

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKS SKUAMÖZ HÜCRELİ KANSER HÜCRE
SERİLERİNDE SİSPLATİN İLE EŞ ZAMANLI
RADYOTERAPİYE EKLENEN METFORMİN'İN
RADYODUYARLILAŞTIRICI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Çağlayan Selenge BEDÜK ESEN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2022**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKS SKUAMÖZ HÜCRELİ KANSER HÜCRE
SERİLERİNDE SİSPLATİN İLE EŞ ZAMANLI
RADYOTERAPİYE EKLENEN METFORMİN'İN
RADYODUYARLILAŞTIRICI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Çağlayan Selenge BEDÜK ESEN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Melis GÜLTEKİN**

**ANKARA
2022**

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda almış olduğum 5 yıllık uzmanlık eğitimim süresince başta anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Gökhan Özyiğit olmak üzere, heyecanından hiç bir şey kaybetmeyerek bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan mutluluk duyan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Faruk Zorlu, Prof. Dr. Ferah Yıldız, Prof. Dr. Mustafa Cengiz, Prof. Dr. Gözde Yazıcı, Prof. Dr. Pervin Hürmüz, Doç. Dr. Sezin Yüce Sarı'ya ve uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgilerinden yararlandığım emekli öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Fadıl Akyol ve Prof. Dr. Murat Gürkaynak'a bana kazandırdıkları her şey için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince, hem akademik anlamda kendisinden çok şey öğrendiğim hem de manevi anlamda bir an olsun desteğini esirgemeyen, örnek kişiliği ile her zaman bana yol gösteren tez danışmanım ve saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Melis Gültekin'e özel olarak saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'ndan Öğr. Gör. Dr. Fazlı Yağız Yedekçi'ye, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Hande Canpınar'a, Doç. Dr. Gürcan Günaydın'a, Uzm. Biol. Dr. Mustafa Emre Gedik'e ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Öğr. Gör. Dr. Beren Karaosmanoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Bölümümüzde birlikte çalışmaktan her zaman memnuniyet duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma, hastalar için beraber emek verdiğimiz fizik mühendisi, hemşire, tekniker, tıbbi sekreter tüm iş arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak her zaman sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim, hayatım boyunca doğru kararlar almamı sağlayıp vizyonumu genişleten çok sevgili annem, babam ve ablama; her an yanımda olan, desteğini hissettiğim ve araştırma merakıyla beni teşvik eden çok sevgili eşim Uzm. Dr. Barış Esen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 18754

ÖZET

Çağlayan Selenge Bedük Esen, Serviks Skuamöz Hücreli Kanser Hücre Serilerinde Sisplatin ile Eş Zamanlı Radyoterapiye Eklenen Metformin'in Radyoduyarlılaştırıcı Rolünün Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022. Serviks kanseri tedavisi sürecinde çeşitli mekanizmalarla radyoterapi (RT) ve sisplatine karşı direnç gelişmektedir. Metforminin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğunu ve RT ile birlikte uygulandığında radyoduyarlılığını arttırdığını gösteren çalışmalar olsa da serviks kanserinde RT ile eş zamanlı sisplatin uygulamasına metformin eklendiğinde tümör kontrolünün artıp artmadığı ile ilgili veri bulunmamaktadır. Bu amaçla, insan serviks kanseri hücre dizisi HeLa hücrelerinde metforminin tek başına radyoduyarlılaştırıcı etkisi, sisplatin ile eş zamanlı uygulamasındaki etkisi ve 5' adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) aktivasyonu/inhibisyonu ile radyoduyarlılığın değişip değişmediği bu çalışmada araştırılmıştır. Metforminin iyonizan radyasyon varlığında sisplatin sitotoksitesini arttırmadığı gösterilmiştir (sisplatin ile kıyaslandığında, $p>0.05$). Özellikle yüksek iyonizan radyasyon dozlarında sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir. Yüksek iyonizan radyasyon dozunda hem sisplatin hem de metformin tek başlarına radyoduyarlılaştırıcı etkileri devam etmesine rağmen (hem sisplatin hem de metformin kontrol ile kıyaslandığında, $p<0.01$) sisplatine metformin eklenmesi radyoduyarlılığını arttırmamaktadır (sisplatin ile kıyaslandığında, $p>0.05$). AMPK inhibitörü olan dorsomorfinin tüm iyonizan radyasyon dozlarında sisplatinin etkinliğini arttırarak AMPK aktivatörü olan A769662 ve metforminden daha potent bir radyoduyarlılaştırıcı ajan olduğu gösterilmiştir. A769662'nin sisplatinden 24 saat önce uygulanması ile hücre içinde artan AMPK'nın sisplatine direnç oluşturduğu, ancak eş zamanlı uygulamada bu etkinin gözlenmediği görülmüştür. Metformin, sisplatin, A769662 ve dorsomorfinin iyonizan radyasyona duyarlılık üzerine etkileri hücre hasar ve hasar tamiri proteinleri ve hücre siklus duraklaması incelenerek desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: serviks kanseri, metformin, sisplatin, iyonizan radyasyon, AMPK, radyoduyarlılık

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 17.03.2020 tarihinde GO 20/274 numarası ile onay alınmıştır.

Destekleyen kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 18754

ABSTRACT

Beduk Esen C.S., Role of the Radiosensitizing Effect of Metformin Added to Concomitant Radiotherapy with Cisplatin in Cervical Squamous Cell Cancer Cell Lines, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Radiation Oncology, Ankara, 2022. The radioresistance and chemoresistance may develop in cervical cancer patients during treatment. Although there are several studies reporting antiproliferative and radiosensitizing effects of metformin, the effect of metformin on the radiosensitizing effect of cisplatin when combined with chemoradiotherapy is uncertain. The aim of this study is to investigate the radiosensitizing effect of metformin per se and combined with cisplatin in human cervical cancer cell line (HeLa) and explore how radiosensitizing effect changes with activation/inhibition of AMPK. Metformin, when combined with cisplatin, did not increase the radiosensitivity of cisplatin (compared to cisplatin, $p>0.05$). Although the radiosensitizing effects of metformin and cisplatin per se were present in high ionizing radiation doses (both metformin and cisplatin compared to control, $p<0.01$), metformin did not increase the radiosensitivity of cisplatin in combination (compared to cisplatin, $p>0.05$). Dorsomorfin which is AMPK inhibitor potentiated cytotoxicity of cisplatin with all ionizing radiation doses, thus, dorsomorfin was found to be a more radiosensitizing agent than A769662 and metformin. Administration of A769662 24 hours prior to cisplatin treatment caused an increase in AMPK that produced resistance to cisplatin, but this effect was not observed in HeLa cells concomitantly treated with A769662 and cisplatin. The radiosensitizing effects of metformin, cisplatin, A769662, and dorsomorfin has been confirmed with analysis of DNA damage proteins, damage repair proteins and evaluation of cell cycle arrest.

Keywords: cervical cancer, metformin, cisplatin, ionizing radiation, AMPK, radiosensitivity

This study was approved by Hacettepe University Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee with a number of GO 20/274 in 17.03.2020.

Funding: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project Number: 18754

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serviks Kanseri	2
2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	2
2.1.2. Serviks Kanserinin Moleküler Biyolojisi	3
2.1.3. Evreleme ve Tanı	4
2.1.4. Tedavi	6
2.2. Metformin	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hücre Kültürü	22
3.2. Mikoplazma Testi	24
3.3. Hücre Sağkalım Deneylerinde Kullanılacak Hücre Sayısının Belirlenmesi	25
3.4. Deneylerde Kullanılacak İlaç Dozlarının Belirlenmesi	27
3.5. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi	30
3.6. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	33
3.6.1. İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Zamana Bağlı Değişiminin İncelenmesi	34
3.7. İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Değişiminin İncelenmesi	39
3.8. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Flow Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi	40

3.9. Biyoenformatik Analiz	40
3.10. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. Serviks Kanseri Tedavisinde AMPK'nın Hedeflenmesi	42
4.2. Hücre Sağkalım Deneylerinde Kullanılacak Hücre Sayısının Belirlenmesi	44
4.3. Deneyde Kullanılacak İlaç Dozlarının MTT ile Belirlenmesi	44
4.4. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin MTT ile İncelenmesi	47
4.5. İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Zamana Bağlı Değişiminin İncelenmesi	59
4.6. İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Değişiminin İncelenmesi	61
4.7. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Flow Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	69
5. TARTIŞMA	73
5.1. İyonizan Radyasyon, Sisplatin ve Metforminin Hücre Üzerindeki Etkileri	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	85
EKLER	
Ek-1. Kimyasal Maddeler ve Kitler	
Ek-2. Cihazlar	
Ek-3. Birinci ve ikinci senaryoda 1 mM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi	
Ek-4. Birinci ve ikinci senaryoda 1 µM sisplatin + 1 mM metformin ve 0,5 µM sisplatin + 1 mM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi	
Ek-5. Birinci ve ikinci senaryoda 200 µM A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi	
Ek-6. Birinci ve ikinci senaryoda 1 µM sisplatin + 200 µM A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi	
Ek-7. Birinci ve ikinci senaryoda 1,5 µM dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi	

- Ek-8. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 1,5 μ M dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi
- Ek-9. Birinci ve ikinci senaryoda üç ilaç kombinasyonu uygulanan hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: 5' adenozin monofosfat
AMPK	: 5' adenozin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz
APC	: Adenomatosis poliposis koli
ATM	: Ataksi-telenjiyektazi mutasyon proteini
ATP	: Adenozin trifosfat
BRCA1	: Meme kanseri tip 1 yatkınlık proteini
BRT	: Brakiterapi
BSA	: Bovine Serum Albumin
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CaMKKβ	: Kalsiyum bağımlı protein kinaz
CCLE	: Cancer Cell Line Encyclopedia
CIN	: Servikal intraepitelyal neoplazi
DAPK1	: Ölüm ilişkili kinaz-1
DM	: Diyabetes mellitus
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EQD2	: 2 Gy doz eşdeğeri
ERCC1	: Excision repair cross complement-1
FBS	: Fötal dana serumu
FIGO	: The International Federation of Gynecology and Obstetrics
GOG	: Gynecologic Oncology Group
Her-2	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü-2
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HPV	: Human papillomavirus
HRR	: Homologous recombination repair

IGF-1	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1
IR	: İyonizan radyasyon
KRT	: Kemoradyoterapi
KT	: Kemoterapi
LET	: Lineer enerji transferi
LKB1	: Karaciğer kinaz B1
LncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
MGMT	: O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz
MiRNA	: MikroRNA
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: Mesajcı RNA
mTOR	: Rapamisin memeli hedefi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NET	: Nükleotid eksizyon tamir
NF-κB	: Nuclear factor kappa B
NHEJ	: Nonhomologous end-joining
OER	: Oksijen iyileştirme oranı
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PFGE	: Pulsed Field Gel Elektroforezi
PI3K	: Fosfoinozid 3 kinaz
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen radikalleri
RPA	: Replikasyon protein A
RT	: Radyoterapi
SAD	: Source-axis distance
SCC-Ag	: Skuamöz hücreli karsinom antijeni
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
XP	: Kseroderma pigmentosum

XRCC-1	: X-ray repair cross complementing-1
VKİ	: Vücut-kitle indeksi
TBS	: Tris Buffered Saline
TCA	: Trikarboksilik asit
TGS	: Tris-Glisin-SDS
TSC2	: Tüberoskleroz kompleks-2
53BP1	: p53-bağlayıcı protein 1



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İyonizan radyasyon ile DNA hasar oluşumu ve DNA hasar tamir mekanizmaları	9
2.2. Sisplatin ile indüklenen DNA hasar oluşumu	13
2.3. Metforminin etki mekanizmaları	14
2.4. Metforminin kanser hücresi üzerindeki potansiyel mekanizmaları	17
2.5. AMPK'nın kanser hücrelerinde KT ve RT'ye yanıtındaki görevleri	20
3.1. HeLa hücre dizisinin DMEM düşük-glukoz besiyerinde çoğaltılması	23
3.2. Mikoplazma test sonucu	25
3.3. Hücre sayısının belirlenmesinin şematik görünümü.	26
3.4. Birinci senaryoda sisplatin dozlarının belirlendiği 96 kuyulu plak örneği.	29
3.5. Birinci senaryoda 2 Gy IR uygulanan 96 kuyulu plak örneği	31
3.6. Işınlama işlemi gantri 180°'de iken SAD = 100 cm olacak şekilde 10 cm derinlikte 40x40 alan boyutunda 6 MV foton demetleriyle RW3 katı fantomlar üzerinde yapıldı. Geri saçılan radyasyon etkisinden dolayı plakların üzerine 5 cm katı fantom yerleştirildi.	32
3.7. Spektrofotometre ile formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimleri 570 nm dalga boyunda okunarak kuyuların optik dansiteleri elde edildi.	32
3.8. Proteinlerin jel elektroforezi tankında yürütülmesi işlemi	37
3.9. Membranların oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcıda sekonder antikör ile inkübasyonu	38
4.1. CAMKK, PKA, LKB1 (STK11) genlerinin bazal ekspresyonlarının HeLa hücre dizisinde en yüksek düzeyde olduğunun gösterilmesi.	42
4.2. Serviks kanserli hastalarda PRKAA1 ve PRKAA2 gen ekspresyon düzeyinin artmış olduğunun gösterilmesi.	43
4.3. PRKAA1 ve PRKAA2 gen ekspresyonlarının normal serviks dokusuna kıyasla serviks kanseri dokusunda daha yüksek olduğunun gösterilmesi.	43
4.4. HeLa hücre dizisinde PRKAA1 ve PRKAA2 gen ekspresyon düzeyinin yüksek olduğunun gösterilmesi.	44
4.5. HeLa hücre sayısı titrasyonu.	44
4.6. Birinci ve ikinci senaryoda sisplatin konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.	45
4.7. Birinci ve ikinci senaryoda metformin konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.	45
4.8. Birinci ve ikinci senaryoda A769662 konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.	46

4.9.	Birinci ve ikinci senaryoda dorsomorfin konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.	47
4.10.	Birinci ve ikinci senaryoda kontrol (ilaç eklenmeyen) hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	48
4.11.	Birinci ve ikinci senaryoda 0,5 μ M sisplatin eklenen hücre dizisinin iyonizan radyasyon dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	49
4.12.	Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	50
4.13.	Birinci ve ikinci senaryoda 150 μ M metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	50
4.14.	Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	51
4.15.	Birinci ve ikinci senaryoda 100 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	52
4.16.	Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	52
4.17.	Birinci ve ikinci senaryoda 0,5 μ M dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	53
4.18.	Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M Sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.	53
4.19.	Birinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin + 150 μ M meformin ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.	54
4.20.	Birinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 100 μ M A769662 ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.	55
4.21.	Birinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M Sisplatin, 0.5 μ M Dorsomorfin ve 1 μ M Sisplatin + 0.5 μ M Dorsomorfin ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması	56
4.22.	İkinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin + 150 μ M meformin ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.	57
4.23.	İkinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 100 μ M A769662 ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.	58
4.24.	İkinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.	59

- 4.25.** Birinci senaryo için 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR uygulanan hücre dizilerinin iyonizan radyasyon sonrası 1. ve 8. saatteki hücre hasar protein ekspresyon görüntüleri. 60
- 4.26.** İkinci senaryo için 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR uygulanan hücre dizilerinin IR sonrası 1. ve 8. saatteki protein ekspresyon görüntüleri. 60
- 4.27.** Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-AMPK/AMPK protein düzeyi üzerine etkisi. 62
- 4.28.** 0,5 μ M dorsomorfın ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-AMPK/AMPK protein düzeyi üzerine etkisi. 62
- 4.29.** 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfın ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-AMPK/AMPK protein düzeyi üzerine etkisi. 63
- 4.30.** Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-H2AX/H2AX protein düzeyi üzerine etkisi. 64
- 4.31.** 0,5 μ M dorsomorfın ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-H2AX/H2AX protein düzeyi üzerine etkisi. 64
- 4.32.** 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfın ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-H2AX/H2AX protein düzeyi üzerine etkisi. 65
- 4.33.** Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-53BP1/53BP1 protein düzeyi üzerine etkisi. 66
- 4.34.** 0,5 μ M dorsomorfın ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-53BP1/53BP1 protein düzeyi üzerine etkisi. 66
- 4.35.** 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfın ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-53BP1/53BP1 protein düzeyi üzerine etkisi. 67
- 4.36.** Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının ERCC1 protein düzeyi üzerine etkisi. 68
- 4.37.** 0,5 μ M dorsomorfın ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının ERCC1 protein düzeyi üzerine etkisi. 68

- 4.38.** 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M Sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının ERCC1 protein düzeyi üzerine etkisi. 69
- 4.39.** Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M Sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarında G2/M fazında hücre siklus duraklamasının karşılaştırılması. 70
- 4.40.** 0,5 μ M dorsomorfin ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarında G2/M fazında hücre siklus duraklamasının karşılaştırılması. 70
- 4.41.** 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarında G2/M fazında hücre siklus duraklamasının karşılaştırılması. 70
- 4.42.** IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin + 150 μ M meformin ilaç kombinasyonlarının hücre siklus duraklaması üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. 71
- 4.43.** IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 100 μ M A769662 ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 ilaç kombinasyonlarının hücre siklus duraklaması üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. 71
- 4.44.** IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ilaç kombinasyonlarının hücre siklus duraklaması üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. 72

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. FIGO 2018 Serviks Kanseri Evreleme Sistemi	5
3.1. Kullanılan ilaç dozları	27
3.2. İlaç dozlarının ve IR'un uygulanma zamanları	28
3.3. Doksan altı kuyulu plakta her ilaç/ilaç kombinasyonunun 3 tekrar şeklinde sıralanışı	33



1. GİRİŞ

Serviks kanserleri, tüm dünyada en sık görülen jinekolojik kanserlerdir. Erken evre olgularda primer tedavi sıklıkla cerrahiyi içermesine karşın, lokal ileri evre olgularda standart tedavi eş zamanlı sisplatin-bazlı kemoradyoterapi (KRT) ve takiben brakiterapiyi (BRT) içerir. Radyoterapi (RT) ile eş zamanlı uygulanan sisplatin radyoduyarlılaştırıcı etkisi ile RT'nin etkinliğini artırır. Ancak tedavi süresince bazı hastalarda RT ve sisplatine karşı çeşitli mekanizmalarla direnç gelişmektedir. Bu nedenle tüm dünyada hastalık kontrolünün artırılması amacıyla çeşitli radyoduyarlılaştırıcı ajanlar aracılığıyla tedavi sonuçlarının iyileştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Metformin, tip 2 diyabetes mellitus (DM) tedavisinde uzun yıllardır kullanılan, düşük yan etki profiline sahip biguanid türevi oral antidiyabetik bir ilaçtır ¹. Antidiyabetik etkisinin yanı sıra halihazırda metformin kullanan hastalarda kanser insidansının ve kanser ilişkili mortalitenin azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur ². Bununla birlikte, metforminin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğunu ve RT ile birlikte uygulandığında radyoduyarlılığı artırdığını gösteren prelinik ve klinik çalışmalar mevcuttur ³.

Elimizdeki bu verilere karşılık, farklı tümör tiplerinde radyoterapi ile eş zamanlı uygulanan sisplatine metformin eklenmesinin tümör kontrolünü artırıp artmadığına ilişkin çalışmalarda farklı sonuçlar mevcuttur ⁴. Serviks kanserlerinde radyoterapi ile eş zamanlı sisplatin standart tedavi olmasına karşın literatürde metforminin rolüne ilişkin yeterli veri olmaması dikkat çekmektedir. Bu amaçla, çalışmamızda insan serviks kanseri skuamöz hücreli kanser hücre serisi olan HeLa hücrelerinde metforminin tek başına radyoduyarlılaştırıcı etkisi, sisplatin ile eş zamanlı uygulamadaki etkisi ve bu etkiyi 5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) yolağı aracılığıyla yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serviks Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Serviks kanseri tarama programlarının başarılı bir şekilde uygulanması ile serviks kanseri ilişkili mortalite oranları son 50 yılda belirgin olarak azalmıştır ⁵. Buna karşılık GLOBOCAN 2020 yılı verilerine göre, serviks kanseri halen tüm dünyada yılda 604.000 yeni hasta sayısı ile 4. en sık görülen kanser ve yılda 342.000 ölüm ile 4. en sık kanser ilişkili ölüm nedenidir ⁶.

Tüm serviks kanseri vakalarının %95'inden fazlasında altta yatan neden kronik *human papillomavirus* (HPV) enfeksiyonudur ^{7,8}. HPV çift zincirli bir deoksiribonükleik asit (DNA) virüsüdür ve serviks kanserine en sık sebep olan alt tipleri HPV 16 ve 18'dir. Daha az sıklıkla ise HPV 31, 33, 35, 45, 52 ve 58 görülür ⁹. HPV ilişkili kanser oluşumu viral partiküllerin epitel bazal membranı içerisine girdikten sonra (epizomal DNA) konak hücre genomuna entegre olarak (entegre DNA) viral genomun konak hücreye geçişine izin vermesi ile başlar ¹⁰. HPV'nin onkogenik rolü ise iki erken viral protein olan E6 ve E7'nin protoonkogenler ve tümör supresor genlerin kodladığı hücre büyümesinin düzenleyicisi olan genlerle ilişkiye girmesiyle gerçekleşir ¹¹. E6 proteini, hücre içerisinde kanser gelişimine neden olabilecek mutasyonların birikimini önleyerek hücrenin apoptozise gitmesini sağlayan tümör supresor gen ürünü olan p53'ün yıkımına neden olur. E7 proteini ise pRb'ü inaktive eder ^{11,12}. pRb'un fosforilasyon durumu hücre siklusuna bağlı olup, G0 ve G1 fazında defosforile haldedir ve defosforile Rb, E2F gibi transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek DNA sentezi ve hücre siklusunun devamlılığını sağlayan genlerin ekspresyonunu azaltır ¹³. E7 proteininin pRb'ü inaktive etmesi ise hücrelerin S fazına erken girişine, DNA sentezine ve kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur ¹⁴. HPV enfeksiyonu dışında serviks kanseri için bilinen risk faktörleri arasında erken yaşta cinsel ilişkiye başlama, çoklu seksüel partner, immünsupresyon (Human Immunodeficiency Virus (HIV) enfeksiyonu vb.), cinsel yolla bulaşan hastalık geçirme öyküsü, HPV ilişkili vulvar-vajinal displazi varlığı ve serviks kanseri tarama programlarına ulaşımın yetersiz olması sayılabilir ¹³.

2.1.2. Serviks Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Yapılan çalışmalarda, HPV enfeksiyonunun siklin A1, ölüm ilişkili kinaz-1 (DAPK1), RAS, O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) gibi hücre siklusunu, apoptozisi, DNA tamirini regüle eden genleri kodlayan promotor bölgelerin metilasyonuna yol açarak serviks kanseri oluşumuna ve progresyonuna neden olduğu gösterilmiştir ¹⁵. Benzer şekilde, hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonu ile ilişkili tümör supresör gen ailesine ait adenomatozis poliposis koli (APC) ve fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) promotor hipermetilasyonunun serviks kanseri gelişiminde rol oynadığı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ^{16,17}.

HPV enfeksiyonu serviks kanserinin ana etkeni olsa da hastalığın progresyonunda çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalar da rol oynamaktadır ¹⁰. Epigenetik değişiklikler, altta yatan DNA zinciri değişmeden genomik yapısal modifikasyonlar ile gen ekspresyonunun değiştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlanmayan ribonükleik asit (RNA)'ları kapsamaktadır. DNA metilasyonu CpG dinükleotid dizilerinde meydana gelerek genomik instabiliteye neden olur ¹⁸. Kovalent modifikasyonlar ise histon metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu ve übikitinasyonu ile gerçekleşir ve gen transkripsiyonunu düzenler ¹⁹. Son yıllarda genomun protein kodlamayan bölümlerinin de kanser gelişiminde majör rol oynadığına dair çalışmalar yayınlanmıştır ²⁰. MikroRNA (miRNA) ve uzun kodlanmayan RNA (lncRNA), protein kodlamayan RNA ailesinin majör komponentleridir ve miRNA'lar gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel regülatörü olarak görev yaparak kanser gelişiminde rol oynarlar ²¹.

Son yıllarda miRNA'lar aracılığı ile gerçekleştirilen posttranskripsiyonel gen regülasyonunun araştırılması giderek önem kazanmıştır. Büyük bir kısmı tümör baskılayıcı etki göstermektedir ancak birkaç miRNA'nın onkogenik etkisi gösterilmiştir ²². Yapılan çalışmalarda serviks kanserinde 29 miRNA'nın ekspresyonunda değişiklik (13'ü artmış ve 16'sı azalmış ekspresyon) tespit edilmiştir ve miRNA'ların yanlış ekspresyonu lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve progresyon ile ilişkili bulunmuştur ^{23,24}.

2.1.3. Evreleme ve Tanı

Serviks kanserlerinde tanı, servikal biyopsi ile elde edilen materyalin histopatolojik incelenmesi ile konulur. Serviks kanserinin en sık görülen alt tipi %80-90 sıklıkla skuamöz hücreli kanserlerdir, daha az sıklıkla ise adenokanserler görülür²⁵. Serviks yoğun lenfatik akım ağına sahip bir organ olup, serviks kanserlerinde artan tümör çapı ve tümör evresi ile korele olarak lenf nodu metastazı sıklığı da artar²⁶. Serviks kanserleri, 2018 yılında yenilenen *The International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) evreleme sistemine göre tümör çapı, tümörün invazyon derinliği, komşu organlara invazyon durumu ve pelvik/paraaortik lenf nodu tutulum durumu dikkate alınarak evrelenir (Tablo 2.1)²⁷. Evrelemede inspeksiyon, palpasyon, kolposkopi, histeroskopi, sistoskopi, proktoskopi ve intravenöz ürografinin yanında ulaşılabilir olan ülkelerde lokal tümör yayılımının, uzak metastaz varlığının ve lenf nodu tutulumunun değerlendirilmesi amacıyla bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRG), lenfanjiyografi ve pozitron emisyon tomografisi (PET) kullanılması önerilmektedir²⁷.

Tablo 2.1. FIGO 2018 Serviks Kanseri Evreleme Sistemi

Evre	Tanım
Evre 1	Servikse sınırlı hastalık (korpusa uzanım ihmal edilmelidir)
IA	Yalnızca mikroskop ile tanı konulabilen, maksimum invazyon derinliği ≤ 5 mm olan invaziv karsinom ^a
IA1	Stromal invazyon derinliği ≤ 3 mm
IA2	Stromal invazyon derinliği >3 mm and ≤ 5 mm
IB	Stromal invazyon derinliği >5 mm
IB1	Stromal invazyon derinliği >5 mm ve tümör çapı ≤ 2 cm
IB2	Tümör çapı >2 cm and ≤ 4 cm
IB3	Tümör çapı >4 cm
Evre 2	Uterusun dışına çıkan ancak alt 1/3 vajen veya pelvik yan duvara uzanmayan invaziv karsinom
IIA	Parametrium invazyonu olmadan üst 2/3 vajen uzanımı
IIA1	Tümör çapı ≤ 4 cm
IIA2	Tümör çapı >4 cm
IIB	Pelvik yan duvar tutulumu olmadan parametrium invazyonu
Evre 3	Vajen alt 1/3 tutulumu ve/veya pelvik yan duvar tutulumu ve/veya hidronefroz veya fonksiyonel olmayan böbrek varlığı ve/veya pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu tutulumu
IIIA	Pelvik yan duvar tutulumu olmadan vajen alt 1/3 tutulumu
IIIB	Pelvik yan duvar tutulumu ve/veya hidronefroz veya fonksiyonel olmayan böbrek varlığı (başka bir sebebe bağlı olduğu bilinmediği sürece)
IIIC	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu tutulumu (mikrometastazlar dahil) ^b , tümör çapı ve uzanımından bağımsız olarak (r ve p ile ifade edilir) ^c
IIIC1	Yalnız pelvik lenf nodu metastazı
IIIC2	Paraaortik lenf nodu metastazı
Evre 4	Gerçek pelvis dışına uzanan hastalık veya mesane/rektum mukozasının tutulumu.
IVA	Komşu organ tutulumu
IVB	Uzak organ metastazı

^a Tümör çapı ve uzanımı gibi klinik bulguları desteklemek için her evre için görüntüleme ve patoloji kullanılabilir. Patolojik bulgular görüntüleme ve klinik bulguların yerini alır.

^b İzole tümör hücresi varlığı evreyi değiştirmez ancak izole tümör hücre varlığı not edilmelidir.

^c Evre IIIC olarak belirtilen hastalarda lenf nodu tutulumunun belirlenmesinde kullanılan yöntem r (görüntüleme) ve p (patoloji) işaretleri kullanılarak belirtilmelidir.

Lenf nodu metastazı varlığı serviks kanseri prognozunu belirleyen en önemli prognostik faktördür ²⁸. Ayrıca literatürde tümör çapı >4 cm, pelvik yan duvar tutulumu, düşük hemoglobin düzeyi, adenokarsinom histolojik alt tipi, ileri FIGO evresi, parametrium invazyonu, lenfovasküler invazyon varlığı, derin stromal invazyon varlığı, skuamöz hücreli karsinom antijen (SCC-Ag) yüksekliği ve artmış vücut-kitle indeksinin (VKİ) serviks kanserli hastalarda genel sağkalım,

progresyonsuz sağkalım ve rekürrens için kötü prognostik faktörler olduğu gösterilmiştir ^{29,30}.

2.1.4. Tedavi

Tanıda serviks kanserli olguların yaklaşık %44'ünde lokalize hastalık, %36'sında bölgesel hastalık ve %16'sında ise metastaz mevcuttur ³¹. Erken evre serviks kanserlerinin tedavisinde radikal histerektomi ya da definitif RT ile benzer lokal kontrol ve sağkalım sonuçları elde edilmesine karşın özellikle genç yaştaki hastalarda RT'nin geç yan etkileri göz önüne alındığında öncelikle cerrahi seçeneği önerilir ³²⁻³⁴. Cerrahi sonrası rekürrens açısından orta ya da yüksek risk faktörleri olan olgularda ise adjuvan RT ya da KRT uygulanması gündeme gelir ³³. Adjuvan RT >4 cm tümör çapı, derin stromal invazyon, lenfovasküler invazyon veya adenokarsinom histolojik alt tip gibi orta risk faktörlerinden ikisinin varlığında uygulanır ³⁵⁻³⁷. Adjuvan KRT ise parametrium invazyonu, cerrahi sınır pozitifliği ya da lenf nodu metastazı gibi yüksek risk faktörlerinden en az birinin varlığında önerilir ^{38,39}. Bu tedavilere ek olarak tartışmalı olmakla birlikte, pozitif veya yakın cerrahi sınır, geniş veya derin invaziv tümör, parametrium veya vajen tutulumu veya yaygın lenfovasküler invazyon varlığında eksternal RT'ye vajinal kaf BRT eklenebilir ^{40,41}.

Evre IIB ve üzeri serviks kanserleri ise lokal ileri evre serviks kanserleri olarak adlandırılır ve tedavide eş zamanlı KRT'nin yalnızca RT'ye kıyasla genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım açısından üstün olduğunu gösteren faz 3 randomize çalışmaları takiben KRT standart tedavi haline gelmiştir ^{38,42-44}. KRT'nin yalnızca RT'ye üstün olduğunu gösteren çalışmalarda eş zamanlı kemoterapi (KT) rejimi olarak sıklıkla sisplatin içeren rejimler kullanılmıştır. *Gynecologic Oncology Group* (GOG) tarafından lokal ileri evre serviks kanserli hastalarda yapılan GOG 85 çalışmasında RT'ye eklenen sisplatin/5-florourasil, hidroksiüre ile karşılaştırıldığında genel sağkalım açısından anlamlı olarak üstün bulunmuştur ⁴³. Aynı grup tarafından yayınlanan GOG 120 çalışmasında ise RT ile eş zamanlı uygulanan sisplatin, sisplatin + 5-florourasil + hidroksiüre ya da yalnızca hidroksiüre karşılaştırılmıştır ⁴⁵. Çalışma sonuçlarına göre genel sağkalım oranı yalnız hidroksiüre uygulanan kolda sisplatin-bazlı KT uygulanan kollara göre daha düşük olmasına karşın, yalnız sisplatin uygulanan kol ile sisplatin + 5-florourasil + hidroksiüre uygulanan kolda benzer

bulunmuştur. Bu çalışmalar doğrultusunda lokal ileri evre serviks kanserlerinin definitif tedavisinde, sisplatin alabilecek olgularda standart olarak eksternal RT'ye sisplatin KT'sinin eklenmesi önerilir.

Lokal ileri evre serviks kanserlerinde definitif tedavinin vazgeçilmez bir parçası ise eksternal RT'yi takiben BRT uygulanmasıdır ^{46,47}. Serviks kanserlerinde sıklıkla intrakaviter BRT uygulanır. İntrakaviter BRT ile hem genel sağkalım hem de kanser spesifik sağkalım oranları artar. İntakt serviksi olan hastalarda eksternal RT ve BRT toplam kümülatif dozunun EQD2 (2 Gy doz eşdeğeri) ≥ 85 Gy olması önerilir ⁴⁸. Eksternal RT sıklıkla 1.8 Gy fraksiyon dozunda toplam doz 45-50 Gy olacak şekilde uygulanır. BRT ise 5-7 Gy aralığında değişen fraksiyon dozlarında, toplam 4-6 fraksiyonda uygulanır. BRT ile tümörün periferi EQD2 80-85 Gy alırken santrali >120 Gy alır ⁴⁷. Günlük pratikte eş zamanlı sisplatin KT eksternal RT ile eş zamanlı en az 5 kür olacak şekilde uygulanırken, intrakaviter BRT uygulanan günlerde fraksiyon dozunun yüksek olması nedeniyle toksisiteyi arttırmamak amacıyla uygulanmaz.

Radyoterapinin Hücre Üzerindeki Etkileri

Hücre Hasarı

İyonizan radyasyon parçacık ve elektromanyetik dalga tipi radyasyon olmak üzere temel olarak ikiye ayrılır. X ve gama ışınları gibi fotonlar elektromanyetik dalga tipi radyasyona örnek iken, alfa ve beta parçacıkları, elektron, nötron, proton ve karbon iyonları ise parçacık tipi radyasyona örnektir. İyonizan radyasyonun hücre içerisindeki asıl hedefi DNA' dır. Yüklü parçacıkların doğrudan DNA hasarı ile DNA'da çift ya da tek zincir kırıkları oluşur. Düşük lineer enerji transferi (LET) değerine sahip X ve gama ışını gibi fotonlar ise hücre içindeki su molekülü ile etkileşerek ortamda reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşumuna neden olur. Oluşan bu ROS, eşlenmemiş elektronlarından dolayı kolaylıkla DNA ile etkileşime girerek dolaylı yoldan DNA hasarına yol açar ⁴⁹. Hem doğrudan hem de dolaylı yoldan IR'un oluşturduğu DNA hasarı tek ve çift zincir kırıklarına neden olabilir. Tek zincir kırıkları genellikle hücre tamir mekanizmaları ile tamir edilebilirken, çift zincir kırıkları sıklıkla hücre ölümü veya karsinogeneze yol açabilen mutasyonlar ile sonuçlanır.

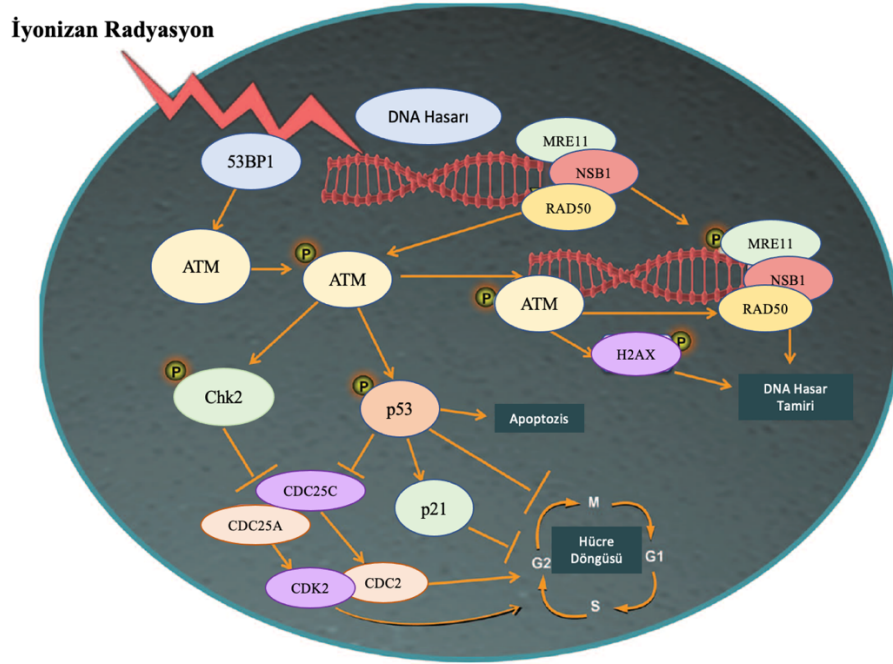
DNA zincirlerinde oluşan bu kırıkların saptanması için çeşitli ölçüm metodları kullanılmaktadır. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) DNA çift zincir kırıklarını, tek hücre elektroforezi (comet assay) ise hem yüksek sensitivite ve spesifite ile tek zincir kırıklarını hem de daha az oranla çift zincir kırıklarını saptamak amacıyla kullanılır. DNA hasarı ile indüklenen nükleer odak testi ise DNA zincir kırığı bölgesinde lokalize olan DNA hasar proteinlerinin görüntülenmesi yöntemi ile DNA hasarının saptanmasında etkili bir ölçüm yöntemidir. H2AX proteini bir histon proteini olup DNA çift zincir kırığına cevap olarak fosforile olarak γ H2AX formuna dönüşür ve hücre içinde hızla γ H2AX artışına yol açar. Aynı şekilde p53-bağlayıcı protein 1 (53BP1) proteini de DNA çift zincir kırığına yanıt olarak hızla fosforile olarak hücre içerisinde p53BP1 miktarını artırır. Bunlar dışında hücre hasarına yanıtı değerlendirmek amacıyla ataksi-telenjiyektazi mutasyon (ATM) proteini, replikasyon protein A (RPA), RAD51 ve meme kanseri tip 1 yatkınlık proteini (BRCA1) gibi proteinler de kullanılabilir ⁴⁹.

Hücre Hasar Tamiri

Hücresinin hangi hücre siklusu fazında olduğuna ve hasarın tipine bağlı olarak hücre içerisindeki baskın olan DNA hasar tamir yolağı değişmektedir. Baz eksizyon tamir yolağı ile DNA'da meydana gelen baz hasarları başarılı bir şekilde tamir edilirken, tamir aşamasındaki bozukluklar mutasyon oranını artırır ancak IR duyarlılığında artmaya yol açmaz. Nükleotid eksizyon tamir (NET) yolakları ise sisplatin gibi ajanların DNA ile birleşerek oluşturduğu normal yapısı bozulmuş DNA adacıklarının ortadan kaldırılmasını sağlar. NET yolağında hasar olması durumunda ultraviyole ışığa duyarlılık olmasına karşın IR'a karşı duyarlılık gözlenmez. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda NET yolağında yer alan excision repair cross complement-1 (ERCC1), x-ray repair cross complementing-1 (XRCC-1) proteinlerinin baskılanmasının baş boyun kanserli sisplatin ile eş zamanlı RT uygulanan hastalarda kemoduyarlılaştırıcı ve radyoduyarlılaştırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir ^{49,50}. Küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre serilerinde yapılan bir başka çalışmada da ERCC1 inhibisyonunun radyoduyarlılığa sebep olduğu gösterilmiştir ⁵¹.

DNA çift zincir kırık onarımı iki ayrı yolak üzerinden gerçekleşmektedir: Homologous recombination repair (HRR) ve nonhomologous end-joining (NHEJ). İki

yolaktan hangisinin aktif olacağı hücre siklus fazı ve tekrarlayan DNA fazlalığına bağlı olarak belirlenir. HRR S/G2 fazında ve hasarsız kardeş kromatid varlığında aktif iken, NHEJ G1 fazında ve kardeş kromatid yokluğunda aktif rol oynar ⁴⁹. HRR ile NHEJ arasındaki yarış 53BP1 düzenler. 53BP1'in fosforilasyonu ile hücre içindeki DNA hasar sensörü olan ATM uyarılır ve hasar tamiri, hücre siklus duraklaması ve hücre ölümüne neden olan birçok sinyal yolağı aktive olur (Şekil 2.1) ⁵². ATM diğer hücre içi hasar sensörü olarak IR'ı algılayan MRN kompleks yardımı ile çeşitli histonların (H2AX) fosforile olarak hasar tamirinin başlamasını sağlar. DNA çift zincir kırığı olması durumunda HRR yolağında RAD51, RAD52 ve BRCA1/2 proteinleri, NHEJ yolağında ise 53BP1, Ku70/Ku80 ve ligaz kompleksi (XRCC4/XLF-LIGIV/PNK) rol oynar ⁴⁹. Yaygın DNA hasarı varlığında ise ATM, p53 regülasyonu yaparak hücrenin siklusa devam etmesini engeller ve hücreyi apoptozise götürür.



Şekil 2.1. İyonizan radyasyon ile DNA hasar oluşumu ve DNA hasar tamir mekanizmaları ⁵² (Toran Sanli ve ark. (2014) AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism, *Cancer Biology & Therapy*, 15:2, 156-169' dan uyarlanmıştır)

Hücre Sağkalımını Etkileyen Faktörler

Prolifere olan hücrelerde ölüm, proliferasyon kapasitesinin kaybı olarak tanımlanır. Bu durum, bir hücrenin halen DNA veya protein sentezi yapabildiğini ancak çoğalamadığını (koloni oluşturamadığını) göstermektedir. IR'a bağlı olarak hücre ölümü *bystander* etkisi, mitotik ölüm, apoptozis, otofajik hücre ölümü ve *senesans* gibi farklı hücre ölüm mekanizmaları ile gelişebilir. Ancak IR'a bağlı en baskın hücre ölüm mekanizmaları mitotik ölüm ve apoptozistir ⁴⁹. İki ölüm tipinde de sonuç aynı olup hücre proliferasyon kabiliyetini kaybeder. Radyoduyarlı hücrelerin daha çok apoptozis ile, radyodirençli hücrelerin ise mitotik ölüm ile öldüğü gösterilmiştir ⁴⁹.

Hücre döngüsünün farklı fazlarında hücrenin radyasyona duyarlılığı değişmekte olup geç S fazında hücre IR'a en dirençli iken G2 ve M fazlarında en duyarlıdır ⁵³. IR'a maruz kalan hücreler G2 fazında duraklamaya uğrarlar ve bu sırada hasarlı kromozomlar tespit edilerek tamir edilir. G2 fazındaki kontrol fonksiyonunu kaybeden mutant hücreler IR'a veya DNA hasarı yapan diğer ajanlara daha duyarlı hale gelir ⁴⁹.

Bunun dışında hücre sağkalımını LET değeri, sublethal hasar onarımı, potansiyel lethal hasar onarımı, doz hızı, dokunun oksijenizasyonu ve sıcaklığı da etkiler. LET, IR'un birim mesafe başına bıraktığı ortalama enerji miktarıdır (keV/ μ m). LET değeri arttıkça IR'un oluşturduğu hasar da artar ⁴⁹. Sublethal hasarlar genellikle indirek radyasyonun etkisi ile ortaya çıkar ve bu hasar oluştuktan sonra tamir için gerekli süreden önce ek bir radyasyon dozu uygulanırsa hücrede radyoduyarlılığa yol açar. Potansiyel lethal hasar ise IR'a maruz bırakılan hücrelerde çevresel koşullara bağlı olarak onarılabilen hasarlardır ve hücreler suboptimal koşullarda tutuluyorsa hasar tamir edilemez ve hücreler IR'a duyarlı hale gelir ⁵⁴. IR dozunun biyolojik etkisini belirleyen en önemli faktörlerden biri de doz hızıdır ve doz hızı arttıkça biyolojik etki artar. Ancak 0.37 Gy/saat'ten daha düşük doz hızında ters etki söz konusudur ⁵⁵. Bu doz hızında hücreler G2 fazına ilerler ve bu fazda duraklarlar, ancak daha yüksek doz hızında hücreler ilerleyemez ve bulundukları hücre siklus fazında kalırlar.

Hücre sağkalımını etkileyen diğer bir faktör ise dokunun oksijenizasyon düzeyidir. Doku oksijenizasyonunun artması, IR sırasında oluşan ROS'un yapısına

girerek hasarın kalıcılığını artırır ⁵⁶. Oksijenize olan hücreler hipoksik hücrelere kıyasla iyonizan radyasyona daha duyarlıdır. Oksijenizasyonun iyonizan radyasyon etkisini artırma fonksiyonunu ifade etmek için oksijen iyileştirme oranı (Oxygen enhancement ratio-OER) tanımlanmıştır. OER, aynı biyolojik etkinin oluşturulması için hipoksik ortamda gerekli radyasyon dozunun oksik ortamda gerekli radyasyon dozuna oranı olarak ifade edilir. OER, IR tipine göre değişir. Düşük LET değerine sahip ve biyolojik etkisini daha çok indirek hasar ile gösteren radyasyon türlerinde oksijen etkisi belirgindir. OER, IR dozu ile de ilişkili olup yüksek dozlarda düşük dozlara göre oksijen etkisi daha az görülür ⁵⁶. Bunların dışında OER hücre siklus fazı ile de ilişkilidir. G1 fazı S fazından daha radyosensitif olması nedeniyle düşük OER değerine sahiptir.

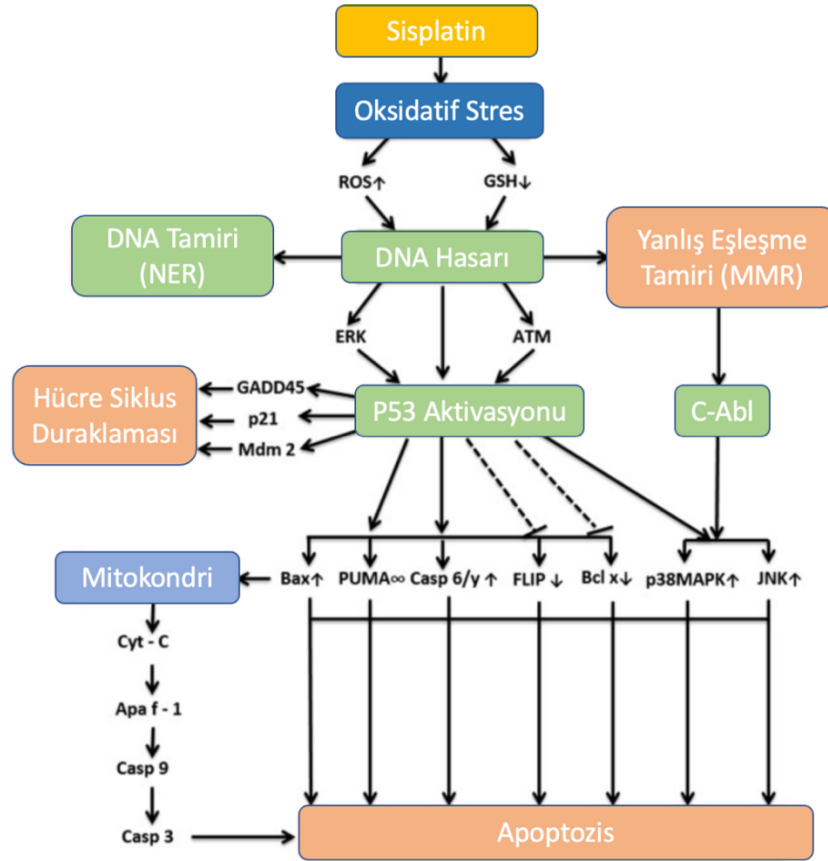
Sisplatinin Hücre Üzerindeki Etkileri

Sisplatin, 1960'lı yıllarda elektrik akımının hücre çoğalması üzerine etkisinin araştırılması sırasında hücrelerin elektrik akımından değil elektrotlardan salınan bir platin bileşiği nedeniyle öldüklerinin farkedilmesi ile keşfedilmiştir ⁵⁷. Daha sonra birçok kanser türünde kullanılmaya başlanmış ve halen günümüzde pek çok kanserde ilk tedavi seçenekleri arasında yer alır ^{45,58,59}. Sisplatinin sitotoksik etkilerinden sorumlu olan 5 ana özelliği mevcuttur: Radyosensitizan etki, hipoksik hücrenin duyarlılaştırılması, hücre siklus düzenlenmesi, anjiogenez inhibisyonu ve normal yapısı bozulmuş DNA adacıklarının oluşturulması ⁶⁰. Sisplatinin potansiyel lethal hasar ve sublethal hasarın onarılmasında inhibisyona ve hücrelerin iyonizan radyasyona en duyarlı olduğu hücre siklus fazı olan G2 fazında duraklamaya yol açarak radyosensitizan etki gösterdiği düşünülmektedir ve bu etki en fazla radyoterapiden hemen önce sisplatin verildiğinde gözlenir ^{60,61}. Bu etkileri dışında sisplatin RT öncesi verildiğinde hücre çekirdeği içerisinde DNA'ya bağlanarak normal yapısı bozulmuş DNA adacıklarının oluşumuna yol açar ve radyoduyarlılığı artırır. Bu etki sisplatin maruziyetinden 1 saat sonra azalmaya başlar ve 24 saat içerisinde radyoduyarlılaştırıcı etkisi tamamen kaybolur ^{60,62}.

Sisplatin hücre içerisine çeşitli membran taşıyıcıları (CTR1, CTR2, ATP7A/B, MTP2, OCT1/2 vb.) aracılığıyla alınmaktadır ⁶³. Sisplatin hücreye girdikten sonra aktifleşir ve kanser hücrelerinde DNA hasarına yol açacak olan pürin N7 reaktif

bölgesine bağlanmaktadır. Böylece hücre bölünmesini engeller ve apoptotik hücre ölümüne yol açar. Normal koşullarda hücre içerisinde oluşan ROS glutatyon-GSH, süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri yardımıyla elimine edilir. Ancak oksidatif stres durumunda oluşan çok sayıda ROS elimine edilemez ve hücre içerisindeki DNA, protein ve lipitlere zarar verir. Sisplatin de direk DNA hasarı oluşturmalarının yanı sıra ROS oluşumunu da indükleyerek DNA hasarı oluşturur ve tamir edilemeyen hasara sahip hücreler apoptozise gider (Şekil 2.2) ⁶⁴.

Tedavi sürecinde gelişen sisplatin direnci tedavinin etkinliğini azaltmaktadır. Sisplatinin hücre içerisine alımını veya hücreden atılmasını sağlayan membran taşıyıcılarını kodlayan genlerde polimorfizm olması durumunda sisplatine karşı direnç gelişir ⁶³. Bununla birlikte sisplatin direncinin ana mekanizması olarak sisplatin-DNA kalıntılarının yok edilmesini sağlayan ERCC1, XRCC1, kseroderma pigmentosum (XP) grup A, grup D ve grup G enzimlerinin fazla eksprese olması suçlanmaktadır ^{49,63}. Sisplatin direncini kırıp daha iyi tedavi yanıtı alınmasını sağlamak için valproik asit, hepatosit büyüme faktörü gibi birçok ilaç denenmiştir ancak günümüzde halen etkin bir sisplatin duyarlaştırıcı ajan mevcut değildir ⁶⁵⁻⁶⁸.



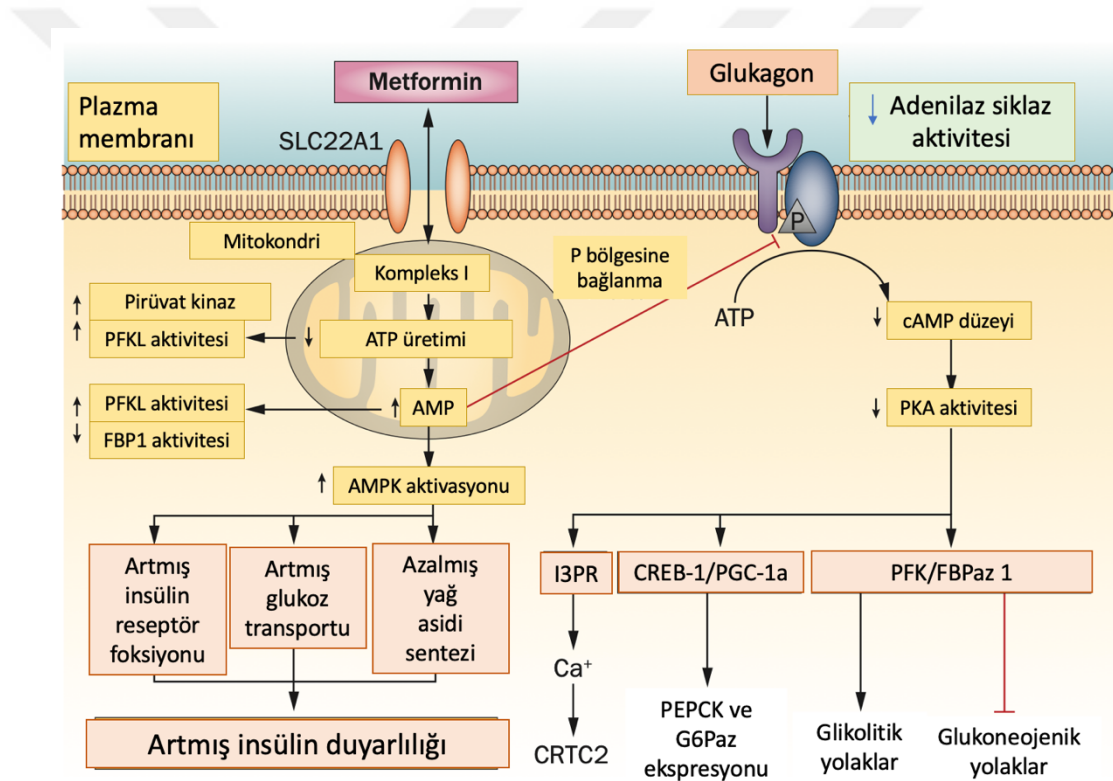
Şekil 2.2. Sisplatin ile indüklenen DNA hasar oluşumu ⁶⁴ (Dasari ve ark. (2014) Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, European Journal of Pharmacology, 264-378’ den uyarlanmıştır)

2.2. Metformin

Metforminin Antidiyabetik Etkisi

Biguanid türevi bir ilaç olan metformin, 1950’li yıllardan beri tip 2 DM tedavisinde kullanılan, iyi tolere edilen oral antidiyabetik bir ilaçtır ¹. Metformin çeşitli mekanizmalarla kandaki glukoz düzeyini düşürür. Öncelikle metformin karaciğerde mitokondriyal kompleks-1’i inhibe ederek sitoplazmik adenosin monofosfat (AMP)/adenozin trifosfat (ATP) ve adenosin difosfat (ADP)/ATP oranlarını arttırmakta ve bu değişiklikler AMPK fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olmaktadır ¹. AMPK hücre içerisinde hücresel enerji homeostazisini sağlar ve düşük glukoz, hipoksi ve iskemi gibi hücresel stres durumlarında aktive olur ⁶⁹. AMPK’nın aktivasyonu ise hepatik lipid sentezini, glukoneogenezi baskılamakta ve insülin duyarlılığını arttırmaktadır. Bunun dışında metformin iskelet kasında glikojenezi,

insülin ile indüklenen hücre içerisine glukoz alımını ve bağırsaklarda anaerobik glukoz metabolizmasını artırır. Böylece kandaki glukoz düzeyini azaltmaktadır ¹. Glukoz düzeyini düşürme etkisinin dışında, metforminin çeşitli dokularda antioksidan özelliği olduğu gösterilmiş olup lipid peroksidasyonunu azaltır ⁷⁰. Tip 2 DM tanılı hastalarda iskemik kalp hastalıkları görülme riskinin arttığı bilinmektedir. Metformin, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazı ve solunum zincir kompleksini azaltarak aortik endotelyal hücrelerde hücreler arası reaktif oksijen radikallerinin üretimini azaltır. Bu hastalarda iskemi riskini azaltmasının yanı sıra iskemi gelişse bile iskemi süresince kardiyomiyosit ölümünü azalttığı gösterilmiştir ⁷¹. Metforminin etki mekanizmaları Şekil 2.3'te özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Metforminin etki mekanizmaları ⁷² (Pernicova ve ark. (2014) Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer, Nature Reviews, 143-166' dan uyarlanmıştır).

Metforminin Antiproliferatif Etkisi

Tip 2 DM tanılı hastalarda endometrium kanseri, kolorektal kanser ve meme kanseri gibi birçok kanser riskinin arttığı bilinmektedir ⁷³. Buna karşılık metformin ile

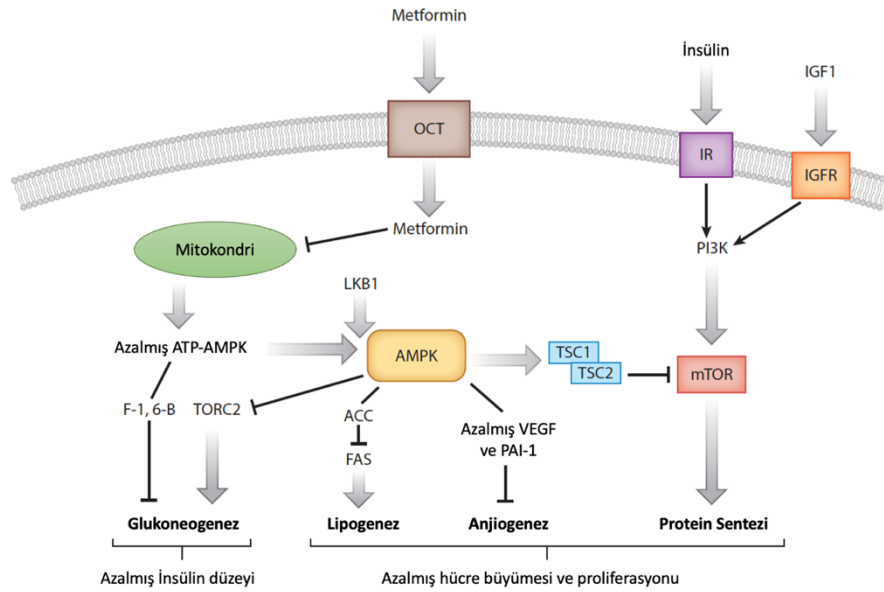
tedavi edilen tip 2 DM tanılı hastalarda daha az kanser oluşumu gözlemlendiği ve kanser gelişmesi durumunda mortalitenin daha az olduğu raporlanmıştır ^{2,74}. Takiben metforminin kanser tedavisinde faydalı bir ajan olma potansiyeli dikkate alınarak RT, KT ve immünoterapi ile birlikte kullanımı önemli bir araştırma konusu olmuştur ^{75,76}.

Aerobik ortamda normal ya da sağlıklı hücreler, gerekli enerjiyi temel olarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yolu ile elde ederken, kanser hücreleri oksijen varlığından bağımsız olarak aerobik glikoliz yaparak yüksek düzeyde laktat üretirler ve bu fenomen Warburg etkisi olarak tanımlanır ⁷⁷. Aerobik glikoliz sonucu oksidatif fosforilasyona oranla daha az ATP üretilmesine rağmen, kanser hücrelerinin hızla gerçekleştirdiği hücre büyümesi ve proliferasyonu için gerekli olan nükleotidler, amino asitler ve lipidler gibi besinlerin alımı ve kullanımını kolaylaştırmak amacıyla hücrenin aerobik glikolize geçtiği düşünülmektedir. Bu sebeple hücre proliferasyonunda yer alan sinyal yolları aktive olarak hücre büyümesi ve sağkalımı için gerekli olan besinlerin alımı ve metabolizması artar. Myc ve nuclear factor kappa B (NF- κ B) gibi onkogenlerin yanı sıra, insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü-2 (Her-2) gibi serin treonin kinaz ailesinden büyüme faktörleri, fosfoinozitid 3 kinaz (PI3K) ve rapamisin memeli hedefi (mTOR) hücre proliferasyon yollarını aktive ederek glikolizde yer alan genlerin transkripsiyonunu artırır ⁷⁸. Buna karşılık AMPK ise, hücre proliferasyonunu inhibe ederek tümör baskılayıcı görevi görür. AMPK, tüberoskleroz kompleks-2 (TSC2)'yi aktive ederek TSC1 ile kompleks oluşturur ve mTOR'un aktivitesini düzenleyerek hücre için önemli olan protein translasyonunu düzenler. Literatürde AMPK aktivite kaybının *in vivo* hayvan modellerinde lenfoma oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir ⁷⁹. Hücresel strese yanıt olarak oluşan karaciğer kinaz B1 (LKB1)/AMPK aktivasyonu glikoliz yoluyla metabolik akışı azaltmakta ve hücreyi düşük enerji seviyesine adapte etmektedir ⁸⁰. AMPK, kanser hücrelerinde anahtar bir enzim olmasına karşın AMPK üzerinde mutasyonlar nadir olarak gözlenir. Buna karşılık, AMPK'nın etkilediği veya AMPK'yı etkileyen proteinlerde mutasyon görülebilmektedir. Örneğin bir tümör baskılayıcı gen olan ve AMPK aktivasyonunda anahtar rol oynayan LKB1 mutasyonunda Peutz-Jeghers sendromu görülmekte ve birçok benign ya da malign tümöre (hamartamatöz polipler, gastrointestinal kanserler, meme kanseri, over kanseri vb.) yol açmaktadır.

Warburg etkisinin kanser hücresi için diğer bir avantajı ise, aerobik glikoliz yapan hücrelerde mitokondriden salınan ROS miktarının azalması ve antioksidan etkisi olan NADPH miktarının artarak hücreyi ROS'un zararlı etkilerinden korumasıdır ⁸¹. Yapılan çalışmalarda AMPK'yı sessizleştirmenin Warburg etkisini arttırdığı gösterilmiştir ⁷⁹. AMPK aktivasyonu sonucunda, metformin Warburg etkisini oksidatif fosforilasyon lehine çevirebilmekte ve tümör baskılayıcı görevi görebilmektedir. Bunun yanı sıra, yakın dönemde yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin aslında ATP üretimi, redoks dengesi ve trikarboksilik asit (TCA) siklusu ara ürünlerinin (malat, sitrat) oluşumu için mitokondriye ihtiyaçlarının olduğu gösterilmiştir ⁸².

Metformin hücre metabolizmasını çok yönlü olarak etkilemektedir. AMPK aktivasyonu üzerinden hücre metabolizmasını önemli ölçüde regüle ettiği ve sitostatik etki ile antiproliferatif etkinin yanında kemopreventif etkisinin de olabileceği öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda metforminin hem endojen ROS üretimini azaltarak hem de DNA tamirinin majör komponenti olan ATM'yi aktive ederek DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir ^{83,84}.

Metforminin kanser metabolizması üzerindeki etkisi insülin bağımlı olan ve olmayan yolak olmak üzere ikiye ayrılır. İnsülin bağımlı yolakta, insülin ve IGF-1 hücre sağkalımını ve mitozu arttırıcı büyüme faktörü görevi görürken, metformin tedavisi ile insülin ve IGF-1 miktarı azalmaktadır. Böylece hücre büyümesi için gelen uyarı miktarı da azalmakta ve protein sentezi baskılanmaktadır. İnsülin bağımlı olmayan yolakta ise, metformin hücre siklus duraklamasına yol açmakta ve protein sentezi, hücre büyümesi, anjiogenez ve lipogenezi inhibe etmektedir (Şekil 2.4) ⁸⁵. Bu yolakların büyük bir kısmı AMPK tarafından düzenlenir. AMPK aktivasyonu ile hücresel enerji metabolizması yeniden programlanır ve enerji tüketimi azaltılmaktadır.



Şekil 2.4. Metforminin kanser hücresi üzerindeki potansiyel mekanizmaları ⁷⁶ (Morales ve ark. (2015) Metformin in Cancer Treatment and Prevention, Annual Reviews, 66:4.1-4.13'ten uyarlanmıştır).

Metforminin antiproliferatif etkilerinden biri de p53 regülasyonunu artırıp, siklin D1'i azaltarak G0 fazından G1 fazına geçişi engellemesi ve p53 bağımlı otofajiye yol açmasından kaynaklanır ^{86,87}. Bunun dışında metforminin antianjiyojenik etkilerinin yanında, proanjiyojenik etkilerinin de olabileceği düşünülmektedir. Bu etkinin de yine AMPK aracılığıyla gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur ⁸⁸.

Birçok malignitede kanser hücrelerinin alt tipi olarak kanser kök hücreleri gösterilir ve bu hücre grubu kendi kendini yenileme, yavaş proliferasyon hızı, yüksek DNA tamir kapasitesi ve antiapoptotik proteinlerin yüksek düzeyde ekspresyonu gibi özelliklere sahiptir. Ayrıca bu hücreler KT/RT'ye karşı dirençli kabul edilirler ve tedavi sonrası relaplarda önemli rol oynarlar ⁸⁹. Bu nedenle, tedavide kanser kök hücrelerinin hedef alınması rekürrenslerin önlenmesinde potansiyel bir mekanizma olarak görülmektedir. Son yıllarda metforminin meme, prostat ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde kanser kök hücrelerini hedef aldığı gösterilmiştir ^{85,90}. Ancak kanser kök hücrelerinin yüksek plastisite potansiyeli düşünüldüğünde metformin tek başına kanser kök hücrelerini yok etmede yeterli olamayabilir. Bu nedenle KT ve RT ile kombine edilerek daha iyi bir tümör yanıtı sağlanabilir.

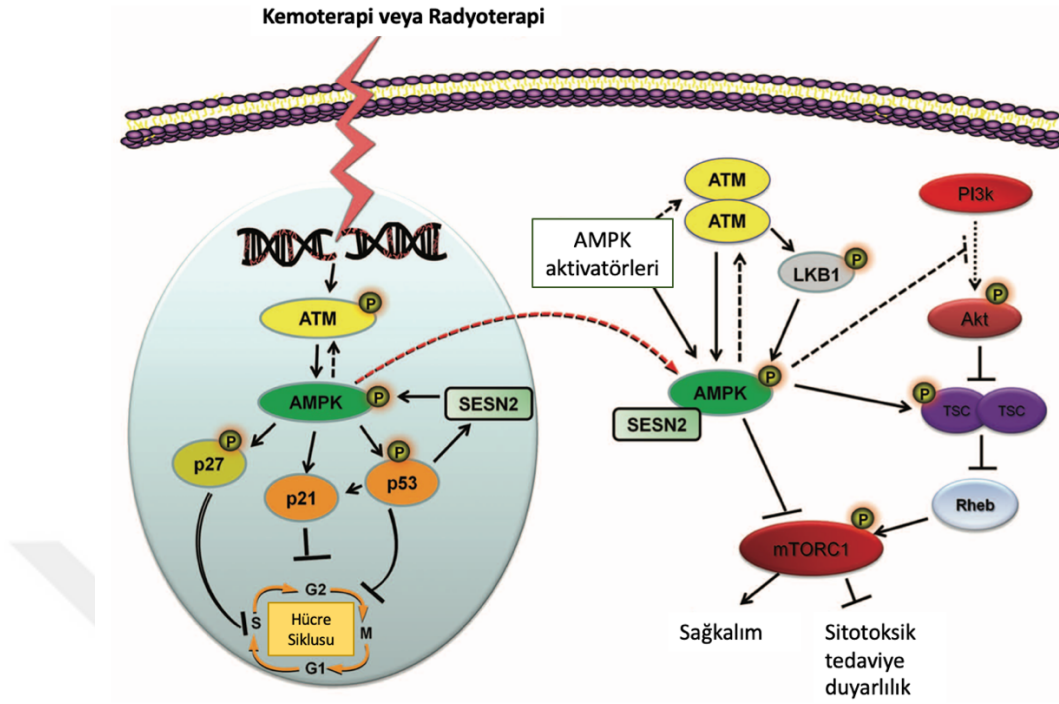
Metforminin meme, prostat, pankreas ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde KT ajanlarıyla kombine edildiğinde tümör büyümesini inhibe ettiği ve remisyon süresini uzattığı gösterilmiş olup KT etkisini aditif olarak değil sinerjistik olarak arttırdığı raporlanmıştır ⁹¹. Buna karşın, metforminin sisplatin toksisitesini ve antikanser etkisini azalttığına dair de çalışmalar mevcuttur ^{4,92}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise metforminin RT ile kombine edildiğinde sinerjistik etki yarattığı öne sürülmüştür. Bu etkinin kanser hücrelerinin direk radyosensitizasyonu, kanser kök hücrelerinin ölümü, proliferasyon hızında azalma ve tümör hipoksisinde azalma yoluyla gerçekleştiği öne sürülmektedir ³. Ancak serviks kanserlerinde standart sisplatin KT ile eş zamanlı RT'ye eklenen metformin radyoduyarlılaştırıcı ve kemoduyarlılaştırıcı etkileri halen aydınlatılmamıştır.

İyonizan Radyasyon Cevabında AMPK

AMPK, hücrel bir enerji durum sensörü olup, bir serin treonin kinazdır. Yedi alt tipi olup (2 alfa, 2 beta, 3 gama) alfa alt tipi katalitik aktiviteye sahiptir ⁵². Metabolik stres durumunda LKB1, AMPK'nın fosforile olmasını sağlayarak Thr172 üzerinde alfa alt tipini aktive eder. Bunun dışında hipotalamus, nöronlar, T lenfositlerde ve ayrıca LKB1 eksik hücrelerde AMPK aktivasyonunun kalsiyum (Ca^{+2}) sinyalleri ve kalsiyum bağımlı protein kinaz ($CaMKK\beta$) aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir ⁵². Metabolik stres durumunda hücre içindeki enerjinin korunabilmesi için AMPK, mTOR yolağını inhibe ederek hücre büyümesi ve protein sentezini inhibe eder. Akciğer, prostat ve meme kanserlerine ilişkin çalışmalarda IR ile oluşan DNA hasarının tamirinde AMPK'nın hızlıca Thr172 üzerinde fosforile olarak hasar tamirinde rol oynadığı, p53 ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21cip1 ve p27kip1'i aktive ederek hücre siklusunda duraklamaya yol açtığı ve hızla sitoplazmaya geçen AMPK'nın Akt-mTOR yolağını inhibe ederek sağkalımı inhibe ettiği, bu nedenle radyosensitizasyon için hedef olabileceği gösterilmiştir (Şekil 2.5) ⁹³⁻⁹⁵. Bununla birlikte IR ile indüklenen ATM'nin AMPK aktivasyonu yolağı henüz net olarak anlaşılamamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda ATM'nin direk olarak AMPK'yı fosforillemediği ve AMPK aktivasyonunu LKB1 fosforilasyonu ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir ⁹³. Aksine, LKB1'in AMPK aktivasyonu için gerekli olmadığı ve LKB1

eksik hücrelerde de IR'un AMPK aktivasyonuna yol açtığını gösteren çalışmalar da mevcuttur ⁵².

İyonizan radyasyon akut AMPK fosforilasyonu dışında kronik dönemde de AMPK aktivasyonu ve ekspresyonunu düzenler. Literatürde, tek doz 8 Gy RT uygulanan akciğer kanseri hücrelerinde AMPK gen mesajcı RNA (mRNA) düzeylerinde artış saptanmıştır ⁹⁶. Bu etkinin ATM-p53 yolağının ekspresyonundaki artış ve Akt-mTOR yolağının kronik inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ⁹⁷. Genotoksik strese yanıt olarak gelişen p53 ve AMPK arasındaki pozitif geri bildirim sayesinde bu etki gerçekleşmektedir. p53, AMPK düzeyini iki yolla düzenlemektedir. Bu yollardan ilki, AMPK'ya bağlanan, p53'ün hedef geni gibi hareket edip oksidatif stres altında veya hipokside hücrede biriken setrinlerin (SESN1 ve SESN2) ekspresyonunda artışa neden olması, ikincisi ise AMPK β 1/2 genlerinin p53 bağımlı transkripsiyonel artışı olarak gösterilmektedir ⁹⁸. Bu bilgiler doğrultusunda AMPK'yı hedefleyerek akciğer, prostat ve serviks kanseri hücre serilerinde radyosensitizasyonun arttırıldığı gösterilmiştir ^{93,99-101}. Aynı şekilde sisplatinin de ATM-AMPK yolağını birçok kanser türünde aktive ettiği ve bu aktivasyonun *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kanser hücrelerini sisplatine duyarlılaştırdığı gösterilmiştir ¹⁰²⁻¹⁰⁴.



Şekil 2.5. AMPK'nın kanser hücrelerinde KT ve RT'ye yanıtındaki görevleri ⁵² (Sanli ve ark. (2014) AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism, Cancer Biology & Therapy, 15:2,156-169'dan uyarlanmıştır).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında iki farklı veri tabanı üzerinden meta-analiz gerçekleştirilerek AMPK aktivatörleri olan PRKAA1, CAMKK1 ve PRKACA gen ifadeleri incelendi. PRKAA1 ve 2 gen ifadelerinin serviks kanseri dokularında normal serviks dokusuna kıyasla daha yüksek olduğu ve bu genlerin insan serviks kanseri hücreleri içerisinde en fazla HeLa'da ifade edildiği görüldü. Bu nedenle çalışmamızda, insan serviks kanseri hücre dizisinde metforminin RT'ye eklenen sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkinliğini arttırıp arttırmadığının belirlenmesi amacıyla öncelikle HeLa hücre dizisi uygun besiyerinde çoğaltıldı. Çoğaltılan hücrelerin içerisinde Mikoplazma kontaminasyonu olup olmadığı EZ-PCR Mikoplazma kiti kullanılarak test edildi. Mikoplazma kontaminasyonu olmadığı belirlenen hücreler 96 kuyulu plaklara ekilerek sonraki deneylerde kullanılacak hücre sayısı MTT testi ile belirlendi.

Metforminin AMPK dışında birçok etki mekanizması olması nedeniyle, çalışmamızda gözlemlediğimiz etkilerin AMPK aracılığıyla gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla çalışmamızda metformin ve sisplatinin yanısıra direk AMPK aktivatörü (A769662) ve AMPK inhibitörü (dorsomorfin) de kullanıldı. Takiben, çalışmanın devamında kullanılması planlanan ilaçların (metformin, sisplatin, A769662 ve dorsomorfin) toksik olmayan dozları 96 kuyulu plakta MTT testi yapılarak belirlendi.

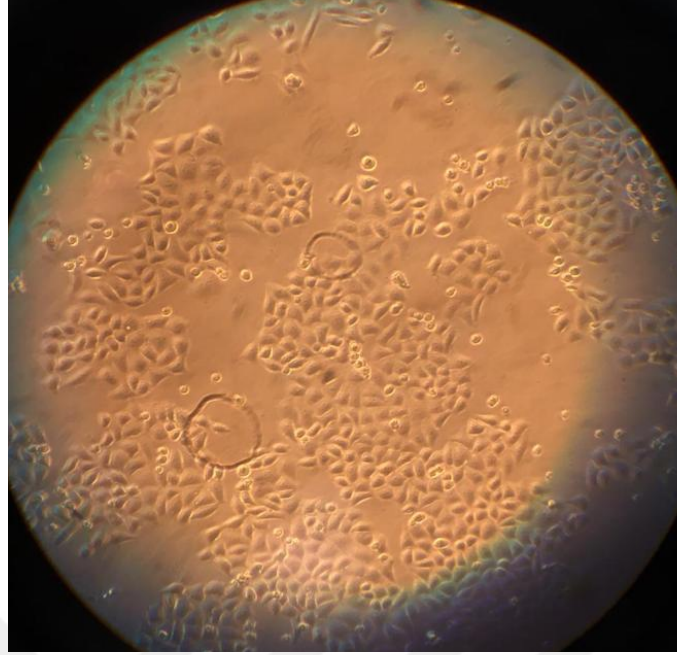
Literatürde kullanılacak ilaçların IR ile kombinasyonunda zamanlamanın nasıl olacağı ile ilgili sınırlı sayıda bilgi mevcuttu. Bu nedenle ilaç dozları belirlenirken 2 zamanlama senaryosu üzerinden deney planlandı. Her iki zamanlama senaryosu kullanılarak belirlenen ilaç veya ilaç kombinasyonları ile belirlenen IR dozları (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy ve 8 Gy) kombine edildikten sonra her IR dozu ve ilaç/ilaç kombinasyonu için hücre sağkalımı MTT yöntemi ile analiz edildi.

İlaçların radyoduyarlılaştırıcı etkileri hücre sağkalım analizleri ile belirlendikten sonra IR ile kombine edilen ilaçlar sonucunda hücredeki hasar yollarında yer alan proteinlerin kinetiğinin literatürde değişiklik gösterdiği görüldü. Bu nedenle her iki ilaç zamanlama senaryosu için de IR (0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy) sonrası iki zaman aralığı (1. ve 8. saat) belirlenerek hücre hasar proteinlerinin (AMPK, H2AX,

53BP1, ERCC1) kinetiğinin zamana bağlı değişimini incelemek amacıyla ön deney yapıldı. Burada kullanılan 0 Gy kontrol amaçlı, 2 Gy günlük RT fraksiyon dozu olması sebebiyle ve 6 Gy ise intrakaviter BRT dozu ile benzer yüksek fraksiyon dozu olması ve 0-2-6 Gy arasında hücre sağkalım farkının belirgin olması nedeniyle deneyde bu dozlar kullanıldı. Daha sonra western blot deneyinde kullanılacak olan proteinler elde edildi. Deneyde kullanılacak protein miktarının belirlenmesi için protein kantitasyonu işlemi yapıldı. Daha sonra belli protein miktarları yüklenmiş kuyular poliakilamid jel elektroforezi ile yürütülerek proteinlerin birbirinden ayrışması sağlandı. Takiben, proteinlerin aktarıldığı jeller trans-Blot Turbo Transfer Sistemi ile membranlara transfer edilerek primer ve sekonder antikor ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kemiluminesans görüntüleme ile proteinler görüntülendi. Aynı deney aşamaları ön deney sonucunda asıl deneyde uygulanmak üzere belirlenen koşullarda (2. senaryoda 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy, IR sonrası 1. saat) tekrarlandı. Takiben, hücre siklus fazlarının hücrenin radyoduyarlılığında değişikliğe yol açtığı bilindiği için IR ile ilaç kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerindeki etkisi flow sitometri yöntemi ile belirlendi.

3.1. Hücre Kültürü

İnsan serviks kanseri hücre dizisi olan HeLa, Bilkent Üniversitesi Doç. Dr. Urartu Şeker'den temin edildi. Hücreler Bilkent Üniversitesi tarafından belirtilen kültür şartları ve metoduna uygun olarak çoğaltıldı (Şekil 3.1). HeLa hücre dizisi, 25 ve 75 cm² flasklar içinde, %10 FBS, 2 mmol/L L-glutamin, 100 IU penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ve 1 g/ml glukoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) düşük-glukoz tam besiyeri ortamında 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde çoğaltıldı. Flask içerisinde çoğalan hücrelerin doluluk oranları %90 ile %100 arasına ulaştıklarında hücreler flasklardan kaldırılarak pasajlandı. Hücrelerin ikinci pasajı aşamasında, krayovial tüp başına 1 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde konuldu ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere sıvı azot tankında muhafaza edildi.



Şekil 3.1. HeLa hücre dizisinin DMEM düşük-glukoz besiyerinde çoğaltılması (%70 doluluk oranı)

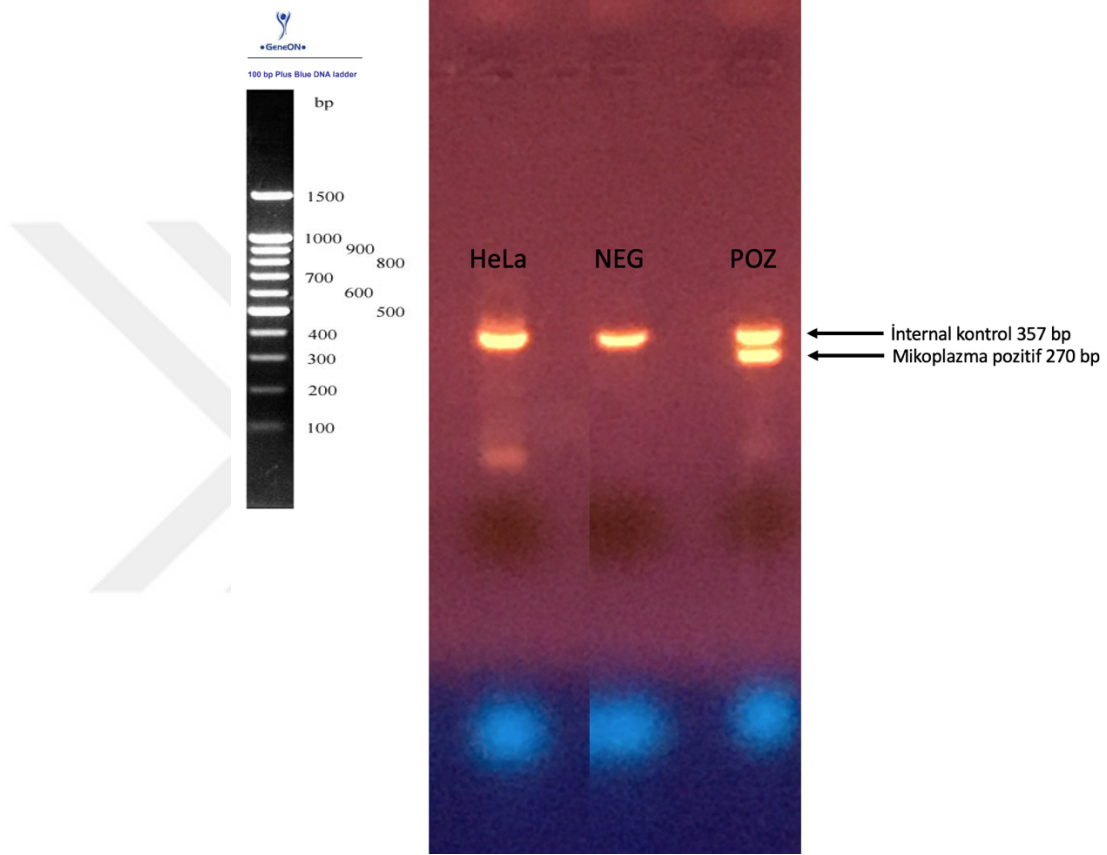
Uygun pasaj sayısına ve deneylerde kullanılacak miktara ulaşan hücrelerin pasajlanma aşamasında öncelikle flasklarda bulunan besiyerleri hücrelere zarar verilmeden serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. T-25 cm² flask için 1 ml, T-75 cm² flask için 3 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) eklendi. Flask PBS ile yıkandı ve daha sonra serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Bu sayede adheran hücreler yıkanarak besiyeri artıkları ve tripsinin enzimatik reaksiyonunu inhibe eden FBS ortamdan uzaklaştırıldı. T-25 cm² flask için 1 ml tripsin/EDTA, T-75 cm² flask için 3 ml tripsin/EDTA flask içine konuldu. Tripsin/EDTA'nın flask içerisindeki adheran hücrelerin hepsine homojen olarak yayılması için flask hafifçe çalkalandı. 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 5-7 dakika arasında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığı faz/kontrast (inverted) mikroskopta kontrol edildi. Tüm hücrelerin tabandan ayrıldığı gözlemlendikten sonra Tripsin/EDTA'nın etkinliğini durdurma için 2-5 ml arasında tam besiyeri eklendi. Besiyerinin etkin bir şekilde tüm hücrelere ulaşabilmesi için serolojik pipet ile pipetaj yapıldı. Flask içerisinde süspanse halde bulunan hücreler 50 ml'lik falkon tüp içine alınıp +24 °C'de 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hücre artıklarının bulunduğu süpernatant falkondan uzaklaştırıldı. Falkonun alt kısmında oluşan hücre pelleti üzerine 6-10 ml arasında tam besiyeri eklendi. Pipetaj işlemi yapılarak süspanse hale getirildikten sonra pipetaj

işlemi ile hücrelerin sayım işlemi öncesi birbirlerinden ayrılması ve lam üzerine tek düşmeleri sağlandı. Süspansiyon içerisinde 15 µl alındı ve 15 µl tripan mavisi ile karıştırılarak süspansiyon içerisinde bulunan hücre miktarı 1:1 oranında seyreltilmiş oldu. Tripan mavisi ile karıştırılan süspansiyon Thoma lamının iki ucuna 15'er µl yayıldı ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Thoma lamı üzerindeki her iki uç için ayrı 5 alan seçildi ve bu alanlarda sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması alındı. Ölü hücrelerin parçalanmaya başlayan hücre zarı içerisinde kolayca geçebilen tripan mavisi sayesinde mavi olarak görülen hücreler ekarte edildi. Kullanılan Thoma lamının ölçüleri 0.1 mm x 0.1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık 0.1 mm'dir. Bu nedenle hücrelerin sayıldığı her alan 0.001 mm³'e (0.0001 ml'ye) karşılık geldiğinden sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması 10.000 ile çarpıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi ile 1:1 oranında seyreltiği için elde edilen değer 2 ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Hücre sayımından sonra T-75 cm² flaska 500.000 hücre ekmek için gerekli besiyeri ve hücre süspansiyonu miktarı hesaplanarak pasaj gerçekleştirildi.

3.2. Mikoplazma Testi

Hücreler çoğaldıkça hücre içi bakterilerin (mikoplazma) kontaminasyonu söz konusu olabilmektedir. Hücrelerin kontamine olup olmadıklarını test etmek için, flask içerisindeki yoğunluğu %90-100 düzeylerine ulaşmış HeLa hücre dizisi besiyerinden 1 ml örnek alınarak, 1,5 ml'lik deney tüpü içerisine konuldu. Aldığımız örnek +4 °C'de 2000 rpm'de 90 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve pellet atıldı. Alınan süpernatant 14000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Bu işleminden sonra süpernatant pipet ile çekilerek atıldı. Tüpün alt kısmında oluşan pellet 25 µl mikoplazma tampon solüsyonu içerisinde süspanse hale getirildi. Süspansiyon 95 °C'ye getirilmiş kuru blok üzerinde 3 dakika inkübe edildi. Bu aşamadan sonra polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) geçildi. PZR, EZ-PCR Mikoplazma kitinde önerilen miktarlarda örnek tüp, pozitif kontrol tüpü ve negatif kontrol tüpü olarak hazırlandı. PZR sonunda tüplerin içerisindeki ürünler %2'lik agaroz jele yüklendi. Yüklenen ürünler agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.2). 357 bp'de bant veren internal kontrol PZR'un düzgün çalışmış olduğunu göstermektedir. Mikoplazma DNA fragmenti 280 bp'de bant vermektedir. Şekil 3.2'de görüldüğü üzere

pozitif kontrol kolonunda bant vardır. Bu deneyimizin düzgün çalıştığını göstermektedir. Negatif kontrol kolonunda bant görülmemektedir. Bu durum kullandığımız PZR ajanlarının kontamine olmadığını göstermektedir. Örnek kolonunda bant görülmemesi ise HeLa hücrelerinde herhangi bir mikoplazma kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.



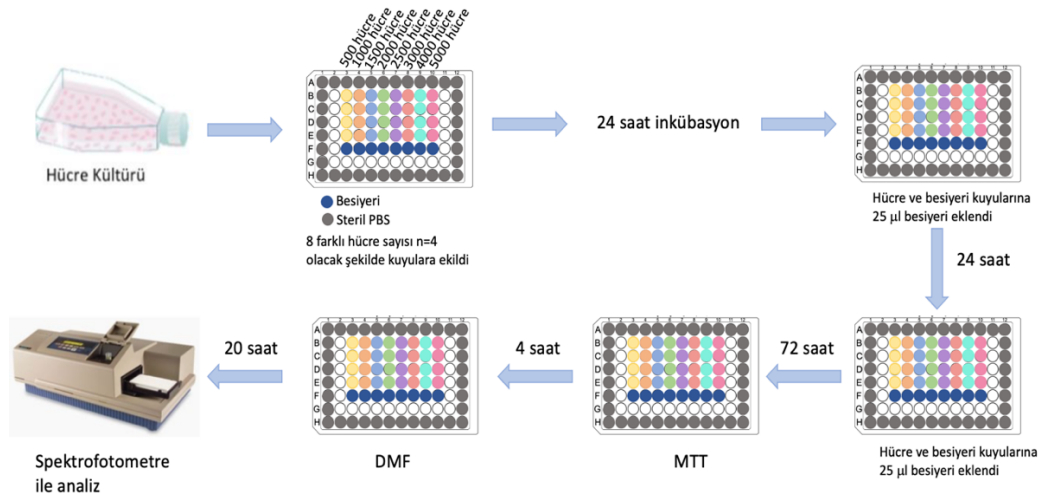
Şekil 3.2. Mikoplazma test sonucu

3.3. Hücre Sağkalım Deneylerinde Kullanılacak Hücre Sayısının Belirlenmesi

Uygun hücre sayısı için hücreler çoğaltıldıktan sonra ilaç konsantrasyonları eklenmeden önce gerekli hücre sayısının belirlenmesi amacıyla ön deney yapıldı. Hücrelerin canlılığını değerlendirmek amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de MTT testidir. Bu yöntemde kolorimetrik olarak hücrenin metabolik aktivitesi değerlendirilmektedir. MTT testinin amacı, çoğalan canlı hücreler tarafından artan dehidrogenaz aktivitesine bağlı olarak mitokondriyal redüktaz enzimi ile

tatazolyumdan oluşan mor renkli formazan kristallerinin absorbansının kolorimetrik olarak spektrofotometrede ölçülmesidir.

Bu deneyde 96 kuyulu plakta her bir hücre sayısı için 4 tekrar olacak şekilde sırayla 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 hücre besiyeri içinde toplam 50 µl hacimde ekildi (Şekil 3.3) ve 37 °C’de %5 CO₂ içeren etüvde tutunmaları ve çoğalmaları sağlandı. Plâğin en dıştaki kuyularında buharlaşma olabileceği için 150 µl steril PBS konuldu. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrasında, hücre ve besiyeri içeren kuyulara ilaç ekleme deneylerinde uygulanacak prosedüre benzer şekilde 24 saat arayla 2 kez 25 µl besiyeri eklendi. Toplam 120 saatlik inkübasyon sonrasında, bu karışımdan hücre ve besiyeri içeren kuyuların her birine 25 µl konuldu. MTT, PBS içinde 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. MTT'nin canlı hücrelerde formazan kristali oluşturması amacıyla etüvde 4 saat inkübasyonu sağlandı. 4 saatlik inkübasyondan sonra, ekstraksiyon tamponu olarak %45 DMF içinde çözülmüş %23 SDS çözeltisi (pH= 4.7) kullanıldı. Her bir kuyuya 80 µL ekstraksiyon tamponu eklendi ve formazan kristallerinin çözünmesi için 20 saat etüvde inkübe edildi. Yirminci saatte renk değişimleri plak okuyuculu spektrofotometre cihazında 570 nm dalga boyunda okundu.



Şekil 3.3. Hücre sayısının belirlenmesinin şematik görünümü.

Okuma işleminden sonra her hücre sayısı için hücrelerin ölçülen değerlerinden besiyeri eklenen kuyuların değerleri çıkartılarak ve 4 ölçümün ortalaması alınarak optik dansite değerleri hesaplandı. Optik dansite değeri 1’e yakın olan 2500 hücre sayısı ilaç deneyleri için optimal hücre sayısı olarak belirlendi.

3.4. Deneylerde Kullanılacak İlaç Dozlarının Belirlenmesi

Hücre sayısı belirlendikten sonra çalışmanın devamında kullanılması planlanan dozlar 96 kuyulu plakta MTT testi yapılarak belirlendi. Denenecek ilaç dozları literatür araştırılarak, literatürde belirtilen en düşük ve en yüksek dozlar baz alınarak belirlendi. Kullanılan ilaç dozları Tablo 3.1’de belirtilmiştir. Sisplatin PBS’te, metformin, A769662 ve compound C (dorsomorfin) ise DMSO’da ilaçların kullanım kılavuzlarına uygun olarak çözülmüştür.

Tablo 3.1. Kullanılan ilaç dozları

Sisplatin	Metformin	A769662	Dorsomorfin
0.25 μ M	4.5 μ M	1.562 μ M	62.5 nM
0.5 μ M	13 μ M	3.125 μ M	125 nM
1 μ M	41 μ M	6.25 μ M	0.25 μ M
2 μ M	123 μ M	12.5 μ M	0.5 μ M
4 μ M	370 μ M	25 μ M	1 μ M
8 μ M	1.11 mM	50 μ M	2 μ M
16 μ M	3.33 mM	100 μ M	4 μ M
32 μ M	10 mM	200 μ M	8 μ M
64 μ M	30 mM	400 μ M	16 μ M

Literatürde sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etki için IR’dan 4 saat önce verilmesi önerilirken, metformin, A769662 ve compound C (Dorsomorfin)’nin IR ile kombinasyonunda zamanlamanın nasıl olacağı ile ilgili sınırlı sayıda bilgi mevcuttu. Bu nedenle ilaç dozları belirlenirken 2 senaryo üzerinden deney planlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. İlaç dozlarının ve IR'un uygulanma zamanları

	1. Senaryo	2. Senaryo
1. Gün	Hücre ekimi	Hücre ekimi
2. Gün	Hücre ekiminden sonra 22. saatte Dorsomorfin eklendi, 24. saatte metformin + A769662 eklendi	Hücre ekiminden sonra 22. saatte Dorsomorfin eklendi, 24. saatte metformin + A769662 + sispaltin eklendi. Sispaltin eklenmesinden sonra 4. saatte IR uygulanması planlandı
3. Gün	Son ilaçtan sonra 24. saatte sispaltin eklendi, sispaltinden sonra 4.saatte IR uygulanması planlandı	-
4. Gün	-	-
5. Gün	-	MTT
6. Gün	MTT	-

Her iki senaryoda da 96 kuyulu plaklara hücre sayısı belirleme deneyindeki prosedür uygulandı. Her bir ilaç ve senaryo için ayrı plaklar hazırlandı. Her bir plakta 4 kontrol kuyusu mevcut olup kontrol kuyularına 50 µL besiyeri içerisinde 2500 hücre ekildi, kontrol kuyularının normalize edilebilmesi için ise 2 kuyuya yalnızca 50 µL besiyeri eklendi (Şekil 3.4). Hücre ekiminin yapıldığı anda kenardaki kuyulara 150 µL PBS konuldu. Hücreler ekildikten sonra 22 saat hücrelerin tutunması ve çoğalması beklendi.



Şekil 3.4. Birinci senaryoda sisplatin dozlarının belirlendiği 96 kuyulu plak örneği.

Örn. B-C 4-5 kuyularında hücre ekildikten sonra $0.25 \mu\text{M}$ sisplatin eklenmiş olup, D 4-5 kuyularında hücre olmaksızın yalnızca $0.25 \mu\text{M}$ sisplatin mevcuttur. Mor renkli formazan kristallerinin canlılığın azaldığı yüksek sisplatin dozu eklenen kuyulara doğru azaldığı görülmektedir.

Her bir ilaç konsantrasyonu için 4 tekrar olacak şekilde $50 \mu\text{L}$ besiyeri içerisinde 2500 hücre ekildikten sonra ilaçlar Tablo 3.2’de belirtilen zamanlarda istenilen konsantrasyonu sağlanacak şekilde eklendi. Asıl deney koşulunu sağlamak amacıyla her iki senaryoda da ilaç ekleme zamanlarında, ilaç eklenmeyen kuyulara da ilaç ile aynı hacimde besiyeri eklendi. Her iki senaryo için Tablo 3.2’de belirtilen zamanlarda $25 \mu\text{L}$ MTT eklendi, MTT sonrası 4. saatte tüm kuyulara $80 \mu\text{L}$ DMF-SDS çözeltisi eklendi. Önceden kenardaki kuyulara eklenmiş olan PBS’lerden bir tanesinden mikropipet ile çekilip yerine $200 \mu\text{L}$ DMF-SDS solüsyonu konuldu. Bu işlem sonrası bu kuyu dikkate alınarak spektrofotometre cihazının tüm değerleri normalize etmesi sağlandı.

Plak DMF-SDS solüsyonu eklendikten 20 saat sonra spektrofotometre cihazına yerleştirilerek, kuyulardaki renk değişimleri plak okuyuculu spektrofotometre cihazında 570 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen hücre üzerine ilaç eklenen değerlerin ortalaması alınarak bu değerden yalnızca ilaç/besiyeri eklenen kuyuların ortalaması çıkartıldı. Kontrol kuyusunda el edilen değer %100 sağkalım olarak

belirlenerek, ilaç eklenen kuyulardaki değerler buna göre normalize edilerek sağkalım analizi yapıldı.

Çalışmamızda ilaçların radyoduyarlılaştırıcı etkisi araştırıldığı için ilaçların tek başlarına uygulandıklarında toksik olmayan ve literatür ile uyumlu olduğu görülen dozlar sonraki deneylerde kullanılacak dozlar olarak belirlendi. Sisplatin için sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olması nedeniyle bir doz, metformin, A769662 ve dorsomorfin için ise iki doz belirlendi ⁵¹. Sisplatin için hücre için toksik olmayan 1 μ M ilaç konsantrasyonu ile deneylere devam edildi. Metformin için 150 μ M ve 1mM, A769662 için 100 μ M ve 200 μ M, dorsomorfin için ise 0.5 μ M ve 1.5 μ M ilaç dozları belirlenerek deneylere devam edildi.

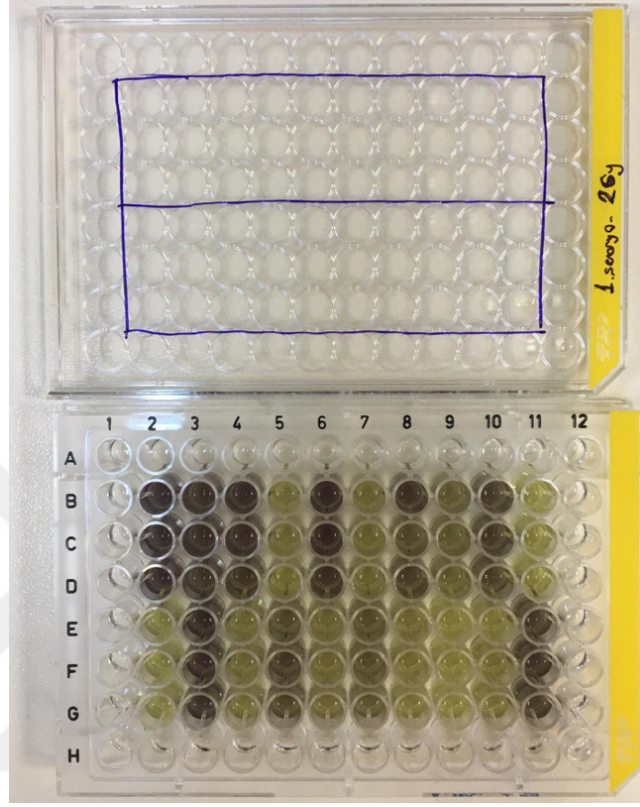
3.5. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Kullanılacak ilaç dozları belirlendikten sonra Tablo 3.2’de belirtilen zamanlamaya uygun olarak deney uygulandı. Uygulanacak RT dozları literatürde hücre kültürü radyoduyarlılık çalışmalarında uygulanan dozlar olan ve günlük fraksiyon dozu ile brakiterapide uygulanan yüksek fraksiyon dozuna uygun olarak 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy ve 8 Gy olarak belirlendi. Toplamda 2 senaryo ve 5 IR dozu için 10 adet 96 kuyulu plak oluşturuldu. Her RT dozu ve deney senaryosu için oluşturulan 96 kuyulu plağa Tablo 3.3 ve Şekil 3.5’te belirtilen ilaç veya ilaç kombinasyonları 3 tekrar olacak şekilde eklendikten sonra plak üzerinde belirtilmiş olan RT dozunda IR uygulandı.

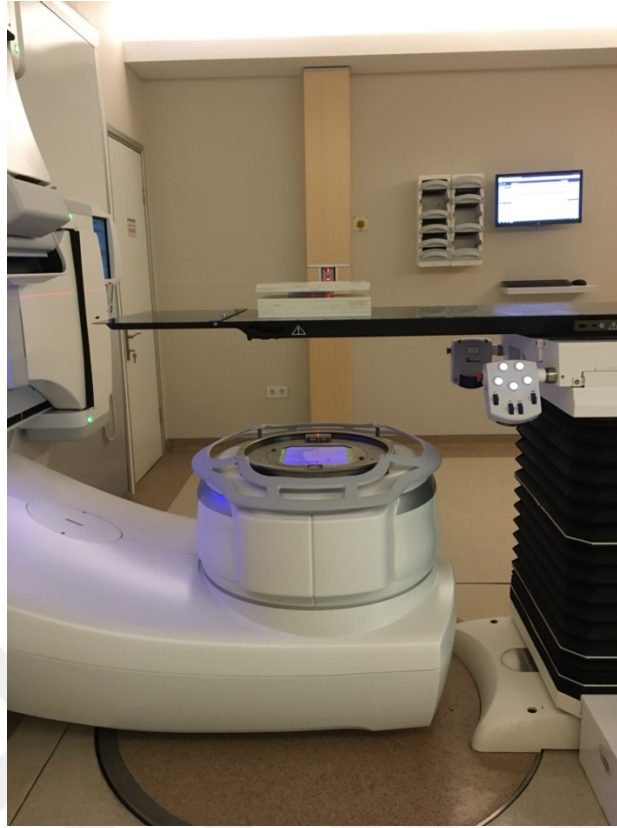
İyonizan radyasyon uygulama işlemi Elekta Versa HD lineer hızlandırıcı cihazında gantri 180°’de iken SAD (source-axis distance) =100 cm olacak şekilde 10 cm derinlikte 40x40 alan boyutunda 6 MV foton demetleriyle RW3 katı fantomlar üzerinde yapıldı. Geri saçılan radyasyon etkisinden dolayı plakların altına 5 cm, üzerine ise 2 cm katı fantom yerleştirildi. Her ışınlama günü öncesi cihazın çıkış kalibrasyonu 1 MU, 1,5 cm derinlikte 1 cGy olacak şekilde yapıldı. Işınlama düzeneği Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

İyonizan radyasyon sonrası kuyulara 72. saatte her kuyuya 50 μ L MTT, MTT’den 4 saat sonra her kuyuya 80 μ L DMF-SDS çözeltisi eklendi. Başlangıçta PBS eklenen köşedeki kuyudan PBS mikropipet ile çekilip, 200 μ L DMF-SDS çözeltisi

konuldu. Son çözelti eklendikten 20 saat sonra spektrofotometre ile formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimleri 570 nm dalga boyunda okundu (Şekil 3.7).



Şekil 3.5. Birinci senaryoda 2 Gy IR uygulanan 96 kuyulu plak örneği



Şekil 3.6. Işınlama işlemi gantri 180°'de iken SAD = 100 cm olacak şekilde 10 cm derinlikte 40x40 alan boyutunda 6 MV foton demetleriyle RW3 katı fantomlar üzerinde yapıldı. Geri saçılan radyasyon etkisinden dolayı plakların üzerine 5 cm katı fantom yerleştirildi.

Plate#1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,562	0,520	0,540	0,138	0,558	0,232	0,505	0,252	0,469	0,133	
C		0,616	0,569	0,590	0,139	0,602	0,232	0,617	0,248	0,536	0,140	
D		0,632	0,532	0,551	0,145	0,560	0,231	0,584	0,228	0,562	0,135	
E		0,138	0,521	0,199	0,519	0,269	0,420	0,208	0,124	0,130	0,566	
F		0,137	0,509	0,240	0,535	0,254	0,401	0,204	0,127	0,135	0,537	
G		0,141	0,515	0,200	0,327	0,254	0,348	0,201	0,142	0,133	0,498	
H												0,000
Endpoint L1 Automix: Off Plate Last Read: 02.06.2021 23:10												

Şekil 3.7. Spektrofotometre ile formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimleri 570 nm dalga boyunda okunarak kuyuların optik dansiteleri elde edildi.

Tablo 3.3. Doksan altı kuyulu plakta her ilaç/ilaç kombinasyonunun 3 tekrar şeklinde sıralanışı

Kuyu numaraları	İlaç/İlaç Kombinasyonu
B-C-D 2	Kontrol
B-C-D 3	1 μ M Sisplatin
B-C-D 4	150 μ M Metformin
B-C-D 5	1 mM Metformin
B-C-D 6	100 μ M A769662
B-C-D 7	200 μ M A769662
B-C-D 8	0,5 μ M Dorsomorfin
B-C-D 9	1,5 μ M Dorsomorfin
B-C-D 10	1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin
B-C-D 11	1 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin
E-F-G 2	0,5 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin
E-F-G 3	1 μ M Sisplatin + 100 μ M A769662
E-F-G 4	1 μ M Sisplatin + 200 μ M A769662
E-F-G 5	1 μ M Sisplatin + 0,5 μ M Dorsomorfin
E-F-G 6	1 μ M Sisplatin + 1,5 μ M Dorsomorfin
E-F-G 7	1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin + 0,5 μ M Dorsomorfin
E-F-G 8	1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin + 1,5 μ M Dorsomorfin
E-F-G 9	1 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin + 0,5 μ M Dorsomorfin
E-F-G 10	1 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin + 1,5 μ M Dorsomorfin
E-F-G 11	0,5 μ M Sisplatin

3.6. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar

Belirteçleri Üzerindeki Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

IR ile kombine edilen ilaçlar sonucunda hücredeki hasar yollarında yer alan proteinlerin kinetiğinin literatürde yapılan araştırmalar sonucunda değişiklik

gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle literatür ön araştırması sonucunda iki zaman aralığı belirlenerek ön deney yapıldı. Ön deneyde IR sonrası 1. ve 8. saatte AMPK, H2AX, 53BP1, ERCC1 proteinlerinin düzeyleri western blot tekniği ile incelendi. Ön deneyde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozları kullanıldı. Burada kullanılan 0 Gy kontrol amaçlı, 2 Gy günlük RT fraksiyon dozu olması sebebiyle ve 6 Gy ise intrakaviter BRT dozu ile benzer yüksek fraksiyon dozu olması nedeniyle seçildi. Ayrıca 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy dozları arasında hücre sağkalımında belirgin farklılık mevcut olması nedeniyle bu dozların kullanılmasına karar verildi.

3.6.1. İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Zamana Bağlı Değişiminin İncelenmesi

Lizat Hazırlama

Western blot deneyinde kullanılacak olan proteinlerin elde edilebilmesi için lizis tamponu ile hücrelerin lizis edilmesi ve lizat hazırlanması gerekmektedir. Bunun için öncelikli olarak hücrelerin lizis olmasını sağlayacak olan lizis tamponu 50 µl 1X Halt Proteaz ve Fosfataz İnhibitör Kokteyli, 4.9 ml RIPA çözeltisi ve 50 µl bir metalloproteaz inhibitörü olan EDTA solüsyonu karıştırılarak elde edildi. Lizat hazırlama işlemine başlamadan önce lizis edilecek kuyu sayısının 2 katı kadar 1,5 ml'lik deney tüpü -20 °C dolapta soğutuldu. Lizat hazırlama aşamasında kullanılacak pipet uçları ve PBS soğuk odada bekletildi. Halt Proteaz ve Fosfataz İnhibitör Kokteyli proteaz inhibitörü olarak kullanılır ve proteinlerin degradasyonunu engellemektedir. EDTA (etilen diamin tetraasetik asit), Ca⁺⁺ ve Fe⁺⁺⁺ iyonlarının solüsyonda kalmasını sağlayarak reaksiyona girmesini önler.

Altı kuyulu plaklar içine 350.000 HeLa hücresi/1 ml ekildikten sonra belirlenen saatlerde (1 ve 8. saat) Tablo 3.3'te belirtilen ilaç kombinasyonları 1. ve 2. senaryoda 3 tekrar olacak şekilde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR uygulanarak inkübasyon süreleri bittikten sonra lizat hazırlanacak hücre plağı etüvden alınarak +4 °C odada buz üstünde 5 dakika bekletildi. Bu aşamadan itibaren tüm işlemler sıcaklık faktöründen dolayı protein degradasyonunu önlemek amacıyla +4 °C odada yapıldı. Plağın 5 dakika süresince buz üstünde bekletilmesinden sonra kuyularda bulunan ilaçlar ve besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyuların besiyeri ve ilaçlardan temizlenmesi amacıyla 1 defa soğuk

PBS ile kuyular yıkandı. Kuyu ve yıkama başına 1 ml PBS kullanıldı. Devamında her bir kuyuya 250 µl taze olarak hazırlanmış lizis tampon eklendi. Lizis tampon ile kazınarak elde edilen lizat 250 µl'lik mikropipetlerle çekilip epandorflara konuldu. Lizatın konulduğu epandorflar +4 °C soğuk odada bulunan vortekste 10 dk karıştırıldıktan sonra çalkalayıcıda 200 rpm hızda 10 dakika çalkalandı. Toplamda 3 defa 10 dakika vorteks ve 10 dakika çalkama işlemi gerçekleştirildi. Örnekler 1,5 ml'lik deney tüplerine konularak +4 °C'ye soğutulmuş santrifüjde 12400 rpm hızında 20 dakika santrifüj edildi. Bu işlem ile çözeltide bulunan atık maddelerin tüpün dibine çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası peleti kaldırmadan süpernatant sıvı yeni bir deney tüpüne konuldu. Bu işlemden sonra protein kantitasyonu aşamasına geçildi veya protein lizatları daha sonra kantite edilmek üzere -86 °C buzdolabına kaldırıldı.

Protein Kantitasyonu

Western blot deneyinde kullanılacak olan protein lizatlarının, protein miktarlarının tayini amacıyla BCA Plus Protein Assay Reagent Kit ile protein kantitasyonu yapıldı. Düz tabanlı 96 kuyulu plakta bulunan kuyulara protein miktar tayini yapılacak protein lizat örneklerinden 10'ar µl eklendi. Ayrıca kantitasyonu yapılacak örneklerin protein miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla, içeriğindeki protein miktarı oranları bilinen BSA protein standartları 96 kuyulu plağın boş olan kuyularına eklendi. Toplamda 7 farklı (2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ve 0,125 mg/ml) BSA protein standartından 10'ar µl kuyulara eklendi. Son olarak lizat hazırlama aşamasında hücreleri lizis etmek için kullanılan lizis bufferın yapacağı olası ısımanın, proteinlerin yoğunlukları ile oluşan farklı renk yoğunluklarından çıkarılabilmesi amacıyla bir kuyuya 10 µl lizis tamponu eklendi. Negatif kontrol kuyusu (blank) olarak kullanılacak bu kuyunun renk yoğunluğunun protein kuyularındaki renk yoğunluklarından çıkarıldığı zaman elde edilen renk yoğunluğu salt olarak proteinlerin oluşturmuş olduğu yoğunluk olarak elde edildi. Her bir protein standardı, protein lizatı ve blank olarak kullanılacak lizis tamponu üzerine 200 µl kit içerisinde bulunan 50:1 oranında A ve B solüsyonlarından oluşan BCA karışım solüsyonu eklendi. Tüm kuyulara aynı işlem uygulandıktan sonra 96 kuyulu plak 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra kantite edilecek plak, plak okuyucu spektrofotometre cihazına yerleştirildi.

Takiben 562 nm dalga boyunda kuyuların renk yoğunlukları kantite edildi. Kantitasyonda kullanılan protein standartlar mg/ml cinsinden olduğu için elde edilen bu değer, 1 ml lizat içerisinde bulunan proteinin mg cinsinden değerini vermektedir. Bu nedenle örneklerden elde edilen değerler 1 µl lizat içerisinde bulunan protein miktarını µg cinsinden karşılığını vermektedir. Western blot deneylerinde ne kadar (µl) protein lizatı kullanılacağı, her bir örnekten 20 µg/µl protein kullanılacağı için doğru orantı yapılarak hesaplandı.

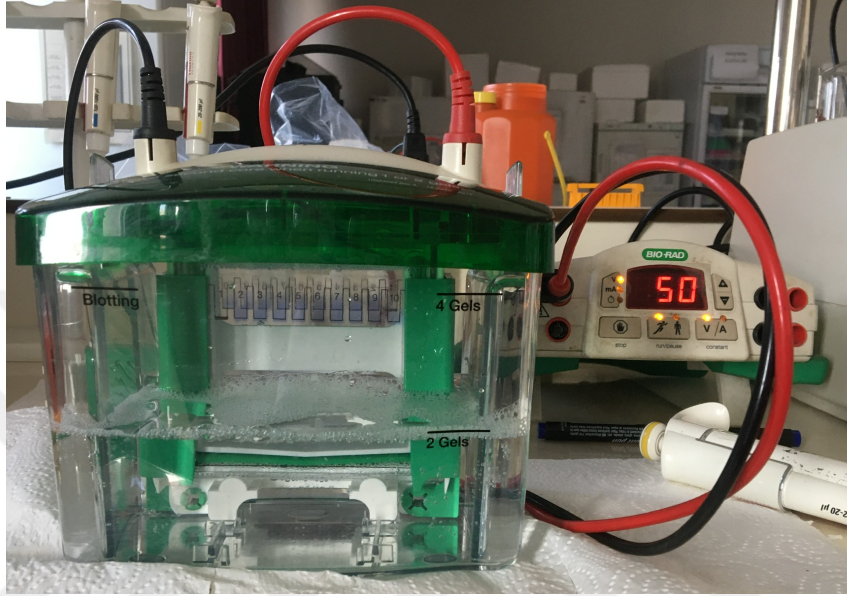
Western Blot ve Protein Analizi

Protein kantitasyonu aşamasından sonra 1,5 ml'lik deney tüplerinde bulunan lizatlar 4x laemmli solüsyonu ile tüplere eklenerek karıştırıldı. Laemmli solüsyonu 10:1 laemmli/β-merkaptoetanol oranında hazırlandı. Tüp içerisine eklenen ve pipetaj yapılarak homojen şekilde karışması sağlanan tampon, proteinlerin denatürasyonu için önceden ısı 95 °C'ye getirilmiş olan kuru ısıtma bloğu içerisinde 3 dakika bekletildi. Bu sayede proteinler denatüre edildi. Proteinlerin denatürasyonu kullanılacak olan antikorların proteinlere tutunabilmesi açısından önemlidir. Aksi takdirde antikorların proteinlere tutunması imkansızlaşır. Proteinlerin denatürasyonu sonrasında deney tüpleri 13400 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi. Tampon içerisinde bulunan β-merkaptoetanol proteinlerin disülfid bağlarının indirgenmesini sağlar. Laemmli solüsyonu içerisinde bulunan SDS maddesi denatüre edilen proteinlerin eksi (-) yük ile yüklenmesini sağlar. Tampon içerisinde bulunan diğer maddelerden biri olan gliserol proteinlerin jel kuyuları içerisine çökmesini sağlamak ve bir diğer madde olan bromfenol mavisi ise jelde örneklerin görülmelerini sağlamaktadır.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Her bir jel elektroferez işleminde proteinlerin hem total hem de fosforile şeklinin görüntülenmesi için gerekli olan 2 adet mini-PROTEAN TGX Precast jel kullanıldı. Jeller elektroferez tankına yerleştirilerek her bir kuyuya en soldaki kuyuya 5 µl moleküler ağırlık bantlarının gösterildiği “*ladder*” ve diğer kuyulara 35-50 µl arasında değişecek şekilde aynı miktarda protein yüklenerek hazırlanan örnekler konuldu. Tankın içerisine ve iki jel arasını da dolduracak şekilde 100 ml 10x TGS ve 900 ml deiyonize su ile hazırlanmış yürütme solüsyonu kullanma kılavuzunda

belirlenen düzeye kadar eklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra tank kapatılarak 5 dakika 50 voltajda tüm kuyulardaki örneklerin yürütme jelinin başlangıç noktasına gelmesi ve daha sonra 90 dakika 100 voltajda örnekleri yürütülerek proteinlerin ayrışması sağlandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Proteinlerin jel elektroforezi tankında yürütülmesi işlemi

Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi ile Transfer ve Blotlama

Proteinlerin yürütme işlemi tamamlanıp proteinler birbirinden ayrıldıktan sonra her iki jelin bulunduğu kasetler açılarak jeller, filtre kağıdı ve PVDF membranlar daha önceden hazırlanmış olan transfer solüsyonu (60 ml distile su + 20 ml etanol + 20 ml transfer solüsyonu) ile ıslatıldı. iBlot™ Semi-Dry Blotting transfer sistemi içerisine Anot Stack ıslatılarak hava kabarcığı bırakılmadan üzerine filtre kağıdı → PVDF membran → Jel → Filtre Kağıdı → Islatılmış Katot Stack yerleştirilerek cihaz kapatıldı. Negatif yüklü katot stack sayesinde proteinlerin PVDF membrana doğru transferi sağlanmıştır. Görüntülenmesi istenen proteinlerin moleküler ağırlıkları geniş bir spektruma sahip olduğundan (53BP1: 450 kDa, AMPK: 62 kDa, β -aktin: 45 kDa, ERCC1: 39 kDa ve H2AX: 15 kDa) 7 dakikada “mixed” volt akım ayarlandı ve seçilen bu program ile tüm proteinlerin membrana transferinin gerçekleştiği görüldü.

Transfer işlemi bittikten sonra membranlar görüntülenmesi istenen proteinlerin moleküler ağırlık aralıklarına göre kesilerek daha önceden hazırlanmış olan blok

solüsyonuna (1:10 blue block ve distile su) konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında 100 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcıda bırakıldı. Blokasyon işlemi daha sonra uygulanacak olan antikor inkübasyonunun spesifitesini arttırmayı hedefler. Bu sayede görüntüleme esnasında membran, arka planda daha temiz bir görüntü elde etmemizi sağlar. Blokasyon işlemi sonrasında blok solüsyonu dökülerek daha önceden hazırlanmış olan primer antikorlar ile membranlar 18 saat +4 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Primer antikorlar β -aktin için 1/6000 ve diğer antikorlar için 1/1500 dilüsyon ile hazırlandı. Primer antikor ile inkübasyon sonrasında primer antikorlardan membranlar uzaklaştırılarak, 3 defa 10 dakikalık TBS-T (50 ml 10x TBS + 5 ml %10 Twin 20 + 445 ml distile su ile hazırlanmış solüsyon) ile inkübasyonlar uygulanarak membranlar yıkandı. Yıkama işleminden sonra sekonder antikorlar (β -aktin için 1/18000 ve diğer antikorlar için 1/3000 dilüsyon ile hazırlandı) ile membranlar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi (Şekil 3.9). Bir saat sonra sekonder antikorlar uzaklaştırılarak membranlar tekrar 3 defa 10 dakikalık TBS-T ile inkübe edilerek yıkandı. Son yıkamadan sonra kemolüminesans görüntülemeye geçildi.



Şekil 3.9. Membranların oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcıda sekonder antikor ile inkübasyonu

Kemilüminesans Görüntüleme

Sekonder antikor ile inkübasyonun ardından yapılan TBS-T ile yıkama sonrası membran üzerinde görüntülemek istenilen hedef proteinlerin görüntülenmesi

aşamasına geçildi. “*Enhanced chemiluminescence*” (ECL) içerisinde bulunan luminesans madde olan luminol, sekonder antikora konjuge HRP’de bulunan peroksidaz enziminin substratıdır. Bu sayede luminol, peroksidaz enzimi ile reaksiyona girerek peroksidazı okside eder ve 3-aminofthalat açığa çıkar. Açığa çıkan ürün foton saçarak (425 nm) düşük enerji seviyesine iner ve ışımaya oluşur. Meydana gelen bu reaksiyon sonucu inkübe edilen antikorun bağlandığı proteinler bant vererek görünür hale gelir. ECL kiti olarak Super Signal Westfemto Maximum Sensitivity Substrate kullanıldı ve reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Kit protokülüne uygun olarak hazırlanan solüsyon membranın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi ve β -aktin dışındaki diğer proteinler için 3 dakika karanlıkta inkübe edildi. β -aktin için ilk görüntülemeye 3 dakika bekleyince yüksek düzeyde ışımaya olması nedeniyle membrandan görüntüleme alınamadığı için sonraki deneylerde bekleme süresi olmadan ECL eklendiği gibi görüntü alındı. İnkübasyon sonrası solüsyon uzaklaştırıldı ve membran üzerinde bulunan protein bantları BioSpectrum Imaging System görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Aynı membrana karşılık gelen molekül ağırlığına sahip proteinler için bir sonraki gün membran 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkanıp, 1 saat blokasyon yapıldıktan sonra primer ve sekonder antikorlar ile tekrar inkübe edilip görüntülemeler alındı.

3.7 İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Değişiminin İncelenmesi

Yapılan ön deney sonucunda 2. senaryodaki MTT hücre sağkalım analizi sonuçlarıyla western blot protein analizi sonuçlarının birbiriyle uyumlu olması nedeniyle daha sonra yapılan deneylerde ön deneyde kullanılan 2. senaryodaki ilaç ve IR dozları (0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy) ve inkübasyon süreleri kullanıldı. Ayrıca literatür ile uyumlu olarak 1. saatte protein ekspresyonlarında daha hızlı artış olduğu, 8. saatte artık bu artışın azalmaya başladığı görülmesi üzerine sonraki deneylerde 1. saatteki protein analizleri yapıldı. Ön deneyde AMPK ve p-AMPK protein görüntülerinin düşük olması sebebiyle sonraki deneylerde ECL eklendikten sonra AMPK ve p-AMPK için 5 dakika inkübasyon süresi uygulanarak görüntü alındı.

Asıl deney gruplarında her bir gruptan 3 tekrar olacak şekilde 2. senaryodaki ilaç ve IR uygulama süreleri kullanılarak gruplar şu şekilde belirlendi: Kontrol,

sisplatin, metformin, dorsomorfin, A769662, sislartin + metformin, sislartin + dorsomorfin, sislartin + A769662. Her grubun 3 tekrar örneğine de 0 Gy (IR uygulanmayan), 2 Gy ve 6 Gy IR uygulandı. Bir  nceki bölümde anlatılan yöntem ile western blot deneyi bu gruplar için yapıldı.

3.8. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü  zerindeki Etkisinin Flow Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi

Hücre döngüsü analizi için bir önceki protein analizi deneyinde kullanılan kontrol, sislartin, metformin, dorsomorfin, A769662, sislartin + metformin, sislartin + dorsomorfin, sislartin + A769662 gruplarında 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy uygulanan her bir örnekte 3 tekrar olacak şekilde toplam 72 örnek elde edildi. Hücre  o altma ve pasaj işleminde sonra 1.150.000 hücre / 5 ml olacak şekilde 72 adet T25 flaska hücreler ekildi ve 22 saatlik inkübasyon süresi hücrelerin tutunması ve çoğalması için beklendi. Ekim sonrası 22. saatte dorsomorfin içeren gruplara dorsomorfin, içermeyenlere besiyeri eklendi. Bu işlemden 2 saat sonra diğer ilaçlar (sislartin, metformin ve A769662) eklendikten 4 saat sonra IR uygulandı. İyonizan radyasyon sonrası 1. saatte hücreler önceki bölümlerde anlatılan pasaj işlemindeki gibi PBS ile besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra tripsin ile hücrelerin kalkması sağlandı. Hücreler tripsinize edildikten sonra santrifüj edildi daha sonra hücrelerin üzerine 1 ml PBS ve takiben vorteks üzerinde karıştırılarak damla halinde 2.5 ml soğuk %96'lık etanol ilave edildi. Fikse edilen hücreler üzerine tekrar 2ml PBS eklenerek +4 C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücrelerin üzerine 70 l RNase (Sigma, P7003) ve 50  l Propidium Iodide (Sigma, P4170) eklenerek karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 37  m'lik naylon mesh'den s z ld  ve akım sitometri cihazında (Cytotflex, BeckmanCoulter, USA) 20.000 hücre sayılarak G0/G1-S ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı floresan yoğunluğu ve hücre sayısını gösteren iki değişkenli histogramlardan analiz edildi.

3.9. Biyoenformatik Analiz

Çalışma kapsamında iki farklı veri tabanı üzerinden meta-analiz gerçekleştirildi. İlki, *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) ¹⁰⁵ veri tabanında

bulunan DepMap Public21Q4 (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.16924132.v1>) veri tabanında bulunan 1389 kanser hücre hattı içerisinde serviks kanseri hücre hatları olan BOKU, C33A, C4I, C4II, CASKI, DOTC24510, HCA1, HCS2, HCSC1, HELA, HOKUG, HT3, MS751, SIHA, SISO, SW756 ve SW954 hücrelerinde AMPK ilişkili 6 genin (CAMKK1, CAMKK2, PRKAA1, PRKAA2, PRKACA ve STK11) bazal ekspresyonları incelendi. Gen seti analizi *Broad Institute Morpheus* (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) yazılımı aracılığıyla oluşturuldu.

İkinci olarak, *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veri tabanında bulunan GSE9750¹⁰⁶ ve GSE63514¹⁰⁷ veri setleri kullanıldı. Bu veri setlerinde gruplar arası AMPK geni olan PRKAA1&2'nin ekspresyonları karşılaştırıldı.

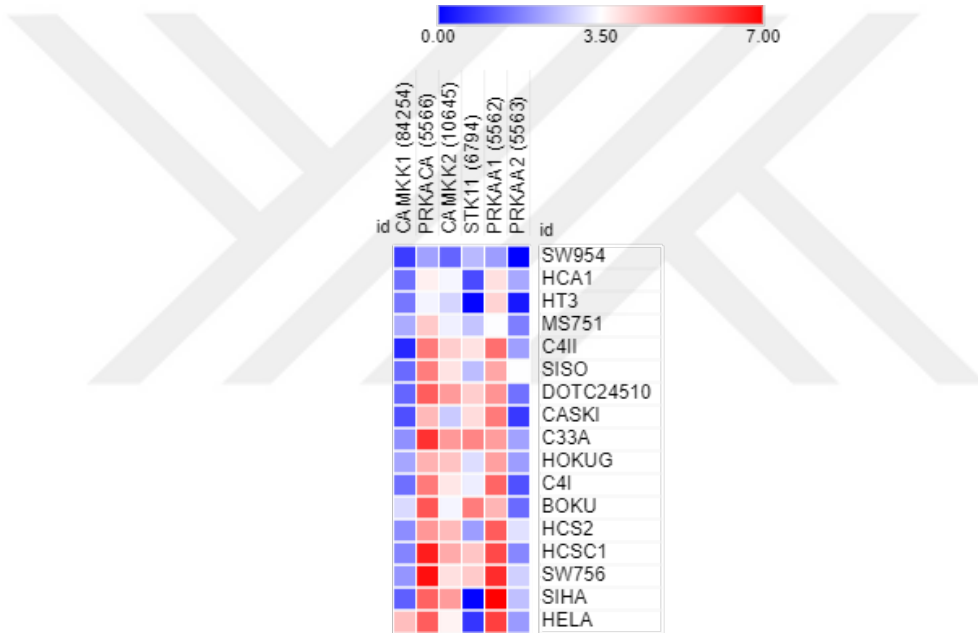
3.10. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler için IBM SPSS Statistics Version 23 programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesi amacıyla istatistiksel yöntem olarak Student-t test kullanılmıştır. İyonizan radyasyon dozuna göre değişkenlerin incelenmesi amacıyla two-way ANOVA testi kullanılmıştır. İki'den fazla grupta parametrik olmayan verilerin karşılaştırılması Kruskal Wallis testi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan testler sonucunda $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

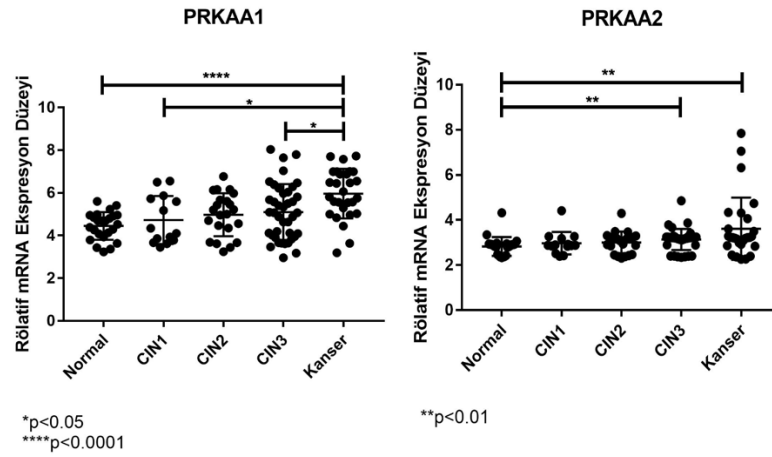
4.1. Serviks Kanseri Tedavisinde AMPK'nın Hedeflenmesi

CCLE veri setinde 17 adet serviks kanserinde AMPK (PRKAA) aktivatörleri olan CAMKK, PKA, LKB1 (STK11) genlerinin bazal ekspresyonları karşılaştırıldı. Çalışma kapsamında AMPK regülasyonu inceleyeceği için PRKAA1, CAMKK1 ve PRKACA gen ifadelerinin yüksekliğine göre sıralama yapıldığında HeLa hücresi birinci sırada yer almaktadır. AMPK regülasyonu en kuvvetli olan hücre hattı olması sebebiyle çalışmanın HeLa hücresi ile yapılması planlanmıştır (Şekil 4.1).



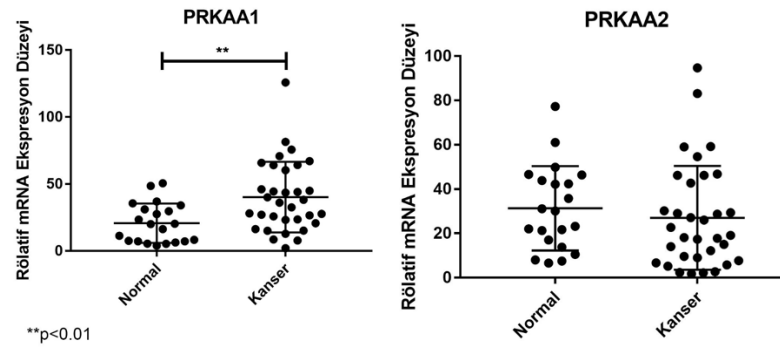
Şekil 4.1. CAMKK, PKA, LKB1 (STK11) genlerinin bazal ekspresyonlarının HeLa hücre dizisinde en yüksek düzeyde olduğunun gösterilmesi.

Toplamda 24 normal, 14 servikal intraepitelyal neoplazi (CIN)1, 22 CIN2, 40 CIN3 ve 28 kanser verisi olmak üzere toplamda 128 hasta verisi kullanılarak serviks kanser gelişim basamaklarının incelendiği bir çalışmanın verileri kullanılarak yapılan ileri analizler sonucunda serviks kanserli hastalarda PRKAA1 gen ekspresyonunun normal serviks dokusu olan ve CIN1 hastalığa sahip hastalara kıyasla, PRKAA2 gen ekspresyonunun ise normal serviks dokusuna sahip hastalara kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2).



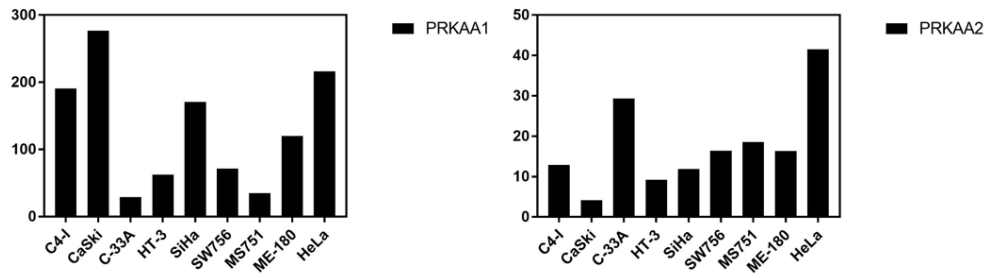
Şekil 4.2. Serviks kanserli hastalarda PRKAA1 ve PRKAA2 gen ekspresyon düzeyinin artmış olduğunun gösterilmesi.

Serviks kanseri dokusu ile normal serviks dokusunu artmış gen ekspresyonu açısından karşılaştıran bir başka çalışmada, 21 normal serviks dokusu ve 33 serviks kanseri verisi olmak üzere toplamda 54 hasta verisi kullanılarak yapılan ileri analizlerde PRKAA1 ve PRKAA2 gen ekspresyonlarının normal serviks dokusuna kıyasla serviks kanseri dokusunda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3).



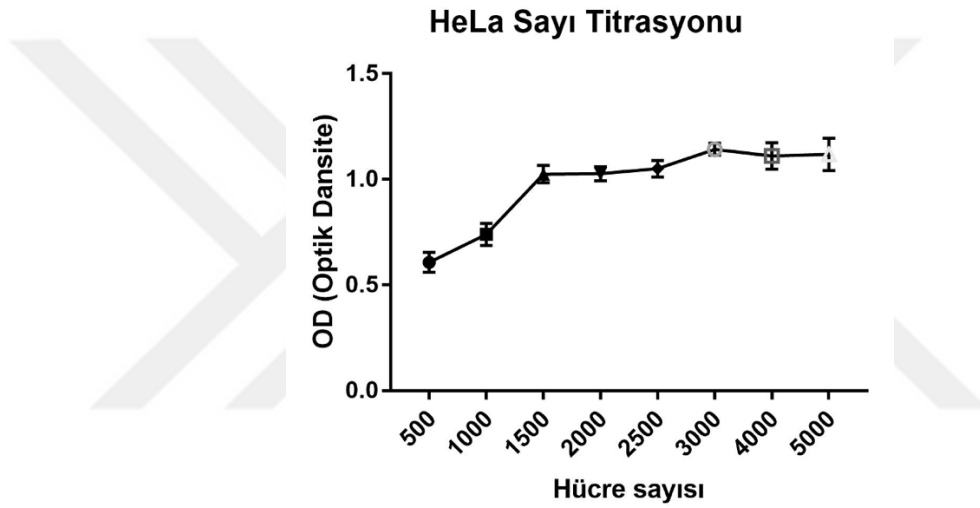
Şekil 4.3. PRKAA1 ve PRKAA2 gen ekspresyonlarının normal serviks dokusuna kıyasla serviks kanseri dokusunda daha yüksek olduğunun gösterilmesi.

Aynı çalışmada ayrıca 9 serviks kanseri gen ekspresyonları incelenmiştir. PRKAA1 düzeyi en yüksek ikinci hücre, PRKAA2 düzeyi en yüksek hücre dizisi olarak HeLa hücresi karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.4). Bu bulgular şekil 4.1’de gösterilen bulguları desteklemektedir. Bu bulgular ışığında çalışma HeLa hücre dizisinde yapılmıştır.



Şekil 4.4. HeLa hücre dizisinde PRKAA1 ve PRKAA2 gen ekspresyon düzeyinin yüksek olduğunun gösterilmesi.

4.2. Hücre Sağkalım Deneylerinde Kullanılacak Hücre Sayısının Belirlenmesi



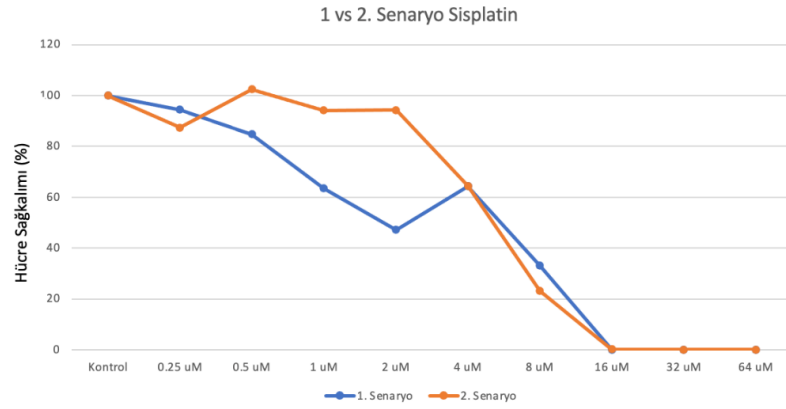
Şekil 4.5. HeLa hücre sayısı titrasyonu.

Şekil 4.5'te MTT deneyi ile 5 günlük inkübasyon sonrası hücre sayıları ile korele olarak ölçülen optik dansite oranları görülmektedir. Beş günün sonunda 3000 hücre ve üzerinde hücrelerin viabilitesinin azaldığı görülmektedir. Bu grafikte 2500 hücre sayısı kullanıldığında optik dansitenin 1'e yakın olduğu gözlenmiş olup, bu nedenle sonraki deneylerde kuyulara 2500 hücre ekilmesine karar verilmiştir.

4.3. Deneyde Kullanılacak İlaç Dozlarının MTT ile Belirlenmesi

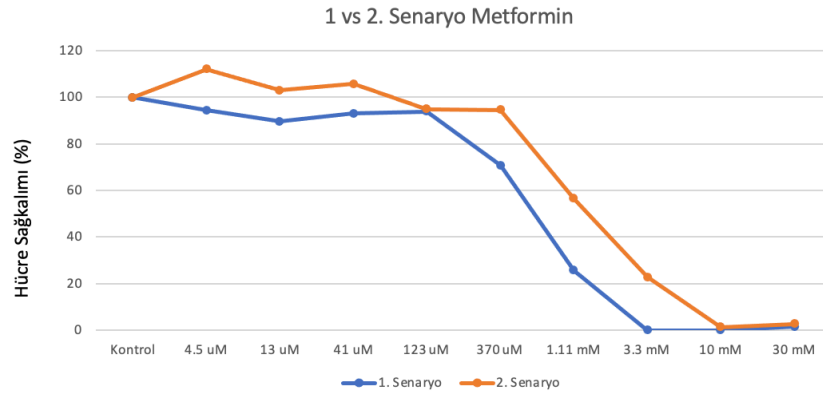
Gereç ve yöntem bölümünde belirtilen ilaç dozları yine aynı bölümde belirtilen zamanlarda uygulanarak MTT ile hücrelerin canlılık oranları incelendi. Elde edilen değerler kontrol grubunun sağkalımı kabul edilen %100'e normalize edilerek analiz edildi (Şekil 4.6-4.9). Çalışmamızda ilaçların radyoduyarlılaştırıcı etkisi araştırıldığı

için ilaçların tek başlarına uygulandıklarında toksik olmayan ve literatür ile uyumlu olduğu görülen dozlar sonraki deneylerde kullanılacak dozlar olarak belirlendi. Her iki senaryo için de toksik olmayan ilaç dozları IR ile kombinasyonda kullanılacak olan dozlar olarak belirlendi. Her iki senaryo arasındaki fark metformin, A769662 ve dorsomorfinin IR öncesi uygulanma zamanıydı. İlaçların uygulanma zamanları ile verilen ilaç dozları aynı olsa bile ilaçların uygulanma zamanlarına göre sağkalımın değiştiği gözlemlendi.



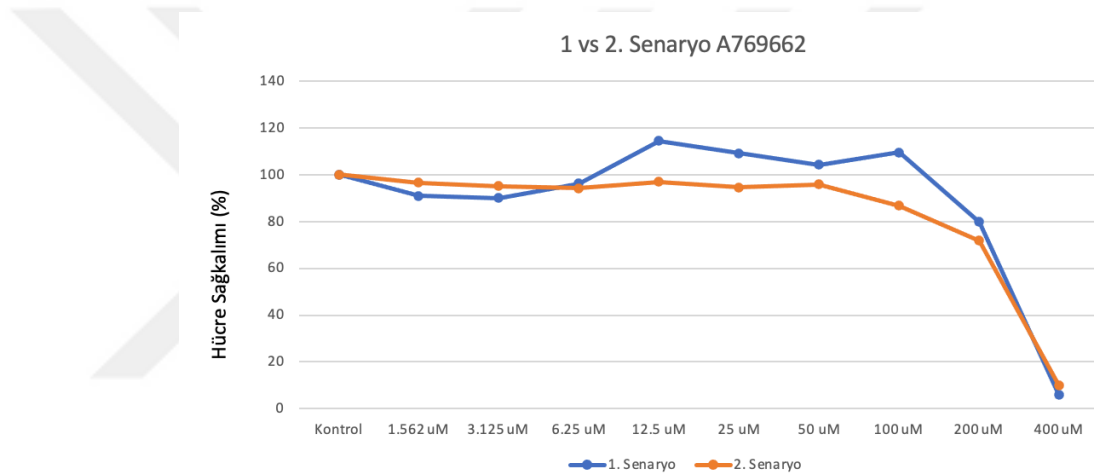
Şekil 4.6. Birinci ve ikinci senaryoda sisplatin konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.

Sisplatin için belirlenen 1 μ M ilaç dozunda sağkalım 1. senaryo için %63,5, 2. senaryo için ise %94,1 olarak saptandı ve 1 μ M sisplatin dozu sonraki deneylerde kullanılacak sisplatin dozu olarak belirlendi.



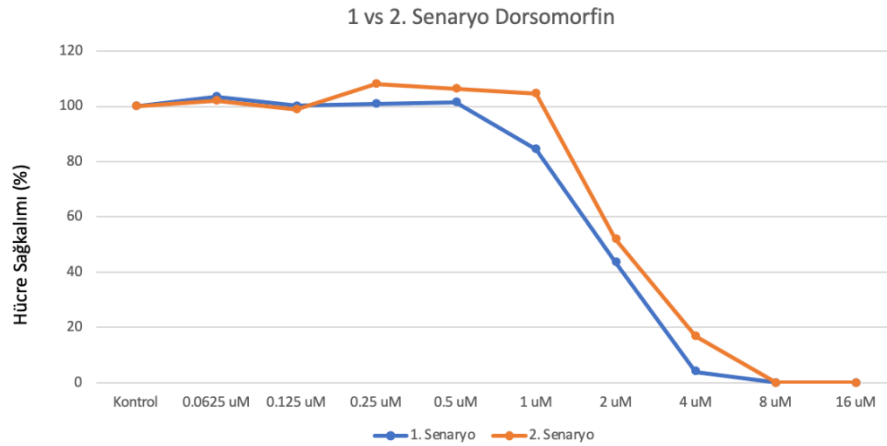
Şekil 4.7. Birinci ve ikinci senaryoda metformin konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.

Metformin için kullanılan 123 μM dozda hücre sağkalımı 1. senaryoda %93,7 iken 2. senaryoda %94,9 olarak saptandı. Bir üst konsantrasyon olan 370 μM dozda 1. senaryoda sağkalımda belirgin düşme gözlenirken (%70,8), 2. senaryoda 123 μM doza kıyasla 370 μM dozda belirgin değişiklik olmaması (%94,9) nedeniyle iki dozun arasında uygulanabilir bir doz olan 150 μM sonraki deneylerde kullanılacak doz olarak belirlendi. Ayrıca 2. doz seçeneği olarak literatürde ⁵¹ 150 μM 'den daha yüksek dozlar kullanılması sebebiyle 1 mM metformin dozu çalışmamızda toksik doz olarak gözlenmesine karşın literatür ile uyumlu olması açısından kullanılacak 2. ilaç dozu olarak belirlendi. Metforminin 1,1 mM dozu için hücre sağkalım oranı 1. senaryo için %25,5, 2. senaryo için ise %56,5 idi.



Şekil 4.8. Birinci ve ikinci senaryoda A769662 konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.

A769662 için 100 μM olarak belirlenen dozda hücre sağkalımı 1. senaryoda %109,5 iken 2. senaryoda %86,7 olarak saptandı. İkinci doz olarak belirlenen 200 μM ilaç dozunda hücre sağkalımı 1. senaryoda %79,7, 2. senaryoda ise %86,7 idi.



Şekil 4.9. Birinci ve ikinci senaryoda dorsomorfin konsantrasyonlarının hücre sağkalımı açısından karşılaştırılması.

Dorsomorfin için toksik olmayan 0,5 μ M olarak belirlenen dozda hücre sağkalımı 1. senaryoda %101,4 iken, 2. senaryoda %106,2 idi. Ayrıca deney sonuçlarımızda toksik olduğu görülmeye karşın literatürde sıklıkla kullanılan 1,5 μ M ilaç dozu 2. ilaç dozu olarak belirlendi.

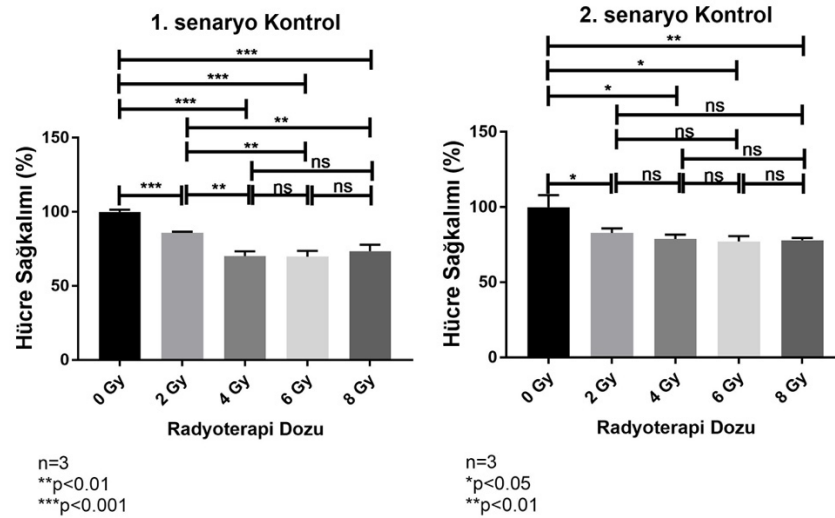
4.4. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin MTT ile İncelenmesi

Bu deneyde ilaç dozu belirlemek için yapılan deney sonucunda bir önceki bölümde belirlenen dozlar ve bunlara ek olarak 0,5 μ M sisplatin ve 0,5 μ M sisplatinin 1 mM metformin ile kombinasyonu kullanıldı. Bu ilaç kombinasyonlarının da deneye eklenmesindeki hipotez, metformin dozunun artırılarak sisplatin dozunun azaltılması ve dolayısıyla olası sisplatin toksisitesinin önlenmesiydi. Belirlenen her ilaç dozu için 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy ve 8 Gy IR dozlarında ilaçların hücre sağkalımı üzerindeki etkileri araştırıldı ve sonuçlar şekil 4.10-4.24'te sunuldu. İlaç gruplarından 1 mM metformin, 0,5 μ M sisplatin + 1 mM metformin, 1 μ M sisplatin + 1 mM metformin, 200 μ M A769662, 1 μ M sisplatin + 200 μ M A769662, 1,5 μ M dorsomorfin, 1 μ M sisplatin + 1,5 μ M dorsomorfin ve üçlü ilaç kombinasyonlarının IR dozları ile kombine edildiklerinde hücre sağkalımı üzerindeki etkileri Ek-4-10'da gösterilmiştir.

İlaç Kombinasyonları Varlığında İyonizan Radyasyonun Hücre Sağkalımı Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

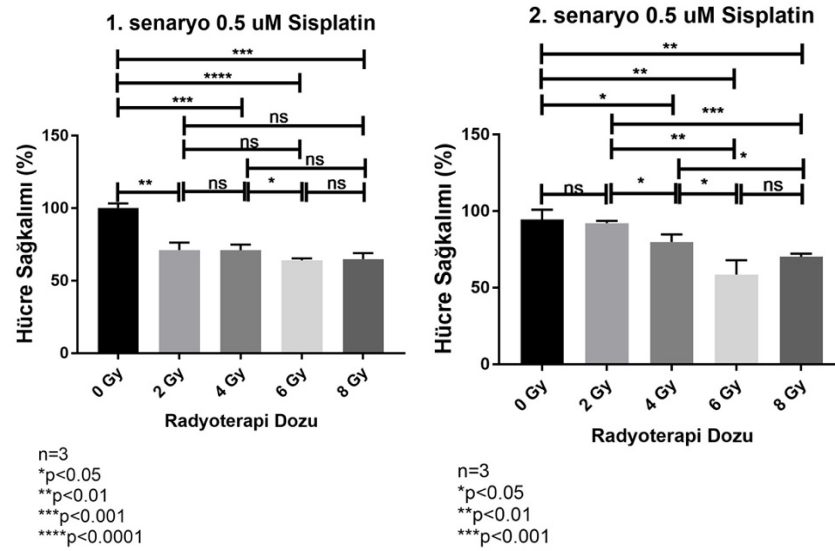
Analizler yapılırken IR veya ilaç uygulanmayan kontrol grubunun optik dansite oranı %100 sağkalım olarak kabul edildi. İlaç/IR uygulanan grupların sağkalımı kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlendi (Şekil 4.10-4.29). Bu sayede artan IR dozu ile birlikte ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki kombine etkisi incelendi.

Her iki grupta da artan IR dozu ile sağkalım düşmektedir. Her iki ilaç zamanlamasında da 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy ve 8 Gy IR uygulanan hücre dizisinin sağkalımı anlamlı olarak IR uygulanmayan gruba göre daha düşüktür (Şekil 4.10).



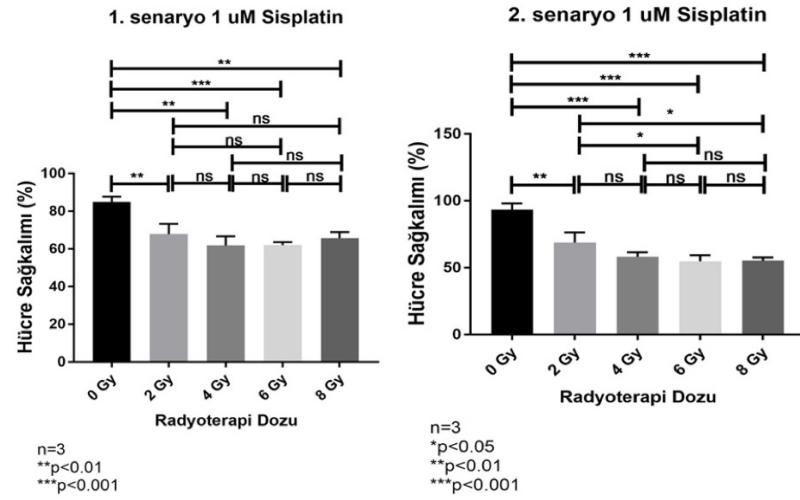
Şekil 4.10. Birinci ve ikinci senaryoda kontrol (ilaç eklenmeyen) hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

İkinci senaryoda daha belirgin olmak üzere her iki senaryoda da 0,5 µM sisplatin eklenmesi ile birlikte IR uygulandığında hücrelerin sağkalımındaki azalma belirginleşti. Birinci senaryoda ise kontrol grubundaki 2 Gy-6 Gy ve 2 Gy-8 Gy arasındaki sağkalım farkı 0,5 µM sisplatin eklendiğinde kayboldu (Şekil 4.11).



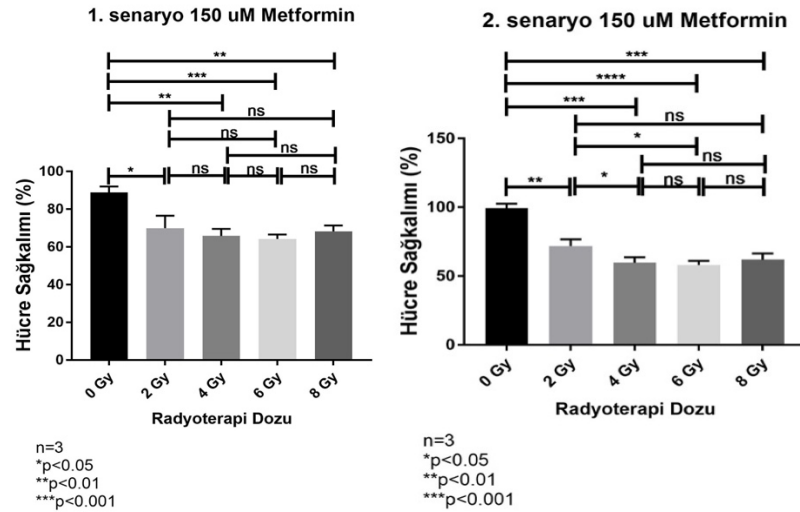
Şekil 4.11. Birinci ve ikinci senaryoda 0,5 μ M sisplatin eklenen hücre dizisinin iyonizan radyasyon dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Her iki grupta da 1 μ M sisplatin eklendiğinde 0 Gy'e kıyasla tüm iyonizan radyasyon dozlarında hücre dizisinin sağkalımı belirgin olarak daha düşük bulunmuştur ancak 0,5 μ M sisplatin eklendiğinde elde edilen sonuca benzer olarak 1. senaryoda kontrol grubundaki anlamlı sağkalım farkı bulunan 2 Gy-6 Gy ve 2 Gy-8 Gy arasında sağkalımdaki farklılık kaybolmuş, 2. senaryoda ise 2 Gy ile 6 Gy ve 8 Gy arasında anlamlı sağkalım farkı ortaya çıkmıştır. Bu bulgular ile sisplatinin her iki senaryoda da IR'un hücre üzerindeki etkinliğini arttırdığı ve 2. senaryoda 1. senaryodan daha belirgin olmak üzere sisplatinin yüksek IR dozlarında da radyoduyarlılaştırıcı etkisi göstermektedir (Şekil 4.12).



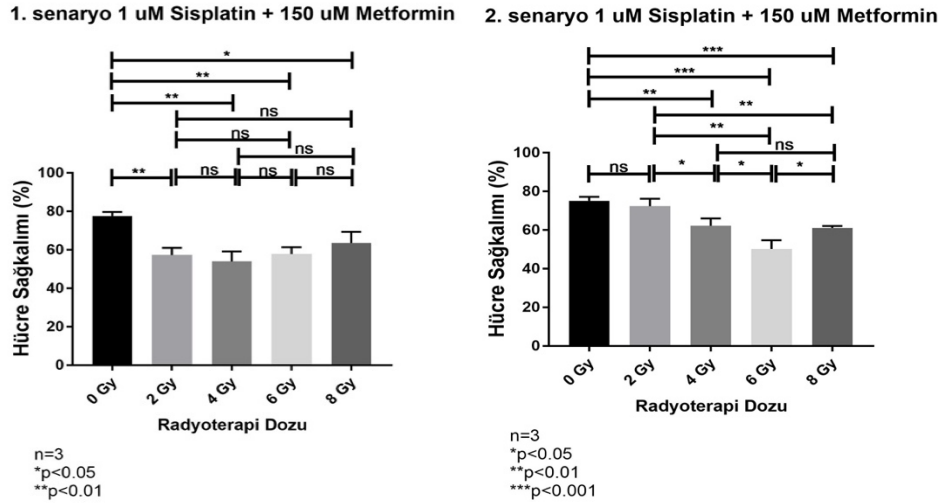
Şekil 4.12. Birinci ve ikinci senaryoda 1 µM sisplatin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Birinci senaryoda 150 µM metformin eklendiğinde kontrole kıyasla sağkalım açısından IR dozları arasındaki anlamlılık kaybolmuş olup, 2. senaryoda ise IR dozu arttıkça sağkalımdaki düşüş belirginleşmiştir. Bu da bize metforminin IR ile aynı gün uygulandığında radyosensitizan etkisinin daha belirgin olduğunu göstermiştir (Şekil 4.13).



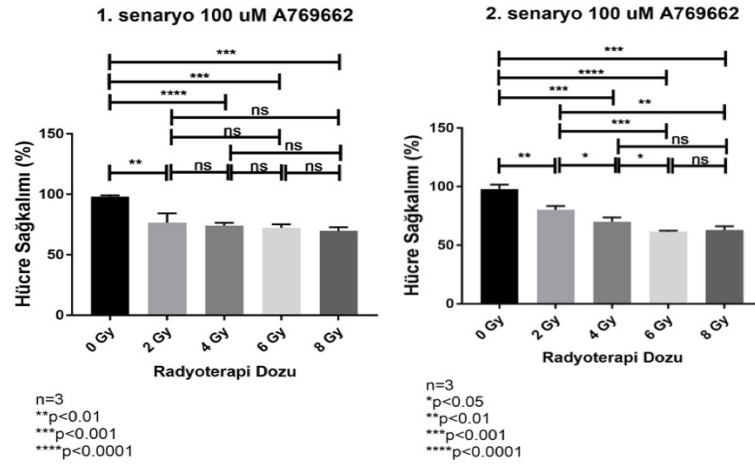
Şekil 4.13. Birinci ve ikinci senaryoda 150 µM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

İkinci senaryoda daha belirgin olmak üzere her iki senaryoda da 1 μ M sisplatine 150 μ M metformin eklendiğinde hücrelerdeki canlılığın artan IR dozları ile birlikte belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.14).



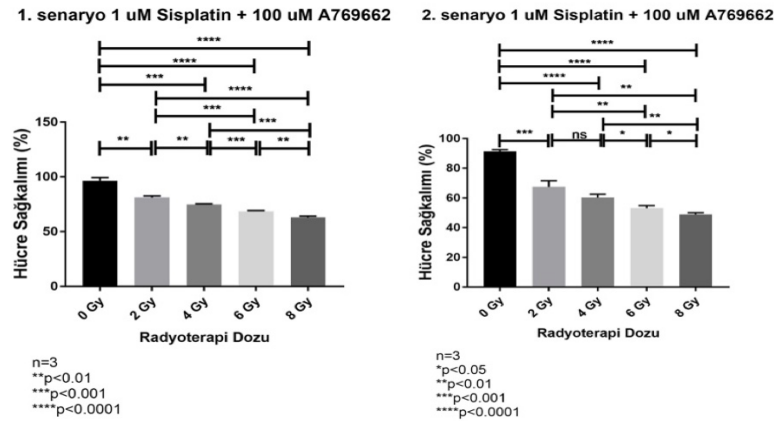
Şekil 4.14. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Her iki senaryoda da A769662 eklenmesi ile hücre sağkalımında anlamlı derecede azalma mevcuttur. Aynı ilaç ekleme senaryoları kontrol gruplarıyla kıyaslandığında bu fark özellikle 2. senaryoda daha belirgindir. İkinci senaryoda artan iyonizan radyasyon dozları ile kontrol grubunda sağkalımda belirgin azalma saptanmazken 100 μ M A769662 eklendiğinde sağkalımda belirgin düşüş gözlenmiştir. Bu bilgiler bize AMPK yolağını aktive etmenin radyoduyarlılaştırıcı rolü olduğunu göstermektedir. (Şekil 4.15).



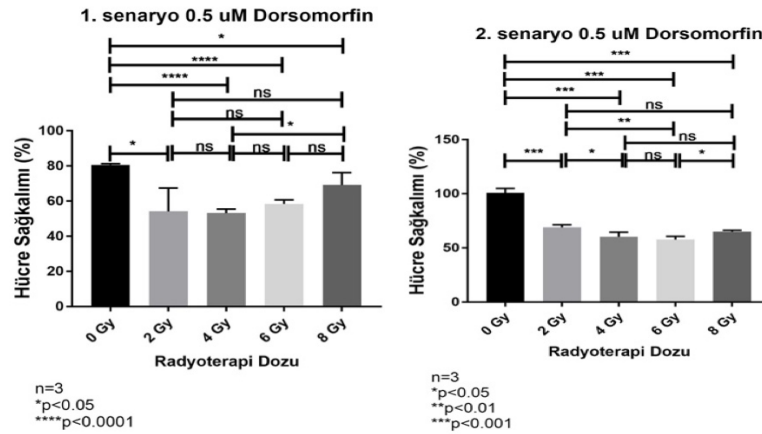
Şekil 4.15. Birinci ve ikinci senaryoda 100 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Her iki senaryoda da 1 μ M sisplatin 100 μ M A769662 eklenmesi ile kontrol grubuna kıyasla artan IR dozlarıyla sağkalımdaki azalma belirginleşmiştir. (Şekil 4.16).



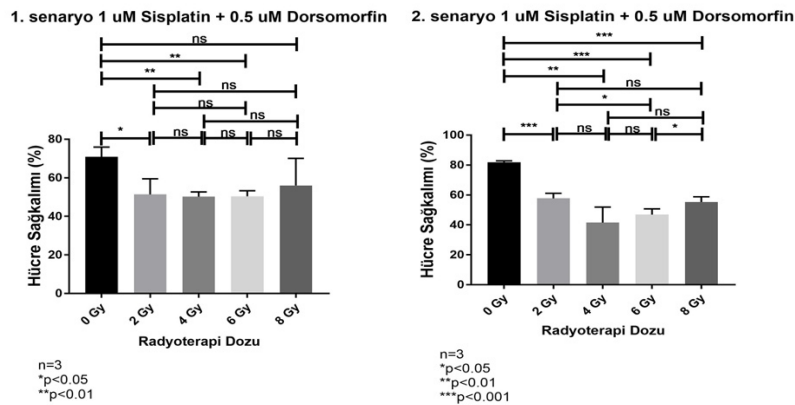
Şekil 4.16. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Birinci senaryoda 0,5 μ M dorsomorfin eklendiğinde 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy ve 8 Gy gruplarında IR uygulanmayan gruba göre sağkalımda düşüş görülmektedir. İkinci senaryoda ise artan IR dozlarıyla birlikte hücre sağkalımı azalmaktadır. Bu bulgular dorsomorfinin de tek başına radyoduyarlılaştırıcı bir ajan olduğunu göstermektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Birinci ve ikinci senaryoda 0,5 μ M dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Her iki senaryoda da 1 μ M Sisplatin'e 0,5 μ M eklenmesinin sağkalımda düşüşe neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.18).

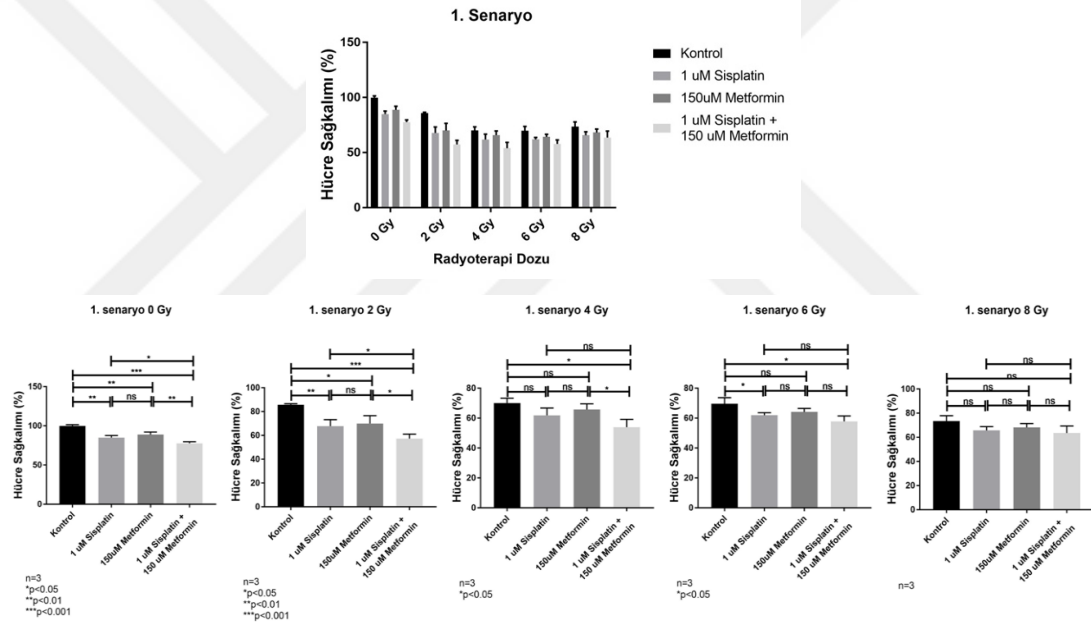


Şekil 4.18. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M Sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

İlaç Kombinasyonlarının Hücre Sağkalımı Üzerindeki Etkisinin Karşılaştırılması

İlaç kombinasyonlarının farklı IR dozlarında hücre sağkalımı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Analizlere yalnızca hücre için toksik olmayan ilaç dozları ve kombinasyonları dahil edilmiştir. Burada özellikle sisplatin ve sisplatin ile birlikte uygulanan AMPK modülasyonunun etkisi karşılaştırılmıştır.

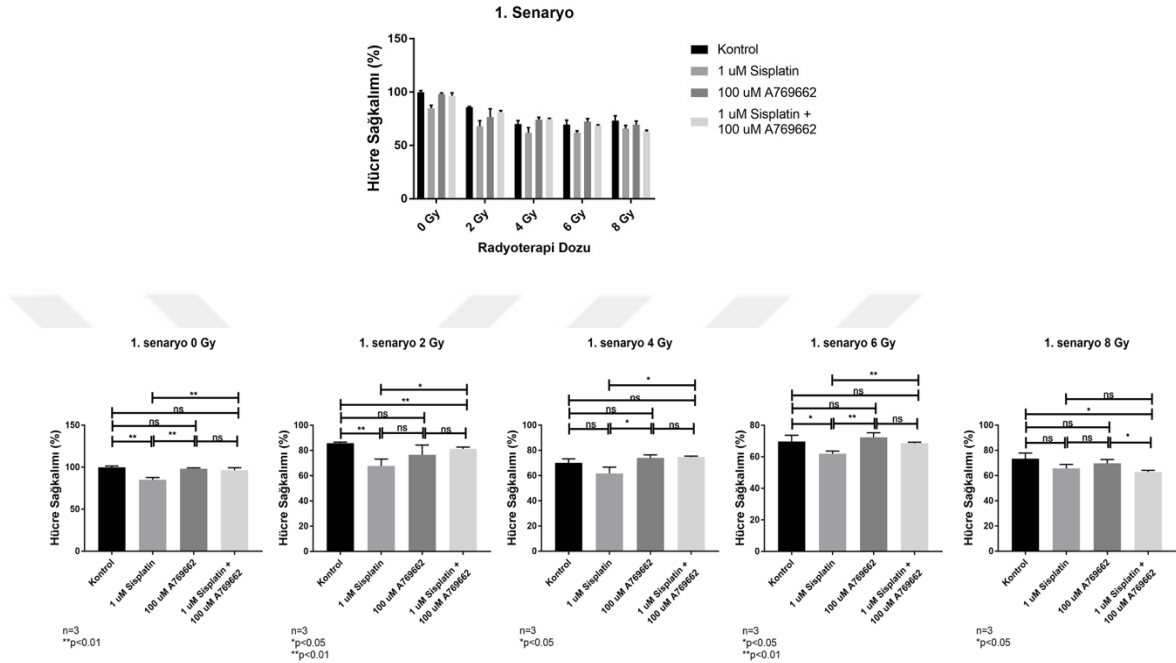
Çalışmamızda 1. senaryoda IR uygulanmayan hücre dizisinde sisplatin ve metforminin tek başlarına ve kombine edildiklerinde kontrole kıyasla sağkalımı anlamlı olarak azalttıkları ve sisplatine metformin eklenmesinin yalnızca sisplatin uygulanmasına kıyasla sağkalımı anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Düşük doz (2 Gy) IR uygulandığında da sisplatin ve metforminin ayrı ayrı veya kombine edildiklerindeki radyoduyarlılaştırıcı etkileri devam etmesine karşın IR dozu arttıkça tek başına sisplatin ya da metformin eklenmesinin radyoduyarlılaştırıcı etkisi ortadan kalkmaktadır. Yüksek doz (4 Gy ve 6 Gy) IR’da kontrol grubuna kıyasla yalnızca sisplatin ve metformin kombinasyonunun radyoduyarlılığı anlamlı olarak arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Birinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 µM sisplatin, 150 µM metformin ve 1 µM sisplatin + 150 µM meformin ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

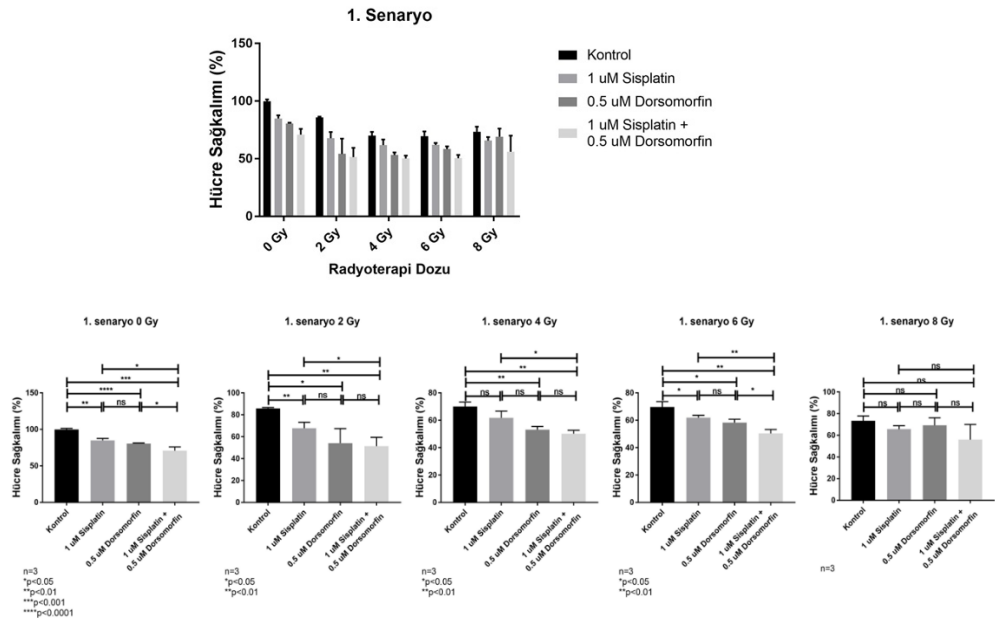
Birinci senaryoda IR uygulanmayan hücre dizisinde sisplatinin tek başına sağkalımı azaltıcı etkisi olmakla birlikte, A769662'nin tek başına hücre sağkalımını azaltıcı/arttırıcı etkisi gözlenmemiştir. Yalnız sisplatin eklendiğinde hücre sağkalımının azaldığı, yalnız A769662 ya da sisplatin ve A769662 eklendiğinde ise yalnız sisplatine kıyasla hücre sağkalımının daha fazla olduğu saptanmıştır. Düşük doz (2 Gy) IR uygulandığında bulgular benzer olmakla birlikte sisplatinin

radıoduyarlılaştırıcı etkisi belirginleşmektedir. A769662'nin 8 Gy IR dozuna kadar sisplatinin etkisini nötralize ettiği ancak 8 Gy'de kontrole kıyasla sisplatine A769662 eklenmesinin hücre sağkalımını en çok azaltan kombinasyon olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20).



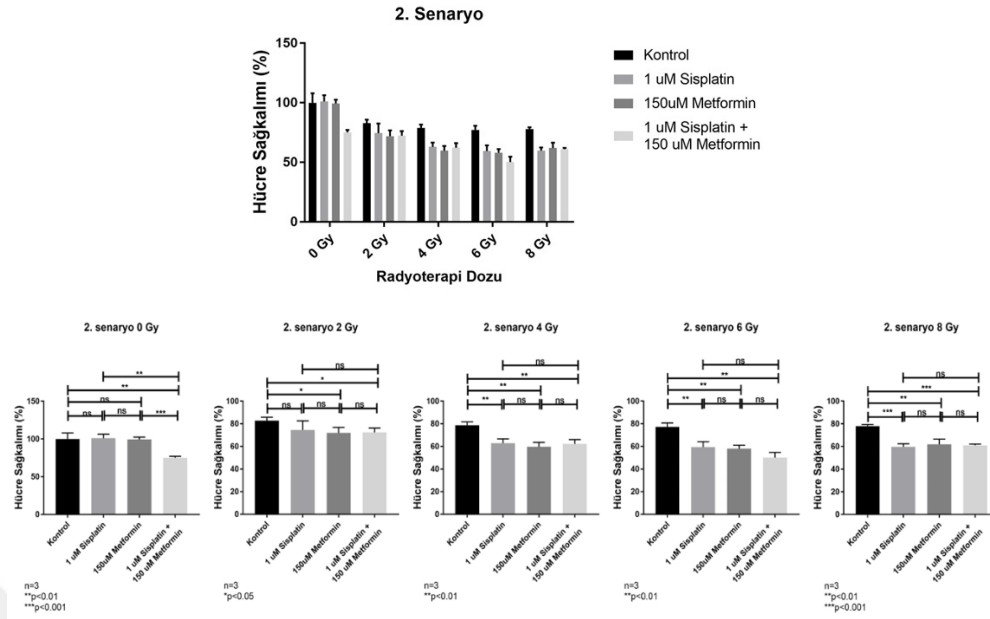
Şekil 4.20. Birinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 100 μ M A769662 ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

Birinci senaryoda IR uygulanmayan hücre dizisinde, sisplatin ve dorsomorfinin tek başlarına sağkalımı inhibe edici etkisinin yanı sıra kombine uygulandığında dorsomorfinin sisplatinin etkisini arttırdığı gözlenmiştir. Düşük doz (2 Gy) IR uygulandığında da bu etki devam eder. Artan IR dozu ile birlikte sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkinliği azalsa da dorsomorfin sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini bu dozlarda da arttırmaya devam etmektedir. Yalnızca 8 Gy IR uygulanan hücre dizisinde hiçbir ilaç kombinasyonunun sağkalımı değiştirmediği gözlenmiş olup bu bulgular 8 Gy gibi çok yüksek doz IR varlığında AMPK modülasyonunun hücre sağkalımı için önemini yitirmeye başladığını göstermektedir (Şekil 4.21).



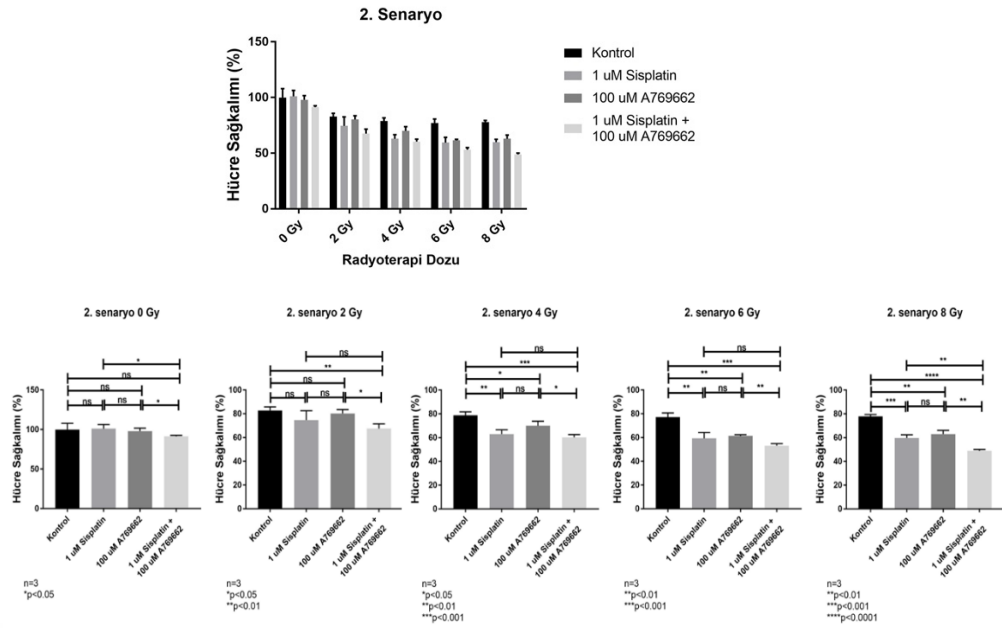
Şekil 4.21. Birinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M Sisplatin, 0.5 μ M Dorsomorfın ve 1 μ M Sisplatin + 0.5 μ M Dorsomorfın ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Çalışmamızda 2. senaryo için IR uygulanmayan hücre dizisinde sisplatin ve metforminin tek başlarına hücre sağkalımını azaltma etkisi saptanmazken eş zamanlı kombine uygulandıklarında hücre sağkalımının belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Düşük doz (2 Gy) IR uygulanan hücre dizisinde metformin tek başına radyoduyarlılaştırıcı etki gösterirken sisplatinin tek başına radyoduyarlılaştırıcı etkisi gösterilememiştir. Kontrole kıyasla sisplatine metformin eklenmesi sağkalımı anlamlı olarak azaltsa bile sisplatin ile kombine tedavi kıyaslandığında bu anlamlılık ortadan kalkmaktadır. İyonizan radyasyon dozu arttıkça sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisi ortaya çıkmakta, metforminin tek başına radyoduyarlılaştırıcı etkisi devam etmektedir. Yüksek doz iyonizan radyasyon uygulandığında sisplatin ve metforminin tek başlarına radyoduyarlılaştırıcı etkileri belirgin olmakla birlikte sisplatine metformin eklenmesinin sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini arttırmadığı gözlenmektedir (Şekil 4.22).



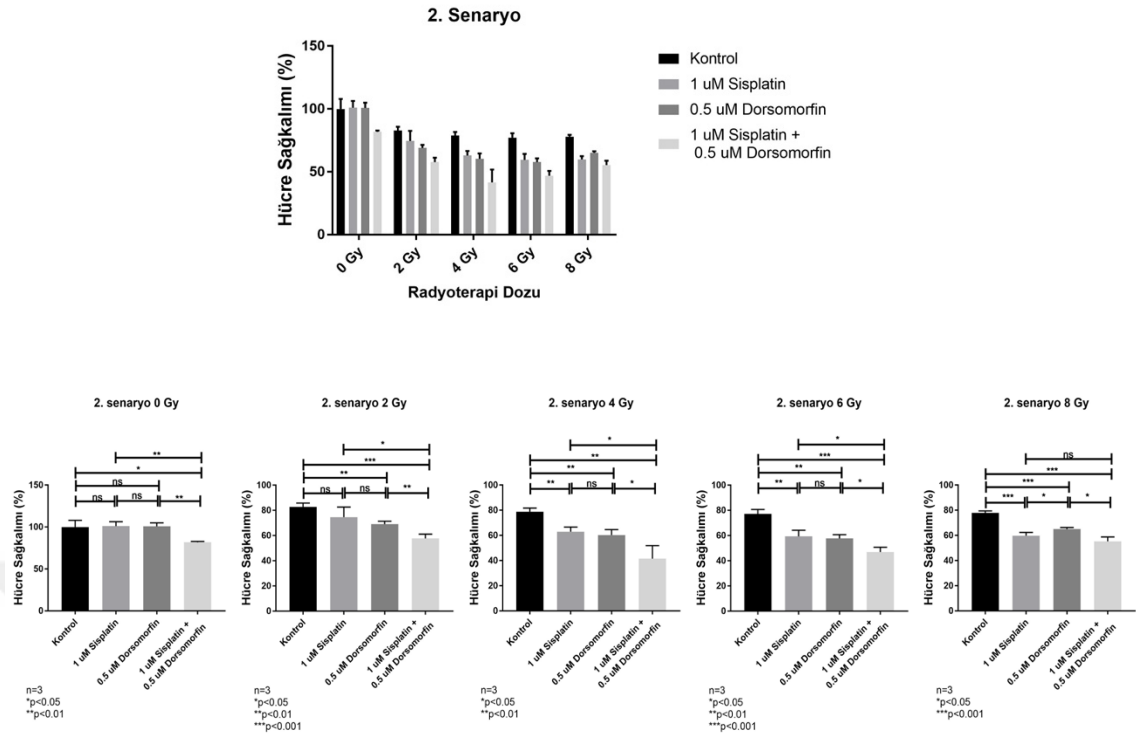
Şekil 4.22. İkinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μM sisplatin, 150 μM metformin ve 1 μM sisplatin + 150 μM meformin ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

İkinci senaryoda IR uygulanmayan hücre dizisinde sisplatin ve A769662'nin tek başlarına eklendiklerinde hücre sağkalımını inhibe edici etkisi gözlenmemiştir. Ancak sisplatine A769662 eklendiğinde sinerjistik etki gözlenmiş ve yalnız sisplatin ya da A769662 uygulanan hücre dizisine kıyasla hücre sağkalımı anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgu birinci senaryodakinin tersine A769662'nin hücreye eklenme zamanı ile hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin değişebileceğini göstermektedir. IR uygulanması ve dozun artırılması ile A769662'nin hücre sağkalımını inhibe edici etkisi belirginleşirken sisplatin ile kombine kullanımında 0 Gy'de yarattığı sinerjistik etki ortadan kalkmaktadır. Yalnızca 8 Gy uygulanan hücre dizisinde A769662'nin sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini sinerjistik olarak arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil.4.23. İkinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 100 μ M A769662 ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

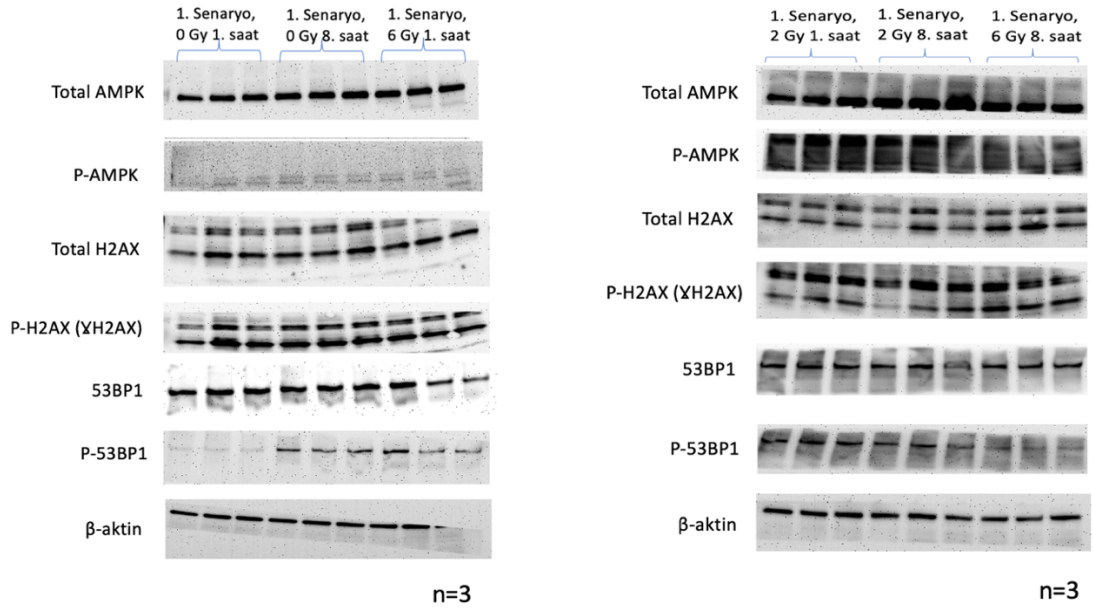
İkinci senaryoda IR uygulanmayan hücre dizisinde tek başına sisplatin veya dorsomorfin eklenmesinin hücre sağkalımını değiştirmedeği ancak sisplatine eklenen dorsomorfinin sinerjistik etki ile anlamlı olarak hücre sağkalımını ilaç uygulanmayan veya yalnızca sisplatin uygulanan hücre dizisine kıyasla inhibe ettiği gözlenmiştir. Düşük doz IR uygulandığında da sinerjistik etkinin devam ettiği, IR dozu arttıkça sisplatin ve dorsomorfinin ayrı ayrı radyoduyarlılaştırıcı etkisinin arttığı, dorsomorfinin sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkinliğini arttırmaya devam ettiği ancak sinerjistik olan bu etkinin artan IR dozu ile birlikte azalmaya başladığı görülmektedir (Şekil 4.24).



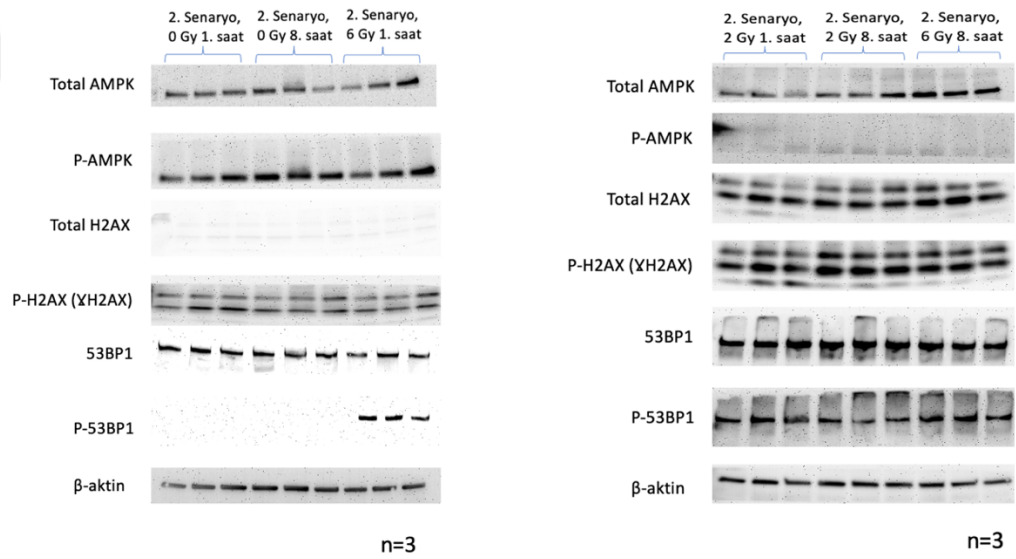
Şekil.4.24. İkinci senaryo için IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ilaç kombinasyonlarının hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

4.5. İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Zamana Bağlı Değişiminin İncelenmesi

Literatürde hücre hasar belirteçlerinin değerlendirilme zamanları ile ilgili kesin ve net bir sonuç bulunmamaktadır. Bu nedenle ön deney olarak her iki senaryoda da IR sonrası 1. ve 8. saatlerdeki protein analizleri yapılmıştır. Ön deney ile moleküler ağırlıkları birbirinden farklı olan proteinlerin her birinin 7 dakikada “mixed” programında membrana geçmesi hedeflenmiş ve hedefe ulaşılmıştır. Ön deneyde ilaç kombinasyonlarına göre protein ekspresyonlarının incelenmesi amaçlanmadığı için önceki deneylerde uygulanan birinci ve ikinci senaryodaki ilaç ekleme zamanlarında deneyi bire bir uygulayabilmek adına besiyeri eklenmiş ve önceki deneylerde 1. ve 2. senaryo için belirlenen IR uygulama zamanlarında hücrelere IR uygulanmıştır. Proteinlerin 1. ve 2. senaryo için IR dozu ve radyasyon sonrası protein değerlendirme saatlerine göre ekspresyonları aşağıda gösterilmiştir. Her protein 3 kez tekrar edilecek şekilde değerlendirilmiştir.



Şekil 4.25. Birinci senaryo için 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR uygulanan hücre dizilerinin iyonizan radyasyon sonrası 1. ve 8. saatteki hücre hasar protein ekspresyon görüntüleri.



Şekil 4.26. İkinci senaryo için 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR uygulanan hücre dizilerinin IR sonrası 1. ve 8. saatteki protein ekspresyon görüntüleri.

Tüm proteinlerin hem aktif hem de total formları incelendi ve sonraki deneyde aktif proteinler total formlarına oranlanarak normalize edildi. Ön deney sonucunda 53BP1 proteininin aktif formu olan p-53BP1'in her iki senaryoda da 1. saatte daha hızlı artış gösterdiği, 8. saatte ise bu farklılığın azaldığı gözlemlendi. Özellikle 2.

senaryoda 6 Gy grubunda 0 Gy grubuna kıyasla p-53BP1 protein düzeyinin belirgin olarak arttığı gözlemlendi.

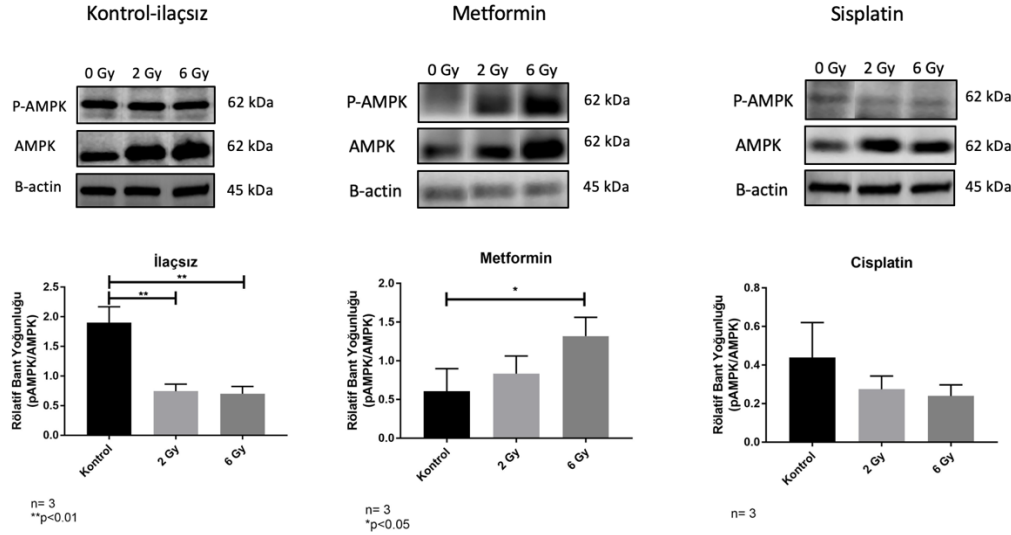
H2AX proteininin aktif formu olan p-H2AX (γ H2AX) protein düzeyinde her iki senaryoda da 1. ve 8. saat arasında belirgin farklılık gözlenmezken AMPK ve p-AMPK protein düzeyleri 8. saatte daha yüksek olarak gözlemlendi. AMPK ve p-AMPK protein düzeyini belirleyecek bant görüntülerinin net olarak elde edilememesi nedeniyle 3 dakika olan ECL maruziyet süresi sonraki deneyde 5 dakikaya çıkarıldı. Daha önce yapılan MTT sonuçları ve klinik uygulamalar göz önüne alındığında sonraki deneye 2. ilaç uygulama senaryosu ile devam edildi.

4.6. İyonizan Radyasyon ve İlaç Kombinasyonlarının Hücre Hasar Belirteçleri Üzerindeki Değişiminin İncelenmesi

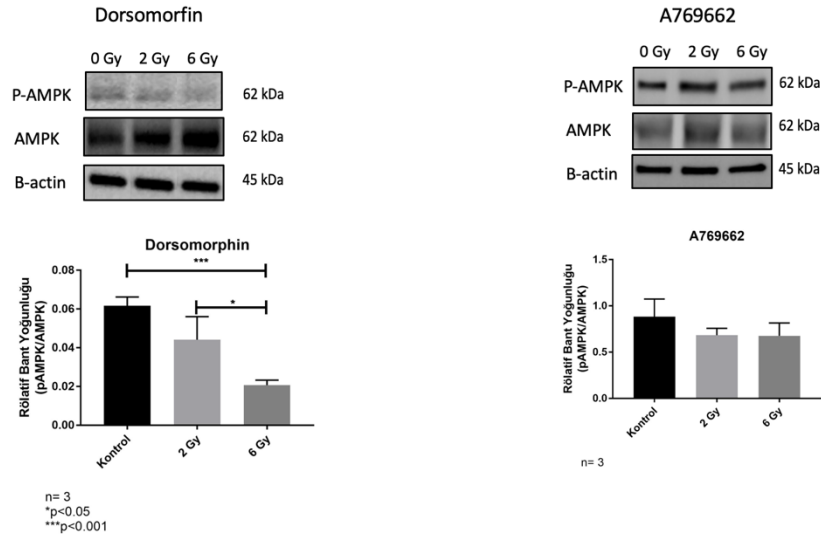
AMPK, H2AX, 53BP1 ve ERCC1 proteinlerinin total ve aktif formları olan sırasıyla p-AMPK, p-H2AX (γ H2AX), p-53BP1 ve ERCC1 protein düzeylerinin ilaç kombinasyonları ve 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy iyonizan radyasyon dozları ile değişimi Şekil 4.27-4.38’de sunulmuştur.

Kontrol grubunda IR uygulanması ile grafikte p-AMPK/AMPK düzeyinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmektedir ancak bant görüntüleri p-AMPK ve total AMPK için ayrı ayrı analiz edildiğinde p-AMPK düzeyinde anlamlı değişim izlenmezken ($p>0.05$) total AMPK ekspresyonunun kontrole kıyasla 2 Gy ve 6 Gy’de anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$) gözlenmektedir. Bu bulgu IR’un hücre içerisinde AMPK protein transkripsiyonunu arttırdığını göstermektedir. Ayrıca 1 μ M sisplatin varlığında artan IR dozu ile birlikte p-AMPK/AMPK düzeyinde düşme eğilimi gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubunun yanı sıra ayrıca 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 ve 0,5 μ M dorsomorfin varlığında da yüksek doz IR ile birlikte p-AMPK düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. 100 μ M A769662, 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin varlığında ise artan IR dozları ile p-AMPK düzeyinin anlamlı ölçüde değişmediği görülmüştür. Yalnızca 150 μ M metformin varlığında yüksek doz IR uygulanması ile birlikte hem p-AMPK hem de total AMPK düzeyinin belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde sisplatine metformin eklenen grupta da metforminden

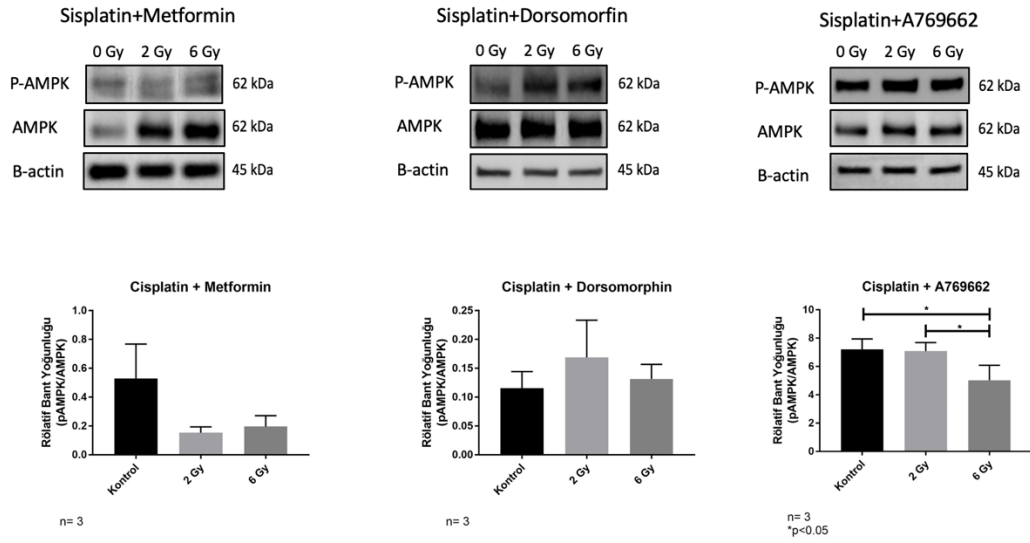
kaynaklı iyonizan radyasyon ile birlikte AMPK protein transkripsiyonunun arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.27-4.29).



Şekil. 4.27. Kontrol, 150 µM metformin ve 1 µM sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-AMPK/AMPK protein düzeyi üzerine etkisi.

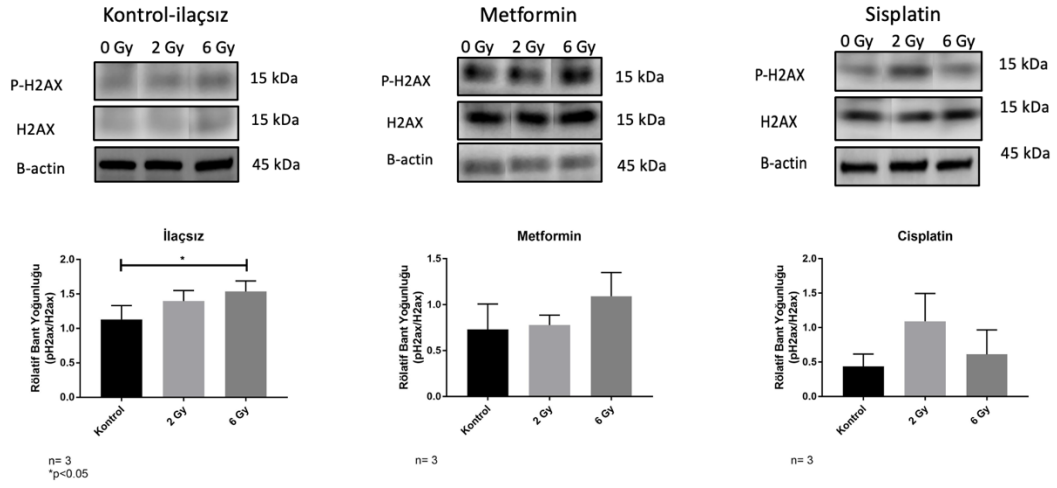


Şekil.4.28. 0,5 µM dorsomorfin ve 100 µM A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-AMPK/AMPK protein düzeyi üzerine etkisi.

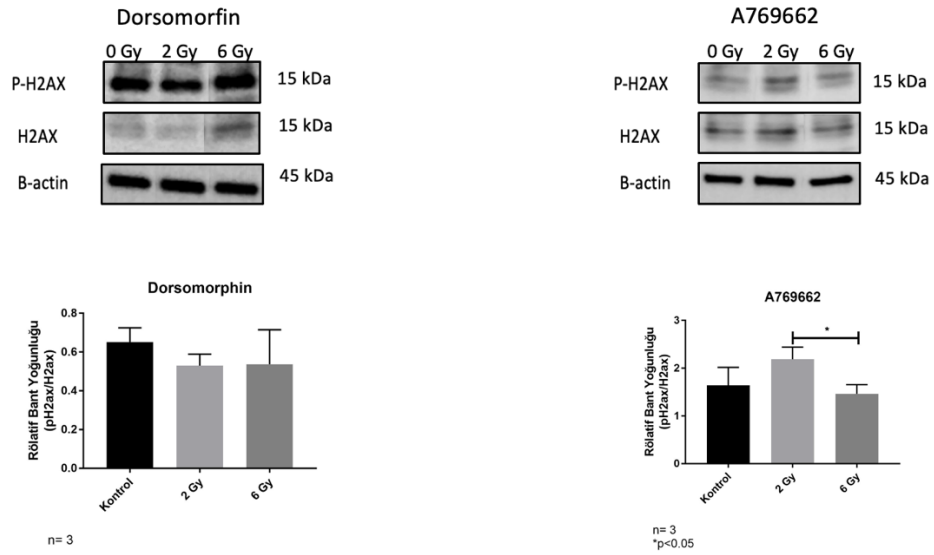


Şekil 4.29. 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-AMPK/AMPK protein düzeyi üzerine etkisi.

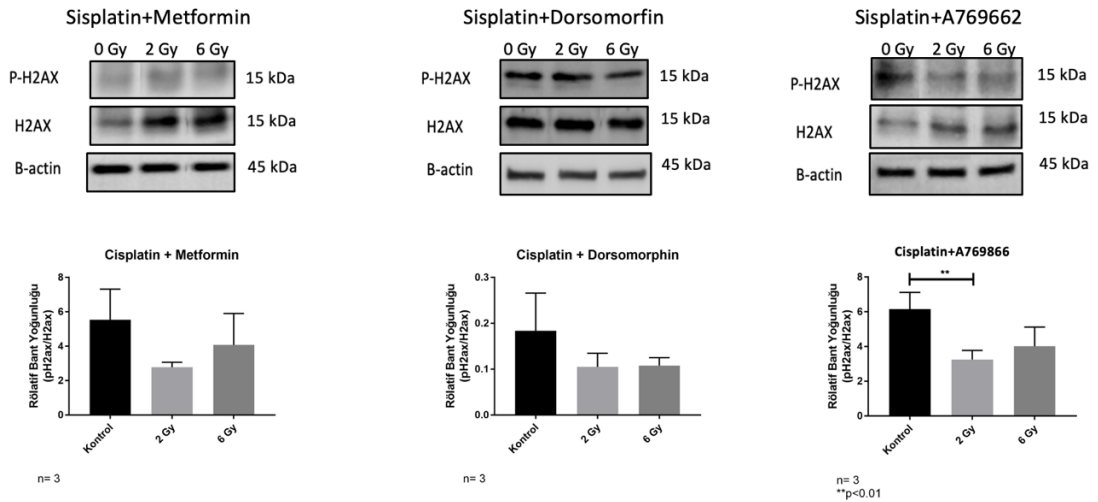
Aktif formu p-H2AX (γ H2AX) olan hücre hasar belirteç proteininde kontrol grubunda düşük doz (2 Gy) IR ile anlamlı artış gözlenmezken yüksek doz (6 Gy) IR ile artış gözlenmiştir. 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin, 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin varlığında hiçbir IR dozu ile hücre hasar protein düzeyi anlamlı farklılık göstermemiştir. 100 μ M A769662 varlığında yüksek doz IR'da düşük doza kıyasla, 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 varlığında ise kontrole kıyasla 2 Gy uygulanan hücre dizisinde p-H2AX düzeyinde anlamlı düzeyde azalma görülmektedir (Şekil 4.30-32).



Şekil 4.30. Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-H2AX/H2AX protein düzeyi üzerine etkisi.

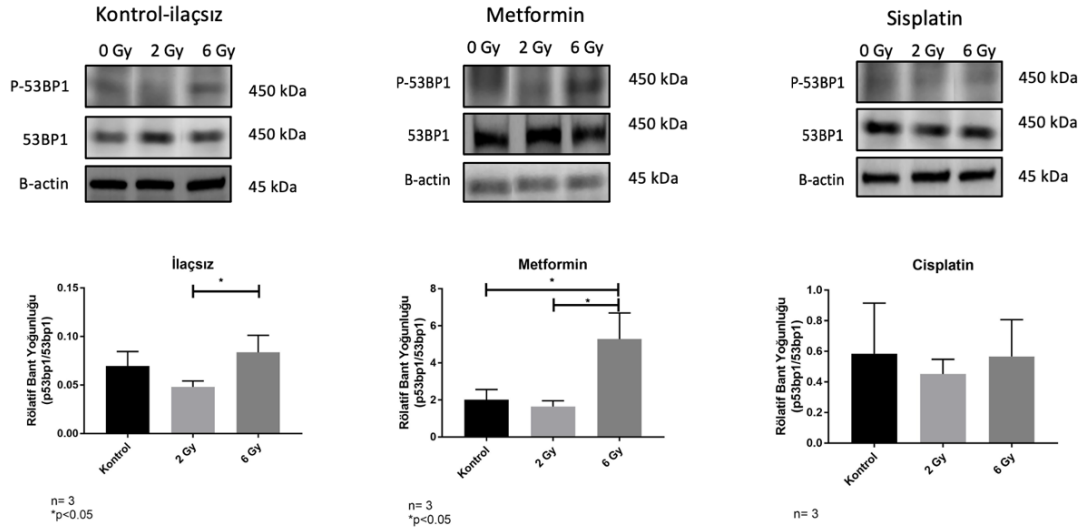


Şekil 4.31. 0,5 μ M dorsomorfin ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-H2AX/H2AX protein düzeyi üzerine etkisi.

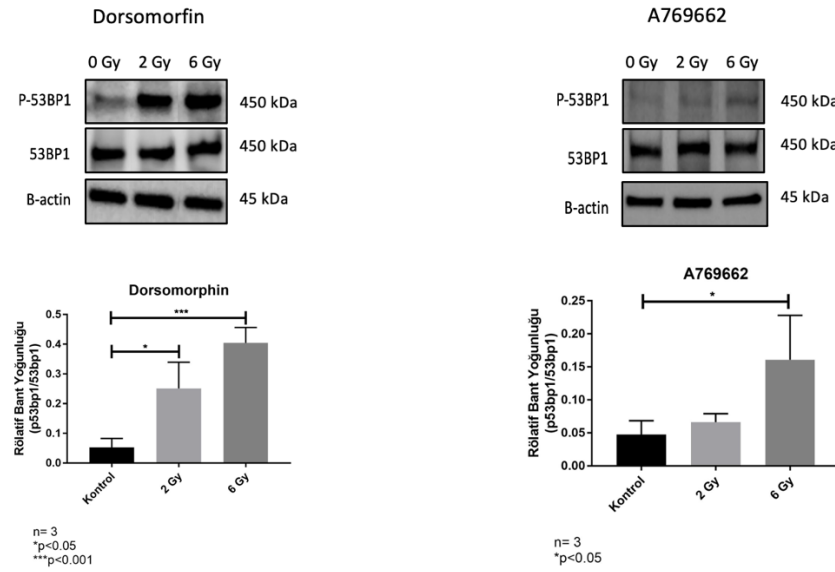


Şekil 4.32. 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-H2AX/H2AX protein düzeyi üzerine etkisi.

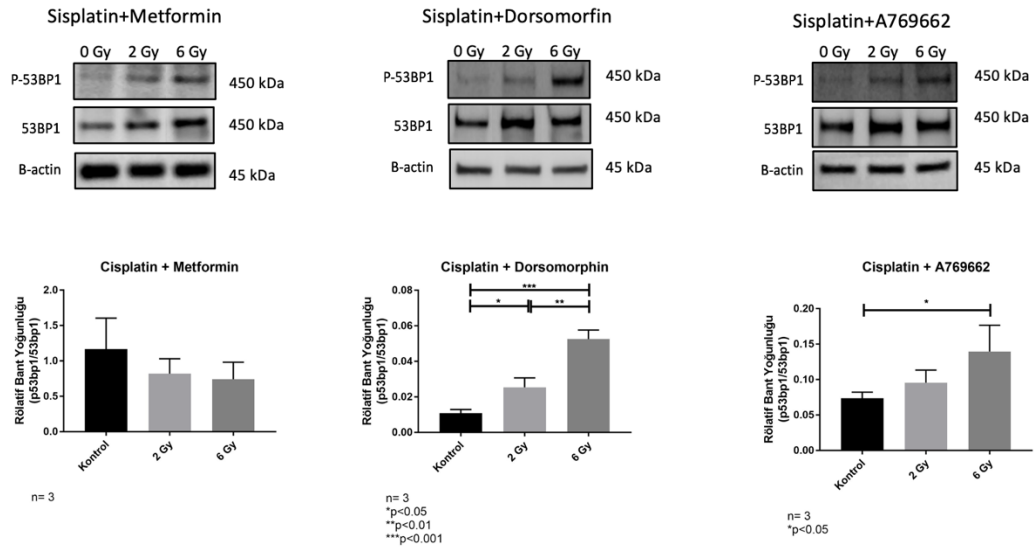
Kontrol grubunda yüksek doz IR'da (6 Gy) hücre hasar tamirini indükleyen p-53BP1 protein düzeyi anlamlı olarak artmıştır. 1 μ M sisplatin ve 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin eklenen grupta p-53BP1 protein düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, 150 μ M metformin, 0,5 μ M dorsomorfin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin, 100 μ M A769662 ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 varlığında IR'un 53BP1 aktivasyonu belirginleşmektedir. Özellikle dorsomorfin varlığında düşük doz (2 Gy) IR uygulandığında da hücrelerde hasar tamirinin uyarıldığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.33-35).



Şekil 4.33. Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-53BP1/53BP1 protein düzeyi üzerine etkisi.

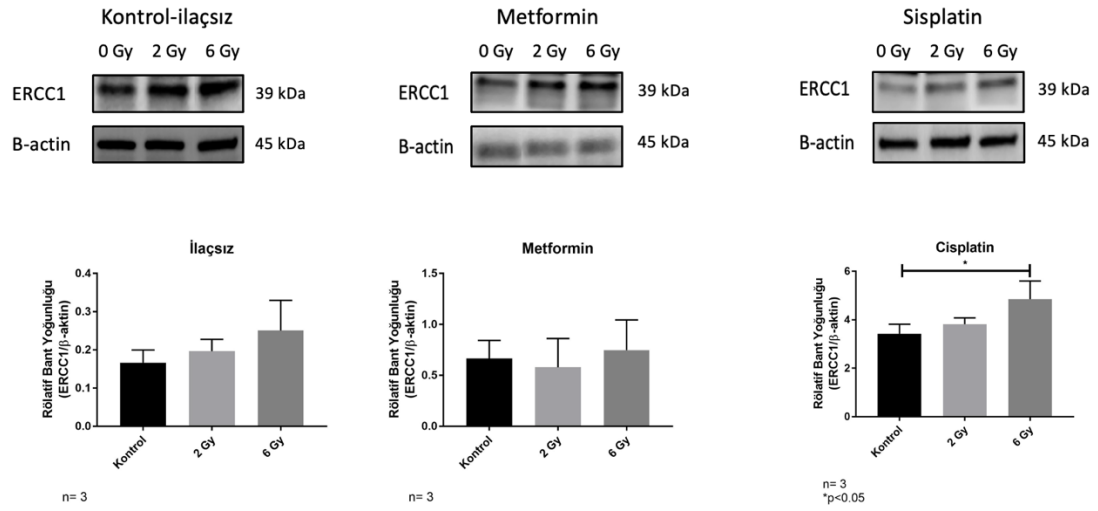


Şekil 4.34. 0,5 μ M dorsomorphin ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-53BP1/53BP1 protein düzeyi üzerine etkisi.

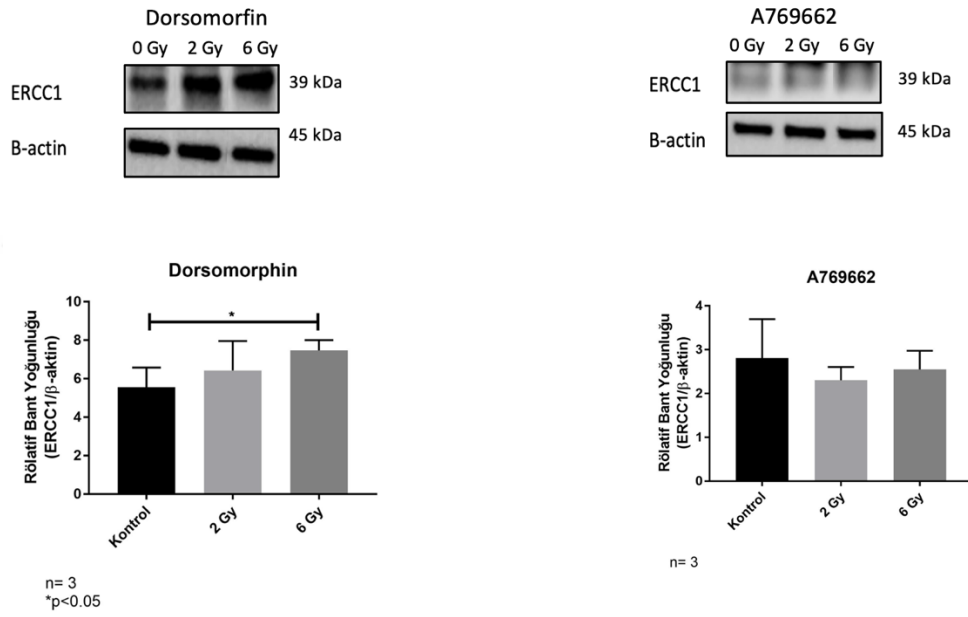


Şekil 4.35. 1 µM sisplatin + 150 µM metformin, 1 µM sisplatin + 0,5 µM dorsomorfin ve 1 µM sisplatin + 100 µM A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının p-53BP1/53BP1 protein düzeyi üzerine etkisi.

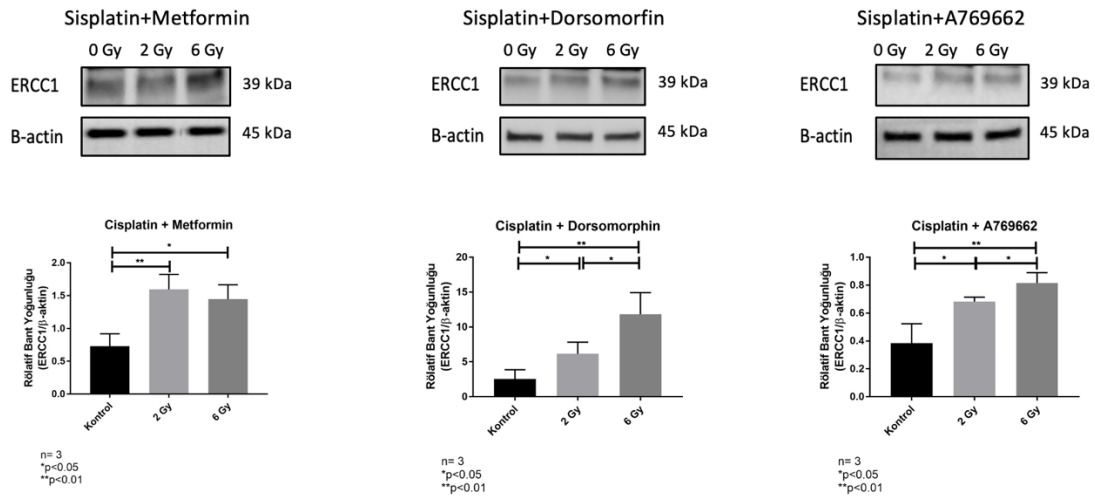
NET yolağında görev alan ERCC1 protein düzeyinde kontrol grubunda, yalnızca 150 µM Metformin ve yalnızca 100 µM A769662 eklenen grupta IR uygulanmasıyla birlikte anlamlı farklılık saptanmamaktadır. 1 µM Sisplatin ve 0,5 µM Dorsomorfin varlığında yüksek doz (6 Gy) IR ile ERCC1 protein düzeyinin anlamlı olarak arttığı görülmektedir. Tek başlarına ERCC1 protein düzeyinde anlamlı artışa neden olmasa da 1 µM sisplatine 150 µM metformin veya 100 µM A769662 eklenmesi ile birlikte düşük doz (2 Gy) IR ile de ERCC1 protein düzeyinde artış gözlenmektedir. Bu bulgular metformin ve A769662'nin sisplatinin nükleotid eksizyon tamir yolağını indükleyici etkisini arttırdığını göstermektedir. Yalnızca 0,5 µM dorsomorfin varlığında ise 6 Gy IR dozunda ERCC1 protein düzeyinin arttığı gözlenmekle birlikte 1 µM sisplatin'e 0,5 µM dorsomorfin eklendiğinde hem düşük hem de yüksek doz IR'da ERCC1 protein düzeyi artmaktadır (Şekil 4.36-38).



Şekil 4.36. Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının ERCC1 protein düzeyi üzerine etkisi.



Şekil 4.37. 0,5 μ M dorsomorphin ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının ERCC1 protein düzeyi üzerine etkisi.

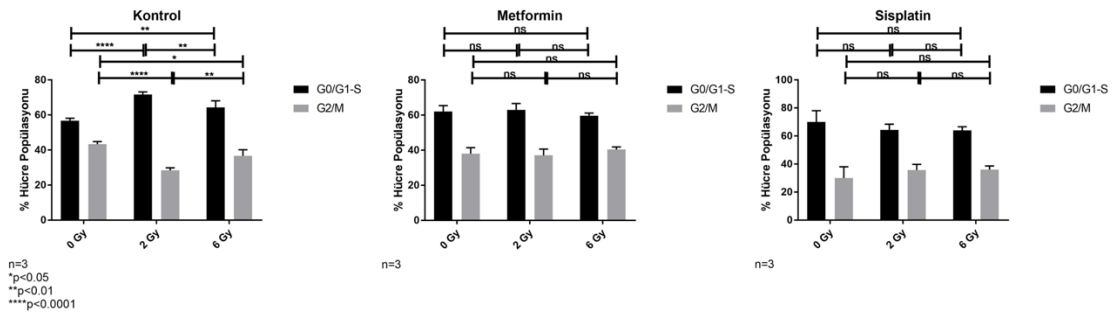


Şekil 4.38. 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M Sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarının ERCC1 protein düzeyi üzerine etkisi.

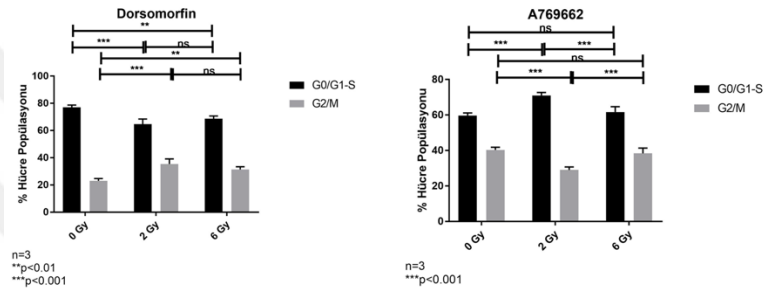
4.7. İyonizan Radyasyon ile İlaç Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Flow Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Hücre dizisine bir önceki protein analizi deneyinde kullanılan 2. senaryodaki ilaç kombinasyonları ve IR dozu olarak 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy uygulandıktan sonra IR ile ilaç kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Şekil 4.39 -4.41’de ilaç varlığında/yokluğunda artan IR dozu ile birlikte G1/S ve G2/M fazındaki değişikliklerin analiz sonuçları sunulmuştur.

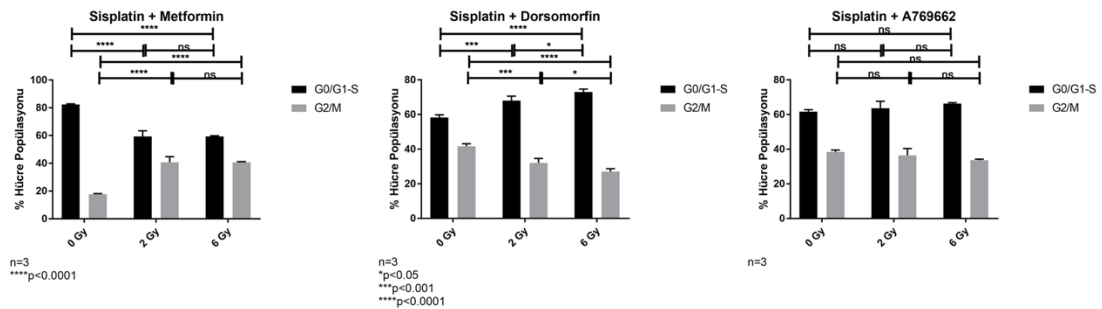
Kontrol grubunda, A769662 ve sisplatine dorsomorfin eklenen hücre dizisinde artan IR dozu ile birlikte G2/M fazında hücre akümüülasyonunda azalma meydana gelmiştir. Yalnızca metformin, sisplatin eklenen ve sisplatine A769662 eklenen hücre dizisinde IR dozları arasındaki G2/M fazındaki hücre oranında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Buna karşılık, sisplatin + metformin kombinasyonu veya yalnızca dorsomorfin varlığında artan IR dozu ile birlikte G2/M fazında duraklayan hücre oranı da artmaktadır.



Şekil 4.39. Kontrol, 150 μ M metformin ve 1 μ M Sisplatin eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarında G2/M fazında hücre siklus duraklamasının karşılaştırılması.



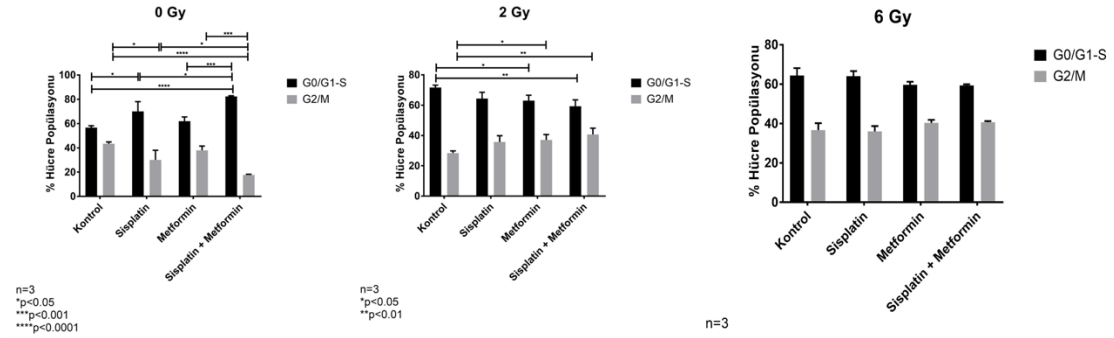
Şekil 4.40. 0,5 μ M dorsomorfin ve 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarında G2/M fazında hücre siklus duraklamasının karşılaştırılması.



Şekil 4.41. 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin, 1 μ M sisplatin + 0,5 μ M dorsomorfin ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 eklenen hücre dizilerinde 0 Gy, 2 Gy ve 6 Gy IR dozlarında G2/M fazında hücre siklus duraklamasının karşılaştırılması.

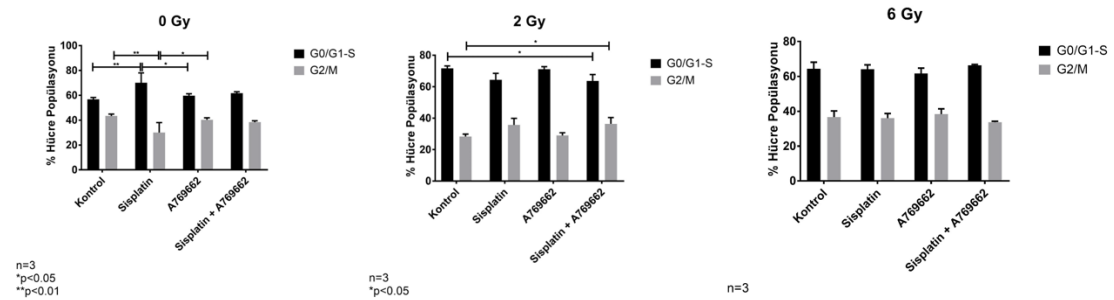
IR dozlarına göre ilaç kombinasyonlarının hücre siklusu duraklamasına olan etkisi şekil 4.42-4.44'te incelenmiştir. IR uygulanmayan grupta tek başına sisplatin ve sisplatine metformin eklenmesinin G2/M fazında hücre duraklamasını azalttığı görülmektedir. Buna karşılık 2 Gy IR dozunda yalnızca sisplatin eklenmesi ile G2/M

fazındaki hücre popülasyonu artmakta ancak anlamlılığa ulaşmamaktadır ve yalnızca metformin veya sisplatin + metformin kombinasyonunda G2/M fazında duraklayan hücre oranı anlamlı olarak artmaktadır. Bu etki 6 Gy IR dozunda görülmemektedir.



Şekil 4.42. IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 150 μ M metformin ve 1 μ M sisplatin + 150 μ M meformin ilaç kombinasyonlarının hücre siklus duraklaması üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

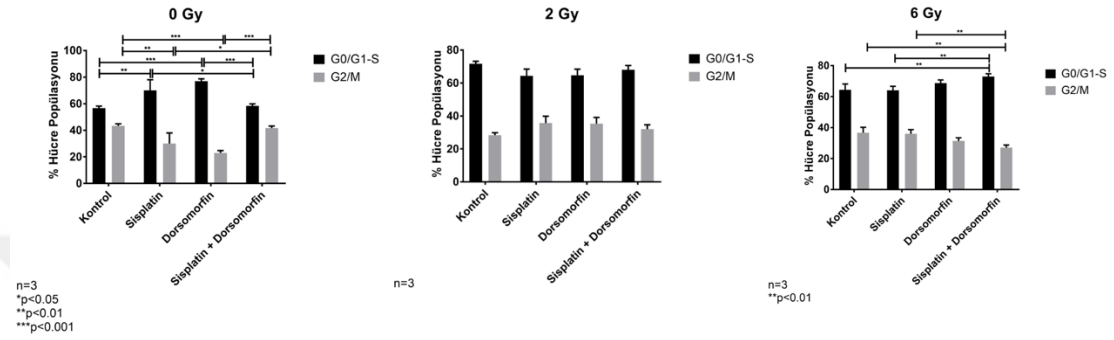
IR uygulanmayan hücre dizisinde yalnızca sisplatin eklenmesi ilaç uygulanmayan gruba kıyasla G2/M fazındaki hücre duraklamasını azaltırken, yalnızca A769662 eklenmesi ise yalnızca sisplatin eklenen gruba kıyasla G2/M fazındaki hücre duraklamasını arttırmaktadır. Düşük doz IR uygulandığında da sisplatine A769772 eklenmesinin G2/M fazında duraklayan hücre oranını arttırdığı görülmekte ancak 6 Gy’de bu etki ortadan kalkmaktadır.



Şekil 4.43. IR dozlarına göre kontrol, 1 μ M sisplatin, 100 μ M A769662 ve 1 μ M sisplatin + 100 μ M A769662 ilaç kombinasyonlarının hücre siklus duraklaması üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

IR uygulanmayan hücre dizisinde yalnızca sisplatin ve yalnızca dorsiormorfin uygulandığında G2/M fazında duraklayan hücre oranı azalmakta ancak sisplatine

dorsomorfine eklendiğinde yalnızca sispaltin ve dorsomorfine kıyasla G2/M fazındaki hücre popülasyonu artmaktadır. İlaç uygulanmayan hücreler ile karşılaştırıldığında ise fark saptanmamıştır. Düşük doz IR'da hiçbir ilaç kombinasyonu arasında fark saptanmazken, 6 Gy IR dozunda sispaltine dorsomorfine eklenmesi ile G2/M fazındaki hücre oranı azalmıştır.



Şekil 4.44. IR dozlarına göre kontrol, 1 µM sispaltin, 0,5 µM dorsomorfine ve 1 µM sispaltin + 0,5 µM dorsomorfine ilaç kombinasyonlarının hücre siklus duraklaması üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, literatürde serviks kanserlerinde görülen gen ekspresyonlarının analiz edildiği veri tabanları kullanılarak biyoenformatik ileri analizler yapılmış ve AMPK proteinini kodlayan PRKAA1 ve PRKAA2 genlerinde ekspresyon artışı saptanmıştır. Böylece AMPK'nın serviks kanseri tedavisinde hedeflenebilir bir molekül olduğu noktasından yola çıkılarak, bu gen ekspresyonlarının en fazla olduğu HeLa hücresinde çalışma dizayn edilmiştir. HeLa hücre dizisi serviks skuamöz hücreli kanser hücre dizisi olup, literatürde yapılan çalışmalarda HeLa hücre dizisinde bir tümör baskılayıcı gen olan LKB1 delesyonu olduğu ve LKB1'den yoksun hücrelerde AMPK aktivasyonunun Ca^{+2} /kalmodülün bağımlı kinaz aracılığıyla gerçekleşebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur ^{108,109}.

Yapılan çalışmalarda serviks kanserli hastaların en az %20 sinde LKB1'in klinik anlamlı olarak mutant olduğu ve bu hastaların progresyonsuz sağkalımının daha kötü olduğu gösterilmiştir ¹⁰⁸. LKB1 delesyonu tümör progresyonunu öngörmeye iyi bir belirteç olarak görülse de LKB1 yolağının inaktive edilmesi metforminin kanser hücre proliferasyonunu azaltmasında yardımcı olabilmektedir. LKB1 gibi tümör baskılayıcı gen delesyonu olan hücrelerde kanser oluşumu ve progresyonu engellenemeyeceği için prognoz daha kötü olması beklenirken, yapılan bir çalışmada tümör hücreleri metformin uygulanarak strese sokulduğunda mutant olan LKB1 nedeniyle AMPK'yı aktive edemedikleri için hücre için gerekli olan ATP'yi koruyamadıkları ve bunun kanser hücre ölümü ile sonuçlandığı gösterilmiştir ¹¹⁰. Chen ve ark. 'ları tarafından yapılan bir çalışmada, LKB1 mutant HeLa hücrelerinin diğer serviks kanseri hücre dizilerine kıyasla metformine daha duyarlı olduğu gösterilmiştir ¹¹¹. Serviks kanser hücre dizisi olan HeLa hücreleri ile endometriyum kanseri hücre dizisi olan HEC-1-A ve KLE hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise, HeLa hücrelerinde LKB1 ekspresyonu olmadığı ve metforminin HeLa hücrelerinde apoptozisi belirgin olarak arttırarak hücre sağkalımını düşürdüğü, ancak HEC-1-A ve KLE hücrelerinde metforminin apoptozisi arttırmadığı ve hücre sağkalımını azaltmadığı gösterilmiştir ¹¹².

5.1. İyonizan Radyasyon, Sisplatin ve Metforminin Hücre Üzerindeki Etkileri

Çalışmamızda, IR uygulanmadan hem tek başlarına metformin ve sisplatinin hem de kombine uygulandıklarında hücre sağkalımını anlamlı olarak azalttıkları gösterilmiştir. Literatürde de benzer şekilde metforminin HeLa hücre serilerinde IR uygulanmaksızın tek başına antiproliferatif etkisi gösterilmiştir ¹¹¹. Bununla birlikte artan IR dozları ile birlikte HeLa hücre dizisi sağkalımının her iki zamanlama senaryosunda da azaldığı ve birinci senaryoda tek başına sisplatin ya da metformin ve sisplatine metformin eklenmesinin radyoduyarlılaştırıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ancak bu etki düşük doz IR varlığında belirgin olmakla birlikte artan IR dozları ile etki ortadan kalkar. Literatürde de benzer şekilde sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini gösteren çalışmalar mevcut olup, klinikte serviks kanserli hastalarda günlük düşük fraksiyon dozları (1.8-2 Gy) ile eş zamanlı sisplatin KT standart uygulamadır ¹¹³. Lokal ileri evre serviks kanserli hastalarda konkomitan KRT sonrası uygulanan BRT süresince toksisiteyi arttırmamak adına hastalara eş zamanlı sisplatin KT uygulanmaz. Çalışmamızda da yüksek IR dozları ile birlikte sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisinin azaldığı gösterilmiş olup, yüksek IR dozları (6-7 Gy) uygulanan BRT süresince eş zamanlı sisplatin uygulanmasının radyoduyarlılığı arttırıcı avantajı gözlenmeden yalnızca toksisiteye neden olabileceği düşünülmektedir.

İkinci senaryoda ise IR uygulanmadan tek başına sisplatin ya da metformin uygulanması sağkalımı azaltmazken, sisplatine metformin eklenmesi birbirlerinin etkisini potansiyalize ederek sağkalımı azaltmaktadır. Literatürde de benzer şekilde, üçlü negatif meme kanserinde sisplatin ve metforminin kombine etkisinin incelendiği bir çalışmada yalnızca sisplatine kıyasla sisplatine metformin eklenmesinin sisplatinin hücre sağkalımını azaltıcı etkisini güçlendirdiği gösterilmiştir ¹¹⁴. Düşük doz IR uygulanması ile birlikte tek başına metformin radyoduyarlılaştırıcı etki göstermesine karşın tek başına sisplatin ya da sisplatine metformin eklenmesi ile radyoduyarlılaştırıcı etki gözlenmemiştir. Riaz ve ark.'larının LKB1'den yoksun A549 hücre dizisinde metforminin sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini arttırdığını gösterdikleri çalışmadakine benzer olarak bu çalışmada HeLa hücre dizisinde hücreler metformine kıyasla sisplatine karşı daha dirençlidir ¹¹⁵. LKB1'den yoksun HeLa hücrelerinin LKB1 mutant olmayan hücrelere kıyasla metformine daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmalar dikkate alındığında, bu durum hücrelerin LKB1'den

yoksun olması ve düşük iyonizan radyasyon dozunda hücreyi koruyacak kadar yeterli düzeyde AMPK'yı aktive edememesine bağlı olabilir ¹¹². Özefagus kanseri hücre dizisinde yapılan diğer bir çalışmada, LKB1'in AMPK yolağı üzerinden apoptozis inhibisyonu ve otofaji aktivasyonu ile IR direncine neden olduğu gösterilmiştir ¹¹⁶. Yüksek IR dozunda ise hem sisplatin hem de metformin tek başına radyoduyarlılaştırıcı etki göstermesine karşın sisplatine metformin eklenmesi radyoduyarlılığı arttırmamaktadır. Bu bulgular yüksek doz IR uygulanan brakiterapi sürecinde toksisiteyi arttırmamak adına sisplatin yerine metformin ile radyoduyarlılığı arttırmanın faydalı olabileceğini ön görmektedir.

Çalışmamızda, metforminin IR'dan 4 saat önce verilmesinin metforminin radyoduyarlılaştırıcı etkisini arttırdığını göstermektedir. Brown ve ark.'ları tarafından küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizisi olan A549 hücre dizisinde yapılan çalışmada, IR öncesi 1. saat, 4. saat ve sonrası 24. saatte metformin uygulanması ile tümör büyümesi arasında ilişki saptanmamıştır ¹¹⁷. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizisi olan LKB1'den yoksun A549 ile LKB1 mevcut H1299 hücre dizilerinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise IR'dan 24 saat önce 1-72 saat metformin ile inkübe edilen hücre dizilerinde metforminin ATM/AMPK yolağını aktifleyerek radyoduyarlılaştırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir ¹¹⁸. Literatürde metformin sıklıkla IR öncesi uygulansa da literatürde zamanlamaya ilişkin net veri mevcut değildir. Çalışmamızda, metforminin iyonizan radyasyondan 28 saat önce uygulandığında da radyoduyarlılaştırıcı etkisi gösterilmesine karşın, bu etki 4 saat önce uygulandığında daha belirgindir.

Literatürde metformin dozlarına ilişkin veriler de tartışmalıdır. Riaz ve ark.'larının çalışmasında, küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizisi olan A549 ve H460'ta tek başına metforminin 0.5 mM ve üzeri dozlarda radyoduyarlılaştırıcı etkinliği gösterilmiştir ¹¹⁵. Song ve ark.'ları tarafından MCF-7 insan meme kanseri hücre dizisi ve FSall fare fibrosarkom hücre dizisi üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise 1 mM ve 5 mM metforminin radyoduyarlılaştırıcı etkinliği gösterilmiştir ⁸⁹. Bizim çalışmamızda ise serviks kanseri hücre serisinde 0.37 mM ve üzeri metformin dozunun toksik olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre yüksek metformin dozlarının radyoduyarlılığı arttırmak yerine direk hücre için toksik olabileceği akılda bulundurulmalıdır.

Literatürde, metforminin sisplatinle kombine edildiğinde sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkinliği üzerindeki rolüne ilişkin farklı sonuçlar mevcuttur. IR uygulanmadan sisplatin ile metforminin kombine edildiği çalışmalarda metformin, sisplatinin anti-kanser etkinliğini arttırmaktadır ve bu bulgular çalışmamızda elde edilen sonuçları desteklemektedir ¹¹⁹⁻¹²². Qi ve ark.'ları tarafından metforminin hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda sisplatinin sitotoksik etkisini sinerjistik olarak arttırdığı gösterilmiştir ¹²³. Buna karşılık Janjetovic ve ark.'ları, metforminin sisplatin ilişkili apoptotik kanser hücre ölümünü azalttığını göstermiştir ¹²⁴. IR varlığında metforminin sisplatin ile kombinasyonundaki etkileri daha farklı olmaktadır. IR uygulanan A549 (LKB1 mutant ve sisplatine dirençli) ve H460 (LKB1 normal ve sisplatine duyarlı) küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizilerinde, sisplatine eklenen metforminin A549 hücre dizilerinde sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini sinerjistik olarak arttırdığı ancak H260 hücre dizilerinde bu etkinin aditif etki olarak kaldığı gösterilmiştir ⁵¹. Takiuchi ve ark.'ları tarafından yapılan retrospektif bir analizde serviks kanserli hastalarda metformin kullanımının hastalıksız sağkalım ve progresyonsuz sağkalım ile ilişkisi gösterilememiştir ¹²⁵. Küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda yapılan OCOG-ALMERA randomize çalışmasında KRT ile metformin kombinasyon kolunda, yalnızca KRT alan hastalara kıyasla toksisite daha fazla ve progresyonsuz sağkalım, genel sağkalım ise daha düşük bulunmuştur ancak bu çalışmada toksisite değerlendirilirken metformin kolunda daha az hastanın KRT'yi tamamladığı ve adjuvan durvalumab immünoterapisi aldığı göz önünde bulundurulmalıdır ¹²⁶. Metforminin konkomitan KRT ile kombinasyonundaki etkisini araştıran diğer bir faz 2 çalışmada ise tedavi iyi tolere edilmiş olsa da lokal-bölgesel kontrol, genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalımda gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır ¹²⁷. Bu bulgular çalışma sonuçlarımızı destekler niteliktedir ve serviks kanserlerinde bu konuya ilişkin araştırma olmaması çalışmamızı eşsiz kılmaktadır. Buna karşılık, Han ve ark.'ları tarafından serviks kanserli 13 hastada KRT ile KRT'ye metformin eklenmesini karşılaştıran faz 2 bir çalışmada, metformin kullanan hastaların hastalıksız sağkalımının daha iyi ve FAZA PET/BT ile ölçülen hipokside daha az artışın görüldüğünü bildirmişlerdir ¹²⁸.

Çalışmamızda, LKB1'den yoksun HeLa hücre dizisinde artan IR dozları ile birlikte AMPK total protein ifadesinin arttığı ancak aktif formu olan p-AMPK düzeyinin değişmediği gösterilmiş olup, hücre dizisine metformin eklendiğinde artan IR dozları ile birlikte hem AMPK total protein ifadesinin, hem de p-AMPK'nın arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular hem IR'un hem de metforminin AMPK üzerindeki etkisinin LKB1 yolağı dışında da literatürde belirtilen Ca^{+2} /kalmodülün bağımlı kinaz yolağı gibi farklı yollar üzerinden gerçekleşebileceğini göstermektedir. Şanlı ve ark.'larının çalışmasında, LKB1'den yoksun hücrelerde artan IR dozları ile p-AMPK düzeyinin IR sonrası 1. saatte en yüksek seviyeye ulaştığı, takiben azalarak 24. saate kadar yüksek düzeyde kaldığı ve IR'un AMPK aktivasyonunu LKB1'den bağımsız olarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir ⁵². Aynı grup tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise LKB1'den yoksun hücrelerde IR uygulaması sonrası 48. saatte AMPK gen ekspresyonunun en yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir ⁹⁶. Xiao ve ark. 'ları tarafından HeLa hücre dizisinde metforminin LKB-1 ekspresyon düzeyini arttırmadan LKB-1 mutant olmayan hücrelerden daha silik şekilde AMPK aktivasyonu ve baskın olarak mTOR inhibisyonu yaparak proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir ¹²⁹. Çalışmamızda ise IR sonrası 1. saatte AMPK total protein ifadesinin arttığı ancak p-AMPK düzeyinin değişmediği gözlenmiştir. Tek başına metforminin radyoduyarlılaştırıcı etkisi gözlenmemesine karşın, düşük ve yüksek doz IR uygulanması ile birlikte uygulandığında radyoduyarlılaştırıcı etki göstermesi, AMPK total protein ifadesi ve p-AMPK düzeyini kontrole kıyasla arttırması nedeniyle radyoduyarlılığın AMPK ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Yine IR olmaksızın sisplatine metformin eklendiğinde etkinin potansiyalize olması, IR varlığında bu etkinin ortadan kaybolması ve AMPK düzeylerinin IR ile birlikte kontrole kıyasla azalması radyoduyarlılığın AMPK ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Literatürde de metforminin hem sisplatine duyarlı (H460) hem de sisplatine dirençli (A549) küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizilerinde radyoduyarlılaştırıcı etkisini AMPK yolağı üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir ^{51,118}. Literatürdeki diğer bir çalışmada MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde metforminin radyoduyarlılaştırıcı etkisini AMPK aktivasyonu ve mTOR inhibisyonu ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir ⁸⁹. Harhaji-Trajkovic ve ark.'larının çalışmasında ise siRNA aracılığıyla AMPK'nın susturulması veya AMPK inhibitörü uygulanması sonucunda sisplatin ilişkili tümör

hücresi ölümünün artarak sisplatin sitotoksitesinin AMPK inhibisyonu ile arttırılabileceği raporlanmıştır¹³⁰. Bu bulgular ışığında çalışmamızda IR ile birlikte artan AMPK düzeyinin de etkisiyle metforminin sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini potansiyalize etme etkisi ortadan kalkmıştır.

Çalışmamızda hücre hasar ve hasar tamiri belirteçleri incelendiğinde, yüksek doz IR'a bağlı sağkalımda azalma ile uyumlu olarak artan IR dozlarının çift zincir DNA kırık belirteci olan H2AX'i aktive ederek (γ H2AX) hücrede hasara yol açtığı ve hasar tamirinin göstergesi olan 53BP1'i aktive ederek (p-53BP1) hasar tamirini başlattığı gösterilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da artan IR dozlarında hücre sağkalımının belirgin olarak azaldığı artan γ H2AX ve p-53BP1 seviyeleri ile gösterilmektedir^{51,93}. Çalışmamızda, yalnızca metformin varlığında artan IR dozları ile birlikte sağkalımda azalma meydana gelirken metforminin radyoduyarlılaştırıcı etkisi ile uyumlu olarak γ H2AX'te hafif artış, p-53BP1'de ise belirgin artış gözlenmiştir. Tek başına sisplatin yüksek doz IR varlığında radyoduyarlılaştırıcı etki gösterirken, γ H2AX ve p-53BP1'de anlamlı fark saptanmamıştır. Bu bulgular LKB1'den yoksun olan HeLa hücre dizisinin, sisplatine karşı metforminden daha dirençli olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Sisplatine metformin eklendiğinde sinerjistik etki ile sağkalımda düşme görülse de IR uygulandığında bu etki ortadan kalkmakta ve bu bulgular ile uyumlu olarak artan IR dozları ile γ H2AX ve p-53BP1'de anlamlı fark gözlenmemektedir.

Metformin eklenen ve eklenmeyen hücre dizilerinde artan IR dozları ile nükleotid eksizyon tamir proteini olan ERCC1'de anlamlı fark saptanmamasına karşın sisplatin varlığında artan IR dozları ile ERCC1 protein düzeyinde artış gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda sisplatinin normal yapısı bozulmuş DNA adacıkları oluşturduğu ve ERCC1 proteininin bu adacıkların ortadan kaldırılmasını sağladığı gösterilmiştir¹³¹. Literatürde yüksek ERCC1 düzeyinin over ve mide kanserli hastalarda sisplatin direnci ile, düşük ERCC1 düzeyinin ise küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri ve over kanseri gibi birçok kanser türünde sisplatine karşı artmış yanıt ile ilişkili olduğu saptanmıştır¹³²⁻¹³⁴. Nükleotid eksizyon tamir yolağında hasar olmasının IR'a duyarlılığa yol açmadığı bilinse de son yıllarda yapılan çalışmalarda ERCC1'in baskılanmasının radyoduyarlılığa yol açtığı gösterilmiştir^{49,50}. Bir başka çalışmada ise metforminin ERCC1 protein ekspresyon düzeyini azaltarak radyoduyarlılığa sebep

olduğu gösterilmiş ancak sisplatine metformin eklenmesi sinerjistik olarak sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisini arttırmasına rağmen ERCC1 düzeyini daha fazla azaltmamıştır ⁵¹. Çalışmamızda da sisplatin varlığında düşük IR dozuna kıyasla hücre sağkalımının yüksek IR dozunda daha fazla azalması ve bu dozda ERCC1 düzeyinin artması, sisplatine bağlı daha fazla hasar olduğu şeklinde açıklanabilir. Literatürdeki çalışmalar ile uyumlu olarak sisplatin varlığında artan IR dozları ile yükselen ERCC1 düzeyleri sisplatinin etkisini arttırmak amacıyla ERCC1'in inhibisyonunu gündeme getirebilir. Çalışmamızda tek başına metformin varlığında artan IR dozları ile ERCC1 düzeyinde belirgin farklılık olmamasına karşın sisplatine metformin eklendiğinde hem düşük hem de yüksek doz IR dozu ile ERCC1 düzeyi artmıştır. Bu dozlarda sisplatine metformin eklenmesi sağkalımı azaltmasına karşın sisplatinin yarattığı radyoduyarlılaştırıcı etkiyi arttırmamaktadır. Bu bulgular ışığında ERCC1'in artmış olması sisplatine metformin eklendiğinde de sisplatin sitotoksitesinin var olduğunu ancak direncin kırılmadığını göstermektedir.

Hücre döngüsünün farklı fazlarında hücrenin radyoduyarlılığı değişmekte olup G2 ve M fazlarının IR'a en duyarlı fazlar olduğu bilinmektedir ⁵³. Hücre döngüsü kontrol yolları IR uygulaması ile birlikte aktive olarak DNA hasar tamirine ve hücre sağkalımının düzenlenmesine olanak sağlar ¹³⁵. Lovastatinin radyoduyarlılığı arttırdığını gösteren bir çalışmada, lovastatin ile hücre siklus fazlarındaki akümüle olan hücrelerin oranının zamana bağlı değişime uğradığı, ilk 24 saatte değişiklik olmazken 24 saatten sonra G0/1 fazına geçişin arttığı, yalnız IR uygulanan hücrelerde ise 48. saatte radyoduyarlılığın en fazla olduğu G2/M fazına geçişin arttığı, IR'a lovastatin eklendiğinde ise G2/M fazındaki akümüülasyonun azaldığı ve apoptozise uğrayan hücrelerin arttığı gösterilmiştir ⁹⁹. Benzer olarak Şanlı ve ark.'ları tarafından yayınlanan çalışmada yüksek doz (8 Gy) IR uygulanan hücrelerde G2/M fazındaki hücre akümüülasyonunun arttığı saptanmıştır ⁵². Yüksek dereceli menenjiomalı hastalarda ise metforminin sisplatin toksisitesini AMPK-mTOR yolağı ile arttırdığı ve bu etkiyi G0/G1 fazında hücre siklus duraklaması yaparak gerçekleştirdiği gösterilmiştir ¹³⁶. Sarıaydın ve ark.'ları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise HeLa hücre dizisine yalnızca 0.5 mM metformin eklendiğinde G2/M fazında duraklama olduğu, daha düşük ve yüksek konsantrasyonlarda G0/1 fazında duraklamaya yol açtığı ve HeLa hücre dizisinde metformin sitotoksitesinden temel

olarak apoptozisin sorumlu olduğu gösterilmiştir ¹³⁷. LKB1'den yoksun küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir araştırmada tek başına IR uygulandığında G2-M fazında duraklama olduğu, metformin eklendiğinde ise G1 fazında duraklamaya yol açarak radyoduyarlılaştırıcı etkinlik sağladığı gösterilmiştir ¹¹⁸. Bizim çalışmamızda ise IR uygulanmadan sisplatin uygulandığında G0/G1-S fazında duraklama söz konusu iken tek başına metformin uygulandığında değişiklik olmamakta, sisplatine metformin eklendiğinde ise G0/G1-S fazında duraklayan hücre oranında artma görülmektedir. Bu da literatürde gösterilen HeLa hücrelerinde ana hasar mekanizmasının G0/G1-S fazında gerçekleşen apoptozis olduğunu düşündürmektedir ⁴⁹. Bu bulgular hücre sağkalım analiz sonuçlarımız ile de uyumlu bulunmuştur. Düşük doz (2 Gy) IR uygulandığında ise metformin eklenen hücrelerde eklenmeyenlere kıyasla artmış G2/M faz duraklaması olması radyoduyarlılığın arttığını, kombine ilaç kullanımında da aynı etkinin görüldüğünü ve kombine ilaç kullanımında sağkalımın da azaldığı göz önünde bulundurulduğunda radyoduyarlılığın G2/M faz duraklaması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda tüm deneylerde IR sonrası 1. saatte değerlendirme yapılmıştır. Literatürde IR sonrası HeLa hücrelerinde 24 saate kadar G2/M fazında akümüasyonun farklılık göstermediği ancak zaman geçtikçe farklılıkların ortaya çıktığı gösterilmiş olup, bulgularımız değerlendirilirken literatürdeki farklı uygulamalar da dikkate alınmalıdır ¹³⁸.

AMPK Aktivatörü Olan A769662 ve AMPK İnhibitörü Olan Dorsomorfinin Sisplatin ve İyonizan Radyasyona Eklenmesinin Hücre Üzerindeki Etkileri

Çalışmamızda birinci senaryoda IR uygulanmaksızın A769662 tek başına sağkalımı azaltmazken, sisplatin ile kombine uygulandığında proliferasyonu arttırdığı gözlenmiştir. Düşük doz IR (2 Gy) varlığında sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisi belirginleşmekle birlikte, doz arttıkça sisplatinin etkisi azalmakta, A769662'nin tek başına ya da sisplatin ile kombine uygulandığında hücre proliferasyonunu arttırıcı etkisi belirginleşmektedir. Bu etki literatürde de gösterilen uzun süreli AMPK aktivasyonunun hücreleri stresten korumak için senesense sokması ile de açıklanabilir ¹³⁹. Buna karşılık, dorsomorfin IR uygulanmadan hem tek başına hem de sisplatine eklendiğinde sisplatin sitotoksitesini arttırır. Düşük ve yüksek doz IR varlığında ise

sisplatinin tek başına etkinliği azalsa da dorsomorfin sislpatinin etkisini arttırmaya devam etmektedir. Bu bulgular A769662 ile AMPK'nın aktive edilmesinin hücrede sislpatinin radyoduyarlılaştırıcı etkisine direnç, dorsomorfin ile AMPK'nın inhibisyonunun ise belirgin olarak radyoduyarlılaştırıcı etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

İkinci senaryoda ise, metformin eklendiğindeki duruma benzer şekilde IR olmaksızın tek başına uygulanan sislpatin ya da A769662 hücre sağkalımını azaltmazken, sislpatine A769662 eklenmesi sislpatinin etkisini potansiyalize ederek sislpatin sitotoksitesini artırır. Bu bulgu birinci senaryodakinin tersine A769662'nin IR'dan hemen önce ve sislpatin ile eş zamanlı uygulanmasının AMPK'yı yeteri kadar arttıramadığını ve hücreye direnç kazandıramadığını düşündürmektedir. Artan IR dozları ile A769662'nin tek başına radyoduyarlılaştırıcı etkisi belirginleşmekte ancak sislpatin sitotoksitesini artırma etkisi ortadan kalkmaktadır. Bu bulgular artan IR dozları ile hücre içinde strese yanıt olarak AMPK'nın (total protein ifadesinin) yeteri kadar arttığını ve artan AMPK'nın IR'un etkisini arttırdığını ancak A769662'nin IR'un AMPK total protein ifadesini artırma etkisini geri çevirdiği ve bu nedenle A769662'nin sislpatinin sinerjistik olarak sitotoksitesini artırma etkisinin ortadan kalktığını göstermektedir. Artan IR dozları ile sislpatine eklenen A769662 varlığında hücre hasar belirteci olan γ H2AX'in azalması DNA çift zincir kırıklarının azaldığını ve p-53BP1'in artması ise hücre hasar tamirinin fazla olarak sislpatine dirence yol açtığını göstermektedir. Literatürde de akciğer adenokarsinom tanılı hastalarda p-53BP1 düzeyinin yüksek olmasının sislpatin direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁴⁰. Bu bulgular çalışma sonuçlarımız ile de desteklenmiştir. ERCC1 düzeyinin yalnızca A769662 varlığında artmaması ancak sislpatin ile kombine uygulandığında artan IR dozları ile anlamlı olarak artması literatür ile benzer şekilde sislpatin direnci ile ilişkili olabilir^{133,141}. Hücre siklus duraklaması incelendiğinde IR uygulanmadan sislpatine A769662 eklendiğinde hücre siklus fazlarında anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Düşük doz IR varlığında ise kontrole kıyasla sağkalımda azalma ile uyumlu olarak G2/M fazında hücre duraklamasında artış meydana gelmiştir.

Buna karşın, IR uygulanmadan tek başına sislpatin ve dorsomorfin hücre sağkalımını azaltmazken, sislpatine dorsomorfin eklendiğinde dorsomorfinin sinerjistik olarak sislpatin sitotoksitesini arttırdığı, metformin ve A769662'den farklı

olarak düşük doz (2 Gy) IR varlığında da sinerjistik etkinin devam ettiği, artan dozlarda ise sisplatin sitotoksitesini aditif olarak arttırmaya devam ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular dorsomorfinin metforminden daha potent bir radyoduyarlılaştırıcı olduğunu göstermektedir. Artan IR dozları ile birlikte artan AMPK düzeylerinin hücrelerde sisplatine karşı direnç yarattığını düşündürmekte ve literatürde yapılan bir çalışma ile birlikte çalışmamızda da hem A769662 eklendiğinde radyoduyarlılığın azalması hem de dorsomorfin eklendiğinde radyoduyarlılığın arttığının gösterilmesi ile doğrulanmıştır¹³⁰. Sisplatine dorsomorfin eklendiğinde p-AMPK/AMPK düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmamış ve hücre hasar protein düzeyi de artan IR dozları ile farklılık göstermemiştir ancak bu durum dorsomorfin ve sisplatine dorsomorfin eklenen hücrelerdeki tekrar deneylerine bağlı varyasyondan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Dorsomorfin eklenen hücrelerde hücre hasar tamir proteinlerinin artmış olması hücre hasarının da artmış olabileceğini göstermektedir. Sisplatine dorsomorfin eklendiğinde ise hasar tamiri daha da belirginleşmiş ve ERCC1 protein düzeyi de yükselmiştir, bu bulgular bize dorsomorfinin hücre hasarını ve hasar tamirini arttırarak radyoduyarlılığa sebep olabileceğini göstermektedir. Sisplatine dorsomorfin eklenmesinin artan IR dozları ile G0-G1/S fazında duraklayan hücre oranını arttırması ise dorsomorfinin apoptozise giden hücre sayısını arttırarak radyoduyarlılığa neden olmuş olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılıklarından biri, western blot testleri ile protein analizi yapılırken aynı jel üzerinde farklı ilaç dozlarının karşılaştırılamamış olmasıdır. Her deney grubundan 3 örnek yürütülecek şekilde deney planı yapılmıştır. Tek jelde 8 örnek yürütülebildiği için ve deneyime bağlı varyasyonları en aza indirmek açısından aynı deney grupları aynı jelde yürütülmüş ve bu nedenle farklı ilaç grupları yerine IR dozlarının farklı seçilip aynı ilaç gruplarının bulunduğu örnekler birlikte yürütülmüştür. Bu sebeple ilaç gruplarını birbirleriyle birebir kıyaslamak mümkün olmamıştır, ilaç gruplarının içerisinde artan IR dozları ile protein ekspresyonlarının değişimi incelenmiştir. Çalışmamızın diğer kısıtlılığı ise hücre döngüsü fazlarının farklı zamanlarda incelenememiş olmasıdır. Yapılan çalışmalarda zamana bağlı hücre siklus değişikliklerinin gözlenebileceği bildirildiği için sonuçlarımız yorumlanırken bu bilgi de dikkate alınmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, çalışmamızda insan serviks kanseri hücre dizisinde (HeLa) metforminin sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkinliği üzerindeki etkisi ilk kez incelenmiştir. Bu kapsamda;

1. Serviks kanserinde AMPK modülasyonunun tedavide önemli olabileceği biyoenformatik analizler yapılarak tespit edilmiştir.
2. Metformin, sisplatin, A769662 ve dorsomorfinin hücre için toksik olmayan dozları belirlenmiştir.
3. Metformin ve sisplatinin ayrı ayrı ve kombine olarak IR'a duyarlılığı arttırıp arttırmadığı hücre sağkalım analizleri ile tespit edilmiştir. Metforminin IR varlığında sisplatin sitotoksitesini arttırmadığı gösterilmiştir. Özellikle yüksek IR dozlarında sisplatinin radyoduyarlılaştırıcı etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir. Klinik uygulamada yüksek IR dozları (6-7 Gy) uygulanan brakiterapi süresince eş zamanlı sisplatin uygulanmasının radyoduyarlılığı arttırıcı avantajı gözlenmeden yalnızca toksisiteye neden olabileceği düşünülmektedir. Yüksek IR dozunda hem sisplatin hem de metformin tek başlarına radyoduyarlılaştırıcı etkileri devam etmesine rağmen sisplatine metformin eklenmesi radyoduyarlılığı arttırmamaktadır. Bu bulgular yüksek doz IR uygulanan brakiterapi sürecinde toksisiteyi arttırmamak adına sisplatin yerine metformin ile radyoduyarlılığı arttırmanın faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda kesin kanıya varabilmek için klinik çalışmalarla bu bulguların konfirme edilmesi gerekmektedir.
4. A769662 ve dorsomorfinin ayrı ayrı ve sisplatin ile kombine olarak IR'a duyarlılığı arttırıp arttırmadığı hücre sağkalım analizleri ile ilk kez incelenmiştir. Dorsomorfinin, A769662 ve metforminden daha potent bir radyoduyarlılaştırıcı ajan olduğu belirlenmiştir. Klinik pratikte kullanılabilecek bir ajan olması için dorsomorfinin radyoduyarlılaştırıcı ve sisplatin sitotoksitesini arttırıcı etkileriyle ilgili ileri çalışmaların yapılması literatüre katkı sağlayacaktır.

5. Metforminin, A769662 ve dorsomorfinin IR öncesi uygulanma zamanının radyoduyarlılaştırıcı etkinliği nasıl değiştirdiği ilk kez incelenmiştir. Metforminin IR uygulamasından 4 saat önce verildiğinde tek başına radyoduyarlılaştırıcı etkisinin daha fazla olduğu ancak hem bu koşulda hem de sisplatin ile eş zamanlı verildiğinde IR varlığında sisplatinin etkisini potansiyalize etmediği gösterilmiştir. A769662'nin sisplatinden 24 saat önce uygulanması ile hücre içinde artan AMPK'nın sisplatine direnç oluşturduğu, ancak eş zamanlı uygulamada bu etkinin gözlenmediği tespit edilmiştir. Dorsomorfinin ise her iki zamanlama koşulunda da benzer etkiler ile sisplatinin etkinliğini arttırmıştır. Metforminin klinik pratikte tek başına kullanılması durumunda IR'dan 4 saat önce verilmesinin radyoduyarlılaştırıcı etkinin belirginleşmesi açısından faydalı olabileceği düşünülmektedir.
6. Metformin ve sisplatinin tek başına ya da kombine olarak IR'a duyarlılığı arttırıp arttırmadığı hücre hasar proteini, hücre hasar tamir proteinleri ve hücre siklus duraklaması incelenerek hücre sağkalım sonuçları desteklenmiştir.
7. A769662 ve dorsomorfinin tek başına ya da sisplatin ile kombine olarak IR'a duyarlılığı arttırıp arttırmadığı hücre hasar proteini, hücre hasar tamir proteinleri ve hücre siklus duraklaması incelenerek hücre sağkalım sonuçları desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017; **60**(9): 1577-85.
2. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014; **7**(9): 867-85.
3. Koritzinsky M. Metformin: A Novel Biological Modifier of Tumor Response to Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; **93**(2): 454-64.
4. Li J, Gui Y, Ren J, et al. Metformin Protects Against Cisplatin-Induced Tubular Cell Apoptosis and Acute Kidney Injury via AMPKalpha-regulated Autophagy Induction. *Sci Rep* 2016; **6**: 23975.
5. Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J BUON* 2016; **21**(2): 320-5.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**(3): 209-49.
7. Cancer Genome Atlas Research N, Albert Einstein College of M, Analytical Biological S, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* 2017; **543**(7645): 378-84.
8. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet* 2019; **393**(10167): 169-82.
9. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011; **128**(4): 927-35.
10. Saavedra KP, Brebi PM, Roa JC. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics* 2012; **4**(1): 13.
11. Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Front Microbiol* 2018; **9**: 2896.

12. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007; **98**(10): 1505-11.
13. Howley PM. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2006; **117**: 113-26; discussion 26-7.
14. Munger K, Basile JR, Duensing S, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; **20**(54): 7888-98.
15. Fang J, Zhang H, Jin S. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour Biol* 2014; **35**(6): 5083-93.
16. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, et al. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol* 2004; **93**(3): 621-7.
17. Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, et al. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer* 2007; **97**(10): 1457-64.
18. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; **24**(2): 132-8.
19. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; **128**(4): 693-705.
20. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 2009; **10**(3): 155-9.
21. Huang T, Alvarez A, Hu B, Cheng SY. Noncoding RNAs in cancer and cancer stem cells. *Chin J Cancer* 2013; **32**(11): 582-93.
22. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006; **25**(46): 6188-96.
23. Ma D, Zhang YY, Guo YL, Li ZJ, Geng L. Profiling of microRNA-mRNA reveals roles of microRNAs in cervical cancer. *Chin Med J (Engl)* 2012; **125**(23): 4270-6.

24. Zhao S, Yao D, Chen J, Ding N. Circulating miRNA-20a and miRNA-203 for screening lymph node metastasis in early stage cervical cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; **17**(8): 631-6.
25. Castanon A, Landy R, Sasieni PD. Is cervical screening preventing adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix? *Int J Cancer* 2016; **139**(5): 1040-5.
26. Wu C, Li L, Xiao X, Sun A, Lin W, Li A. Risk Factors of Regional Lymph Node Metastasis in Patients with Cervical Cancer. *Open Life Sci* 2019; **14**: 208-13.
27. Bhatla N, Berek JS, Cuellar-Fredes M, et al. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet* 2019; **145**(1): 129-35.
28. Stehman FB, Bundy BN, DiSaia PJ, Keys HM, Larson JE, Fowler WC. Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy. I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 1991; **67**(11): 2776-85.
29. Yang X, An J, Zhang Y, et al. Prognostic Nomograms Predicting Survival in Patients With Locally Advanced Cervical Squamous Cell Carcinoma: The First Nomogram Compared With Revised FIGO 2018 Staging System. *Front Oncol* 2020; **10**: 591700.
30. Rose PG, Java J, Whitney CW, et al. Nomograms Predicting Progression-Free Survival, Overall Survival, and Pelvic Recurrence in Locally Advanced Cervical Cancer Developed From an Analysis of Identifiable Prognostic Factors in Patients From NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Randomized Trials of Chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2015; **33**(19): 2136-42.
31. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022; **72**(1): 7-33.
32. Hopkins MP, Morley GW. Radical hysterectomy versus radiation therapy for stage IB squamous cell cancer of the cervix. *Cancer* 1991; **68**(2): 272-7.
33. Landoni F, Colombo A, Milani R, Placa F, Zanagnolo V, Mangioni C. Randomized study between radical surgery and radiotherapy for the treatment of stage IB-IIA cervical cancer: 20-year update. *J Gynecol Oncol* 2017; **28**(3): e34.

34. Gray HJ. Primary management of early stage cervical cancer (IA1-IB) and appropriate selection of adjuvant therapy. *J Natl Compr Canc Netw* 2008; **6**(1): 47-52.
35. Sedlis A, Bundy BN, Rotman MZ, Lentz SS, Mudderspach LI, Zaino RJ. A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1999; **73**(2): 177-83.
36. Rotman M, Sedlis A, Piedmonte MR, et al. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in Stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a gynecologic oncology group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; **65**(1): 169-76.
37. Ryu SY, Kim MH, Nam BH, et al. Intermediate-risk grouping of cervical cancer patients treated with radical hysterectomy: a Korean Gynecologic Oncology Group study. *Br J Cancer* 2014; **110**(2): 278-85.
38. Peters WA, 3rd, Liu PY, Barrett RJ, 2nd, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; **18**(8): 1606-13.
39. Monk BJ, Wang J, Im S, et al. Rethinking the use of radiation and chemotherapy after radical hysterectomy: a clinical-pathologic analysis of a Gynecologic Oncology Group/Southwest Oncology Group/Radiation Therapy Oncology Group trial. *Gynecol Oncol* 2005; **96**(3): 721-8.
40. Small W, Jr., Beriwal S, Demanes DJ, et al. American Brachytherapy Society consensus guidelines for adjuvant vaginal cuff brachytherapy after hysterectomy. *Brachytherapy* 2012; **11**(1): 58-67.
41. Nadeem R. Abu-Rustum CMY, Kristin Bradley, Rebecca Brooks, Susana M. Campos, Junzo Chino, Hye Sook Chon, Christina Chu, David Chon, Marta Ann Crispens, Shari Damast, Elisabeth Diver, Christine M. Fisher, Peter Frederick, David K. Gaffney, Robert Giuntoli II, Ernest Han, Brooke E. Howitt, Warner K. Huh, Jayanthi Lea, Andrea Mariani, David Mutch, Larissa Nekhlyudov, Mirna Podoll, Steven W. Remmenga, R. Kevin Reynolds, Ritu Salani, Rachel Sisodia,

- Pamela Soliman, Edward Tanner, Stefanie Ueda, Renata Urban, Stephanie L. Wethington, Emily Wyse, Kristine Zanotti. NCCN Guidelines Version 1.2022 Cervical Cancer. 2021.
42. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; **340**(15): 1137-43.
 43. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1999; **17**(5): 1339-48.
 44. Monk BJ, Tewari KS, Koh WJ. Multimodality therapy for locally advanced cervical carcinoma: state of the art and future directions. *J Clin Oncol* 2007; **25**(20): 2952-65.
 45. Rose PG, Ali S, Watkins E, et al. Long-term follow-up of a randomized trial comparing concurrent single agent cisplatin, cisplatin-based combination chemotherapy, or hydroxyurea during pelvic irradiation for locally advanced cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007; **25**(19): 2804-10.
 46. Han K, Milosevic M, Fyles A, Pintilie M, Viswanathan AN. Trends in the utilization of brachytherapy in cervical cancer in the United States. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; **87**(1): 111-9.
 47. Tanderup K, Eifel PJ, Yashar CM, Potter R, Grigsby PW. Curative radiation therapy for locally advanced cervical cancer: brachytherapy is NOT optional. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; **88**(3): 537-9.
 48. Viswanathan AN, Beriwal S, De Los Santos JF, et al. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part II: high-dose-rate brachytherapy. *Brachytherapy* 2012; **11**(1): 47-52.
 49. Giaccia EJHaAJ. Radiobiology for the Radiologist. Eight ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.

50. Yadav A, Kumar B, Teknos TN, Kumar P. Bazedoxifene enhances the anti-tumor effects of cisplatin and radiation treatment by blocking IL-6 signaling in head and neck cancer. *Oncotarget* 2017; **8**(40): 66912-24.
51. Riaz MA, Sak A, Erol YB, Groneberg M, Thomale J, Stuschke M. Metformin enhances the radiosensitizing effect of cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines with different cisplatin sensitivities. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 1282.
52. Sanli T, Steinberg GR, Singh G, Tsakiridis T. AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism: a novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway. *Cancer Biol Ther* 2014; **15**(2): 156-69.
53. Steel GG. The radiobiology of human tumour cells. *Br J Radiol Suppl* 1988; **22**: 116-20.
54. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of radiobiology. *Int J Radiat Biol* 1989; **56**(6): 1045-8.
55. Mitchell JB, Bedord JS, Bailey SM. Dose-rate effects on the cell cycle and survival of S3 HeLa and V79 cells. *Radiat Res* 1979; **79**(3): 520-36.
56. Palcic B, Skarsgard LD. Reduced oxygen enhancement ratio at low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* 1984; **100**(2): 328-39.
57. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 1965; **205**: 698-9.
58. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**(7): 502-16.
59. Ajani JA, Winter KA, Gunderson LL, et al. Fluorouracil, mitomycin, and radiotherapy vs fluorouracil, cisplatin, and radiotherapy for carcinoma of the anal canal: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; **299**(16): 1914-21.
60. Marcu L, Bezak E, Olver I. Scheduling cisplatin and radiotherapy in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck: a modelling approach. *Phys Med Biol* 2006; **51**(15): 3625-37.
61. Lawrence TS, Blackstock AW, McGinn C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Radiat Oncol* 2003; **13**(1): 13-21.

62. Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout J, Kal HB, Theeuwes AG. Effectiveness in inhibition of recovery of cell survival by cisplatin and carboplatin: influence of treatment sequence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; **20**(6): 1235-41.
63. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol* 2019; **53**(2): 148-58.
64. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; **740**: 364-78.
65. Isonishi S, Ohkawa K, Tanaka T, Howell SB. Depletion of protein kinase C (PKC) by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) enhances platinum drug sensitivity in human ovarian carcinoma cells. *Br J Cancer* 2000; **82**(1): 34-8.
66. Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 2000; **60**(21): 6039-44.
67. Bardella C, Dettori D, Olivero M, Coltella N, Mazzone M, Di Renzo MF. The therapeutic potential of hepatocyte growth factor to sensitize ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel in vivo. *Clin Cancer Res* 2007; **13**(7): 2191-8.
68. Lin CT, Lai HC, Lee HY, et al. Valproic acid resensitizes cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Sci* 2008; **99**(6): 1218-26.
69. Canto C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**(20): 3407-23.
70. Kanigur-Sultuybek G, Guven M, Onaran I, Tezcan V, Cenani A, Hatemi H. The effect of metformin on insulin receptors and lipid peroxidation in alloxan and streptozotocin induced diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995; **6**(3-4): 271-80.
71. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 2005; **54**(6): 829-34.
72. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2014; **10**(3): 143-56.

73. Lega IC, Lipscombe LL. Review: Diabetes, Obesity, and Cancer-Pathophysiology and Clinical Implications. *Endocr Rev* 2020; **41**(1).
74. 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.
75. Coyle C, Cafferty FH, Vale C, Langley RE. Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 2016; **27**(12): 2184-95.
76. Morales DR, Morris AD. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med* 2015; **66**: 17-29.
77. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; **324**(5930): 1029-33.
78. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 2010; **330**(6009): 1340-4.
79. Faubert B, Boily G, Izreig S, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab* 2013; **17**(1): 113-24.
80. Wu SB, Wei YH. AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1822**(2): 233-47.
81. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**(2): 85-95.
82. Pollak M. Potential applications for biguanides in oncology. *J Clin Invest* 2013; **123**(9): 3693-700.
83. Algire C, Moiseeva O, Deschenes-Simard X, et al. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; **5**(4): 536-43.
84. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin activates an ataxia telangiectasia mutated (ATM)/Chk2-regulated DNA damage-like response. *Cell Cycle* 2011; **10**(9): 1499-501.
85. Daugan M, Dufay Wojcicki A, d'Hayer B, Boudy V. Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol Res* 2016; **113**(Pt A): 675-85.

86. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Lopez-Bonet E, Menendez JA. AMPK: Evidence for an energy-sensing cytokinetic tumor suppressor. *Cell Cycle* 2009; **8**(22): 3679-83.
87. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 2008; **27**(25): 3576-86.
88. Dallaglio K, Bruno A, Cantelmo AR, et al. Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis. *Carcinogenesis* 2014; **35**(5): 1055-66.
89. Song CW, Lee H, Dings RP, et al. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci Rep* 2012; **2**: 362.
90. 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 Res* 2009; **69**(19): 7507-11.
91. 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 Res* 2011; **71**(9): 3196-201.
92. Janjetovic K, Vucicevic L, Misirkic M, et al. Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt. *Eur J Pharmacol* 2011; **651**(1-3): 41-50.
93. Sanli T, Rashid A, Liu C, et al. Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; **78**(1): 221-9.
94. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 2011; **13**(9): 1016-23.
95. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; **30**(2): 214-26.
96. Sanli T, Storozhuk Y, Linher-Melville K, et al. Ionizing radiation regulates the expression of AMP-activated protein kinase (AMPK) in epithelial cancer cells: modulation of cellular signals regulating cell cycle and survival. *Radiother Oncol* 2012; **102**(3): 459-65.

97. Storozhuk Y, Sanli T, Hopmans SN, et al. Chronic modulation of AMP-Kinase, Akt and mTOR pathways by ionizing radiation in human lung cancer xenografts. *Radiat Oncol* 2012; **7**: 71.
98. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, et al. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* 2007; **67**(7): 3043-53.
99. Sanli T, Liu C, Rashid A, et al. Lovastatin sensitizes lung cancer cells to ionizing radiation: modulation of molecular pathways of radioresistance and tumor suppression. *J Thorac Oncol* 2011; **6**(3): 439-50.
100. Fritz G, Brachetti C, Kaina B. Lovastatin causes sensitization of HeLa cells to ionizing radiation-induced apoptosis by the abrogation of G2 blockage. *Int J Radiat Biol* 2003; **79**(8): 601-10.
101. Rashid A, Liu C, Sanli T, et al. Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat Oncol* 2011; **6**: 144.
102. Alexander A, Walker CL. The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. *FEBS Lett* 2011; **585**(7): 952-7.
103. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* 2010; **2010**.
104. Shi Y, Felley-Bosco E, Marti TM, Orlowski K, Pruschy M, Stahel RA. Starvation-induced activation of ATM/Chk2/p53 signaling sensitizes cancer cells to cisplatin. *BMC Cancer* 2012; **12**: 571.
105. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012; **483**(7391): 603-7.
106. Scotto L, Narayan G, Nandula SV, et al. Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; **47**(9): 755-65.

107. den Boon JA, Pyeon D, Wang SS, et al. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**(25): E3255-64.
108. Wingo SN, Gallardo TD, Akbay EA, et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS One* 2009; **4**(4): e5137.
109. Fogarty S, Ross FA, Vara Ciruelos D, Gray A, Gowans GJ, Hardie DG. AMPK Causes Cell Cycle Arrest in LKB1-Deficient Cells via Activation of CAMKK2. *Mol Cancer Res* 2016; **14**(8): 683-95.
110. Menendez JA, Oliveras-Ferreros C, Cufi S, et al. Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle* 2012; **11**(15): 2782-92.
111. Chen YH, Yang SF, Yang CK, et al. Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 2021; **23**(1).
112. Rho SB, Byun HJ, Kim BR, Lee CH. Knockdown of LKB1 Sensitizes Endometrial Cancer Cells via AMPK Activation. *Biomol Ther* 2021; **29**(6): 650-7.
113. Asaka-Amano Y, Takiguchi Y, Yatomi M, et al. Effect of treatment schedule on the interaction of cisplatin and radiation in human lung cancer cells. *Radiation Research* 2007; **167**(6): 637-44.
114. Lee JO, Kang MJ, Byun WS, et al. Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51. *Breast Cancer Res* 2019; **21**(1): 115.
115. Riaz MA, Sak A, Erol YB, Groneberg M, Thomale J, Stuschke M. Metformin enhances the radiosensitizing effect of cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines with different cisplatin sensitivities. *Sci Rep-Uk* 2019; **9**.
116. He Q, Li J, Dong F, Cai C, Zou X. LKB1 promotes radioresistance in esophageal cancer cells exposed to radiation, by suppression of apoptosis and activation of autophagy via the AMPK pathway. *Mol Med Rep* 2017; **16**(2): 2205-10.
117. Brown SL, Kolozsvary A, Isrow DM, et al. A Novel Mechanism of High Dose Radiation Sensitization by Metformin. *Frontiers in Oncology* 2019; **9**.

118. Storozhuk Y, Hopmans SN, Sanli T, et al. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK. *Brit J Cancer* 2013; **108**(10): 2021-32.
119. Lee JO, Kang MJ, Byun WS, et al. Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51. *Breast Cancer Research* 2019; **21**(1).
120. Sun YM, Chen XC, Zhou YJ, et al. Metformin reverses the drug resistance of cisplatin in irradiated CNE-1 human nasopharyngeal carcinoma cells through PECAM-1 mediated MRPs down-regulation. *Int J Med Sci* 2020; **17**(16): 2416-26.
121. Wandee J, Prawan A, Senggunprai L, Kongpetch S, Tuszkorn O, Kukongviriyapan V. Metformin enhances cisplatin induced inhibition of cholangiocarcinoma cells via AMPK-mTOR pathway. *Life Sciences* 2018; **207**: 172-83.
122. Morelli AP, Tortelli TC, Pavan ICB, et al. Metformin impairs cisplatin resistance effects in A549 lung cancer cells through mTOR signaling and other metabolic pathways. *International Journal of Oncology* 2021; **58**(6).
123. Qi XF, Xu WG, Xie JQ, et al. Metformin sensitizes the response of oral squamous cell carcinoma to cisplatin treatment through inhibition of NF-kappa B/HIF-1 alpha signal axis. *Sci Rep-Uk* 2016; **6**.
124. Janjetovic K, Vucicevic L, Misirkic M, et al. Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt. *European Journal of Pharmacology* 2011; **651**(1-3): 41-50.
125. Takiuchi T, Machida H, Hom MS, et al. Association of Metformin Use and Survival Outcome in Women With Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017; **27**(7): 1455-63.
126. Tsakiridis T, Pond GR, Wright J, et al. Metformin in Combination With Chemoradiotherapy in Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: The OCOG-ALMERA Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2021; **7**(9): 1333-41.
127. Skinner H, Hu C, Tsakiridis T, et al. Addition of Metformin to Concurrent Chemoradiation in Patients With Locally Advanced Non-Small Cell Lung

- Cancer: The NRG-LU001 Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2021; **7**(9): 1324-32.
128. K. Han TWF, T. Shek, J.M. Croke, N. Dhani, D.P. D'Souza, T.Y. Lee, N. Chaudary, R. Cairns, M. Pintilie, D. Vines, D.A. Jaffray, U. Metser, M. Milosevic, M. Koritzinsky. Chemoradiation With or Without Metformin in Locally Advanced Cervical Cancer: Phase II Randomized Trial. *Int J Radiat Oncol* 2021; **111**(3): S19-S20.
 129. Xiao X, He Q, Lu C, et al. Metformin impairs the growth of liver kinase B1-intact cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2012; **127**(1): 249-55.
 130. Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; **13**(9b): 3644-54.
 131. Larminat F, Bohr VA. Role of the Human Ercc-1 Gene in Gene-Specific Repair of Cisplatin-Induced DNA-Damage. *Nucleic Acids Research* 1994; **22**(15): 3005-10.
 132. Dabholkar M, Bostick-Bruton F, Weber C, Bohr VA, Egwuagu C, Reed E. ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**(19): 1512-7.
 133. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998; **16**(1): 309-16.
 134. Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)* 2010; **9**(7): 745-53.
 135. Braunstein S, Badura ML, Xi QR, Formenti SC, Schneider RJ. Regulation of Protein Synthesis by Ionizing Radiation. *Molecular and Cellular Biology* 2009; **29**(21): 5645-56.
 136. Guo LM, Cui J, Wang HR, et al. Metformin enhances anti-cancer effects of cisplatin in meningioma through AMPK-mTOR signaling pathways. *Mol Ther-Oncolytics* 2021; **20**: 119-31.

137. Sariaydin T, Cal T, Dilsiz SA, Canpinar H, Bucurgat UU. In vitro assessment of cytotoxic, apoptotic and genotoxic effects of metformin. *Istanb J Pharm* 2021; **51**(2): 167-74.
138. Zhao H, Zhuang YF, Li RB, et al. Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. *Oncology Letters* 2019; **17**(1): 42-54.
139. Jones RG, Plas DR, Kubek S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005; **18**(3): 283-93.
140. Lai TC, Chow KC, Lin TY, et al. Expression of 53BP1 as a cisplatin-resistant marker in patients with lung adenocarcinomas. *Oncology Reports* 2010; **24**(2): 321-8.
141. Dabholkar M, Bostickbruton F, Weber C, Bohr VA, Egwuagu C, Reed E. Ercc1 and Ercc2 Expression in Malignant-Tissues from Ovarian-Cancer Patients. *J Natl Cancer I* 1992; **84**(19): 1512-7.

EKLER

Ek-1. Kimyasal Maddeler ve Kitler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddelerin ve kitlerin adları ve üretildikleri firmaların adları aşağıda sıralanmıştır.

Ürün Adı	Firma Adı ve Üretildiği Ülke
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biological Industries-İsrail
FBS (Fötal Dana Serum)	Biological Industries-İsrail
L-glutamin	Biological Industries-İsrail
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries-İsrail
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Biological Industries-İsrail
Tripan Mavisi	Lozan-İsviçre
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	Thermo Scientific-ABD
Tripsin %0.05 (1X)	Biological Industries-İsrail
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Isolab-Almanya
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma Aldrich-Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma Aldrich-Almanya
Metformin	Sigma-ABD
Sisplatin	Sigma-ABD
A769662	Abcam-İngiltere
Compound C	Abcam-İngiltere
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Serva-Almanya
RIPA Buffer	Thermo Scientific-ABD
Proteaz & Fosfataz İnhibitör Kokteyli	Thermo Scientific-ABD
Bovine Serum Albumin (BSA) Standart Seti	Thermo Scientific-ABD
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific-ABD
β -merkaptoetanol	Bio-Rad-ABD
Tris-Glisin-SDS (TGS)	Bio-Rad-ABD

Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit	Bio-Rad-ABD
10% Tween	Bio-Rad-ABD
10x Tris Buffered Saline (TBS),	Bio-Rad-ABD
Mini-PROTEAN TGX Gels	Bio-Rad-ABD
Etanol	Merck-Almanya
Blue Block	Serva-Almanya
Super Signal West-femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific-ABD
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific-ABD
β -actin Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
53BP1 Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
p-53BP1 Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
Histon H2A.X Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
p-Histon H2A.X Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
ERCC1 Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
HRP-linked Anti-Rabbit IgG sekonder antikor	Cell Signaling Technology- ABD
Rnase, P7003	Sigma-ABD
Propidium Iodide, P4170	Sigma-ABD
Mikoplazma deteksiyon kiti	Biological Industries-İsrail
Agar	Lozan-İsviçre
6x loading dye	SNP Biyoteknoloji-Türkiye
100 bp DNA ladder	GeneOn-Almanya

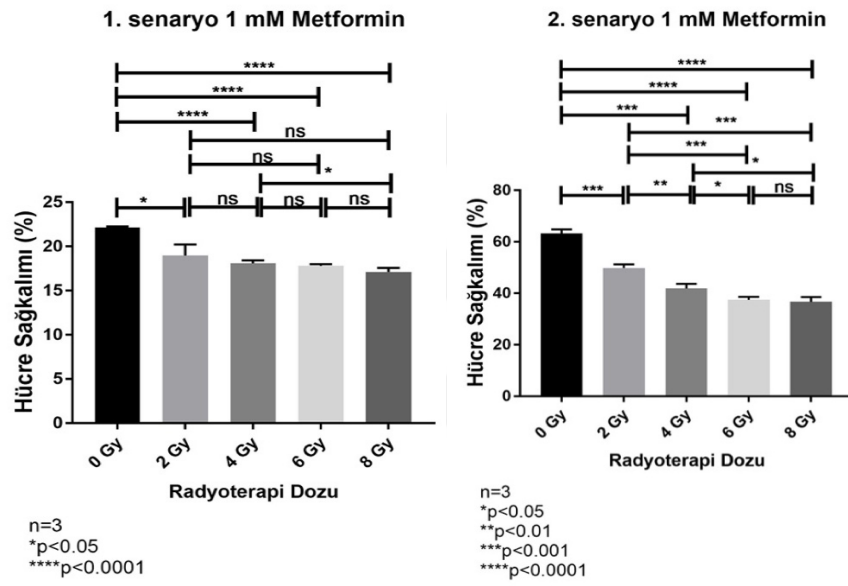
Ek-2. Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazların adları ve üretildikleri firmaların adları aşağıda sıralanmıştır.

Cihaz Adı	Firma Adı ve Üretildiği Ülke
BioSpectrum Imaging System	Ultra-Violet Products-İngiltere
Faz/Kontrast Mikroskop	Olympus-İngiltere
Etüv	Heraeus-Almanya
Otomatik Çalkalayıcı	Heidolph-Almanya
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Eppendorf-Almanya
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad-ABD
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis	Bio-Rad-ABD
Spektrofotometre	Spectramax-ABD
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Electron-ABD
Santrifüj	Heraeus-Almanya
-196 Sıvı Azot Tankı	Thermo Scientific- ABD
Buz makinası	Scotsman AF200-İngiltere
Jel Yürütme Tankı	Thermo Scientific-ABD
Hassas Terazı	Denver Instrument-ABD
Vorteks	Clofton Cycline-İngiltere
Distile Su Cihazı	Millipore-Almanya
Çalkalayıcı	GFL-Almanya
Isıtma Bloğu	Techne Dri Bloc-İngiltere
Manyetik Karıştırıcı	Ika RH Basic-Almanya
Çeker Ocak	Ünitest-Türkiye
Dikey Akımlı Hava Kabini	Thermo-Electron-ABD
Su Banyosu	GFL-Almanya
+4 °C Soğuk Oda	Alarko Carrier-Türkiye
+4 °C Buzdolabı	Bosch-Almanya
-20 °C Derin Dondurucu	Bosch-Almanya
Thoma Lamı	Neubauer-ABD
Akım Sitometri	Cytoflex, BeckmanCoulter-ABD
Lineer Hızlandırıcı RT Cihazı	Elekta Versa HD-İsveç
Arktık Thermal Cyclers	Thermo Scientific-ABD

Ek-3. Birinci ve ikinci senaryoda 1 mM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi

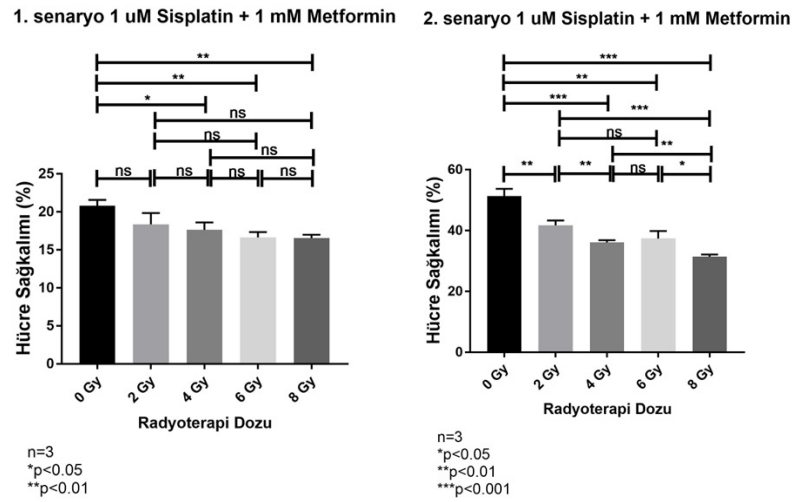
Birinci senaryo deney grubunda 1 mM metformin uygulanması ile sağkalım oranı %17-18 bandında olsa da ilaç/IR uygulanmayan gruptaki optik dansite ile karşılaştırıldığında canlı hücre kalmadığı, 2. senaryoda ise canlılığın belirgin olarak IR ile birlikte azaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle protein analizi yapılacak olan sonraki deneylerde 1 mM metformin dozu tercih edilmemiştir (Şekil Ek-3).



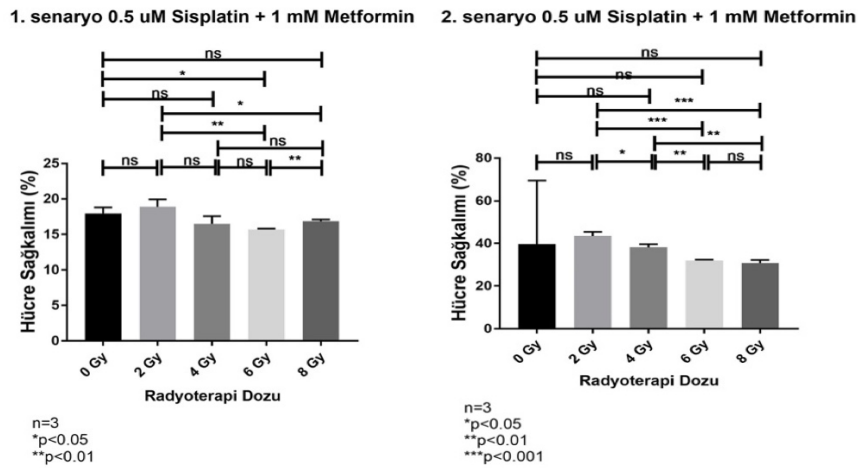
Şekil Ek-3. Birinci ve ikinci senaryoda 1 mM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Ek-4. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 1 mM metformin ve 0,5 μ M sisplatin + 1 mM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi

Her iki senaryoda da hem 0,5 μ M sisplatin hem de 1 μ M sisplatin, 1 mM metformin eklenmesi hücrelerde toksik etki yaratmıştır. Bu etki 1 mM metforminin tek başına toksik etkisinden kaynaklanmaktadır (Şekil Ek-4.1-2).



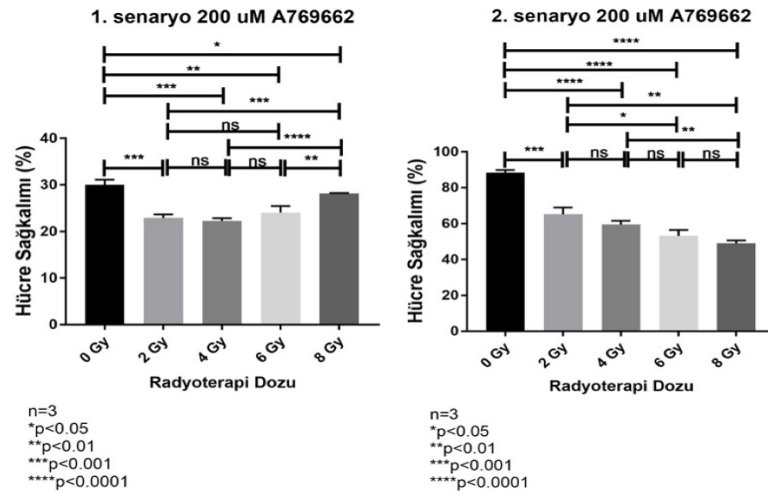
Şekil Ek-4.1. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 1 mM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.



Şekil Ek-4.2. Birinci ve ikinci senaryoda 0,5 μ M sisplatin + 1 mM metformin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Ek-5. Birinci ve ikinci senaryoda 200 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi

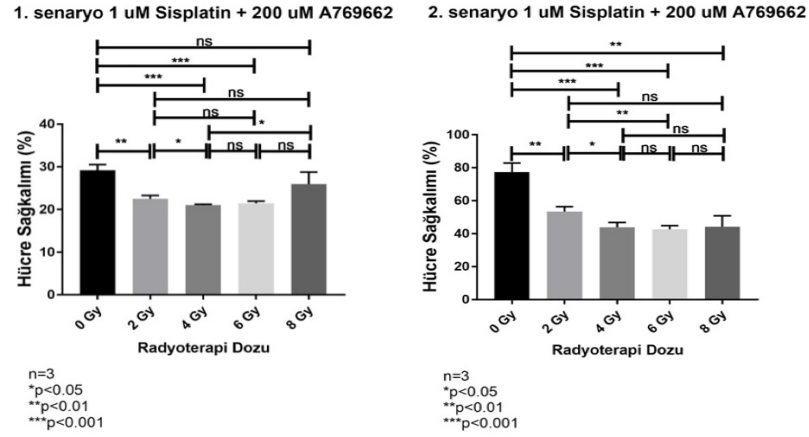
Birinci senaryoda daha belirgin olmak üzere 200 μ M A769662'nin hücre üzerine toksik etki gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle protein analizi yapılacak olan sonraki deneylerde 200 μ M A769662 dozu tercih edilmemiştir (Şekil Ek-5).



Şekil Ek-5. Birinci ve ikinci senaryoda 200 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Ek-6. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 200 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi

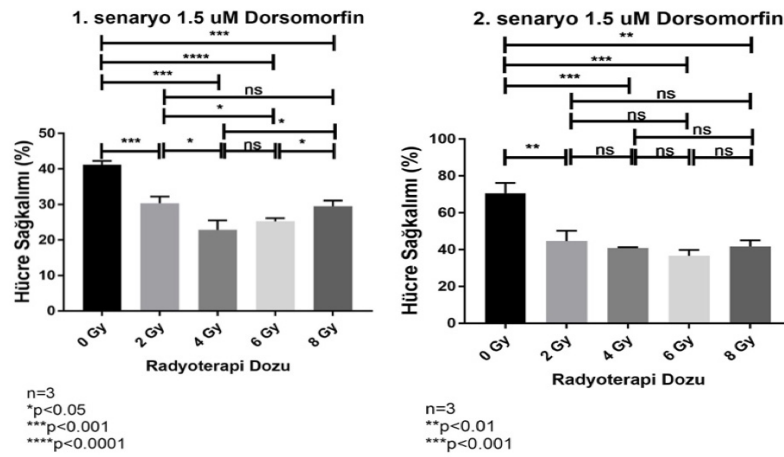
Birinci senaryoda daha belirgin olmak üzere 1 μ M sisplatin + 200 μ M A769662 eklendiğinde A769662'nin toksik etkisinden dolayı hücrelerde toksik etki görülmüştür (Şekil Ek-6).



Şekil Ek-6. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 200 μ M A769662 eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Ek-7. Birinci ve ikinci senaryoda 1,5 μ M dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi

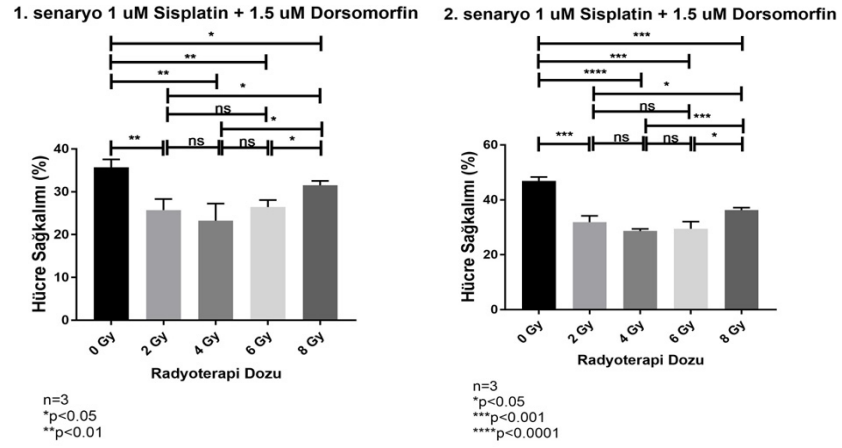
Birinci senaryoda 1,5 μ M dorsomorfin eklendiğinde 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy ve 8 Gy gruplarında IR uygulanmayan gruba göre sağkalımda düşüş görülmektedir. İkinci senaryoda ise artan IR dozlarıyla birlikte hücre sağkalımı azalmaktadır. Bu bulgular dorsomorfinin de tek başına radyoduyarlılaştırıcı bir ajan olduğunu göstermektedir (Şekil Ek-7).



Şekil Ek-7. Birinci ve ikinci senaryoda 1,5 μ M dorsomorfin eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

Ek-8. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 1,5 μ M dorsomorfın eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi

Her iki senaryoda da 1 μ M Sisplatin'e 1,5 μ M eklenmesinin sağkalımda düşüşe neden olduğu görülmektedir (Şekil Ek-8).

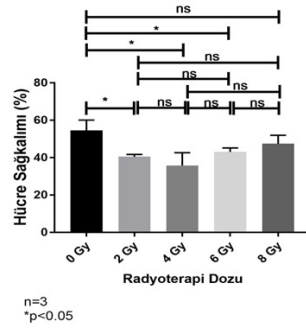


Şekil Ek-8. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 1,5 μ M dorsomorfın eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

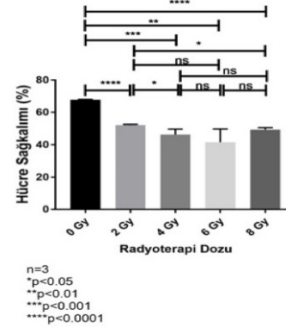
Ek-9. Birinci ve ikinci senaryoda üç ilaç kombinasyonu uygulanan hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi

Üç ilaç kombinasyonu uygulanan hücrelerde sağkalım çok düşük olup, toksik etkiye neden olmuştur (Şekil Ek-9.1-4).

1. senaryo 1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin + 0.5 μ M Dorsomorfın

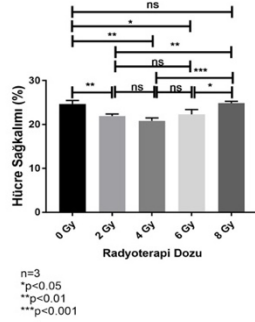


2. senaryo 1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin + 0.5 μ M Dorsomorfın

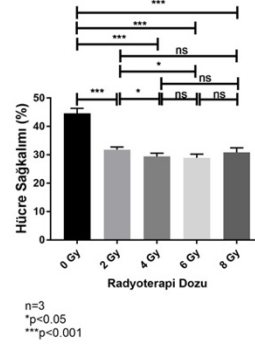


Şekil Ek-9.1. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 150 μ M metformin + 0,5 μ M dorsomorfın eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

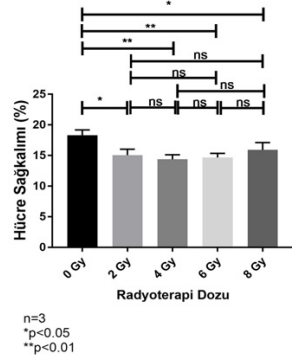
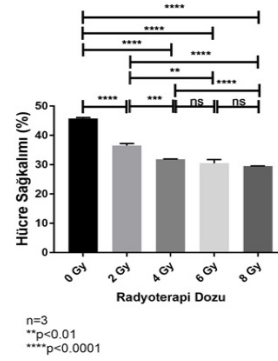
1. senaryo 1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin + 1.5 μ M Dorsomorfın



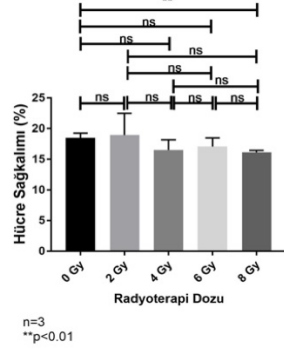
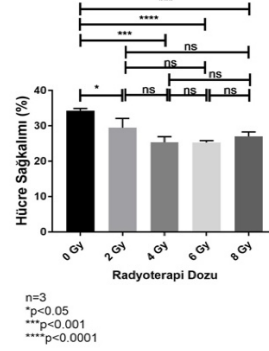
2. senaryo 1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin + 1.5 μ M Dorsomorfın



Şekil Ek-9.2. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M Sisplatin + 150 μ M Metformin + 1,5 μ M dorsomorfın eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

1. senaryo 1 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin + 0.5 μ M Dorsomorfın2. senaryo 1 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin + 0.5 μ M Dorsomorfın

Şekil Ek-9.3. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 1 mM metformin + 0,5 μ M dorsomorfın eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.

1. senaryo 1 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin + 1.5 μ M Dorsomorfın2. senaryo 1 μ M Sisplatin + 1 mM Metformin + 1.5 μ M Dorsomorfın

Şekil Ek-9.4. Birinci ve ikinci senaryoda 1 μ M sisplatin + 1 mM metformin + 1,5 μ M dorsomorfın eklenen hücre dizisinin IR dozlarına göre sağkalımdaki değişimi.