Biyokimya, AİBÜ

Tarih: 19/01/2016

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Ezgi BOZKURT' un Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYZ

(imza)

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Jüri Başkanı

**Tez danışmanı

ÖZET

METFORMİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA TEK BAŞINA, 5-FLOROURASİL VE OKSALİPLATİN İLE KOMBİNASYONUNUN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Metformin (dimetilbiguanid) *Galega officinalis* isimli bitkiden ekstre edilen, diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir. Diyabette kullanımının yanı sıra, polikistik over sendromu (PKOS) ve obezite tedavisinde de etkilidir. Son zamanlarda metforminin kanser üzerindeki etkinliği araştırılmaktadır. Metforminin kanser hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi öncelikle 5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) aktivasyonu sonucu azalan mammalian target of rapamycin (mTOR) sinyalizasyonu ve protein sentezi ile ilişkilidir. Meta-analiz çalışmalarında, metformin kullanmış diyabetik hastalarda kanser insidansının azaldığı gösterilmiştir. Prostat kanseri, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, endometriyum kanseri ve pankreas kanseri gibi bazı kanser türlerinde metforminin etkinliğini değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Son zamanlarda metforminin kolon kanseri hücre hatlarındaki etkilerine ilişkin yapılan araştırmalar dikkat çekmektedir. Devam eden çalışmalar, konvansiyonel kemoterapi ile birlikte, metforminin kolon kanserinde etkili bir tedavi rejimi olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, biz bu çalışmamızda metforminin hem tek başına hem de 5-florourasil ve oksaliplatinle kombine halde verildiğinde kolon kanseri hücre hattında (HT-29) oluşturduğu etkileri araştırmayı amaçladık. Deneylerde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), laktat dehidrogenaz (LDH), Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) ve kaspaz-3 aktivasyonu yöntemleri kullanılarak metforminin HT-29 hücrelerinde proliferasyon, sitotoksikite ve apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır.

Sonuçta, çalışmalarımızın bulguları metforminin HT-29 hücre hattı üzerinde apoptotik etkisi olduğunu ve 5-florourasil ve oksaliplatinle birlikte verildiğinde bu etkinin arttığını ortaya çıkartmıştır. Araştırmamızın diğer bir bulgusu ise metformine bağlı bu etkinin doza ve zamana bağımlı olduğudur.

Anahtar Sözcükler: Metformin, Oksaliplatin, 5-florourasil, Kolon Kanseri, HT-29.

ABSTRACT

THE DETERMINATION OF EFFECTS OF METFORMIN ALONE AND IN COMBINATION WITH 5-FLUOROURACIL AND OXALIPLATIN ON COLON CANCER CELL LINE

Metformin (dimethylbiguanide) is one of the most widely prescribed drugs in the treatment of diabetes. Metformin, classified as a biguanide, is extracted from the herb *Galega officinalis*. In addition to its use in diabetes, metformin is also effective in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) and obesity. Metformin is currently being investigated for its efficacy in cancer. This effect of metformin on cancer cell proliferation is primarily associated with the activation of AMPK, leading to the reduction in mTOR signaling and protein synthesis. In meta-analysis studies, it has been shown that the incidence of cancer is reduced in diabetic patients who have received metformin. There have been many studies evaluating the efficiency of metformin in some cancers such as breast, prostate, lung, endometrial, ovarian, and pancreatic cancer. Recent studies relating to the effects of metformin on colon cancer cell lines are remarkable. Ongoing studies have suggested that metformin could be an effective treatment regimen for colon cancer with conventional chemotherapy. Therefore, we aim to determine the effects of metformin alone and in combination with 5-fluorouracil and oxaliplatin on colon cancer cell line (HT-29) in this study. The effect of metformin on HT-29 cells for determine proliferation, cytotoxicity and apoptosis were investigated in experiments by using 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), lactate dehydrogenase (LDH), Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) and caspase-3 activity methods.

In conclusion, the findings of our investigation revealed apoptotic effect of metformin increased on HT-29 cell line and the same effect was observed in combination with 5-fluorouracil and oxaliplatin. Another finding of our study is this effect of metformin is dose-and time-dependent.

Keywords: Metformin, Oxaliplatin, 5-fluorouracil, Colon Cancer, HT-29.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve yardımlarından yararlandığım, akademik hayata attığım bu ilk adımda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN'e;**

Bilgi, tecrübe ve yardımlarıyla her zaman bana yardımcı olan, yanında çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, karakteriyle ve sağlam duruşuyla her daim bana güç veren, çok sevdiğim tez danışmanım, kıymetli hocam **Prof. Dr. Özge UZUN'a;**

Özellikle hücre kültürü konusunda yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarım da bilgilerini aktarırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, yardımcı tez danışmanım **Yrd. Doç. Dr. Recep BAYRAM'a;**

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana yol gösteren, hücre kültürü konusunda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Uzm. Dr. Muhsine Zeynep YAVUZ'a;**

Deneyleirim sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan değerli hocam Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Doç.Dr. Zekiye ALTUN'a;**

Bolu'ya geldiğim günden beri her zaman bana destek olan, buradaki en büyük şanslarım, deyim yerindeyse kader birliği ettiğim dostlarım Fizyoloji Anabilim Dalı **Arş.Grv. Didem AYHAN DURAK** ve yüksek lisans öğrencisi **Hüsniye BİLGE'ye**

Ve hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da her zaman yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim, candan öte canlarım, her şeyden çok sevdiğim en kıymetlilerim annem **Alev BOZKURT** ve babam **Abdurrahman BOZKURT'a ;**

Sonsuz teşekkür ederim..

Ecz. Ezgi BOZKURT

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar	x
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Metformin.....	3
2.1.1. Bulunuşu	3
2.1.2. Kimyasal yapısı ve sentezi.....	4
2.1.3. Farmakokinetiği	5
2.1.4. Etki Mekanizması	6
2.1.4.1. AMPK (5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase)	6
2.1.5. Metforminin Kullanım Alanları	10
2.1.5.1. Diabetes Mellitus (DM)	10
2.1.5.2. Polikistik Over Sendromu (PKOS)	11
2.1.5.3. Metabolik sendrom ve obezite	11
2.1.5.4. Kardiyovasküler Sistem	12
2.3 Kanser ve Metformin.....	13
2.3.1. Kolon Kanseri ve Metformin	15
2.3.2. 5-Florourasil (5-FU)	16
2.3.3. Oksaliplatin	17
2.4. Hücre Kültürü.....	18
2.4.1. Hücre kültürlerinin sınıflandırılması	20
2.4.2. Kanser hücre hatları ve HT-29 kolon kanseri hücre hattı	21
2.5. Hücre ölümü	23
2.5.1. Nekroz.....	23
2.5.2. Apoptoz.....	23

2.5.3. Otofaji	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Kullanılan Kimyasallar	28
3.2. Kullanılan Cihazlar	29
3.3. Kullanılan Yöntemler	29
3.3.1. Hücre kültürü	29
3.3.1.1. Sıvı azot tankından alınan hücrelerin ekimi ve tripsinizasyonu.....	29
3.3.1.2. Hücre sayımı	30
3.3.1.3. Alt kültürlenme	30
3.3.2. Metforminin hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	31
3.3.2.1. 5-florourasil ve oksaliplatinin MTT yöntemiyle HT-29 hücre hattındaki toksik dozlarının belirlenmesi	31
3.3.2.2. Metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	32
3.3.3. Metforminin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının hücreler üzerinde etkisinin morfolojik olarak değerlendirilmesi	32
3.3.4. Metforminin HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksitenin LDH testi ile belirlenmesi	33
3.3.4.1. Metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksitenin LDH testi ile belirlenmesi	33
3.3.5. TUNEL yöntemi ile apoptozun belirlenmesi	34
3.3.6. Kaspaz-3 aktivasyonu tayini	35
3.3.7. İstatistiksel değerlendirme	36
4. BULGULAR	37
4.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	37
4.1.1. 5-florourasil (5-FU) ve oksaliplatinin toksik dozlarının MTT testi ile belirlenmesi	37
4.1.1.1. 5-florourasilin (5-FU) toksik dozunun MTT testi ile belirlenmesi	37
4.1.1.2. Oksaliplatinin toksik dozunun MTT testi ile belirlenmesi.....	37
4.1.2. Metforminin hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT ile belirlenmesi	38
4.1.2.1. Metforminin 24 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi	38

4.1.2.2. Metforminin 48 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi	39
4.1.2.3. Metforminin 72 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi	40
4.1.3. Metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi....	40
4.1.3.1. Metforminin 5-FU ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi	40
4.1.3.2. Metforminin oksaliplatin ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi	41
4.1.4. Metformin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının hücreler üzerinde etkisinin morfolojik olarak değerlendirilmesi	42
4.2. LDH Testi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi.....	44
4.2.1. Metforminin HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi	44
4.2.1.1. Metformine 24 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi.....	44
4.2.1.2. Metformine 48 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi.....	44
4.2.1.3. Metformine 72 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi.....	45
4.2.2. Metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarına maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi	46
4.2.2.1. Metforminin 5-FU ile kombinasyonuna 48 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi	46
4.2.2.2. Metforminin oksaliplatin ile kombinasyonuna 48 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi	47
4.4. HT-29 Hücre Hattında Metformin ve Metforminin 5-FU ve Oksaliplatin ile Kombinasyonlarının TUNEL Sonuçları.....	48
4.5. ELİSA Yöntemi ile Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları.....	50
4.5.1. Metformin uygulaması sonrası kaspaz-3 seviyesinin ölçümü	50

4.5.2. Metforminin 5-FU ile kombinasyonu sonrası kaspaz-3 seviyesinin ölçümü	50
4.5.3. Metforminin oksaliplatin ile kombinasyonu sonrası kaspaz-3 seviyesinin ölçümü	51
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR	58
8. ÖZGEÇMİŞ.....	72



TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 2.1. Hücre ve doku kültüründeki önemli gelişmelerin tarihçesi	19
Tablo 2.2. Önemli hücre hattı bankaları	22
Tablo 2.3. Apoptoz ve Nekroz kıyaslaması	26



ŞEKİLLER

	Sayfa No	
Şekil 2.1.	Galega officinalis bitkisi ve bu bitkiden sentezlenen guanidin yapıları moleküller	4
Şekil 2.2.	Metforminin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.3.	Metforminin absorpsiyonu ve dağılımı	6
Şekil 2.4.	AMPK alt üniteleri	8
Şekil 2.5.	AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı	9
Şekil 2.6.	AMPK aktivasyonu sonucu metforminin organlarda oluşturduğu etkiler	9
Şekil 2.7.	Metforminin anti-kanser etki mekanizması	15
Şekil 2.8.	5-FU ve oksaliplatin yapıları	18
Şekil 2.9.	HT-29 hücre hattı düşük yoğunluk ve yüksek yoğunlukta	22
Şekil 2.10.	Nekroza/Apoptoza maruz kalan bir hücrede hücre ölümünün aşamaları	26
Şekil 4.1.	5-florourasilin (5-FU) HT-29 hücrelerindeki toksisitesinin MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	37
Şekil 4.2.	Oksaliplatinin HT-29 hücrelerindeki toksisitesinin MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	38
Şekil 4.3.	Metforminin HT-29 hücrelerinde 24 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	39
Şekil 4.4.	Metforminin HT-29 hücrelerinde 48 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	39
Şekil 4.5.	Metforminin HT-29 hücrelerinde 72 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	40
Şekil 4.6.	Metforminin (met) 5-FU ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	41
Şekil 4.7.	Metforminin (met) oksaliplatin ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	41
Şekil 4.8.	Metformin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarına 48 saatlik maruziyet sonucu HT-29 hücrelerinin faz kontrast invert mikroskopda görüntüleri	43

Şekil 4.9.	Metforminin HT-29 hücrelerinde 24 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksisitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları	44
Şekil 4.10.	Metforminin HT-29 hücrelerinde 48 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksisitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları	45
Şekil 4.11.	Metforminin HT-29 hücrelerinde 72 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksisitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları	46
Şekil 4.12.	Metforminin (met) 5-FU ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksisitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları	47
Şekil 4.13.	Metforminin (met) oksaliplatin ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksisitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları	48
Şekil 4.14.	Metformin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarına 48 saatlik maruziyet sonucu HT-29 hücrelerinin TUNEL görüntüleri	49
Şekil 4.15.	Metforminin (met) 48 saatlik maruziyeti sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz-3'ün kat artışı sonuçları	50
Şekil 4.16.	Metforminin (met) 5-FU ile kombinasyonuna 48 saatlik maruziyeti sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz-3'ün kat artışı sonuçları	51
Şekil 4.17.	Metforminin (met) oksaliplatin ile kombinasyonuna 48 saatlik maruziyeti sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz-3'ün kat artışı sonuçları	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

4EBP1	4E binding protein 1
5-FU	5-Florourasil
ACC	Asetil-CoA karboksilaz
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	5'Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BKİ	Beden Kitle İndeksi
BSA	Bovine serum albumin
CaMKKs	Ca ²⁺ /kalmodülin bağımlı kinazlar
CYP17	Sitokrom P-450c17a
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dUTP	Deoksiuridin trifosfat
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAz	Deoksiribonükleaz
DPD	Dihidropirimidin dehidrojenaz
DSMZ	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH
dTMP	Deoksiuridin monofosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
dUMP	Deoksiuridin monofosfat
EASD	European Association of the Study of Diabetes
ECACC	The European Collection of Cell Cultures
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMF	Embriyonik Mouse Fibroblast
ER	Endoplazmik retikulum
ET-1	Endothelin-1
FAS	Fatty Acid Syhntase
FBS	Fetal bovin serum
FDA	Food and Drug Administration
FdUMP	Florodeoksiuridin monofosfat
FdUTP	Florodeoksiuridin trifosfat
FUTP	Florouridin trifosfat
GLUT4	Glucose transporter type 4

HDL	High Density Lipoprotein
HeLa	İnsan Serviks Karsinomu
Hep-2	İnsan Larenks Epidermoid Karsinomu
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-isoprenoid
HT-29	İnsan kolon kanseri hücre hattı
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IRS	İnsülin reseptör substratı
JCRB	Japanese Collection of Research Bioresources
KAH	Koroner Arter Hastalığı
KB	İnsan Nazofarenks Karsinomu
LDH	Laktat dehidrogenaz
LDL	Low Density Lipoprotein
LKB-1	Liver Kinase B1
LV	Lökoverin
MATE	Multidrug and Toxin Extrusion
MO25	Mouse protein 25
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC 1	mTOR Complex 1
MTT	3-(4.5-dimethylthiazol-2y)]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid

NO	Nitrik oksit
OCTs	Organic Cation Transporters
p53	Tumor protein 53
p70S6K1	p70 S6 kinase 1 onkoprotein
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PEPCK	Fosfoenol karboksi
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PKOS	Polikistik Over Sendromu
PMAT	Plasma Membrane Monoamine Transporter
PP2C	Protein fosfataz 2C
RNA	Ribonükleik asit
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
REDD1	Regulated in development and DNA damage response1
ROS	Reaktif oksijen türleri
OCTs	Organic Cation Transporters
S6K	S6 kinaz
SPSS	Statistic Program for Social and Science
SREBP-1	Sterol-Regulatory-Element-Binding Proteins
STRAD	Ste20-bağımlı adaptör
Thr172	Treonin 172
TNF α	Tümör necrosis factor alpha

TS	Timidilat sentaz
TSC2	Tuberous sclerosis protein 2
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VLDL	Very Low Density Lipoprotein



1. GİRİŞ

Metformin, *Galega officinalis* isimli bitkiden elde edilen ve diyabet tedavisinde en yaygın olarak reçete edilen ilaçlardan biridir (1). Antidiyabetik etkisini karaciğerde glukoneogenezi inhibe edip hepatik glukozu azaltarak ve insülin reseptörlerinin insüline karşı afinitesini artırarak göstermektedir (2). Metforminin bu etkilerini genellikle 'adenozin monofosfat-aktive edici protein kinaz' (AMPK) yolağını tetikleyerek gösterdiği belirtilmektedir (3). Metforminin diyabette kullanımının yanı sıra, polikistik over sendromlu kadınlarda kullanılmasının kişilerin metabolik profilinde düzelmeye sağladığı (4), obezite ve metabolik sendrom tedavisinde kullanımının ise tedaviye ek yarar sağlayabileceği düşünülmektedir (5).

Metformin aynı zamanda kanser üzerinde etkinliği araştırılan bir ilaçtır (6). Bir çok çalışma, metformin ile tedavi edilmiş diyabetik hastalarda kanser riskinin azaldığını göstermiştir (2, 7, 8). Bu çalışmalar metformin kullanımının kansere karşı koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle meme kanserinde apoptotik etkilerini gösteren ve tedavide kullanılmasını destekleyen yayınlar bulunmaktadır (9, 10). Metforminin antikanser etkisini insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), insülin ve human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) aracılı sinyalleri azaltarak ve mTOR sinyal inhibisyonu yolağıyla anjiyogenez inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu ile gösterdiği ileri sürülmektedir (2, 11). Metforminin prostat kanseri, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, endometriyal kanser ve pankreas kanseri üzerindeki etkileri ile ilgili de yapılmış birçok çalışma mevcuttur (12-18).

Kolon kanseri dünyada sık görülen kanserlerden biridir (19). Tedavisinde 5-florourasil (5-FU) ile birlikte son on yıldır oksaliplatin, irinotekan ve kapesitabin ve üç biyolojik ajan; bevasizumab, setuksimab ve panitumumab kullanılmaktadır. (20, 21, 22). Son zamanlarda metforminin kolon kanseri üzerindeki etkileri ile ilgili yapılan araştırmalar artmıştır (23-27). Kimyasal karsinojenlerle indüklenmiş, kanserli hayvan modellerinde, kolorektal karsinogenezde metforminin etkisini inceleyen çalışmalar metforminin mTOR yolağının engellenmesi ve AMPK aktivasyonu yoluyla azoksimetan kaynaklı

kolorektal aberran kript odağını bastırđını göstermiştir (28). Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda farklı kanser hücre hatlarında metforminin kemoterapötik ilaçlarla kombine halde verilmesinin antikanser etkide artış oluşturduğu tespit edilmiştir (29, 30). Tüm bu literatür bilgileri göz önünde bulundurarak planladđımız çalışmamızda metforminin hem tek başına hem de 5-florourasil ve oksaliptinle kombine halde verildiğinde kolon kanseri hücre hattında oluşturduğu sitotoksik ve apoptotik etkilerin tespit edilmesi ve kolon kanseri tedavisine yeni bir yaklaşım kazandırılması amaçlanmaktadır.

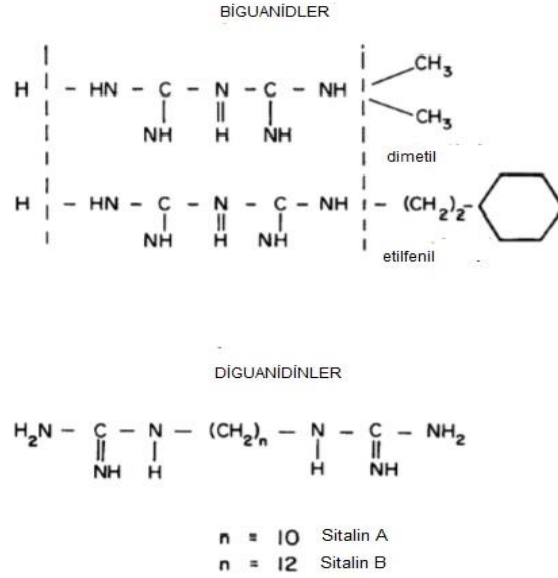


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metformin

2.1.1. Bulunuşu

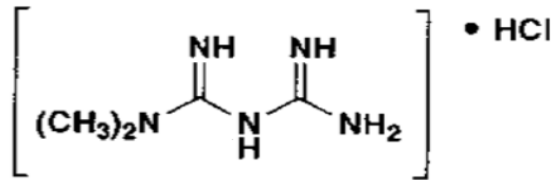
Metformin (dimetilbiguanid) diyabet tedavisinde en yaygın olarak reçete edilen ilaçlardan biridir. Metformin, *Galega officinalis* (goat's rue, French lilial) bitkisinden (Şekil 2.1) ekstre edilir. *Galega officinalis*, Leguminosae familyasından beyaz, mavi veya mor çiçekli çok yıllık bir bitkidir (1). Bitkinin ortaçağ'da Avrupa'da geleneksel kullanımı hipoglisemik bir madde olan "guanidin" açısından zengin olması ile açıklanmaktadır. 1920'li yıllarda guanidinin klinik kullanım için fazla toksik olduğunun belirlenmesiyle daha iyi tolere edilen ve daha etkili iki sentetik biguanid "Sitalin A ve Sitalin B" (Şekil 2.1) kullanılmaya başlanmıştır (31). 1929'da ise dimetilbiguanidinin de içinde olduğu bazı biguanidler sentezlenmiş ve bu maddeler hayvanlar üzerinde hipoglisemik etkiler göstermiştir (32). Metforminin glukoz yiyici anlamına gelen "Glucophage" olarak adlandırılması ise Fransız doktor Jean Sterne'nin 1957'deki makalesiyle olmuştur (33). 1957 ve 1958'de sırasıyla fenformin ve buformin isimli diğer biguanidler bulunmuş olsa da bu ilaçların neden olduğu laktik asidoz vakaları birçok ülkede kullanımlarının sonlandırılmasına neden olmuştur. Hipoglisemiye ve kilo almaya neden olmaması ve diğerlerine göre daha az laktik asidoza yol açması sebebiyle metformin daha fazla tercih edilmeye başlanmıştır (1). 1958 yılında İngilterede, 1972'de Kanada'da, 1995 yılından itibaren ise ABD ve tüm dünya ülkelerinde yaygın olarak diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (34).



Şekil 2.1. Galega officinalis bitkisi ve bu bitkiden sentezlenen guanidin yapıları (35, 36).

2.1.2. Kimyasal yapısı ve sentezi

Metforminin moleküler formülü $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5 \cdot \text{HCl}$, moleküler ağırlığı ise 165.63 g/mol'dür. Beyaz kristalli higroskopik, acı ve kokusuz bir tozudur. Suda çözünürken; eter ve kloroform içinde çözünmez. pKa değerleri 2.8 ve 11.51, erime aralığı $230\text{-}231^\circ\text{C}$ 'dir (37). Metforminin kimyasal sentezi, ilk olarak 1922 yılında Werner ve Bell tarafından yapılmıştır. Eşit molariteye sahip dimetilamin ve 2-siyanoguanidin toluen içerisinde eritilmiş, bu işlemler esnasında solüsyon soğutulmuş ve yoğun hale getirilmiş ve eşit molaritede HCl yavaşça bu solüsyona eklenmiştir. Karışım kaynatılıp soğutulduktan sonra oluşan çökelti ile metformin hidroklorid elde edilmiştir (38) (Şekil 2.2).

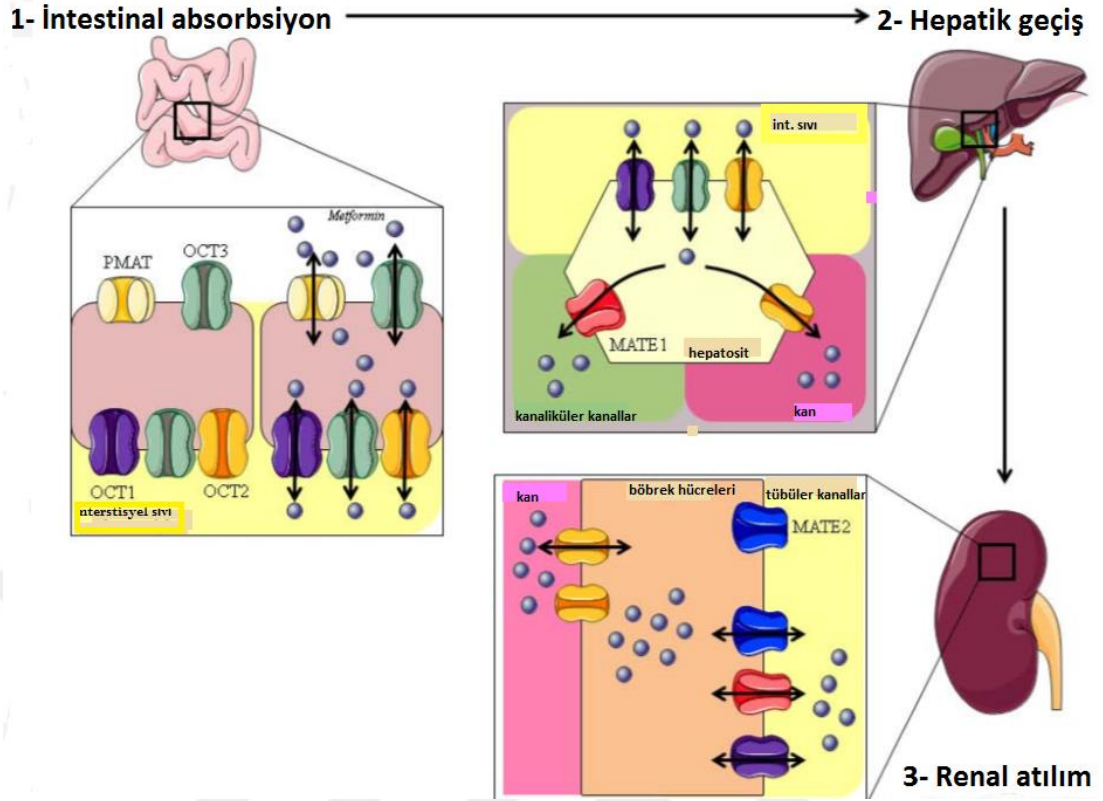


Şekil 2.2. Metforminin kimyasal yapısı (39).

2.1.3. Farmakokinetiği

Metformin gastrointestinal sistemden yavaş emilen bir ilaçtır. Biyoyararlanımı %50-60 oranındadır ve esas olarak ince barsaktan emilir (40). Emilimi tam değildir ve doz bağımlıdır (41). Oral yolla verilmesini takiben plazma doruk konsantrasyonuna 1-3 saatte; kararlı plazma konsantrasyonuna ise 24-48 saat içinde ulaşır. Metforminin plazma proteinlerine bağlanma oranı ihmal edilebilir seviyelerdedir. Zamana bağlı olarak eritrositler içine de girer. Sanal dağılım hacmi (V_d) ise 63-276 litre aralığında değişmektedir. Metformin tüm dokularda plazmadaki konsantrasyonuna yakın olarak dağılır ve bazı dokularda (özefagus, duodenum, tükürük bezi ve böbrekler) birikebilme özelliği gösterir. Metformin karaciğerde metabolize edilmez ve safra yoluyla atılmaz. İdrarda değişmeden atılır (42). Klinik kullanım dozlarında, böbrek fonksiyonları normal olan diyabetik ve diyabetik olmayan insanlarda metformin farmakokinetiği değişmez. Böbrek fonksiyon bozukluğu olanlarda ise metforminin plazma ve kan yarılanma ömrü uzar (43).

Metforminin taşınması esas olarak “Organic Cation Transporters (OCTs)” OCT1, OCT2, OCT3 ve “Multidrug and Toxin Extrusion (MATE)” MATE1, MATE2 proteinleri tarafından yönetilmektedir (44, 45). Metforminin gastrointestinal sistemden emiliminde ise “Plasma Membrane Monoamine Transporter” (PMAT) proteinlerinin rol oynadığı düşünülmektedir (46). OCT1, OCT2 ve OCT3 proteinlerinin metforminin intestinal epitelyum hücrelerde emiliminde ve hepatik alımında; MATE-1 ve MATE2 proteinlerinin ise metforminin renal atılımında görev aldıkları ileri sürülmektedir (47) (şekil 2.3).



Şekil 2.3. Metforminin absorpsiyonu ve dağılımı (48).

2.1.4. Etki Mekanizması

2.1.4.1. AMPK (5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase)

Metforminin moleküler hedefi yıllarca anlaşılamamasına rağmen, Zhou ve ark. AMPK aktivasyonunun metforminin etkileri ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (49). AMPK mekanizmasının ortaya çıkışı ise 1973 yılında yayımlanan iki farklı çalışma ile olmuştur. Bu çalışmalarda asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-isoprenoid (HMG-CoA) redüktazın, Adenozin trifosfat (ATP) ile inkübe edilmesi sonucu inaktive olduğu, bulunan bu iki grubun etkinliğinin fosforilasyon sonucu ortaya çıktığı ve bu fosforilasyonu sağlayanın bir protein kinaz olduğu düşünülmüştür (50, 51). 1987 yılında ise bu protein kinaz tespit edilerek adı AMPK olarak belirlenmiştir (52). AMPK enerji homeostazının dengelenmesinde önemli rol oynayan bir protein kinaz dizisinin baş bileşenidir. Isı şoku, hipoksi, açlık ya da uzun süreli egzersiz gibi hücre içi ATP düzeylerini tüketen beslenme ve çevresel değişimlere hücre adaptasyona aracılık eden "metabolik ana şalter" olarak tarif edilmiştir. AMPK her birini 2 veya 3 genin

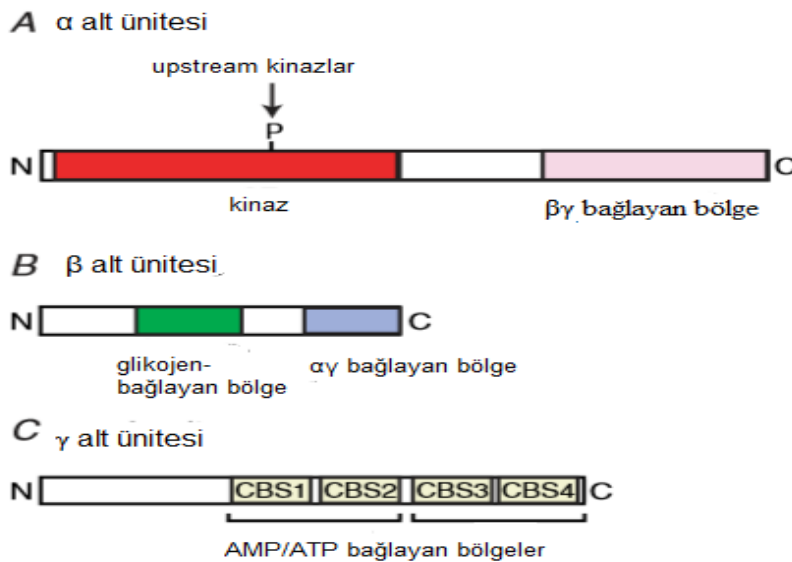
kodladığı α , β ve γ alt ünitelerinden oluşmaktadır. α alt ünitesinin iki izoformu ($\alpha 1$, $\alpha 2$) kinaz bölgesinde N-terminalin yarısını oluşturmaktadır. α alt ünitesi katalizör bölgeyi de içermektedir ve burada başka kinazlar tarafından fosforile edilen önemli bir düzenleyici olan Threonin (Thr^{172}) bulunmaktadır. $\alpha 1$ alt birimi esas olarak böbrek, akciğer ve adipoz dokuda sentezlenirken, $\alpha 2$ alt birimi kalp ve iskelet kaslarında sentezlenir. β alt ünitesinin iki izoformu ($\beta 1$, $\beta 2$) glikojen-bağlayan-C-terminal bölgesini oluşturmaktadır. γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) alt ünitesi ise N-terminal bölgesini takip eden ve Bateman tarafından CBS motifi olarak adlandırılan 60 aminoasit dizilik dört sıralı tekrardan oluşmaktadır. Bu motiflerin her bir çifti Bateman bölgesi olarak isimlendirilmekte ve bu bölgeler AMP/ATP moleküllerini bağlamaktadır (53-59) (Şekil 2.4).

AMPK'nin aktivasyonunun iki şekilde olduğu düşünülmektedir. Birincisi AMP'nin bağlanması sonucu AMPK'nin aktive olması, ikincisi ise AMPK α alt ünitesine LKB1 (Liver Kinase B1) kinazın bağlanarak AMPK'yi fosforile etmesidir (60). Fosforile olduğu zaman, AMPK maksimum düzeyde aktiftir. AMPK'nin α alt ünitesinde bulunan Thr^{172} bölgesini fosforile eden ana kinazın LKB1 ve iki yardımcı alt ünite STRAD (Ste20-bağımlı adaptör) ve MO25 (mouse protein 25) olduğu düşünülmektedir. Bu yapıların yokluğunda, LKB1 zayıf aktivite göstermektedir. (61). Çalışmalar, LKB1'in iskelet kasında en önemli AMPK kinaz olduğunu ve ayrıca karaciğerde LKB1'in delesyonu durumunda metforminin AMPK aktivasyonu üzerindeki etkilerini engellediğini göstermiştir (62, 63). Yapılan eş zamanlı çalışmalarda, beyinde ve LKB1 eksikliği olan hücrelerde ikinci bir alternatif AMPK kinaz Ca^{2+} /kalmodülün bağımlı kinazlar (CaMKKs) “CaMKK α ve CaMKK β ” bulunmuştur (64, 65). CaMKK'lar aynı zamanda kas dokusunda da bulunurlar ve aktiviteleri hücre içi Ca^{2+} artışına bağlıdır. Kesin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da protein fosfataz 2C (PP2C)'nin AMPK'nin fosforilasyonu ve dolayısıyla AMPK'nin etkinliğini düzenlemede önemli bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (56) (Şekil 2.5).

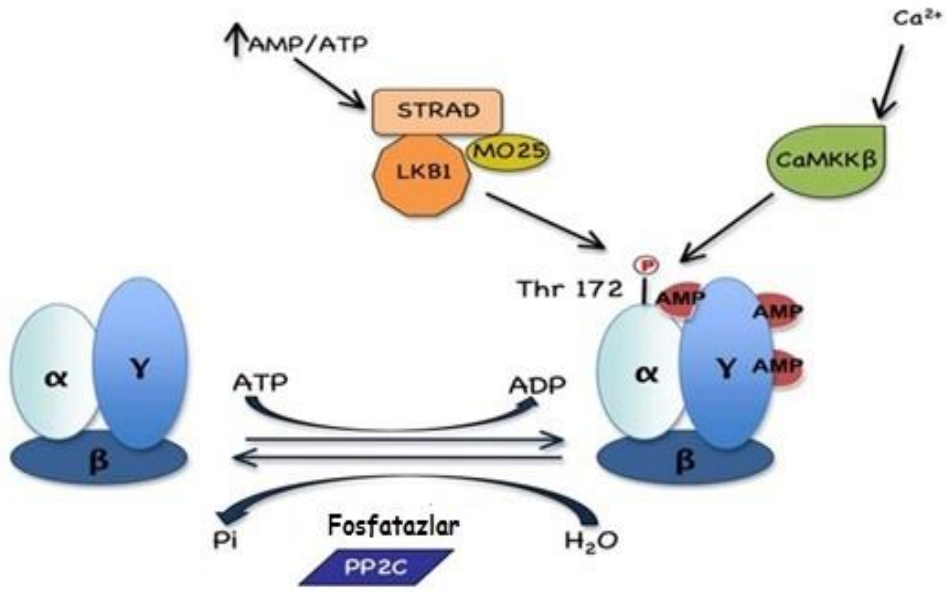
Kas ve karaciğer dokusunda AMPK'nin aktivasyonu glukoz ve lipid metabolizmasında olumlu etkilere neden olmaktadır. AMPK iskelet kasında glukozu hücreye taşıyan GLUT-4 (Glukoz transporter) ekspresyonunu artırarak glukoz

utilizasyonunu artırmaktadır (66). Karaciğerde aktive olduğunda ise hepatik glukoneogenezde önemli rol oynayan PEPCK (fosfoenol karboksi) ve glukoz-6-fosfataz enzimlerinin gen ekspresyonları inhibe olmaktadır. Aynı zamanda AMPK yağ asidi oksidasyonunu da teşvik etmekte ve karaciğerde yağ asidi sentezini artıran ACC (Acetyl-CoA carboxylase) enzimini ve SREPB-1 (Sterol-Regulatory-Element-Binding Proteins) proteinlerinin ekspresyonunu baskılayarak yağ asidi sentezini azaltmaktadır. Bunun sonucunda da kana VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), trigliserid taşınmasını ve karaciğerde yağ depolanmasını azaltmaktadır (67) (Şekil 2.6).

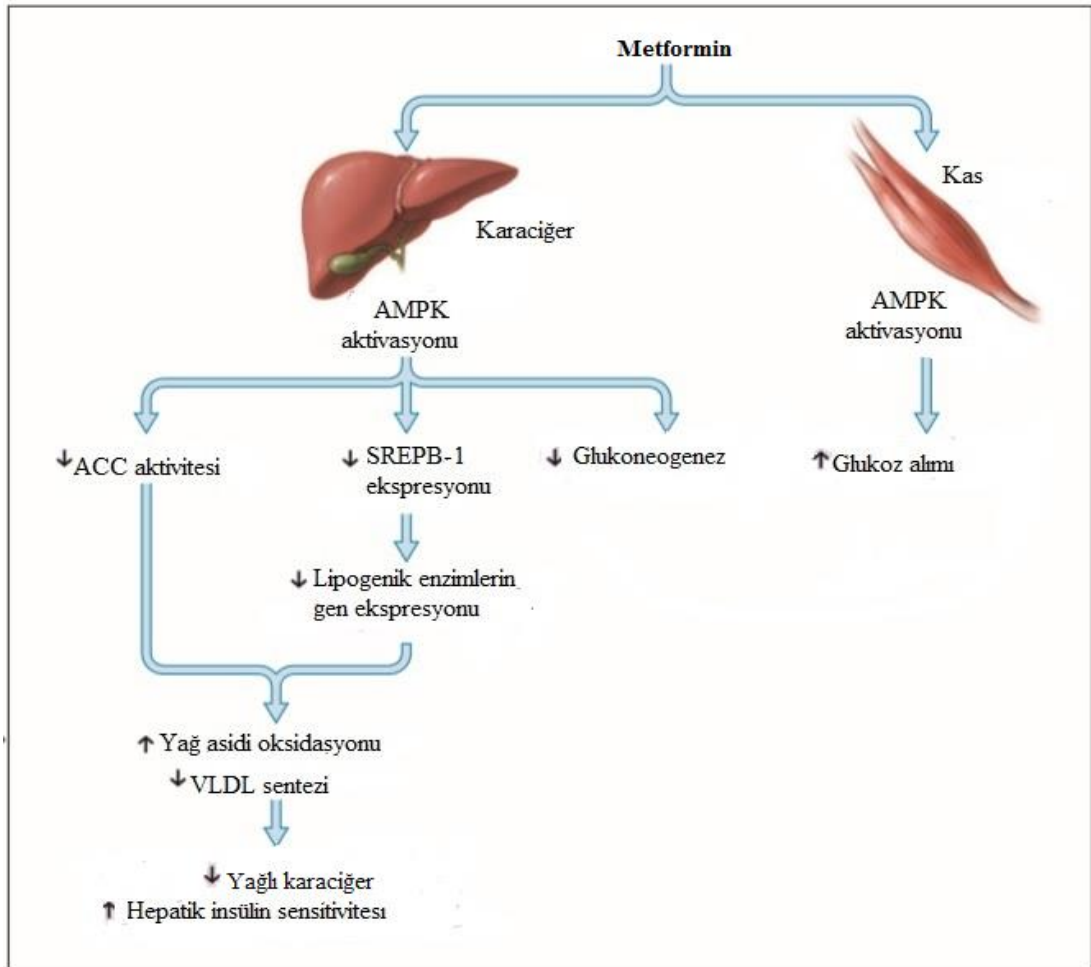
AMPK iştah mekanizmasının düzenlenmesinde de etkilidir. Hipotalamik AMPK aktivasyonunun artışı besin alımının artmasına ve enerji harcanmasının azalmasına neden olmaktadır ve bunun sonucunda vücut ağırlığında artış görülmektedir. Metformin iskelet kaslarında AMPK aktivitesini sitümüle ederken hipotalamusta ise bunu inhibe etmektedir (68). Yapılan bazı çalışmalar AMPK'nın inflamatuvar sinyal yollarında da önemli bir rol oynadığını göstermektedir. AMPK aktivitesinin veya ekspresyonunun inhibisyonu TNF α (tumor necrosis factor alpha), İnterlökin-1 (IL-1) ve İnterlökin-6 (IL-6) gibi pro-inflamatuvar maddelerin üretimini arttırmaktadır (69, 70).



Şekil 2.4. AMPK alt üniteleri (68).



Şekil 2.5. AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı (59).



Şekil 2.6. AMPK aktivasyonu sonucu metforminin organlarda oluşturduğu etkiler (71).

2.1.5. Metforminin Kullanım Alanları

2.1.5.1. Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes Mellitus (DM), insülin saliverilmesi, insülin etkisi veya bu faktörlerin her ikisinde de bozukluk olması sonucunda ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabet hastalarının %90'lık bölümünü tip 2 diyabet hastaları, geri kalan %10'luk bir kısmını ise tip 1 ve diğer diyabet hastaları oluşturmaktadır (72). Diyabetli hastalarda öncelikli tedavi amacı diyabete bağlı komplikasyonların oluşumunu azaltmak için hiperglisemilerini kontrol altında tutmaktır. Metformin tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan biguanid grubu insülin duyarlılaştırıcı bir ilaçtır. Metformin şu anda dünya çapında en az 120 milyon kişiye reçete edilmekte, ADA (American Diabetes Association) ve EASD (European Association of the Study of Diabetes) tarafından tip 2 diyabet hastalarında yaşam biçimi modifikasyonu ile birlikte kullanılması önerilmektedir (3).

Metforminin primer fonksiyonu glukoneogenezi inhibe ederek hepatik glukozu azaltmaktır (73). Bu etkisini doğrudan glukoneogenik enzimler olan fruktoz-1,6-bifosfat, fosfoenolpiruvat karboksiaz ve glukoz-6-fosfatazı inhibe ederek göstermektedir. Metformin ayrıca glikokinaz (hekzokinaz) gibi glikolitik enzimleri aktive ederek glikolizi de uyarmaktadır (74). Ayrıca metformin karaciğerdeki önemli glukoneogenik genlerin ekspresyonunu da inhibe etmektedir (75). Metformin insülin reseptör ve reseptör substratları IRS-1 ve IRS-2'nin fosforilasyonlarını artırmaktadır (76). Etki mekanizması bölümünde belirttiğimiz üzere AMPK'nın sitümlasyonu metforminin hepatik glukoneogenez ve lipogenez etkilerinin anahtar mediyatörü olarak görülmektedir (77). Tip 2 diyabette metforminin plazma glukoz seviyesini azaltmanın yanı sıra plazma kolesterol ve trigliserid düzeyleri üzerinde de etkileri olduğu kontrollü çalışmalarda tespit edilmiştir (78). Bu çalışmalarda özellikle belirgin hiperglisemisi olan hastaların uzun süreli metformin kullanımına bağlı olarak plazma trigliserid düzeylerinde orta dereceli (%10-20) bir azalma sağlandığı belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda, hastaların plazma total kolesterollerinde %5-10'luk hafif azalmalar ve yüksek dansiteli lipoprotein kolesterollerinde (HDL) hafif artışlar bildirilmektedir (79). Metforminin tip 1 diyabetli hastalarda insülin ihtiyacını

azalttığı ve glisemik kontrolü iyileştirdiği gösterilmiş olmakla birlikte tip 1 diyabet tedavisinde kullanımı henüz önerilmemektedir (80).

2.1.5.2. Polikistik Over Sendromu (PKOS)

Polikistik over sendromu, premenopozal kadınların yaklaşık % 5'ini etkileyen hiperandrojenizm ve kronik anovulasyon ile karakterize yaygın bir endokrin bozukluktur (81). Genel nüfusa kıyasla, PKOS'li kadınların daha sık bozulmuş glukoz toleransı'na (%35-40) sahip oldukları gözlemlenmiştir (82). Bu gözlem araştırmacıları PKOS tedavisinde insülin duyarlılaştırıcı ilaçların özellikle de metforminin kullanımının oluşturacağı etkileri araştırmaya yöneltmiştir. Metformin kullanan PKOS'li kadınlarda, metforminin kandaki glukoz ve androjen düzeylerini azaltarak kardiyometabolik parametrelerinde iyileşme sağladığı tespit edilmiştir (83). Bazı çalışmalar metformin ile tedavi edilen hiperinsülinemik PKOS'li kadınların total kolesterol, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve trigliserit düzeylerinde önemli bir azalma ve HDL düzeylerinde ise artma olduğunu göstermiştir (84). Ayrıca metformin kullanımının PKOS'li kadınlarda ovülasyonu arttırdığı da belirlenmiştir (85). Metformin hiperandrojenizme olan etkisini karaciğer tarafından üretilen seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) yapımını artırarak ve androjen üretimini azaltarak gösterdiği de tespit edilmiştir (86). Metforminin kontrollü ve düzenli diyet ile birlikte kullanımının uzun dönem tedavi gören PKOS'li kadınların metabolik profillerinde düzelme sağladığı da saptanmıştır (4). Metformin kullanımı ile spontan düşüklerin ve gestasyonel diyabet sıklığının azaldığı da bildirilmektedir (87). Ancak gebelikte metformin kullanımının uzun dönemde etkileri bilinmemektedir ve gebelikte kullanımı henüz onaylanmamıştır (88).

2.1.5.3. Metabolik sendrom ve obezite

Metabolik sendrom, insülin direnciyle başlayan abdominal obezite, glukoz intoleransı veya diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı (KAH) gibi sistemik bozuklukların bir birine eklendiği ölümcül bir endokrinopatidir (89). Metforminin metabolik sendromlu bireylerde özellikle insülin direncini azaltmak ve glukoz intoleransını düzenlemek açısından etkili olabileceği düşünülmektedir (90). Metformin, Food and Drug Administration (FDA) tarafından

obezite tedavisinde onaylanmamış, ancak tedavide denenmekte olan bir ilaçtır. Diyabetik olan veya diyabet riski taşıyan obez hastalarda metformin, vücut ağırlığını azaltmada etkili olabileceği düşünülmektedir. Metformin insülin direnci ve hiperglisemiye azalttığı için obezite tedavisinde ek fayda sağlayabileceği görüşü belirtilmektedir (5).

Metforminin PKOS veya diyabet olmaksızın obezite tedavisinde etkinliğini değerlendiren 9 çalışmada, metformin ile tedavi edilen obez hastalarda ortalama 0.2-3.6 kg vücut ağırlığı kaybı ve 0-1 kg/m² BKİ azalması görülmüştür (91-99). Metforminin obezite tedavisindeki etkisi pediyatrik yaş grubunda da araştırılmaktadır. Kısa vadede hiperinsülinemik obez çocuklarda ve ergenlerde BKİ ve insülin rezistansını azaltmada orta derecede etkili olduğu görülmektedir (100). Ayrıca metforminin gıda alımını düzenleyen leptin, adiponektin, ghrelin ve nöropeptid Y gibi peptidler üzerinde de bazı etkileri olduğu tespit edilmiştir (101, 102).

2.1.5.4. Kardiyovasküler Sistem

Metforminin insülin direnci olan hastaların lipit metabolizmaları üzerinde önemli etkileri vardır. Plazmadaki serbest yağ asidi seviyesini ve bu asitlerin dokuda oksidasyonlarını, plazma trigliserit seviyesini, total kolesterol ve LDL kolesterol seviyelerini azaltmaktadır ve bu göstergeler metforminin kardiyovasküler hastalıklara karşı protektif etki sağlayabileceğini düşündürmektedir (103). Metformin aynı zamanda doku plazminojen aktivatör inhibitör-1 seviyesini, platelet agregasyonu ve adhezyonunu azaltarak da kardiyoprotektif etkisini göstermektedir (104, 105, 106). Yapılan bazı çalışmalar metforminin hayvanlarda ve insanlarda ılımlı bir anti-hipertansif etkisinin olabileceğini göstermektedir (107, 108). Metforminin anti-hipertansif etkisi karmaşıktır. Potansiyel mekanizmaların: 1- Nitrik oksit (NO) sentezini artırması, 2- Vasküler düz kas hücrelerinde hücre içi kalsiyum seviyesini düşürmesi olduğu düşünülmektedir (109).

2.3 Kanser ve Metformin

Yapılan çalışmalar metformin ile tedavi edilen diyabetik hastalarda kanser insidansı ve mortalite riskinin daha az olduğunu göstermektedir (110, 111, 112). Yapılan kapsamlı bir meta-analiz çalışmasında metforminin pankreas kanseri, hepatoselüler karsinoma ve kolon kanserinde kanser insidansını %30-50 azalttığı tespit edilmiştir (113).

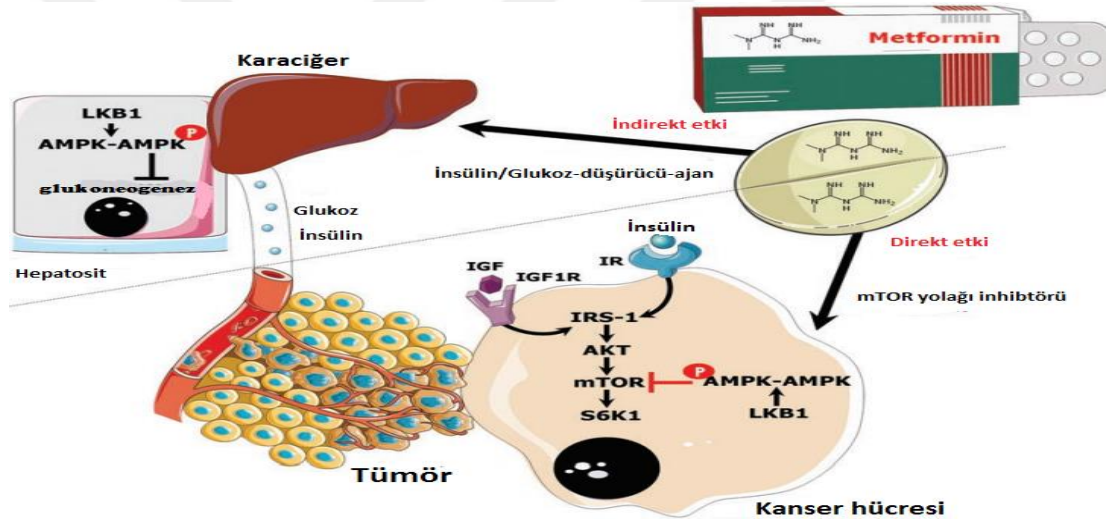
Metforminin antikanser etkilerinin hangi mekanizmalar aracılığıyla olduğu halen kesin olarak belirlenemese de bu etkilerini doğrudan veya dolaylı birçok mekanizma ile gösterdiği tespit edilmiştir. Bu mekanizmalardan biri AMPK aktivasyonu ile phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of 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 (114). 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 (115) (Şekil 2.7). Metforminin AMPK modülasyonu yoluyla mTOR aktivitesini inhibe ederek çeşitli kanser türlerinin progresyonunda olumlu etkiler sağladığını bildiren çalışmalar vardır (116, 117, 118). Bunun yanında metforminin mTORC1'i AMPK ve TSC2 yolağından bağımsız RAG GTPase aracılıklı inhibe ettiği de bulgular arasındadır (119). 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 (120).

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 yollarının upregülasyonu birçok kanser türünün oluşumunda rol oynadığı ortaya

konmuştur (121). Metforminin bu yolağın inhibisyonu üzerinden kanser hücrelerinde hücre metabolizmasını değiştirdiği tespit edilmiştir (122, 123) (Şekil 2.6.). Ayrıca lipogenez ve kolesterol sentezi gibi iki önemli anabolik sürecin AMPK aktivasyonu aracılığıyla metformin tarafından inhibe edilmesi de metforminin kanser üzerindeki etkileriyle ilişkilendirilmektedir (124). Metforminin yağ asidi sentezini doğrudan inhibe ederek pankreatik tümör hücrelerinin çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir (125). 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 (126). 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 (127) metforminin kanser üzerindeki inhibitör etkisinin p53 aktivitesi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (128, 129).

AMPK'nın hücre bölünmesi sürecinde yer aldığı da gösterilmiştir (130). Meme kanseri hastalarının genom haritaları çıkarılarak yapılan bir çalışmada, metforminin mitozda yer alan tübülünler, histonlar, Aurora- ve Polo gibi kinazlar ve ribozomal proteinleri kodlayan birçok genin ekspresyonunu AMPK aktivasyonu yoluyla baskıladığı tespit edilmiştir (131). Bu gözlemler tutarlı olarak, metformin ve paklitaksel uygulanan meme ve akciğer kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü G2-M fazında durmuş, tümör büyümesi azalmış ve tek başına ilaç tedavisine göre apoptozun büyük bir ölçüde arttığı tespit edilmiştir (132). Yapılan araştırmalarda metforminin bazı kanser hücrelerinde apoptozu uyardığını göstermektedir. Metformin bu etkisini kaspaz bağımlı (133) / kaspaz bağımlı olmayan yollardan (AMPK aktivasyonu gibi) gerçekleştirmektedir (134). Metformin kanser hücrelerinde apoptozu uyarmasının yanı sıra, bu hücrelerde otofajiyi de indüklediği de gösterilmiştir. Bu etki ise hücrelerde otofajiyi yöneten AMPK/mTOR yolağı aracılığı ile gerçekleşmektedir (135).

Metformin sitokinler ve büyüme faktörlerinin düzenlenmesi yoluyla immünomodülasyon üzerinde de etkiye sahiptir. Yapılan bir çalışmada, metformin mürin T lenfositlerinin çoğalmasını zayıflatmış, apoptoz ve nekrozu artırmıştır (136). Metformin ayrıca reaktif oksijen türlerini de (ROS- reactive oxygen species) etkilemektedir. Mitokondriyal kompleks-I aktivitesine müdahale ederek endojen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini engellemektedir (137). Metforminin AMPK aktivasyonundan bağımsız bir diğer yolağı, DNA-damage-inducible transcript 4 proteininin (DDIT4, REDD1) ekspresyonunun geliştirmesidir. Bu antiproliferatif etkisi Ben Sahra ve arkadaşları tarafından, prostat kanseri hücrelerinde (138), Sesen ve ark. tarafından da glioblastoma hücrelerinde gösterilmiştir (139).



Şekil 2.7. Metforminin anti-kanser etki mekanizması (6).

Metforminin tek başına ya da kemoterapik ilaçlarla kombine halde farklı kanser türlerinde uygulanmasıyla elde edilen olumlu sonuçlar, çalışmalarda metforminin yeni bir tedavi seçeneği olarak önerilmesini sağlamaktadır. (30, 140, 141).

2.3.1. Kolon Kanseri ve Metformin

Kolon kanseri, dünya çapında en sık görülen kanserlerden biridir. Diabetes mellitus (DM) ve obezite gibi hastalıklar kanser ile ilişkili olduğundan, bu hastalıklar için kullanılan ilaçların kolon kanserinin önlenmesinde etkili olup olmadıkları incelenmektedir (142). Son epidemiyolojik çalışmalar metformin ile tedavi edilen

Tip 2 diyabetli kolon kanseri hastalarında metformin ile tedavi edilmeyen hastalara göre azalan kanser insidasını göstermektedir (143-146). Metforminin kolon kanserindeki etkilerini göstermek için yapılan bir çalışmada, Hosono ve ark. kimyasal karsinojenlerle indüklenmiş, kanserli hayvan modellerinde, metforminin mTOR yolağının engellenmesi ve AMPK aktivasyonu yoluyla azoksimetan kaynaklı kolorektal aberran kript odağını bastırdığını göstermiştir (28). Hosono ve ark. ayrıca diyabetik olmayan hastalarda kısa vadede düşük doz metformin uygulanmasının doğrudan hem kolorektal epitel çoğalması hem de aberrant kript oluşumunun baskılanmasını sağladığını gösteren bir pilot klinik çalışma da yürütmüşlerdir (147). Epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmaların yanı sıra son yıllarda kolon kanseri hücre hatları üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmaları da metforminin antikanser etkisinin tespit edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. 2008 yılında Zakikhani ve ark. yaptığı bir çalışmada metforminin HT-29 kolon kanseri hücre serisi üzerinde AMPK aktivasyonu yoluyla hücre proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir (148). Diğer bir çalışmada, Buzzai ve ark. metforminin p53-eksikliği olan kolon kanseri hücrelerinde tümör ksenograftlarının büyümesini azalttığını tespit etmişlerdir (14). Zhang ve ark. 2013 yılında yayımladıkları çalışmalarında 5-florourasil ile birlikte verilen metforminin SW620 kolon kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu azalttığını ve apoptotik etkiyi arttırdığını gözlemlemişlerdir (23). Yapılan araştırmalar metforminin kolon kanseri üzerindeki olumlu etkilerini gösterse de çoğu çalışma henüz büyük klinik çalışmalarla desteklenmediğinden metforminin olası etkilerinin daha geniş araştırmalarla gösterilmesi beklenmektedir.

2.3.2. 5-Florourasil (5-FU)

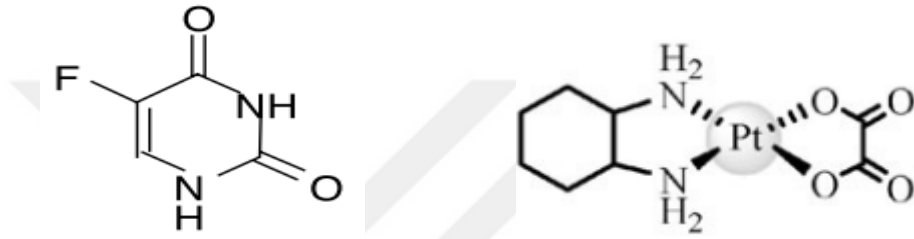
5-FU kolorektal kanserler, meme kanseri ve sindirim sistemi kanserleri de dahil olmak üzere birçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötiktir. 5-FU, C-5 konumunda hidrojen yerine bir flor atomu taşıyan bir urasil analogu bir antimetabolittir (149) (Şekil 2.8). 5-FU ilk kez 1957 yılında Heidelberg ve ark. tarafından sentezlenmiştir (150). 5-FU, yaklaşık 20 dakikalık oldukça kısa bir plazma yarı-ömürüne sahiptir. İnfüzyon yoluyla verildiğinde çok yüksek (yaklaşık 5 L/dak) ve değişken sistemik klerens gösterir (151). 5-FU'nun

%80-%85'i dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) enzimi tarafından aktif metabolitlerine (florodeoksiuridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) ve fluorouridin trifosfat (FUTP)) dönüştürülmekte ve uygulanan dozun sadece %1-3'ü tümör hücreleri ve normal hücreler üzerinde sitotoksik etkileri meydana getirmektedir (152). DPD eksikliği olan hastalar 5-FU'yu başarıyla metabolize edememekte ve bu kişilerde bazen ölümcül de olabilen çeşitli toksisiteler gelişmektedir (153). 5-FU'nun hem DNA hem de RNA sentezine etkisi olduğu bilinmektedir. 5-FU'nun metaboliti FdUMP, timidilat sentaz (TS) enzimi üzerindeki nükleotid bağlayıcı kısma stabil bir şekilde bağlanarak, normal substratı olan deoksiuridin monofosfat (dUMP)'in enzime bağlanması engeller. Bu, deoksiuridin monofosfat (dTMP) sentezinin engellenmesine neden olur. dTMP sentezinin engellenmesi, ileri aşamada deoksitimidin trifosfat (dTTP) sentezinin engellenmesine neden olur. Bu, diğer deoksinükleotidlerin (dATP, dGTP, dCTP) miktarında bir artışa yol açar. Deoksinükleotid havuzunun dengesindeki bozulma (özellikle dATP/dTTP oranının bozulması) DNA sentez ve onarımını bozarak, DNA üzerinde ölümcül bir hasara yol açar. TS inhibisyonu deoksiuridin trifosfat (dUTP) miktarını artırır. Hem dUTP, hem de bir 5-FU metaboliti olan FdUTP, DNA ile yanlış biçimde birleşerek DNA hasarına yol açar. (152, 154).

2.3.3. Oksaliplatin

Oksaliplatin, kolorektal kanser tedavisi için onaylanmış ilk platin (Pt) bazlı anti-kanser ilaçtır (Şekil 2.8.). Oksaliplatin ilk önce 1996 yılında Fransa'da, daha sonra 1999 yılında diğer Avrupa ülkelerinde ve 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmaya başlanmıştır (155). Oksaliplatin karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilerek biyotransformasyon ürünlerine dönüştürülür. Bu ürünler DNA çift iplikleri arasında çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini bozarak sitotoksik etki oluşturur. Bu etki hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (156). Oksaliplatinin ortalama plazma eliminasyon yarı ömrü 9 gündür. Oksaliplatin enzimatik olmayan degradasyon yoluyla birkaç farklı aktif metabolite dönüştürülür ve bu metabolitler çoğunlukla idrarla atılır (157). Oksaliplatin tedavisi infüzyonun hemen ardından oluşan ve tedavi boyunca biriken önemli nörotoksisiteyle sınırlanır. Periferik nöropati oksaliplatinin en sık rastlanan doz

kısıtlayıcı yan etkisidir ve ilacın kesilmesine yol açan en önemli nedenlerden biridir (158). Oksaliptatin tedavide çoğunlukla 5-fluorourasil (5-FU) ve lökoverin (LV) ile birlikte kullanılmakta olup, bu kombinasyon FOLFOX olarak adlandırılmaktadır. Bu kombinasyon tedavisinde oksaliptatin 15 günde 1 olmak üzere, 85 mg/m² dozunda uygulanmaktadır. Oksaliptatin, kolon kanseri haricinde diğer gastrointestinal sistem kanserlerinin tedavisinde de önemli kemoterapi ilaçlarından biri haline gelmiştir. İleri evre pankreas kanseri tedavisinde, oksaliptatinin irinotekan ve 5-FU ile birlikte kullanılmasının sağkalım süresini arttırdığı tespit edilmiştir (159, 160).



Şekil 2.8. 5-FU ve oksaliptatin yapıları (161, 162).

2.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlı bir organizmadaki bir veya birkaç hücre grubunun dokuda bulunduğu yerden çeşitli yöntemlerle alınarak in vitro olarak yaşatılması ve üreme yeteneği olanların çoğaltılmasıdır (163). Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma faaliyetlerinin önemli bir yerini tutmaktadır. Hücre ve doku kültürü çalışmaları, 1885'ten bu yana önemli yollar katederek basamak basamak ilerleyen bir tarihsel gelişim göstermiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Hücre ve doku kültüründeki önemli gelişmelerin tarihçesi (164, 165).

1885	Wilhelm Roux bir tavuk embriyosu nöral plağının bir kısmını ayırmış ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatmıştır.
1907	Ross Harrison, kurbağa embriyoları ile yaptığı deneyde normal fonksiyonun in vitro ortamda da sürdüğünü göstermiştir ve tekrarlanan bir teknik oluşturduğu için, bu deney doku kültürünün gerçek başlangıcı olarak kabul edilmiştir.
1910	Peyton Rous, tavuk sarkomlarının hücreden yoksul tümör filtratları ile hayvandan hayvana bulaştırılabildiğini ortaya koymuştur. Bu buluşuyla kanserin bir virüs (Rous sarcoma virus) yoluyla bulaşabileceğini göstermiştir.
1913	Carrel aseptik koşullar altında düzenli olarak beslenmeleriyle hücrelerin kültür ortamında uzun süre hayatta kalıp çoğalabildiklerini göstermiştir.
1948	Earle ve ark. L hücre hattından saflaştırdıkları hücrelerin kültüre alındıklarında koloniler oluşturduklarını göstermişlerdir.
1952	Gey ve ark. günümüzde oldukça bilinen HeLa hücre hattını, bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli serisi şeklinde gözlemlemişlerdir.
1954	Levi-Montalcini ve ark. sinir büyüme faktörü'nün (EGF) doku kültüründe akson büyümesini teşvik ettiğini göstermişlerdir.
1955	Earle, doku kültürü metodlarını ve kullanılan medyumları tanımlamıştır. Kontaminasyon olasılığı azalmıştır.
1958	Harris, aynı türlerin farklı tiplerini içeren hücre hibridizasyonunu indüklemeyi başarmıştır.
1961	Hayflick ve Moorhead normal diploid insan hücrelerinin sınırlı ömrünü tanımlamıştır.
1965	Ham belirli memeli hücrelerinin klonal büyümesinin desteklenmesi için serumsuz medyumunu tanımlamıştır.
1968	Augusti-Tocco ve Sato bir fare nöroblastomasını doku kültürü ve izole klonlara adapte etmişlerdir.
1975	Köhler ve Milstein hibrit hücre kültüründe ilk defa monoklonal antikor üretmeyi başarmışlardır.
1986	Martin ve Evans fareden pluripotent embryonik kök hücrelerini saflaştırarak kültürünü yapmışlardır.
1998	Thomson ve Gearhart ile yardımcıları, insan embryonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır.

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma şartlarında standardizasyonun sağlanabilmesi, hızlı sonuç alınması ve deneylerde hayvanların öldürülmemesi gibi etik nedenlerden dolayı tercih edilmektedirler. Hücre kültüründe amaç, hücreleri yaşatmak, çoğaltmak ve gerektiğinde tekrar kullanabilmek için dondurarak saklamaktır. Hücre ve doku kültüründe başarı steril ve hızlı bir şekilde çalışmaya bağlıdır (166).

2.4.1. Hücre kültürlerinin sınıflandırılması

Çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir: Primer hücre kültürleri, sekonder veya diploid hücre kültürleri, sürekli veya heteroploid hücre kültürleri.

Primer hücre kültürleri: Doğrudan dokudan elde edilen hücre kültürlerine primer hücre kültürleri denir. Primer kültürler elde edildiklerinde dokunun özelliklerini taşırlar. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler, hücre hatları gibi tek tip hücreler değildir. Primer hücre kültürleri küçük doku parçalarının petri yüzeylerine ekilmesiyle eksplant kültürler halinde ya da enzim uygulanmasıyla tek hücre süspansiyonu halinde yapılabilir. Primer kültürler kontaminasyon riski olan kültürlerdir, bu yüzden manipulasyonlarda steriliteye özen gösterilmelidir. Bu tipe örnek olarak EMF (Embriyonik Mouse Fibroblast) hücre kültürü, tavşan böbrek hücresi, maymun böbrek hücresi, primer aortik, göbek kordonu endotel hücreleri, primer hepatosit ve primer düz kas hücreleri vs. gösterilebilir (167, 168).

Sekonder hücre kültürü: Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Standardize edilerek ve kodlanarak kullanıma sunulmuştur. Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilirler. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir. Bu nedenle sınırlı hücre kültürü olarak da adlandırılmaktadırlar. Örnek olarak HeLa, KB, 3T3 fibroblastlar, L929, CHO, HL60, MatLy-Lu (metastatik) ve AT-2 (non-metastatik) prostat karsinomu hücre kültürleri verilebilir.

Sürekli hücre kültürü: Teorik olarak sonsuz pasajları yapılabilir. Genellikle malign tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve

kromozom sayıları sabit değildir. Örnek: İnsan Larenks Epidermoid Karsinomu (Hep-2), İnsan Nazofarenks Karsinomu (KB), İnsan Serviks Karsinomu (HeLa) (167, 168).

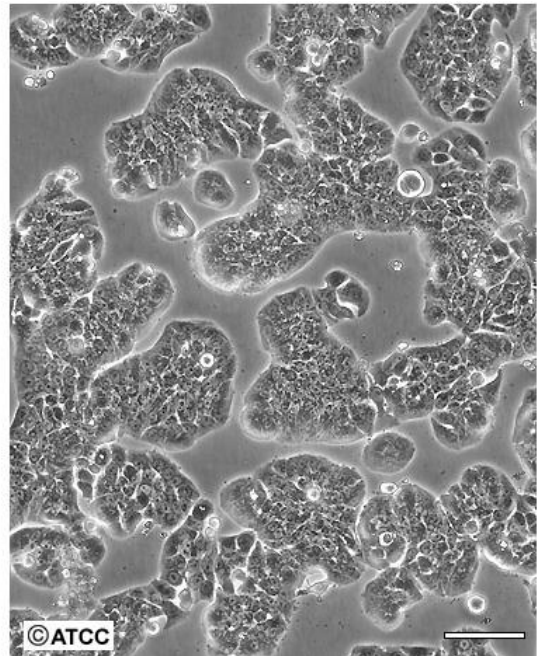
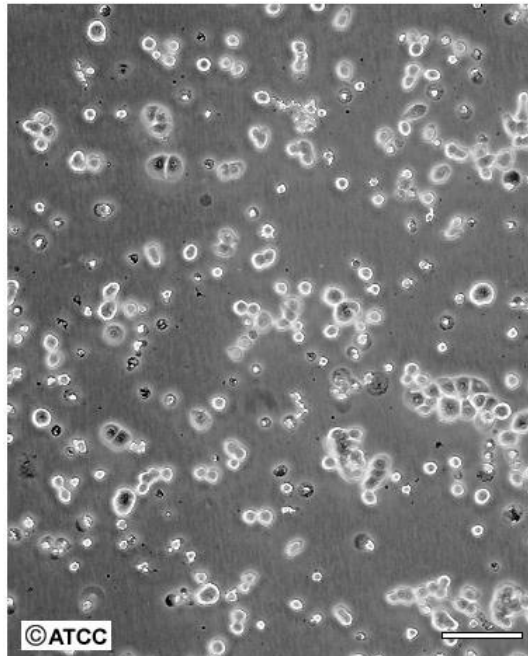
2.4.2. Kanser hücre hatları ve HT-29 kolon kanseri hücre hattı

Günümüzde kanser araştırmalarının hız kazanması ile özellikle kanser ilaçlarının geliştirilmesinde, etkilerinin saptanmasında kanser hücre hatlarının kullanımı büyük önem kazanmıştır. İlk kez 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Baltimore'da servikal kanser nedeniyle takip edilen Afrika kökenli Amerikalı zenci bir hastanın kanser dokularının laboratuvarında kültür edilmiştir. Henrietta Lack adındaki hasta kanserin metastaz yapması sonucu ölmüş ancak ölümsüz hücrelerinin kültürü adına atfen HeLa adı ile farklı ülkelerdeki laboratuvarlara dağıtılmıştır. Kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve kolay üretilebilmeleri, hücre kültürü gerektiren araştırmalara hız kazandırmıştır (169). Kanser hücre hatları birkaç önemli hücre hattı bankasından temin edilebilmektedir (Tablo 2.2).

HT-29 kolon kanseri hücre hattı, J. Fogh tarafından 1964 yılında 44 yaşında, kafkas kökenli bir kadının kolorektal tümöründen izole edilmiştir (170). HT-29 hücre hattı in vitro koşullarda epitelyal hücrelerin tipik morfolojisine sahiptir. Standart büyüme koşulları altında farklılaşmamış fenotip göstermekte ve normal dokunun belirli özelliklerini muhafaza etmektedir. Ayrıca hat, fibroblast proliferasyonunu uyaran faktörler dahil olmak üzere çeşitli peptidler salgılamaktadır. HT-29 hücre hattı popülasyonunun büyük bir kısmını goblet benzeri hücreler oluşturmakta, bu nedenle de bu hat fazla miktarda musin üretmektedir (171, 172, 173).

Tablo 2.2. Önemli hücre hattı bankaları (164).

American Type Culture Collection (ATCC)	Amerika Birleşik Devletleri	950'si kanser hücre hattı olmak üzere 4000'in üzerinde hücre hattı
The European Collection of Cell Cultures (ECACC)	İngiltere	900'ün üzerinde hücre hattı
Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH (DSMZ)	Almanya	500'ün üzerinde hücre hattı
Interlab Cell line Collection (ICLC)	İtalya	200'ün üzerinde hücre hattı
Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)	Japonya	1000'in üzerinde hücre hattı



Şekil 2.9. HT-29 hücre hattı düşük yoğunluk ve yüksek yoğunlukta (174).

2.5. Hücre ölümü

Tüm canlılarda hücre ölümü patolojik/fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşmektedir. Tanımlanmış üç tip hücre ölüm şekli vardır: Nekroz, apoptoz ve otofaji. Apoptoz ve otofaji "programlanmış" hücre ölümü olarak değerlendirilirken, nekrotik hücre ölümünün ise rastgele, kontrolsüz bir süreç olduğuna inanılmaktadır (175).

2.5.1. Nekroz

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 senesinde ışık mikroskopu ve yeni boyama yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır (176). Nekroz, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreçtir. Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve Ca^{++} kanalları açılır. Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik maddeler) hücrenin iyon dengesini bozar. DNA tamirinden sorumlu nükleer enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) NAD^{+} 'ı ikiye bölerek NAD (Nikotinamid adenin dinükleotid) kaybına neden olur. Bu durumda oluşan ATP eksikliği, iyon pompası yetersizliğine yol açar. Bunun sonucunda ise hücre sıvı alır ve organeller şişer. Plazma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin intraselüler boşluğa salınımı inflamasyona sebep olur (Şekil 2.10). Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle inflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir (177, 178, 179). Nekrozun en yaygın nedeni hipoksi'dir. Ayrıca ısı, arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller de nekroza neden olabilmektedir (180).

2.5.2. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Avusturyalı patolog J.F.K. Kerr ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Kerr, Wyllie ve Currie, yayımladıkları makalede o tarihe kadar fazla tanımlanmamış ve nekrozdan farklı özellikler gösteren bir hücre ölüm şeklini gözlemlemiş ve bu olayı apoptoz olarak isimlendirmişlerdir (181). Yunancada 'apo'=ayrı, 'ptosis'=düşen anlamındadır ve Horner tarafından ağaçların sonbaharda

yaprak dökümünü andırdığı için, hücre kaybını belirtmek amacı ile kullanmıştır (182). Programlı hücre ölümü adıyla da anılan bu süreç, hücrede bazen yeni proteinlerin sentezini, hücre iskeletinin yıkımı için bazı proteaz enzimlerin ve DNA'nın parçalanması için DNAz (deoksiribonükleaz)'ların aktif hale geçmesini indükleyen ve aktif olarak düzenlenen bir süreçtir (183). Apoptoz ile ilgili çalışmalarda genelde *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılmıştır. Bu nematodlarda 3 gen; ced-3, ced-4 ve ced-9 apoptozu kontrol etmektedir. Mutasyon ile inaktif olmuş ced-3 ve ced-4 genlerini taşıyan nematodlarda apoptozun meydana gelmediği ve normalde ölmesi gereken hücrelerin yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle ced-3 ve ced-4'ün ölüm genleri olup apoptozu indükledikleri, ced-9'un ise ölüme karşı koruyan gen olup apoptozu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bugün bu genlerin insan genomundaki karşılıkları ced-3 için kaspazlar, ced-4 için APAF-1 (Apoptotic peptidase activating factor-1) ve ced-9 için Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) olduğu tanımlanmıştır (184, 185).

Apoptoz uyarısı alan hücre komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzülür, kromatini yoğunlaşır. Hücrenin DNA'sı nükleozomlarından kesilir ve jel elektroforezinde merdiven bant görünümü alır. Ancak organeller yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfolipid serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür ve parçalara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak inflamasyon görülmez (178) (Şekil 2.10.).

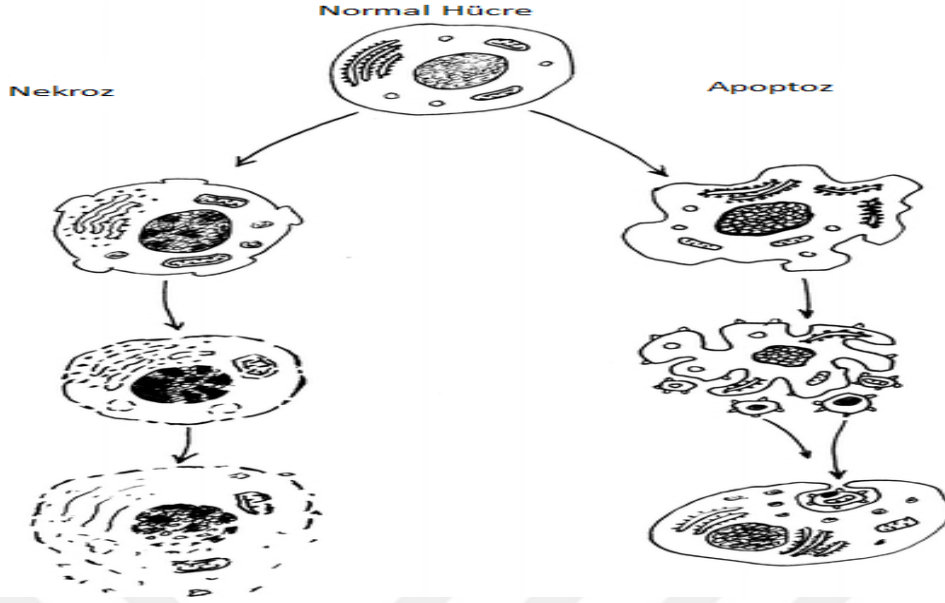
Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanısıra, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondride zar potansiyelinin bozulması durumunda normalde ATP zincirinde yer alan Sitokrom C, hücre stoplazmasına dağılıp inaktif halde bulunan APAF-1 molekülüne bağlanarak Apoptozom adı verilen bir yapının oluşmasına sebep olur. Apoptozom, kaspaz-9'u, kaspaz-9 da diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktifleştirerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesi Bcl-2 ailesi denilen bir protein grubu tarafından düzenlenir. Farklı türlerde de rol oynamakla beraber apoptozu düzenleyen Bcl-2 ailesinin memelilerde 19 üyesi

olduğu bildirilmektedir. Mitokondri aracılığıyla dzenlenen hcre içi yol aslında hcre dışı ve hcre içi etkenlerin ortaklaŐıđı bir mekanizma oluşturur. İster hcre içi, isterse hcre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar (Caspases) adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleŐtirilir (178, 186). Kaspazlar inaktif prekürsör olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sisteinin yer aldığı sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozda rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada neden olurlar. Bazıları baŐlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10) olarak bilinirken bazıları da efektör kaspazlar (3, 6, 7) olarak bilinir (187).

Apoptoz, lm reseptörleri adı verilen birbiriyle yapısal olarak akraba olan birkaç reseptör tarafından aktif olarak uyarılır. En iyi bilinen rnekleri TNF α ve Fas reseptörleridir. Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaŐan Fas ligandı, ya da TNF alfa, hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak apoptozu uyarabilir (186).

Son zamanlarda kaspaz- 12'ye bağımlı endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptotik bir yol da tarif edilmiştir. Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teŐkil eden bir kaspazdır. Son alıŐmalar göstermiştir ki Ca^{2+} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. AktiflenmiŐ kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karŐılıklı olarak etkileŐerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (187).

Apoptozu belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerin en sık kullanılanları arasında hematoksilen-eozin boyama, giemsa boyama, floresan boyama, elektronmikroskopi, faz kontrast mikroskopi, Anneksin V yöntemi, TUNEL yöntemi, agaroz jel elektroforezi, western blotting, kaspaz-3 yöntemi, M30 yöntemi, flow sitometri, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) testi sayılabilir (188).



Şekil 2.10. Nekroza/Apoptoza maruz kalan bir hücrede hücre ölümünün aşamaları (189).

Hem nekroz hem de apoptoz, yöntem olarak hücre ölüm şekli olmalarına rağmen bu iki ölüm şeklinin hem histolojik hem de fizyolojik nedenlerinde büyük farklılıklar vardır (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Apoptoz ve Nekroz kıyaslaması (183).

ÖZELLİK	APOPTOZ	NEKROZ
Morfolojik özellikleri	Küçülme, çekirdekte kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşması, komşu hücreler tarafından fagosite edilme	Şişme, hücre geçirgenliğinin artması ve blebleşme, hücre içeriğinin dış ortama dağılması
Tetikleyen mekanizmalar	Hücre dışından (TNF α , büyüme faktör eksikliği, antikanserojen ilaçlar, oksidatif stres, DNA hasarı) Hücre içinden (mitokondri, ER)	Ani toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin çok büyük ölçüde bozulması
Biyokimyasal değişimler	Hücre içinde proteolitik enzimlerin aktivasyonu, hücre içi proteinlerin ve DNA'nın yıkımı (kaspaz ve DNaz aktivasyonu)	Hücrede çok hızlı bir enerji yetmezliği ya da toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin hızla artmasıyla osmotik dengenin bozulması sonucu hücrenin patlaması
Sonuçları	Apoptoza uğrayan hücrenin inflamasyon oluşturmaksızın ortamdan temizlenmesi	Hücre içi maddelerin salınımıyla oluşan inflamasyon

2.5.3. Otofaji

Otofajik hücre ölümü Clarke tarafından tip II hücre ölümü olarak sınıflandırılmıştır. Bu tip hücre ölümünde en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili, sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içeren veziküllerin varlığıdır. Bu veziküller lizozoma kaynaşır, taşıdıkları yüklerin lizozomal enzimler tarafından parçalamasını sağlarlar. Bu biyolojik olay, kendini içten içe yemek anlamında, "otofaji" olarak adlandırılmıştır (190). Otofaji; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılıklı otofaji şeklinde en az üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlardan makrootofaji, pek çok hücrede bazal düzeyde oluşmakta, protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli rolü üstlenmektedir. Mikrootofaji, lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yenilmesi ve içeriğinin lizozom içinde hazmedilmesidir. Şaperon aracılıklı otofaji ise KFERQ motifli proteinlerin lizozom zarına seçici biçimde taşınmasını sağlamaktadır (190, 191).

Ölüm mekanizması hakkında bilinen, otofajinin apoptoz sinyallerine çeşitli seviyelerde katkıda bulunduğu, her iki ölüm tipinde de ortak mediyatörlerin yer aldığıdır. O nedenle ölüm mekanizmasının tetiklendiği durumlarda hücre ölüm tipinin belirlenmesi organellerin yeniden yapılanmasına ve salgılanan moleküllerin tipine göre belirlendiği düşünülmektedir (192).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)'den sağlanmıştır. Çalışmanın tamamı Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi Farmakoloji AD hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

1. RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich (ABD)
2. Fetal Sığır Serum, Pan-Biotech (ALMANYA)
3. Tripsin EDTA, Pan-Biotech (ALMANYA)
4. Penicilin/Streptomycin amph. antibiyotik, Pan-Biotech (ALMANYA)
5. Metformin, Sigma-Aldrich (ABD)
6. Oksaliptatin, Sigma-Aldrich (ABD)
7. 5-Florourasil, Sigma-Aldrich (ABD)
8. Caspase 3 (active) human elisa kit, İnvitrogen (ABD)
9. MTT kit, Roche (ALMANYA)
10. LDH kit, Roche (ALMANYA)
11. In Situ Cell Death Detection Kit-Fluorescein, Roche (ALMANYA)
12. Triton X-100, Amresco (AVUSTRALYA)
13. Mounting medium, Abcam (İNGİLTERE)

3.2. Kullanılan Cihazlar

1. ELISA, Thermo Scientific, Multiskan FC (FİNLANDIYA)
2. Hassas terazi, Acculab (ABD)
3. Mikroskop, Olympus CKX41 ve Nikon eclipse 80i (JAPONYA)
4. Kamera, Infinity lite ve Nikon DS-Fi1 (JAPONYA)
5. Santrifüj, Hettich Zentrifugen, Universal 320R (ALMANYA)
6. Etüv, Nuare autoflow, iso class 5 (ABD)
7. Kabin, Biosafety Cabinet, class II (TÜRKiYE)

3.3 Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü

3.3.1.1. Sıvı azot tankından alınan hücrelerin ekimi ve tripsinizasyonu

Dondurulmuş halde sıvı azot tankında bulunan kriyotüplerdeki HT-29 hücreleri 37°C'lik su banyosunda hızla çözüldü. Hücreler çözüldükten sonra tüp kapağı %70'lik alkol ile silindi. 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 10 ml medyum (%10 FBS, %1 antibiyotik, DMEM) yavaşça eklendi ve 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan hücre pelletine 10 ml medyum yavaşça eklendi ve 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra hücre pelleti üzerine 5ml yeni medyum eklendi ve hücreler iyice süspanse edildi. Süspansiyon 75cm²'lik flasklara aktarıldıktan sonra mikroskop altında değerlendirildi ve 37°C derece CO₂ inkübatörüne kaldırılarak bir gün beklemeye alındı. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılığı incelendi ve medyumları değiştirildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra flask inkübatörden alındı ve steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum döküldü. Flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 1ml PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS döküldü ve üzerine 1ml %0,05'lik tripsin-EDTA ilave edilerek flask hücreler zeminden ayrılana kadar inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında

mikroskobik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları belirlendikten sonra, hücreleri tripsinden uzaklaştırmak için flaska 2 ml medyum eklenerek hücreler steril falkon tüpe aktarıldı ve 1500 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ardından tüpün dibinde kalan hücre pelleti uygun hacimde medyum içinde süspanse edildi. Hücreler sayılarak istenen sayıda flaska ekim yapıldı.

3.3.1.2. Hücre sayımı

Hücre sayımı hemasitometre yöntemiyle özel sayım lamlarında yapıldı. Santrifüj sonrasında pellet üstünde kalan sıvı dökülerek uzaklaştırıldı, falkon tüpünün dip kısmında kalan hücreler 1ml medyumla iyi bir şekilde pipetaj yapılarak süspanسیون elde edildi. Pipetle 10µl çekilerek lama yayıldı. Faz kontrast mikroskopta lamın alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamaları alındı. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde edildi.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = A \times SF \times 10.000$$

Burada A=20 karede sayılan hücre sayısı, SF=seyreltme faktörü, 10.000 ise 0,1 mm³ 'deki sayım sonucunu 1ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdır (193).

3.3.1.3. Alt kültürleme

Hücrelerin pasajlanması, iki-üç günde bir olacak şekilde yapıldı. Hücre kültür ortamı ve tripsin-EDTA su banyosunda 37°C'ye ısıtıldı. Bir önceki kültürdeki hücreler Tripsin- EDTA ile kaldırılıp, hücrelerin bulunduğu ortam pipet ile çekilerek santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Supernatan uzaklaştırılıp tüpe taze ortam eklenerek pipetaj yapıldı. Hücre sayımı yapılarak çalışılan hücre hattı için uygun ekim yoğunluğunda 75 cm²'lik flaslara ekim yapıldı. Flask üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazıldı. Hücreler mikroskopta incelenip flaslara CO₂ inkübatörüne yerleştirildi.

3.3.2. Metforminin hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2y)]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi ilk kez Mossmann tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır (194). Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (195).

Hücrelerin mikropklara ekimi 24, 48 ve 72 saatler için farklı sayılarda yapıldı. 24 saat için 10^4 , 48 saat için 5×10^3 , 72 saat için 2.5×10^3 hücre her bir kuyucuğa ekildi. 96'lık well plate'e uygulanmak üzere metforminin (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM) farklı konsantrasyonlarını içeren gruplar oluşturuldu. İlacın farklı dozları 24, 48 ve 72 saat maruz kalmak üzere uygulandı. Gruplara 10 µl MTT solüsyonundan eklenerek 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Ertesi gün DMSO ile kristaller çözüldükten sonra 96'lık well plate ELISA Reader ile 570 nm'de okutuldu.

3.3.2.1. 5-florourasil ve oksaliplatinin MTT yöntemiyle HT-29 hücre hattındaki toksik dozlarının belirlenmesi

Hücreler 5×10^3 sayıda her bir kuyucuğa ekildi. 96'lık well plate'e uygulanmak üzere 5-Florourasil (5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM) ve oksaliplatinin (1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM ve 25 µM) farklı konsantrasyonlarındaki kombinasyonlarını içeren gruplar oluşturuldu. İlaçların farklı dozları 48 saat maruz kalmak suretiyle hücreler üzerine uygulandı. Gruplara 10 µl MTT solüsyonundan eklenerek 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerini çözmek

için her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Ertesi gün DMSO ile kristaller çözüldükten sonra 96'lık well plate ELISA Reader ile 570 nm'de okutuldu.

3.3.2.2. Metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

Hücreler 5×10^3 sayıda her bir kuyucuğa ekildi. 96'lık well plate'e 50 µM 5-FU, 1 mM metformin+50 µM 5-FU, 5 mM metformin+50 µM 5-FU, 10 mM metformin+50 µM 5-FU, 20 mM metformin+50 µM 5-FU, 40 mM metformin+50 µM 5-FU ve 10 µM oksaliplatin, 1 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 5 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 10 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 20 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 40 mM metformin+10 µM oksaliplatin kombinasyonları halinde 48 saat maruz kalmak suretiyle hücreler üzerine uygulandı. Gruplara 10 µl MTT solüsyonundan eklenerek 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Ertesi gün DMSO ile kristaller çözüldükten sonra 96'lık well plate ELISA Reader ile 570 nm'de okutuldu.

3.3.3. Metforminin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının hücreler üzerinde etkisinin morfolojik olarak değerlendirilmesi

Faz kontrast mikroskopunda metforminin ve metforminin farklı dozlarının 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının hücre proliferasyonu üzerine etkisini morfolojik olarak gözlemlemek için 25cm²'lik flasklara 25×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Metforminin (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM) farklı dozları tek başına ve 50 µM 5-FU, 10 µM oksaliplatin ile kombinasyonları (1 mM metformin+50 µM 5-FU, 5 mM metformin+50 µM 5-FU, 10 mM metformin+50 µM 5-FU, 20 mM metformin+50 µM 5-FU, 40 mM metformin+50 µM 5-FU ve 1 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 5 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 10 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 20 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 40 mM metformin+10 µM oksaliplatin) halinde 48. saatte değerlendirmek için inkübasyona bırakıldı ve faz kontrast mikroskopunda 200X resimleri alındı.

3.3.4. Metforminin HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksitenin LDH testi ile belirlenmesi

LDH (laktat dehidrogenaz) test yönteminde hücrede membran hasarı veya sitolizis durumunda açığa çıkan sitozolik bir enzim olan laktat dehidrogenazın ölçümü yapılarak sitotoksitenin belirlenir. Bu yöntemin ilkesi ölü hücrelerden açığa çıkan LDH miktarının kolorimetrik olarak saptanmasıdır (196). LDH analizleri “Roche, Cytotoxicity Detection Kit (LDH)” ile gerçekleştirildi. Kit içeriği: 1. Catalyst (Diaphorase/NAD⁺ mixture), 2. Dye Solution (INT and sodium lactate).

LDH test yönteminin uygulanması: Metforminin tek başına değerlendirilmesi amacıyla 24, 48 ve 72 saatler için farklı sayılarda hücre ekimi 96'lık well plate'lere yapıldı. 24 saat için 10⁴, 48 saat için 5X10³ ve 72 saat için 2.5X10³ sayıda hücre ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hücreler metforminin farklı dozlarına (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM) 24, 48 ve 72 saat maruz bırakıldı. Hücre ölümünün %100 olarak kabul edildiği pozitif kontrol (yüksek kontrol) grubu oluşturmak için % 1'lik Triton X-100 solüsyonu hücreler üzerine uygulandı. İlaç uygulanmayan kuyucuk düşük kontrol olarak kabul edildi. Inkübasyon aşamasından sonra, plate 10 dakika santrifüj edilip, kuyucuklardaki her bir süpernatant örneğinden 100'er µl hacimde örnek başka bir 96'lık well plate'e dikkatle aktarıldı. Örnekler üzerine 100'er µl Reaction mixture (250 µl Catalyst + 11.25 ml Dye Solution) eklenip oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Örnekler ELISA Reader cihazında 490 nm'de okutularak hücre içi LDH miktarını gösteren absorbans değerleri elde edildi. Her bir kültür koşulu için hücre ölümü yüzdesi şu formül kullanılarak hesaplandı: (% Sitotoksitenin=Ölçülen absorbans değeri-Düşük kontrol/Yüksek kontrol-Düşük kontrol).

3.3.4.1. Metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksitenin LDH testi ile belirlenmesi

Her bir kuyucuğa 5X10³ sayıda olmak üzere 96'lık well plate'e hücreler ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra 50 µM 5-FU, 1 mM metformin+50 µM 5-FU, 5 mM metformin+50 µM 5-FU, 10 mM metformin+50 µM 5-FU, 20 mM metformin+50 µM 5-FU, 40 mM metformin+50 µM 5-FU ve 10 µM oksaliplatin, 1

mM metformin+10 µM oksaliplatin, 5 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 10 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 20 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 40 mM metformin+10 µM oksaliplatin kombinasyonları 48 saat maruz kalmak suretiyle hücreler üzerine uygulandı. İnkübasyon aşamasından sonra, plate 10 dakika santrifüj edilip, kuyucuklardaki her bir süpernatant örneğinden 100'er µl hacimde örnek başka bir 96'lık well plate'e dikkatle aktarıldı. Örnekler üzerine 100'er µl Reaction mixture (250 µl Catalyst + 11.25 ml Dye Solution) eklenip oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Örnekler ELISA Reader cihazında 490 nm'de okutularak hücre içi LDH miktarını gösteren absorbans değerleri elde edildi. Her bir kültür koşulu için hücre ölümü yüzdesi şu formül kullanılarak hesaplandı: (%Sitotoksosite=Ölçülen absorbans değeri-Düşük kontrol/Yüksek kontrol-Düşük kontrol).

3.3.5. TUNEL yöntemi ile apoptozun belirlenmesi

TUNEL; terminal "deoksinukleotidil-transferaz-aracılı deoksiüridin trifosfat nick-end" işaretleme yöntemidir. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak apoptoza giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır (198).

TUNEL yöntemi ile apoptozun belirlenmesi için "Roche, In Situ Cell Death Detection Kit-Fluorescein" kiti kullanıldı. Kitin içeriği: 1. Enzyme Solution (TdT), 2. Label Solution (fluorescein-dUTP). TUNEL yönteminde sırasıyla şu işlemler uygulandı: 24'lük well plateler içine yerleştirilen lamellere 48 saat için 5×10^3 sayıda hücre ekimi yapıldı. Hücreler 24 saat süresince inkübe edildikten sonra metforminin farklı dozları (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM) ve 50 µM 5-FU, 1 mM metformin+50 µM 5-FU, 5 mM metformin+50 µM 5-FU, 10 mM metformin+50 µM 5-FU, 20 mM metformin+50 µM 5-FU, 40 mM metformin+50 µM 5-FU ve 10 µM oksaliplatin, 1 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 5 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 10 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 20 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 40 mM metformin+10 µM oksaliplatin kombinasyonları uygulandı ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra well platelerden medium çekilip, 200 µl %4'lük paraformaldehit çözeltisi eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bekletildi (Fiksasyon aşaması). 1 saat sonunda hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra %0.1'lik sodyum sitrat içinde %0.1'lik Triton-X çözeltisinden 200'er µl her bir

bölmeye eklendi ve 2 dakika süresince buz üzerinde bekletildi (Permeabilizasyon aşaması). Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine 50 µl TUNEL reaction mixture (50 µl enzyme solution+500 µl label solution) eklenerek nemli ve karanlık ortamda, 37°C sıcaklıkta 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra hücreler PBS ile 3 kez yıkandı. Lameller mounting medium ile lama yapıştırıldı ve Florasan mikroskop altında yeşil ışık aralığında (515-565 nm) analiz edilerek görüntüleri alındı.

3.3.6. Kaspaz-3 aktivasyonu tayini

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri olan kaspaz-3 aktivasyon tayini yönteminin prensibi kaspaz-3'ün substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVD-pNA) kromofor p-nitroanilin (pNA) serbestleşmesinin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (197). Kaspaz-3 analizleri "Invitrogen, caspase 3 (active) human elisa kit" ile gerçekleştirildi. Kit içeriği: 1- Caspase-3 (active) Standard, 2- Standard Diluent Buffer, 3- Antibody Coated Wells, 4- Caspase-3 Detection Antibody, 5- Anti-Rabbit IgG HRP (100X), 6- Wash Buffer Concentrate (25X), 7- Stabilized Chromogen (TMB), 8- Stop Solution, 9- Plate covers. Kaspaz-3 aktivite tayini yönteminde sırasıyla şu işlemler uygulandı:

Kiti uygulamadan önce, $2,5 \times 10^5$ sayıda HT-29 hücreleri sırasıyla 25 cm²'lik kültür kaplarına ekildi. Ekilen hücreler üzerine 1 gün inkübasyondan sonra metforminin farklı dozları (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM) ve 50 µM 5-FU, 1 mM metformin+50 µM 5-FU, 5 mM metformin+50 µM 5-FU, 10 mM metformin+50 µM 5-FU, 20 mM metformin+50 µM 5-FU, 40 mM metformin+50 µM 5-FU ve 10 µM oksaliplatin, 1 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 5 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 10 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 20 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 40 mM metformin+10 µM oksaliplatin kombinasyonları uygulandı. Flasklar 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra hücreler tripsinizasyon yöntemiyle kaldırılıp medyumları ile birlikte 15 ml'lik deney tüplerine toplandı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatantları atılarak hücrelerin üzerlerine 2 ml PBS eklenip süspansiyon edilip ependorf tüplerine aktarıldı. Ependorf tüpündeki hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 1 kez daha tekrarlandı. Süpernatantları atıldıktan sonra pellet üzerine 500 µl

Cell Extraction Buffer+Protease inhibitor cocktail karışımından eklendi ve vorteks ile hafifçe süspanse edilip buzun üzerinde 30 dakika inkübe edildikten sonra 10 dakikada bir vorteks uygulandı. Örnekler 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları ayrı ependorflara aktarıldı ve buzun üzerine konuldu. Yöntem için gerekli reaktifler (standartın farklı konsantrasyondaki örnekleri, Anti-Rabbit IgG HRP çalışma solüsyonu ve yıkama solüsyonu) protokole uygun şekilde hazırlandı. Deney için gerekli 8-well strips sayısı belirlendikten sonra 100 µl hacminde farklı konsantrasyondaki standartlar (2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.313 ng/ml, 0.156 ng/ml, 0.078 ng/ml, 0.039 ng/ml) ve blank (kör) olarak 100 µl hacminde dilüsyon sıvısı kuyucuklara eklendi. Farklı konsantrasyondaki örneklerimizden de 100 µl hacimde kuyucuklara eklenerek kuyucukların üzeri plate cover ile kapatılıp 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bekleme aşamasından sonra kuyucuklardaki sıvılar aspire edilip sonrasında kuyucuklar 4 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µl Caspase-3 detection antibody solüsyonu eklendikten sonra 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Üzerindeki sıvı aspire edilip kuyucuklar 4 defa yıkandı. Kuyucuklara 100 µl Anti-Rabbit IgG HRP çalışma solüsyonu eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Solüsyon aspire edildikten sonra kuyucuklar 4 defa yıkandı. 100 µl Stabilized Chromogen kuyucuklara eklendi. 30 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. 100 µl stop solution kuyucuklara eklendi ve plate 450 nm'de ELISA Reader cihazında okutularak absorbans değerleri elde edildi. Gruplardaki kaspaz-3 seviyelerinin kontrol grubuna göre kaç kat artış veya azalış gösterdikleri hesaplandı.

3.3.7. İstatistiksel değerlendirme

Deney sonuçları, SPSS (Statistic Program for Social and Science) istatistik programında değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılık one-way ANOVA ve anlamlılık belirlenmişse Post-Hoc olarak da Tukey testi kullanılarak hesaplandı.

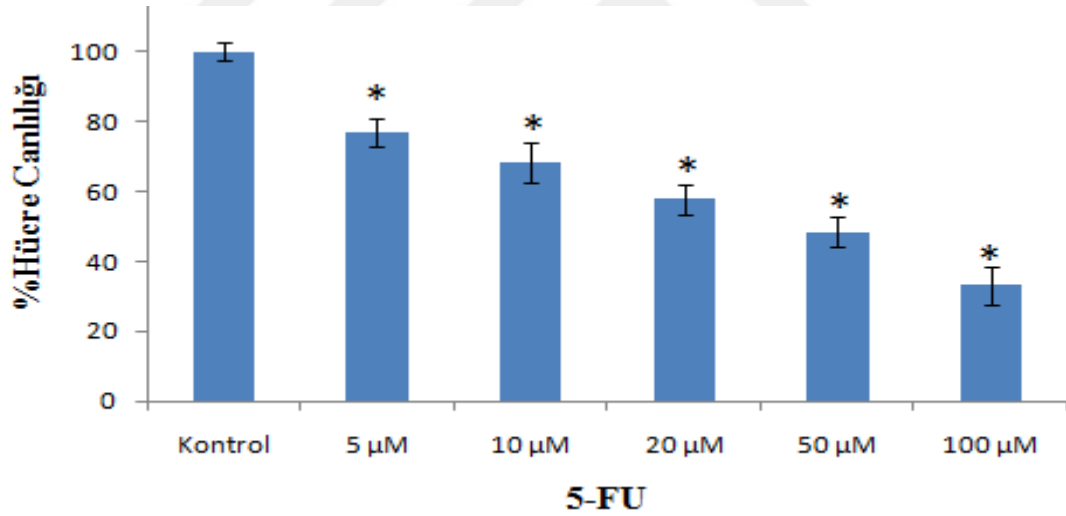
4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

4.1.1. 5-florourasil (5-FU) ve oksaliplatinin toksik dozlarının MTT testi ile belirlenmesi

4.1.1.1. 5-florourasilin (5-FU) toksik dozunun MTT testi ile belirlenmesi

5-FU'nun HT-29 hücre hattı üzerindeki 48 saatlik maruziyeti sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 5 μ M seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 5 μ M 5-FU hücre canlılığını $100 \pm 1,37$ 'den $76,9 \pm 2,34$ 'a; 10 μ M 5-FU $68,2 \pm 3,23$ 'e; 20 μ M 5-FU $57,9 \pm 2,41$ 'e, 50 μ M 5-FU ve 100 μ M 5-FU ise $48,4 \pm 2,43$ 'e ve $33,1 \pm 3,07$ 'e düşürmüştür (Şekil 4.1). Bu sonuçlara göre, diğer testlerde kullanılmak üzere 5-FU'nun HT-29 kolon kanseri hücrelerinin yaklaşık % 50'sini öldüren 50 μ M dozu olarak seçilmiştir (*; $p < 0,001$).

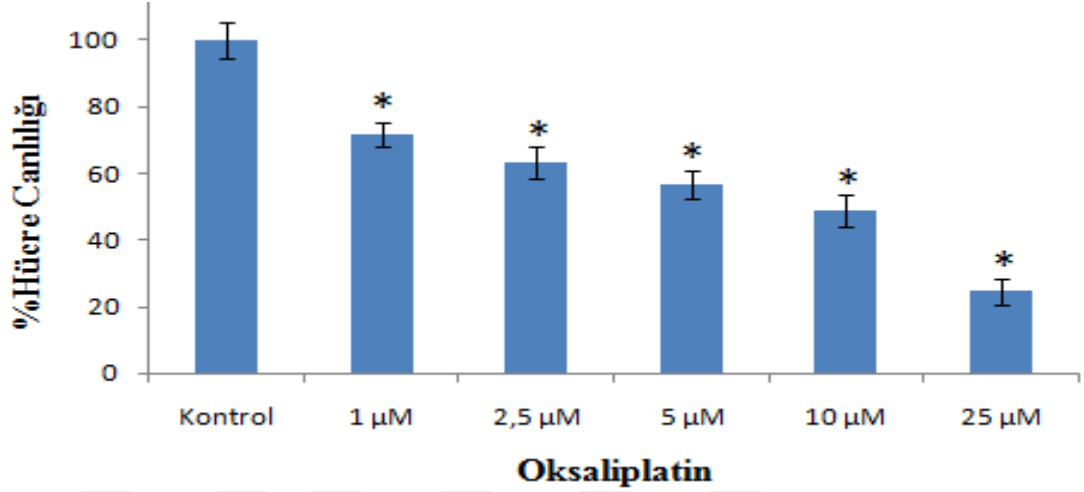


Şekil 4.1. 5-florourasilin (5-FU) HT-29 hücrelerindeki toksisitesinin MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. *; $p < 0,001$. (n=3)

4.1.1.2. Oksaliplatinin toksik dozunun MTT testi ile belirlenmesi

Oksaliplatinin HT-29 hücre hattı üzerindeki 48 saatlik maruziyeti sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 1 μ M seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 1 μ M oksaliplatin hücre canlılığını $100 \pm 3,26$ 'den $71,8 \pm 2,01$ 'e; 2,5 μ M oksaliplatin $63,2 \pm 2,74$ 'ye; 5 μ M oksaliplatin $56,9 \pm 2,49$ 'a, 10 μ M oksaliplatin ve 25 μ M

oksaliplatin ise $48,9 \pm 2,92$ 'a ve $24,7 \pm 2,24$ 'e düşürmüştür (Şekil 4.2). Bu sonuçlara göre, diğer testlerde kullanılmak üzere oksaliplatinin HT-29 kolon kanseri hücrelerinin yaklaşık % 50'sini öldüren 10 μ M dozu seçilmiştir (*; $p < 0,001$).

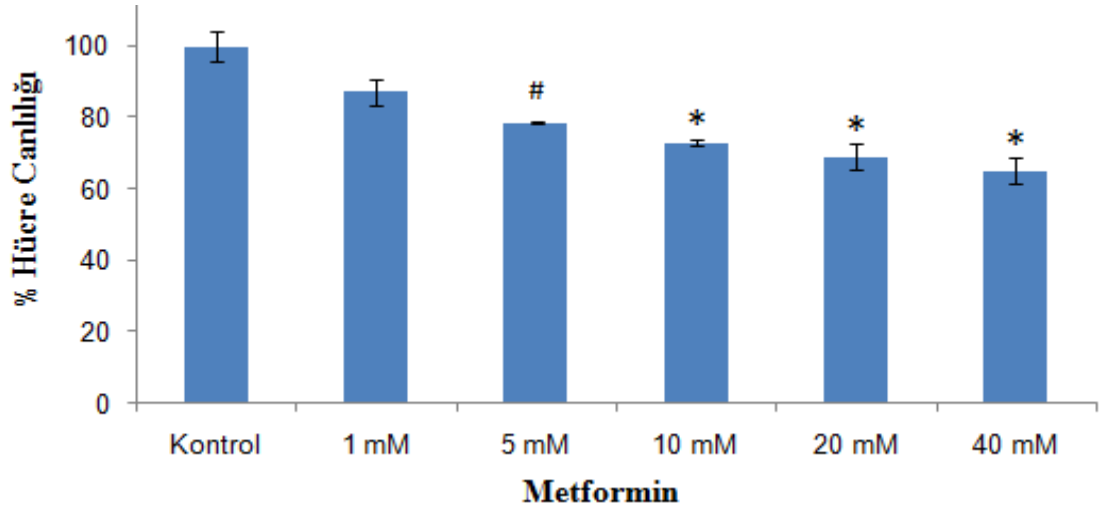


Şekil 4.2. Oksaliplatinin HT-29 hücrelerindeki toksisitesinin MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. *; $p < 0,001$. (n=3)

4.1.2. Metforminin hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT ile belirlenmesi

4.1.2.1. Metforminin 24 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

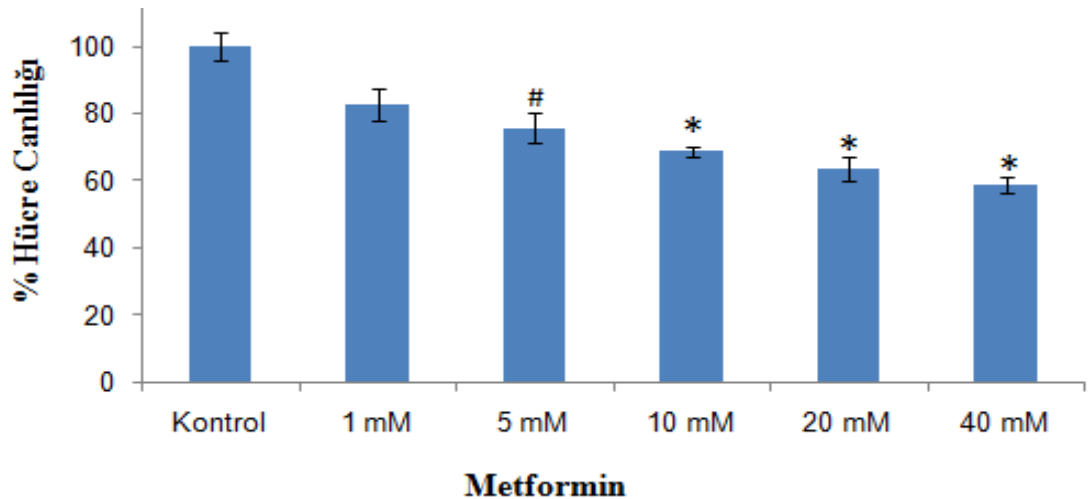
Metforminin HT-29 hücre hattı üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 5 mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 5 mM metformin hücre canlılığını $100 \pm 4,2$ 'den $78,7 \pm 0,41$ 'e; 10 mM metformin $72,9 \pm 0,82$ 'e düşürmüştür (#; $p < 0,05$). 20mM ve 40mM metformin hücre canlılığını 100 ± 7 'den, $69 \pm 3,56$ 'a ve $65 \pm 3,67$ 'e düşürmüştür. (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Metforminin HT-29 hücrelerinde 24 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. #; $p < 0,05$, *; $p < 0,001$. (n=3)

4.1.2.2. Metforminin 48 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

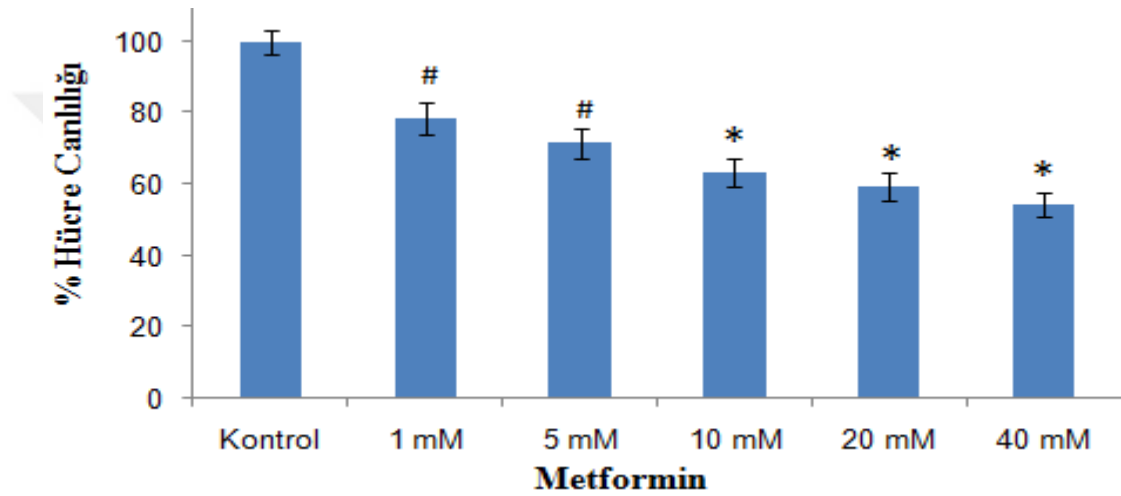
Metforminin HT-29 hücre hattı üzerindeki 48 saatlik maruziyeti sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 5 mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 5 mM metforminin hücre canlılığını $100 \pm 4,26$ 'den, $75,4 \pm 4,73$ 'e düşürmüştür (#; $p < 0,05$). 10 mM metformin hücre canlılığını $100 \pm 4,26$ 'den, $68,6 \pm 1,48$ 'e; 20mM ve 40mM metformin $63,6 \pm 3,72$ 'ya ve $58,5 \pm 2,4$ 'e düşürmüştür (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Metforminin HT-29 hücrelerinde 48 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. *; $p < 0,001$, #; $p < 0,05$. (n=3)

4.1.2.3. Metforminin 72 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

Metforminin HT-29 hücre hattı üzerindeki 72 saatlik maruziyeti sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 1 mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 1 mM metformin hücre canlılığını $100 \pm 3,31$ 'den, $78,2 \pm 4,48$ 'ye; 5 mM metformin $71,7 \pm 4,24$ 'e düşürmüştür (#; $p < 0,05$). 10 mM metformin hücre canlılığını $100 \pm 3,31$ 'den, $63,2 \pm 43,91$ 'ye 20mM ve 40mM metformin ise hücre canlılığını $59,3 \pm 3,9$ 'e ve $54,6 \pm 3,36$ 'ya düşürmüştür (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.5).

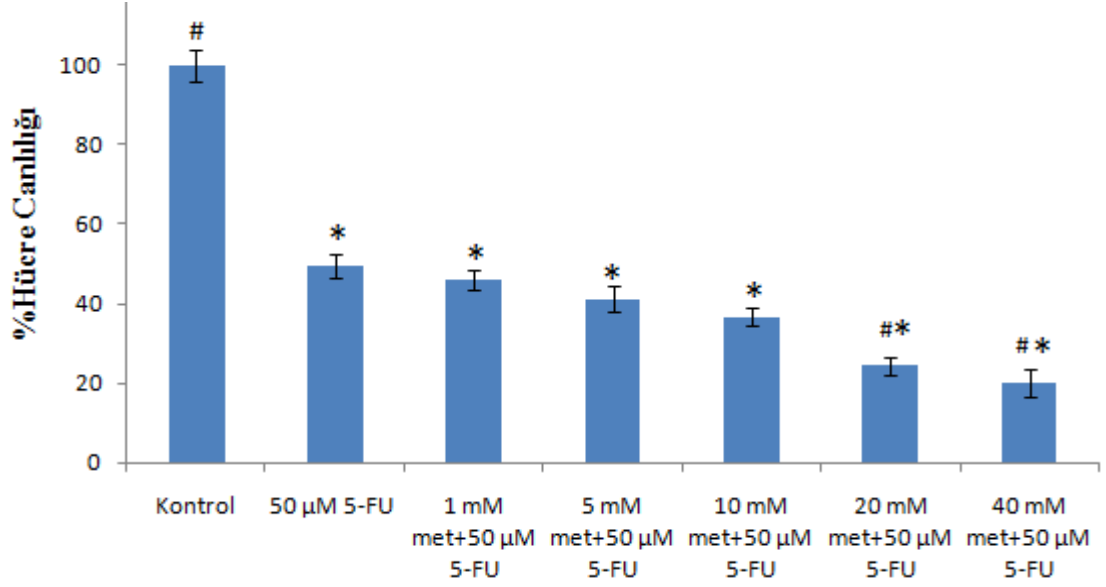


Şekil 4.5. Metforminin HT-29 hücrelerinde 72 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. *; $p < 0,001$, #; $p < 0,05$. (n=3)

4.1.3. Metforminin 5-FU ve oksaliptatin ile kombinasyonlarının maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

4.1.3.1. Metforminin 5-FU ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

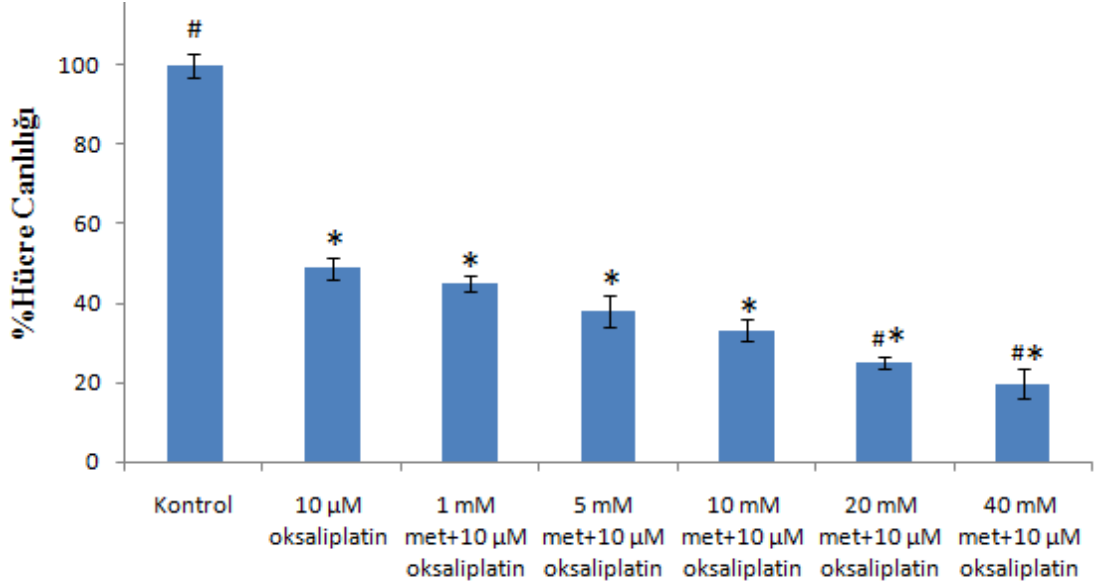
5-FU'nun HT-29 kolon kanseri hücrelerinin yaklaşık % 50'sini öldüren $50 \mu\text{M}$ dozu kombinasyonlarda kullanmak üzere seçilmiştir. Metforminin 20 mM'lık ve 40 mM'lık 5-FU kombinasyonları yalnız $50 \mu\text{M}$ 5-FU dozuna göre $49,5 \pm 2,76$ 'ten $24,3 \pm 2,39$ 'e ve $20 \pm 3,6$ 'ye düşüş sağlamışlardır (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Metforminin (met) 5-FU ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p < 0,001$, 50 µM 5-FU'ya göre #; $p < 0,001$. (n=3)

4.1.3.2. Metforminin oksaliplatin ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

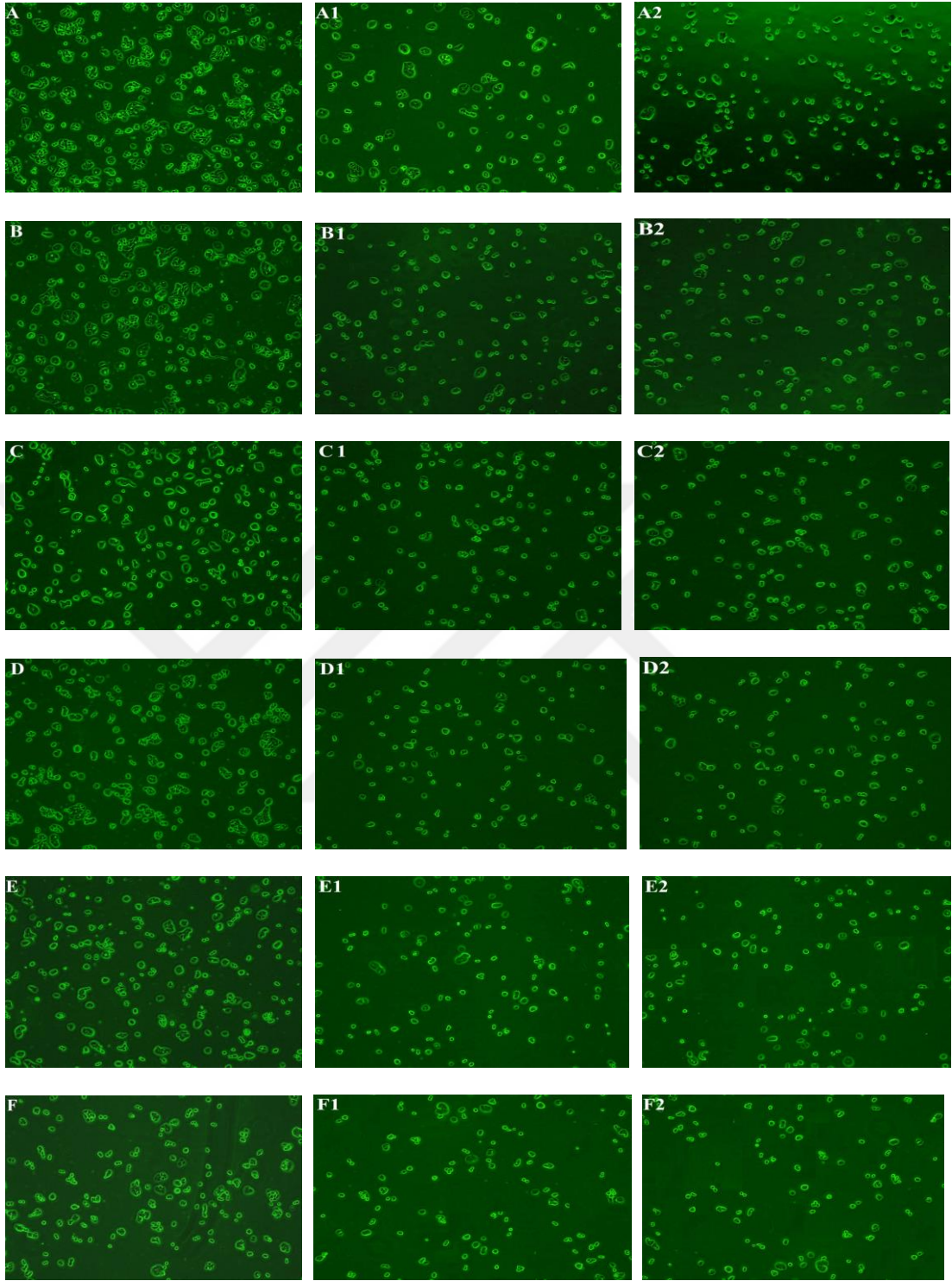
Oksaliplatinin HT-29 kolon kanseri hücrelerinin yaklaşık % 50'sini öldüren 10µM dozu kombinasyonlarda kullanmak üzere seçilmiştir. Metforminin 20 mM'lık ve 40 mM'lık oksaliplatin kombinasyonları yalnız 10 µM oksaliplatin dozuna göre %48,9±2,73'dan %24,9±1,48'a ve %19,7±3,56'ye düşüş sağlamışlardır (#; $p < 0,001$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Metforminin (met) oksaliplatin ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p < 0,001$, 10 µM oksaliplatin'e göre #; $p < 0,001$. (n=3)

4.1.4. Metformin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının hücreler üzerinde etkisinin morfolojik olarak değerlendirilmesi

Faz kontrast invert mikroskopta 200X ile alınan resimler üzerinden HT-29 hücrelerinin morfolojileri kontrol grubu, metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM dozları ve 50 µM 5-FU, 10 µM oksaliplatin ile kombinasyonları (1 mM metformin+50 µM 5-FU, 5 mM metformin+50 µM 5-FU, 10 mM metformin+50 µM 5-FU, 20 mM metformin+50 µM 5-FU, 40 mM metformin+50 µM 5-FU ve 1 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 5 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 10 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 20 mM metformin+10 µM oksaliplatin, 40 mM metformin+10 µM oksaliplatin) uygulandıktan 48 saat sonra değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda hücreler morfolojik yönden normal olarak gözlemlenirken, 1mM metformin uygulanan grupta hücre sayısında azalma başladığı görüldü. En çok hücre kaybı ise 10, 20 ve 40 mM metformin ve metforminin ile 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonundaki tüm gruplarda görüldü. Kombinasyon grupları yalnız 5-FU ve oksaliplatine göre değerlendirildiğinde ise artan metformin dozunun özellikle 20 mM ve 40 mM'lik kombinasyonlarında hücre sayısında azalamaya neden olduğu saptandı (Şekil 4.8).



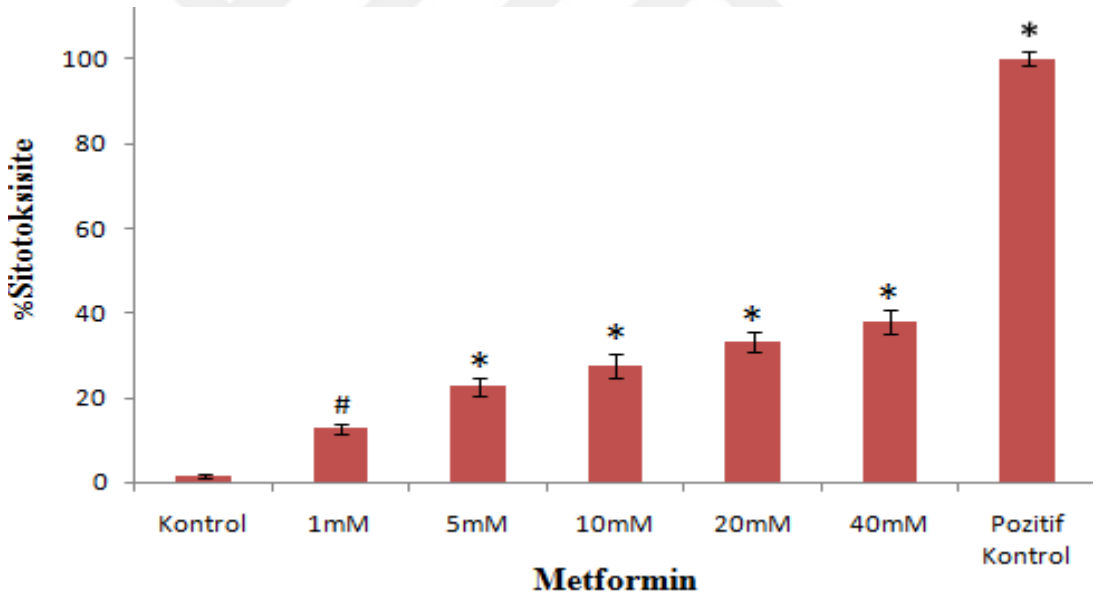
Şekil 4.8. Metformin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarına 48 saatlik maruziyet sonucu HT-29 hücrelerinin faz kontrast invert mikroskopda görüntüleri. A:Kontrol grubu, B:1mM metformin, C:5mM metformin, D:10mM metformin, E:20 mM metformin, F: 40 mM metformin. A1:5-FU (50µM), B1:1 metformin+5-FU, C1:5 metformin+5-FU, D1:10 metformin+5-FU, E1:20 metformin+5-FU, F1:40 metformin+5-FU. A2:oksalipatin (10µM), B2:1 metformin+oksalipatin, C2:5 metformin+ oksaliplatin, D2:10 metformin+oksalipatin, E2:20 metformin+oksalipatin, F2:40 metformin+oksalipatin.

4.2. LDH Testi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

4.2.1. Metforminin HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi

4.2.1.1. Metformine 24 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi

Metformin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat sonrasında doz bağımlı olarak sitotoksisiteyi artırmıştır. Kontrol grubunda spontane hücre ölümlerinden kaynaklanan $1,6\pm0,48$ 'lik bir sitotoksisite hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre, 1 mM metformin sitotoksisiteyi $12,6\pm1,21$ 'ya çıkarmıştır (#; $p<0,05$). 5 mM metformin $22,6\pm2,23$ 'ya; 10 mM metformin $27,5\pm2,77$ 'e; 20mM ve 40mM metformin ise sitotoksisiteyi $33,1\pm2,41$ ve $38\pm2,87$ çıkarmıştır (*; $p<0,001$) (Şekil 4.9).

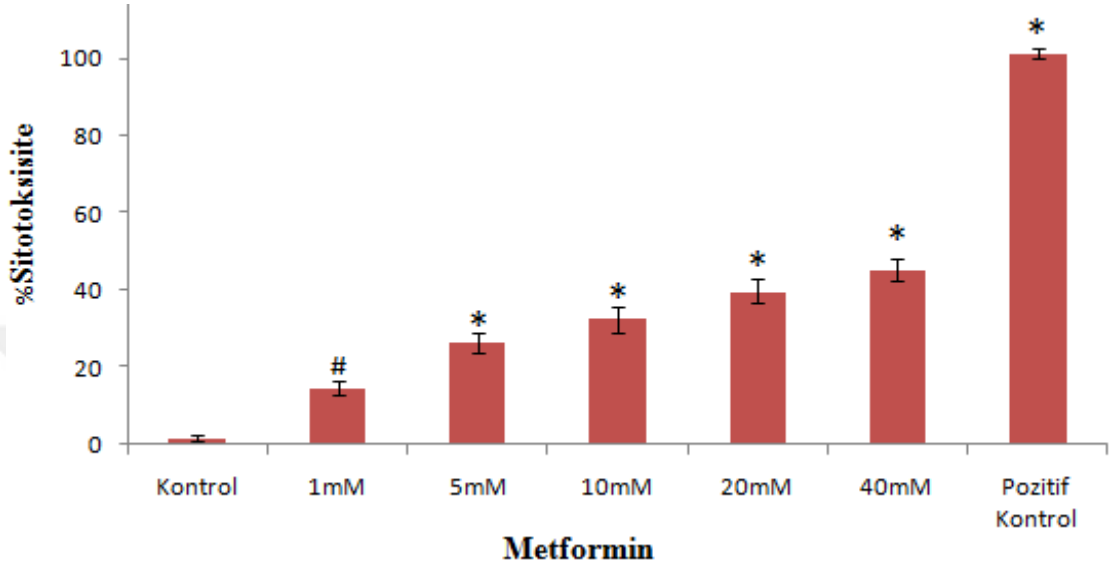


Şekil 4.9. Metformine HT-29 hücrelerinin 24 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksisitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları. #; $p<0,05$, *; $p<0,001$. (n=3)

4.2.1.2. Metforminine 48 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksisitenin LDH testi ile belirlenmesi

Metformin HT-29 hücre hattı üzerinde 48 saat sonrasında doz bağımlı olarak sitotoksisiteyi artırmıştır. Kontrol grubunda spontane hücre ölümlerinden kaynaklanan $1,8\pm0,73$ 'lik bir sitotoksisite hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre, 1

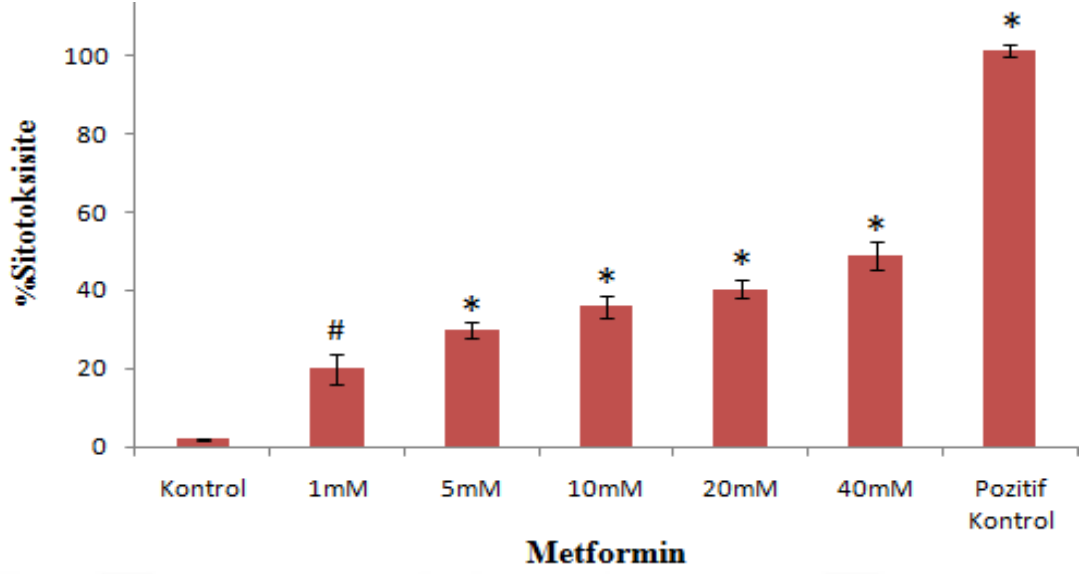
mM metformin sitotoksisteyi $14,6 \pm 1,78$ 'ya çıkarmıştır (#; $p < 0,05$). 5 mM metformin $26,6 \pm 2,49$ 'ya; 10 mM metformin $32,5 \pm 3,29$ 'e; 20 mM ve 40 mM metformin ise sitotoksisteyi $39,7 \pm 3,13$ ve $45,4 \pm 2,99$ 'e çıkarmıştır (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Metformine HT-29 hücrelerinin 48 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksistenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları. #; $p < 0,05$, *; $p < 0,001$. (n=3)

4.2.1.3. Metformine 72 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksistenin LDH testi ile belirlenmesi

Metformin HT-29 hücre hattı üzerinde 72 saat sonrasında doz bağımlı olarak sitotoksisteyi artırmıştır. Kontrol grubunda spontane hücre ölümlerinden kaynaklanan $1,9 \pm 0,41$ 'lik bir sitotoksiste hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre, 1 mM metformin sitotoksisteyi $20 \pm 3,93$ 'ye; 5 mM metformin $29,8 \pm 2,02$ 'e; 10 mM metformin $35,9 \pm 2,78$ 'a; 20 mM ve 40 mM metformin ise $40,4 \pm 2,06$ ve $48,7 \pm 3,58$ 'ye çıkarmıştır (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.11).

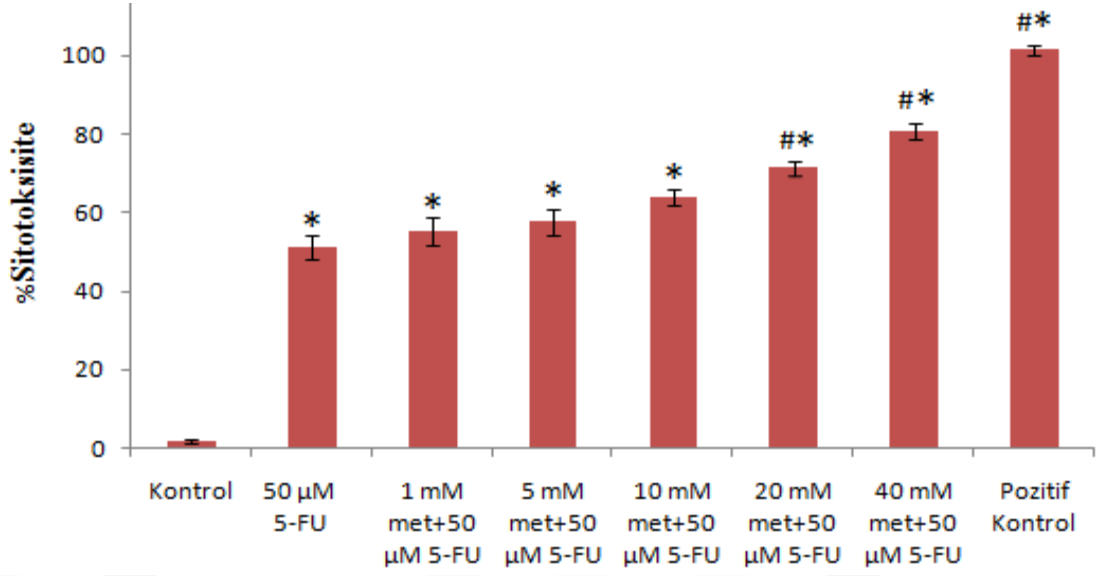


Şekil 4.11. Metformine HT-29 hücrelerinin 72 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları. #; $p<0,05$, *; $p<0,001$. (n=3)

4.2.2. Metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksitenin LDH testi ile belirlenmesi

4.2.2.1. Metforminin 5-FU ile kombinasyonuna 48 saatlik maruziyet sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksitenin LDH testi ile belirlenmesi

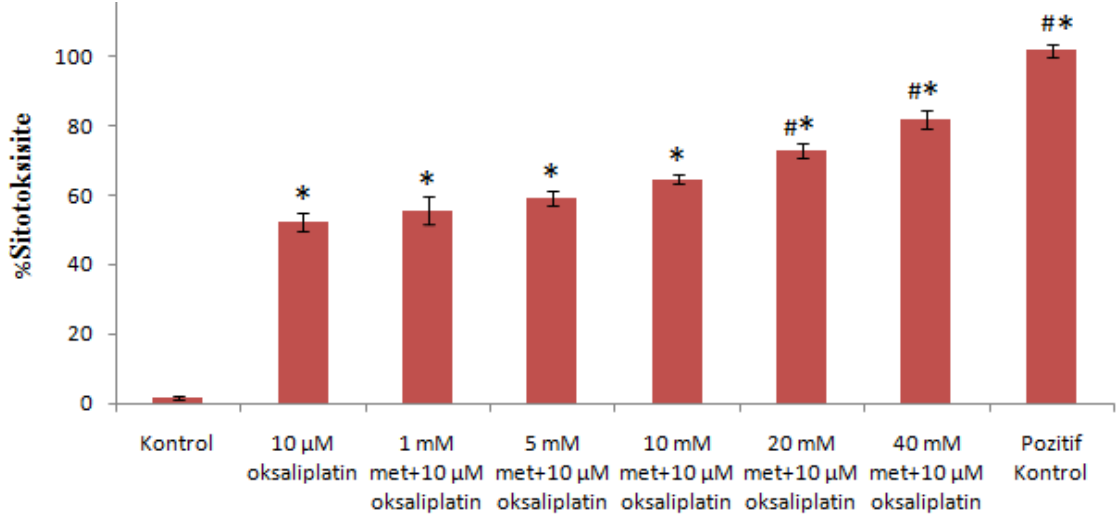
Kontrol grubuna göre, 50 μ M 5-FU ve 5-FU'nun 1, 5, 10, 20 ve 40 mM'lık metformin kombinasyonlarının tamamı sitotoksiteyi artırmıştır (*; $p<0,001$). Metforminin 20 mM'lık ve 40 mM'lık 5-FU kombinasyonları yalnız 50 μ M 5-FU dozuna göre sitotoksiteyi $51,3\pm 2,92$ 'den, $71,4\pm 1,79$ 'e ve $80,8\pm 2,08$ 'e çıkarmıştır (#; $p<0,001$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Metforminin (met) 5-FU ile kombinasyonuna HT-29 hücrelerinin 48 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p<0,001$, 50 µM 5-FU'ya göre #; $p<0,001$. (n=3)

4.2.2.1. Metforminin oksaliplatin ile kombinasyonunun 48 saatlik maruziyeti sonrasında HT-29 hücrelerinde oluşan sitotoksitenin LDH testi ile belirlenmesi

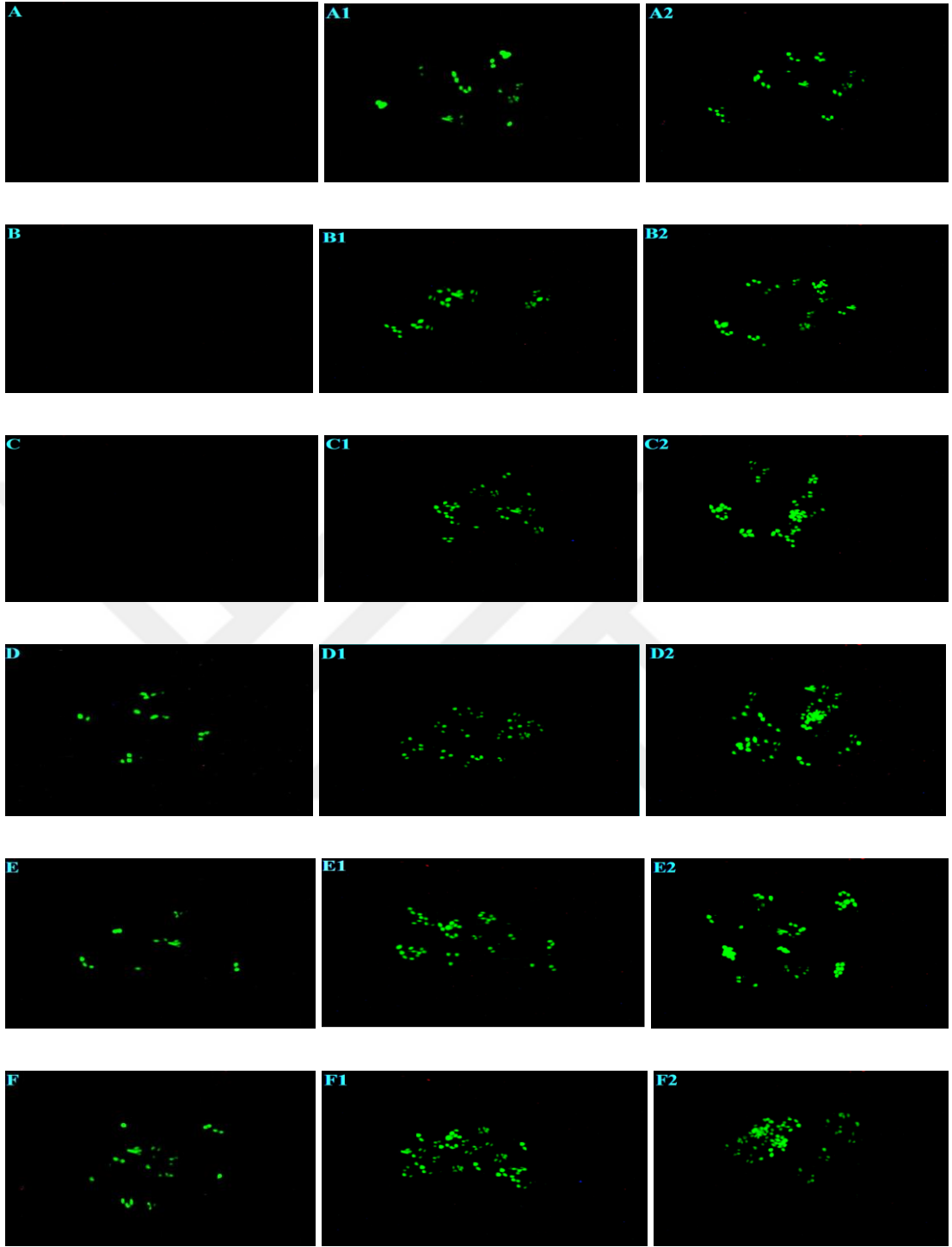
Kontrol grubuna göre, 10 µM oksaliplatin ve oksaliplatinin 1, 5, 10, 20 ve 40 mM'lık metformin kombinasyonlarının tamamı sitotoksiteyi artırmıştır (*; $p<0,001$). Metforminin 20 mM'lık ve 40 mM'lık oksaliplatin kombinasyonları yalnız 10 µM oksaliplatin'e göre sitotoksiteyi $52,2\pm 2,79$ 'den, $73\pm 2,13$ 'e ve $81,8\pm 2,49$ 'e çıkarmıştır (#; $p<0,001$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Metforminin (met) oksaliplatin ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerinin 48 saatlik maruziyeti sonrası sitotoksitenin LDH testi ile ölçülmüş sonuçları. Kontrol grubuna göre *; p<0,001, 10 µM oksaliplatinine göre #; p<0,001. (n=3)

4.4. HT-29 Hücre Hattında Metformin ve Metforminin 5-FU ve Oksaliplatin ile Kombinasyonlarının TUNEL Sonuçları

HT-29 hücre hattında apoptoz; kontrol grubu, metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM dozları ve 50 µM 5-FU, 5-FU'nun 1, 5, 10, 20 ve 40 mM'lık metformin kombinasyonları, 10 µM oksaliplatin ve oksaliplatinin 1, 5, 10, 20 ve 40 mM'lık metformin kombinasyonları uygulanarak değerlendirildi. 48 saatin sonunda TUNEL protokolu uygulandıktan sonra florasan mikroskopunda apoptotik hücreler tespit edildi. Kontrol grubunda, metforminin 1mM ve 5mM dozlarında apoptotik hücrelere rastlanmadı. Apoptotik hücreler 10 mM, 20 mM ve 40mM metformin dozunda saptandı. 5-FU, oksaliplatin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonundaki tüm gruplarda da apoptoz tespit edildi. (Şekil 4.14).

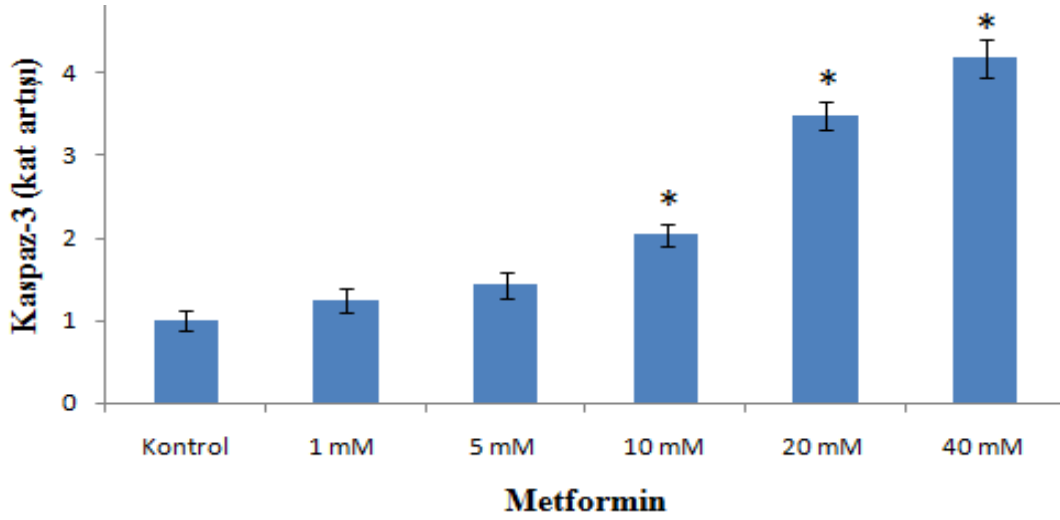


Şekil 4.14. Metformin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonlarına 48 saatlik maruziyet sonucu HT-29 hücrelerinin TUNEL görüntüleri. A:Kontrol grubu, B:1mM metformin, C:5mM metformin, D:10mM metformin, E:20 mM metformin, F: 40 mM metformin. A1:5-FU (50µM), B1:1 metformin+5-FU, C1:5 metformin+5-FU, D1:10 metformin+5-FU, E1:20 metformin+5-FU, F1:40 metformin+5-FU. A2:oksalipatin (10µM), B2:1 metformin+oksalipatin, C2:5 metformin+ oksalipatin, D2:10 metformin+oksalipatin, E2:20 metformin+oksalipatin, F2:40 metformin+oksalipatin.

4.5. ELİSA Yöntemi ile Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları

4.5.1. Metformin uygulaması sonrası kaspaz-3 seviyesinin ölçümü

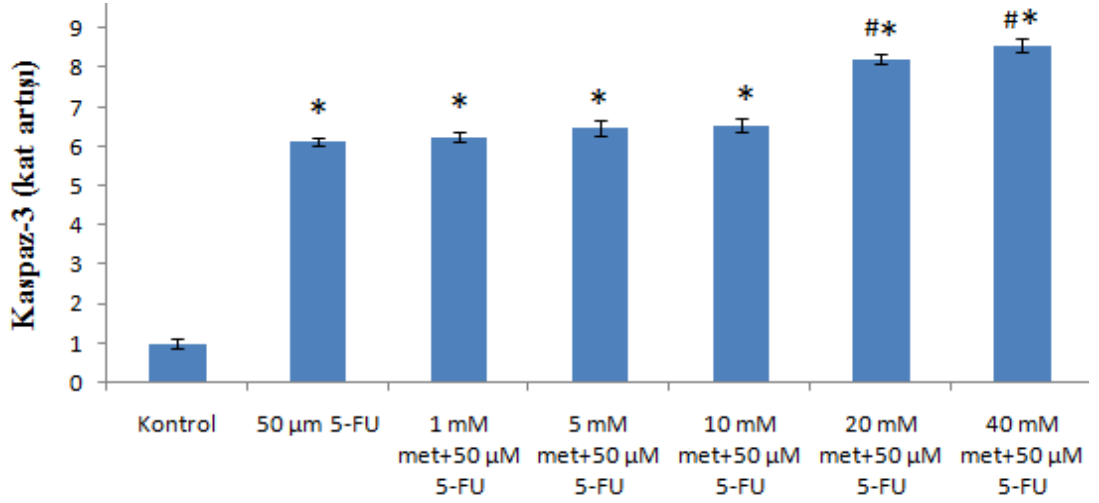
Hücrelerde apoptozu belirlemek için ELISA yöntemiyle hücrelerin kaspaz-3 seviyeleri ölçüldü ve 10mM, 20mM ve 40mM metforminin kaspaz-3 seviyesini kontrol grubuna göre $1\pm0,13$ 'den $2,21\pm0,15$ 'e, $3,58\pm0,17$ 'e ve $4,65\pm0,24$ 'e arttırdığı tespit edildi (*; $p<0,001$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Metforminin (met) 48 saatlik maruziyeti sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz-3ün kat artışı sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p<0,001$. (n=3)

4.5.1. Metforminin 5-FU ile kombinasyonu sonrası kaspaz-3 seviyesinin ölçümü

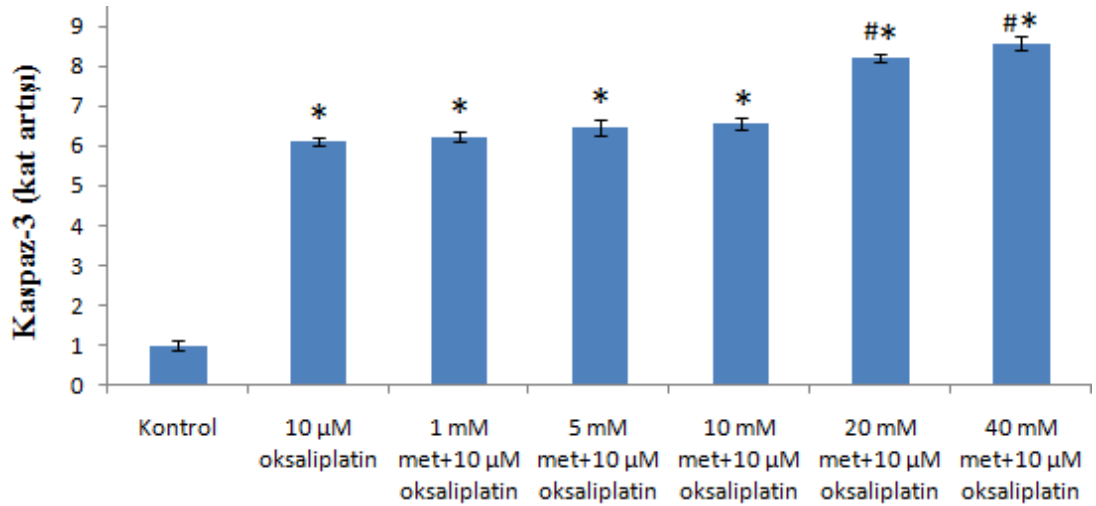
Metforminin 20 mM'lık ve 40 mM'lık 5-FU kombinasyonları kaspaz-3 seviyesini yalnız 50 μ M 5-FU dozuna göre $5,69\pm0,18$ 'den $8,24\pm0,14$ 'e ve $8,56\pm0,25$ 'e çıkarmışlardır (#; $p<0,001$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Metforminin (met) 5-FU ile kombinasyonuna 48 saatlik maruziyeti sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz-3'ün kat artışı sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p < 0,001$, 50 µM 5-FU'ya göre #; $p < 0,001$. (n=3)

4.5.1. Metforminin oksaliplatin ile kombinasyonu sonrası kaspaz-3 seviyesinin ölçümü

Metforminin 20 mM'lık ve 40 mM'lık oksaliplatin kombinasyonları kaspaz-3 seviyesini yalnız 10 µM oksaliplatin dozuna göre $5,91 \pm 0,11$ 'den, $8,44 \pm 0,12$ 'e ve $8,89 \pm 0,16$ 'a çıkarmışlardır (#; $p < 0,001$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Metforminin (met) oksaliplatin ile kombinasyonuna 48 saatlik maruziyeti sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz-3'ün kat artışı sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p < 0,001$, 10 µM oksaliplatinine göre #; $p < 0,001$. (n=3)

5. TARTIŞMA

Metformin tip 2 diyabet tedavisinde ilk basamak olarak kullanılan insülin duyarlılaştırıcı bir ilaçtır (199). Antidiyabetik etkisini hepatik glukoneogenezi inhibe ederek, periferel dokulardaki glukoz utilizasyonunu ve insülin duyarlılığını arttırarak gösterir (200). Diyabet tedavisinde kullanımının yanı sıra son yıllarda metforminin obezite tedavisi, polikistik over sendromu ve metabolik sendromda faydalı olabileceği ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin de bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (201-203). Ayrıca metforminin yaşlanma karşıtı bir madde olduğunu gösteren araştırmalar da bulunmaktadır (204). Çalışmamız açısından önemli olan konu ise metformin kanser ilişkisidir. Tip 2 diyabetli hastalarda metformin kullanımının kanser riskini azalttığını gösteren ilk çalışmaların yayınlanmasının üzerinden 10 yıl geçmiş ve o zamandan beri farklı kanser türlerinde metforminin etkilerini gösteren çok sayıda makale yayımlanmıştır (205). Metforminin anti-kanser etkisinin IGF sinyal yolağını baskılayarak dolaşımdaki insülin düzeyini düşürmesi, AMPK aktivasyonu ile mTOR yolağını baskılaması ve kanserin progresyonunda rol oynayan inflamatuvar süreçleri değiştirmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (206).

Kolon kanseri gelişmiş ülkelerde önemli bir ölüm nedenidir (207). Kolon kanseri için öngörülen tedavi, cerrahi rezeksiyonu takiben uygulanan adjuvan kemoterapidir. Kemoterapide 5-fluorurasil, irinotekan, oksaliptin kullanılmaktadır (208). Ancak bu ilaçlara karşı direnç gelişimi ve yüksek dozlarında oluşan ciddi toksik etkiler araştırmacıları farklı ilaç molekülleri aramaya yöneltmektedir (209). Metforminin insan kolon kanseri üzerindeki etkileri az bilirse de, etkili olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (210, 211). Gerek farklı kanser türlerinde gösterilen hücre proliferasyonunu azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkileri gerekse kolon kanserinde bu etkileri gösteren araştırma sayısının az olması nedeniyle, çalışmamızda metforminin HT-29 kolon kanseri hücre hattında hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda öncelikle metforminin hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla MTT testi yapılmıştır. MTT yönteminin avantajları basit, hızlı ve güvenilir olmasının yanı sıra radyoizotoplara gereksinim duyulmamasıdır (212). Bu deneylerde metforminin 5 farklı dozunun 24,

48, 72 saatlerde hücre canlılığı üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. Metformin doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. Bu bulgumuz metforminin HT-29 hücre canlılığına etkisini MTT testi ile değerlendiren 2015 yılında Jia ve ark. yaptığı çalışmayı doğrular niteliktedir (213). Bu çalışmada da metformin 0-40 mM doz aralığında kullanılmış 24.ve 48. Saatlerde hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Bulgularımızla uyumlu diğer bir çalışmada ise hücre proliferasyonu Alamar Blue testi ile değerlendirilmiştir (148). 0-20 mM dozlarda uygulanan metforminin 24 saat sonunda doz bağımlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Alamar Blue testi MTT'ye göre pahalı bir yöntemdir ancak renk değişiklikleri bu yöntemde hem florometrik hem de spektrofotometrik olarak tespit edilebilmektedir (214). Bununla birlikte, 2014 yılında yapılan bir araştırmada HT-29 hücre hattında MTT testi yapılmış ve metforminin hücre canlılığını etkilemediğini göstermiştir (215). Bunun nedeni büyük olasılıkla, metforminin seçilen doz aralığıdır. Çalışmada sadece 24 saat için 1-5 mM metformin dozu test edilmiştir. Bu çalışma, metforminin HT-29 hücrelerinde hücre canlılığına etkisini değerlendiren çalışmalar içinde bu kadar düşük doz aralığının çalışıldığı tek çalışmadır. Bizim çalışmamızda ise metforminin 24 saat sonrasında etkilerinin anlamlı olarak 5 mM dozlarında başladığı görülmüştür. Çalışmamızın devamında metforminin farklı dozlarının yine MTT testi ile belirlenen uygun 5-FU ve oksaliplatin dozlarıyla kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirilmiş ve 20 mM ve 40 mM 'lık metformin kombinasyonlarının yalnız 5-FU ve oksaliplatine göre hücre canlılığını anlamlı olarak azaltarak HT-29 hücrelerinde bu ilaçlarla sinerjistik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde bu bulgumuzla birebir karşılaştıracığımız başka bir çalışma bulunmamakla birlikte 2014 yılında yapılan bir çalışmada metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde sinerjistik olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği MTT testi ile gösterilmiştir ancak bu çalışmada HT-29 hücreleri önceden kemorezistan hale getirilmiştir (216). Bunun dışında, metforminin 5-FU'nun antiproliferatif etkisini artırdığını farklı bir kolon kanseri hücre hattında (SW620) yine MTT testi ile gösteren bir çalışma mevcuttur (23).

MTT testinin ardından metforminin ve metforminin 5-florourasil ve oksaliplatin ile kombinasyonlarının HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksiteyi belirleyebilmek amacıyla LDH testi uygulanmıştır. LDH testi güvenilir ve hızlı

uygulanabilen bir test olması nedeniyle tercih edilirken; MTT testinden daha az duyarlı olduğu belirtilmektedir (217). Sitotoksisteyi göstermek için nötral red ve ATP ölçümüne dayalı testler de kullanılabilir ancak nötral red testi LDH testine göre daha az duyarlıdır. ATP ölçüm testleri ise örnekler okutulurken farklı lüminisens ışımlarının sonuçları etkileyebileceğininin gösterilmesi nedeniyle tercih edilmemiştir (218). LDH deneylerinde metforminin 5 farklı dozunun 24, 48, 72 saatlerde HT-29 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksisteyi tespit edilmiştir. Metformin doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksisteyi artırmıştır. Ayrıca metforminin farklı dozlarının 5-FU ve oksaliplatinle kombinasyonlarının sitotoksisteyi üzerine etkisi değerlendirilmiş ve 20 mM ve 40 mM 'lık metformin kombinasyonlarının yalnız 5-FU ve oksaliplatinle göre sitotoksisteyi anlamlı olarak artırarak HT-29 hücrelerinde bu ilaçlarla sinerjistik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen LDH sonuçları MTT testi sonuçlarıyla uyumludur. Çalışmamızda 48 saatlik 10 mM metformin uygulamasının ardından tespit edilen hücre canlılığı %68,6±1,48; hücre ölümü yüzdesi ise %32,5±3,29'tir. Metforminin tek başına ve kombinasyon uygulamalarının tümünde bu sonuç gibi birbirini doğrular sonuçlar elde edilmiştir. HT-29 hücrelerinde metformin ve metformin 5-FU, oksaliplatin kombinasyonlarının oluşturduğu sitotoksistenin LDH testi ile belirlenmesi ile ilgili literatürde kaynak bulunmamaktadır. MTT ve LDH testlerinin ardından metformin ve metforminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonları uygulanan HT-29 hücrelerinin faz invert mikroskopta hücre yoğunluğu ve morfoloji de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede MTT ve LDH bulgularımız mikroskopik görüntülerle desteklenmiştir.

Apoptozun aşırılığı ya da azlığının kanser ya da otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli olması nedeniyle kolay ve çabuk uygulanan yöntemlerle belirlenebilmesi önemlidir (184). Çalışmamızda apoptozu saptamak için öncelikle TUNEL yöntemi kullanılmıştır. TUNEL için HT-29 hücrelerinde metforminin farklı dozları ve bu dozların 5-FU ve oksaliplatinle kombinasyonları 48 saat için uygulanmış, metforminin doz bağımlı apoptotik etki gösterdiği ve 5-FU ve oksaliplatinin apoptotik etkinliklerini artırdığı gözlemlenmiştir. Bulgumuz metforminin HT-29 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisini araştıran başka bir çalışma ile de uyumludur (26). Bu çalışmada metformin 0-10 mM doz aralığında 72 saat

uygulanmış ve Annexin V yöntemi kullanılarak flow sitometri ile HT-29 hücrelerinde apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Annexin V yönteminde nekrotik hücrelerin de zaman zaman işaretlenebilmesi spesifitesini düşürse de flow sitometri ile nekroz ve apoptoz birbirinden ayırt edilebilmektedir (219). Literatürde metforminin ya da metforminin farklı ilaçlarla kombinasyonlarının HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik etkisini TUNEL yöntemi ile değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Farklı kanser hücre kültürü hatlarında ise metforminin apoptotik etkisi TUNEL yöntemi kullanılarak incelenmiş ve metforminin prostat kanseri hücrelerinde (LNCaP, PC3 ve DU145) ve oral skuamöz kanser hücrelerinde (HSC-3, HSC-4) apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. (220, 221).

TUNEL yönteminden sonra ile HT-29 hücrelerinde ELISA yöntemi ile kaspaz-3 düzeylerini ölçerek metforminin apoptotik etkinliğini doğrulanmıştır. Apoptotik sinyal geldiğinde kaspaz-3 enzimi yarılarak alt ünitelerine ayrılır. Bu iki alt ünite kendi arasında tetrametrik bir yapı oluşturarak kaspaz-3 enzimi aktif hale geçer. Aktif hale geçen kaspaz-3'ün ölçümü apoptozu saptamak için kullanılır (222). Kaspaz-3'ün haricinde kaspaz-8'in ölçümü de kolon kanseri hücrelerinde apoptozu belirlemek için kullanılmaktadır (223). Kaspaz-3 aktivasyonun kolorimterik olarak ölçümü deneyi için, HT-29 hücrelerinde metforminin farklı dozları ve bu dozların 5-FU ve oksaliplatinle kombinasyonları 48 saat için uygulanmış ve metformine bağlı olarak HT-29 hücrelerinde kaspaz-3 düzeyini yükselterek apoptotik etki gösterdiği ve 5-FU ve oksaliplatinin apoptotik etkinliklerini artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlarla TUNEL sonuçlarının birbirini doğrular ölçüde olması metforminin HT-29 hücrelerinde apoptotik etkinliği olduğunu düşündürmektedir. Metforminin 5-FU'nun apoptotik etkisini artırdığını doğrulayan, apoptozun Annexin-V kullanılarak flow sitometri ile tespit edildiği, yukarıda daha önce sözünü ettiğimiz bir literatür çalışması bulunmaktadır (23). Bununla birlikte, yine daha önce sözünü ettiğimiz 2014 yılında yapılan bir araştırma metforminin apoptozu indüklediğini de idda etmektedir (215). Bunun nedeni büyük olasılıkla, metforminin seçilen doz aralığıdır. Metforminin apoptoza olan etkisi değerlendirilirken önemli bir nokta da metforminin AMPK/mTOR yolağı gibi kaspazdan bağımsız yollarla da hücreyi ölüme götürebileceğidir (224). Çalışmamızda kaspazdan bağımsız olan bu mekanizma değerlendirilmemiştir. Metforminin gözlemlediğimiz tüm bu etkilerinin yanı sıra

belirtilmesi gereken önemli nokta deneylerde kullanılan dozudur. Bu çalışmada kullanılan dozlar literatürde bildirilen birçok in vitro ve klinik öncesi çalışmada kullanılan dozlarla (1-100 mM) benzerlik gösterse de metforminle tedavi edilen tip 2 diyabet hastalarındaki kan konsantrasyonunun (yaklaşık 50 µM) çok üstünde olduğu unutulmamalıdır (225). Araştırmacılar, bu yüksek dozlarda kullanımında metforminin hücre organellerinde ve dokularda birikebileceğini belirtmişlerdir (225, 226).

Sonuç olarak, çalışmamız metforminin insan kolon kanseri hücrelerinde apoptotik etki gösterdiğini, 5-florourasil ve oksaliplatinin apoptotik etkilerini arttırdığını göstermektedir. Bu açıdan metforminin kolon kanseri tedavisine destek olabilecek bir ilaç olabileceğini düşündürmektedir ancak bu konudaki araştırmaların kapsamı genişletilmeli ve klinik çalışmalarla doğrulukları kanıtlanmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız araştırmanın sonuçlarını aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

1. Metformin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azaltmış ve sitotoksiteyi arttırmıştır. Ayrıca doz bağımlı apoptotik bir etkinlik göstermiştir.

2. Metforminin 5-FU ve oksaliptatin ile kombinasyonlarında bu ilaçlara bağlı sitotoksite artmıştır. Ayrıca metformin 5-FU ve oksaliptatinin HT-29 hücrelerindeki apoptotik etkinliklerinin artmasını sağlamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak metforminin kolon kanseri tedavisine eklenebilecek bir aday molekül olabileceği yorumunu yapabiliriz. Bununla birlikte metforminin bu etkilerini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğinin tam olarak aydınlatılabilmesi için başka bilimsel çalışmalara da gereksinim olduğu açıktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Bailey CJ, Day C.** Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes Int*, **2004**; 21:115.
2. **Del Barco S, Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveras-Ferraros C, Bosch-Barrera J, et al.** Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget*, **2011**; 2: 896–917.
3. **Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F.** Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, **2012 Mar**; 122(6):253-70.
4. **Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H.** Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*, **2003 Apr**; 79(4):956-62.
5. **Glueck CJ, Aregawi D, Agloria M, et al.** Sustainability of 8% weight loss, reduction of insulin resistance, and amelioration of atherogenic-metabolic risk factors over 4 years by metformin-diet in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, **2006 Dec**; 55(12):1582-9.
6. **Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA.** Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell Cycle*, **2010 Mar 15**; 9(6):1057-64.
7. **Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA.** Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care*, **2006**; 29: 254-8.
8. **Landman GW, Kleefstra N, van Haterenm KJJ, Groenier KH, Gans ROB, Bilo HJG.** Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care*, **2010**; 33: 322-6.
9. **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.
10. **Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V.** Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol*, **2009**; 27: 3271–3.
11. **Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, et al.** Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer*, **2010 Sep**; 46(13):2369-80.
12. **M. Bodmer, C. Becker, C. Meier, S. Jick, C. Meier.** Use of metformin and the risk of ovarian cancer: a case–control analysis. *Gynecol Oncol*, **2011**; 123:200–204.
13. **L. Cantrell, C. Zhou, A. Mendivil, K. Malloy, P. Gehrig, V. Bae-Jump.** Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol*, **2010**; 116 (1): 92–98.
14. **Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Viollet B, Thompson CB.** Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *200Cancer Res*, **7 Jul 15**; 67(14):6745-52.
15. **Lee DJ, Kim B, Lee JH et al.** The effect of metformin on responses to chemotherapy and survival instage iv colorectal cancer with diabetes. *KoreanJ Gastroenter*, **2013**; 60:355–361.
16. **Kumar S, Meuter A, Thapa P, Langstraat C, Giri S, Chien J et al.** Metforminin- take is associated with better survival in ovarian cancer:A case-controlstudy. *Cancer*, **2013**; 119:555–562.

17. **Sadeghi N, Abbruzzese JL, Yeung SC, et al.** Metformin use is associated with better survival of diabetic patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, **2012**; 18:2905–2912.
18. **Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, Kawabata S, Fox SD, Dennis PA.** Metformin prevents tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2010**; 3:1066–76.
19. **Jin Ha Lee, Tae Il Kim.** Type II Diabetes, Metformin Use, and Colorectal Neoplasia: Mechanisms of Action and Implications for Future Research. *Current Colorectal Cancer Reports*, **2014**; 10:105-113.
20. **D Hind, P Tappenden, I Tumor, et al.** The use of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed for the treatment of advanced colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, **2008**; Vol. 12: No. 15.
21. **A. de Gramont, A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi.** Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **2000**; 18(16):2938-2947.
22. **G. Gasparini, D. Gattuso, A. Morabito, et al.** Combined therapy with weekly irinotecan, infusional 5-fluorouracil and the selective COX-2 inhibitor rofecoxib is a safe and effective second-line treatment in metastatic colorectal cancer. *Oncologist*, **2005**; 10:710–717.
23. **Zhang Y, Guan M, Zheng Z, Zhang Q, Gao F, et al.** Effects of metformin on CD133+ colorectal cancer cells in diabetic patients. *PLoS One*, **2013**; 8:e81264.
24. **Zhang ZJ, Zheng ZJ, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao G, Kip KE.** Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, **2011 Oct**; 34(10):2323-8.
25. **He J, Wang K, Zheng N, et al.** Metformin suppressed the proliferation of LoVo cells and induced a time-dependent metabolic and transcriptional alteration. *Sci Rep*, **2015 Nov 30**; 5:17423.
26. **Habibollahi P, van den Berg NS, Kuruppu D, Loda M, Mahmood U.** Metformin, an Adjunct Antineoplastic Therapy, Divergently Modulates Tumor Metabolism and Proliferation, Interfering with Early Response Prediction Using 18F-FDG PET Imaging. *J Nucl Med*, **2013 February**; 54(2): 252–258.
27. **Tomimoto A, Endo H, Sugiyama M, Fujisawa T, Hosono K, et al.** Metformin suppresses intestinal polyp growth in ApcMin/+ mice. *Cancer Sci*, **2008**; 99: 2136–2141.
28. **Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al.** Metformin suppresses azoxymethane- induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP- activated protein kinase. *Mol Carcinog*, **2010**; 49:662-671.
29. **Teixeira SF, Guimarães IS, Madeira KP, Daltoé RD, Silva IV, Rangel LBA.** Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. *J Bras Pneumol*, **2013**; 39(6):644-649.
30. **Rattan R, Graham RP, Maguire JL, Giri S, Shridhar V.** Metformin Suppresses Ovarian Cancer Growth and Metastasis with Enhancement of Cisplatin Cytotoxicity *In Vivo*. *Neoplasia (New York, NY)*, **2011**; 13(5):483-491.
31. **Bailey CJ, Day C.** Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*, **1989**; 12:553–564.

32. **B. Gottlieb, W. H. R. Auld.** Metformin In Treatment Of Diabetes Mellitus. *The British Medical Journal*, **1962**; 1:5279-680.
33. **Sterne J.** Du nouveau dans les antidiabetiques. La NN dimethylamine guanyl guanide. *Maroc Med*, **1957**; Sep;36(388):873-884.
34. **Patade GR, Marita AR.** Metformin: A Journey from countryside to the bedside. *J Obes Metab Res*, **2014**; 1(2),127-130.
35. **Spielholz C.** French Liliac:A medicinal plant that led to a key treatment for type-2 diabetes. *NMR News*, **2009**; 2:6.
36. **H. Keen, R. J. Jarrett.** The uses of biguanides in diabetes mellitus. *Postgrad. med. J*, **June 1968**; 44:466-471.
37. **Saxena P, Raghuwanshi S.** UV spectrophotometric method for the quatitation of metformin hydrochloride in pharmaceutical dosage form. *Oriental Journal of Chemistry*, **2010**; 26(4), 1553-1556.
38. **Werner E, Bell J.** The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J Chem Soc, Transactions*, **1921**; 121:1790-5.
39. **Arlt W, Auchus RJ, Miller WL.** Thiazolidinediones but not metformin directly inhibit the steroidogenic enzymes P450c17 and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, **2001 May 18**; 276(20):16767-71.
40. **Campbell RK, White JR Jr, Saulie BA.** Metformin: a new oral biguanide. *Clin Ther*, **1996 May-Jun**; 18(3):360-71.
41. **Sambol NC, Chiang J, O'Conner M, Liu CY, Lin ET, Goodman AM, Benet LZ, Karam JH.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin in healthy subjects and patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol*, **1996 Nov**; 36(11):1012-21.
42. **Scheen AJ.** Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, **1996**; 30(5): 359-369.
43. **Garry G. Graham, Jeroen Punt, Manit Arora, Richard O. Day, Matthew P. Doogue, Janna K, et al.** Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet*, **2011**; 50 (2): 81-980312-5963/11/0002-0081.
44. **Zhou M, Xia L, Wang J.** Metformin transport by a newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine. *Drug Metab Dispos*, **2007**; 35:1956-1962.
45. **Hou W, Zhang D, Lu W, Zheng T, Wan L, Li Q, Bao Y, Liu F, Jia W.** Polymorphism of Organic Cation Transporter 2 Improves Glucose-Lowering Effect of Metformin via Influencing Its Pharmacokinetics in Chinese Type 2 Diabetic Patients. *Molecular diagnosis and therapy*, **2015 Feb**; 19(1):25-33.
46. **Chen S, Zhou J, Xi M, et al.** Pharmacogenetic variation and metformin response. *Curr Drug Metab*, **2013 Dec**; 14(10):1070-82.
47. **Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE.** Metformin pathways: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*, **2012 Nov**; 22(11):820-7.

48. **Rojas J, Chávez-Castillo M, Torres W, Arraiz N, Cabrera M, Bermúdez V.** Metformin in cancer: Chemical pathways for tumoral control independent of AMP dependent kinase. *J Endocrinol Diabetes Obes*, **2014**; 2(2):1036.
49. **Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, **2001**; 108:1167–1174.
50. **Carlson, C. A. and Kim, K. H.** Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem*, **1973**; 248, 378-380.
51. **Beg, Z. H., Allmann, D.W. and Gibson, D. M.** Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1973**; 54, 1362-1369.
52. **Carling, D., Zammit, V. A. and Hardie, D. G.** A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*, **1987**; 223, 217-222.
53. **Cantó C, Auwerx J.** AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci*, **2010 Oct**;67(20):3407-23.
54. **Towler MC, Hardie DG.** AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*, **2007 Feb 16**; 100(3):328-41.
55. **Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ.** Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, **2007**; 449:496–500.
56. **Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D.** Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade *Biochem J*, **2007 Apr 1**; 403(1):139-48.
57. **Almabrouk TA, Ewart MA, Salt IP, Kennedy S.** Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *Br J Pharmacol*, **2014 Feb**; 171(3):595-617.
58. **Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK.** AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes*, **2014 Jun 24**; 7:241-53.
59. **Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F.** Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **2009 Jan 1**; 14:3380-400.
60. **Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG.** Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **1996**; 271:27879–27887.
61. **Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, **2003**; 2:28. 14.
62. **Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR.** Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *Embo J*, **2005**; 24:1810–1820.

63. **Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC.** The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*, **2005**; 310:1642–1646.
64. **Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D.** Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, **2005**; 2:21–33.
65. **Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG.** Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, **2005**; 2:9–19.
66. **Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW.** 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, **1999**; 48:1667–1671.
67. **Hardie DG, Pan DA.** Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans*, **2002**; 30:1064–1070.
68. **Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I.** Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J*, **2003 Oct 1**; 375(Pt 1):1-16.
69. **Hardie DG, Hawley SA, Scott JW.** AMP-activated protein kinase-- development of the energy sensor concept. *J.Physiol*, **2006**; 574:7-15.
70. **Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, Giri S, Andreelli F.** AMPK inhibition in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **2010 Aug**; 45(4):276-95.
71. **Cheng AY, Fantus IG.** Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*, **2005 Jan 18**; 172(2):213-26.
72. **Bogardus, C.** Metabolic abnormalities in the development of noninsulin- dependent diabetes mellitus. In Diabetes mellitus. D. LeRoith, S.I. Taylor, and J.M. Olefski, editors. *Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, PA, 1996*; 459 pp.
73. **Hundal RS, Krssak M, Dufour S, et al.** Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*, **2000**; 49: 2063-9.
74. **Argaud D, Roth H, Wiernsperger N, et al.** Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, **1993**; 213:1341-8.
75. **Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pégurier JP.** Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. **2001 Aug 15**; 62(4):439-46.
76. **Gunton JE, Delhanty PJD, Takasahi SI, Baxter RC.** Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *JCEM*, **2003**; 88(3):1323-32.
77. **Rena G, Pearson ER, Sakamoto K.** Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*, **2013 Sep**; 56(9):1898-906.
78. **Wulffele MG, Kooy A, De Zeeuw D, et al.** The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *J Intern Med*, **2004**; 256: 1-14.

79. **Harmancı A, Gürlek A.** Eski ilaç, Eski ve Yeni Kullanımları: Metformin. *İç Hastalıkları Dergisi*, **2005**; 12(1):029-037.
80. **Pagano G, Tagliaferro V, Carta Q, et al.** Metformin reduces insulin requirement in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, **1983**; 24: 351-4.
81. **Kelly CJ, Gordon D.** The effect of metformin on hirsutism in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*, **2002 Aug**; 147(2):217-21.
82. **Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, et al.** Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: A prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*, **1999**; 84:165-9.
83. **Bargiota A, Diamanti-Kandarakis E.** The effects of old, new and emerging medicines on metabolic aberrations in PCOS. *Ther Adv Endocrinol Metab*, **2012 Feb**; 3(1):27-47.
84. **Santana LF, de Sá MFS, Ferriani RA, de Moura MD, Foss MC, dos Reis RM.** Effect of metformin on the clinical and metabolic assessment of women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol*, **2004**; 19(2): 88–96.
85. **Johnson NP.** Metformin use in women with polycystic ovary syndrome. *Ann Transl Med*, **2014 Jun**; 2(6):56.
86. **la Marca A, Morgante G, Palumbo M, Cianci A, Petraglia F, De Leo V.** Insulin-lowering treatment reduces aromatase activity in response to follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, **2002 Dec**; 78(6):1234-9.
87. **Ashrafi M, Sheikhan F, Arabipoor A, et al.** Gestational diabetes mellitus risk factors in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2014 Oct**; 181:195-9.
88. **Hawthorne G.** Metformin use and diabetic pregnancy—has its time come? *Diabet Med*, **2006 Mar**; 23(3):223-7.
89. **Balkan F.** Metabolik Sendrom. *Ankara Medical Journal*, **2013**; 13(2):85-90.
90. **Lim S, Eckel RH.** Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*, **2014 Dec**; 15(4):329-41.
91. **Lawson AA, Strong JA, Peattie P, Roscoe P, Gibson A.** Comparison of fenfluramine and metformin in treatment of obesity. *Lancet*, **1970**; 2:437-441.
92. **Giugliano D, De Rosa N, Di Maro G, et al.** Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women. *Diabetes Care*, **1993**; 16:1387-1390.
93. **Fontbonne A, Charles MA, Juhan-Vague I, et al.** The effect of metformin on the metabolic abnormalities associated with upper-body fat distribution. BIGPRO Study Group. *Diabetes Care*, **1996**; 19:920-926.
94. **Paolisso G, Amato L, Eccellente R, et al.** Effect of metformin on food intake in obese subjects. *Eur J Clin Invest*, **1998**; 28:441-446.
95. **Charles MA, Morange P, Eschwege E, et al.** Effect of weight change and metformin on fibrinolysis and the von Willebrand factor in obese nondiabetic subjects: the BIGPRO1 Study. Biguanides and the Prevention of the Risk of Obesity. *Diabetes Care*, **1998**; 21:1967-1972.

96. **Morel Y, Golay A, Perneger T, et al.** Metformin treatment leads to an increase in basal, but not insulin-stimulated, glucose disposal in obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabet Med*, **1999**; 16:650-655.
97. **Charles MA, Eschwege E, Grandmottet P, et al.** Treatment with metformin of non-diabetic men with hypertension, hypertriglyceridaemia and central fat distribution: the BIGPRO 1.2 trial. *Diabetes Metab Res Rev*, **2000**; 16:2-7.
98. **Lehtovirta M, Forsen B, Gullstrom M, et al.** Metabolic effects of metformin in patients with impaired glucose tolerance. *Diabet Med*, **2000**; 18:578-583.
99. **Kantola I, Rouru J, Malmiemi K, Arkkila P, Huupponen R.** Effect of metformin on blood pressure-A study in obese non-diabetic patients with hypertension. *Clinical Drug Investigation*, **2002**; 22:347-354.
100. **Park MH, Kinra S, Ward KJ, White B, Viner RM.** Metformin for obesity in children and adolescents: a systematic review. *Diabetes Care*, **2009**; 32: 1743-5.
101. **Katsiki N, Mikhailidis DP, Gotzamani-Psarrakou A, Yovos JG, Karamitsos D.** Effect of various treatments on leptin, adiponectin, ghrelin and neuropeptide Y in patients with type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets*, **2011**; 15: 401-20.
102. **Weickert MO, Hodges P, Tan BK, Randeve HS.** Neuroendocrine and endocrine dysfunction in the hyperinsulinemic PCOS patient: the role of metformin. *Minerva Endocrinol*, **2012**; 37: 25-40.
103. **Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR.** Metformin:an update. *Ann Intern Med*, **2002 Jul 2**; 137(1):25-33.
104. **Grant PJ, Stickland MH, Booth NA, Prentice CR.** Metformin causes a reduction in basal and post-venous occlusion plasminogen activator inhibitor-1 in type-2 diabetic patients. *Diabet Med*, **1991**; 8:361-5.
105. **Nagi DK, Yudkin JS.** Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups. *Diabetes Care*, **1993 Apr**; 16(4):621-9.
106. **Marfella R, Acampora R, Verrazzo G, Ziccardi P, De Rosa N, Giunta R, Giugliano D.** Metformin improves hemodynamic and rheological responses to L-arginine in NIDDM patients. *Diabetes Care*, **1996**; 19:934-939.
107. **Petersen JS, DiBona GF.** Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **1996**; 27:619-625.
108. **Giugliano D, Quatraro A, Consoli G, Minei A, Ceriello A, De Rosa N, D'Onofrio F:** Metformin for obese, insulintreated diabetic patients: improvement in glycaemic control and reduction of metabolic risk factors. *Eur J Clin Pharmacol*, **1993**; 44:107-112.
109. **Klachko D, Whaley-Connell A:** Use of metformin in patients with Kidney and Cardiovascular Diseases. *Cardiorenal Med*, **2011 May**; 1(2): 87-95.
110. **Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD.** Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, **2005**; 330: 1304-1305.
111. **Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM.** 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.

112. **Lee MS, Hsu CC, Wahlqvist ML, Tsai HN, Chang YH, Huang YC.** Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. *BMC Cancer*, **2011 Jan 18**; 11:20.
113. **Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S.** Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2010 Nov**; 3(11):1451-61.
114. **Pulito C, Donzelli S, Muti P, Puzzo L, Strano S, Blandino G.** microRNAs and cancer metabolism reprogramming: the paradigm of metformin. *Ann Transl Med*, **2014 Jun**; 2(6):58.
115. **Hay N, Sonenberg N.** Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, **2004 Aug 15**; 18(16):1926-45.
116. **Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N.** Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res*, **2007 Nov 15**; 67(22):10804-12.
117. **Han G, Gong H, Wang Y, Guo S, Liu K.** AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. *Cancer Biol Ther*, **2015 Jan 2**; 16(1):77-87.
118. **Honjo S, Ajani JA, Scott AW, Chen Q, et al.** Metformin sensitizes chemotherapy by targeting cancer stem cells and the mTOR pathway in esophageal cancer. *Int J Oncol*, **2014 Aug**; 45(2):567-74.
119. **Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, et al.** Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*, **2010**; 11:390-401.
120. **Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M.** Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*, **2006 Nov 1**; 66(21):10269-73.
121. **LeRoith D, Roberts CT Jr.** Insulin-like growth factors and cancer. *Cancer Lett*, **2003 Jun 10**; 195(2):127-37.
122. **Karnevi E, Said K, Andersson R, Rosendahl AH.** 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.
123. **Sarfstein R, Friedman Y, Attias-Geva Z, Fishman A, Bruchim I, Werner H.** Metformin downregulates the insulin/IGF-I signaling pathway and inhibits different uterine serous carcinoma (USC) cells proliferation and migration in p53-dependent or -independent manners. *PLoS One*, **2013 Apr 19**; 8(4):e61537.
124. **Li D.** Metformin as an antitumor agent in cancer prevention and treatment. *J Diabetes*, **2011 Dec**; 3(4):320-7.
125. **Cantoria MJ, Boros LG, Meuillet EJ.** Contextual inhibition of fatty acid synthesis by metformin involves glucose-derived acetyl-CoA and cholesterol in pancreatic tumor cells. *Metabolomics*, **2014**; 10:91-104.
126. **Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA.** 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.

127. Nelson LE, Valentine RJ, Cacicedo JM, et al. A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPKSIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose-exposed HepG2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2012**; 303:C4-13. 31.
128. Cerezo M, Tichet M, Abbe P, et al. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/ p53-dependent manner. *Mol Cancer Ther*, **2013**; 12:1605-15.
129. Li P, Zhao M, Parris AB, Feng X, 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.
130. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. The active form of the metabolic sensor: AMP-activated protein kinase (AMPK) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. *Cell Cycle*, **2009**; 8: 2385-2398.
131. Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, and Menendez JA. Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells. *Cell Cycle*, **2009**; 8(10):1633-6.
132. Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osorio-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, Saad MJ, Carnevali JB. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin. Cancer Res*, **2011**; 17(12):3993-4005.
133. Zhang DA, Meng FJ, Zhou J, Ma P, Song XG, Cao J. Effect of Metformin on Proliferation, Differentiation and Apoptosis of THP-1 Cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, **2015 Jun**; 23(3):633-6.
134. Leclerc GM, Leclerc GJ, Kuznetsov JN, DeSalvo J, Barredo JC. Metformin Induces Apoptosis through AMPK-Dependent Inhibition of UPR Signaling in ALL Lymphoblasts. *PLoS One*, **2013 Aug 23**; 8(8):e74420.
135. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis*, **2011 Sep 1**; 2:e199.
136. Solano ME, Sander V, Wald MR, Motta AB. Dehydroepiandrosterone and metformin regulate proliferation of murine T lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, **2008**; 153(2):289-296.
137. Algire C, Moiseeva O, Deschenes-Simard X, et al. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev. Res*, **2012**; 5,536–543.
138. Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res*, **2011**; 71:4366-72.
139. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, et al. Metformin Inhibits Growth of Human Glioblastoma Cells and Enhances Therapeutic Response. *PLoS One*, **2015**; 10(4): e0123721.
140. Teixeira SF, Guimarães IS, Madeira KP, Daltoé RD, Silva IV, Rangel LBA. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. *J Bras Pneumol*, **2013**; 39(6):644-649.
141. Chan DK, Miskimins WK. Metformin and phenethyl isothiocyanate combined treatment in vitro is cytotoxic to ovarian cancer cultures. *J Ovarian Res*, **2012 Jul 10**; 5(1):19.

142. **Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, et al.** A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, **2015 Mar**; 14(1):1-10.
143. **Cho YH, Ko BM, Kim SH, Myung YS, et al.** Does Metformin Affect The Incidence of Colonic Polyps and Adenomas in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus? *Intest Res*, **2014 Apr**; 12(2):139-45.
144. **Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM.** New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **2009**; 32:1620-5.
145. **Lee MS, Hsu CC, Wahlqvist ML, Tsai HN, Chang YH, Huang YC.** Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. *BMC Cancer*, **2011 Jan 18**; 11:20.
146. **Lee JH, Kim TI, Jeon SM, Hong SP, Cheon JH, Kim WH.** The effects of metformin on the survival of colorectal cancer patients with diabetes mellitus. *Int J Cancer*, **2012 Aug 1**; 131(3):752-9
147. **Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al.** Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2010**; 3: 1077-1083
148. **Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN.** The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2008 Oct**; 1(5):369-75.
149. **Longley DB, Harkin DP, Johnston G.** 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, **2003**; 3:330-8.
150. **Dushinsky, P., Heidelberger, C.** The synthesis of 5- flouropyrimidines. *J. Am. Chem. SOC*, **1957**; 79:4559.
151. **Paci A, Veal G, Bardin C, Levêque D, Widmer N, Beijnen J, Astier A, Chatelut E.** Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1—cytotoxics. *Eur J Cancer*, **2014 Aug**; 50(12):2010-9.
152. **Miura K, Kinouchi M, Ishida K, Fujibuchi W, et al.** 5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs. *Cancers (Basel)*, **2010 Sep 17**; 2(3):1717-30.
153. **Shahrokni A, Rajebi MR, Saif MW.** Toxicity and efficacy of 5-fluorouracil and capecitabine in a patient with TYMS gene polymorphism: A challenge or a dilemma? *Clin Colorectal Cancer*, **2009 Oct**; 8(4):231-4.
154. **Nagasaki T, Tsuchiya T, Tagawa T, Honda S, et al.** Analysis of 5-fluorouracil-related enzymes in pulmonary neuroendocrine carcinoma: differences in biological properties compared to epithelial carcinoma. *Clin Lung Cancer*, **2010 Nov 1**; 11(6):412-22.
155. **Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P.** Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov*, **2004 Jan**; 3(1):11-2.
156. **Simpson D, Dunn C, Curran M, Goa KL.** Oxaliplatin: a review of its use in combination therapy for advanced metastatic colorectal cancer. *Drugs*, **2003**; 63(19):2127-56.
157. **Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E.** Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res*, **2000 Apr**; 6(4):1205-18.

158. **Misset JL.** Oxaliplatin in practice. *Br J Cancer*, **1998 Jun**; 77 Suppl 4:4-7.
159. **Hoff PM, Saad ED, Costa F, Coutinho AK, Caponero R, Prolla G, Gansl RC.** Literature review and practical aspects on the management of oxaliplatin-associated toxicity. *Clin Colorectal Cancer*, **2012 Jun**; 11(2):93-100.
160. **Raymond E, Lawrence R, Izbicka E, Faivre S, Von Hoff DD.** Activity of oxaliplatin against human tumor colony-forming units. *Clin Cancer Res*, **1998 Apr**; 4(4):1021-9.
161. **Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, Johnston PA, Perry W 3rd, Dantzig AH.** The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol Cancer Ther*, **2005 May**; 4(5):855-63.
162. **Esteban-Fernández D, Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM.** Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. *Metallomics*, **2010 Jan**; 2(1):19-38.
163. **Yazır Y, Dalçık H.** Vasküler patolojilerin araştırılmasında önemli bir araç: endotel hücre kültürü (An important method in the investigation of vascular pathologies: endothelial cell culture). *Koşuyolu Kalp Dergisi*, **2012**; 15(3):137-142.
164. **S. P. Langdon.** Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2001**.
165. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Eds.).** Some Landmarks in the Development of Tissue and Cell Culture. Molecular Biology of the Cell, 4th edition, 2002.
166. **Aldemir B.A.** Farklı irrigasyon solüsyonlarının sitotoksitelerinin hücre kültürü yöntemi ile karşılaştırılması olarak incelenmesi. Doktora tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, **2009**: 91s.
167. **Yard. Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN.** Memeli Hücre ve Doku Kültürü Ders Notu. İstanbul Üniversitesi, Fen fakültesi, Biyoloji Bölümü. Erişim Tarihi: 23.03.2015.
168. **Arıkan H.** İnsan korpus kavernozum hücre kültürü oluşturulması. Uzmanlık tezi, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı*, İzmir, **2008**: 52s.
169. **Akçalı A.** Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, **2010**; 25(3):119-123.
170. **Fogh J.** Human Tumor Cell In Vitro. *Plenum Press: New York, USA*, **1975**.
171. **Forgue-Lafitte ME, Coudray AM, Bréant B, Mester J.** Proliferation of the human colon carcinoma cell line HT29: autocrine growth and deregulated expression of the c-myc oncogene. *Cancer Res*, **1989 Dec 1**;49(23):6566-71.
172. **Grajek W, Olejnik A.** Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Pol. J. Food Nutr. Sci*, **2004**; Vol. 13/54, SI 1, pp. 5–24.
173. **Kawai K, Viars C, Arden K, Tarin D, Urquidi V, Goodison S.** Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer*, **2002 May**; 34(1):1-8.
174. Web (2014) ATCC. <https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Global/Products/C/1/4/B/HTB-38.aspx?slp=1#characteristics> Erişim tarihi: 01.04.2015.
175. **Baines CP.** Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol*, **2010 Nov 29**; 1:156.

176. **Öktem S, Özhan MH, Özol D.** Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**; 2(1):91-95
177. **Golstein P, Kroemer G.** Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, **2007**; 32:37-43.
178. **Coşkun G, Özgür H.** Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **2011**; 20: 145.
179. **Nicotera P, Bernassola F, Melino G.** Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, **2004**; 23:2757-2765.
180. **G. Majno and I. Joris.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, **1995 Jan**; 146(1): 3–15.
181. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **1972 Aug**; 26(4):239-57.
182. **Yılmaz İ.** Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi. *T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği*, İstanbul. **2005**; 69s.
183. **Solakoğlu Z.** Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, **2009**; 22(3): 20-25.
184. **Koçyiğit A, Çevik M.** Memeli reproduktif dokuları, gamet hücreleri ve embriyolarında apoptozis. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, **2011**; 8(1) 33-41.
185. **Hung RW, Chow AW.** Apoptosis: Molecular mechanisms, regulation and role in pathogenesis. *Can J Infect Dis*, **1997 Mar**; 8(2):103-9.
186. **Prof. Dr. Engin Ulukaya.** Apoptozis Ders Notu. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü. Erişim Tarihi: 25.03.2015.
187. **Philchenkov A.** Caspases: Potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med*, **2004**; 8:432–444.
188. **Güleş Ö, Eren Ü.** Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2008**; (2):73-78.
189. **Van der Meer FJ, Faber DJ, Aalders MC, Poot AA, Vermes I, van Leeuwen TG.** Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. *Lasers Med Sci*, **2010 Mar**; 25(2):259-67.
190. **Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaçık D.** Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **Ekim 2011**; 2(4):184-194.
191. **Şimşek F, Vatansver S.** Apoptotik ve otofajik ölümlerde hücre içi organizasyon. *Yeni Tıp Dergisi*, **2014**; 31:6-11.
192. **Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, et al.** Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **2013 Feb**; 61(1):43-58.
193. **Mary C. Phelan.** Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, **1998**; 1.1.1-1.1.10.

194. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**; 65:55–63.
195. **Beytur A, Tekin S, Keleştimur T, Ergin Z, Sandal S.** Yeni sentezlenen bir tiyosemikarbazon türevinin prostat kanseri hücre kültürleri üzerine antikanserojenik özelliklerinin belirlenmesi: in vitro bir çalışma. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.*, **2011**; 25 (1): 25–32.
196. **Tuncer S, Demirci M,** Dental materyallerde biyoyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **2011**; 21:141-149.
197. **Şener A, Çevik Ö, Özşavcı D, Yanıkaya-Demirel G.** Demir (III) varlığında trombosit gama-glutamil transferazının pro-oksidan etkisi. *Marmara Eczacılık Dergisi*, **2011**; 15:30-37.
198. **Karakoyun ÖÇ, Aras A, Tuğan D, Hekimgil M, Yalman D, Esassolak M, Haydaroğlu A.** Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi. *Türkiye klinikleri tıp bilimleri dergisi*, **2004**; 24(2):142-6.
199. **Brufani C, Fintini D, Nobili V, Patera PI, Cappa M, Brufani M.** Use of metformin in pediatric age. *Pediatr Diabetes*, **2011 Sep**; 12(6):580-8.
200. **Pernicova I, Korbonits M.** Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*, **2014 Mar**; 10(3):143-56.
201. **Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F Jr.** Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev*, **2009 Feb**; 30(1):1-50.
202. **Ahmed RH, Huri HZ, Al-Hamodi Z, Salem SD, Muniandy S.** Serum levels of soluble cd26/dipeptidyl peptidase-iv in type 2 diabetes mellitus and its association with metabolic syndrome and therapy with antidiabetic agents in malaysian subjects. *PLoS One*, **2015 Oct**; 16;10(10):e0140618.
203. **Miles JM, Rule AD, Borlaug BA.** Use of metformin in diseases of aging. *Curr Diab Rep*, **2014 Jun**; 14(6): 490.
204. **Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al.** Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*, **2013**; 4:2192.
205. **Jara JA, López-Muñoz R.** Metformin and cancer: Between the bioenergetic disturbances and the antifolate activity. *Pharmacol Res*, **2015 Nov**; 101:102-8.
206. **Pryor R, Cabreiro F.** Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J*, **2015 November 1**; 471(Pt 3): 307–322.
207. **Tseng CH.** Diabetes but not insulin is associated with higher colon cancer mortality. *World J Gastroenterol*, **2012 August 21**; 18(31): 4182-4190.
208. **Lin C, Ng HL, Pan W, et al.** Exploring Different Strategies for Efficient Delivery of Colorectal Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, **2015 Nov 11**; 16(11):26936-52.
209. **Tolba MF, Abdel-Rahman SZ.** Pterostilbine, an active component of blueberries, sensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil cytotoxicity. *Sci Rep*, **2015 Oct 16**; 5:15239.
210. **Montales MT, Simmen RC, Ferreira ES, Neves VA, Simmen FA.** Metformin and soybean-derived bioactive molecules attenuate the expansion of stem cell-like epithelial subpopulation and confer apoptotic sensitivity in human colon cancer cells. *Genes Nutr*, **2015 Nov**; 10(6):49.
211. **Moon HS, Mantzoros CS.** Adiponectin and metformin additively attenuate IL1 β -induced malignant potential of colon cancer. *Endocr Relat Cancer*, **2013 Oct 24**; 20(6):849-59.

212. **Yıldırım Biçer AZ.** Seromer esaslı iki farklı indirekt kompozit materyalin sitotoksik etkilerinin in vitro değerlendirilmesi. *GÜ Diş Hek Fak Derg*, **2011**; 28(2): 69-74.
213. **Jia Y, Ma Z, et al.** Metformin prevents DMH-induced colorectal cancer in diabetic rats by reversing the warburg effect. *Cancer Med*, **2015 Nov**; 4(11):1730-4.
214. **Terzioğlu G, Keskin AÜ, Yanıkkaya Demirel G.** Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turk J Immunol*, **2013**; 1(3):74-89.
215. **Sui X, Xu Y, Yang J, et al.** Use of Metformin Alone Is Not Associated with Survival Outcomes of Colorectal Cancer Cell but AMPK Activator AICAR Sensitizes Anticancer Effect of 5-Fluorouracil through AMPK Activation. *PLoS One*, **2014 May 21**; 9(5):e97781.
216. **Nangia-Makker P, Yu Y, Vasudevan A, Farhana L, Rajendra SG, et al.** Metformin: A Potential Therapeutic Agent for Recurrent Colon Cancer. *PLoS ONE*, **2014**; 9(1): e84369.
217. **Fotakis G, Timbrell JA.** In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, **2006 Jan 5**; 160(2):171-7.
218. **Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A.** A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm*, **2005 Jan 20**; 288(2):369-76.
219. **Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ.** Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, **2008**; 44(3):235-40.
220. **Tsutsumi Y, Nomiyama T, Kawanami T, et al.** Combined Treatment with Exendin-4 and Metformin Attenuates Prostate Cancer Growth. *PLoS One*, **2015 Oct 6**; 10(10):e0139709.
221. **Wang L, Wang Z, Zhao X, Ji N, Zhou Y, Li J.** The inhibitory effect of metformin on oral squamous cell carcinoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **2015 Jun**; 50(6):360-5.
222. **Chang YH, Yang X.** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2000**; 64(4):821-46.
223. **Gurbuz V, Yilmaz A, Gokçe Ö, Konac E.** İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında (HT29) Sisplatin'in Apoptotik Etkisi. *Marmara Medical Journal*, **2011**; 24 (2):100-105.
224. **Han G, Gong H, Wang Y, Guo S, 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.
225. **Patel S, Kumar L, Singh N.** Metformin and epithelial ovarian cancer therapeutics. *Cell Oncol*, **2015**; 38:365–375.
226. **Owen MR, Doran E, Halestrap AP.** Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*, **2000 Jun 15**; 348 Pt 3:607-14.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ezgi BOZKURT, 15.06.1988 tarihinde Ankara’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden Haziran 2012’de mezun oldu. Şubat 2013’te Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde ÖYP araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Mart 2013-Eylül 2013 tarihleri arasında Orta Doğu Teknik Üniversitesinde yüksek lisans öncesi İngilizce dil eğitimi aldı. Eylül-2013’te Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Ocak-2016’da yüksek lisans öğrenimini tamamladı.

