

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİNİN BAZI KEMOTERAPÖTİK İLAÇLARLA
ETKİLEŞMESİNİN *İN VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kim. Ayşe Zeynep ÜNAL

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2016**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİNİN BAZI KEMOTERAPÖTİK İLAÇLARLA
ETKİLEŞMESİNİN *İN VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kim. Ayşe Zeynep ÜNAL

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

**ANKARA
2016**

ONAY SAYFASI

Metforminin Bazı Kemoterapötik İlaçlarla Etkileşiminin *in vitro* Olarak

Değerlendirilmesi

Kim. Ayşe Zeynep ÜNAL

Bu çalışma 29.12.2016 tarihinde, jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hilal ÖZGÜNEŞ
(Hacettepe Üniversitesi)



Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr. Gözde GİRGİN
(Hacettepe Üniversitesi)

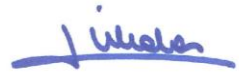


Üye: Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ
(Ankara Üniversitesi)



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- Tezimin/Raporumuntarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

12/01/2017


Ayşe Zeynep ÜNAL

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ayşe Zeynep ÜNAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek bilgi, beceri ve tecrübeleriyle gerekse manevi olarak bu çalışmanın ortaya çıkmasında her türlü desteği, ilgiyi ve sabrı gösteren çok sevgili tez danışmanım **Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**'na,

Deneylerimi yaparken herhangi bir sorunla karşılaştığımda büyük bir içtenlikle yardımcı olup yol gösteren sevgili arkadaşım **Ecz. Duygu PASLI**'ya,

Bu yorucu süreçte bana manevi olarak her zaman destek veren **Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL**, **Uzm. Ecz. Ünzile YAMAN SUR**, **Ecz. Kübra Gizem YILDIZTEKİN** ve **Uzm. Bio. Özge KÖSE**'ye,

Eğitimime katkıda bulunan **Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine**,

Yapılan bazı ölçümlerde yardım ve olanak sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi**'ne

Her daim arkamda olan, destek ve dualarını esirgemeyen **Canım Ailem**'e ve her zaman yanımda duran, bana hep moral ve destek veren **Sevgili Arkadaşlarım**'a tüm saygı ve sevgilerimle teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 8043 numaralı hızlı destek projesi ile desteklenmiştir

ÖZET

Ünal, A.Z. Metforminin bazı kemoterapötik ilaçlarla etkileşiminin *in vitro* olarak değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016.

Metformin, tip 2 diabetes mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan, bir oral antidiyabetik ilaçtır. Diyabet hastalarında, kanser de dahil farklı patolojilerin gelişim riskinin sağlıklı kişilere oranla fazla olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda, farklı biyolojik özellikleri olduğu gösterilen metforminin kanser ilaçları ile birlikte alındığında ilaçların etkilerini arttırabildiği gibi azaltabileceğine ilişkin çelişkili çalışma verileri bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, metforminin farklı mekanizmalarla etki gösteren bazı kemoterapötik ilaçlarla (doksorubisin, sisplatin, ve gemsitabin) birlikte kullanıldığında meydana gelebilecek olası etkileşmelerin *in vitro* olarak iki farklı kanser hücre hattında (HepG2 ve Hep2) belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, metformin ve sitotoksik ilaçlar tek başlarına ve kombine halde hücre hatlarına uygulanmıştır. Hücrelerde, hücre canlılığı, apoptoz ve hücre çoğalmasının gerçek zamanlı izlemesi değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı ve hasarı 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür ve laktat dehidrogenaz salınımı testleri kullanılarak; apoptotik ve nekrotik hücre oranları floresans tarafından aktive edilmiş hücre sıralaması, akım sitometride ve gerçek zamanlı hücre hareketleri ise XCELLigence'ta değerlendirilmiştir. Yapılan ön çalışmalar ile sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılacak dozlar (Hep2 hücre hattında, doksorubisin 100-0,8 µM, sisplatin 100-0,8 µM, gemsitabin 100-0,8 µM, metformin 1-10 mM; HepG2 hücre hattında doksorubisin 0,08- 3,2x10⁻³ µM, sisplatin 2,0-0,08 µM, gemsitabin 0,4-0,016 µM, metformin 10-0,04 mM) ve maruziyet süresi (48 saat) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kullanılan analiz yöntemi, hücre hattı ve kullanılan doza bağlı olarak farklılıklar gösterse de metforminin sitotoksik ilaçlarla olan kombinasyonunun, genel olarak ilaçların etkisini arttırabildiği görülmüştür. Sonuç olarak, metformin kullanan diyabetli kanser hastalarında olası ilaç etkileşmelerinin iyi değerlendirilmesi insan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Etkileşme mekanizmasının tam olarak ortaya konabilmesi için daha geniş mekanistik çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metformin, doksorubisin, sisplatin, gemsitabin, ilaç etkileşmesi

ABSTRACT

Unal, A.Z. In vitro valuation of interaction between metformin and several chemotherapeutic drugs. Hacettepe University Health Sciences Institute Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2016. Metformin is an oral antidiabetic drug widely used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. It is stated that diabetes patients have a higher risk of developing different pathologies including cancer than healthy individuals. There are conflicting studies about commonly used metformin that have different biological properties and when taken with cancer chemotherapeutics, it can increase or reduce the effects of them. In this thesis study, it was aimed to determine the possible interactions of metformin being used together with certain chemotherapeutic drugs [doxorubicin, cisplatin and gemcitabine] that have different mechanisms as in vitro in two different cancer cell lines (HepG2 and Hep2). For this purpose, metformin and cytotoxic drugs were applied to cell lines individually and together. In cells, real-time monitoring of cell viability, apoptosis and cell proliferation has been evaluated. Cell viability and damage was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and lactate dehydrogenase release assays. Apoptotic and necrotic cell ratios were determined by fluorescence-activated cell sorting in flow cytometry and real-time cell motions were evaluated at XCELLigence. In the preliminary studies, the doses to be applied (in the Hep2 cell line doxorubicin 100-0.8 μM , cisplatin 100-0.8 μM , gemcitabine 100-0.8 μM , metformin 1-10 mM; in the HepG2 cell line doxorubicin 0.08-3.2x10⁻³ μM , cisplatin 2.0-0.08 μM , gemcitabine 0.4-0.016 μM , metformin 10-0.04 mM) and the duration of exposure (48 hours) was determined for cytotoxic evaluations. In general, it has been observed that the combination of metformin and cytotoxic drugs may increase the effect of the drugs, in spite of, the differences in the results depending on the method of analysis, the cell line and the dosage applied. In conclusion, the evaluation of the possible interactions between cancer chemotherapeutics and metformin in diabetic cancer patients is important for human health. More extensive mechanistic research is needed in order to demonstrate the exact mechanism of interaction.

Keywords: Metformin, doxorubicin, cisplatin, gemcitabine, drug interaction

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xi |
| ŞEKİLLER | xiii |
| TABLolar | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1 Metformin | 3 |
| 2.1.1. Metforminin <i>Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri</i> | 4 |
| 2.1.2. Metforminin Antidiyabetik Etki Mekanizması | 5 |
| 2.1.3. Metforminin Kardiyovasküler Sistemi Koruyucu Etkisi | 7 |
| 2.1.4. Metforminin Antitümoral Etkisi | 8 |
| 2.1.5. Metforminin Yaşlanmaya Karşı Koruyucu Etkisi | 9 |
| 2.2. DOKSORUBİSİN | 10 |
| 2.3. SİSPLATİN | 13 |
| 2.4. GEMSİTABİN | 15 |
| 2.5. SİTOTOKSİK İLAÇLAR VE METFORMİN ÜZERİNE YAPILAN BİLİMSEL ÇALIŞMALAR | 17 |
| 3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER | 22 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 22 |
| 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler | 23 |
| 3.3. Çözeltilerin Hazırlanması | 26 |
| 3.4. Yöntemler | 29 |
| 3.4.1. Hücre Kültürü | 29 |
| 3.4.2. Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi | 29 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.3. Maruziyet Dozlarının Belirlenmesi | 30 |
| 3.4.4. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) Testi | 31 |
| 3.4.5. LDH Salınımı Analizi | 33 |
| 3.4.6. Floresans Tarafından Aktive Edilmiş Hücre Sıralaması (FACS) Analizi | 34 |
| 3.4.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (XCELLigence) | 36 |
| 3.4.8. İstatistiksel Değerlendirme | 37 |
| 4. BULGULAR | 38 |
| 4.1. MTT Testi ile Elde Edilen Hücre Canlılığı Sonuçları | 38 |
| 4.1.1. Sitotoksik İlaçların IC ₅₀ Değerleri | 38 |
| 4.1.2. MET'in Kemoterapötik İlaçların Sitotoksisiteleleri Üzerine Etkisi | 40 |
| 4.2. LDH Salınımı Testi ile Hücre Canlılığı Sonuçları | 49 |
| 4.3. Floresans tarafından Aktive Edilmiş Hücre Sıralaması (FACS) ile Annexin V / Propidium İyodür Apoptoz Testi Sonuçları | 57 |
| 4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (XCELLigence) Sonuçları | 72 |
| 5. TARTIŞMA | 84 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 91 |
| 7. KAYNAKLAR | 93 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ | 106 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|------------------------|---------------------------------------------------------|
| A549 | İnsan akciğer kanser hücresi |
| AICAR | 5-aminoimidazol-4karboksamit ribonükleotit |
| AMPK | Adenozin monofosfat ile aktifleştirilmiş protein kinazı |
| ANOVA | Tek yolu varyans analizi |
| Bax | Bcl-2 ile ilişkili X proteini |
| Bcl-XL | β hücreli lenfoma (XL) |
| BT-474 | Meme kanseri hücresi |
| CFPAC-1 | Kistik fibrozis pankreatik adenokarsinoma |
| CIS | Sisplatin |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DNPH | 2,4-difenilhidrazin |
| DOX | Doksorubisin |
| EGF | Epidermal büyüme faktörü |
| ETZ | Elektron taşıyıcı zincir |
| FACS | Akım Sitometrisi |
| FBS | Fötal bovin serum |
| G1/S | Hücrenin büyüdüğü/DNA eşleşmesi fazı |
| GEM | Gemsitabin |
| H9c2 | Sıçan fötal kardiyomiyositleri hücresi |
| HbA1c | Hemoglobin A1c |
| HCl | Hidroklorik asit |
| HEI-OC1 | <i>House Ear Institute-Organ of Corti</i> |
| HER2 | İnsan epidermal büyüme faktörü |
| IC₅₀ | Hücrelerin %50'sinin olduğu inhibitor konsantrasyon |
| IGF-1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 |
| IKR | İskemik kalp rahatsızlığı |
| LDH | Laktat dehidrojenaz |
| KKB1 | Liver kinase B1 |
| MDA-MB-231 | Meme kanseri hücresi |

| | |
|----------------------|------------------------------------------------------------|
| MET | Metformin |
| MKN-45 | Mide kanser hücresi |
| mTOR | Rapamisinin mekanistik hedefi |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |
| NAD | Nikotinamid adenin dinukleotid (yükseltgenmiş hali) |
| NADH | Nikotinamid adenin dinukleotid (indirgenmiş hali) |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| NCI-H460 | İnsan akciğer kanser hücresi |
| NPC | Nazofraringeal karsinoma |
| NRK-52E | Sıçan karaciğer hücresi |
| OSCC | Oral Skuamöz hücreli karsinom |
| OVCAR-3&4 | Yumurtalık kanser hücresi |
| OXPHOS | Oksidatif fosforilasyon |
| p53 | Trankripsiyon faktörü |
| PC3 | Prostat kanser hücresi |
| PDGFR | Platelet türevi büyüme faktörü reseptörü |
| R1507 | İnsan anti-IGF-1R monoklonal antikor |
| RBC | Kırmızı kan hücre sayısı |
| RL14 | İnsan fetal kardiyomiyositleri hücresi |
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROS | Reaktif Oksijen Türleri |
| TAME | <i>Targeting Aging with Metformin</i> |
| T2DM | Tip 2 <i>Diabetes Mellitus</i> |
| WBC | Beyaz kan hücre sayısı |

ŞEKİLLER

| Şekil | | Sayfa |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.1. | Metforminin kimyasal yapısı | 4 |
| 2.2. | MET'in sentez reaksiyonu | 4 |
| 2.3. | MET'in antidiyabetik etkisi | 5 |
| 2.4. | Doksorubisinin kimyasal yapısı | 10 |
| 2.5. | Sisplatinin kimyasal yapısı | 13 |
| 2.6. | Gemsitabinin kimyasal yapısı | 15 |
| 3.1. | MTT reaksiyonu | 31 |
| 3.2. | LDH reaksiyonu | 33 |
| 3.3. | FACS çalışma prensibi | 34 |
| 3.4. | Gerçek zamanlı hücre analizi (XCELLigence) prensibi | 36 |
| 4.1. | Doksorubisin (DOX) için 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrası HepG2 (A) ve Hep2 (B) hücre hatlarındaki hücre canlılığı sonuçları | 38 |
| 4.2. | Sisplatin (CIS) için 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrası HepG2 (A) ve Hep2 (B) hücre hatlarındaki hücre canlılığı sonuçları | 39 |
| 4.3. | Gemsitabin (GEM) için 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrası HepG2 (A) ve Hep2 (B) hücre hatlarındaki hücre canlılığı sonuçları | 39 |
| 4.4. | HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 41 |
| 4.5. | Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 42 |
| 4.6. | HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 43 |
| 4.7. | Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 45 |
| 4.8. | HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 46 |
| 4.9. | Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 48 |
| 4.10. | HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 49 |

| | | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.11. | Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 51 |
| 4.12. | HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 52 |
| 4.13. | Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 53 |
| 4.14. | HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 54 |
| 4.15. | Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 56 |
| 4.16. | Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. | 58 |
| 4.17. | HepG2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. | 59 |
| 4.18. | Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi | 61 |
| 4.19. | Hep2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. | 62 |
| 4.20. | Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. | 64 |
| 4.21. | HepG2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. | 65 |
| 4.22. | Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. | 66 |
| 4.24. | Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. | 68 |

- 4.25.** HepG2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. 69
- 4.27.** Hep2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. 71
- 4.28.** HepG2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi 72
- 4.29.** Hep2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi 74
- 4.30.** HepG2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi 76
- 4.31.** Hep2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi 78
- 4.32.** HepG2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi 80
- 4.33.** Hep2 hücre hattında Gemsitabinin(GEM) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi 82

TABLOLAR

| Tablo | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.1. HepG2 hücre hattı için kullanılan ilaç dozları | 30 |
| 3.2. Hep2 hücre hattı için kullanılan ilaç dozları | 31 |
| 4.1. HepG2 hücre hattı için IC ₅₀ değerleri | 39 |
| 4.2. Hep2 hücre hattı için IC ₅₀ değerleri | 40 |
| 4.3. HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 41 |
| 4.4. Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 42 |
| 4.5. HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 44 |
| 4.6. Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 45 |
| 4.7. HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 47 |
| 4.8. Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi | 48 |
| 4.9. HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 50 |
| 4.10. Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 51 |
| 4.11. HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 52 |
| 4.12. Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 53 |
| 4.13. HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 55 |
| 4.14. Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi | 56 |
| 4.15. HepG2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi | 59 |

| | | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.16. | Hep2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi | 62 |
| 4.17. | HepG2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi | 65 |
| 4.18. | Hep2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi | 67 |
| 4.19. | HepG2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi | 69 |
| 4.20. | Hep2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi | 71 |
| 4.21. | Doksorubisinin (DOX) HepG2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları | 73 |
| 4.22. | Doksorubisinin (DOX) Hep2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları | 75 |
| 4.23. | Sisplatinin (CIS) HepG2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları | 77 |
| 4.24. | Sisplatinin (CIS) Hep2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları | 79 |
| 4.25. | Gemsitabinin (GEM) HepG2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları | 81 |
| 4.26. | Gemsitabinin (GEM) Hep2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları | 83 |

1. GİRİŞ

Günümüzde genetik yatkınlığın yanısıra stresli yaşam koşulları ve sağlıksız beslenme alışkanlıkları ile birlikte özellikle obezite ve diyabet önemli birer sağlık sorunu haline gelmiştir. Diabetes mellitus hastalığı dünyada ölüme neden olan 5 hastalıktan biridir (1). En yaygın formu, bütün diyabetik vakaların %90-95'ini oluşturan Tip 2 diabetes mellitus (T2DM)'tur (1). Daha önceden hastalığın temelinde metabolik sendrom olarak adlandırılan patolojik durumun yer aldığı ifade edilse de, son dönemlerde mekanizması, insülin direnci ile açıklanmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu, dünya genelinde 382 milyon diyabet hastası bulunduğunu ve 2035 yılına kadar bu rakamın 592 milyona ulaşmasının beklendiğini bildirmiştir. Yaşlanan nüfusla beraber, kentleşme ve insanların yaşam tarzlarındaki değişiklik diğer kronik hastalıklarla birlikte diyabet epidemisinin de hızlanmasına yol açmaktadır. Ayrıca, ülkemizde de son yıllarda diyabetli hasta sayısında ciddi artış olduğu ve 2035'de bu rakamın 12 milyon kişiyi bulacağı öngörülmektedir (2, 3).

İnsülin direncindeki artış ile birlikte metforminin (MET) de dahil olduğu insülin duyarlılığını artıran ilaç grupları ile tedavi, son yıllarda yaygın hale gelmiştir. Özellikle obez olan kişilerde, MET hem hekimler tarafından tercih edilmekte hem de kullanımı bu hastalar tarafından suistimal edilebilmektedir (3).

Sıklıkla ve hemen her yaş grubunda kullanılan MET'in diğer ilaçlarla kullanımı ile ortaya çıkabilecek olası etkileşmelerin bilinmesi, insan sağlığı açısından önem arz etmektedir. Özellikle çok farklı patolojik durumların bir arada görülebildiği T2DM hastaları, çoklu ilaç kullanımı ve olası etkileşmeler açısından risk altındadır. Bu hastalarda, ayrıca kanser gelişme riskinin de diğer sağlıklı kişilere göre daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Dolayısıyla, kemoterapide kullanılan sitotoksik ilaçlarla MET'in etkileşmesi, bu duyarlı hasta grubunun tedavisi açısından önemlidir (2,3).

Bu tez çalışmasında, MET'in antikanser etkisi de dikkate alınarak, belirlenen dozları, farklı etki mekanizmalarına sahip antikanser ilaçların farklı dozları ile kombine edilmiş, MET'in söz konusu ilaçlarla olası etkileşmeleri sonucunda sitotoksik etkideki değişiklikler değerlendirilmiştir. Uygulamalar, insan karaciğer kanser hücresi olan HepG2 ve insan serviks kanser hücresi olan Hep2 hücre hatları olmak üzere iki kanser hücre türünde yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan, söz

konusu kemoterapötik ilaçlar, sitotoksik antrasiklin grubu antibiyotik olan doksorubisin (DOX), platin içeren alkilleyici ilaçlardan sisplatin (CIS) ve nükleozit analogu bir kemoterapötik ilaç olan gempitabin (GEM)'dir. Bu ilaçlardan DOX, lösemi, lenfoma, yumuşak doku kanserleri gibi; CIS, sarkoma, lenfoma, yumurtalık tümörleri gibi, GEM ise kolon, mide yanısıra pankreas kanseri gibi birçok kanser türlerinin tedavisinde tek başına veya diğer kemoterapötiklerle kombine halde kullanılmaktadır (4, 5). Etkileşmelerin ortaya konabilmesi için, hücrelerde, maruziyet sonrası hücre canlılığı, apoptoz/nekroz ve gerçek zamanlı hücre hareketleri değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) ve laktat dehidrogenaz salınımı (LDH) testleri ile değerlendirilmiştir. Diğer yandan, apoptotik ve nekrotik hücre oranları floresans tarafından aktive edilmiş hücre sıralaması akım sitometride (FACS-flow sitometri) ve gerçek zamanlı hücre hareketleri ise XCELLigence'da araştırılmıştır.

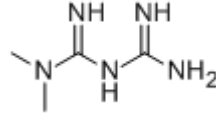
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Metformin

Metforminin (1, 1-dimethylbiguanid hidroklorit, MET) tıbbi kullanımı, tarihte Çin tıbbında yararlanılan ve Ortaçağ Avrupası'nda halitosis ve poliüreyi tedavi etmek için kullanılan *Galega officinalis* (Fransız leylağı) bitkisine dayanır (6, 7). 1800'lerde yapılan araştırmalara göre, hayvanlarda hipoglisemik özellik gösteren *Galega officinalis* bitkisinin guanidin bakımından zengin olduğu belirtilmiş, bu bitkinin antidiyabetik mekanizması bu şekilde açıklanmıştır (8). 1930'un başlarına kadar Fransa'da diyabetin belirtilerini tedavi etmek için MET kullanılabileceği düşünülmüş; ancak, guanidinin klinik kullanımının toksik olduğu belirlenmiştir (9). 1920'lerde isoprenil türevi olan galeginin yan etkisinin çok az olduğu görülmüş ve insanlarda diyabet tedavisinde kullanılmıştır (10). Yaklaşık aynı zamanlarda, dimetil biguanid türevi olan ve *in vivo* olarak kan glukoz seviyesini ciddi oranda düşürme etkisine sahip MET sentezlenmiş olsa da (11), bir süre sonra insülinin bulunmasıyla diyabet tedavisinde MET'in klinik kullanımı geri planda kalmıştır. MET'in yanı sıra, daha güçlü biguanid türevleri olan fenformin ve buformin de Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) tedavisinde kullanılmıştır (12). Önceleri, buformin daha yaygın olarak kullanılsa da, 1970'lerde fenformin ve buforminin yaşamı tehdit eden laktik asidozla bağlantılı oldukları görülmüştür (13).

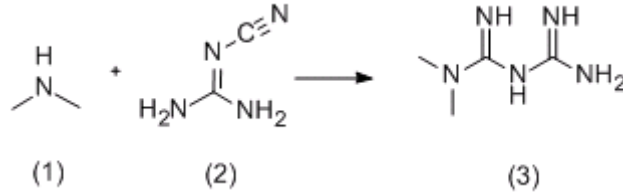
MET, T2DM tedavisinde yaygın olarak kullanılan ağızdan alınan (14) ve aynı zamanda kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özellikleriyle de bilinen biguanid grubundan olan ve insülin duyarlılığını arttıran bir ilaçtır (15, 16). Laktik asidoz veya önemli hipoglisemiye ait herhangi bir veri bulunmamaktadır (17).

2.1.1. Metforminin Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri



Şekil 2.1. Metforminin kimyasal yapısı (18)

Metforminin kimyasal yapısı, 1,1-dimetilbiguanid hidroklorür şeklindedir ve kapalı formülü $C_4H_{11}N^+$ 'dir (Şekil 2.1). Glucian, metformina, metforminum, N,N-dimethylimidodicarbonimidic diamide gibi sinonimleri de bulunmaktadır. Metformin ilk defa 1922 yılında, dimetilamin hidroklorit (1) ve 2-siyanoguanidin (2)'in reaksiyonu ile sentezlenmiştir (Şekil 2.2).



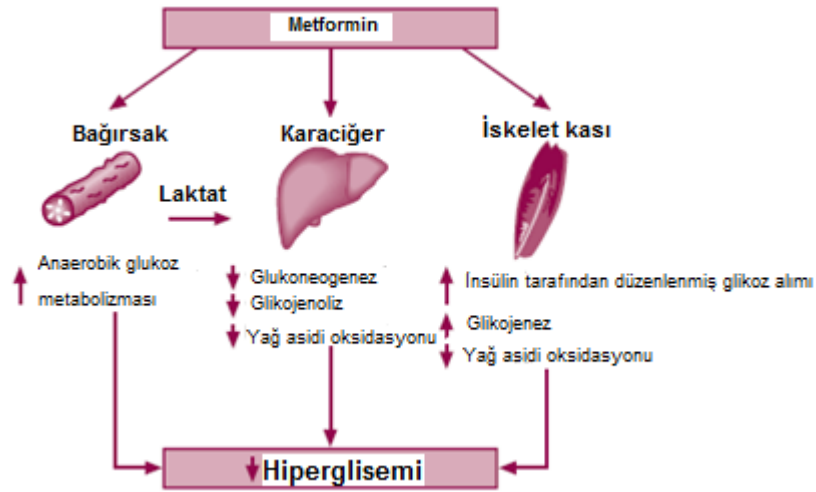
Şekil 2.2. MET'in sentez reaksiyonu (19)

MET beyaz veya koyu beyaz renkli kristal yapıda ve moleküler ağırlığı 165,63 g/mol olan bir bileşiktir (20). Suda tamamen çözünebilirken, aseton, eter ve kloroformda çözünmemektedir (20). MET'in hücre zarlarından pasif difüzyonu hidrofilik kimyasal doğasından dolayı düşüktür. Kimyasal yapısı ile ilişkili olarak, fizyolojik pH'da (pH=7,4) katyonik türler (>%99,9) halinde bulunan hidrofilik bazdır (21). Dolayısıyla, fizyolojik pH'da da büyük oranda hidrofilik katyonik türler olarak bulunmaktadır (21). MET'in asit ayrışma sabit değeri olan pKa değeri 11,5'tir (21). pKa değerinin 11,5 olması, MET'i kanda %0,01'den daha düşük seviyede iyonlaşmamış diğer bazik ilaçlarla kıyaslandığında daha güçlü bir baz haline getirmektedir (21). Bu kimyasal parametreler, MET'in düşük lipofilik özelliğini göstermektedir ve bunun sonucu olarak MET'in hücre zarlarından pasif difüzyon hızı düşüktür (21).

Plazmadaki en yüksek konsantrasyonuna [0,5 g dozdan sonra 1,0-1,6

$\mu\text{g/ml}$ 'ye (yaklaşık 6-10 μM) ve bir buçuk gram doz uygulanması sonrasında plazma konsantrasyonu yaklaşık 3 $\mu\text{g/ml}$ 'ye (yaklaşık 18 μM) artan] 3 saat içinde ulaşabilmektedir (22). MET, çoğunlukla ince bağırsaktan absorblanır ve değişime uğramadan idrar ile atılır. MET'in, böbrek fonksiyonları iyi olan hastalarda çoklu dozlarda alındığında, plazma yarılanma ömrü 6,2 saat iken kandan atılma yarı ömrü 17,6 saattir (23). MET'in etki süresi 8-12 saat olarak verilmektedir (23). Tavşanlarda, oral akut toksisite değeri (LD_{50}) 350 mg/kg olarak belirlenmiştir (23). Böbrekten atılma ortalama süresi $510 \pm 120 \text{ mL/dk}$ 'dır. MET atılımının başlıca yolu böbrekten aktif tübüler salgılama yolu ile olur. MET, organik katyon taşıyıcıları aracılığıyla bağırsak, karaciğer ve böbreğe dağılım gösterir (21).

2.1.2. Metforminin Antidiyabetik Etki Mekanizması



Şekil 2.3. MET'in antidiyabetik etkisi (24)

Diyabet hastalığının 2000 yılında 171 milyon insanda görüldüğü saptanmıştır ve 2030 yılında bu sayının artarak 366 milyon insana ulaşacağı tahmin edilmektedir. *Diabetes mellitus*, insülinin bağımlı veya insülinden bağımsız olarak kan şekerinin artmasıyla meydana gelen karmaşık bir patolojik durumdur (25). İnsülin direnci sonucu hiperglisemi (kan şekerinin yüksek olması) ile tanımlanan metabolik bir rahatsızlıktır. Bu durum genellikle, insülin düzeylerinden düşük olmasından kaynaklanır. Ayrıca, pankreas β -hücrelerinin yetersiz kalması ve takiben β -hücresi

işlev bozukluğu ile ortaya çıkar (25). T2DM tedavisindeki amaç, kan şekeri konsantrasyonunun normal sınırlar içinde tutulmasını sağlamak ve hastalığın uzun dönemde oluşabilecek komplikasyonlarının gelişimini engellemektir (25). Kilo vermek, egzersiz yapmak ve sağlıklı ve düzenli beslenmek insülin direncinin azalmasını sağlar. Hayatın fizyolojik ve psikolojik olarak sağlıklı bir şekilde düzene sokulması, T2DM hastalarının kan şekerlerinin de düzenlenmesini sağlar (25).

MET'in ana farmakolojik etkisi, glukoz düzeyini düşürmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, T2DM tedavisinde yaygın kullanılan bir maddedir. Bu etkisini, glukozun ana kaynağı olan karaciğerden glikoz çıkışını azaltarak (glukoneojenezin ve glikojenolizin inhibisyonu yoluyla) (26); iskelet kasında ve adipozitlerde artmış insülin aracılı glikoz alımını (27) ve intestinal glikoz emilimini düşürerek gerçekleştirmektedir (Şekil 2.3) (28). Normal bireylere kıyasla, T2DM hastalarında glukoz yapım oranı %25-100 arasında artmıştır (28-31) . MET, endojen glikoz üretiminde %25-30'luk bir azalmaya neden olmaktadır (26, 32). Ayrıca, MET, iskelet kasları ile yağ dokusundan periferel glikoz alımını da uyararak plazma glikoz oranlarını azaltmaktadır (33). Sülfonilürelerden farklı olarak MET, insülin salınımını uyarmamaktadır (31, 34). Dolayısıyla, MET'in kullanımında önemli bir diğer avantajı da kan glikozunu hipoglisemiye neden olmaksızın düşürmesidir. MET, ayrıca, insülin duyarlılığını arttırarak, insülin direncinin kırılmasına katkı sağlamaktadır. Böylece, kiloya bağlı insülin direnci veya yağlı karaciğer hastalığı olanlarda, MET kullanımının yararlı olduğu görülmüştür (35). Serbest yağ asitlerinin miktarı, diyabette olduğu gibi obezitede de artmaktadır. Bu artış, hepatik glikoz üretiminde artışa ve insülin reseptöründe duyarsızlığa, dolayısıyla da, insülin direncine neden olmaktadır (36, 37). Yapılan bazı çalışmalarda, MET'in serbest yağ asiti düzeylerinde %10-30 oranında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (38-40) . Ayrıca, hiperglisemiklerde uzun süreli MET kullanımının plazma trigliserid düzeylerinde %10-20 oranında azalma sağladığı görülmüştür (39).

MET'in etki mekanizması, diğer ağızdan alınan antihiperlisemik ilaçlardan farklıdır. MET'in hücre içindeki öncelikli moleküler hedefinin, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ve adenzin trifosfat (ATP) sentezinde önemli rolü olan mitokondri olduğu ifade edilmektedir. MET'in elektron taşıma zincirinde yer alan kompleks I ekspresyonunu yavaşlattığı ve böylece ATP sentezinin de azaldığı

belirtilmiştir. Bu durumda, artan adenozin monofosfat [AMP], kasların kandan glukozu almasını indükleyen (41)AMP-ile aktive edilmiş protein kinaza (AMPK) bağlanmakta ve enzimde allosterik olarak yapısal değişikliğe neden olmaktadır. Böylece, AMPK'nın katalitik etkisi aktive edilmektedir. AMP/ATP oranı arttığı için, MET'in iyi bir tümör baskılayıcısı olan karaciğer kinaz B1 (KKB1) ile AMPK'yı aktive ettiği gösterilmiştir (41). AMPK'nın aktivasyonu, hücre anabolik evreden katabolik evreye geçer. Ancak, MET'in AMPK'yı hücrenin enerji durumunu, AMP/ATP oranının değişmesiyle veya KKB1 aracılığıyla doğrudan etkileyip etkilemediği hâlâ tartışmalı bir konudur (42).

MET hem hepatik glikoz üretimini hem de mitokondriyal solunum zinciri kompleks I'i geçici süreyle yavaşlatır (43). Aynı zamanda, enerji metabolizmasında önemli rolü olan AMPK yolağını dolaylı olarak etkileyen MET, lipit ve kolesterol biyosentezi gibi diğer anabolik faaliyetleri baskılar (44, 45).

Glikoz seviyesini düşürme etkisinin dışında, MET'in çeşitli dokularda antioksidan özelliği olduğu gösterilmiş olup lipit peroksidasyonunu azaltmaktadır (32, 46).

2.1.3. Metforminin Kardiyovasküler Sistemi Koruyucu Etkisi

İskemik kalp rahatsızlığına (IKR), T2DM hastalarında sıklıkla karşılaşılmakta ve ölüme varan sonuçlara neden olduğu bilinmektedir (47). MET'in kalpteki etkisinin mekanizmaları açık bir şekilde anlaşılmamış olsa da, MET kullanımıyla iskemi süresince kardiyomiyosit ölümünün azaldığı, böylece kalp rahatsızlığının gelişiminin engellendiği ifade edilmektedir (13). Deneysel veriler, MET'in kalp iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığını göstermiştir. Buna ek olarak Yin ve ark. tarafından yapılan çalışmada MET tedavisinin kalp fonksiyonlarını geliştirdiği ve Sprague-Dawley sıçanlarında miyokardiyal enfaktüs sonrasında oluşan ölü doku boyutunu küçülttüğü belirlenmiştir (48).

Kardiyomiyositlerde, MET apoptozu başlatan proteinlerin sentezini azaltıp, antiapoptotik proteinlerin sentezini artırarak kardiyomiyositlerde oluşan ölüm yüzdesini azaltmıştır (1). Bu etki AMPK'nın aktivasyonu ile bağlantılıdır ve AMPK'nın aktivitesini düzenleyen bir AMP analogu olan 5-aminoimidazol-4 karboksamit ribonükleotit (AICAR) (49) tarafından yeniden oluşturulur. MET'in bir

diğer özelliği, kalp krizi riskinin bir nedeni olarak görülen miyokardiyal iskemi süresince kardiyak metabolizmanın adaptasyonunu sağlamasıdır. Sağlıklı bir kalpte, oksidatif fosforilasyondan elde edilen enerjinin %60-90'ı yağ asitlerinin oksidasyonundan kaynaklanır. Hasar görmüş bir kalpte ise glikoz alımı ve kullanımı artar (50).

MET ile tedavi edilen T2DM hastalarındaki bu kardiyovasküler koruma, diğer oral antidiyabetiklerde görülmediği için Hemogloblin A1c (HbA1c) seviyesinin düşmesiyle ilişkili olduğu düşünölmektedir (51). Gundewar ve ark. tarafından yapılan çalışmada MET'in sol ventriküler fonksiyonunu ve farelerdeki kalp krizlerini azalttığı belirtilmiştir (52). MET, NAD(P)H oksidazı ve solunum zinciri kompleksi-I'i azaltarak aortik endotelial hücrelerde, hücreler arası reaktif oksijen türleri (46) üretimini azaltır (53).

2.1.4. Metforminin Antitümöral Etkisi

Yapılan bazı çalışmalarda, MET'in antitümöral aktivitesi nedeniyle antikanser ilaçlarla birlikte alındığında bu ilaçların tedavici edici etkilerini arttırılabileceği öne sürölmektedir (41, 42). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, MET'i kullanan diyabet hastalarında rektum, karaciğer ve pankreas kanser türlerini içeren birçok kanser riskini azaldığı ifade edilmektedir (54, 55).

Son dönemde yapılan ileriye dönük ve büyük çalışma gruplarıyla yürütölen vaka-kontrol çalışmaları, T2DM'nin özellikle meme, kolon, prostat, böbrek ve pankreası etkileyerek kanser riskini yüksek oranda arttırdığını göstermiştir (56). Bu artan riskin, kronik olarak artan plazma insölin seviyesinin büyümeyi arttırıcı etkisi ile bağlantılı olduğu öne sürölmektedir (57). Etkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da, anahtar rolün hem normal hem de kanser hücreleri için metabolizma ve büyümeyi düzenlemede büyük bir etkiye sahip olan AMPK aracılı olacağına inanılmaktadır (58). Bu molekülün aktivasyonu, MET'in solunum kompleksi I üzerindeki doğrudan etkisinden dolayı mitokondriyal ATP üretimindeki düşüş sonucu gerçekleşmektedir (59). Bu etki hücre döngüsünü durdurur ve kanser hücrelerindeki protein sentezini azaltır (60). Griss ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre MET'in kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyici etkisi iki model ile açıklanmaktadır (61). Birincisi, MET karaciğer glikoneogenezisini inhibe ederek,

sistemik insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) seviyelerini düşürür. Böylece, insülin / IGF-1'e bağlı olarak oluşan tümör hücrelerinin büyümesini baskılayarak etki eder. İkincisi, MET, OXPHOS ve doğrudan tümör hücrelerinin kompleks I üzerine etki ederek tümör hücrelerinin diğer metabolik aktivitelerini azaltır (62, 63). Yapılan bu çalışma da ikinci hipotezi destekler şekildedir ve MET'in doğrudan kanser hücrelerindeki elektron taşıma zincirindeki kompleks I'i hedef aldığı gösterilmiş ve kompleks I seviyesinin düşmesiyle de *in vitro* ve *in vivo* olarak kanser hücrelerinin çoğalmasının azaldığı gösterilmiştir (61).

2.1.5. Metforminin Yaşlanmaya Karşı Koruyucu Etkisi

MET'in T2DM tedavisi başta olmak üzere, antikanser ve kardiyovasküler sistemi koruyucu etkilerinin olmasının yanı sıra son zamanlarda araştırılan etkilerinden biri de yaşlanmaya karşı koruyucu etkisidir. Albert Einstein Üniversitesi'nde Barzilai ve ark. tarafından, MET kullanımını ile yaşa bağlı hastalıklardan (örn. Kardiyovasküler hastalıklar, artrit vb.) kaynaklanan ölümlerin azaltılabilmesi veya engellenebilmesi sonucu, ömrün uzayabileceğine ve yaşlanmanın geciktirilebileceği düşünülerek *TAME (Targeting Aging with Metformin)* adı verilen bir proje başlatılmıştır (64). Bu proje ile yaşlanmayı geciktirme ile farmakolojik gelişim arasında bir bağ kurma amaçlanmaktadır (64). Özellikle yaşlanma için, MET insülin seviyesinin azaltmasına, IGF-1 sinyalinin düşmesine (65), rapamisin mekanistik hedefi diye adlandırılan kinazın (mTOR) azalmasına (4, 66, 67) , elektron taşıma zincirinde mitokondriyel kompleks I'in düşmesine, iç sebeplerden doğan ROS üretiminin azalmasına (68-70) , AMPK aktivasyonunun düşmesine (71, 72) ve DNA hasarının düşmesine (73) liderlik eder. MET aynı zamanda inflamasyon (74), otografi (75, 76) ve hücre yaşlılıkla (5, 77) yakından ilişkili olan metabolik ve hücresel süreçleri etkilemektedir. Yuvarlak solucanlardan olan *Caenorhabditis elegans*'ta, MET, özellikle mikrobiyal folik asitin ve metiyonin metabolizmasının değişimiyle gerçekleşen mikrobiyom farklılaşmasını içeren çeşitli olası mekanizmalarla yaşam süresi uzatmıştır (78). Bu tarihe kadar, insanlar üstünde böyle etkilerin olduğuna dair herhangi bir kanıt bulunmamaktadır (64).

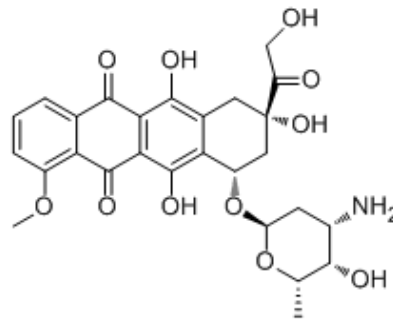
Bu hücre ortamı yanında, *in vivo* olarak, özellikle iplik kurtları ve çeşitli

kemiricilerde MET'in beslenmeye eklenerek yaşlanmayı geciktirdiğine ve sağlıklı bir yaşam döngüsünü sağladığına ilişkin kanıtlar bulunmaktadır (78-80).

T2DM hastalığı olan insanlarda, MET kullanımı ile diğer antidiyabetik ilaçlar kıyaslandığında, kardiyovasküler hastalık riskinde %20 oranında, diyabete bağlı ölümlerde %42 oranında azalma görülmüştür (81). 2014 yılında Bannister ve ark. tarafından yapılan restrospektif bir çalışmada, İngiltere Klinik Pratik Araştırma Veri Bağlantısı'ndan alınan gözlemsel veriler kullanılmıştır (82). Sadece MET veya sülfonilüre tedavisi gören T2DM hastalığı olan insanlar, yaş ve cinsiyet açısından, diyabet hastalığı olmayan kontrol grupları ile yaşam süreleri yönünden karşılaştırılmıştır. Sülfonülüre tedavisi gören hastalar da diyabetik olmayan veya MET tedavisi gören hastalara kıyasla yaşam sürelerinin kısa olduğu gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde, MET tedavisi gören hastalar, kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında daha obez ve ölüm oranını artırıcı bir patolojik altyapıya sahip olmalarına rağmen aynı yaşam oranını göstermişlerdir (83).

Bu çalışmalardan yola çıkarak, MET'in antidiyabetik, kardiyovasküler ve antitümoral etkisinin olmasının yanı sıra ölüm oranını düşürerek yaşlanma karşıtı – diğer bir deyişle yaşam süresini arttırıcı bir etkiye de sahip olduğu söylenebilir. Fakat bu konuda daha sağlıklı karar verebilmek için daha detaylı ve fazla çalışma yapılması önerilir (77).

2.2. DOKSORUBİSİN



Şekil 2.4. Doksorubisinin kimyasal yapısı (84)

DOX molekül ağırlığı 543.52 g/mol olan ve *Streptomyces peucetius caesius* kültüründen izole edilen bir sitotoksik antrasiklin antibiyotiktir, ancak, antimikrobiyal bir özelliği yoktur (85). Genellikle farklı kemoterapötik ilaçlarla kombine

halde, akut lenfositik ve miyeloid lösemiler, çeşitli sarkomlar ve meme, serviks ve pankreas kanserlerini de içeren pekçok kanser türünün tedavisinde kullanılır (86).

Biyolojik yarılanma ömrü ortalama 1-3 saattir. Tekli veya kombine ilaç tedavisi gören farklı kanserlere sahip hastalarla yapılan farmakokinetik çalışmalar, DOX'in damar yoluyla enjeksiyonu sonrasında çok basamaklı bir plazma eğrisi takip ettiğini göstermektedir. Bu uygulama sonrasında, plazma eğrisi, 12 dakika, 3,3 saatlik ve 30 saatlik yarılanma ömürleriyle seyreden üç fazı takip ettiği çalışmalarla gösterilmiştir (85, 87).

DOX'in kötü huylu hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin ve çeşitli organlara olan toksik etkisinin DOX'in hücre zarı yağlarına bağlanması ve nükleotid baz araya yerleşmesiyle bağlantılı olduğu düşünülür. Araya yerleşen nükleotid replikasyonunu, ve DNA ve RNA polimeraz aktivitelerini azaltır. DNA ile bölünebilen kompleksler oluşturmak için DOX'in topoizomeraz II ile bağlantısı ve buna bağlı olarak serbest radikaller oluşturması, DOX'in sitotoksikal aktivitesinin önemli bir mekanizması olarak görülür (85). Mide-bağırsak kanalından fazla absorbe olmamaktadır. Dokulara fazla bağlanan DOX, o bölgeden yavaş salıverildiğinden karaciğerde hızlı metabolize edilmesine rağmen vücutta kalış ve etki süresi uzundur (86). Karaciğer metastazı veya primer tümörü ya da diğer bir nedenle, karaciğer fonksiyonu bozulmuşsa DOX'un metabolizması yavaşlar ve doz azaltılmazsa vücutta birikerek toksisite gösterebilir (85). Ayrıca, DOX'in kendisi ve metabolitlerinin vücutta uzun süre kaldığı ve dolayısıyla, dokulara dağılımının da fazla olduğu gösterilmiştir. Dağılımının fazla olması nedeniyle eliminasyon yarılanma ömrü uzundur. Parenteral olarak uygulanan dozun yaklaşık %33 ile %50'si, 5 gün sonrasında idrarda, safrada ve dışkıda izlenebilir. Dozdan bağımsız olarak farmakokinetiğinin 30-70 mg/m² aralığında olduğu belirtilmektedir. Plazma atılımı 324-809 ml/min/m² aralığındadır (85).

DOX'in etkisi mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte iki mekanizma öne sürülmektedir. Birincisi, DNA çift sarmalında araya girer (interkalasyon) ve topoizomeraz II aracılı DNA onarımını bozar. İkincisi ise, serbest radikal oluşumunu artırır ve hücre membranları, DNA ve proteinlerde hasara neden olur (85,87,88). DOX'un da yapısında bulunan antrasiklin halkası lipofilik özelliktedir, ancak, bu halkanın sonundaki doymuş kısım hidrofilik merkezi oluşturur

ve amino şekerine komşu olan pekçok hidroksil grubu içerir. DOX, amfoterik yapıya sahiptir. Diğer bir deyişle, hem fenolik gruplardan dolayı asidik hem de şekerle bağlı amino gruplarından dolayı bazik bir yapısı vardır. Plazma proteinlerine bağlandığı gibi hücre zarlarına da bağlanabilmektedir, fakat kan-beyin bariyerini geçemez (85).

Oldukça geniş spektrumlu ve güçlü etkili olmasının sağladığı üstünlüklere rağmen, DOX'in neden olduğu toksik etkilerin fazla olması kullanımını sınırlayabilmektedir (86). Bu yan etkiler arasında en önemlisi kardiyotoksitesidir. DOX kardiyomiyositlerde apoptoz ve miyokardiyal fibrozisi de içeren doza bağlı kardiyomiyopati gelişmesine neden olur ve kullanımını sınırlayan en önemli toksisitesi budur (89). Diğer kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanıldığında, yaygın olarak kullanılan DOX'in dozu her 21-28 günde bir kez damardan verilen 40-60 mg/m²'dir (90).

DOX'in kötü huylu hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinde olduğu gibi çeşitli organlarda meydana getirdiği toksik etkisinin hücre zarı yağlarına bağlanması ve DNA çift sarmalında araya yerleşmesiyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. DNA interkalasyonu, nükleotid replikasyonunu ve DNA/RNA polimeraz aktivitelerini azaltmaktadır (85, 87).

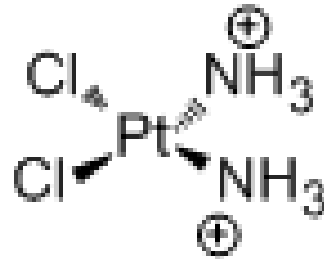
DOX'in hücre zarına bağlanması çeşitli hücresel faaliyetleri etkileyebilir. Çeşitli oksidazlar, redüktazlar ve dehidrogenazlar tarafından azalan DOX'in enzimatik elektronu, serbest hidroksil radikalini (OH•) içeren yüksek reaktif türler oluşturur. DOX, DNA'da tek zincir kırılımına neden olan süperoksit iyonları ve hidrojen peroksit üreten moleküler oksijen ile etkileşime girer (25). Serbest radikal üretimi, hücresel seviyede Cu (II) ve Fe (III) azalmasıyla DOX'in kardiyotoksitesinin ortaya çıkmasına neden olur (85).

Antrasiklin grubu kemoterapötiklerle tedavide kardiyotoksite, değerlendirilmesi gereken en önemli risktir. DOX tedavisinden aylar sonra dahi kardiyomiyopati ve/veya konjestif kalp rahatsızlığı görülebilmektedir. Aynı zamanda, diğer sitotoksik ilaçlar gibi DOX de kemik iliğinin baskılanmasına (miyelösüpresyon) neden olabilir. Kemik iliğinde oluşan bu etkiyi takip edilmesi gerekir. Toplam ve farklı beyaz kan hücresi sayısı (WBC), kırmızı kan hücresi sayısı (RBC) ve platelet sayımları DOX tedavisi boyunca ve onun öncesinde değerlendirilmelidir. DOX, hastanın kardiyak fonksiyonları dikkatli bir şekilde

izlenmediği sürece diğer kardiyotoksik ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmamalıdır. Genellikle, karaciğer tarafından metabolize olur. DOX ile ilişkilendirilmiş toksisiteler, özellikle hematolojik ve gastrointestinal olaylar, DOX'in diğer sitotoksik ilaçlarla birlikte kullanıldığında artış gösterebilir (85).

DOX, gebelikte kullanıldığında fetüse zarar verebilir ve ciddi malformasyonlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle, DOX, Gıda ve İlaç Örgütü'nün ilaç gebelik sınıflamasında D sınıfında yer almaktadır. Sıçanlarda organogenez döneminde 0,8 mg/kg/gün (önerilen insan dozunun yaklaşık 1/13'ü) dozda uygulandığında teratojenik ve embriyotoksik olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, tavşanlarda da aynı dönemde 0,4 mg/kg/gün (önerilen insan dozunun yaklaşık 1/14'ü) dozda verildiğinde aynı etkiler gözlenmiştir (55). Ancak, gebelerle ilgili yeterli ve iyi değerlendirilmiş insan verisi bulunmamaktadır. Eğer gebelik zamanında kullanılması gerekiyorsa veya tedavi sırasında gebe kalınmışsa, fetüs üzerindeki etkisi konusunda kişi bilgilendirilmelidir (85).

2.3. SİSPLATİN



Şekil 2.5. Sisplatinin kimyasal yapısı (91)

CIS'in Molekül ağırlığı 300,5 olup, kapalı formülü $Cl_2H_6N_2Pt$ şeklindedir. Yapısında, %23,63 Cl, %2,02 H, %9,34 N, %65,02 Pt içerir. Koyu sarı renkli katı bir tozdur. Erime noktası 270 °C'dir. Suda 25°C'de 0,253 g/100 g oranında ve yavaş çözünür, su dışında dimetilformamidde çözünür (92).

CIS, platin içeren antitümoral ilaç grubunun ilk üyesidir. Başlangıç yarılanma ömrü 25-49 dakika ve son yarılanma ömrü ise 58-73 saattir (93). Mide-bağırsak kanalından absorbe edilmez; sadece intravenöz uygulanır (93). CIS'in i.v. enjeksiyonunu takiben başlangıç plazma eliminasyon yarı ömrü 25-50 dakikadır.

Daha sonra bağı ve serbest olarak toplam ilaç miktarı 24 saatlik veya daha uzun yarılanma ömrü ile elimine edilir. Kandaki Pt'in %90'dan fazlası plazma proteinlerine kovalan bağlanmış halde olup böbrek, karaciğer, ince barsak ve testis dokularında bulunduğu fakat merkezi sinir sistemine geçişinin az olduğu bildirilmiştir (94). İlk 6 saat boyunca ilacın çok az bir kısmı böbrekler tarafından itrah edilir; 24 saate kadar %25'i ve 5 gün zarfında da uygulanan dozun %43'ü idrarda tespit edilmiştir. Hızlı enjeksiyon yerine infüzyon halinde verildiğinde plazma yarı ömrü daha kısa ve itrah edilen ilaç miktarı daha fazladır. CIS'in safra veya barsaklardan atılımının çok az olduğu bildirilmiştir. CIS'in safra atılımı, uygulamadan 6 saat sonra %1 düzeyindedir. Verilişinden sonra 4 ay süreyle böbrek dokusunda Pt saptanabilir (95). İntravenöz infüzyon veya yavaş i.v. enjeksiyon şeklinde tek başına günde 100 mg/m² dozunda, kombinasyon içinde ise genellikle 20 mg/ m² dozunda uygulanır (86).

Özel kimyasal yapısından dolayı, CIS'deki Cl atomları, su veya sülfhidril grupları gibi nükleofillerle olan kimyasal yer değiştirme reaksiyonlarına yatkınlık gösterir. Yapısında bulunan Pt, son alımdan sonra 180 gün boyunca dokularda bulunabilmektedir (96). Plazmanın yüksek klorür konsantrasyonunda, CIS kompleksi deiyonize olmakla ilacın hücre zarından geçişi sağlandığı düşünülmektedir (97).

CIS, sarkoma, lenfoma, yumurtalık tümörleri, ve birçok karsinomu (örn. yumurtalık kanseri, küçük hücre akciğer kanseri ve gastrik kanseri) içeren çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan en önemli kemoterapötik ilaçtır ve DNA ile farklı şekillerde çapraz bağ yapabilmektedir (98). Ayrıca, CIS spesifik bir kanser türü olan nazofaringeal karsinoma (NPC) tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (99). Yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzeyemeyen organik platin türevi (platin koordinasyon kompleksi) ilaçlardandır (86).

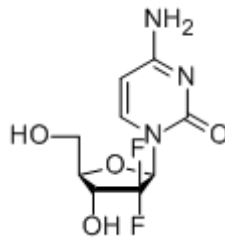
CIS'in antikanser aktivitesinin asıl mekanizması, DNA çifte sarmalında sarmal içi çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini engelleyen bir komplekse dönüşmesinden, yani DNA çift-zincirinde çapraz bağlanma yapmasından ileri gelir. DNA biyosentezini inhibe eder (100),(101). DNA çift zincirinde çapraz bağlama yapması nedeniyle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlarınkı ile benzerlik göstermektedir (93). CIS, en etkili kanser ilaçlarından biri olup, klinikte kullanım oranı oldukça yüksektir. Fakat böbreklerde ve mide bağırsak yolunda toksik etkiye neden olur (83).

Geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaçtır (96). Fakat, böbrek toksisitesi ve ototoksisite (kulak toksisitesi) gibi doz sınırlayıcı yan etkileri de beraberinde getirmektedir (102). Böbrek toksisitesi salin hidrasyonu ile geri döndürülebilirken ototoksisite için herhangi bir tedavi veya engel bulunmamaktadır (7). CIS spesifik olmayan hücre döngüsüne sahip, DNA ve RNA sentezi ve mitozu boyunca tümör büyümesini azaltan ve NPC tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir anti-kanser ilaçtır (7). Plazmada geri dönüşsüz protein bağlamaya neden olduğu için aktif olan formun serbest halde bulunan CIS olduğu düşünülmektedir (103). NPC'da proliferasyonu önemli ölçüde azaltabilmesine rağmen, toksik etkiler artan ilaç dozlarıyla belirgin hale gelir (103).

CIS, farklı ilaçlarla etkileşme gösterebilmektedir ve bu ilaçlardan biri olan fenitoinin emilimini azaltarak serum düzeyini düşürür. CIS ile fenitoinin birlikte kullanımında fenitoin serum düzeyi kontrol edilip doz ayarlaması yapılmalıdır. İlerlemiş yumurtalık kanseri tedavisinde piridoksin ile altretamin (heksametilmelamin) ve CIS kombinasyonu kullanıldığında etki süresinin olumsuz şekilde etkilendiği görülmüştür. Nefrotoksik ve ototoksik ilaçlar (örneğin, aminoglikozidler, sefalosporinler ve amfoterisin B) CIS'nin yan etkilerini artırırlar. Miyolesüpresyon yapan ilaçlar ve radyasyon ile birlikte CIS kullanımı CIS'in miyolesüpsiyon yapıcı etkisini artırır (93). 50 mg/m²'lik tek doz CIS sonrasında hastaların %28 – 36'sında böbrek toksisitesi görülmüştür. Kulak toksisitesi ise işitme kaybı ve kulak çınlaması olarak hastaların %31'inde 50 mg/m²'lik tek doz CIS verildiği zaman görülmüştür (93).

DOX gibi, CIS de fetus üzerine zararlı etkileri olduğundan Gıda ve İlaç Örgütü'nün ilaç gebelik sınıflamasında D kategorisinde yer almaktadır ve gebeler tarafından kullanılmamalıdır (93).

2.4. GEMSİTABİN



Şekil 2.6. Gemsitabinin kimyasal yapısı(104)

Gemsitabin (2,2-difloro 2-deoksisitidin, dFdC, GEM), molekül ağırlığı 263,198 g/mol olan bir kemoterapötik ilaçtır. Biyolojik yarılanma ömrü kısa enfüzyonlar için 32-94 dakika uzun enfüzyonlar için ise 245-638 dakikadır (105). GEM'in aktif metaboliti olan gemsitabin trifosfat, periferal tek çekirdekli kan hücrelerinden 1,7 – 19,4 saatte atılmaktadır (105). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hastalarına GEM (1. ve 8. günlerde 1250 mg/m²) ve CIS (1. gün 75 mg/m²) birlikte uygulandığında, GEM'in atılımı 1. Gün 128 L/saat/m² ve 8. Gün 107 L/saat/m² iken CIS'in atılım süresi 134 saat olan yarılanma ömrüne karşılık 3,94 ml/dakika/m² olarak belirlenmiştir (105).

Gemsitabin (GEM), kolon ve mide yanısıra pankreas kanserini tedavi etmede kullanılan antimetabolit bir kemoterapötik ilaçtır (105). Pankreas kanseri, Amerika'da kadın ve erkeklerde kanser kaynaklı ölüme neden olan 4. en yaygın etmendir (106), ve belirgin bir erken uyarı veya semptomları yoktur ve genellikle hastalık çok ilerlediği zaman kendini belli etmektedir. GEM klinik uygulamalarda önemli yarar sağlarken, pankreas kanserine etkisi meydana gelen kemorezistans nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle GEM'in ve diğer kemoterapötiklerin birlikte kullanımının hayatta kalma oranlarını iyileştireceği yönünde tahmin ileri sürülmektedir (107).

GEM, hücre döngüsünde faza spesifik etki göstermektedir ve S fazında hücre döngüsünü durdurarak hücrenin yaşamsal döngüsünü durdurmaktadır. Ayrıca, hücrenin büyüdüğü/DNA eşleşmesi fazı olan G1/S fazını engelleyip, hücrelerin ilerlemesini durdurarak da etkisini göstermektedir. GEM, doza ve süreye bağlı olarak sitotoksik etki göstermektedir (15, 105, 108, 109).

GEM bir pirimidin antimetaboliti olup hücre içinde nükleozit kinaz enzimleri aracılığıyla aktif difosfat ve trifosfat nükleozidlere metabolize olur (105). Bunlara bağlı olarak sitotoksik etkisini birbirini takip eden iki ayrı mekanizma ile gösterir. Birincisi, difosfat, DNA sentezi için deoksinükleosit trifosfat meydana getiren enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe etmesidir. Böylece difosfat ve deoksinükleosit trifosfat düzeyleri azalır. Diğeri, trifosfat DNA'ya karşı deoksinükleosit trifosfat ile yarışmaya girer. Deoksinükleosit trifosfat düzeyindeki azalma nedeniyle trifosfat DNA'ya bağlanır. Böylece DNA'da bir nükleotid artışı meydana gelir ve DNA sentezi durur (105, 110).

GEM, gebe iken alındığı takdirde fetüste hasara yol açtığı için İlaç ve Gıda

Örgütü gebelik sınıflamasında D kategorisinde yer almaktadır. 1,5 mg/kg/gün dozunda kullanıldığında fötal malformasyonlara neden olduğu belirlenmiştir (105). Toksik etkileri embriyotoksisite, ölüm, düşük doğum ağırlığı ve gelişim geriliği olarak tanımlanmıştır (105). GEM'i tek başına veya diğer hepatotoksik ilaçlarla birlikte alan hastalarda, karaciğer yetmezliği gelişebilmekte ve ölüme kadar giden bir tablo ortaya çıkabilmektedir. Ancak, GEM kullanımına bağlı olarak akciğer toksisitesi ortaya çıktığı bildirilmektedir. Genel olarak, GEM kullanımında bu toksisite açısından dikkatli bir şekilde izlenmelidir. Doz azaltma veya ilacı bırakma durumları ortaya çıksa da, birçok yan etki geri dönüşlüdür ve tedaviye devam söz konusudur (105).

2.5. SİTOTOKSİK İLAÇLAR VE METFORMİN ÜZERİNE YAPILAN BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

İnsülin direncindeki artış ile birlikte MET'in de dahil olduğu insülin duyarlılığını artıran ilaç grupları ile tedavi yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu nedenle, her yaş grubunda kullanılan MET'in diğer ilaçlarla kullanımı ile ortaya çıkabilecek olası etkileşmelerin araştırılması gerekmektedir. Özellikle çok farklı patolojik durumların bir arada görülebildiği T2DM hastaları çoklu ilaç kullanımı ve olası etkileşmeler açısından risk altındadır. Bu hastalarda, ayrıca kanser gelişme riskinin de diğer sağlıklı kişilere göre daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Diyabetik kanser hastalarında kemoterapide kullanılan sitotoksik ilaçlarla MET'in etkileşmesi üzerine bilimsel çalışmalar yapılmaktadır (111).

Son yıllarda, T2DM ve obezitede insülin direncini kırmak amacıyla yaygın şekilde kullanımı ve farklı biyolojik özelliklerinin de keşfedilmesiyle MET üzerinde araştırma yapılan ilaçlardan biri olmuştur. Yapılan çalışmalar, T2DM hastalarında, MET kullanımının, kanserin gelişmesini baskıladığını ve kanser bağlantılı ölümleri de azalttığını belirtmektedir (111-113). Kolorektal kanserinden sonra diyabet hastalığı olan insanlarda ölüm oranının yüksek olduğu, MET kullanan hastalarda ise bu oranda azalma olduğu görülmüştür (97, 114-116).

MET ile etkileşme açısından çalışılan en yaygın kemoterapötik ilaçlar DOX ve CIS'tir (42, 54).

Antrasiklin grubu bir kemoterapötik olan DOX, güçlü antitümoral etkinliğe

sahiptir. Ancak, DOX'a bağlı gelişen kardiyomiyosit apoptozu ve miyokardiyal fibrozis içeren doza bağlı kardiyomiyopati gelişmesi kullanımını sınırlayan yan etkisi olarak belirtilmektedir (117). DOX, metabolizması sırasında reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırmaktadır. Diyabetik kanser hastaları tarafından birlikte kullanıldıklarında, MET'in DOX tarafından oluşturulan kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etkisi olduğu yapılan son çalışmalar tarafından gösterilmiştir. Iliopoulos ve ark. (15) tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada, ailesinde meme kanseri olmayan bir kadın hastadan alınan fibrosistik göğüs dokusu olan MCF-10A hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattının yanı sıra 4. seviye metastatik prostat kanser hücre hattı olan PC3 hücreleri, insan akciğer kanser hücresi olan A549 hücreleri kullanılmıştır. Bunlara ek olarak, HER2 reseptörleri baskılanan insan meme kanseri hücreleri olan BT-474 hücreleri, metastatik yapıda ve EGF reseptörlerini baskılayan, p53'te mutasyonu bilinen insan meme kanseri hücresi MDA-MB-231 hücreleri de kullanılmıştır. Çalışmada, MET'in DOX ile birlikte ağız yolundan kullanımı ile, tümör büyümesini ve meme dokularında kanserin yayılımını baskıladığı gözlenmiştir. Çalışma, MET'in hem kanser tedavisini desteklemek hem de standart kemoterapi tedavisi ile ortaya çıkan toksisiteyi azaltmak için geniş antikanser etkisi olduğunu belirtmektedir. 2014 yılında Kobashigawa ve ark. (100) tarafından yapılan çalışmada, düşük doz MET'in, DOX'a karşı AMPK, PKA/CREB1, Src ve platelet türevi büyüme faktörü reseptörü (PDGFR)'ne bağlanarak koruyucu bir etki oluşturduğu gösterilmiştir. Sıçan fütal kardiyomiyositleri olan H9c2 hücre hattı ve insan fütal kardiyomiyositleri RL14 hücre hattı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, düşük doz (0.1 mM) MET, kardiyomiyositlerde DOX tarafından indüklenmiş toksisiteyi azaltmış ve koruyucu etki göstermiştir. 2015 yılında Argun ve ark. (118) tarafından sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, DOX'a bağlı kardiyotoksisiteye karşı MET'in koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, DOX ile MET'in birlikte verildiği gruptaki sıçanlarda, sol karıncıkla ilgili fonksiyonlarda bozulmanın olmadığı, histopatolojik değişikliklerin ve kardiyomiyosit apoptozunun azaldığı gözlenmiştir.

Barbieri ve ark. (110) tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada, köpek meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Bu hücre hattının DOX'a duyarlı olmadığı, ancak, MET ile birlikte yanıtın arttığı bildirilmiştir. Araştırmalar, DOX'e yüksek

cevap vermesine rağmen farklılaşmış tümör hücrelerinin sadece MET'den kısmi olarak etkilenmiş olduğunu belirtmişlerdir. Bu veriler, MET ve alışılmamış sitotoksik ilaçlar birlikte alındığında terapötik avantaj sağlayabileceğini doğrulamaktadır.

CIS, daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi sarkoma, lenfoma, yumurtalık tümörleri, ve birçok karsinomayı (örn. yumurtalık kanseri, küçük hücre akciğer kanseri ve gastrik kanseri) içeren çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir alkilleyici ajandır ve DNA ile farklı şekillerde çapraz bağ yapabilmektedir (98). CIS'in antikanser aktivitesinin asıl mekanizması, DNA-DNA içi ve arası çapraz bağlantılar kurarak, DNA eşleşmesine engel olmasıdır. Bu şekilde hücrede apoptoz da indüklenmektedir (15). CIS, MET ile etkileşimleri açısından en çok çalışılan ilaçlardan biridir ve pek çok çalışmaya da rastlamak mümkündür. 2008 yılında Gotlieb ve ark. (119) tarafından yapılan çalışmada, tutunabilen yumurtalık kanser hücresi olan OVCAR-3 ve OVCAR-4 hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatlarına CIS (5 ve 10 µg/ml) MET ile kombinasyonu halinde ve MET tek başına (1-100 mM) uygulanmış olup bu çalışma sonucunda, MET'in doza ve zamana bağlı olarak hücrelerde büyümeyi geciktirdiği görülmüştür. Aynı zamanda MET'in, CIS'in *in vitro* olarak etkisini arttırdığı da gözlenmiştir. 2013 yılında Teixeira ve ark. (120) tarafından yapılan çalışmada, akciğer kanser hücresi olan NCI-H460 hücre hattı kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonunda, 60,58 ve 30,29 mM MET 0,19 mM CIS ile kombine edildiğinde sinerjistik bir etkisinin olduğu, ve CIS'in IC₅₀ değeri (0,09 mM) kombinasyonu ile kıyaslandığı zaman daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bulunan sinerjistik sonuçların aksine, 2014 yılında Chang ve ark. (102), ve Lesan ve ark. (121) tarafından yapılan çalışmalarda, sırasıyla *House Ear Institute-Organ of Corti 1*, HEI-OC1, hücreleri ve insan mide kanser hücresi olan MKN-45 kullanılmış, bu hücre hattı ile MET ve CIS'in birlikte kullanımını değerlendirmişlerdir. İlk çalışmanın sonunda, MET'in hücreler arası kalsiyum artışını engellediği, hücre canlılığını arttırdığı ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önlediği belirlenmiştir. İkinci çalışmada MET'in, birlikte kullanıldığında CIS'in antitümoral etkisini azalttığı gözlemlenmiştir.

Sun ve ark. (99) tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada, Güneydoğu Asya'da ve Güney Çin'de yaygın olan baş ve boyun kanser hücresi NPC hücre hattı

kullanılmıştır. Bu hücre hatlarında MET (5, 10, 15, 20 ve 25 mmol/L) ve CIS (2, 4, 8, 16 ve 32 μ mol/L) tek başlarına ve aynı zamanda kombinasyonunun (4 μ mol/L CIS+5 mmol/L&10 mmol/L MET) kullanılması sonucu, CIS'in proliferasyon ve saldırı (invazyon) üzerine etkisinin arttığını gözlemlemişlerdir.

2014 yılında Damelin ve ark. (122) tarafından yapılan çalışmada ise, oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hücre hattı kullanılmış, ve MET'in hücre çoğalmasını azalttığını gözlemlemişlerdir. Fakat, MET'in CIS toksisitesine karşı, OSCC'yi indükleyerek koruduğu gözlemlenmiştir. Aynı yılda Yajun Wang ve diğerleri (123) tarafından aynı yılda yapılan çalışmada, MET, CIS'e karşı duyarlandırılmış A549 insan akciğer kanser hücrelerine tek ve CIS ile birlikte uygulanmıştır. Yapılan araştırmanın sonucunda, MET'in A549/CDDP hücrelerinin döngüsünü yavaşlattığı ve apoptozu indüklediği görülmüştür. Sonuç olarak, MET'in ilaca karşı hassaslaştırıcı özelliğinin de olabileceği ileri sürülmüştür.

Wang ve ark. (124) tarafından 2015 yılında yapılan araştırmada, T24 ve BIU-87 mesane kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda, 2 μ M CIS ile 0.5 μ M MET birlikte kullanıldığında antitümör etkide artış görülmüştür. Li ve ark. (125) tarafından 2016 yılında yayınlanan bir araştırmada sıçan karaciğer hücre hattı olan NRK-52E hücre hattı kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, MET'in tübüler hücrelerde AMPK α aktivasyonunu ve otofaj indüksiyonunu uyararak CIS kaynaklı tübüler hücre apoptozuna ve dolayısıyla, akut böbrek hasarına karşı koruyucu olabileceği ileri sürülmüştür

Kolon ve mide kanserinin yanısıra pankreas kanserini tedavi etmede kullanılan antimetabolit bir kemoterapötik GEM'dir. Pankreas kanseri, Amerika'da kadın ve erkeklerde kanser kaynaklı ölüme neden olan 4. en yaygın etmendir (106), ve belirgin bir erken uyarı veya semptomu bulunmadığından genellikle hastalık çok ilerlediği zaman kendini belli etmektedir. GEM klinik uygulamalarda önemli bir yarar sağlarken, pankreas kanserine etkisi kemorezistans nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle GEM'in ve diğer kemoterapötiklerin birlikte kullanımının hayatta kalma oranlarını iyileştireceği düşünülmektedir (107). GEM ile MET etkileşimiyle ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte, 2012 yılında Kawanami ve ark. (126) tarafından yapılan çalışmada, GEM'in bir insan anti IGF-1R monoklonal antikoru olan R1507 ve/veya MET ile birlikte kullanımını ve bir apoptoz proteini

inhibitörü indüksiyonunu incelemiştir. Pankreas kanser hücrelerine, GEM, R1507 ve MET ile ayrı ayrı ve kombinasyonları halinde muamele edilmiştir. Bu muamelenin etkileri hücre proliferasyonu, apoptoz ve apoptozu inhibisyonu ile ilgili genlerin ekspresyonu ve kemoterapi direnci için değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, GEM ile R1507 ve/veya MET kombinasyonunun, GEM'e farklı duyarlılığı ile birlikte pankreas kanseri hücre hatlarında aditif etkiye sahip olduğu; ancak, GEM'in kemoterapi direncini indükleyebileceği görülmüştür.

2015 yılında ise Chai ve ark. (127) tarafından yapılan araştırmada pankreas kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda, MET'in pankreas kanser hücrelerini GEM'e karşı hassaslaştırdığını böylece kanserli bölgenin çıkarılmasından sonra, pankreas kanseri olan hastalarda GEM kullanımının fayda sağlayabileceği görülmüştür.

2016 yılında yeni bir çalışma da Shi ve ark. (128) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, insan CFPAC-1 pankreas kanser hücre hattı *in vitro* ve *in vivo* olarak kullanılmıştır. Bu hücre hattına MET ve GEM hem tek başlarına hem de kombinasyon halinde uygulanmış olup kistik fibrozis pankreatik adenokarsinoma (CFPAC-1) hücre canlılığı hücre sayımı kiti-8 analizi ile apoptozu ise annexin V ve propidiyum iyodür kullanılarak FACS yöntemi ile yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, MET tedavisinin farelerin ksenografları çekilmiş ve CFPAC-1 hücrelerindeki büyümenin azaldığı gözlenmiştir. β hücreli lenfoma (XL) (Bcl-xL), apoptozu azaltan bir protein olan survivin ve siklin D1 seviyelerinde azalma olurken, p53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevine sahip Bcl-2-ile ilişkili X proteini (Bax) ve kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime giren bir kaspaz proteini olan kaspaz-3 seviyelerinde artış görülmüştür. MET, GEM ile birlikte kullanıldığında etkileşme gözlenmiş ve GEM'in etkisi açısından bir sinerjizma belirlenmiştir. MET'in, hücre çoğalmasını azaltarak ve apoptozu indükleyerek pankreas kanser hücrelerinin büyümesinde gerilemeye neden olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda, GEM ile birlikte kombinasyon halinde kullanıldığında bu etkilerde sinerjizmaya neden olduğu da belirtilmektedir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| β -Nicotinamid adenin dinükleotit tarafından azaltılmış dipotasyum tuzu (β -NADH) | Sigma Aldrich |
| Annexin V | Biologend |
| Dimetilsülfoksit, DMSO | Sigma Aldrich |
| 2,4-Dinitrofenylhidrazin, DNPH | Merck |
| Dokсорubisin | Cayman |
| Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri | Biological Industries |
| Dulbecco's Phosphated Buffer Saline (DBPS) | Biological Industries |
| Fötal Bovin Serum (FBS) | Biological Industries |
| Gemsitabin | Cayman |
| Glutamin | Biological Industries |
| Metformin | Sigma Aldrich |

| | |
|------------------------|--------------------------|
| MTT | Sigma Aldrich |
| Penisilin-Streptomisin | Biological Industries |
| Propidiyum İyodür | BioLegend |
| Sisplatin | Cayman |
| Sodyum hidroksit | Riedel-de- Haën |
| Sodyum piruvat | Sigma Aldrich |
| Tripan Mavisi | Sigma Aldrich |
| Tripsin EDTA | Gibco |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich |

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

| | |
|--------------------------------|--------------------|
| 5 ml'lik Dispenser | Eppendorf |
| 5 ml'lik steril plastik pipet | Krigen |
| 10 ml'lik steril plastik pipet | LP Italiana SPA |

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| 15 ml'lik Falkon tüp | Kirgen |
| 25 ml'lik steril plastik pipet | Cellstar |
| 25 cm ² 'lik flask | Corning |
| 48 kuyucuklu mikroplak | Collstar |
| 50 ml'lik Falkon tüp | Kirgen |
| 75 cm ² 'lik flask | Corning |
| 96 kuyucuklu mikroplak | Collstar |
| 10 µl'lik pipet | Socorex |
| 100 µl'lik pipet ucu | Eppendorf |
| 100 µl'lik mikropipet | Socorex |
| 1000 µl'lik pipet ucu | Eppendorf |
| 1000 µl'lik pipet | Socorex |
| Buzdolabı | Arçelik |
| Cam pastör pipeti | İnterlab |
| Deiyonize su cihazı | Barnstead EASYpure UV |

| | |
|-------------------------|---------------------------------|
| Derin Dondurucu (-20°C) | Arçelik AEG-1350S |
| Derin Dondurucu (-80°C) | Revco |
| Etüv | Dedeoğlu |
| FACS Cihazı | FACSARIA Becton Dickinson |
| Handystep | Brand |
| Hassas Terazı | Mettler Toledo |
| Hücre Dondurma Tüpü | Kirgen |
| Işık Mikroskobu | Leica |
| İnkübatör | Heraeus |
| Kapaklı tüp (1.5 ml) | Eppendorf |
| Laminar Akımlı Kabin | Holten Laminair |
| Multipipet | Socorex |
| Neubauer Camı | Marienfeld |

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| Otoklav | Monarch |
| Otomatik Pipetör | Topscien |
| Rezervuar | Isolab |
| Santrifüj | Heraeus, Hettich |
| Su Banyosu | Termal® Laboratory Tools |
| UV Spektrofotometre | Shimadzu |
| Yatay Çalkalayıcı | Edmund Bühler |

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Kullanılan hücre hatlarının çoğaltılabilmesi için kullanılacak besiyeri 500 ml Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine %10 Fötal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 Glutamin eklenerek hazırlanmıştır.

Metformin Stok Çözeltisinin Hazırlanması (50 mM)

MET için 50 mM konsantrasyonda stok çözelti hazırlanabilmesi için 82,81 mg MET 10 ml besiyeri (DMEM) içinde çözülmüştür.

Metformin Dilüsyonlarının Hazırlanması (25 mM)

1 ml 25 mM MET dilüsyon çözeltisi hazırlanabilmesi için 500 µl 50 mM MET stok çözeltiden Falcon tüpe alınıp besiyeri ile hacmine tamamlanmıştır.

Doksorubisin Stok Çözeltisinin Hazırlanması (2 mM)

2 mM DOX stok çözeltisi için 1,16 mg DOX tartılıp DPBS ile çözülerek hazırlanır.

Doksorubisin Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması (100 µM)

1 ml 100 µM DOX ara stok çözelti hazırlamak için 2 mM'lık stok çözeltiden 50 µl alınıp 950 µl DMEM eklenerek hazırlanır.

Sisplatin Stok Çözeltisinin Hazırlanması (4 mM)

4 mM konsantrasyonda stok çözelti hazırlanabilmesi için 1,200 mg CIS 1 ml DPBS içerisinde çözülmüştür.

Sisplatin Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması (100µ M)

1 ml 100 µM CIS ara stok çözeltisi için 25 µl 4 mM'lık stok çözeltiden alınıp 975 µl DMEM eklenerek hazırlanır.

Gemcitabin Stok Çözeltisinin Hazırlanması (4 mM)

4 mM konsantrasyonda stok çözelti hazırlanabilmesi için 1,199 mg GEM 1 ml DPBS içerisinde çözülmüştür.

Gemcitabin Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması (100µ M)

1 ml 100 µM GEM ara stok çözeltisi için 25 µl 4 mM'lık stok çözeltiden

alınıp 975 µl DMEM eklenerek hazırlanır.

MTT Çözeltisinin Hazırlanması (5 mg/ml)

MTT çözeltisi hazırlanabilmesi için 5 mg MTT hassas terazide tartularak 1 ml DPBS içinde çözülerek hazırlanmıştır.

NADH-Piruvat Çözeltisinin Hazırlanması (1 mg/ml NADH ve 0,75 mM Piruvat)

1 mg/ml NADH çözeltisi hazırlayabilmek için 10 mg NADH 10 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. 0,75 mM piruvat çözeltisi hazırlanabilmesi için 0,83 mg piruvat 10 ml saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

HCl Çözeltisinin Hazırlanması (1 mM)

%37'lik (12,07 M) HCl çözeltisinden 4,143 ml alınmıştır. 50 ml'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

DNPH Çözeltisinin Hazırlanması (5 mM)

5 mM DNPH çözeltisi hazırlayabilmek için 9,91 mg DNPH 10 ml 1 M HCl içinde çözülerek hazırlanmıştır.

NaOH Çözeltisinin Hazırlanması (4 mM)

1,6 g NaOH 10 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Hücre Kültürü

Çalışmada iki ayrı hücre hattı kullanılmıştır. Söz konusu hücreler, insan karaciğer kanser hücresi (HepG2) ve HeLa türevi insan serviks kanser hücresi (Hep2) hücre hatlarıdır. Her iki hücre hattı da epiteliyal ve tutunan hücre hatlarıdır. Hücreler, DMEM besiyeri içerisinde 75 cm²'lik hücre kültürü plaklarına ekilerek, 37°C'de %5 CO₂ salınım şartlarını sağlayan inkübatör ortamında çoğaltılmıştır.

3.4.2. Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak uygun hücre sayısının ve maruziyet dozlarının belirlenebilmesi amacıyla, daha önce yapılan araştırmalar incelenmiş, denenmesi planlanan hücre sayılarına karar verilerek deneysel uygulamalar başlatılmıştır.

Bu amaçla, 24 saat önce ekilerek tutunmaları sağlanmış HepG2 ve Hep2 hücrelerinin bulunduğu kültür plaklarından hücre üzerindeki besiyeri ile birlikte ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Tutunmuş haldeki hücreler 5 ml DPBS eklenerek yıkanmıştır. Daha sonra, plaklara 3 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve hücreler 4 dk inkübatörde tutularak süspande edilmiştir. Takiben, ışık mikroskopunda hücrelerin tamamının tutundukları yerden ayrılarak süspande hale geldikleri kontrol edilmiştir ve ortama 7 ml besiyeri eklenerek tripsin-EDTA'nın etkisi ortadan kaldırılmıştır. Hücreler steril bir pipet ile homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra, süspande hücrenin 1 ml'si steril bir tüpe alınmış, bu hücre çözeltisinin 10 µl'si üzerine 90 µl tripan mavisi (%0,4) eklenerek karıştırılmıştır (hücreler bu şekilde 1/10 oranında dilüe olmuştur). Hücreleri içeren bu karışımdan 10 µl Neubauer hücre sayım camı üzerine uygulanarak ışık mikroskopu altında canlı hücre sayımı yapılmıştır. Cam üzerindeki dört ayrı bölmeden elde edilen hücre sayılarının ortalamaları alınmış ve aşağıdaki formülde yerine koyularak 1 ml besiyeri için hücre sayısı elde edilmiştir. Daha sonra besiyeri ile süspande edilen hücre hacmine uygun olarak elde edilen hücre sayısı hesaplanmış ve analizlere geçilmiştir.

Hücre sayısı: Sayılan hücre \times Dilüsyon oranı $\times 10^4$

Hücreler, yeterli sayıda çoğaltıldıktan ve sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakta her bir kuyucuk için 10×10^3 , 25×10^3 ve 50×10^3 hücre olacak şekilde besiyeri içinde ekilerek tutanmalarının sağlanabilmesi için 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 salınım şartlarında inkübe edilmiştir. HepG2 ve Hep2 hücre hattına, 24 saatin sonunda MET ve söz konusu sitotoksik ilaçlar sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de gösterilen dozlar halinde eklenerek 24, 48 ve 72 saat için maruziyet başlatılmıştır. Maruziyet sonrasında yapılan MTT testlerine göre diğer hücre sayıları ile kıyaslandığında hücrelerin sitotoksik cevabının tekrarlanabilir şekilde alınabildiği sayı olan kuyucuk başına 25×10^3 hücre seçilmiş ve deneylere bu hücre sayısı ile devam edilmiştir.

3.4.3. Maruziyet Dozlarının Belirlenmesi

Hücre sayısının ve maruziyet dozlarının belirlenmesini takiben, çalışmanın devamında kullanılması planlanan dozlar, 96 kuyucuklu plakta MTT testi yapılarak belirlenmiştir.

Hücrelerin ekilmesinden 24 saat sonra, hücrelerin plaklara tutunma durumları kontrol edilmiş, üstteki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. HepG2 hücre hattında, MET için en yüksek 25 mM'dan, sitotoksik ilaçlar için ise 50 μM 'dan başlanarak ve 1/5 oranında seyreltilerek 8 farklı konsantrasyon üçlü tekrarlar halinde denenmiştir. Hep2 hücre hattında ise, HepG2 hücre hattında kullanılan MET dozlarının yanı sıra 10 mM eklenirken DOX, CIS ve GEM için 100 μM 'dan başlanarak 1/5 seyreltme ile 8 farklı konsantrasyon denenmiştir.

Tablo 3.1. HepG2 hücre hattı için kullanılan ilaç dozları

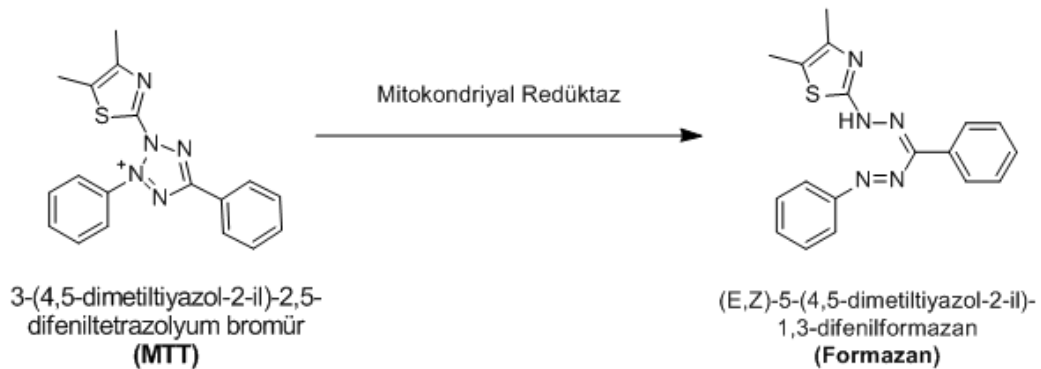
| MET | DOX | CIS | GEM |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 25 mM | 50 μM | 50 μM | 50 μM |
| 5 mM | 10 μM | 10 μM | 10 μM |
| 1 mM | 2 μM | 2 μM | 2 μM |
| 0,2 mM | 0,4 μM | 0,4 μM | 0,4 μM |
| 0,04 mM | 0,08 μM | 0,08 μM | 0,08 μM |
| 0,008 mM | 0,016 μM | 0,016 μM | 0,016 μM |
| $1,6 \times 10^{-3}$ mM | $3,2 \times 10^{-3}$ μM | $3,2 \times 10^{-3}$ μM | $3,2 \times 10^{-3}$ μM |
| $0,32 \times 10^{-3}$ mM | $0,64 \times 10^{-3}$ μM | $0,64 \times 10^{-3}$ μM | $0,64 \times 10^{-3}$ μM |

Tablo 3.2. Hep2 hücre hattı için kullanılan ilaç dozları

| MET | DOX | CIS | GEM* |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 25 mM | 100 µM | 100 µM | 100 µM |
| 10 mM | 20 µM | 20 µM | 20 µM |
| 5 mM | 4 µM | 4 µM | 4 µM |
| 1 mM | 0,8 µM | 0,8 µM | 0,8 µM |
| 0,2 mM | 0,16 µM | 0,16 µM | 0,16 µM |
| 0,04 mM | 0,032 µM | 0,032 µM | 0,032 µM |
| 0,008 mM | 6,4x10 ⁻³ µM | 6,4x10 ⁻³ µM | 6,4x10 ⁻³ µM |
| 1,6x10 ⁻³ mM | 1,28x10 ⁻³ µM | 1,28x10 ⁻³ µM | 1,28x10 ⁻³ µM |
| 0,32x10 ⁻³ mM | | | |

3.4.4. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT)

Testi

**Şekil 3.1.** MTT reaksiyonu (129)

Hücrelerin canlılığını değerlendirmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılan yöntemlerden biri de *3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür* (MTT) testidir. Bu yöntemin temelinde, kolorimetrik olarak hücrenin metabolik aktivitesi değerlendirilmektedir. MTT testinin amacı, çoğalan canlı hücreler tarafından artan dehidrogenaz aktivitesine bağlı olarak mitokondriyal redüktaz enzimi ile tetrazolyumdan oluşan mor renkli formazan kristallerinin absorbansının kolorimetrik olarak spektrofotometrede ölçülmesidir (Şekil 3.1). Yapılan çalışmada, sitotoksik ilaçların tek başına ve MET ile kombinasyonları uygulandığında hücre canlılığı üzerine etkisi, Ohguro ve ark. (130) tarafından yapılan MTT denemesi

modifiye edilerek uygulanan bu analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir.

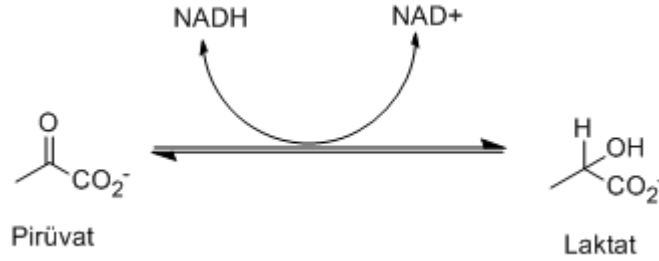
Hücreler 25×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-kuyucuklu plaklara üçlü şekilde ekilmiş ve tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, besiyerleri uzaklaştırılarak önceden farklı dozlarda DMEM içerisinde hazırlanan sitotoksik ilaçlar tek başlarına ve MET ile kombinasyonları halinde hazırlanmış çözeltilerinden 200 µl/kuyucuk eklenmiştir.

DOX (0,08 µM, 0,016 µM ve $3,2 \times 10^{-3}$ µM), CIS (2,0 µM, 0,4 µM ve 0,08 µM) ve GEM (0,4 µM, 0,08 µM ve 0,016 µM) tek başına ve MET (10 mM, 1 mM, 0,2 mM ve 0,04 mM) ile kombinasyonları halinde HepG2 hücre hattına uygulanmıştır. Hep2 hücre hattına ise DOX (100 µM, 20 µM, 4 µM ve 0,8 µM), CIS (100 µM, 20 µM, 4 µM ve 0,8 µM) ve GEM (100 µM, 20 µM, 4 µM ve 0,8 µM) tek başlarına ve MET (10 mM ve 1 mM) ile kombinasyonları halinde uygulanmıştır.

24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 farklı zaman diliminde maruziyet gerçekleştirilmiştir. Deney sırasında, ayrıca, herhangi bir ilaç uygulanmayan negatif kontrol olarak kullanılan hücreler de ekilmiştir. Bütün maruziyet sürelerinin sonrasında hücre canlılığını belirlemek için, MTT kullanılmıştır. Bu amaçla, 10 µl DPBS içinde çözülmüş olan MTT her bir kuyucuğa ilaç çözeltilerinin dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmasını takiben eklenmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazan kristalleri 90 µl DMSO eklenerek çözülmüş, 15 dk yatay çalkalayıcıda karıştırılarak 570 nm' de absorbans değerleri ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan hücrelerin absorbans değeri %100 kabul edilerek, sitotoksik ilaçların uygulandığı hücrelerin absorbans değerlerine göre hücre canlılık %'leri hesaplanmıştır.

Bu test 3 kere tekrarlanmıştır.

3.4.5. LDH Salınımı Analizi



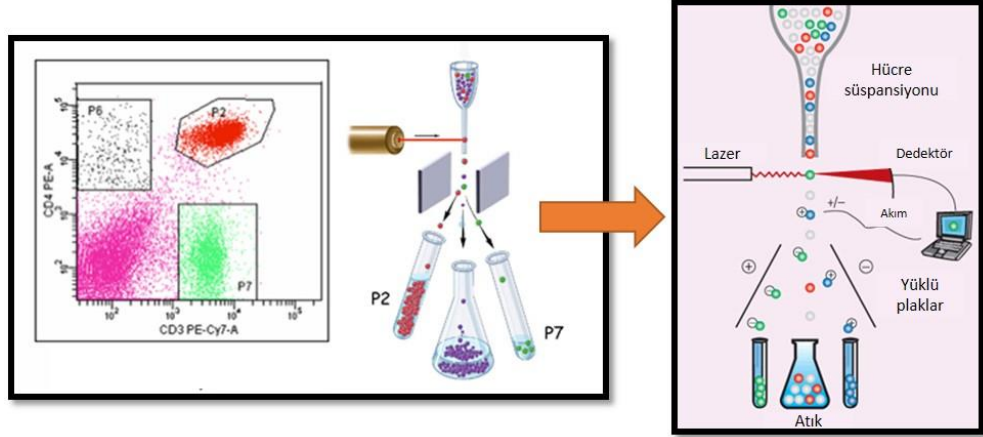
Şekil 3.2. LDH reaksiyonu (131)

Laktat dehidrogenaz (LDH) canlılarda bulunan bir oksidoredüktaz enzim olup, hücre hasarının olduğu durumlarda hücre dışına salınabilmektedir. Pirüvatın laktata dönüşümü sırasında NADH katalizör görevi görerek NAD^{+} 'ya dönüşür. Söz konusu reaksiyon, Şekil 2.2'de özetlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, LDH ölçümlerinin yapılabilmesi için Schlinkert ve ark. (132) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Hücre hasarını değerlendirmek amacıyla, söz konusu ilaçlara MTT analizinde anlatıldığı şekilde maruz bırakılan hücrelerin üzerlerindeki besiyerinden 10 μl 'lik bir kısmı bir başka 96-kuyucuklu mikropolağa alınmıştır. Üzerlerine 1 mg/ml NADH ve 0.75 mM pirüvat içeren çözelti karışımından 50 μl eklenmiş ve 30 dk. 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, 1 M HCl asit içinde çözünen 5 mM 2,4-dinitrofenilhidrazinden (DNPH) 50 μl hacimde eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında, 4 M NaOH çözeltisinden 50 μl ilave edilerek oluşan rengin absorbans değerleri spektrofotometrik olarak 410 nm'de okunmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılan hücrelerin absorbans değeri %100 kabul edilerek, sitotoksik ilaçların uygulandığı hücrelerin absorbans değerlerine göre hücre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.4.6. Floresans Tarafından Aktive Edilmiş Hücre Sıralaması (FACS)

Analizi



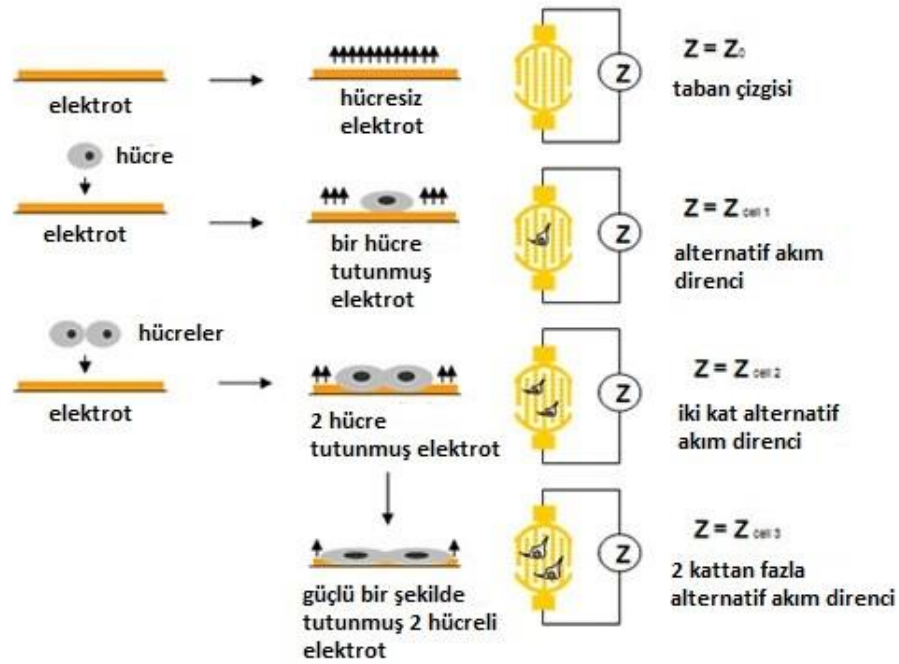
Şekil 3.3. FACS çalışma prensibi (133)

FACS, akım sitometrinin (flow sitometri) özgün bir alt tipi olup, analizinin temeli, akım sitometri cihazında tanımlanacak hücrelerin durumunu değerlendirmek amacıyla apoptoz antikoru olan annexin V ve propidiyum iyodür [PI] ile işaretlenerek belirlenmesine dayanır. Sağlıklı canlı hücrelerde, hücre zarının iç yüzeyinde fosfolipidlerden biri olan fosfatidilserin yerleşmiştir. Hücre apoptoza uğradığında ise normalde iç yüzde bulunan bu fosfolipid, hücre zarının dış yüzüne döner ve bu değişim hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olup, floressein gibi floresan bir boya ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilmektedir. Floressein-Anneksin-V (FITC-Anneksin V) kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı akım sitometri ile ölçülebilmektedir. Apoptotik hücreleri, aynı şekilde boyanabilen nekrotik hücrelerden ayırmak için ikinci boya olarak PI eklenmektedir. PI, hem akım sitometrisinde hücre canlılığını veya hücre döngüsü analizinde DNA içeriğini değerlendirmek için hem de mikroskopta çekirdek ve DNA içeren organelleri görüntülemek için DNA boyası olarak kullanılmaktadır (134). Normal hücreler her iki boya ile de boyanmazken, apoptotik hücreler FITC-Anneksin V ile boyanmakta, nekrotik hücrelerde ise her iki boya da görülmektedir Akım

sitometri tekniği kullanılarak hücrelerin boyanma durumlarına göre canlı, apoptotik ve nekrotik hücre oranları belirlenmektedir (135).

Bu analizin yapılması için; hücreler 48 kuyucuklu plaklara 50×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ikili şekilde ekilmiş ve 24 saat tutunmaları için 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda besiyerleri alınarak önceden belirli dozlarda hazırlanmış ilaçların tek başlarına ve kombinasyonlarının %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 Glutamin içeren Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içerisinde hazırlanmış çözeltileri 400 μl /kuyucuk olarak eklenmiş ve 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrasında, ölü hücreleri de toplamak amacıyla hücrelerin üzerlerindeki besiyerleri hücrelerin toplanacağı tüplere alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Hücreleri süspande etmek için 100 μl Tripsin EDTA eklenmiş ve 4 dk inkübatörde bekletilmiştir. 4 dakika sonunda 400 μl DMEM eklenerek tripsin EDTA'nın etkinliği durdurulmuştur. Hücreler, önceden besiyerlerinin konulup santrifüjün yapıldığı plastik tüplere eklenmiş ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml DPBS içinde süspande edilmiştir. Süspande hücreler, santrifüjlendikten sonra üzerlerindeki DPBS uzaklaştırılarak çökmeleri sağlanmıştır. Hücreler 2 defa soğuk hücre boyama tamponu ile yıkanmıştır. Annexin V'in konsantrasyonu, bağlayıcı tampon ile 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen hücre solüsyonundan 100 μl (1×10^5 hücre) Falcon tüpüne alınmıştır. 5 μl Annexin-V-FITC ve 10 μl Propidyum İyodür eklendi ve yavaşça karıştırılıp, 15 dk oda ısısında, karanlıkta inkübe edildikten sonra 400 μl Annexin V Bağlayıcı Tampon (1X) eklenmiştir. Saniyede geçen hücre sayısı 10×10^3 hücre sayısının altında olmayacak şekilde cihazın hızı ayarlanmış, cihazda numune çalkalayıcı (*sample agitation*) kapatılarak okutulmuştur. Cihazda yapılan ayarlamalar sonucunda tüplerin tek tek analizi yapılmıştır.

3.4.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (XCELLigence)



Şekil 3.4. Gerçek zamanlı hücre analizi (XCELLigence) prensibi (136)

XCELLigence sisteminde hücreler canlı şekilde takip edilebilmektedir. Sistemin temeli, gerekli alternatif akım direncinin ölçülebilmesi için alt yüzeyine altın mikro elektrotlar yerleştirilmiş özel e-plaklar kullanılarak hücrenin sayısı, canlılığı, morfolojisi hakkında kantitatif bilgi elde edilmesidir. Hücre indeksi arttıkça, söz konusu akım direnci artmakta ve hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi hakkında bilgi alınabilmektedir.

Tez çalışmasında, hücreler ekilmeden önce e-plağa 100 μl DMEM eklenmiş, söz konusu plak XCELLigence cihazına yerleştirilerek cihaz kalibrasyonları yapılmıştır. Gerekli ayarlamalar sonrasında, besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış, 200 μl 'de 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre hatları kuyucuklara ekilmiştir. 24 saat sonunda, hücrelerin tutunmasını takiben ilaç maruziyetleri başlatılmıştır. Bu amaçla, ilaçlar HepG2 ve Hep2 hücre hatları için sırasıyla Tablo 3.1 ve 3.2'de verilen dozlarda tek başlarına ve MET ile kombinasyonları şeklinde içeren besiyerlerinden kuyucuklara 100'er μl eklenerek 5 gün boyunca hücrelerin proliferasyonu takip edilmiştir.

3.4.8. İstatistiksel Değerlendirme

Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler IBM SPSS Statistics Version 23 programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), LSD testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

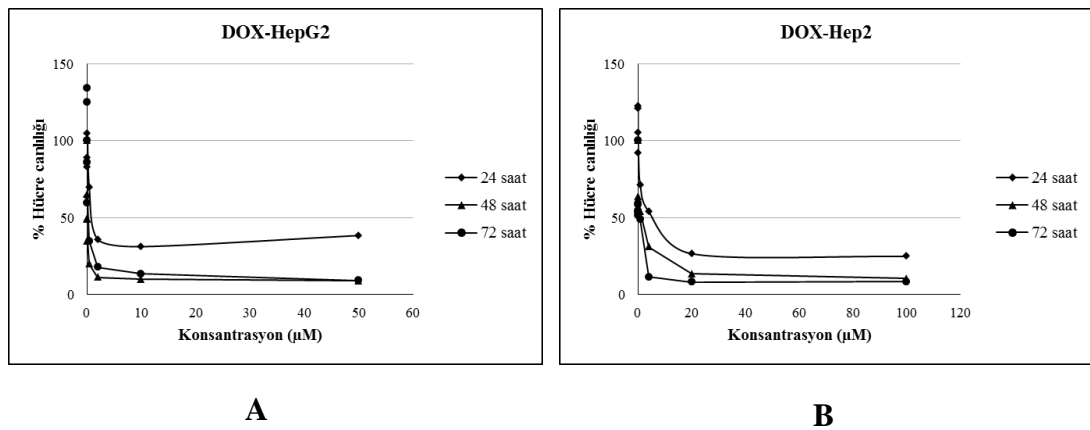
4. BULGULAR

4.1. MTT Testi ile Elde Edilen Hücre Canlılığı Sonuçları

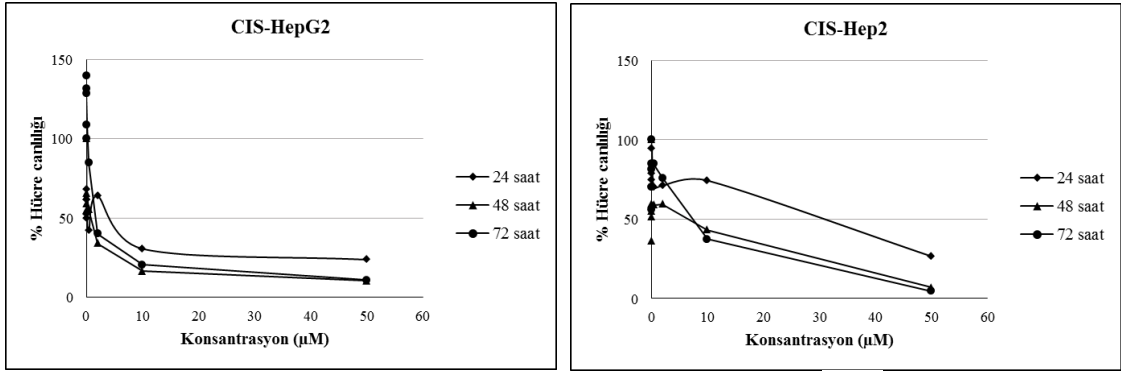
Hücre hasarının belirlenebilmesi için en temel testlerden biri olan ve hücrenin metabolik aktivitesinin önemli bir göstergesi olan MTT testi kullanılmıştır.

4.1.1. Sitotoksik İlaçların IC₅₀ Değerleri

Ana deneylere geçilmeden önce, en ideal sitotoksik cevabın alındığı sürenin belirlenebilmesi amacıyla yöntemler bölümünde HepG2 ve Hep2 için sırasıyla Tablo 3.1 ve 3.2’de verilen dozlarda ilaçlar hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Her bir sitotoksik ilaç için MTT testleri ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.’te verilmektedir. Uygulama sürelerinin hepsi için hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 4.1. ve Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Yapılan analizler sonunda literatür çalışmalarında da belirtildiği şekilde sitotoksitenin değerlendirilebilmesi için en uygun sürenin 48 saat olduğu belirlenmiştir. Hep2 hücre hattında GEM için bir kemorezistans olduğu belirlenmiş, IC₅₀ değeri bu nedenle hesaplanamamıştır.



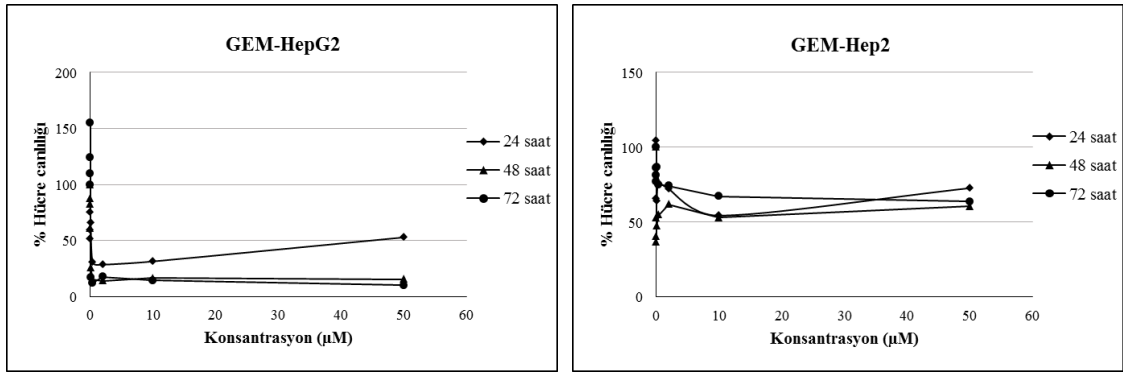
Şekil 4.1. Doksorubisin (DOX) için 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrası HepG2 (A) ve Hep2 (B) hücre hatlarındaki hücre canlılığı sonuçları



A

B

Şekil 4.2. Sisplatin (CIS) için 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrası HepG2 (A) ve Hep2 (B) hücre hatlarındaki hücre canlılığı sonuçları



A

B

Şekil 4.3. Gemsitabin (GEM) için 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrası HepG2 (A) ve Hep2 (B) hücre hatlarındaki hücre canlılığı sonuçları

Tablo 4.1. HepG2 hücre hattı için IC₅₀ değerleri

| | 24 saat | 48 saat | 72 saat |
|-----|---------|----------------------------|----------------------------|
| DOX | 1,33 µM | 11,91x10 ⁻³ µM | 141,31x10 ⁻³ µM |
| CIS | 5,34 µM | 381,06x10 ⁻³ µM | 12,18 µM |
| GEM | 0,17 µM | 51,54x10 ⁻³ µM | 50,24x10 ⁻³ µM |

Tablo 4.2. Hep2 hücre hattı için IC₅₀ değerleri

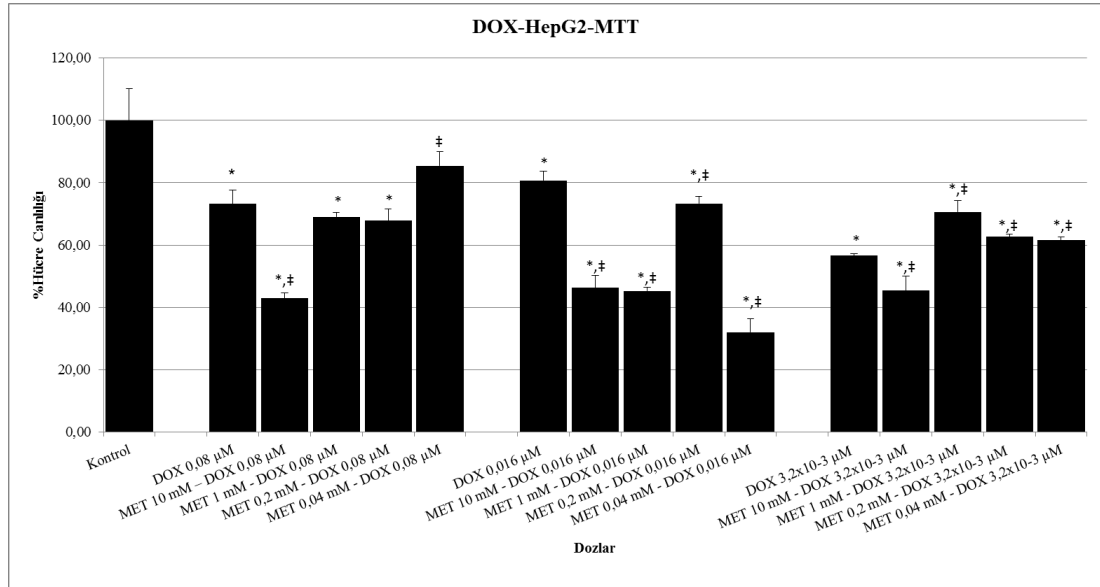
| | 24 saat | 48 saat | 72 saat |
|------------|----------|---------|---------|
| DOX | 6,31 µM | 1,36 µM | 0,73 µM |
| CIS | 35,44 µM | 6,62 µM | 7,37 µM |
| GEM | - | - | - |

4.1.2. MET'in Kemoterapötik İlaçların Sitotoksiteleri Üzerine Etkisi

Yapılan MTT testleri sonucunda HepG2 hücre hattı için, belirlenen IC₅₀ değerlerinin üstünde ve altındaki dozları içerecek şekilde, 4 farklı dozda MET ve 3 farklı dozda sitotoksik ilaç seçilmiş ve her bir sitotoksik ilaç, hem tek başına hem de MET'in farklı dozları ile kombinasyon halinde uygulanmıştır. MET'in ilaçların sitotoksiteleri üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi amacıyla 48 saat süreyle DOX (0,08 µM, 0,016 µM ve 3,2x10⁻³ µM), CIS (2,0 µM, 0,4 µM ve 0,08 µM) ve GEM (0,4 µM, 0,08 µM ve 0,016 µM) tek başına ve MET (10 mM, 1 mM, 0.2 mM ve 0,04 mM) ile kombinasyonları halinde HepG2 hücre hattına uygulanmıştır.

Hep2 hücre hattı için ise 2 farklı doz MET ve HepG2 hücre hattında olduğu şekilde IC₅₀ değerininin üstünde ve altındaki dozlar seçilerek, 3 doz sitotoksik ilaç hem tek başına hem de MET'in farklı dozları ile kombinasyon halinde uygulanmıştır. Bu dozlar, DOX için 100 µM, 20 µM, 4 µM ve 0,8 µM, CIS için 100 µM, 20 µM, 4 µM ve 0,8 µM ve GEM için 100 µM, 20 µM, 4 µM ve 0,8 µM olup tek başlarına ve MET'in 10 mM ve 1 mM konsantrasyonları ile kombinasyonları halinde uygulanmıştır. Hücre canlılığı 48 saatlik uygulamayı takiben MTT testi ile değerlendirilmiştir.

Şekil 4.4'te ve Tablo 4.3'te gösterilen değerlere göre, DOX'in her bir dozu 10 mM MET ile birlikte HepG2 hücre hattına uygulandığında, DOX'in bu hücre hattındaki etkinliğinin arttığı gözlenmiştir.

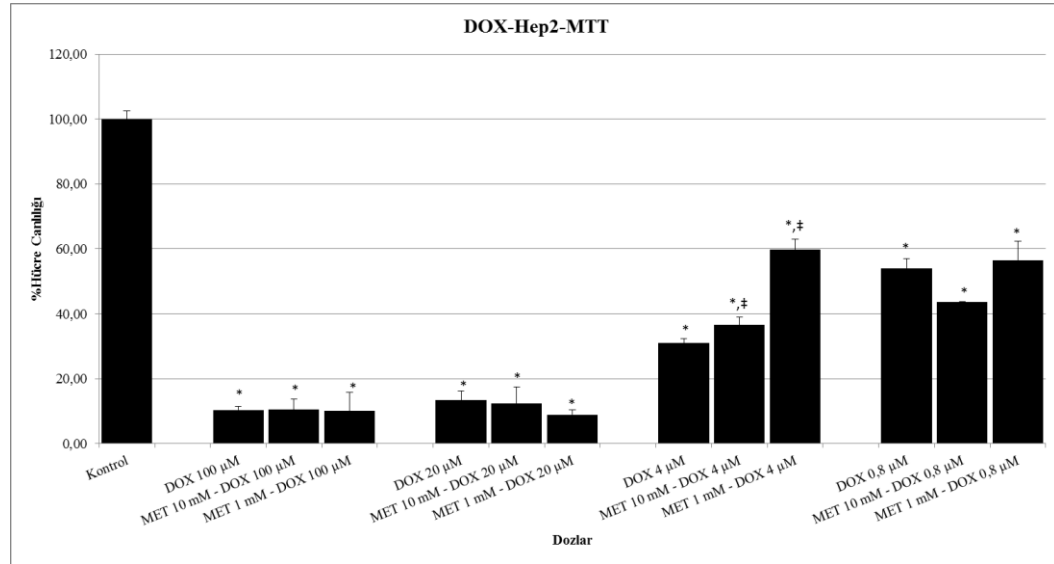


Şekil 4.4. HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi, *Kontrolden farklı, ‡ Aynı dozda tek başına uygulanan DOX'den farklı, $p < 0,05$

Tablo 4.3. HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

| HepG2 | % Ortalama±SS |
|-------------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±10,23 |
| DOX 0,08 µM | 73,19±4,47 |
| MET 10 mM – DOX 0,08 µM | 42,93±1,69 |
| MET 1 mM - DOX 0,08 µM | 69,06±1,42 |
| MET 0,2 mM - DOX 0,08 µM | 67,82±3,76 |
| MET 0,04 mM - DOX 0,08 µM | 85,38±4,47 |
| DOX 0,016 µM | 80,75±2,92 |
| MET 10 mM - DOX 0,016 µM | 46,30±4,00 |
| MET 1 mM - DOX 0,016 µM | 45,24±1,15 |
| MET 0,2 mM - DOX 0,016 µM | 73,27±2,41 |
| MET 0,04 mM - DOX 0,016 µM | 32,11±4,30 |
| DOX 3,2x10-3 µM | 56,64±0,68 |
| MET 10 mM - DOX 3,2x10-3 µM | 45,34±4,66 |
| MET 1 mM - DOX 3,2x10-3 µM | 70,61±3,68 |
| MET 0,2 mM - DOX 3,2x10-3 µM | 62,63±0,81 |
| MET 0,04 mM - DOX 3,2x10-3 µM | 61,56±1,07 |

HepG2 hücre hattında görülen etkinin aksine, Şekil 4.5'te ve Tablo 4.4'te görüldüğü gibi Hep2 hücre hattında her iki MET dozunun 4 µM DOX ile kombinasyon edildiğinde antagonistik bir etki gösterdiği, diğer dozlarda ise MET'in DOX'in etkinliği üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

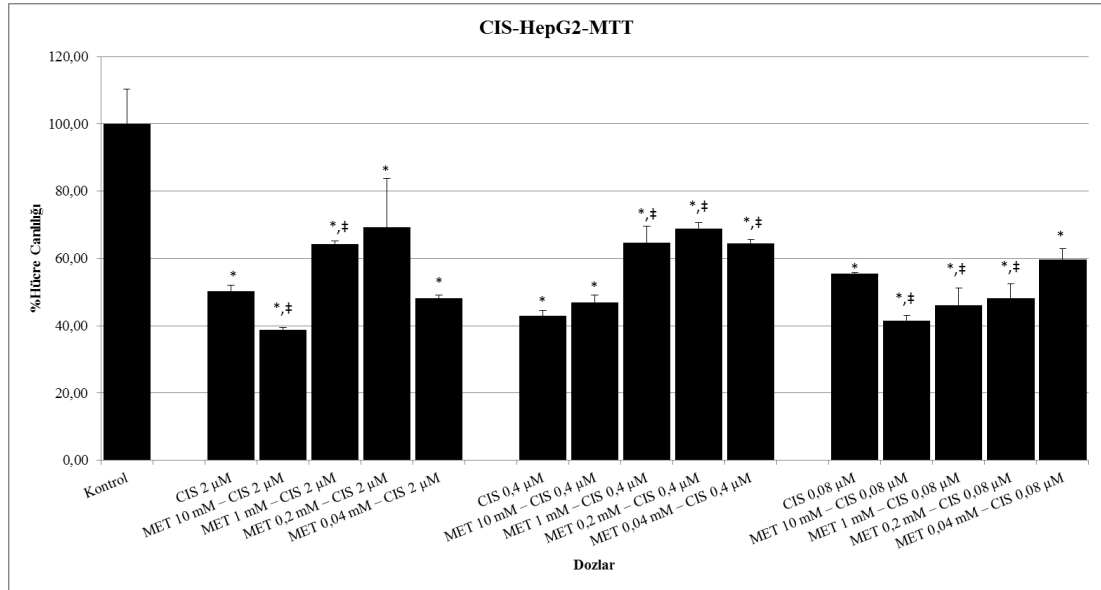


Şekil 4.5. Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi, *Kontrolden farklı, †Aynı dozda tek başına uygulanan DOX'den farklı, ‡p<0,05

Tablo 4.4. Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

| Hep2 | % Ortalama±SS |
|------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±2,49 |
| DOX 100 µM | 10,34±1,13 |
| MET 10 mM - DOX 100 µM | 10,42±3,19 |
| MET 1 mM - DOX 100 µM | 10,03±5,64 |
| DOX 20 µM | 13,37±2,74 |
| MET 10 mM - DOX 20 µM | 12,24±5,17 |
| MET 1 mM - DOX 20 µM | 8,90±1,48 |
| DOX 4 µM | 30,95±1,32 |
| MET 10 mM - DOX 4 µM | 36,52±2,37 |
| MET 1 mM - DOX 4 µM | 59,84±3,07 |
| DOX 0,8 µM | 54,03±2,96 |
| MET 10 mM - DOX 0,8 µM | 43,61±0,04 |
| MET 1 mM - DOX 0,8 µM | 56,46±5,83 |

CIS'in MET ile birlikte ve tek başına HepG2 hücre hattına uygulandığında elde edilen hücre canlılığı değerleri Şekil 3.6'da verilmiştir. Tablo 3.5'te verilen değerlere bakıldığında, 0,04 mM, 0,2 mM ve 1 mM MET'in 0,4 µM CIS ile birlikte kullanımının antagonistik etki gösterdiği görülmüştür. Buna karşın, yüksek dozdaki (10 mM) MET'in 0,08 µM ve 2 µM CIS ile kombine sinerjistik etki gösterdiği saptanmıştır.

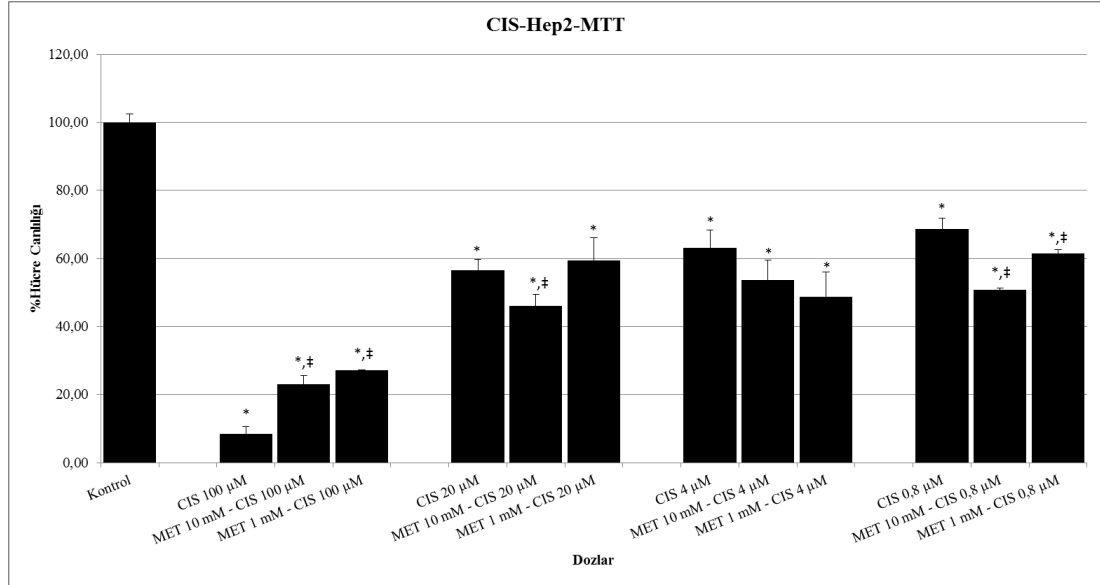


Şekil 4.6. HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi, *Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan CIS'den farklı, p<0,05

Tablo 4.5. HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

| HepG2 | % Ortalama±SS |
|---------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±10,23 |
| CIS 2 µM | 50,31±1,75 |
| MET 10 mM – CIS 2 µM | 38,73±0,72 |
| MET 1 mM – CIS 2 µM | 64,16±0,98 |
| MET 0,2 mM – CIS 2 µM | 69,20±14,49 |
| MET 0,04 mM – CIS 2 µM | 48,11±1,01 |
| CIS 0,4 µM | 42,92±1,47 |
| MET 10 mM – CIS 0,4 µM | 46,97±2,18 |
| MET 1 mM – CIS 0,4 µM | 64,71±4,91 |
| MET 0,2 mM – CIS 0,4 µM | 68,85±1,74 |
| MET 0,04 mM – CIS 0,4 µM | 64,47±1,23 |
| CIS 0,08 µM | 55,57±0,20 |
| MET 10 mM – CIS 0,08 µM | 41,55±1,45 |
| MET 1 mM – CIS 0,08 µM | 46,15±5,01 |
| MET 0,2 mM – CIS 0,08 µM | 48,11±4,40 |
| MET 0,04 mM – CIS 0,08 µM | 59,66±3,21 |

Hep2 hücre hattında ise, Tablo 4.6’da ve Şekil 4.7’de gösterilen sonuçlara göre 100 µM CIS, 1 mM ve 10 mM’lık MET dozları ile kombinasyonunun CIS’in etkisini azalttığı görülürken, 0.8 µM CIS’in MET ile birlikte uygulandığında sitotoksik etkisinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, 20 µM CIS’in etkisi 10 mM MET ile kombinasyonunda artarken, 1 mM MET ile etkide bir değişikliğe rastlanmamıştır.



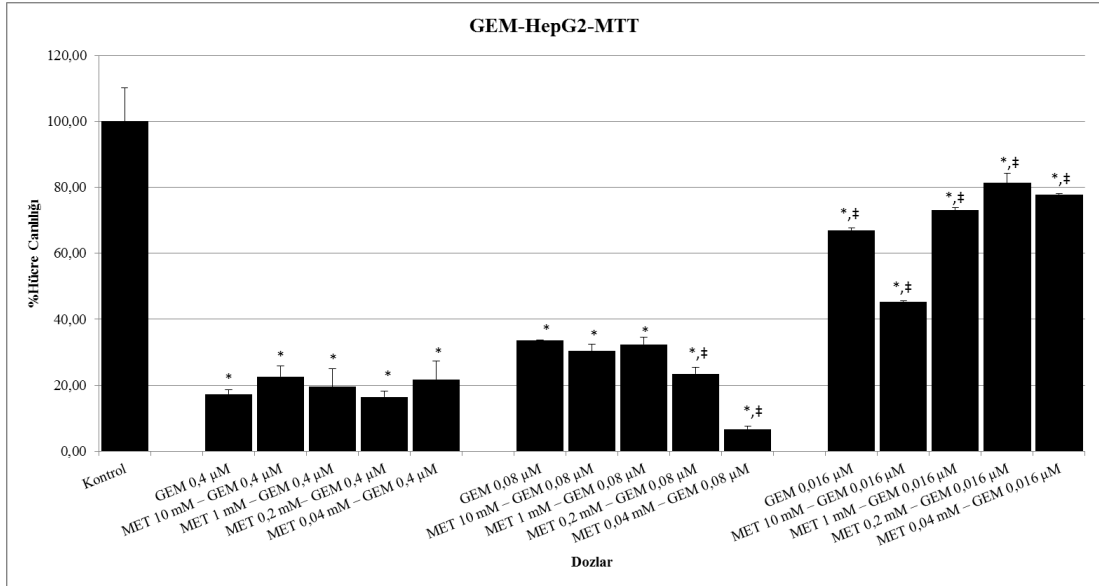
Şekil 4.7. Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi, *Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan CIS'den farklı, $p < 0,05$

Tablo 4.6. Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

| Hep2 | % Ortalama±SS |
|------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±2,49 |
| CIS 100 µM | 8,47±2,24 |
| MET 10 mM - CIS 100 µM | 23,18±2,46 |
| MET 1 mM - CIS 100 µM | 27,21±0,18 |
| CIS 20 µM | 56,62±3,09 |
| MET 10 mM - CIS 20 µM | 45,99±3,47 |
| MET 1 mM - CIS 20 µM | 59,49±6,73 |
| CIS 4 µM | 63,04±5,34 |
| MET 10 mM - CIS 4 µM | 53,59±5,91 |
| MET 1 mM - CIS 4 µM | 48,77±7,33 |
| CIS 0,8 µM | 68,64±3,22 |
| MET 10 mM - CIS 0,8 µM | 50,73±0,58 |
| MET 1 mM - CIS 0,8 µM | 61,57±1,07 |

GEM ile MET'in kombinasyonunun ve GEM'in tek başına HepG2 hücre hattına farklı dozlarda uygulandığında elde edilen hücre canlılığı sonuçları Şekil 4.8.'de ve Tablo 4.7'de verilmektedir. 0,4 µM GEM'in sitotoksik etkisinin sadece 10

mM MET ile birlikte uygulandığında azaldığı, 0.08 μ M GEM ile 0,2 mM ve 0,04 mM MET ile kombinasyonun uygulanmasıyla ise sitotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, 0.016 μ M GEM ile 10 mM MET kombinasyonu dışındaki MET dozlarındaki uygulamalarda sitotoksik etkinin azaldığı görülmüştür.

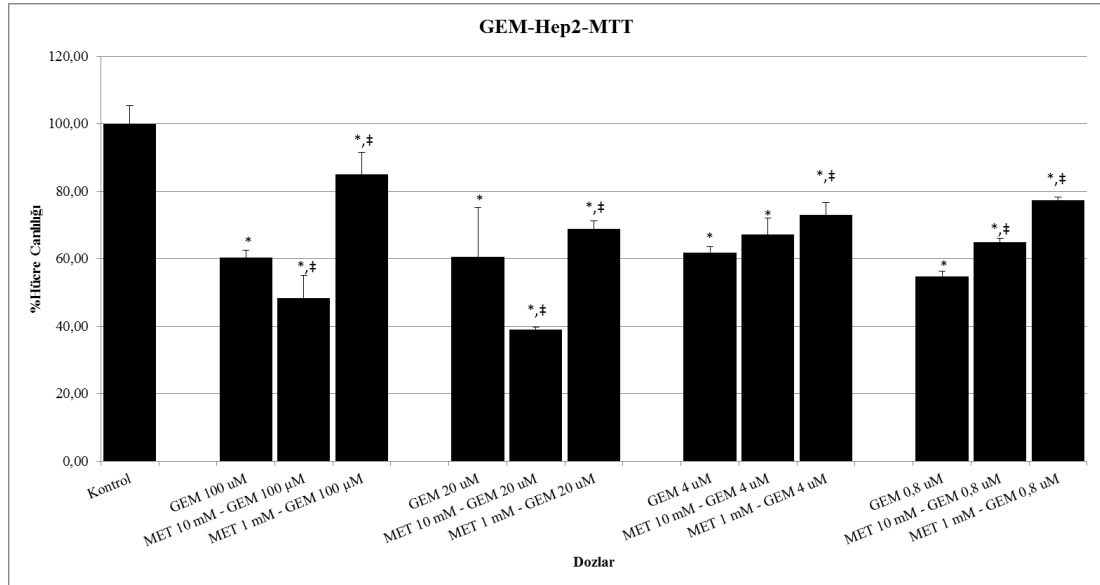


Şekil 4.8. HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi, *Kontrolden farklı, †Aynı dozda tek başına uygulanan GEM'den farklı, ‡p<0,05

Tablo 4.7. HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

| HepG2 | % Ortalama±SS |
|----------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±10,23 |
| GEM 0,4 µM | 17,32±1,31 |
| MET 10 mM – GEM 0,4 µM | 22,68±3,23 |
| MET 1 mM – GEM 0,4 µM | 19,53±5,47 |
| MET 0,2 mM – GEM 0,4 µM | 16,47±1,76 |
| MET 0,04 mM – GEM 0,4 µM | 21,79±5,47 |
| GEM 0,08 µM | 33,67±0,00 |
| MET 10 mM – GEM 0,08 µM | 30,40±2,04 |
| MET 1 mM – GEM 0,08 µM | 32,38±2,08 |
| MET 0,2 mM – GEM 0,08 µM | 23,52±1,82 |
| MET 0,04 mM – GEM 0,08 µM | 6,72±0,87 |
| GEM 0,016 µM | 66,85±0,84 |
| MET 10 mM – GEM 0,016 µM | 45,35±0,30 |
| MET 1 mM – GEM 0,016 µM | 73,06±0,79 |
| MET 0,2 mM – GEM 0,016 µM | 81,32±2,99 |
| MET 0,04 mM – GEM 0,016 µM | 77,79±0,41 |

Hep2 hücre hattında, 100 µM ve 20 µM GEM'in, sırasıyla 10 mM MET ile kombinasyonunun sinerjistik, 1 mM MET ile kombinasyonunun ise antagonistik etkiye neden olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.9 ve Tablo 4.8). Dolayısıyla, sadece 10 mM MET uygulamasıyla Hep2 hücrelerinde GEM'e karşı görülen direncin azaldığı ve hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü görülmüştür. Ancak, 0,8 µM ve 4 µM GEM, MET'in tüm dozları ile uygulandığında ise ilacın etkisinin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve/veya Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi, *Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan GEM'den farklı, $p < 0,05$

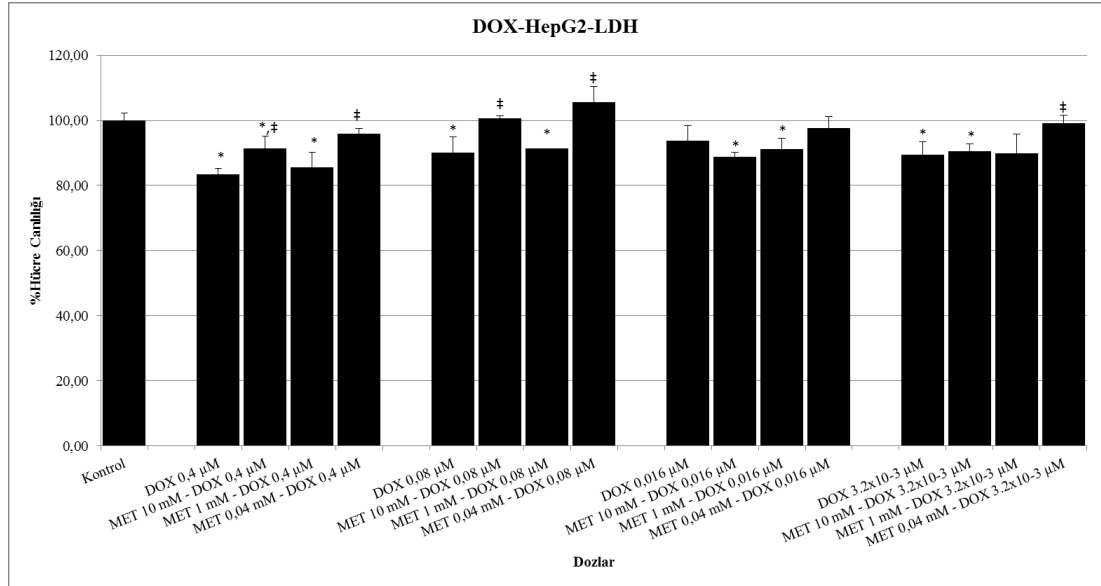
Tablo 4.8. Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

| Hep2 | % Ortalama±SS |
|------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±5,35 |
| GEM 100 uM | 60,33±2,09 |
| MET 10 mM - GEM 100 µM | 48,30±6,70 |
| MET 1 mM - GEM 100 µM | 84,93±6,67 |
| GEM 20 uM | 60,49±14,59 |
| MET 10 mM - GEM 20 uM | 39,02±0,79 |
| MET 1 mM - GEM 20 uM | 68,90±2,33 |
| GEM 4 uM | 61,80±1,83 |
| MET 10 mM - GEM 4 uM | 67,15±4,94 |
| MET 1 mM - GEM 4 uM | 73,01±3,56 |
| GEM 0,8 uM | 54,81±1,48 |
| MET 10 mM - GEM 0,8 uM | 64,91±1,20 |
| MET 1 mM - GEM 0,8 uM | 77,34±0,97 |

4.2. LDH Salınımı Testi ile Hücre Canlılığı Sonuçları

Hücre canlılığının önemli bir göstergesi olan ve hücre enerji metabolizmasında laktatın piruvata dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan LDH salınımı hücre hasarının belirlenebilmesi için kullanılmıştır. LDH, hasar gören hücrelerde salgılanan ve hastalıklar ve yaralanmalarda belirteç olarak kullanılan bir enzimdir.

Yapılan çalışmada, HepG2 hücre hattında DOX'in MET ile birlikte kullanılmasına bağlı olarak ortaya çıkan sitotoksik etkisindeki değişiklikler Şekil 4.10'da ve Tablo 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 0,4 μM ve 0,08 μM DOX'un 10 mM ve 0,04 mM MET ile birlikte uygulandığında sitotoksik etkide bir antagonizma olduğu görülmüştür.

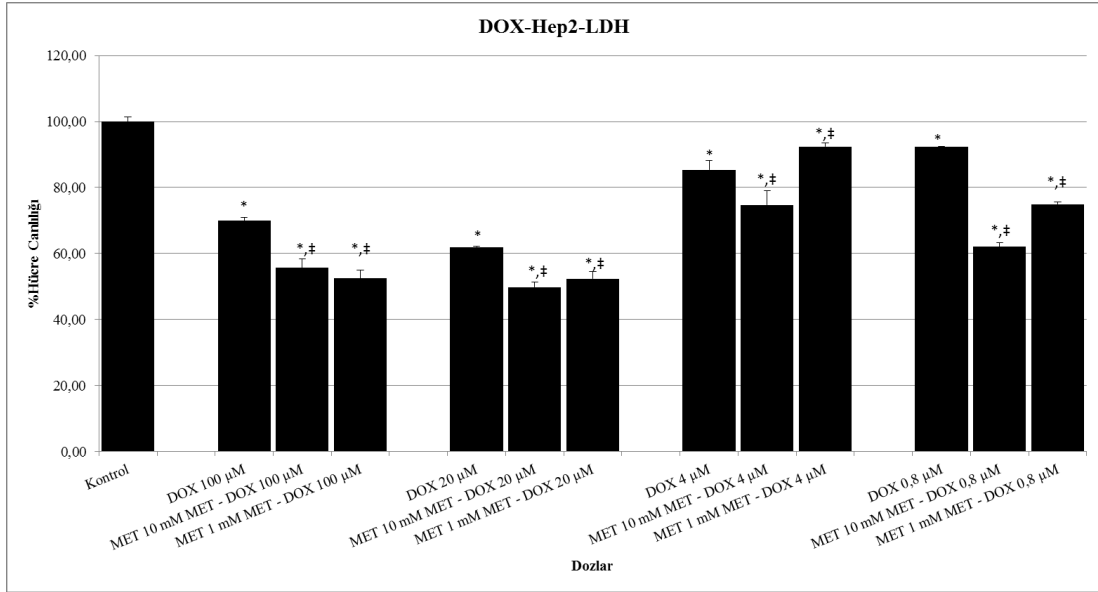


Şekil 4.10. HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi, *Kontrolde farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan DOX'den farklı, $p < 0,05$

Tablo 4.9. HepG2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi

| HepG2 | % Ortalama±SS |
|-------------------------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±2,34 |
| DOX 0,4 µM | 83,35±1,83 |
| MET 10 mM - DOX 0,4 µM | 91,38±3,77 |
| MET 1 mM - DOX 0,4 µM | 85,62±4,70 |
| MET 0,04 mM - DOX 0,4 µM | 95,99±1,54 |
| DOX 0,08 µM | 90,07±4,86 |
| MET 10 mM - DOX 0,08 µM | 100,57±0,85 |
| MET 1 mM - DOX 0,08 µM | 91,37±0,02 |
| MET 0,04 mM - DOX 0,08 µM | 105,72±4,73 |
| DOX 0,016 µM | 93,76±4,56 |
| MET 10 mM - DOX 0,016 µM | 88,74±1,54 |
| MET 1 mM - DOX 0,016 µM | 91,20±3,22 |
| MET 0,04 mM - DOX 0,016 µM | 97,55±3,75 |
| DOX 3.2x10 ⁻³ µM | 89,49±3,95 |
| MET 10 mM - DOX 3.2x10 ⁻³ µM | 90,49±2,28 |
| MET 1 mM - DOX 3.2x10 ⁻³ µM | 89,92±5,81 |
| MET 0,04 mM - DOX 3.2x10 ⁻³ µM | 99,05±2,51 |

Hep2 hücre hattında ise HepG2 hücre hattının aksine, Şekil 4.11’de ve Tablo 3.10’da görüldüğü gibi sitotoksik etkinin 10 mM MET ile kombinasyonlarında DOX’in tüm dozlarında arttığı görülmüştür. 1 mM MET ile DOX’in birlikte kullanıldığı kombinasyonlardan yalnızca 4 µM DOX’in etkisinin azaldığı, diğer dozlarda ise sinerjistik etkinin ortaya çıktığı belirlenmiştir.

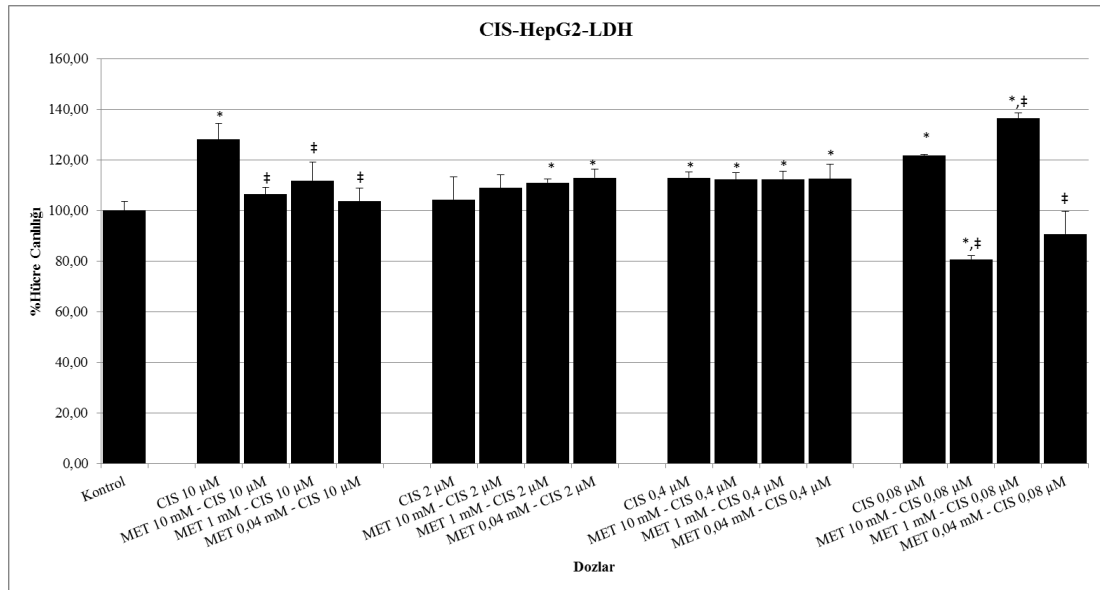


Şekil 4.11. Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi, *Kontrolden farklı, †Aynı dozda tek başına uygulanan DOX'den farklı, p<0,05

Tablo 4.10. Hep2 hücre hattındaki Doksorubisin (DOX) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi

| Hep2 | % Ortalama±SS |
|----------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±1,42 |
| DOX 100 µM | 69,89±1,14 |
| MET 10 mM MET - DOX 100 µM | 55,63±2,77 |
| MET 1 mM MET - DOX 100 µM | 52,47±2,53 |
| DOX 20 µM | 61,98±0,30 |
| MET 10 mM MET - DOX 20 µM | 49,77±1,46 |
| MET 1 mM MET - DOX 20 µM | 52,37±2,11 |
| DOX 4 µM | 85,32±2,93 |
| MET 10 mM MET - DOX 4 µM | 74,68±4,41 |
| MET 1 mM MET - DOX 4 µM | 92,41±1,21 |
| DOX 0,8 µM | 92,36±0,18 |
| MET 10 mM MET - DOX 0,8 µM | 62,03±1,20 |
| MET 1 mM MET - DOX 0,8 µM | 74,98±0,61 |

CIS'in kendisi ve MET ile olan kombinasyonları karşılaştırıldığında, Şekil 4.12'de ve Tablo 4.11'de gösterildiği şekilde, HepG2 hücre hattında özellikle 10µM konsantrasyonda sitotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir.

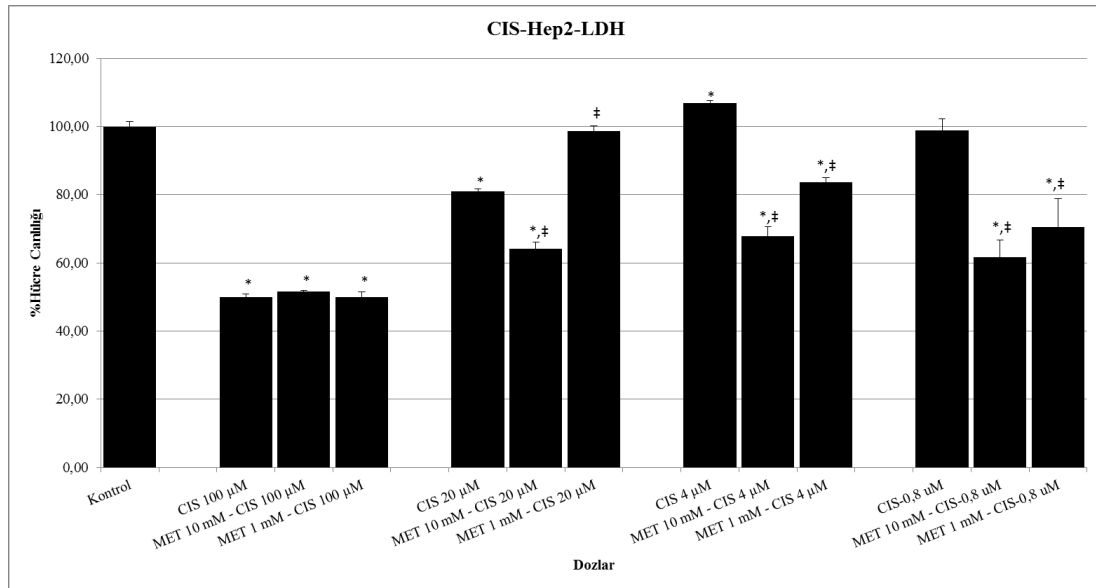


Şekil 4.12. HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi, *Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan CIS'den farklı, p<0,05

Tablo 4.11. HepG2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi

| HepG2 | % Ortalama±SS |
|---------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±3,50 |
| CIS 10 µM | 128,10±6,23 |
| MET 10 mM - CIS 10 µM | 106,45±2,74 |
| MET 1 mM - CIS 10 µM | 111,87±7,22 |
| MET 0,04 mM - CIS 10 µM | 103,81±5,09 |
| CIS 2 µM | 104,31±8,84 |
| MET 10 mM - CIS 2 µM | 108,86±5,16 |
| MET 1 mM - CIS 2 µM | 110,95±1,42 |
| MET 0,04 mM - CIS 2 µM | 112,86±3,55 |
| CIS 0,4 µM | 112,96±2,35 |
| MET 10 mM - CIS 0,4 µM | 112,34±2,49 |
| MET 1 mM - CIS 0,4 µM | 112,20±3,26 |
| MET 0,04 mM - CIS 0,4 µM | 112,46±5,68 |
| CIS 0,08 µM | 121,77±0,32 |
| MET 10 mM - CIS 0,08 µM | 80,67±1,55 |
| MET 1 mM - CIS 0,08 µM | 136,60±2,07 |
| MET 0,04 mM - CIS 0,08 µM | 90,76±9,01 |

Hep2 hücre hattında Şekil 4.13 ve Tablo 4.12’de görüldüğü gibi 4 µM ve 0,8 µM CIS’in MET’in her iki dozundaki kombinasyonu ile sinerjistik etki gösterdiği görülmüştür. Diğer yandan, 20 µM CIS ile 10 mM MET kombine edildiğinde sinerjistik etki görülürken, 1 mM MET ile antagonistik bir etki ortaya çıkmıştır. Ayrıca, 100 µM CIS ile 10 mM MET birlikte uygulandığında ise sitotoksik etkinin kısmen azaldığı belirlenmiştir.

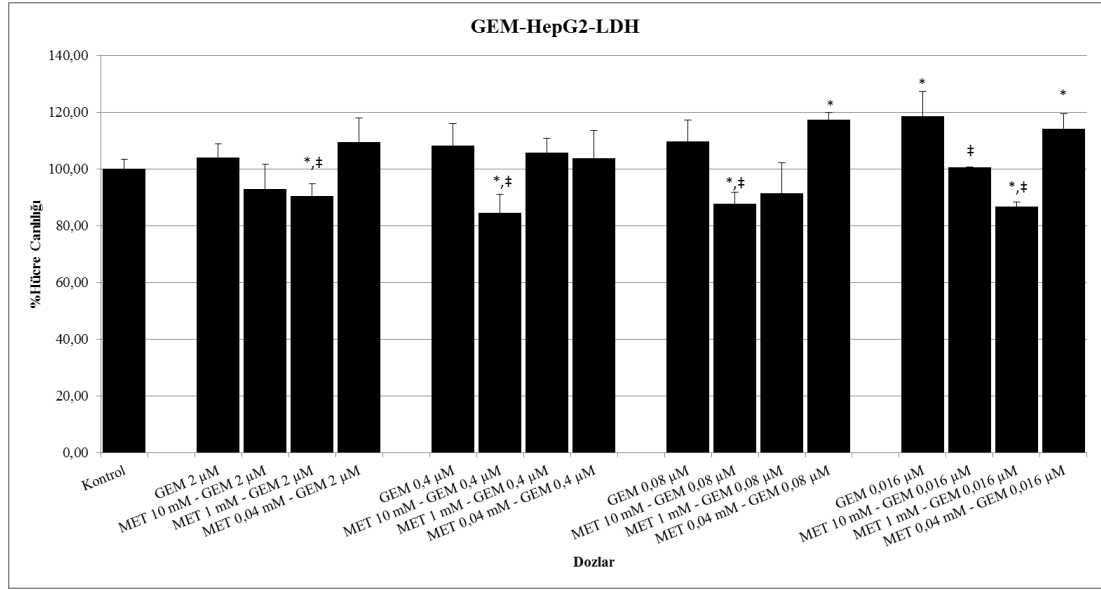


Şekil 4.13. Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi, *Kontrolde farklı, †Aynı dozda tek başına uygulanan CIS’den farklı, p<0,05

Tablo 4.12. Hep2 hücre hattındaki Sisplatin (CIS) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi

| Hep2 | % Ortalama±SS |
|------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±1,42 |
| CIS 100 µM | 49,96±0,89 |
| MET 10 mM - CIS 100 µM | 51,55±0,42 |
| MET 1 mM - CIS 100 µM | 49,92±1,71 |
| CIS 20 µM | 80,92±0,89 |
| MET 10 mM - CIS 20 µM | 64,16±1,93 |
| MET 1 mM - CIS 20 µM | 98,62±1,50 |
| CIS 4 µM | 106,92±0,75 |
| MET 10 mM - CIS 4 µM | 67,86±2,77 |
| MET 1 mM - CIS 4 µM | 83,77±1,32 |
| CIS-0,8 uM | 98,78±3,42 |
| MET 10 mM - CIS-0,8 uM | 61,65±5,09 |
| MET 1 mM - CIS-0,8 uM | 70,60±8,20 |

GEM'in tek başına ve MET ile kombinasyonlarının uygulama sonuçları karşılaştırıldığında HepG2 hücre hattında GEM'in 0,4 μ M, 0,08 μ M ve 0,016 μ M'lık dozları ile 10mM MET birlikte kullanıldığında sitotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, diğer dozlarında görülmemekle birlikte, 0,016 μ M GEM'in sitotoksik etkisi 1 mM MET ile kombine uygulandığında artmıştır (Şekil 4.14 ve Tablo 4.13).

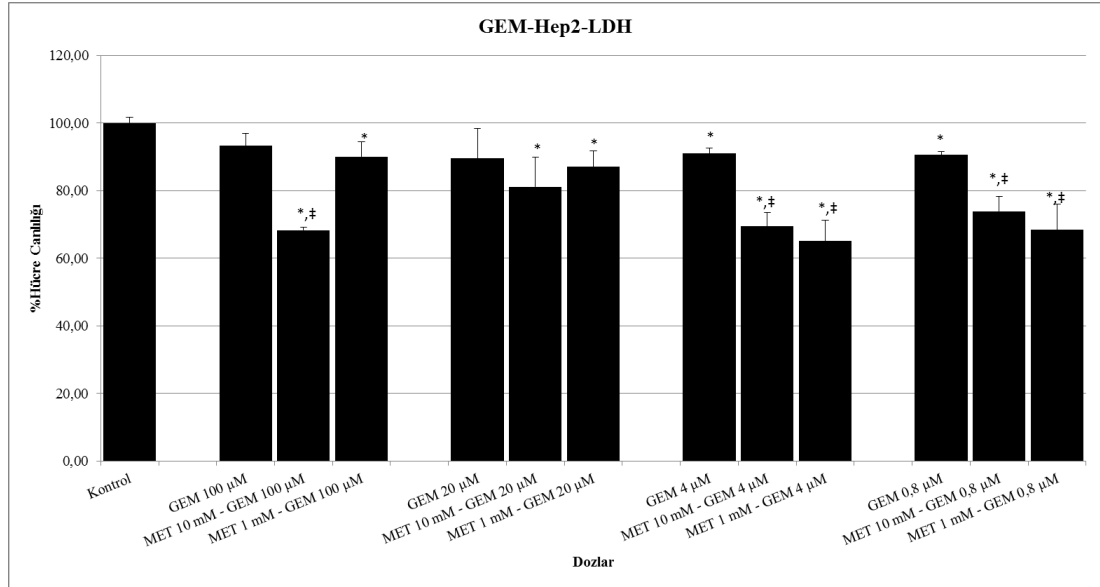


Şekil 4.14. HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi, *Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan GEM'den farklı, $p < 0,05$

Tablo 4.13. HepG2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi

| HepG2 | % Ortalama±SS |
|----------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±3,50 |
| GEM 2 µM | 104,03±4,91 |
| MET 10 mM - GEM 2 µM | 93,02±8,60 |
| MET 1 mM - GEM 2 µM | 90,45±4,33 |
| MET 0,04 mM - GEM 2 µM | 109,53±8,41 |
| GEM 0,4 µM | 108,14±7,78 |
| MET 10 mM - GEM 0,4 µM | 84,42±6,75 |
| MET 1 mM - GEM 0,4 µM | 105,85±5,04 |
| MET 0,04 mM - GEM 0,4 µM | 103,87±9,76 |
| GEM 0,08 µM | 109,80±7,41 |
| MET 10 mM - GEM 0,08 µM | 87,66±4,22 |
| MET 1 mM - GEM 0,08 µM | 91,34±10,83 |
| MET 0,04 mM - GEM 0,08 µM | 117,23±2,76 |
| GEM 0,016 µM | 118,62±8,67 |
| MET 10 mM - GEM 0,016 µM | 100,55±0,24 |
| MET 1 mM - GEM 0,016 µM | 86,76±1,61 |
| MET 0,04 mM - GEM 0,016 µM | 114,25±5,25 |

Hep2 hücrelerinde ise GEM'in tüm dozlarında 10 mM MET ile yapılan kombinasyonlarında sinerjistik etki gözlenmiştir. Buna ek olarak, 100 µM ve 20 µM GEM 1 mM MET ile kombine edildiğinde bir değişiklik gözlenmezken, 4 µM ve 0,8 µM GEM'in MET kombinasyonlarında sinerjistik etki görülmüştür (Şekil 4.15 ve Tablo 4.14).



Şekil 4.15. Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi, *Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan GEM'den farklı, p<0,05

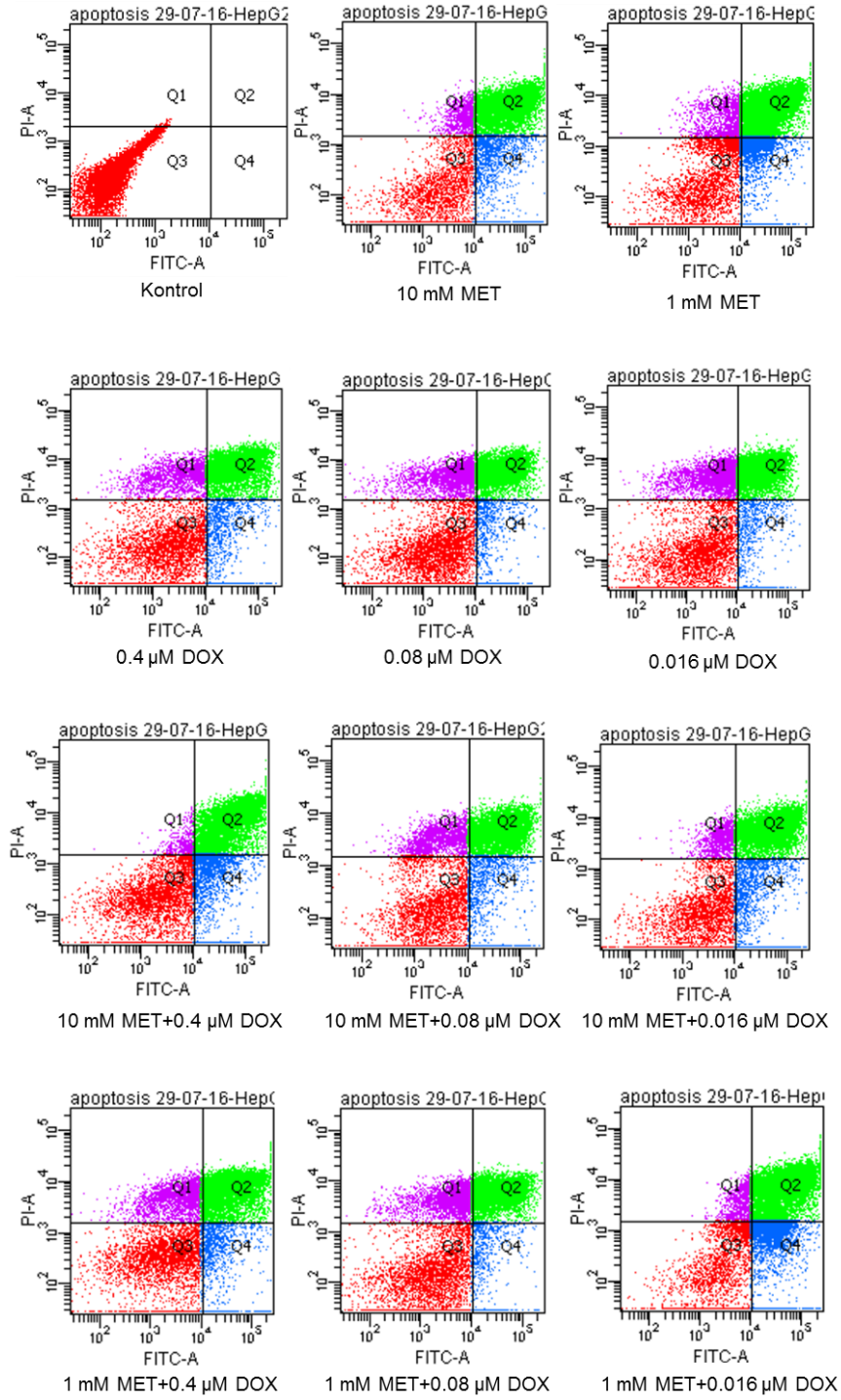
Tablo 4.14. Hep2 hücre hattındaki Gemsitabin (GEM) ve Metformin (MET) kombinasyonunun hücre hasarına etkisi

| Hep2 | % Ortalama±SS |
|------------------------|---------------|
| Kontrol | 100,00±1,64 |
| GEM 100 µM | 93,24±3,74 |
| MET 10 mM - GEM 100 µM | 68,26±0,93 |
| MET 1 mM - GEM 100 µM | 90,02±4,52 |
| GEM 20 µM | 89,53±8,79 |
| MET 10 mM - GEM 20 µM | 81,16±8,70 |
| MET 1 mM - GEM 20 µM | 87,03±4,66 |
| GEM 4 µM | 90,98±1,68 |
| MET 10 mM - GEM 4 µM | 69,42±4,07 |
| MET 1 mM - GEM 4 µM | 65,07±6,15 |
| GEM 0,8 µM | 90,54±1,10 |
| MET 10 mM - GEM 0,8 µM | 73,88±4,48 |
| MET 1 mM - GEM 0,8 µM | 68,39±7,52 |

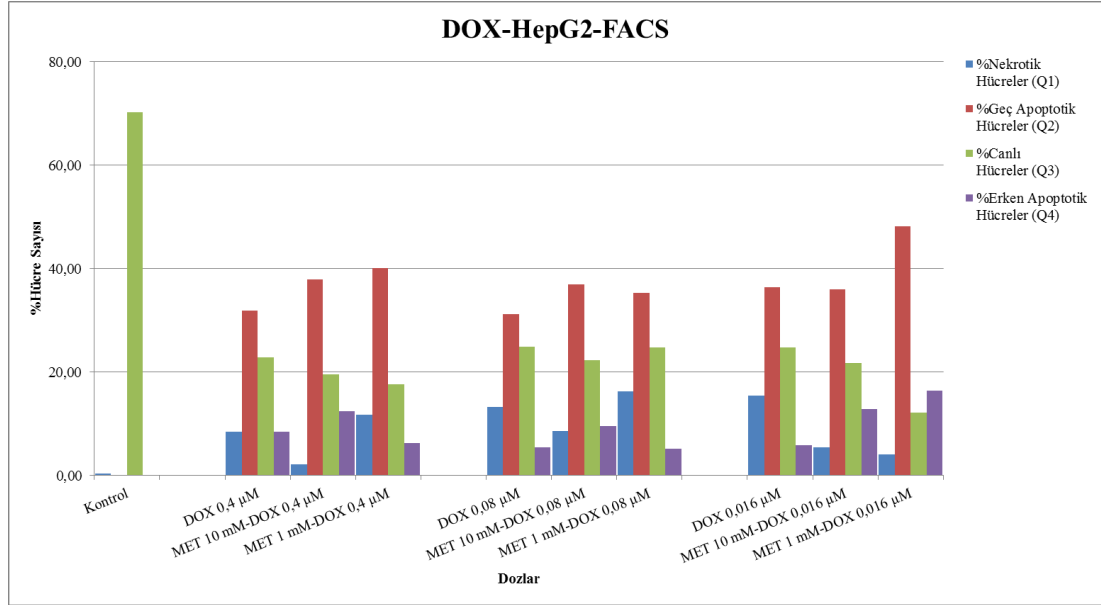
4.3. Floresans tarafından Aktive Edilmiş Hücre Sıralaması (FACS) ile Annexin V / Propidium İyodür Apoptoz Testi Sonuçları

Akım sitometrinin bir alt tipi olan FACS analizi ile apoptoz antikorları olan annexin V ve propidiyum iyodür (43) ile işaretlenerek hücre apoptozu belirlenmiştir. Analizden elde edilen grafiklerde, Q1, nekrotik, Q2 geç apoptoz evresindeki, Q3 canlı ve Q4 erken apoptoz evresindeki hücrelerin oranını göstermektedir.

DOX'in tek başına ve MET ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmektedir. Ayrıca, canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelere ait % oranları Tablo 4.15'te verilmiştir. 0,4 μ M DOX ile MET'in tüm dozlarının kombinasyonlarında canlı hücre oranları azalırken, geç apoptotik hücre oranları artmıştır. Bununla birlikte, 10 mM MET ile birlikte kullanıldığında erken apoptotik hücre oranı artmış, 1 mM MET kullanıldığında ise azalmıştır. Nekrotik hücrelerde bu durum tam tersi olup, 1 mM MET ile oran artarken, 10 mM'da azalmıştır.



Şekil 4.16. Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

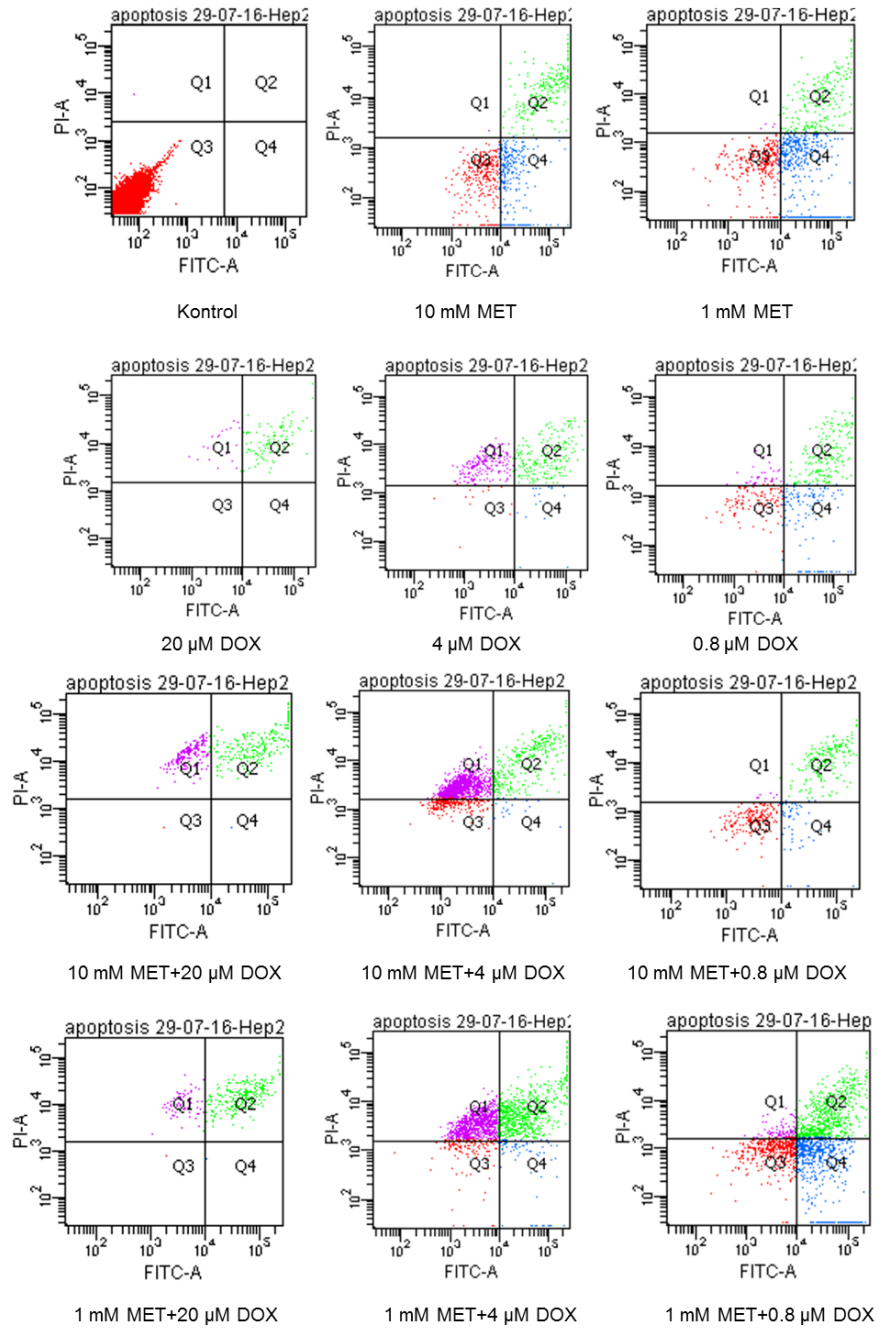


Şekil 4.17. HepG2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

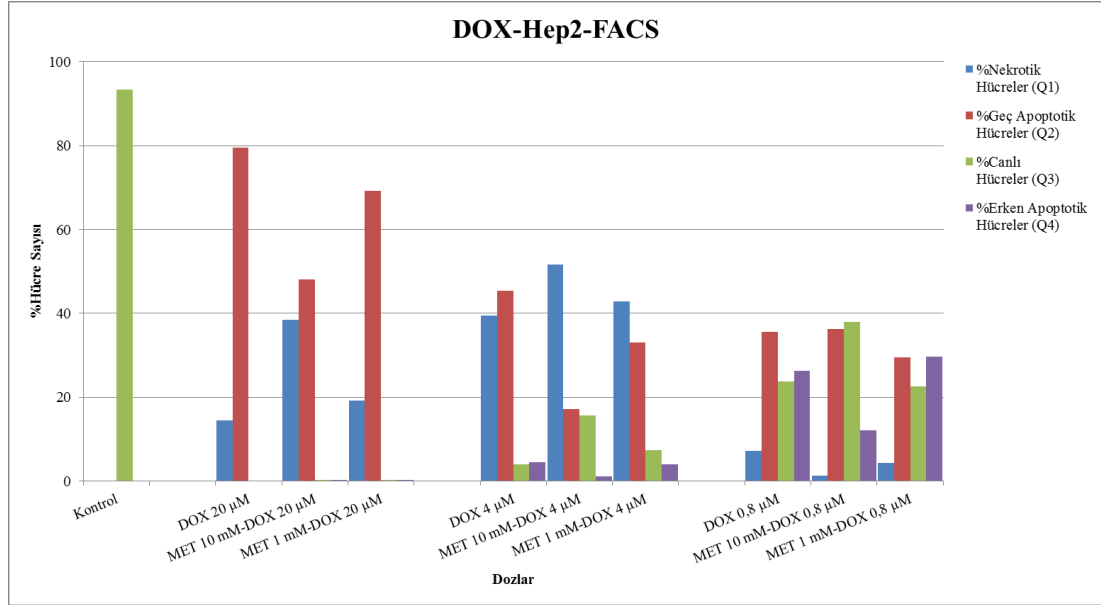
Tablo 4.15. HepG2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi

| HepG2 | %Nekrotik Hücreler (Q1) | %Geç Apoptotik Hücreler (Q2) | %Canlı Hücreler (Q3) | %Erken Apoptotik Hücreler (Q4) |
|--------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Kontrol | 0,4 | 0 | 70,2 | 0 |
| DOX 0,4 µM | 8,5 | 31,9 | 22,8 | 8,5 |
| MET 10 mM - DOX 0,4 µM | 2,1 | 37,9 | 19,5 | 12,4 |
| MET 1 mM - DOX 0,4 µM | 11,7 | 40,1 | 17,6 | 6,3 |
| DOX 0,08 µM | 13,2 | 31,2 | 24,9 | 5,5 |
| MET 10 mM - DOX 0,08 µM | 8,6 | 37 | 22,3 | 9,6 |
| MET 1 mM - DOX 0,08 µM | 16,3 | 35,3 | 24,8 | 5,2 |
| DOX 0,016 µM | 15,5 | 36,4 | 24,7 | 5,9 |
| MET 10 mM - DOX 0,016 µM | 5,4 | 36 | 21,7 | 12,9 |
| MET 1 mM - DOX 0,016 µM | 4,1 | 48,2 | 12,2 | 16,4 |

DOX'in tek başına ve MET ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilmektedir. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücelere ait % oranları Tablo 4.16'da verilmiştir. 20 μ M DOX ile MET'in tüm dozlarının birlikte kullanılması sonucu nekrotik hücre oranlarında artış görülürken geç apoptotik hücre oranlarında azalma gözlenmiştir. 4 μ M DOX ile MET'in tüm dozlarının kombinasyonlarında canlı hücre oranları artarken, geç apoptotik hücre oranları azalmıştır. Bununla birlikte, 10 mM MET ile birlikte kullanıldığında nekrotik hücre oranı artmış, erken apoptotik hücre oranı azalmıştır. 0,8 μ M DOX 10 mM MET ile birlikte kullanıldığında nekrotik ve erken apoptotik hücre oranları azalmış canlı hücre oranı artmıştır. 1 mM MET ile birlikte kullanımı sonucu geç apoptotik hücre oranında azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.18. Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre



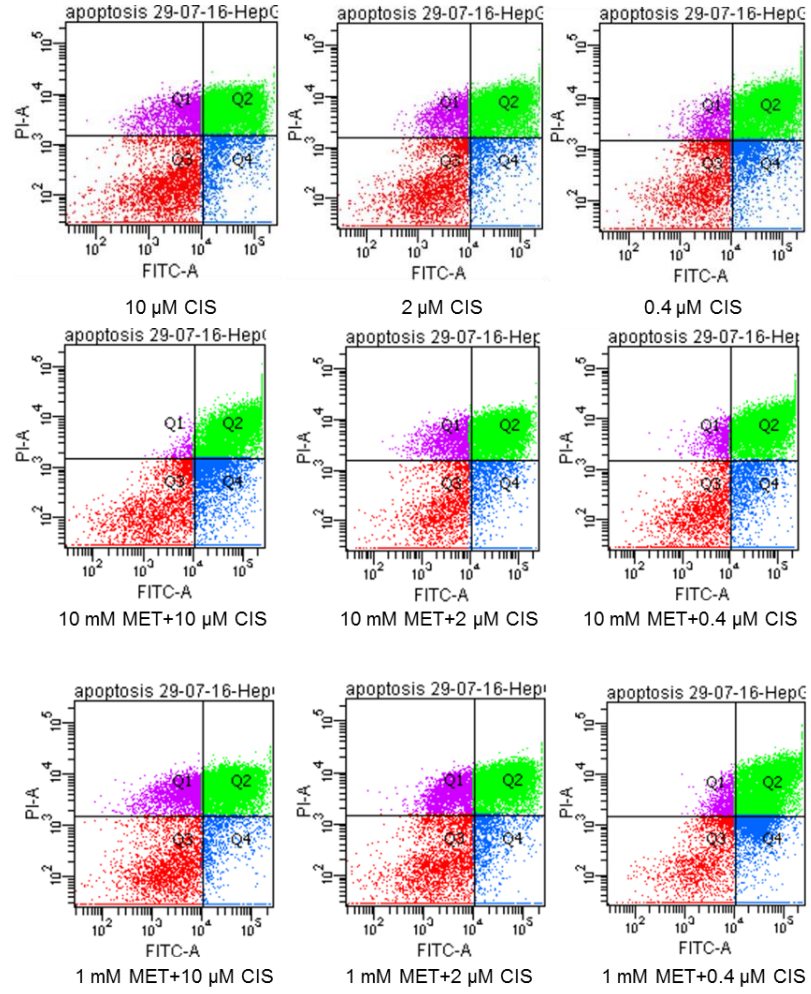
Şekil 4.19. Hep2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

Tablo 4.16. Hep2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi

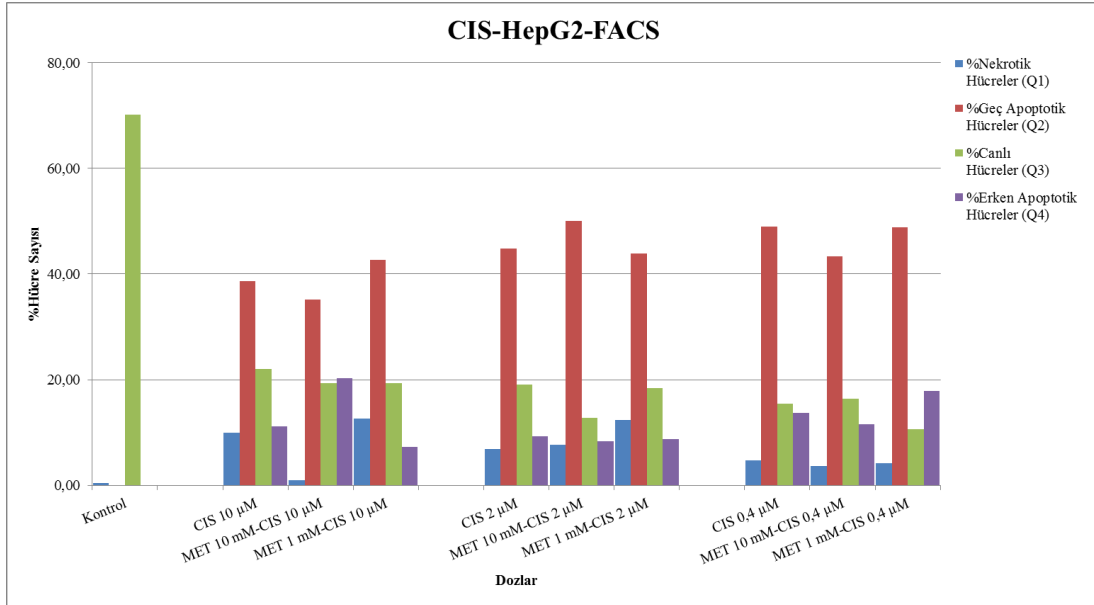
| Hep2 | %Nekrotik Hücreler (Q1) | %Geç Apoptotik Hücreler (Q2) | %Canlı Hücreler (Q3) | %Erken Apoptotik Hücreler (Q4) |
|------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Kontrol | 0 | 0 | 93,4 | 0 |
| DOX 20 µM | 14,4 | 79,5 | 0 | 0 |
| MET 10 mM - DOX 20 µM | 38,5 | 48 | 0,2 | 0,2 |
| MET 1 mM - DOX 20 µM | 19,1 | 69,2 | 0,3 | 0,3 |
| DOX 4 µM | 39,5 | 45,3 | 4 | 4,4 |
| MET 10 mM - DOX 4 µM | 51,6 | 17,2 | 15,6 | 1,1 |
| MET 1 mM - DOX 4 µM | 42,8 | 33,1 | 7,4 | 3,9 |
| DOX 0,8 µM | 7,1 | 35,6 | 23,7 | 26,3 |
| MET 10 mM - DOX 0,8 µM | 1,2 | 36,3 | 37,9 | 12,1 |
| MET 1 mM - DOX 0,8 µM | 4,3 | 29,5 | 22,6 | 29,6 |

CIS'in tek başına ve MET ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de

gösterilmektedir. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücelere ait % oranları Tablo 4.17’de verilmiştir. 10 μ M CIS ile MET’in tüm dozlarının kombinasyonlarında canlı hücre oranları azalmıştır. 10 mM MET ile birlikte kullanımında erken apoptotik hücre oranı artarken, 1 mM MET ile kombinasyonunda azalmıştır. Bununla birlikte, 1 mM MET ile birlikte kullanıldığında geç apoptotik hücre oranı artmıştır. 2 μ M CIS 10 mM MET ile birlikte kullanıldığında canlı hücre oranı azalırken geç apoptotik hücre oranı artmıştır. 1 mM MET ile kombinasyonunda sadece nekrotik hücre oranında bir artış gözlenmiştir. 0,4 μ M CIS 10 mM MET ile kombine edildiğinde genel olarak bir değişiklik görülmemiştir. Fakat, 1 mM MET ile birlikte kullanıldığında canlı hücre oranı azalırken erken apoptotik hücre oranı artmıştır.



Şekil 4.20. Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

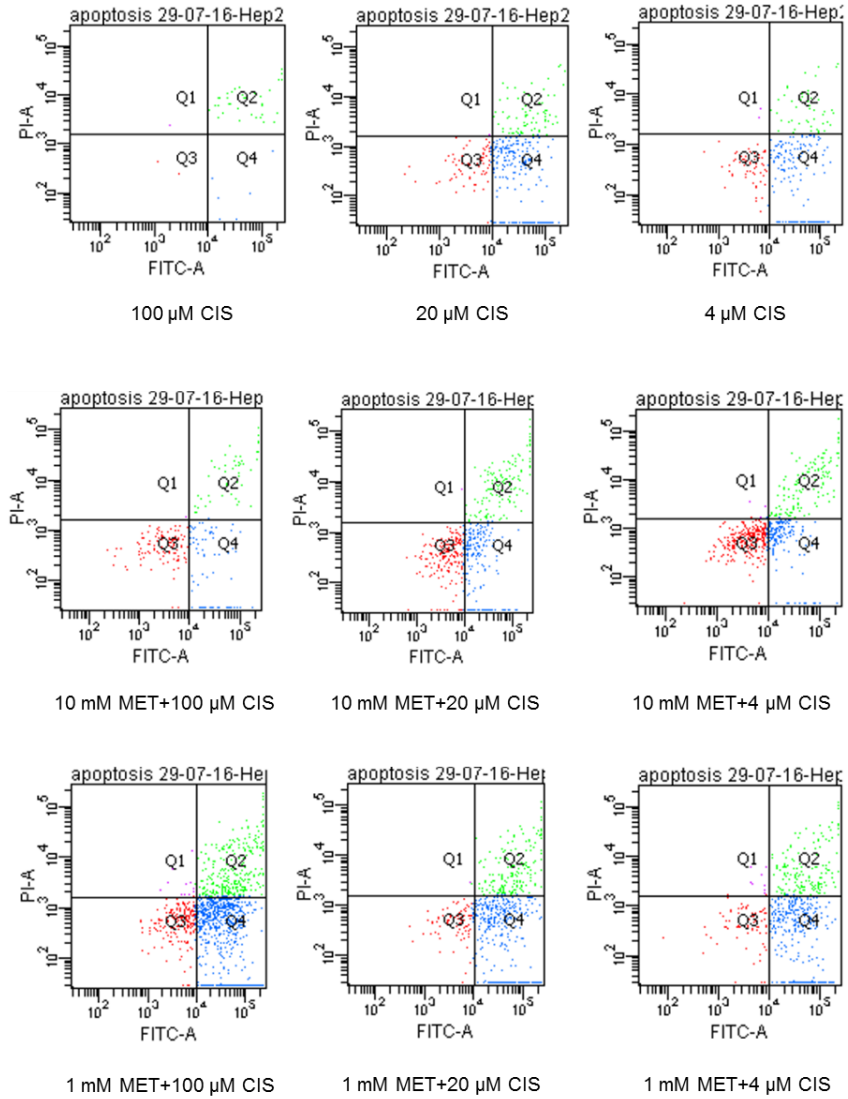


Şekil 4.21. HepG2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

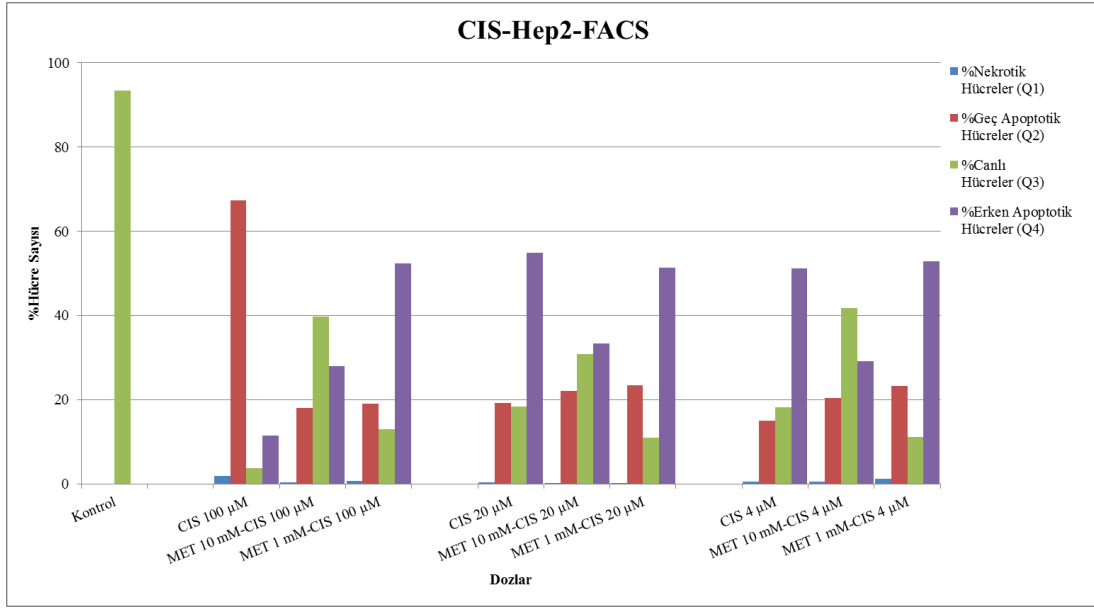
Tablo 4.17. HepG2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi

| HepG2 | %Nekrotik Hücreler (Q1) | %Geç Apoptotik Hücreler (Q2) | %Canlı Hücreler (Q3) | %Erken Apoptotik Hücreler (Q4) |
|------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Kontrol | 0,4 | 0 | 70,2 | 0 |
| CIS 10 µM | 10 | 38,7 | 22 | 11,2 |
| MET 10 mM - CIS 10 µM | 1 | 35,2 | 19,3 | 20,3 |
| MET 1 mM - CIS 10 µM | 12,6 | 42,7 | 19,4 | 7,2 |
| CIS 2 µM | 6,8 | 44,8 | 19,1 | 9,3 |
| MET 10 mM - CIS 2 µM | 7,7 | 50 | 12,8 | 8,4 |
| MET 1 mM - CIS 2 µM | 12,4 | 43,9 | 18,4 | 8,7 |
| CIS 0,4 µM | 4,7 | 49 | 15,4 | 13,7 |
| MET 10 mM - CIS 0,4 µM | 3,7 | 43,4 | 16,4 | 11,5 |
| MET 1 mM - CIS 0,4 µM | 4,2 | 48,9 | 10,6 | 17,8 |

CIS'in tek başına ve MET ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te gösterilmektedir. Ayrıca, canlı, apoptotik ve nekrotik hücelere ait % oranları Tablo 4.18'de verilmiştir. 100 μ M CIS her iki MET dozuyla birlikte kullanıldığında erken apoptotik hücre oranında artış görülmüştür. Bunun yanı sıra, kullanılan bütün CIS dozları 10 mM MET ile kombine edildiğinde canlı hücre oranı artış gözlenmiştir.



Şekil 4.22. Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

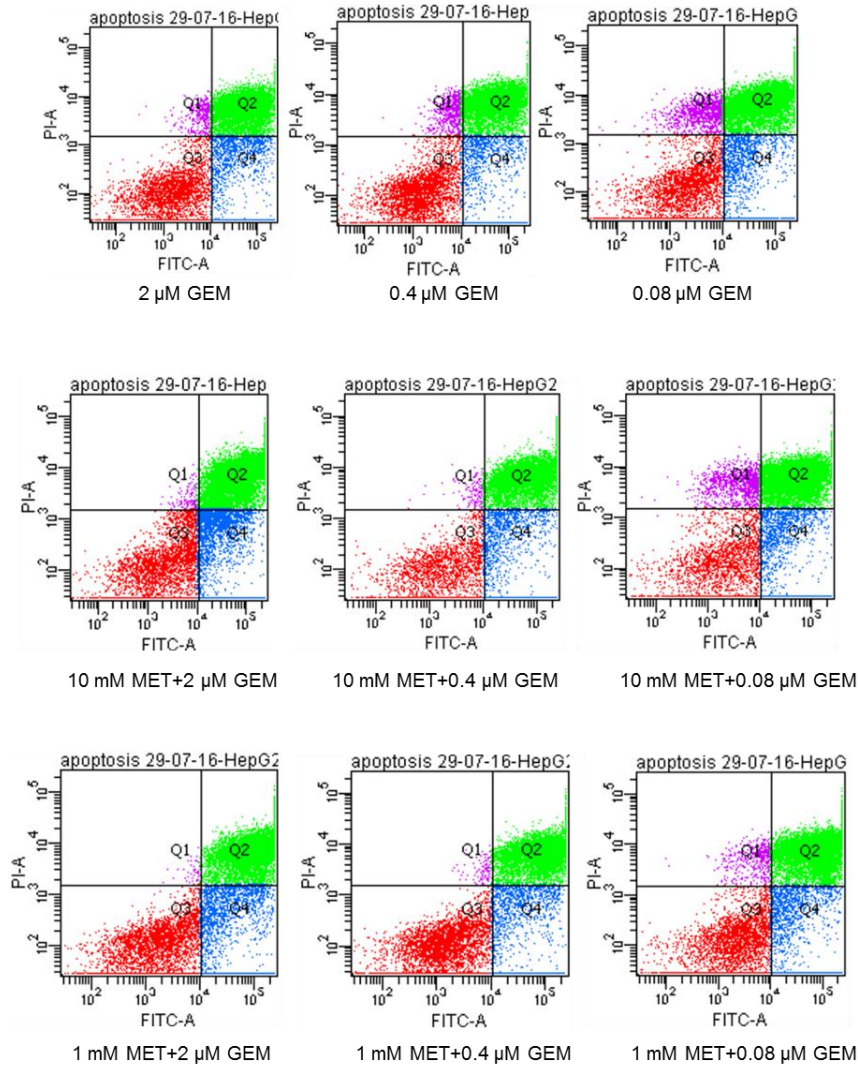


Şekil 4.23. Hep2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

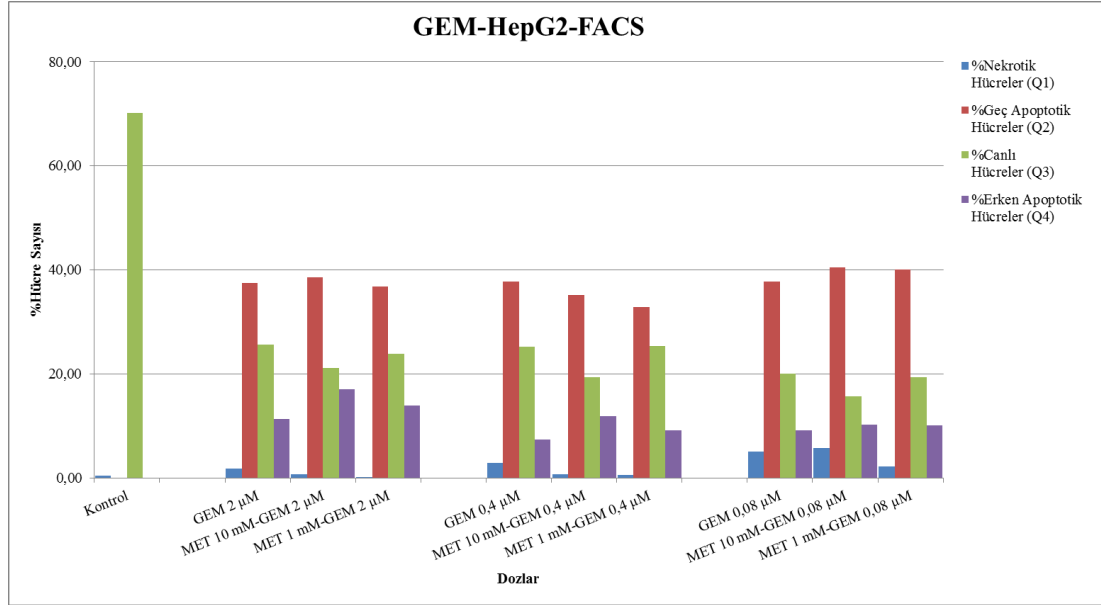
Tablo 4.18. Hep2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi

| Hep2 | %Nekrotik Hücreler (Q1) | %Geç Apoptotik Hücreler (Q2) | %Canlı Hücreler (Q3) | %Erken Apoptotik Hücreler (Q4) |
|----------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Kontrol | 0 | 0 | 93,4 | 0 |
| CIS 100 µM | 1,9 | 67,3 | 3,8 | 11,5 |
| MET 10 mM-CIS 100 µM | 0,4 | 18,1 | 39,7 | 28 |
| MET 1 mM-CIS 100 µM | 0,7 | 19 | 13 | 52,4 |
| CIS 20 µM | 0,3 | 19,2 | 18,4 | 54,8 |
| MET 10 mM-CIS 20 µM | 0,2 | 22,1 | 30,8 | 33,3 |
| MET 1 mM-CIS 20 µM | 0,1 | 23,4 | 11 | 51,3 |
| CIS 4 µM | 0,6 | 15 | 18,2 | 51,1 |
| MET 10 mM-CIS 4 µM | 0,5 | 20,4 | 41,8 | 29,1 |
| MET 1 mM-CIS 4 µM | 1,2 | 23,3 | 11,1 | 52,9 |

GEM'in tek başına ve MET ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te gösterilmektedir. Ayrıca, canlı, apoptotik ve nekrotik hücelere ait % oranları Tablo 4.19'da verilmiştir. 0,4 μ M GEM 10 mM MET dozuyla birlikte kullanıldığında canlı hücre oranı azalırken erken apoptotik hücre oranı artmıştır. Benzer olarak 0,08 μ M GEM 10 mM MET ile kombine edildiğinde canlı hücre oranı azalıp geç apoptotik hücre oranı artmıştır.



Şekil 4.24. Gemitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre



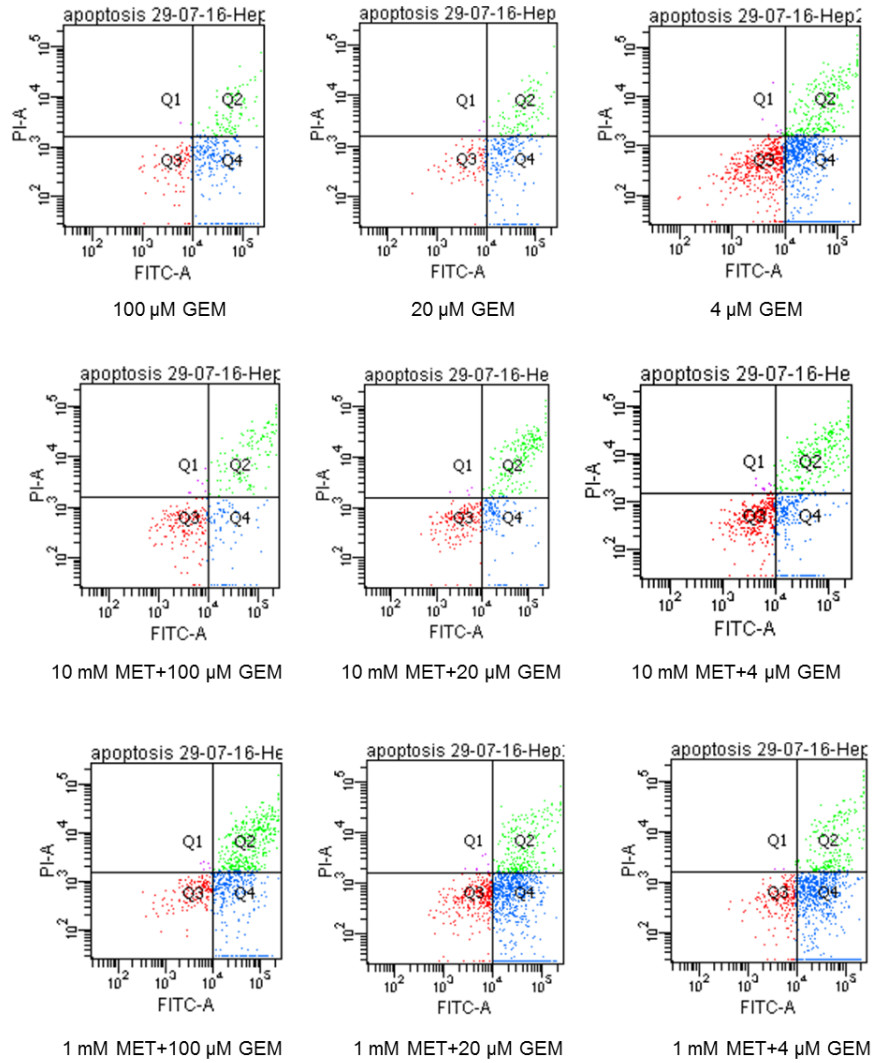
Şekil 4.25. HepG2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

Tablo 4.19. HepG2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi

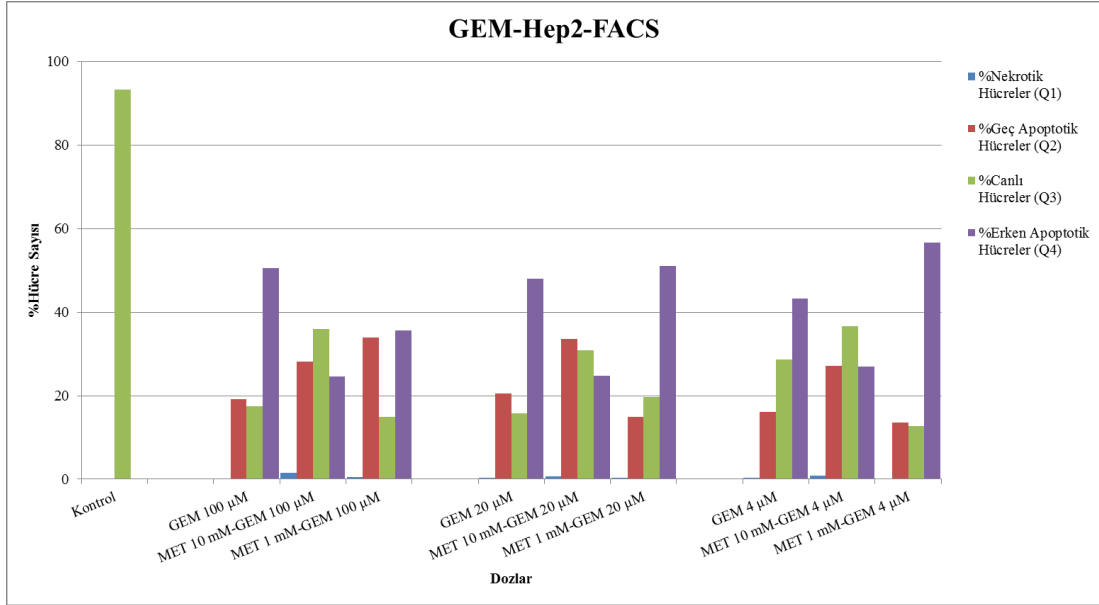
| HepG2 | %Nekrotik Hücreler (Q1) | %Geç Apoptotik Hücreler (Q2) | %Canlı Hücreler (Q3) | %Erken Apoptotik Hücreler (Q4) |
|-----------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Kontrol | 0,4 | 0 | 70,2 | 0 |
| GEM 2 µM | 1,8 | 37,5 | 25,6 | 11,3 |
| MET 10 mM-GEM 2 µM | 0,7 | 38,5 | 21,1 | 17,1 |
| MET 1 mM-GEM 2 µM | 0,2 | 36,8 | 23,8 | 13,9 |
| GEM 0,4 µM | 2,9 | 37,8 | 25,2 | 7,3 |
| MET 10 mM-GEM 0,4 µM | 0,7 | 35,2 | 19,4 | 11,8 |
| MET 1 mM-GEM 0,4 µM | 0,5 | 32,8 | 25,4 | 9,1 |
| GEM 0,08 µM | 5,1 | 37,8 | 20 | 9,1 |
| MET 10 mM-GEM 0,08 µM | 5,7 | 40,4 | 15,7 | 10,2 |
| MET 1 mM-GEM 0,08 µM | 2,2 | 40,1 | 19,4 | 10,1 |

GEM'in tek başına ve MET ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattına 48 saat

süreyle uygulanması sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de verilmiştir. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücre oranları Tablo 4.20’de gösterilmiştir. Kullanılan tüm GEM dozları 10 mM MET ile birlikte kullanıldığında canlı hücre oranı artarken erken apoptotik hücre oranı azalmıştır. Bu durum 1mM MET ile kombinasyonunda tam tersidir.



Şekil 4.26. Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun Hep2 hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisinin FACS ile değerlendirilmesi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre



Şekil 4.27. Hep2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi. Q1: nekrotik hücre, Q2: geç apoptoz evresindeki hücre, Q3: canlı hücre, Q4: erken apoptoz evresindeki hücre

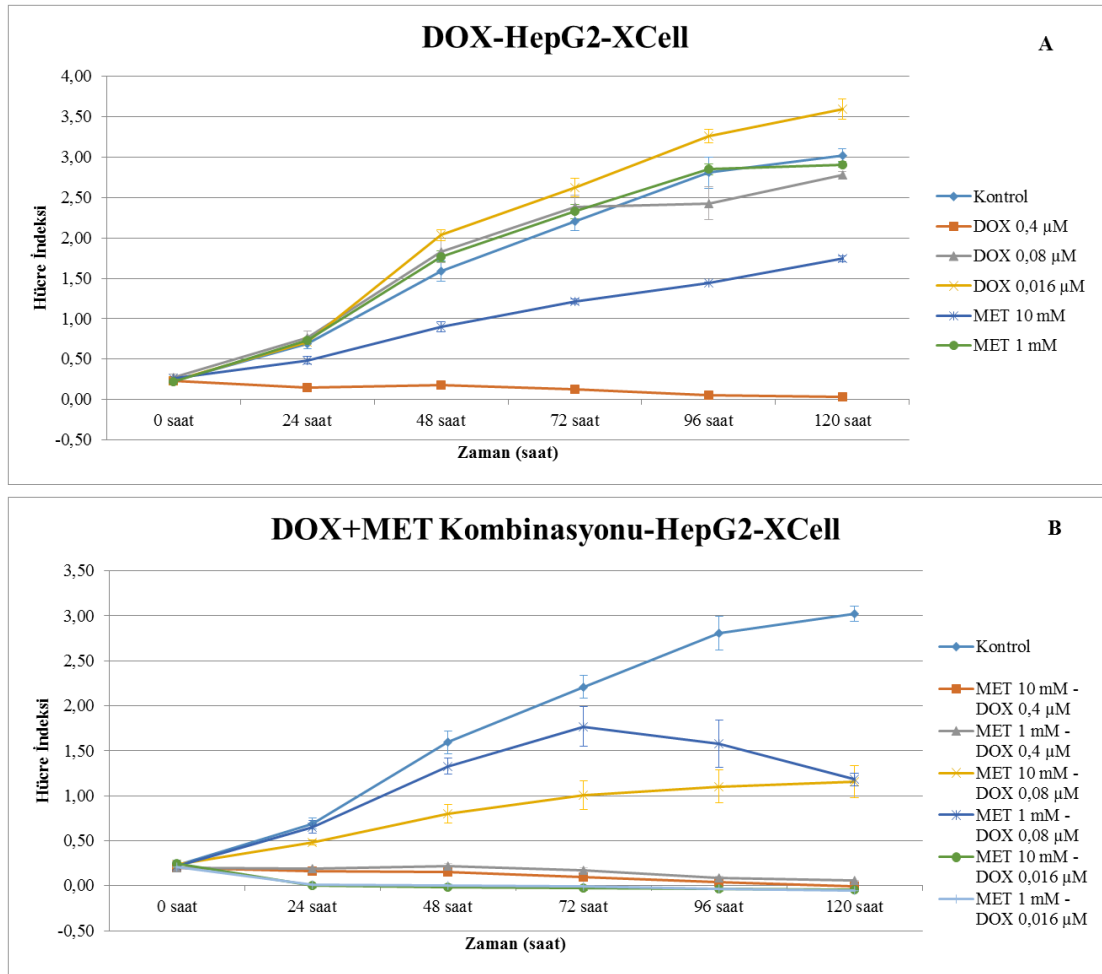
Tablo 4.20. Hep2 hücre hattında Gemsitabinin (GEM) tek başına ve Metformin (MET) ile kombinasyonunun apoptoz ve hücre canlılığına etkisi

| Hep2 | %Nekrotik Hücreler (Q1) | %Geç Apoptotik Hücreler (Q2) | %Canlı Hücreler (Q3) | %Erken Apoptotik Hücreler (Q4) |
|----------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Kontrol | 0 | 0 | 93,4 | 0 |
| GEM 100 µM | 0,2 | 19,2 | 17,5 | 50,5 |
| MET 10 mM-GEM 100 µM | 1,5 | 28,2 | 36 | 24,6 |
| MET 1 mM-GEM 100 µM | 0,5 | 34 | 15 | 35,7 |
| GEM 20 µM | 0,4 | 20,5 | 15,7 | 48,1 |
| MET 10 mM-GEM 20 µM | 0,7 | 33,6 | 30,9 | 24,8 |
| MET 1 mM-GEM 20 µM | 0,4 | 14,9 | 19,7 | 51 |
| GEM 4 µM | 0,4 | 16,2 | 28,6 | 43,3 |
| MET 10 mM-GEM 4 µM | 0,9 | 27,2 | 36,7 | 27 |
| MET 1 mM-GEM 4 µM | 0,1 | 13,5 | 12,8 | 56,6 |

4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (XCELLigence) Sonuçları

XCELLigence, e-plaktaki alternatif akım drenajının değişimine bağlı olarak hücre indeksini veren, gerçek zamanlı ölçüm yapan bir cihazdır.

HepG2 hücrelerinde tüm DOX dozlarının sitotoksik etkisinin MET'in kullanılan dozları ile kombine edildiğinde azaldığı gözlenmiştir. 0,016 μ M DOX, kullanılan tüm MET dozlarıyla kombine edildiğinde hücre indeksi azalma görülmüştür. (Şekil 4.28 ve Tablo 4.21)



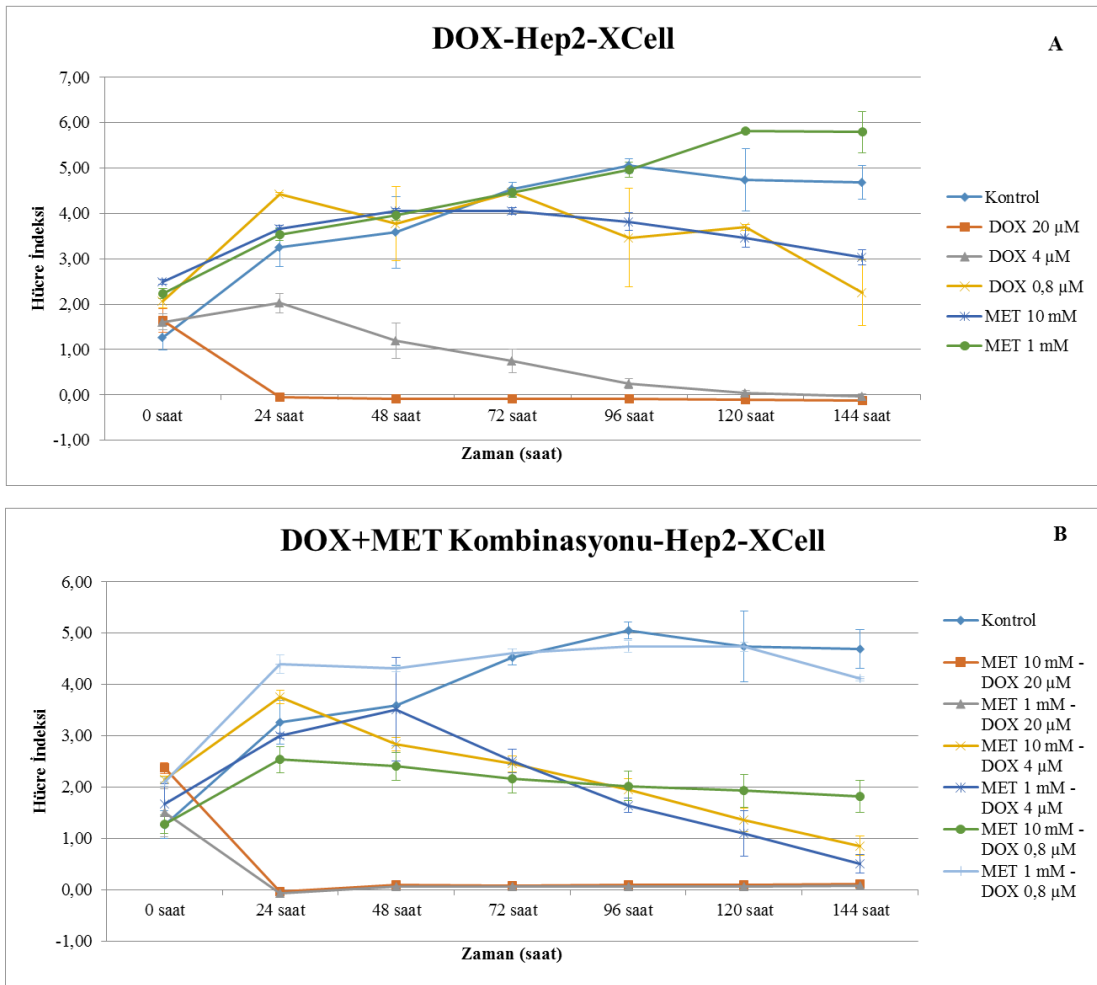
Şekil 4.28. HepG2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi

Tablo 4.21. Dokсорubisinin (DOX) HepG2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları

| HepG2 | %Ortalama±SS | | | | | |
|-----------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 saat | 24 saat | 48 saat | 72 saat | 96 saat | 120 saat |
| Kontrol | 0,23±0,1 | 0,69±0,1 | 1,59±0,1 | 2,21±0,1 | 2,81±0,2 | 3,02±0,1 |
| DOX 0,4 µM | 0,23±0,0 | 0,15±0,0* | 0,18±0,0* | 0,12±0,0* | 0,06±0,0 | 0,04±0,0* |
| MET 10 mM - DOX 0,4 µM | 0,20±0,0 | 0,16±0,0* | 0,15±0,0* | 0,10±0,0* | 0,04±0,0 | -0,01±0,0* |
| MET 1 mM - DOX 0,4 µM | 0,20±0,0‡ | 0,19±0,0* | 0,21±0,0* | 0,17±0,0* | 0,09±0,0 | 0,06±0,0* |
| DOX 0,08 µM | 0,27±0,0 | 0,77±0,1 | 1,83±0,1 | 2,38±0,2 | 2,43±0,2 | 2,78±0,0* |
| MET 10 mM - DOX 0,08 µM | 0,24±0,0 | 0,48±0,0*‡ | 0,80±0,1*‡ | 1,01±0,2*‡ | 1,10±0,2 | 1,16±0,2*‡ |
| MET 1 mM - DOX 0,08 µM | 0,22±0,0 | 0,65±0,1 | 1,33±0,1*‡ | 1,77±0,2*‡ | 1,58±0,3 | 1,18±0,1*‡ |
| DOX 0,016 µM | 0,23±0,0 | 0,71±0,0 | 2,04±0,0* | 2,63±0,1* | 3,26±0,1* | 3,59±0,1* |
| MET 10 mM - DOX 0,016 µM | 0,25±0,0 | -0,00±0,0*‡ | -0,01±0,0*‡ | -0,03±0,0*‡ | -0,04±0,0*‡ | -0,04±0,0*‡ |
| MET 1 mM - DOX 0,016 µM | 0,21±0,0 | 0,01±0,0*‡ | 0,01±0,0*‡ | -0,01±0,0*‡ | 0,03±0,0*‡ | -0,05±0,0*‡ |

*Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan DOX'den farklı, p<0,05

Hep2 hücrelerinde DOX'in 20 µM dozunda MET kombinasyonları ile bir değişiklik gözlenmezken, 4 µM DOX ile MET'in her iki dozunun kombinasyonu sonucunda sitotoksik etkinin azaldığı belirlenmiştir. Ancak, 0,8 µM DOX, 10 mM Met ile birlikte kullanıldığında sitotoksik etkide artış gözlenmiştir (Şekil 4.29 ve Tablo 4.22.).



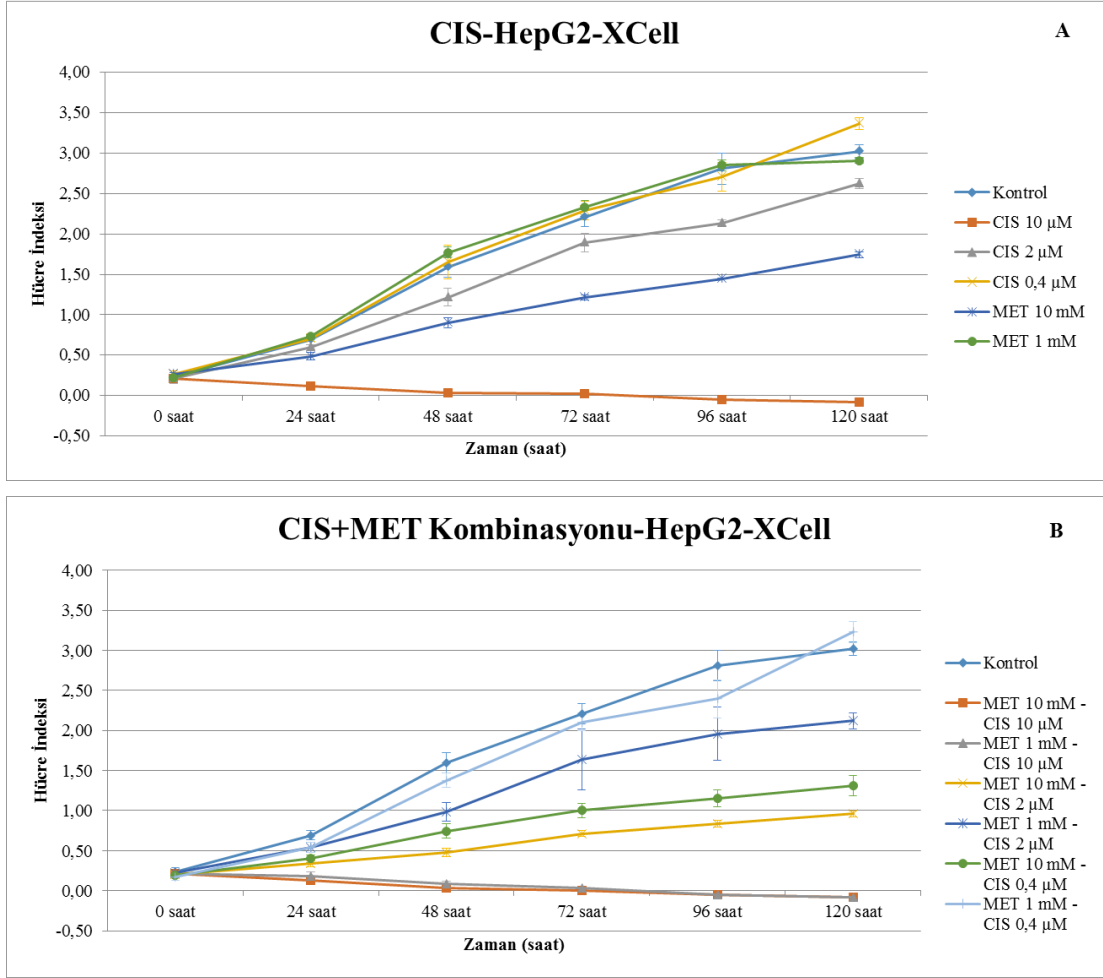
Şekil 4.29. Hep2 hücre hattında Doksorubisinin (DOX) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi

Tablo 4.22. Dokсорubisinin (DOX) Hep2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları

| Hep2 | %Ortalama±SS | | | | | | |
|------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | 0 saat | 24 saat | 48 saat | 72 saat | 96 saat | 120 saat | 144 saat |
| Kontrol | 1,26±0,3 | 3,26±0,4 | 3,58±0,8 | 4,53±0,2 | 5,05±0,12 | 4,74±0,7 | 4,69±0,4 |
| DOX 20 µM | 1,64±0,3 | -0,05±0,0* | 0,09±0,0* | 0,09±0,0* | 0,09±0,0* | 0,10±0,0* | 0,12±0,0* |
| MET 10 mM - DOX 20 µM | 2,37±0,1*‡ | -0,03±0,0* | 0,09±0,0* | 0,09±0,0* | 0,09±0,0* | 0,10±0,0* | 0,11±0,0* |
| MET 1 mM - DOX 20 µM | 1,50±0,5 | -0,06±0,0* | 0,07±0,0* | 0,05±0,0* | 0,06±0,0* | 0,07±0,0* | 0,08±0,0* |
| DOX 4 µM | 1,60±0,2 | 2,02±0,2* | 1,20±0,34* | 0,74±0,23* | 0,24±0,1* | 0,04±0,1* | 0,04±0,1* |
| MET 10 mM - DOX 4 µM | 2,15±0,1*‡ | 3,76±0,1‡ | 2,83±0,1‡ | 2,45±0,2*‡ | 1,95±0,2*‡ | 1,35±0,2*‡ | 0,85±0,2*‡ |
| MET 1 mM - DOX 4 µM | 1,67±0,4 | 2,99±0,0‡ | 3,52±1,0‡ | 2,50±0,2*‡ | 1,64±0,1*‡ | 1,10±0,4*‡ | 0,50±0,12*‡ |
| DOX 0,8 µM | 2,06±0,1* | 4,43±0,0* | 3,77±0,8 | 4,47±0,0 | 3,47±1,1 | 3,70±0,1 | 2,25±0,7* |
| MET 10 mM - DOX 0,8 µM | 1,28±0,2‡ | 2,53±0,3‡ | 2,40±0,3 | 2,16±0,3*‡ | 2,02±0,3* | 1,92±0,3*‡ | 1,82±0,3* |
| MET 1 mM - DOX 0,8 µM | 2,10±0,1* | 4,39±0,2* | 4,31±0,1 | 4,61±0,01‡ | 4,74±0,1 | 4,74±0,01‡ | 4,11±0,0*‡ |

*Kontrolден farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan DOX'den farklı, p<0,05

HepG2 hücre hattına 10 µM CIS'in MET'in tüm dozları ile kombine olarak uygulandığında sitotoksik yanıtta bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, 2 µM CIS'in her iki MET dozuyla kullanıldığında da etkisinin arttığı belirlenmiştir. 0,4 µM CIS'in ise yalnızca 10 mM MET ile kombinasyonunda bu etki görülmüştür. (Şekil 4.30 ve Tablo 4.23.).



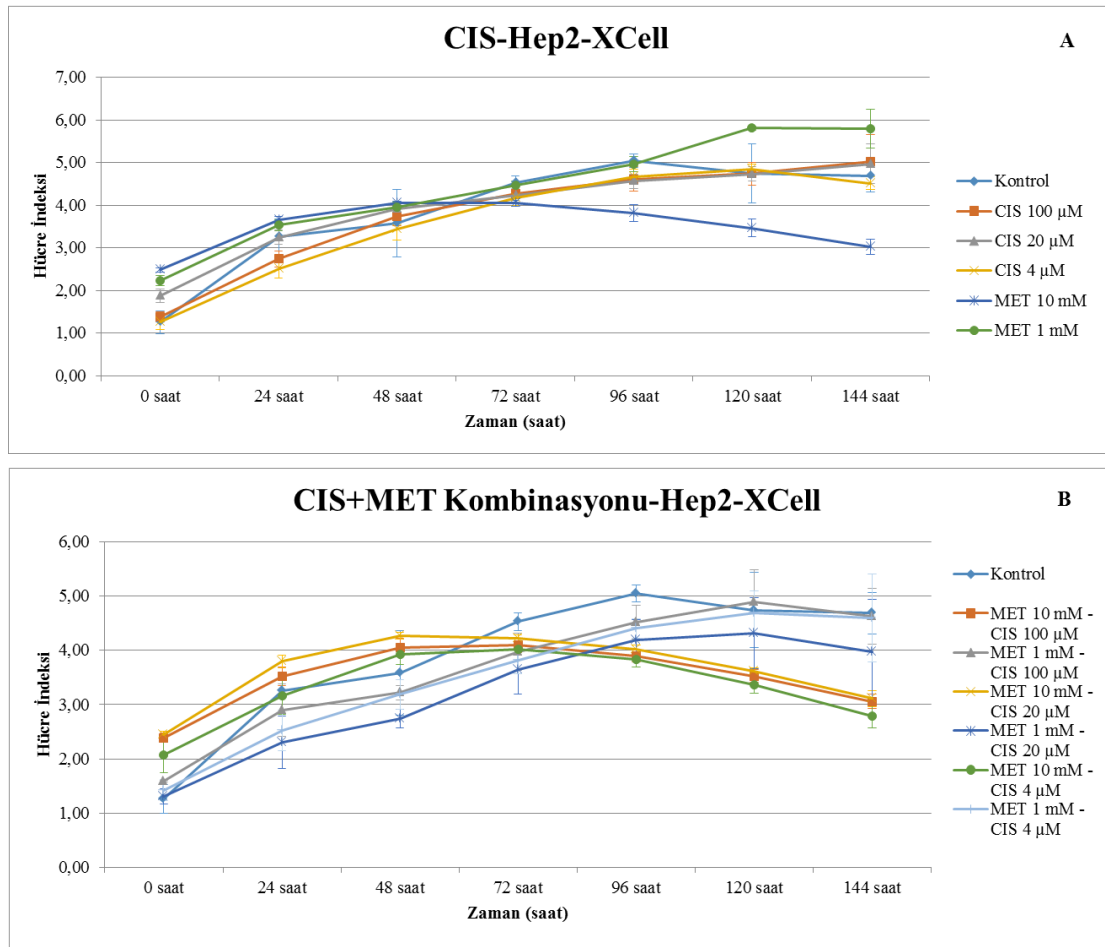
Şekil 4.30. HepG2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi

Tablo 4.23. Sisplatinin (CIS) HepG2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları

| HepG2 | %Ortalama±SS | | | | | |
|------------------------------|--------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0 saat | 24 saat | 48 saat | 72 saat | 96 saat | 120 saat |
| Kontrol | 0,23±0,1 | 0,69±0,01 | 1,59±0,1 | 2,21±0,1 | 2,80±0,2 | 3,02±0,1 |
| CIS 10 µM | 0,21±0,1 | 0,12±0,1* | 0,04±0,0* | 0,02±0,0* | -0,05±0,0* | -0,08±0,0* |
| MET 10 mM - CIS 10 µM | 0,22±0,0 | 0,12±0,0* | 0,04±0,0* | -0,00±0,0* | -0,05±0,0* | -0,08±0,0* |
| MET 1 mM - CIS 10 µM | 0,22±0,0 | 0,19±0,01* | 0,08±0,0* | 0,03±0,0* | -0,05±0,0* | -0,08±0,0* |
| CIS 2 µM | 0,21±0,0 | 0,60±0,0 | 1,22±0,1* | 1,89±0,1* | 2,14±0,0* | 2,63±0,1* |
| MET 10 mM - CIS 2 µM | 0,20±0,0 | 0,34±0,0*‡ | 0,48±0,1*‡ | 0,71±0,0*‡ | 0,83±0,0*‡ | 0,96±0,0*‡ |
| MET 1 mM - CIS 2 µM | 0,23±0,0 | 0,54±0,01* | 0,98±0,1* | 1,64±0,4 | 1,96±0,3* | 2,12±0,1*‡ |
| CIS 0,4 µM | 0,26±0,0 | 0,70±0,0 | 1,65±0,2 | 2,29±0,1 | 2,71±0,2 | 3,37±0,01* |
| MET 10 mM - CIS 0,4 µM | 0,19±0,0 | 0,40±0,1*‡ | 0,74±0,1*‡ | 1,00±0,1*‡ | 1,15±0,1*‡ | 1,31±0,1*‡ |
| MET 1 mM - CIS 0,4 µM | 0,18±0,0 | 0,54±0,01*‡ | 1,378±0,1 | 2,10±0,1 | 2,40±0,2 | 3,23±0,1 |

*Kontrolden farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan CIS'den farklı, p<0,05

Hep2 hücre hattında gerçek zamanlı hücre analizi yönteminde CIS'in kendisi ile karşılaştırıldığında tüm dozlarında 10 mM MET ile kombine edildiğinde sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür ve sonuçlar Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



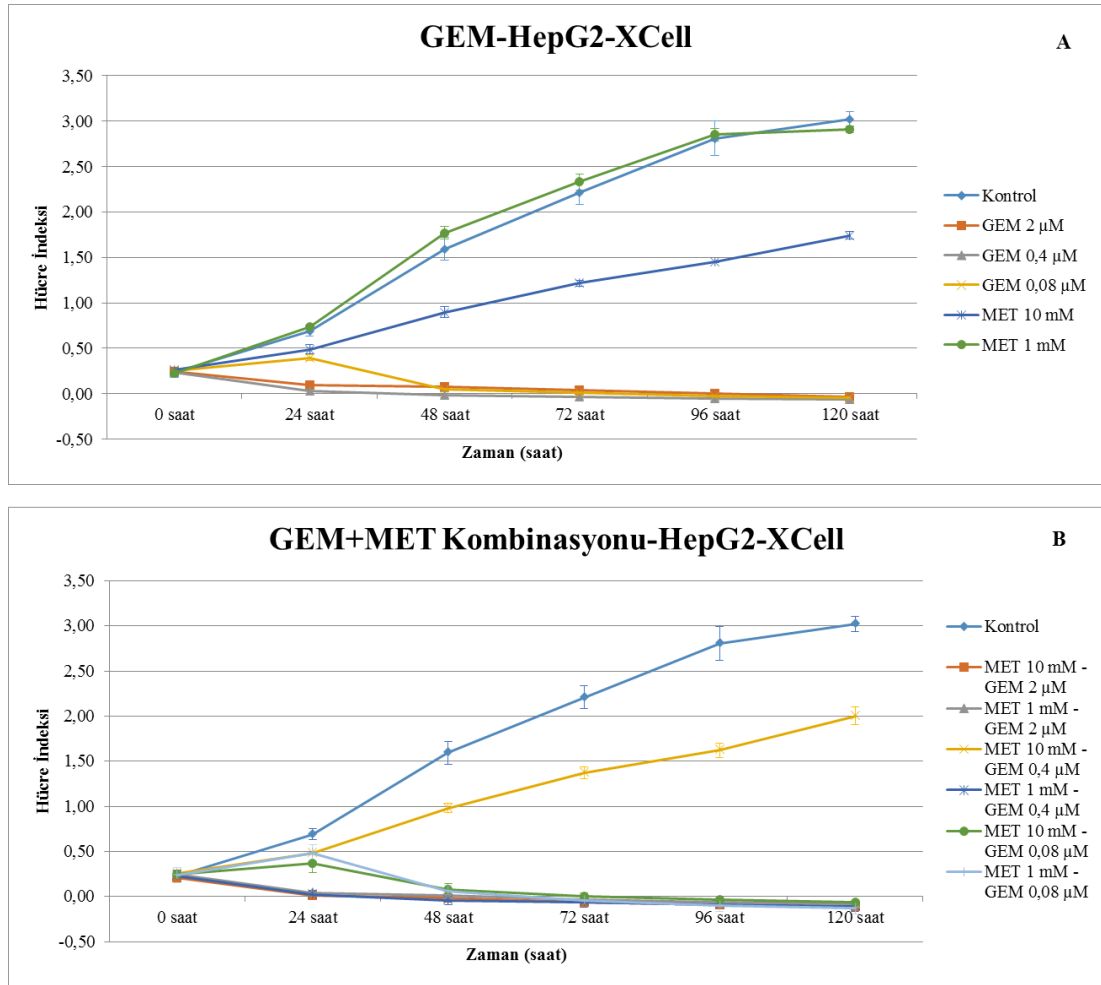
Şekil 4.31. Hep2 hücre hattında Sisplatinin (CIS) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi

Tablo 4.24. Sisplatinin (CIS) Hep2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları

| Hep2 | %Ortalama±SS | | | | | | |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 0 saat | 24 saat | 48 saat | 72 saat | 96 saat | 120 saat | 144 saat |
| Kontrol | 1,26±0,3 | 3,26±0,4 | 3,58±0,8 | 4,53±0,2 | 5,05±0,2 | 4,74±0,7 | 4,69±0,4 |
| CIS 100 μ M | 1,39±0,1 | 2,75±0,2 | 3,74±0,2 | 4,27±0,2 | 4,62±0,3 | 4,74±0,3 | 5,02±0,6 |
| MET10 mM - CIS 100 μ M | 2,39±0,01* [‡] | 3,52±0,2 [‡] | 4,06±0,2 | 4,09±0,1* | 3,90±0,1* [‡] | 3,53±0,1* [‡] | 3,06±0,1* [‡] |
| MET 1 mM - CIS 100 μ M | 1,59±0,0 | 2,90±0,5 | 3,22±0,1 [‡] | 3,97±0,4 | 4,52±0,3 | 4,90±0,6 | 4,63±0,5 |
| CIS 20 μ M | 1,88±0,2* | 3,25±0,2 | 3,91±0,1 | 4,24±0,2 | 4,56±0,2* | 4,74±0,2 | 4,98±0,5 |
| MET 10 mM - CIS 20 μ M | 2,45±0,01* [‡] | 3,80±0,1 [‡] | 4,27±0,1 [‡] | 4,23±0,1* | 4,03±0,1* [‡] | 3,61±0,1 [‡] | 3,11±0,2* [‡] |
| MET 1 mM - CIS 20 μ M | 1,30±0,1 [‡] | 2,31±0,5 [‡] | 2,74±0,2 [‡] | 3,65±0,5* | 4,19±0,4* | 4,32±0,7 | 3,97±1,0 |
| CIS 4 μ M | 1,26±0,2 | 2,51±0,2 | 3,44±0,3 | 4,17±0,2 | 4,67±0,2 | 4,84±0,1 | 4,52±0,2 |
| MET 10 mM - CIS 4 μ M | 2,07±0,3* [‡] | 3,16±0,4 | 3,93±0,2 | 4,03±0,1* | 3,83±0,1* [‡] | 3,36±0,1* [‡] | 2,78±0,2* [‡] |
| MET 1 mM - CIS 4 μ M | 1,42±0,2 | 2,52±0,4 | 3,19±0,3 | 3,82±0,3* | 4,40±0,2* | 4,69±0,4 | 4,59±0,9 |

*Kontrolden farklı, [‡]Aynı dozda tek başına uygulanan CIS'den farklı, p<0,05

HepG2 hücrelerinde 0.4 μ M GEM'in 10 mM MET ile kombinasyonunun sitotoksik etkiyi antagonize ettiği ve bunun dışındaki tüm kombinasyonlarda etkinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.32 ve Tablo 4.25).



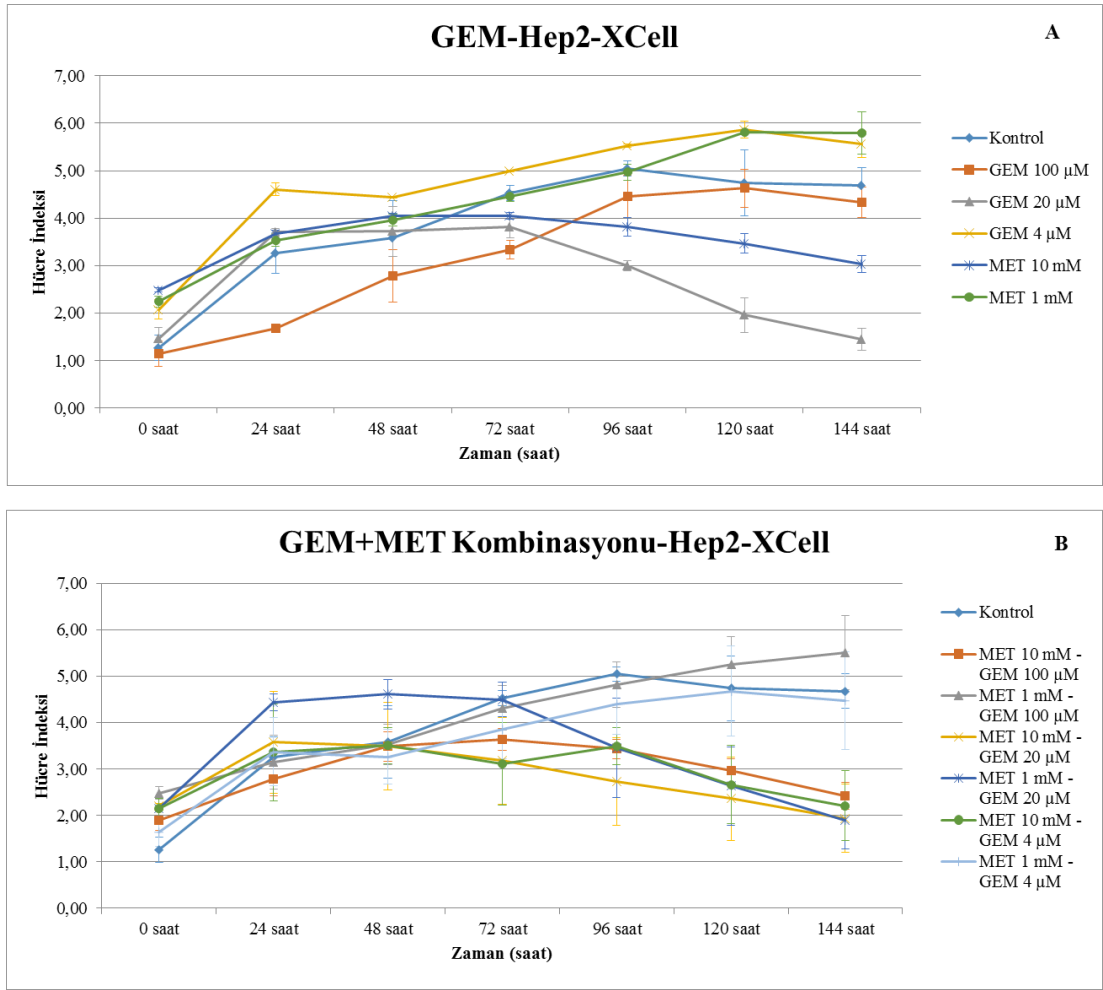
Şekil 4.32. HepG2 hücre hattında Gemcitabinin (GEM) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi

Tablo 4.25. Gemisitabinin (GEM) HepG2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları

| HepG2 | %Ortalama±SS | | | | | |
|----------------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 saat | 24 saat | 48 saat | 72 saat | 96 saat | 120 saat |
| Kontrol | 0,23±0,1 | 0,69±0,1 | 1,59±0,1 | 2,21±0,1 | 2,81±0,2 | 3,02±0,1 |
| GEM 2 µM | 0,25±0,0 | 0,09±0,0* | 0,07±0,0* | 0,04±0,0* | 0,00±0,0* | -0,03±0,0* |
| MET 10 mM - GEM 2 µM | 0,21±0,0 | 0,01±0,0*‡ | -0,02±0,0*‡ | -0,06±0,0*‡ | -0,09±0,0*‡ | -0,11±0,0*‡ |
| MET 1 mM - GEM 2 µM | 0,25±0,0 | 0,04±0,0*‡ | 0,01±0,0*‡ | -0,03±0,0* | -0,07±0,0*‡ | -0,09±0,0* |
| GEM 0,4 µM | 0,24±0,0 | 0,03±0,0* | -0,01±0,0* | -0,03±0,0* | -0,05±0,0* | -0,06±0,0* |
| MET 10 mM - GEM 0,4 µM | 0,25±0,0 | 0,48±0,0*‡ | 0,98±0,1*‡ | 1,38±0,1*‡ | 1,62±0,1*‡ | 2,01±0,1*‡ |
| MET 1 mM - GEM 0,4 µM | 0,23±0,1 | 0,02±0,0 | -0,04±0,1* | -0,06±0,1* | -0,09±0,1* | -0,11±0,1* |
| GEM 0,08 µM | 0,25±0,0 | 0,39±0,0* | 0,05±0,0* | 0,01±0,0* | -0,02±0,0* | -0,04±0,0* |
| MET 10 mM - GEM 0,08 µM | 0,25±0,0 | 0,37±0,1* | 0,08±0,1* | 0,01±0,0* | -0,04±0,0* | -0,06±0,0* |
| MET 1 mM - GEM 0,08 µM | 0,23±0,0 | 0,48±0,1* | 0,06±0,1* | -0,04±0,1* | -0,10±0,1* | -0,123±0,1* |

*Kontrolten farklı, ‡Aynı dozda tek başına uygulanan GEM'den farklı, p<0,05

Hep2 hücrelerinde yapılan XCELLigence analizlerinde GEM'in 100 µM konsantrasyonuna karşı Hep2 hücrelerinde bir direnç olduğu ve 10 mM MET ile birlikte uygulandığında bu direncin azaldığı ve sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür. Ancak, 1 mM MET ile kullanıldığında tam tersi bir durum ortaya çıkarak sitotoksik etki azalmıştır. 20 µM GEM'in MET'in tüm dozları ile kombinasyonlarında hücre indeksinin arttığı, yani, sitotoksik etkinin azaldığı belirlenmiştir. 100 µM GEM ile görülen direnç 20 µM GEM uygulamalarında görülmemiştir. Ayrıca, 4 µM GEM ile 10 mM MET birlikte uygulandığında ilacın etkinliği artmıştır (Şekil 4.33 ve Tablo 4.26).



Şekil 4.33. Hep2 hücre hattında Gemsitabinin(GEM) tek başına (A) ve Metformin (MET) ile kombinasyonu (B) için gerçek zamanlı hücre analizi

Tablo 4.26. Gemsitabinin (GEM) Hep2 hücre hattı üzerindeki gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları

| Hep2 | %Ortalama±SS | | | | | | |
|------------------------------------|--------------|------------|-----------|------------|-----------------|------------|------------|
| | 0 saat | 24 saat | 48 saat | 72 saat | 96 saat | 120 saat | 144 saat |
| Kontrol | 1,26±0,3 | 3,26±0,4 | 3,58±0,8 | 4,53±0,2 | 5,05±0,2 | 4,74±0,7 | 4,69±0,4 |
| GEM 100 µM | 1,39±0,1 | 2,75±0,2* | 3,74±0,2 | 4,27±0,2* | 4,62±0,28 | 4,74±0,3 | 5,02±0,6 |
| MET 10 mM - GEM 100 µM | 2,39±0,1*‡ | 3,52±0,2‡ | 4,06±0,2 | 4,09±0,1* | 3,90±0,11* ‡ | 3,53±0,1*‡ | 3,06±0,1*‡ |
| MET 1 mM - GEM 100 µM | 1,59±0,0*‡ | 2,90±0,5‡ | 3,22±0,1 | 3,97±0,4*‡ | 4,52±0,31 | 4,90±0,6 | 4,63±0,5 |
| GEM 20 µM | 1,88±0,2 | 3,25±0,2 | 3,91±0,1 | 4,24±0,2* | 4,57±0,17* | 4,74±0,2* | 4,98±0,5* |
| MET 10 mM - GEM 20 µM | 2,45±0,1*‡ | 3,80±0,1 | 4,27±0,1 | 4,23±0,1 | 4,03±0,07* | 3,61±0,1* | 3,11±0,2* |
| MET 1 mM - GEM 20 µM | 1,30±0,1*‡ | 2,31±0,5*‡ | 2,74±0,2 | 3,65±0,5‡ | 4,19±0,37 | 4,32±0,7* | 3,97±1,0* |
| GEM 4 µM | 1,26±0,2* | 2,51±0,2* | 3,44±0,3 | 4,17±0,2* | 4,67±0,17* | 4,84±0,1 | 4,52±0,2* |
| MET 10 mM - GEM 4 µM | 2,07±0,3* | 3,16±0,4 | 3,93±0,2‡ | 4,03±0,1‡ | 3,83±0,14* ‡ | 3,36±0,1*‡ | 2,78±0,2*‡ |
| MET 1 mM - GEM 4 µM | 1,42±0,2 | 2,52±0,4 | 3,19±0,3‡ | 3,82±0,3‡ | 4,40±0,18‡ | 4,69±0,4 | 4,59±0,8 |

*Kontrolden farklı, †Aynı dozda tek başına uygulanan GEM'den farklı, p<0,05

5. TARTIŞMA

Günümüzde değişen beslenme alışkanlıkları ve genetik yapının kişiler arasında farklılık göstermesi nedeniyle, obezite ve T2DM önemli birer sağlık sorunu haline gelmiştir. T2DM'nin patolojik mekanizmasında olduğu gibi, çağımızın hastalığı olarak bilinen ve önceleri metabolik sendrom olarak adlandırılan patolojinin temelinde de insülin direncinin yer aldığı artık bilinmektedir. Bu nedenle insülin direncini kıran ilaçlarla tedavi son yıllarda giderek önem kazanmaktadır (6-12). MET, T2DM'nin tedavisinde kullanılan, biguanid grubundan insülin duyarlılığını arttıran ilaçlardan biridir. Aslında, ortaçağdan beri Goat's rue, Fransız leylağı ya da İtalyan fitch olarak da bilinen *Galega officinalis*'in diyabete eşlik eden diürezi düzelttiği bilinmektedir. Daha sonraları bitkideki aktif maddenin guanidin olduğu keşfedilmiş ve normalde oldukça toksik olan bu bileşik 1950'li yıllarda bağlanmış halde iki guanidin halkası içeren biguanid haline getirilerek diyabetli hastaların tedavisi için kullanıma girmiştir. Ancak bu grubun ilk temsilcileri olan fenformin ve buforminin laktik asidoz riskini arttırdıkları gösterilmiş ve bu nedenle özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde uzun yıllar biguanidlerin kullanımına izin verilmemiştir (7, 8). Oysa grubun yeni temsilcisi olan MET diğerlerinden farklı olarak daha az lipofilik olup, çok daha düşük laktik asidoz riskine sahiptir ve tüm dünyada yıllardır güvenle kullanılan bir antidiyabetik ilaçtır (9, 10).

Biguanid grubu ilaçlardan olan MET, glikoz düşürücü etkisini başta glukoneogenezin ve daha az olarak da glikojenolizin inhibisyonu yoluyla göstermekte olup, intestinal glikoz emilimini de azaltmaktadır. Az sayıdaki araştırmacı tarafından öne sürülen hipoteze göre ise, MET pirüvat karboksilaz-fosfoenolpirüvat karboksikinaz aktivitesini inhibe ederek ve bu yolla pirüvatın alanine dönüşümünü artırarak glukoneojenezi azalttığı düşünülmektedir. Ayrıca, MET'in AMPK'yı aktive ve mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks 1'i inhibe ettiği düşünülmektedir. Biguanidler, proteinlerdeki divalen katyon bölgelerine kompetitif olarak bağlanır (18) ve özellikle mitokondrilerde olmak üzere hücre içinde tutulan kalsiyum ile etkileşir (19, 137).

MET, ayrıca, insülin duyarlılığını artırarak, insülin direncini de kırmaktadır. Dolayısıyla, fazla kiloya bağlı insülin direncinin kırılmasında veya yağlı karaciğerde MET kullanımının faydalı olduğu görülmüştür (35). Serbest yağ asitlerinin miktarı diyabette olduğu gibi obezitede de artmaktadır. Bu artış, hepatik glikoz üretiminde

artışa ve insülin direncine neden olmaktadır (36, 37). Hiperglisemililerde uzun süreli MET kullanımına bağlı olarak plazma trigliserid düzeylerinde %10-20 oranında azalma olduğu görülmüştür (39). Yapılan bazı çalışmalarda, MET'in sahip olduğu düşünülen antitümöral aktiviteye bağlı olarak da antitümöral ilaçlarla birlikte alındığında bu ilaçların tedavici edici etkilerini arttırdığı belirtilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, MET'i kullanan diyabet hastalarında rektum, karaciğer ve pankreas kanser türlerini içeren birçok kanserin riskini azalttığı bildirilmiştir (41, 42, 54, 55).

DOX antrasiklin grubu kemoterapötik ilaçtır. Kullanılan antitümör ajanlar arasında en güçlülerinden biri olmasına karşın doza bağlı kardiyomiyopati gelişmesine neden olduğu için kullanımı sınırlıdır. Kardiyomiyositlerde apoptoz ve miyokardiyal fibrozisin indüklenmesine yol açar (117). Ayrıca, metabolizması sırasında reaktif oksijen türleri oluşumunu da arttırmaktadır (100). Yapılan son çalışmalarda, birlikte alındıklarında, MET'in DOX tarafından indüklenmiş kardiyotoksositeye karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. 2014 yılında Kobashigawa ve ark. (100) tarafından yapılan çalışmada, düşük doz MET'in, DOX'a karşı AMPK, PKA/CREB1, Src ve platelet türevi büyüme faktörü reseptörü (PDGFR)'ne bağlanarak koruyucu bir etki oluşturduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, sıçan fetal kardiyomiyositleri olan H9c2 hücre hattı ve insan fetal kardiyomiyositleri hücresi RL14 hücre hattı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, düşük doz (0.1 mM) MET, kardiyomiyositlerde DOX tarafından indüklenmiş toksisiteyi azaltmış ve koruyucu etki göstermiştir. BT-474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında, MET ve DOX'in tek başlarına ve kombinasyonları halinde kullanıldığı bir çalışma sonucunda kombine olarak uygulandıklarında, tümör hücrelerinin gerilediği ve DOX'un etkinliğinin arttığı belirlenmiştir. Çalışmada, MET'in hem kanser tedavisinin etkinliğini arttırabileceği hem de standart kemoterapi tedavisinin toksisitesini azaltabileceği ifade edilmiştir (15). Bir başka çalışmada, Argun ve ark. (118) tarafından yapılan, DOX kardiyotoksitesini oluşturulan sıçanlarda MET'in bu toksisiteyi önleyici etkisi çalışılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda, DOX ile MET'in birlikte verildiği gruptaki sıçanların sol karıncıklarında DOX'a bağlı olarak gelişen fonksiyon bozukluğuna karşı korunduğu, histopatolojik değişikliklerinde ise kardiyomiyosit apoptozunun da azaldığı gösterilmiştir.

CIS, sarkoma, lenfoma, yumurtalık tümörleri, ve birçok kanser türünün

tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir alkilleyici ilaçtır (98). CIS'in antitümoral aktivitesi, DNA çift sarmalında DNA-DNA içi ve arası çapraz bağlantıları oluşturan DNA'nın pürin bazlarıyla oluşturduğu kompleksin DNA sentezini engellemesi, yani DNA çift-zincirinde çapraz bağlanma yapmasından ileri gelmektedir (138). CIS'in klinik kullanımı, başta nefrotoksisite olmak üzere (101, 139), hepatotoksisite, miyelosupresyon, nörotoksisite, geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi gibi doz bağımlı belirgin yan etkileri nedeniyle kısıtlanmaktadır (140-142). Lesan ve ark. yaptıkları bir çalışmada MKN-45 hücre hattı ile MET ve CIS'in birlikte kullanımını değerlendirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada MET'in, birlikte kullanıldığında CIS'in antitümoral etkisini azalttığı gözlemlenmiştir (121).

GEM, kolon, mesane, meme, akciğer, mide ve pankreas gibi kanser türlerinin tedavisinde kullanılan antimetabolit grubu bir nükleozit analogu kemoterapötik ajandır. Özellikle ileri ve metastatik pankreas kanserinde standart tedavinin bir parçası olmuştur. Pankreas kanseri, Amerika'da kadın ve erkeklerde kanser kaynaklı ölüme neden olan 4. en yaygın etmendir (106, 143), hastalığın belirgin bir erken uyarı veya semptomu bulunmamakta ve genellikle hastalık çok ilerlediği zaman kendini belli etmektedir. GEM, kanser hastalarında klinik uygulamalarda önemli bir yarar sağlarken, pankreas kanserine etkisi sınırlıdır. Bu nedenle GEM'in ve diğer kemoterapötiklerin birlikte kullanımının hayatta kalma oranlarını iyileştireceği yönünde görüş ileri sürülmektedir (107). Klinikte, özellikle CIS ile kombine kullanılan GEM'e karşı direnç oluşumu, ilaç ile ilgili önemli bir sorun olarak ifade edilmektedir. GEM ile ilgili yapılmış çalışma sayısı sınırlı olmakla birlikte Kawanami ve ark. (126), GEM'in bir insan anti IGF-1R monoklonal antikoru olan R1507 ve/veya MET ile birlikte kullanımını ve bir apoptoz proteini inhibitörü indüksiyonunu incelemiştir. Pankreas kanser hücrelerine, GEM, R1507 ve MET ile ayrı ayrı ve kombinasyonları halinde muamele edilmiştir. Bu muamelenin etkileri hücre proliferasyonu, apoptoz ve apoptozu inhibisyonu ile ilgili genlerin ekspirasyonu ve kemoterapi direnci için değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, GEM ile R1507 ve/veya MET kombinasyonunun, GEM'e farklı duyarlılığı ile birlikte pankreas kanseri hücre hatlarında aditif etkiye sahip olduğu; ancak, GEM'in kemoterapi direncini indükleyebileceği görülmüştür.

Yapılan araştırmalarda, MET ile sitotoksik ilaçların etkileşimleri farklılık göstermektedir ve çelişkili literatür verileri bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu tez

çalışmasında, bu konuda gerçekleştirilen diğer çalışma sonuçlarından hareketle, farklı etki mekanizmasına sahip olan DOX, GEM ve CIS'in çeşitli dozlarda MET ile kombinasyonları ile ortaya çıkabilecek olası etkileşimlerinin farklı kanser hücre hatlarında belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen MTT testlerinin sonuçlarına göre, genel olarak Hep2 hücre hattında DOX'un yüksek dozlarında MET ile kombinasyonunda bir değişiklik gözlenmezken, daha düşük dozlarda sitotoksik cevapta bir azalma olduğu belirlenmiştir. Literatürde, DOX'in kemoterapötik etkisinin temelinde serbest radikal oluşumunun da etkisinin olduğu belirtilmektedir. MET'in radikal oluşumunu azalttığına ilişkin çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında, DOX'in MET ile kombinasyonunun MET'in radikal süpürücü özelliğine bağlı olarak DOX'in etkisini azaltabileceği düşünülebilir. Metabolizasyonun enzim içeriğine bağlı olarak daha yüksek olduğu HepG2 hücre hatlarında ise düşük doz DOX ile MET kombinasyonlarında genel olarak sitotoksik cevapta bir artış olduğu görülmüştür. Bu sinerjistik etkinin, hücre hattına da bağlı olarak hem DOX hem de MET'in literatürde belirtildiği gibi, kanser kök hücrelerini hedef almalarından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Ancak, bu mekanizmanın aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Hücre toksisitesinin belirleyici testlerinden biri olan LDH salınımında ise genel olarak, Hep2 hücre hatlarında DOX ile MET kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği görülmüştür. HepG2 hücre hatlarında ise yüksek dozda DOX ile MET kombinasyonunun antagonistik, düşük dozda DOX ile MET kombinasyonunun ise sinerjistik etki oluşturabileceği belirlenmiştir. Hücre hatlarının sahip olduğu hem metabolik hem de diğer fizyolojik farklılıkların bu etki farklılıklarına neden olabileceği düşünülebilir.

Hücrede oluşan apoptotik cevabın incelenmesi amacıyla yapılan FACS analizi sonucunda, Hep2 hücrelerinde genel olarak DOX ile MET kombinasyonu antagonistik etki oluştururken, HepG2 hücrelerinde sinerjistik bir etki gözlenmiştir. Diğer yandan, gerçek zamanlı hücre analizi (XCELLigence) sonuçları değerlendirildiğinde, DOX'in her iki hücre hattı için MET ile kombine edildiğinde sitotoksik etkisinin arttığı görülmüştür.

CIS ile yürütülen MTT testi sonucunda CIS'in özellikle düşük dozlarında MET ile kombine edildiğinde genel olarak etkinliğinin arttığı, hücre canlılığının

azaldığı belirlenmiştir. HepG2 hücre hatlarında ise MET ile CIS kombinasyonlarında sitotoksik etkinin azaldığı görülmüştür. Literatürdeki diğer çalışmalarda da CIS ile ilgili verilerde hücre tipine ve doza göre farklılıklar bulunmaktadır. CIS etkisinin ortaya çıkmasında metabolizmasının önemi bulunmaktadır. CIS süperoksit anyonu ve hidroksil radikalini de içeren serbest radikallerin oluşumunu arttırmakta ve bu durum CIS'e bağlı nefrotoksiteyi açıklayan mekanizmalardan biri olarak öne sürülmektedir. Hayvan çalışmalarında, CIS ile böbrek dokularının glutatyon düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. Bu da, GSH'un CIS ile oluşan reaktif oksijen bileşiklerini bağlayarak uzaklaştırması sonucu miktarının azalmasına bağlanmıştır (97, 110, 144). CIS metabolizması sırasında, Pt bir ağır metal olarak salınarak DNA ile katım reaksiyonuna girmektedir. MET'in antioksidan etkisi nedeniyle oluşan radikallerin süpürülmesi özellikle metabolik fonksiyonu fazla olan HepG2 hücreleri ile elde edilen sonuçlara bir açıklama olarak düşünülebilir. Yapılan çalışmada, hücre hasarının bir göstergesi olarak LDH salınımı değerlendirildiğinde her iki hücre hattında da yüksek dozlarda farklılık görülmeyle birlikte sitotoksik cevabın MET ile kombine edildiğinde arttığı görülmüştür.

FACS analizinde ise apoptoza giden hücreler kıyaslanmış, Hep2 hücrelerinde CIS'e bağlı apoptozun özellikle 1mM MET ile kombine edilen dozlarda arttığı görülmüştür. Bunun yanı sıra, XCELLigence'ta canlı olarak hücreler izlendiğinde CIS'in sadece kendisinin uygulandığı hücreler ile karşılaştırıldığında, genel olarak Hep2 hücrelerinde sitotoksik etkinin, MET ile kombine edilerek uygulandığında sinerjistik şekilde arttığı belirlenmiştir. Tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde, CIS'e bağlı kemoterapötik etkinin MET ile arttığı ifade edilebilir.

Pek çok farklı kanser türünün tedavisinde kullanılan ve tedavi sırasında CIS başta olmak üzere farklı kemoterapötiklerle kombine edilen bir antimetabolit ilaç olan GEM ile de tez kapsamında çalışılmıştır. Genel olarak, kemorezistans gelişim oranı yüksek bir ilaç olan GEM'in MTT analizi sonuçları incelendiğinde, her iki hücre hattında da MET ile kombine edildiğinde kemoterapötik etkinin azaldığı görülmüştür. Ancak, özellikle Hep2 hücre hattında genel olarak ilacın genel etkinliğinin de yüksek dozlar da dahil düşük olduğu ve bu durumun da MET ile değişmediği belirlenmiştir. LDH salınım testleri göz önüne alındığında, GEM'e bağlı gelişen hücre hasarının MET ile arttığı ve sinerjistik bir etkinin ortaya çıktığı

görülmüştür.

Hücrelerde indüklenen apoptozisin değerlendirilmesi amacıyla yapılan FACS analizlerinde GEM ile MET kombinasyonunun HepG2 hücre hattında oluşan apoptozda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Hep2 hücre hattında ise genel olarak GEM'in etkisinin MET ile kombine uygulandığında azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, XCELLigence'da gerçekleştirilen analiz yönteminde GEM'in özellikle yüksek dozlarına karşı Hep2 hücrelerinde direnç olduğu, ancak, MET uygulamasının bu durumu düzeltmediği gösterilmiştir. Buna karşın, HepG2 hücrelerinde ilacın sitotoksik etkisinin genel olarak MET ile kombine edildiğinde sitotoksik yanıtı arttırdığı görülmüştür. GEM'in doz ve kanser tipine göre hücrelere olan duyarlılığının değiştiğine dair literatür verileri bulunmaktadır (84). Dolayısıyla, elde edilen verilerdeki değişkenlikler bu literatür verileri ile uyum göstermektedir.

Elde edilen verilerdeki farklılıkların, ilaçların farklı sitotoksik etki mekanizmalarının MET'in hücre metabolizması üzerindeki düzenleyici etkisi nedeniyle değiştirilmesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir. MET'in, AMPK stimüle edici ve antioksidan etkisi gibi farklı biyolojik aktiviteleri, özellikle oksidatif stres oluşturarak etki gösteren sitotoksik ilaçların etkilerini antagonize etmesini açıklayabilir.

Elde edilen veriler, genel olarak değerlendirildiğinde, kullanılan doza ve uygulama yapılan hücre hattına göre sitotoksik yanıtın değişebileceğini ortaya konmuştur. Bu durum da literatürdeki çelişkiyi açıklamaktadır. Diğer yandan, yapılan çalışmalar, genellikle in vitro koşullarda gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla, in vivo araştırma verilerinde eksiklik olduğu görülmektedir. MET ile kanser ilaçları ile ilgili olarak yeni hayvan çalışmalarına ve klinik verilere ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca, in vitro çalışmaların her zaman in vivo modelleri yansıtmadığı, bütün bir organizmanın sistemlerinin kompleksliğinin de değerlendirilerek bu etkileşmelerin yeniden ortaya konması gerekmektedir.

MET kullanan diyabetli kanser hastalarında olası ilaç etkileşmelerinin iyi değerlendirilip, tedavi planlamasının olası sonuçlar göz önüne alınarak yapılması gerekmektedir. Kullanılan onkolojik ilaçların yan etkilerinin ciddiyeti de göz önüne alındığında olası sinerjistik etkileşme sonuçları göz önüne alınmalıdır. Öte yandan, diğer ilaçların MET ile birlikte kullanılmaları durumunda sitotoksik etkilerinin azalmasının da hastanın gerekli tedaviyi alamaması ile sonuçlanacağı

unutulmamalıdır.

Her yaş grubunda sık olarak kullanılan MET, insülin duyarlılığını artıran ilaç gruplarının önemli bir üyesidir. T2DM hastalarının kanser oluşumuna daha yatkın olduğu ve MET'in bu hastaların tedavi seçeneklerinde geniş bir alanı kapladığı unutulmamalıdır. MET ile kemoterapötik ilaçlar arasında görülebilecek olası etkileşmelerin iyi değerlendirilmesi, insan sağlığı ve tedavi etkinliği açısından önem arz etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diabetes mellitus tüm dünyada oldukça yaygın bir şekilde görülen kronik hastalıklardan biridir. En yaygın formu ise bütün diyabetik durumların %90'dan fazlasını T2DM vakaları oluşturur. Çağımızda genetiğe, stresli çalışma koşulları ve dengesiz beslenme alışkanlıklarının da eklenmesiyle birlikte obezite ve T2DM hasta sayılarında ciddi bir artış görülmüştür. Hastalığın mekanizması, son dönemlerde insülin direnci ile açıklanmaya başlamış ve insülin direncine karşı kullanılan MET'in de dahil olduğu insülin duyarlılığını artıran ilaç grupları ile tedavi, son yıllarda popüler hale gelmiştir. Diyabetli hastaların pekçok farklı kronik hastalıkla birlikte kansere yakalanma riskinin, sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu ifade edilmektedir.

MET, diyabet tedavisinde sıklıkla oral olarak kullanılan ve farklı biyolojik özellikleri nedeniyle de adından sıkça söz ettiren, biguanid yapıda, insülin duyarlılığını arttıran bir ilaçtır. Bu çalışmada, MET'in farklı etki mekanizmalarına sahip bazı antikanser ilaçlarla çeşitli dozlarda kombine edildiğinde ortaya çıkabilecek etkileşmeler, farklı yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmanın sonucunda, kullanılan doza ve uygulama yapılan hücre hattına göre sitotoksik yanıtın değişebileceği görülmüştür. Bu durum, literatürde verilen birbirinden farklı sonuçlarla uyum göstermektedir. Sonuçlardaki farklılıklar, ilaçların sitotoksik etki mekanizmalarının farklı olması, farklı dozlarda ve farklı kanser türlerinde değişik sitotoksik etkilerin ortaya çıkabilmesiyle açıklanabilir.

Yaptığımız çalışmadan elde edilen sonuçlar, kullanılan analiz yöntemi, hücre hattı ve kullanılan doza da bağlı olarak farklılıklar içerse de MET'in sitotoksik ilaçlarla olan kombinasyonunun, genel olarak ilaçların etkisini arttırabildiği görülmüştür. Diğer yandan, MET'in hücre metabolizması üzerindeki düzenleyici etkisi, AMPK stimüle edici ve antioksidan etkisi gibi farklı biyolojik aktiviteleri özellikle oksidatif stres oluşturarak etki gösteren sitotoksik ilaçların etkilerini antagonize etmesini açıklayabilir.

Çalışma hücre kültüründe gerçekleştirilmiş olup, in vitro çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilebildiği literatür verilerinden de anlaşılmıştır. MET ile kanser ilaçları arasındaki etkileşmenin ortaya konulabilmesi için in vivo modellerde yapılacak çalışmalara ve olası klinik araştırmalardan sağlanabilecek verilere gereksinim bulunmaktadır.

Diyabetli hastalar arasında kanser tedavisi görenlerin sağlığı açısından MET'in kemoterapötik ilaçlarla kullanımı ile ortaya çıkabilecek olası etkileşmelerin bilinmesi önemlidir. Bu etkileşmelerin sonucunda, onkolojik hastalarda sitotoksik ilaçlara bağlı olarak gelişebilecek yan etkilerin şiddeti ve ilaçların etkinliği değişebilir.

MET kullanan diyabetli kanser hastalarında olası ilaç etkileşmelerinin iyi değerlendirilip, tedavi planlamasının olası sonuçlar göz önüne alınarak yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Diabetes Fact Sheet No.312. Dünya Sağlık Örgütü. 2015.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care.* 2004;27(5):1047-53.
3. IDF Diabetes Atlas. Brüksel: International Diabetes Federation. 2013.
4. Nair V, Sreevalsan S, Basha R, Abdelrahim M, Abudayyeh A, Hoffman AR, et al. Mechanism of Metformin-dependent Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) and Ras Activity in Pancreatic Cancer Role Of Specificity Protein (Sp) Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry.* 2014;289(40):27692-701.
5. Jadhav KS, Dungan CM, Williamson DL. Metformin limits ceramide-induced senescence in C2C12 myoblasts. *Mechanisms of ageing and development.* 2013;134(11):548-59.
6. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes care.* 1989;12(8):553-64.
7. Witters LA. The blooming of the French lilac. *The Journal of clinical investigation.* 2001;108(8):1105-7.
8. Watanabe C. Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. *J biol Chem.* 1918;33:253.
9. Parturier G, Hugonot G. Le Galéga dans le traitement du diabète, par MM. G. Parturier et G. Hugonot: Masson; 1935.
10. Muller H, Rheinwein H. Pharmacology of galegin. *Arch Expll Path Pharm.* 1927;125:212-28.
11. Hesse E, Taubmann G. Die Wirkung des Biguanids und seiner Derivate auf den Zuckerstoffwechsel. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.* 1929;142(5-6):290-308.
12. Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International.* 2004;21(3):115-7.
13. Nattrass M, Alberti KG. Biguanides. *Diabetologia.* 1978;14(2):71-4.
14. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsiachlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer research.* 2009;69(19):7507-11.

15. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer research*. 2011;71(9):3196-201.
16. Wysham CH, Kirkman MS. Response to Comment on: American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2011. *Diabetes Care* 2011; 34 (Suppl. 1): S11–S61. *Diabetes care*. 2011;34(5):e54-e.
17. Group DPPR. Long-term safety, tolerability, and weight loss associated with metformin in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Diabetes care*. 2012;35(4):731-7.
18. Group DPPR. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl j Med*. 2002;2002(346):393-403.
19. Bretnall AE, Clarke GS. Metformin hydrochloride. *Analytical Profiles of drug substances and excipients*. 1998;25:243-93.
20. Metformin Hydrochloride Tablets. FDA. 2002.
21. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong J, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical pharmacokinetics*. 2011;50(2):81-98.
22. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell metabolism*. 2014;20(6):953-66.
23. Kovacic S, Soltys C-LM, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(41):39422-7.
24. Bailey CJ, Feher MD. Therapies for diabetes. Birmingham Sherborne Gibbs Ltd. 2004;127.
25. Hoeland R, Mycek M. Lippincott's illustrated reviews: Pharmacology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2000;157:240.
26. Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(13):867-73.
27. Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *Jama*. 2002;287(3):360-72.
28. Harmancı UDA, Gürlek A. Eski İlaç, Eski ve Yeni Kullanımları: Metformin.
29. DeFronzo RA. The triumvirate: β -cell, muscle, liver. A collusion responsible

- for NIDDM. *Diabetes*. 1988;37(6):667-87.
30. Jeng C-Y, Sheu WH, Fuh MM, Chen YI, Reaven GM. Relationship between hepatic glucose production and fasting plasma glucose concentration in patients with NIDDM. *Diabetes*. 1994;43(12):1440-4.
 31. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(12):2063-9.
 32. Kanigür-Sultuybek G, Güven M, Onaran İ, Tezcan V, Cenani A, Hatemi H. The effect of metformin on insulin receptors and lipid peroxidation in alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 1995;6(3-4):271-80.
 33. Yu J, Kruszynska YT, Mulford MI, Olefsky JM. A comparison of troglitazone and metformin on insulin requirements in euglycemic intensively insulin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 1999;48(12):2414-21.
 34. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1995;333(9):550-4.
 35. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science*. 2012;122(6):253-70.
 36. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, et al. A Direct Effect of Hyperinsulinemia on Serum Sex Hormone-Binding Globulin Levels in Obese Women with the Polycystic Ovary Syndrome*. *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*. 1991;72(1):83-9.
 37. Wilcock C, Bailey CJ. Reconsideration of inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 1991;43(2):120-1.
 38. Hundal H, Ramlal T, Reyes R, Leiter L, Klip A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology*. 1992;131(3):1165-73.
 39. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(9):574-9.

40. Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycaemic effect of metformin. *Drugs*. 1999;58(1):31-9.
41. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Bmj*. 2005;330(7503):1304-5.
42. Chong CR, Chabner BA. Mysterious metformin. *The oncologist*. 2009;14(12):1178-81.
43. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo S-H, Bardeesy N, DePinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005;310(5754):1642-6.
44. Yeh C-H, Chen T-P, Wang Y-C, Lin Y-M, Fang S-W. AMP-activated protein kinase activation during cardioplegia-induced hypoxia/reoxygenation injury attenuates cardiomyocytic apoptosis via reduction of endoplasmic reticulum stress. *Mediators of inflammation*. 2011;2010.
45. Mazière J-C, Mazière C, Mora L, Gardette J, Salmon S, Auclair M, et al. The antidiabetic drug metformin decreases cholesterol metabolism in cultured human fibroblasts. *Atherosclerosis*. 1988;71(1):27-33.
46. Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes*. 1999;48(2):353-7.
47. Hurst RT, Lee RW. Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management. *Annals of internal medicine*. 2003;139(10):824-34.
48. Yin M, van der Horst IC, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, Silljé HH, et al. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301(2):H459-H68.
49. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside. *European Journal of Biochemistry*. 1995;229(2):558-65.
50. Scolletta S, Biagioli B. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2010;64(3):203-7.

51. Pantalone KM, Kattan MW, Yu C, Wells BJ, Arrigain S, Jain A, et al. The Risk of Overall Mortality in Patients With Type 2 Diabetes Receiving Glipizide, Glyburide, or Glimepiride Monotherapy A retrospective analysis. *Diabetes care*. 2010;33(6):1224-9.
52. Gundewar S, Calvert JW, Jha S, Toedt-Pingel I, Ji SY, Nunez D, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circulation research*. 2009;104(3):403-11.
53. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Legrand A, Beaudeau J-L. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism*. 2005;54(6):829-34.
54. Lee MS, Hsu CC, Wahlqvist ML, Tsai HN, Chang YH ve 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;11:20.
55. 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*. 2011;13(5):483-IN28.
56. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2010;60(4):207-21.
57. Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, et al. Metformin: taking away the candy for cancer? *European journal of cancer*. 2010;46(13):2369-80.
58. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1776-83.
59. El-Mir M-Y, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(1):223-8.
60. Capitanio S, Marini C, Sambuceti G, Morbelli S. *WJR. World*. 2015;7(3):57-60.
61. Griss T, Vincent EE, Egnatchik R, Chen J, Ma EH, Faubert B, et al.

- Metformin antagonizes cancer cell proliferation by suppressing mitochondrial-dependent biosynthesis. *PLoS Biol.* 2015;13(12):e1002309.
62. Quinn BJ, Kitagawa H, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2013;24(9):469-80.
 63. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. *Cancer discovery.* 2012;2(9):778-90.
 64. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a tool to target aging. *Cell Metabolism.* 2016;23(6):1060-5.
 65. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Yang X, Lind SE, Thor AD. Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle.* 2011;10(17):2959-66.
 66. Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, et al. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(50):21830-5.
 67. Pérez-Revuelta B, Hettich M, Ciociaro A, Rotermund C, Kahle P, Krauss S, et al. Metformin lowers Ser-129 phosphorylated α -synuclein levels via mTOR-dependent protein phosphatase 2A activation. *Cell death & disease.* 2014;5(5):e1209.
 68. Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir M, Fontaine E, Rigoulet M, et al. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *Journal of bioenergetics and biomembranes.* 2006;38(1):33-42.
 69. Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochemical Journal.* 2014;462(3):475-87.
 70. Zheng Z, Chen H, Li J, Li T, Zheng B, Zheng Y, et al. Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes.* 2012;61(1):217-28.
 71. Cho K, Chung JY, Cho SK, Shin H-W, Jang I-J, Park J-W, et al. Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXR

- [agr]/POMC pathway. *Scientific reports*. 2015;5.
72. Duca FA, Côté CD, Rasmussen BA, Zadeh-Tahmasebi M, Rutter GA, Filippi BM, et al. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nature medicine*. 2015;21(5):506-11.
 73. Algire C, Moiseeva O, Deschênes-Simard X, Amrein L, Petruccelli L, Birman E, et al. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prevention Research*. 2012;5(4):536-43.
 74. Saisho Y. Metformin and inflammation: Its potential beyond glucose-lowering effect. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*. 2015;15(3):196-205.
 75. Song YM, Lee Y-h, Kim J-W, Ham D-S, Kang E-S, Cha BS, et al. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy*. 2015;11(1):46-59.
 76. Xie Z, Lau K, Eby B, Lozano P, He C, Pennington B, et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes*. 2011;60(6):1770-8.
 77. Moiseeva O, Deschênes - Simard X, St - Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence - associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF - κ B activation. *Aging Cell*. 2013;12(3):489-98.
 78. Cabreiro F, Au C, Leung K-Y, Vergara-Irigaray N, Cochemé HM, Noori T, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell*. 2013;153(1):228-39.
 79. Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, et al. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle*. 2008;7(17):2769-73.
 80. De Haes W, Frooninckx L, Van Assche R, Smolders A, Depuydt G, Billen J, et al. Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(24):E2501-E9.

81. Group UPDS. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *The Lancet*. 1998;352(9131):854-65.
82. Bannister C, Holden S, Jenkins - Jones S, Morgan CL, Halcox J, Schernthaner G, et al. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non - diabetic controls. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2014;16(11):1165-73.
83. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(8):573-84.
84. Hofman J, Malcekova B, Skarka A, Novotna E, Wsol V. Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;278(3):238-48.
85. Doxorubicin Hydrochloride for Injection. USP. 2011.
86. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Kitapçılık. 1998;1:398.
87. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(7):440.
88. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(7):727-41.
89. Ashour AE, Sayed-Ahmed MM, Abd-Allah AR, Korashy HM, Maayah ZH, Alkhalidi H, et al. Metformin rescues the myocardium from doxorubicin-induced energy starvation and mitochondrial damage in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012;2012.
90. Doxorubicin. Truven Health Analytics. 2016.
91. Fischer J, Ganellin CR. Analogue-based drug discovery II: John Wiley & Sons; 2010.
92. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. *The Merck Index*, Merck & Co. Inc, Rahway, NJ. 1989;1008.
93. Cisplatin – Koçak 50 mg /100 ml I.V. İnfüzyon İçin Konsantre Solüsyon

- İçeren Flakon. Koçak Farma. 2004.
94. Yasuyuki S, Takahiro S, Yoshio T. Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. *Toxicology letters*. 1992;62(2-3):293-300.
 95. Klaassen C. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. Baskı. McGraw-Hill Companies Inc. Medical Publishing Division, USA; 2001.
 96. Calderari G, Bonadeo D, Cannella R, Macciocchi A, Miksztal A, Malefyt T, et al. Liquid pharmaceutical formulations of palonosetron. Google Patents; 2016.
 97. 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. *International Journal of Cancer*. 2012;131(3):752-9.
 98. Pruefer F, Lizarraga F, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Participation of Omi Htra2 serine-protease activity in the apoptosis induced by cisplatin on SW480 colon cancer cells. *Journal of chemotherapy*. 2013.
 99. Sun X-J, Zhang P, Li H-H, Jiang Z-W, Jiang C-C, Liu H. Cisplatin combined with metformin inhibits migration and invasion of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating E-cadherin and MMP-9. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2013;15(9):4019-23.
 100. Kobashigawa LC, Xu YC, Padbury JF, Tseng Y-T, Yano N. Metformin protects cardiomyocyte from doxorubicin induced cytotoxicity through an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway: an in vitro study. *PloS one*. 2014;9(8):e104888.
 101. Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H, et al. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *European journal of pharmacology*. 2002;451(2):203-8.
 102. Chang J, Jung HH, Yang JY, Lee S, Choi J, Im GJ, et al. Protective effect of metformin against cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2014;15(2):149-58.
 103. Urien S, Lokiec F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma

cisplatin in adult patients. *British journal of clinical pharmacology*. 2004;57(6):756-63.

104. Gemcitabine hydrochloride MSDS. Sigma Aldrich. 2016.
105. Randall ME, Constable WC. Guidelines for handling parenteral antineoplastics. *JAMA*. 1985;254(8):1033-.
106. Kleeff J, Michalski C, Friess H, Büchler MW. Pancreatic cancer: from bench to 5-year survival. *Pancreas*. 2006;33(2):111-8.
107. Reni M, Cereda S, Mazza E, Passoni P, Nicoletti R, Balzano G, et al. PEFG (cisplatin, epirubicin, 5-fluorouracil, gemcitabine) regimen as second-line therapy in patients with progressive or recurrent pancreatic cancer after gemcitabine-containing chemotherapy. *American journal of clinical oncology*. 2008;31(2):145-50.
108. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*. 2006;17(suppl 5):v7-v12.
109. Jones RB, Frank R, Mass T. Safe handling of chemotherapeutic agents: a report from the Mount Sinai Medical Center. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1983;33(5):258-63.
110. Barbieri F, Thellung S, Ratto A, Carra E, Marini V, Fucile C, et al. In vitro and in vivo antiproliferative activity of metformin on stem-like cells isolated from spontaneous canine mammary carcinomas: translational implications for human tumors. *BMC cancer*. 2015;15(1):1.
111. Daerden F, Lefeber D. Pneumatic artificial muscles: actuators for robotics and automation. *European journal of mechanical and environmental engineering*. 2002;47(1):11-21.
112. 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(9):1620-5.
113. Lega IC, Austin PC, Gruneir A, Goodwin PJ, Rochon PA, Lipscombe LL. Association between metformin therapy and mortality after breast cancer. *Diabetes Care*. 2013;36(10):3018-26.
114. Bo S, Ciccone G, Rosato R, Villosi P, Appendino G, Ghigo E, et al. Cancer mortality reduction and metformin: a retrospective cohort study in type 2 diabetic patients. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2012;14(1):23-9.

115. Garrett C, Hassabo H, Bhadkamkar N, Wen S, Baladandayuthapani V, Kee B, et al. Survival advantage observed with the use of metformin in patients with type II diabetes and colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2012;106(8):1374-8.
116. Spillane S, Bennett K, Sharp L, Barron TI. A cohort study of metformin exposure and survival in patients with stage I–III colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2013;22(8):1364-73.
117. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*. 2004;56(2):185-229.
118. Argun M, Üzümlü K, Sönmez MF, Özyurt A, Karabulut D, Soyarsarıca Z, et al. Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anatol J Cardiol*. 2015.
119. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp M-C, Gu J, Lau S, Pollak MN, et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;110(2):246-50.
120. Teixeira SF, Guimarães IdS, Madeira KP, Daltoé RD, Silva IV, Rangel LBA. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2013;39(6):644-9.
121. Lesan V, Ghaffari SH, Salaramoli J, Heidari M, Rostami M, Alimoghaddam K, et al. Evaluation of antagonistic effects of metformin with Cisplatin in gastric cancer cells. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2014;8(3):12.
122. Damelin LH, Jivan R, Veale RB, Rousseau AL, Mavri-Damelin D. Metformin induces an intracellular reductive state that protects oesophageal squamous cell carcinoma cells against cisplatin but not copper-bis (thiosemicarbazones). *BMC cancer*. 2014;14(1):1.
123. Wang Y, Lin B, Wu J, Zhang H, Wu B. Metformin inhibits the proliferation of A549/CDDP cells by activating p38 mitogen-activated protein kinase. *Oncology letters*. 2014;8(3):1269-74.
124. Wang J, Gao Q, Wang D, Wang Z, Hu C. Metformin inhibits growth of lung adenocarcinoma cells by inducing apoptosis via the mitochondria-mediated

- pathway. *Oncology letters*. 2015;10(3):1343-9.
125. Li J, Gui Y, Ren J, Liu X, Feng Y, Zeng Z, et al. Metformin Protects Against Cisplatin-Induced Tubular Cell Apoptosis and Acute Kidney Injury via AMPK α -regulated Autophagy Induction. *Scientific reports*. 2016;6.
 126. Kawanami T, Takiguchi S, Funakoshi NI. A humanized anti-IGF-IR monoclonal antibody (R1507) and/or metformin enhance gemcitabine-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncology reports*. 2012;27(3):867.
 127. Chai X, Chu H, Yang X, Meng Y, Shi P, Gou S. Metformin increases sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine by reducing CD133+ cell populations and suppressing ERK/P70S6K signaling. *Scientific reports*. 2015;5.
 128. Shi Y, He Z, Jia Z, Xu C. Inhibitory effect of metformin combined with gemcitabine on pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports*. 2016;14(4):2921-8.
 129. Cirlini M, Barilli A, Galaverna G, Michlmayr H, Adam G, Berthiller F, et al. Study on the uptake and deglycosylation of the masked forms of zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;98:232-9.
 130. Ohguro N, Fukuda M, Sasabe T, Tano Y. Concentration dependent effects of hydrogen peroxide on lens epithelial cells. *British journal of ophthalmology*. 1999;83(9):1064-8.
 131. Spriet LL, Howlett RA, Heigenhauser GJ. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 2000;32(4):756-63.
 132. Schlinkert P, Casals E, Boyles M, Tischler U, Hornig E, Tran N, et al. The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. *Journal of nanobiotechnology*. 2015;13(1):1.
 133. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Cornell Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. 2014.
 134. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*. 2006;1(3):1458-61.

135. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Experimental cell research*. 2002;277(1):1-14.
136. Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *dental materials*. 2010;26(1):51-8.
137. Setter SM, Iltz JL, Thams J, Campbell RK. Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. *Clinical therapeutics*. 2003;25(12):2991-3026.
138. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2000;57(8-9):1229-35.
139. Borch RF, Pleasants ME. Inhibition of cis-platinum nephrotoxicity by diethyldithiocarbamate rescue in a rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979;76(12):6611-4.
140. Hannemann J, Baumann K. Cisplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: different effects of antioxidants and radical scavengers. *Toxicology*. 1988;51(2-3):119-32.
141. Dubaskaia T, Vetoshkina T, Gol'dberg V. [The mechanisms of the hepatotoxicity of complex platinum compounds]. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija*. 1993;57(1):38-41.
142. Bompart G. Cisplatin-induced changes on cytochrome P-450, lipid peroxidation and some P-450 related specific catalytic activities in rat liver. *Journal de toxicologie clinique et expérimentale*. 1990;10(6):375-83.
143. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *European journal of pharmacology*. 2014;741:8-16.
144. Appenroth D, Fröb S, Kersten L, Splinter F-K, Winnefeld K. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. *Archives of toxicology*. 1997;71(11):677-83.

8. ÖZGEÇMİŞ

I - Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı: Ayşe Zeynep ÜNAL

Doğum Yeri: Yenimahalle

Doğum Tarihi: 18/09/1991

Uyruğu: T.C.

Adresi: GEN İlaç A.Ş. (FABRİKA) ASO 2. OSB. 2013. Cad. Alcı Köyü

Temelli/Sincan/ANAKARA

Telefon: 0533 3387306

e-mail: a.zeynep.u@gmail.com

Ünvanı: Kimyager

Yabancı Dil: İngilizce, Almanca

II – Eğitim

2014 – 2016: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji

Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)

2009 – 2014: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü (Lisans)

III – Mesleki Deneyim

Ağustos 2016 – şimdi: GEN İlaç A.Ş - Kalite Kontrol Analisti

IV – Bilimsel Faaliyetler

Katıldığı seminer, kurs ve kongreler

- TURKHELTOX Toxicology Congress, Izmir/TÜRKİYE, 21-24 Ekim 2015
- Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesi, Ankara/TÜRKİYE, 11-14 Şubat 2016