

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**miR-506 İFADESİ ARTTIRILAN MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME
KANSERİ HÜCRELERİNDE METFORMİNİN APOPTOTİK HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Suraya QAYOUMİ

1900006131

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

OCAK 2023

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**miR-506 İFADESİ ARTTIRILAN MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME
KANSERİ HÜCRELERİNDE METFORMİNİN APOPTOTİK HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Suraya QAYOUMİ

1900006131

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YILMAZER

Dr. Pelin ÖZFİLİZ

OCAK 2023

ÖNSÖZ

Bu çalışmam boyunca beni cesaretlendiren, sahip olduğu değerli bilgi ve tecrübeleriyle zor yolu kolaylaştıran bana destek olan saygıdeğer tez danışman hocam Dr. Özge Rencüzoğulları sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimde bana tecrübeleriyle yol gösteren, bana bu zor yolu kolaylaştıran çok kıymetli hocamı Dr. Alp AYAN'a, teşekkür ederim.

Dr. Pelin ÖZFİLİZ'e, Dr. Burcu AYHAN ŞAHİN'e, Dr. Tamer GÜMÜŞ'e Dr. Sinan MERİÇ'e, laboratuvar çalışma sürem boyunca hoş sohbetleriyle yanımda olan değerli hocalarım gösterdikleri destek için teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her zaman arkamda duran kıymetli, annem Sabira QAYOUMI, babam Sayed Mukhtar QAYOUMI, ve ablam Sabrina QAYOUMI, kardeşim Susun QAYOUMI, Freshta QAYOUMI ve bütün ailemden değer kardeşlerim sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda birlikte çalışan, Zehra Giritlioğlu ve Yiğit Efe Aydın, Seda Nur Özer destek için teşekkür ederim.

Suraya Qayoumi

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
SİMGE LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	3
2.3. Meme Kanseri Tipleri.....	5
2.4. Meme Kanseri Evreleri.....	5
2.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	6
2.6. Meme Kanserinin Genetik Temelleri.....	7
2.6.1. BRCA1 Geni.....	7
2.6.2. BRCA2 Geni.....	8
2.6.3. HER2.....	8
2.6.4. PI3K/AKT/mTOR Sinyal yolağı.....	8
2.6.4.1. Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K).....	8
2.6.4.2. mTOR yolağı.....	9
2.6.4.3. AKT.....	10
2.6.4.4. PI3K/AKT/mTOR yolakları aktivasyonu.....	10
2.6.4.5. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolakları ve Meme Kanseri.....	11
2.7. Mikro RNA (miRNA).....	13
2.7.1. miR-506.....	14
2.8. AMPK.....	15
2.8.1. AMPK'nin Moleküler Regülasyonu.....	15

2.9. Metformin nedir?.....	15
2.9.1. Metforminin Mekanizması	16
2.10. Apoptoz	18
2.10.1 Apoptoz 'da Rol Alan Düzenleyici Moleküller.....	18
2.10.2. Apoptoz Tipleri.....	18
2.10.2.1. İç Mitokondriyal yolak.....	19
2.10.2.2. Dış yolak	20
2.10.3.Bcl-2	21
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Metforminin Hazırlanışı	23
3.2. 10x TBS ve 1X TBS-T	23
3.3. Hücre Dondurma Solüsyonunun	23
3.4. miR-506.....	23
4. YÖNTEMLER	23
4.1. Hücre kültürü.....	23
4.2. Hücre Dondurma	24
4.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	24
4.4. Floresan Boyama	24
4.4.1. DAPI (4'6 Diamidino-2-fenilindo) Boyaması.....	24
4.4.2. DiOC6 (3 ,3-Diheksiloksakarbosiyamin).....	25
4.4.3. PI (Propidyum iyodür).....	25
4.4.4. AO (3,6-dimetilaminoakridin Akridin turuncusu)	25
4.5. Koloni Oluşumu	25
4.6. Yara İyileşme Yöntemi	26
4.7. Protein İzolasyonu	26
4.8. Bradford Protein Miktar Tayini.....	26
4.9. İmmunoblotlama Yöntemi	27

4.10. Asılı Damla Modeli Tekniđi.....	27
4.11. PI Analizi.....	28
4.12. İstatiksel Analiz.....	28
5. BULGULAR	29
5.1. Metformin uygulamasının MDA- MB231 ve MCF-7 hücre canlığı üzerinde etkisinin gösterilmesi.....	29
5.2. MDA-M-231 ve MCF-7 Hücrelerine Doza Bağlı Metformin Uygulamalarının Hücre Ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisinin Gösterilmesi	31
5.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde miR-506 seviyesinin incelenmesi.....	33
5.4. Metformin ve miR-506 uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin MDA- MB-231 VE MCF-7 meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi.....	35
5.5. MCF-7 ve MDA- MB-231 meme kanseri hücre migrasyonuna miR-506 ve metforminin etkisinin incelenmesi	36
5.6. MDA-MB231 ve MCF-7 Meme kanseri Hücrelerinde miR-506 ve Metformin Uygulamasının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Gösterilmesi	39
5.7. miR-506 İfadesinin Metformin Uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Üç Boyutlu Sferoid Kültür Formu Oluşturma Potansiyeline Etkisinin İncelenmesi	40
5.8. MDA-MB-231 Ve MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatlarında miR-506 İfadesine Göre Metforminin Apoptotik Hücre Ölüm Mekanizmasına Etkisinin İncelenmesi.....	42
6. TARTIŞMA.....	46
7. KAYNAKÇA	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Farklı kanser türleri arasında kanser insidansı ve mortalite dağılımı	3
Şekil 2. 2018 yılına ait tahmini 2,1 milyon meme kanseri vakası teşhis edilmesi (Uluslararası kanser Araştırmaları Ajansı (ISIR) verisi).	4
Şekil 3. Meme kanserinin evreleri	6
Şekil 4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları.....	11
Şekil 5.PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının meme kanseri ile ilişkisi.....	12
Şekil 6. miR-506'nın tümör baskılayıcı aktivitesinin altında yatan mekanizmalar ...	14
Şekil 7. Metformin kimyasal yapısı	15
Şekil 8. Metforminin insülin direnci, serum insülini ve meme kanseri agresif biyolojisi için önemli olan sinyal yolları üzerindeki etkisini göstermektedir.	17
Şekil 9. Karaciğerde metformin sinyalizasyonu	18
Şekil 10. Memeli hücrelerinde programlı hücre ölümü yolları. İntrinsik (iç) mitokondriyal ve ekstrinsik (dış) apoptotik yollar.....	21
Şekil 11. Bcl2 ailesi üyeleri	22
Şekil 12. MDA-MB-231 hücrelerinde doza bağlı Metformin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	29
Şekil 13. MCF-7 hücrelerinde doza bağlı Metformin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	30
Şekil 14. MCF-7 hücrelerine uygulanan metforminin hücre ölümüne etkisinin floresan mikroskopunda incelenmesi. Metformin (2.5 mM ve 5 mM) olarak MCF-7 hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır. PI, DiOC6, DAPI ve acridine orange floresan boyaları ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir.	32
Şekil 15. MDA-MB-231 hücrelerinde metforminin hücre ölümüne etkisinin floresan mikroskopunda incelenmesi. Metformin (2,5 mM ve 5 mM) olarak MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır. PI, DiOC6, DAPI ve acridine orange floresan boyaları ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir.	33
Şekil 16. miR-506 ifadesi arttırılan MCF-7 hücrelerinde transfeksiyon başarısı ve metforminin miR-506 ifadesine etkisinin gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelenmesi	34

Şekil 17. miR-506 ifadesi arttırılan MCF-7 hücrelerinde transfeksiyon başarısı ve metforminin miR-506 ifadesine etkisinin gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelenmesi	35
Şekil 18. miR-506 ifadesi arttırılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine metformin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi.....	36
Şekil 19 Normal ve miR-506+ MCF-7 hücrelerinde metformin uygulamalarının hücre migrasyonuna etkisinin incelenmesi	37
Şekil 20. MDA-MB-231 hücrelerinde miR-506 ve metformin uygulamalarının hücre migrasyonuna etkisi yara iyileşmesi deneyi ile incelenmiştir.....	38
Şekil 21. MCF-7 Meme kanseri Hücrelerinde miR-506 ve metformin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi	39
Şekil 22. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde miR-506 ve metformin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi.....	40
Şekil 23. miR-506 ifadesinin MCF-7 hücrelerinde metformin varlığında ve yokluğunda üç boyutlu sferoid kültür formlarına etkisinin asılı damla metodu ile gösterilmesi.	41
Şekil 24. miR-506 ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinde metformin varlığında ve yokluğunda üç boyutlu sferoid kültür formlarına etkisinin asılı damla metodu ile gösterilmesi.	42
Şekil 25. miR-506 ifadesi arttırılan ve normal MCF-7 hücrelerinde metformin uygulamasının apoptotik hücre ölüm mekanizmasında görevli protein ifadelerine etkisinin immunoblotlama ile incelenmesi.....	43
Şekil 26. miR-506 ifadesi arttırılan ve normal MDA-MB-231 hücrelerinde metformin uygulamasının apoptotik hücre ölüm mekanizmasında görevli protein ifadelerine etkisinin immnoblottlama ile incelenmesi.....	44
Şekil 27. miR-506 ifadesi arttırılan ve normal MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde metformin uygulamasının AMPK ifadesine etkisinin immunoblotlama ile incelenmesi.	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanseri Tipleri (19).....	5
Tablo 2. Meme kanserinin değiştirilebilen ve değiştirilemez risk faktörleridir (23)..	6



KISALTMALAR

AMPK: Adenosin monofosfat ile aktive edilen protein Kinaz

BRCA1: Meme kanseri A1 geni

BRCA2: Meme kanseri A2 geni

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz

mTOR: Rapamisin Protein kompleksinin memeli hedefi

miRNA: MikroRNA

HER2: insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2

Met: Metformin

SDS: sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

MTT: 3-(4,5-dimetiltrizol-2-i) 2,5-difeniltrazolium bromid

PARP: poli-ADP riboz polimeraz

TBS-T: TBS-TWEEN

TBS: Tris tamponlu tuz çözeltisi

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenişindol

DiOC6: 3,3-dihexyloxacarbocyanine iodide

DMSO: Dimetil sülfoksit

FBS: Fetal sığır serum

AKT: Protein kinaz B

BOX: Bcl-2 İlişkişi X protein

Bcl-2: B Hücreli- lenfoma 2

Bid: Bax-ilk BH3 Protein

DMEM: Dulbecco nun Modifiye Eagle Besiyeri

PI: Propidyum iyodür

mTOR: Memeli Rapamisin Hedefi

OCT1: Organik katyon Taşıyıcı 2

FDA: Gıda ve ilaç Dairesi

MAPK: Mitojenle aktive edilen protein kinaz

EMT: epitelyal-mezenkimal geçiş

DM Diabetes mellitus'

BCL-2: B-hücreli lenfoma 2



SİMGE LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Derece

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

g: Santrifüj kuvveti

gr: Gram

kDa: Kilo Dalton

L: Litre

M: Molar

ml: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

PH: Hidrojen derecesi

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

cm: Santimetre

sa: Saat

ÖZET

Meme kanseri insidansı değerlendirildiğinde ikinci sırada görülen kanserdir. BRCA1 veya BRCA2 genlerinde kalıtsal mutasyonları meme kanseri vakalarında sırasıyla % 72 ve % 69 oranlarında yüksek risk faktörleridir. Menopoz sonrası kullanılan östrojen ve progesteron hormonlarının kombinasyonu, aile öyküsü, genetik mutasyonlar, meme kanseri ile ilişkili olarak değiştirilemeyen risk faktörlerdir.

Metformin, *Galega officinalis* bitkisinden izole edilen ilaçtır. Kan glukoz seviyesini düşürmesindeki ana mekanizma, glukoneogenezisi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini azaması ve insülin duyarlılığını düzeltmesidir. Metformin, tip 2 *Diabetes mellitus*' un (DM) tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. 2014 yılında yapılan bir meta-analizde, metformin kullanan bireylerin meme kanseri insidansı daha düşük göstermiştir. Metformin, AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu nedeniyle anti- proliferatif memeli rapamisin hedefini (mTOR) baskılar hücre büyümesini inhibe eder.

miR-506 ilk olarak primat testislerinde X kromozomuna bağlantılı miRNA kümesi olarak tanımlanmıştır. Anti-onkojenik olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda miR-506'nın restorasyonunun tümör büyümesinin baskıladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, miR-506'nın meme kanseri hücre hatlarında epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT'yi) düzenlemede rolü olduğu incelenmiştir. miR-506 yüksek ifadesinin meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını inhibe ettiğini gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasındaki amaç, miR-506 ifadesi arttırılan MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde metforminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin incelenmesidir. Elde edilen sonuçlarda metforminin meme kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını, koloni oluşumunu, migrasyonunu, inhibe edici etkisi, miR-506 ifadesi arttırıldığında anlamlı ölçüde arttırmıştır. Sonuç olarak, miR-506 ifadesi meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak görev yapmakta ve metforminin etkisini arttırıcı etkisi ilerde yapılacak *in vivo* çalışmalara ön veri oluşturmuştur. miR-506 ve metformin kombinasyonunun hücre canlılığını baskılama ve hücre ölümünü tetiklemedeki rolü hücre içi sinyal yollarına etkisi üzerinden incelenmeye devam edilecektir.

Abstract

Breast cancer is the second most common cancer and inherited mutations in the BRCA1 or BRCA2 genes are high risk factors in 72% and 69% of breast cancer cases, respectively. Combination of estrogen and progesterone hormones used after menopause, family history, genetic mutations are risk factors that cannot be changed in relation to breast cancer.

Metformin is a drug isolated from the *Galega officinalis* plant. The main mechanism in lowering blood glucose level is by inhibiting gluconeogenesis, decreasing hepatic glucose production and improving insulin sensitivity. Metformin is a drug used in the treatment of type 2 diabetes mellitus (DM). In a 2014 meta-analysis, individuals taking metformin had a lower incidence of breast cancer. Metformin inhibits cell growth by suppressing the anti-proliferative mammalian target of rapamycin (mTOR) due to activation of AMP-activated protein kinase (AMPK).

miR-506 was first identified as an X-linked miRNA cluster in primate testes. Restoration of miR-506 has been shown to suppress tumor growth in in vitro and in vivo studies as an anti-oncogenic. Also, the role of miR-506 in regulating the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cell lines was investigated. It has been shown that high expression of miR-506 inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cells.

The aim of this thesis study is to examine the effect of metformin on apoptotic cell death in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells with increased miR-506 expression. In the results obtained, metformin significantly increased cell proliferation, colony formation, migration, and inhibitory effect in breast cancer cells when miR-506 expression was increased. In conclusion, miR-506 expression acts as a tumor suppressor in breast cancer cells and its enhancing effect of metformin has created preliminary data for future in vivo studies. The role of miR-506 and metformin combination in suppressing cell viability and triggering cell death will continue to be examined through its effect on intracellular signaling pathways.

1. GİRİŞ

Normal meme dokusu lobül denilen yapıların bir araya gelmesiyle oluşan lob, meme başına süt yağ dokusunda oluşmaktadır (1). Duktus ve lobüller çevre dokulardan bazal membran ile ayrılmaktadır (2). Meme kanseri kadın sağlığını olumsuz olarak etkileyen ancak en sık görülen kanserdir. Meme kanseri yıllarca Mısırlı hekimler tarafından ölümcül hastalık olarak kabul edilmiştir (3). Meme kanseri kadın ve erkeklerde meme hücrelerinde oluşan bir kanser türüdür. Meme kanseri uzak dokulara yayılma özelliği olan, malign, ya da yayılma özelliği olmayan, benign, türlerden oluşmaktadır. Malign tümörler vücutta periferik veya lenfatik sistemi kullanarak yayılım gösteren (metastaz yapan) hücre topluluklarından oluşmaktadır (4). Meme kanseri insidansı değerlendirildiğinde ikinci sırada görülen kanserdir. Meme kanseri luminal, HER2 pozitif, bazal benzeri ve Normal-Benzeri meme kanseri olarak alt sınıflar olarak tanınmaktadır (5). 2020 yılında yapılan istatistiksel veri analizine göre 2.3 milyon yeni meme kanseri vakası saptanmıştır. Meme kanserine sebep olan değiştirilebilir ve değiştirilemez faktörler bulunmaktadır (6). Erken menarş, geç menopoz, östrojen, progesteron hormonlarının kullanımı, cinsiyet, aile öyküsü ve genetik mutasyonlar değiştirilemeyen risk faktörlerdir. Değiştirilebilen risk faktörleri obezite, hormonal tedavi, fiziksel aktivite, alkol alımı, sigara içmek, ilaçlar, kimyasallara maruz kalma olarak sıralanmaktadır (7).

Metformin, *Galega officinalis* bitkisinden izole edilen ilaçtır. Glukoneogenezisi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini azaltarak ve insülin duyarlılığını düzelterek kan glukoz seviyesini düşürmektedir. Metformin, tip 2 *Diabetes mellitus*' un (DM) terapilerinde kullanılmaktadır. 2014 yılında yapılan bir meta-analizde, metformin kullanan bireylerin meme kanseri insidansının daha düşük olduğu gösterilmiştir (8). Metformin anti-proliferatif etkisini, AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu sağlanarak memeli rapamisin hedefini (mTOR) baskılayarak hücre büyümesini inhibe etmesi ile göstermektedir (9).

PI3K/AKT/mTOR kompleksi, hücre metabolizması, büyümesi, proliferasyonu, apoptoz anjiyogenez gibi aktivitelerde önemli rolü olan bir sinyal yolağıdır. Meme kanserinde, PI3K yolak katalitik ve düzenleyici alt birimleri kodlayan genlerin mutasyonları gözlenmiştir. En sık görülen mutasyonlar, tüm meme kanseri alt tiplerinde tümör dokusu ve/veya dolaşımdaki DNA'da tanımlanan ekzon 9 ve 20 de bulunmuştur.

HER2 gibi RTK reseptörlerinde de meme kanseri mutasyonları görülür ve bu reseptörün fosforilasyonu PI3K/AKT/mTOR aktivasyonuna yol açar. PI3K mutasyonları, PTEN metilasyonu ve AKT aktivasyonu hormonla tedavi direncine neden olur. Everolimus, FDA tarafından onaylanan rapamisin analogu bir ilaçtır. mRNA translokasyonu, protein, lipid sentezinde yer alan hücre büyümesini ve hücre organizasyonu destekleyen mTOR kompleksini inhibe eden rapamisin analogudur. Sonuç olarak, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunda meydana gelen mutasyonların ve aynı zamanda inhibitörlerinin araştırılması meme kanseri hastalarına fayda sağlayabileceği öngörülmektedir (10).

miR-506 ilk olarak Bentwich ve arkadaşları tarafından primat testislerinde X kromozomu ile bağlantılı miRNA kümesi tanımlanmıştır. Yedi farklı diziler ailesini, miR-506, mir-507, miR-508, mir-509, mir-510, mir-513, mir-514 oluşturur. Zhao ve arkadaşları tarafından *in vitro* ve *in vivo* yapılan çalışmalarda miR-506'nın restorasyonunun tümör büyümesinin baskılandığı ve anti-onkojenik özelliği vurgulanmıştır (11). miR-506'nın meme kanseri hücre hatlarının EMT'yi düzenlemede rolü olduğunu bildirmiş ve birçok çalışmada, miR-506'nın kötü huylu tümör tiplerinde tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü gösterilmiştir. Yu ve arkadaşları, miR-506'nin aşırı ekspresyonunun meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını inhibe ettiğini göstermiştir(12).

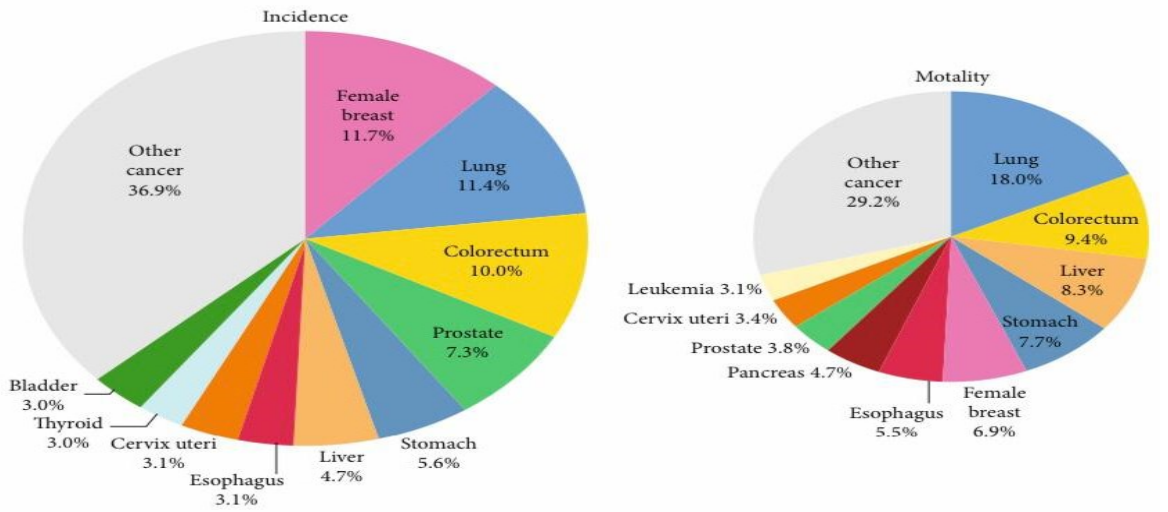
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kontrolsüz bir şekilde hücrelerin anormal büyüme ve genetik değişikliklerle ortaya çıkan mutasyonlarla ifade edilmiştir (13). Meme kanseri duktal epitel veya lobüllerden gelebilen meme dokularının malignitesidir. Meme kanseri (MK) özellikle son yıllarda dünyada, kadınlar arasında en yaygın malignitelerden biri haline gelmiştir, insidansı değerlendirildiğinde, meme kanseri ikinci sırada görülen kanserdir. Meme kanseri heterojen bir gruptan oluşmaktadır (14).

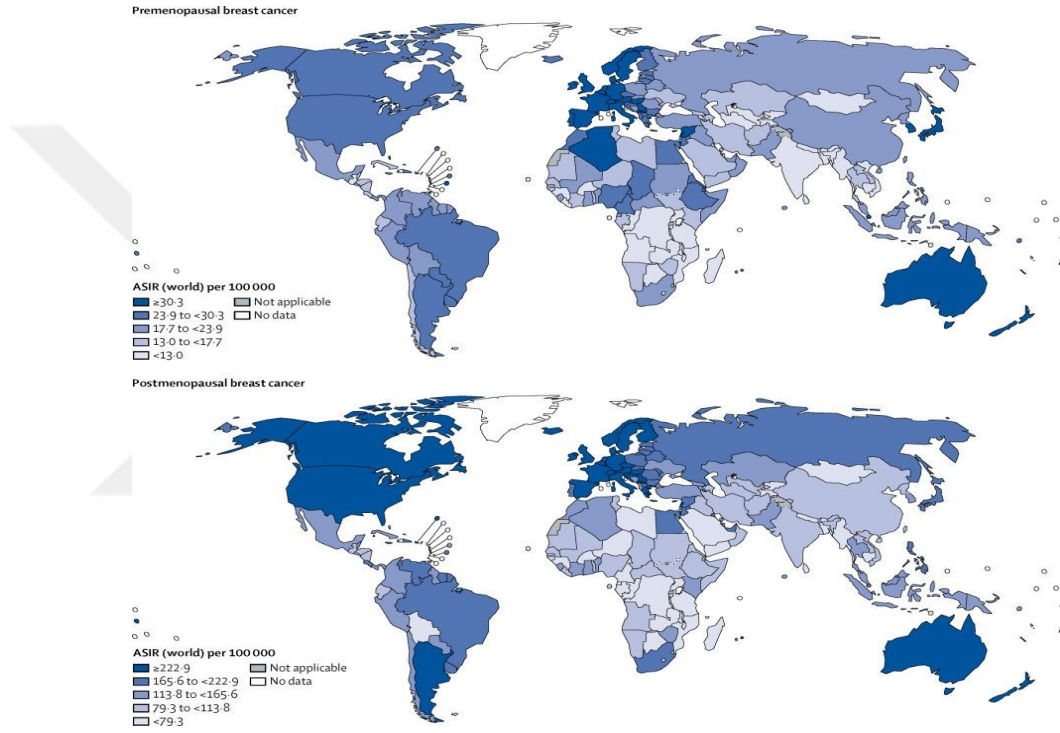
2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

2020 yılında yapılan istatistiksel araştırmalar yeni meme kanseri vakasını 2.3 milyon olarak saptamıştır (15). Melezya, Batı Afrika, Mikronezya ve Karayıp ülkelerinde meme kanseri sebebi ile mortalite daha yüksek olduğundan daha sık, Avustralya, Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa'da daha az görülmektedir. Türkiye'de %89 oranında meme kanseri belirtilmiştir. 1990-2016 arasında meme kanseri Hong-Kong, Singapur Afganistan, Filipinler, Brezilya ve Arjantin gibi ülkelerde iki kat artmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde %29 yeni meme kanseri vakası bildirilmiştir. 2020'deki toplam ölüm sayısı Asya ve Afrika ülkeleri yüzde %63 olarak bildirilmiştir(6).



Şekil 1. Farklı kanser türleri arasında kanser insidansı ve mortalite dağılımı (16).

Kadınlarda menopoz öncesi ve menopoz sonrası meme kanseri 2018’ de, menopoz öncesi meme kanseri <50 yaş olarak tanımlanır menopoz sonrası meme kanseri > 50 yaş olarak tanımlanır. Dünya çapında 2018 yılına ait tahmini 2,1 milyon meme kanseri vakası teşhis edildiği belirtilmiştir. Uluslararası kanser Araştırmaları Ajansı (ISIR)’nın verilerine göre 19,7 milyon menopoz öncesi meme kanseri vakasının ve 152,6 milyon menopoz sonrası meme kanseri vakası tespit edilmiştir (Şekil 2) (17).



Şekil 2. 2018 yılına ait tahmini 2,1 milyon meme kanseri vakası teşhis edilmesi (Uluslararası kanser Araştırmaları Ajansı (ISIR) verisi) (17).

2.3. Meme Kanseri Tipleri

2000 yılında, Perou ve diğerleri tarafından meme kanseri, Luminal, HER2, Bazal Benzeri ve Normal-Benzeri meme kanseri alt tipleri olarak tanımlanmaktadır (18).

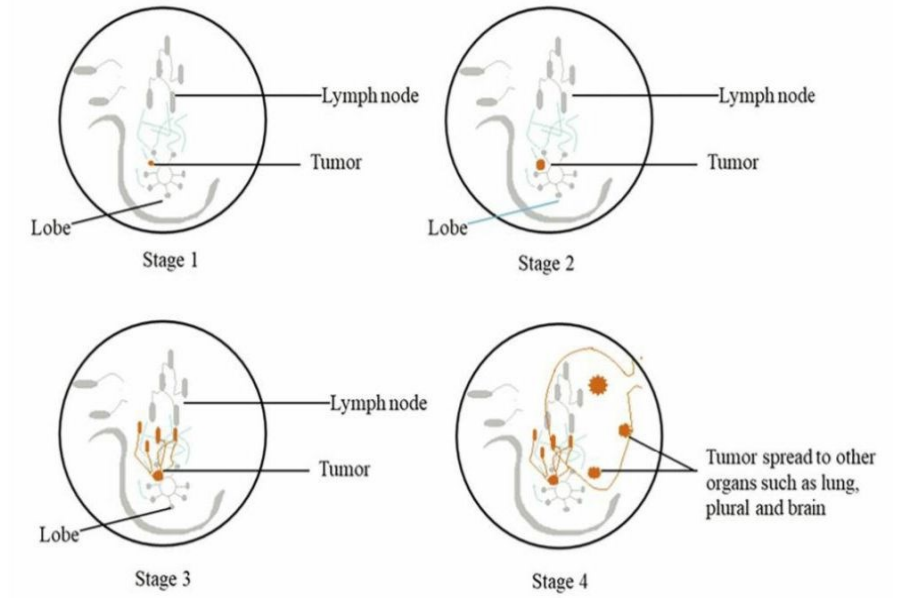
Tablo 1. Meme kanseri Tipleri (19).

Meme kanseri türevleri	Tanım
Luminal A Meme kanseri	Bütün meme kanseri vakalarının 70% 'ini oluşturur. Farklı mutasyonlara sahip tümör dokusu, östrojen (ER) pozitif ve/veya progesteron (PR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) negatif olabilir.
Luminal B Meme kanseri	ER+, düşük PR, HER2- olabilir. ER-, PR-, HER2+ mutasyonlarına sahip olma oranı %10-15 oranlarındadır.
HER2	Üçlü negatif form olarak adlandırılan alt tipte, ER, PR ve HER2 negatif olarak tanımlanmaktadır.

2.4. Meme Kanseri Evreleri

Amerikan Ortak kanser komitesi'ne (AJCC) göre meme kanserinin aşamaları TNM sistemine ayrılmıştır. T meme tümörünün boyutu, N tümörün lenf düğümlerine yayılma derecesi, M vücudun diğer organlarına tümör metastazının derecesi gösterir. Meme kanseri en erken evresi evre 0 veya karsinoma *in situ* olarak adlandırılır. I evrede tümör küçüktür ve meme dışına yayılmamıştır (20). II. evre kanserin çapı 2 cm den küçüktür ve koltuk altı lenf düğümlerinde bulunur. III. evre memede bulunan tümör herhangi boyutta olabilir, kanseri birinci evreye kadar olmayacaktır. Ayrıca kanser göğüs duvarına veya meme derisine de

yayılarak çukurlaşma, iltihaplanma meme cilt renginin değişmesine neden olur. Meme kanseri IV evre beyin, akciğer kemik gibi bölgelere yayılmıştır (21).



Şekil 3. Meme kanserinin evreleri (21)

2.5. Meme Kanser Risk Faktörleri

En önemli risk faktörlerinden biri cinsiyet olmakla birlikte kadınlarda erkelere göre daha yüksek oranda meme kanseri görülmektedir. Aile öyküsü (genetik faktörler) ikinci önemli risk faktörüdür (22).

Tablo 2. Meme kanserinin değiştirilebilen ve değiştirilemez risk faktörleri (23).

Değiştirilemez risk faktörleri	Değiştirilebilen risk faktörleri
<ul style="list-style-type: none"> ○ Kadın cinsiyeti ○ Yaş ○ Aile öyküsü ○ Hamilelik ve emzirme ○ Genetik mutasyonlar ○ Irk ○ Adet ve Menopoz ○ Meme hastalıkları ○ Radyasyon tedavisi 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hormonal replasman tedavisi ○ Fiziksel aktivite ○ Obezite ○ Alkol alımı ○ Sigara içmek ○ Yetersiz vitamin takviyesi ○ Işığa aşırı maruz kalma ○ Kimyasallara maruz kalma ○ İlaçlar

2.6. Meme Kanserinin Genetik Temelleri

Genetik mutasyonlar meme kanserinde önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar kanserleşmede rolü olan hücre bölünmesi ve ölümünde görev alan BRCA1, BRCA2 ve HER2 genlerindeki mutasyonların meme kanserine sebep olduğunu göstermiştir. Meme tümörlerinin erken başlangıcı sıklıkla BRCA1 ve BRCA2 genleriyle ilişkilendirilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 genleri DNA tamir mekanizması ve DNA rekombinasyonunda görev yaparak genomik stabilitenin korunmasını sağlar ve tümör baskılayıcıdır (24).

2.6.1. BRCA1 Geni

BRCA1, BRCA1 ile ilişkili genom izleme kompleksi (BASC) olarak bilinen büyük birçok alt birimli ve diğer tümör baskılayıcılar, DNA hasar sensörleri ve sinyal transdüserleri ile protein kompleks halinde çalışır. BRCA1 proteini, RNA polimeraz II ile birleşerek ve histon deasetilaz kompleksleri ile etkileşime girer. Böylece, ubiquitination ve transkripsiyonel düz Mutant BRCA1 genine sahip kadınların 90 yaşına kadar %80 oranlarında kadar meme kanseri geliştirme riski vardır. Ek olarak, meme kanseri ile birlikte ovaryum kanseri gelişme riski, BRCA1 mutasyonları olan kadınlarda yaklaşık %55'tir.

Mutasyona uğramış bir BRCA1 geni, fonksiyonel olmayan yani DNA hasarını düzeltmeye yardımcı olamayan bir protein üretir. Mutasyon sonucu biriken hasarlı proteinler hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasına ve bir tümör oluşturmak üzere bölünmesine izin verebilir. Böylece, BRCA1 inaktive edici mutasyonlar kanser için bir yatkınlığa yol açtığı söylenebilir (25).

2.6.2. BRCA2 Geni

BRCA2 genindeki germ-line mutasyonları, kadınlarda erken başlangıçlı meme kanseri olan ailelerin yaklaşık %35'inde görülür ve ayrıca kadınlarda yumurtalık kanseri ve erkeklerde meme kanseri gelişme riskinin artmasına neden olur. BRCA2 geninde 500'den fazla mutasyonun bildirildiği ve bunların çoğunun kesik protein üretmesine yol açtığı bulgusu ile tutarlıdır. Bu tip proteini üreten mutasyonlar, bir veya daha fazla nükleotid silme, çoğaltma, çerçeve kayması veya hatalı mutasyonları etkileyebilir veya ekleme işlemine müdahale edebilir (26). Genel olarak, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar STK11, ATM, CHEK2, P53 ve CDH1 genleri gibi genomu sağlam tutmak için gerekli olan genlerdeki mutasyonlar ile birlikte tüm ailesel meme kanseri vakalarının %50'sinde görülmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genleri, meme ve yumurtalık kanserinin otozomal dominant form ve yüksek penetrasyonlu formlarını oluşturmak için en yaygın genlerden ikisidir.

2.6.3. HER2

HER2, epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesi üyesidir. HER2 17. kromozomunun uzun kolunda bulunan bir onko-proteindir. HER2, EGFR/ HER1, HER2, HER3 ve HER4'ten oluşan, hücre büyümesini, sağkalımını, farklılaşmasını ve migrasyonu kontrol eder. HER2 üç monoklonal antikor var, Trastuzumab, Pertuzumab ve margetuksiman. Trastuzumab ve Pertuzumab, HER2 reseptörünün farklı hücre dışı alanlarına bağlanır ve bu nedenle tamamlayıcı etki mekanizmalarına sahiptir. Pertuzumab tek başına orta antitümör aktivite göster ve Trastuzumab ile kombine edildiğinde sinerjistik bir etkiye sahiptir (27). Margetuximab yakın zamanda onaylanmış bir kimerik antikordur. Trastuzumab ile epitop özelliği var, aynı zamanda tasarlanmış bir FC bölgesini içeren, HER2'ye karşı bağışıklık aktivasyonunu artırmaktadır. HER2 aşırı ekspresyonu %15-20'inde agresif meme kanseri ile sonuçlanır (28).

2.6.4. PI3K/AKT/mTOR Sinyal yolağı

2.6.4.1. Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)

Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) hücrede sitoplazmada yer alan bir kinazdır. PI3K sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla, hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını, göçünü, farklılaşmasını, transkripsiyonunu ve translasyonunu düzenler. PI3K, üç alt birimden oluşan bir plazma membranı ile ilişkili lipid kinaz grubu proteindir (29). P85 düzenleyici alt birim,

p55 düzenleyici alt birim ve p110 katalitik alt birimdir. Farklı yapılarına ve spesifik alt katmanlarına göre PI3K 3 sınıfa ayrılır. Sınıf I, II, ve III, sınıf I PI3k'ler sınıf IA ve IB PI3K'lerden oluşur. Sınıf IA PI3K, p58 heterodimeri, p110 katalitik alt birimin insan kanserinde en sık görülen alt birimdir. P110 katalitik alt birimi, düzenleyici p85 alt birimi ile dimerizasyon yoluyla stabilize edilir(30). PI3K fizyolojik koşullarda normalde büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar gibi çeşitli hücre dışı uyaranlar aktive edilir. Son yıllarda, ncRNAs (kodlanmayan RNA) gibi birçok çeşitli gen PI3K/AKT/mTOR yolunun önemli düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır. ncRNA PI3K yolu aktivitelerini etkilemek için hem yukarı akış araçları hem de akış yönünde efektörler olarak işlev görür. ncRNA'ların PI3K yolundaki bileşenleri direkt olarak veya dolaylı olarak (PI3K/AKT/mTOR/PTEN) hedeflediği ve PI3K sinyalleşmesinin aktivitesini düzenlediği bildirilmiştir (31).

PI3K hiper- aktivitesinin insan tümör ilerlemesi, artan tümör yoğunluğu ve kanser hücrelerinin invazyon potansiyeli ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. PI3K inhibe edilmesi kanser tedavi yöntemi olarak klinik tedavilerde kullanılmaktadır (32).

2.6.4.2. mTOR yolağı

mTOR (Rapamisin Protein kompleksinin memeli hedefi), birçok molekülden oluşan bir protein kompleksidir. mTOR yolağı, hücre çoğalması ve hücre içi enerji metabolizması birçok hayati görevi olan bir hücre içi sinyal yolağını oluşturur. Birçok düzenleyici rolü olan bu yolağın kanser, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıklarda da önemli rolleri vardır. mTOR'un immün sistem üzerindeki başlıca etkisi, edinsel bağışıklığı uyarırken, doğal bağışıklığı baskılamasıdır. Örneğin yardımcı T hücrelerini artırırken, düzenleyici T hücrelerini azaltır (33). mTOR, inhibitörleri tedavide yeni bir umut kaynağı olmaktadır. mTOR hücre içerisinde, kompleks 1 (mTORC1) ve kompleksi 2 (mTORC2) olmak üzere iki farklı şekilde yer alır. Bu iki multiprotein kompleksine ve ilişkili oldukları substratlara mTOR yolağı denmektedir. Raptor, mTOR substratlarını toplayıp kompleksi regüle ederek mTORC1 aktivitesini sağlamaktadır (34).

mTOR sinyali, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde genellikle aşırı aktiftir. Bu, mTOR'un kendisindeki mutasyonları içerebilir, ancak daha yaygın olarak meme kanserinde bu, ErbB ailesi reseptörlerinin aktivitesindeki artış veya PI3K sinyalindeki değişiklikler ve mutasyonlarla ilişkilidir. Rapamisin ve analogları (rapaloglar), hücreler arası reseptör FKBP12'ye bağlanır ve daha sonra allosterik bir mekanizma yoluyla ağırlıklı olarak mTORC1 sinyalini inhibe eder. Araştırmalar, mTOR'un inhibisyonunun, tümör büyümesini

yavaşlatma ve kanserin yayılmasını sınırlama etkisi ile kanserlerle mücadelede yararlı bir strateji olduğunu göstermiştir. HER-2 negatif, menopoz sonrası meme kanseri hastalarında eksemestan ile birlikte kullanım için onaylanmış rapalog türevi olan everolimus (RAD-001/Afinitor) ile klinik çalışmalarda kullanılmaktadır.

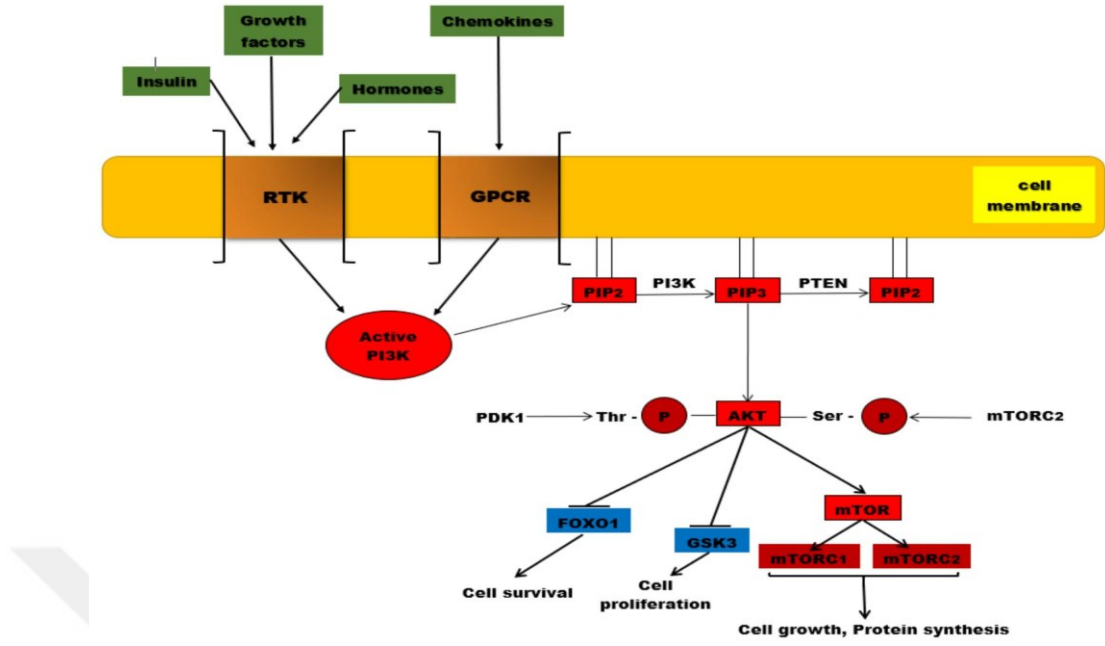
2.6.4.3. AKT

Serin/treonin protein kinaz AKT, PI3K alt sinyal yolağında yer alan moleküldür. AKT'nin üç izoformu vardır. AKT1 dokuların çoğunda ifade edilir, AKT2 esas olarak yüksek duyarlılığa sahip pankreas, karaciğer, kaslar gibi dokularda ifade edilir. AKT3 beyinde ve testislerde daha çok ifade edilir(35). AKT, plazma zarına PIP2 ve PIP3 tarafından bağlanarak aktive edilir. Thr308 ve ser473'ün fosforilasyonu, AKT'nin aktivasyonunu belirler. AKT'nin 100'den fazla substratı vardır bunlar transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü ilerlemesi inhibitörleri, protein kinazlar, GTPaz aktivasyon proteinleri ve apoptoz indükleyicileridir. AKT ana protein substratlarından biri glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3), glikojen sentazı fosforile ve inhibe eden bir protein kinazdır. Geçtiğimiz on yıllar boyunca PI3K sinyal yolunun birçok insan kanserinde deregüle edildiğine inanılmaktadır. PTEN'in kinaz mutasyonları ve/veya ekspresyonu azalmış, neoplastik transformasyon, insan karsinogenezine yol açar. PI3K yolu, tümör baskılayıcı PTEN'in kaybı veya inaktivasyonu, PI3K'nın mutasyonu veya amplifikasyonu ve ayrıca tirozin kinaz, büyüme faktörü reseptörlerinin, yukarıdaki onkogenlerin aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla deregüle edilir (36).

2.6.4.4. PI3K/AKT/mTOR yolakları aktivasyonu

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, PI3K ligandlarının (insülin büyüme faktörleri hormonlar) RTK'lere ve GPCR'ye bağlanmasıyla aktive edilir. PI3K aktive edildiğinde, protein kinaz, PIP2'nin PIP3 fosforilasyonunu katalize eder. AKT birinci treonin kalıntısı düzeyinde PDK1 tarafından katalize edilen ve ikinci reaksiyon mTOR2 tarafından katalize edilen iki fosforilasyon işleminden geçtiği zaman plazma zarından içeri alınır.

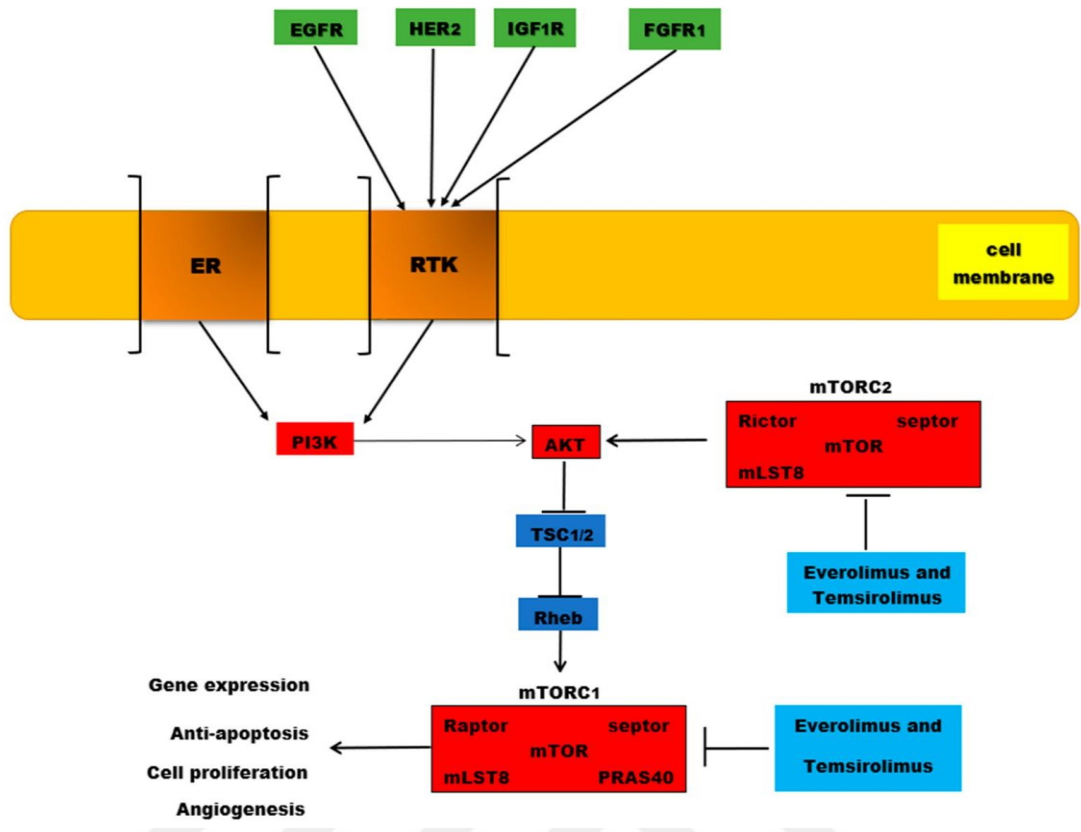
Fosforilasyon ile aktive edildiğinde AKT, hücre proliferasyonu ve hayatta kalması ile bağlantılı olarak mTOR kompleksi gibi molekülleri fosforile ederek aktive eder ve GSK-3 ve FOXO1 moleküllerini ise inhibe etmektedir. PTEN ana negatif sinyal yolağı, PIP3 fosforilasyonunda düzenleyicidir (37).



Şekil 4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları(10)

2.6.4.5. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolları ve Meme Kanseri

PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının meme kanseri ile ilişkisi birçok gözlenmiştir. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, ER, EGFR, HER2, IGF1R ve FGFR1, RTKs tarafından aktive edilir. IGF1R (insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1) ve EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) PI3K ve MAPK'yı (mitojenle aktive olan protein kinaz) aktive eden faktörlerdir. Bu reseptörler ve ER arasındaki ilişki çok karmaşıktır. MAPK, ER α için önemli rol oynayan AKT ile ER'den bağımsız fosforilasyona yol açar. PI3K sinyal yolunun aktivasyonu ve AKT fosforilasyonu, tümör hücrelerinde östrojenden bağımsız büyümeyi ve anti-östrojenlere karşı direnci destekler. AKT fosforilasyon yoluyla TSC'i inhibe eder, ayrıca Rheb'nin inhibisyonuna ve mTOR aktivasyonuna yolu açar(10).



Şekil 5.PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının meme kanseri ile ilişkisi (10)

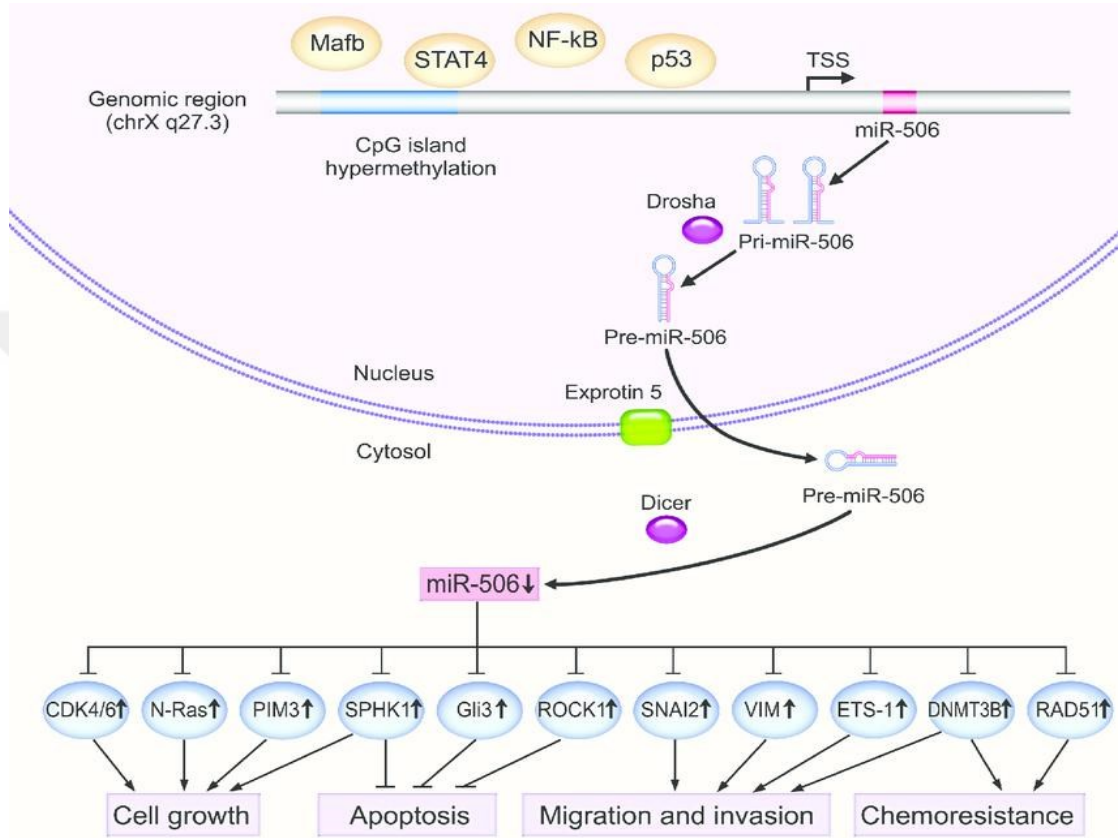
2.7. Mikro RNA (miRNA)

Kodlanmayan RNA (non-coding (nc) RNA) proteine çevrilmeyen RNA'lardır. MikroRNA'lar (miRNAs), bitkiler, hayvanlar ve bazı virüsler dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda bulunan küçük kodlanmayan RNA molekülü ailesinin bir üyesidir (38). Yaklaşık 22 nükleotid içeren miRNA'lar ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenlenir. Kodlanmayan miRNA'ların gen ekspresyonunda, fenotipik değişkenlik şekillenmesinde ve hastalık gelişmesinde regülatör olarak önemli rollerinin olduğu gözlemlenmiştir. MikroRNA'lar işlevlerini çoğunlukla mRNA'nın 3' transle edilmeyen bölgesine (3' UTR) bağlanarak daha azınlıkta 5'-UTR, ORF (open reading frame) ya da promotör bölgelerine bağlanarak yapmaktadırlar. miRNA ekspresyonunun düzensizliği, kanserin başlaması, ilerlemesi ve metastaz ile ilişkilidir. miRNA gen ekspresyon hücresel kontrolü, çevresel streslere, açlık, hipoksi, oksidatif, stres ve kanserle ilişkilendirilen DNA hasarı gibi hücresel kritik öneme sahiptir. miRNA'ların kanserde tümör baskılayıcı rolleri vardır, ve bunların anormal düşük ekspresyonu, apoptozda azalma, hücre büyümesinin artması, istila ve metastaz gibi hücresel süreçlerde anormalliklere ve onkogen fonksiyonunu negatif baskılanması yoluyla tedaviye duyarlılığın azalmasına yol açar(39).

Çok çeşitli tümör baskılayıcı ve onkojenik mRNA'lar inhibisyonuna dayanarak, birtakım yüksek ifade edilen miRNA'lar kanser gelişiminde tümör destekleyici onkomiR'ler olarak rol oynamaktadırlar. Düşük seviyedeki miRNA'lar, tümör büyümesinde fonksiyon kaybına uğrayan tümör baskılayıcılardır(40).

2.7.1. miR-506

miR-506'nın meme kanseri hücre hatlarında migrasyon ve invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. miR-506'nın meme kanseri metastazını etkilemek için IQGAP1 ve MAPK sinyal yolunu baskılama yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir(41).



Şekil 6. miR-506'nın tümör baskılayıcı aktivitesinin altında yatan mekanizmalar(42)

Olgun miR-506, Drosha ve Dicer tarafından çekirdeğin içinde ve dışında RNase III tarafından işlenir. miR-506 çeşitli kanser türlerinde önemli ölçüde düşük seviyede ifade edilir ve N-Ras, PIM3, SPHK1, ROCK1 ve ETS-1 gibi önemli onkogenleri hedefleyerek bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür ve böylece hücre çoğalması gibi kanserle ilgili apoptoz, yaşlanma, kemorezistans, invazyon ve migrasyon gibi önemli süreçleri düzenler. miR-506'nın promotör bölgesindeki CpG bölgelerinin DNA hipermetilasyonu, miR-506 transkripsiyonunu bloke eder(42).

2.8. AMPK

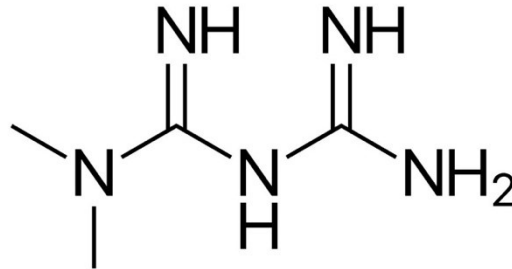
AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), hem tek hücreli organizmalar hem de memelilerde bulunur. AMPK metabolizmanın düzenlenmesinde ve hücrel enerji homeostazının sürdürülmesinde kilit rol oynar. AMPK aktive edildiğinde, glikoz alımı ve yağ asidi oksidasyonu gibi tahrik eder, ve enerji tüketen süreçleri protein ve lipid sentezi gibi azaltır(43). AMPK egzersiz sırasında insanlarda iskelet kasında aktive olur. Düzenli fiziksel aktivite, Tip 2 diyabet, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve obeziteye bağlı ölümlerde azalma göstermiştir. Egzersiz kemirgenlerde kas dokusu ve karaciğerde AMPK aktivasyonuna neden olur(44).

2.8.1. AMPK'nin Moleküler Regülasyonu

AMPK, farklı alt birimlerinden oluşur. α ve β alt birimlerinin her biri iki izoformda ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\beta 1$, $\beta 2$) ve γ alt birimi 3 izoformda ($\gamma 1$, $\gamma 2$, 3γ) bulunur(45). AMPK kanser tedavisi için hedef olarak özellikle meme kanseri tedavisi için önemli rol oynar. AMPK meme kanseri hücreleri anti-proliferatif etki ve hücrelerde otofaji indükleyerek, hücre ölümüne neden olur. Metforminin kanser hücreleri üzerindeki etkisi, AMPK'yi aktive ederek mTOR'un inhibisyonu yoluyla akış aşağı büyüme faktörü sinyalini inhibe eder(46).

2.9. Metformin nedir?

Metformin, *Galega officinalis* bitkisinden izole edilen ilaçtır. Kan glukoz seviyesini düşürmek için ana mekanizma glukoneogenezisi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini azaltır ve insülin duyarlılığını düzenler(47). Metformin, *Diabetes mellitus* (DM) tip2'nin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. 2014 yılında yapılan bir meta-analizde, metformin alan bireylerin meme kanseri insidansının daha düşük olduğu gösterilmiştir(48).



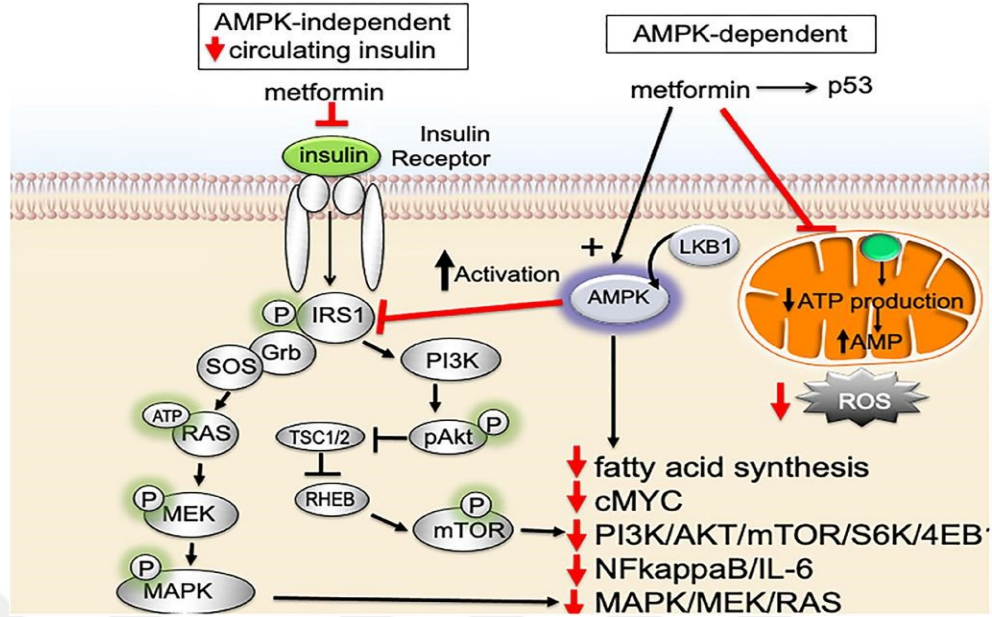
Şekil 7. Metformin kimyasal yapısı(47)

Metforminin meme kanseri, böbrek hasarı, karaciğer hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve kemik rahatsızlıklarının tedavisinde yararlı etkileri gösterilmiştir. Metformin, AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu nedeniyle anti-proliferatif memeli rapamisin hedefini (mTOR) baskılar ve hücre büyümesini inhibe eder(9). MDA-MB231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarıdır. Metforminin bu hücre hatlarına anti-proliferatif etkisi gösterilmiştir. Genellikle ER, PR veya HER2 ifadesine göre Meme kanseri sınıflandırılmaktadır. Metformin östrojen reseptör ER (+), ve ER (-) MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde metforminin hücre siklusunun duraklatılmasına sebep olduğu gösterilmiştir(49).

2.9.1. Metforminin Mekanizması

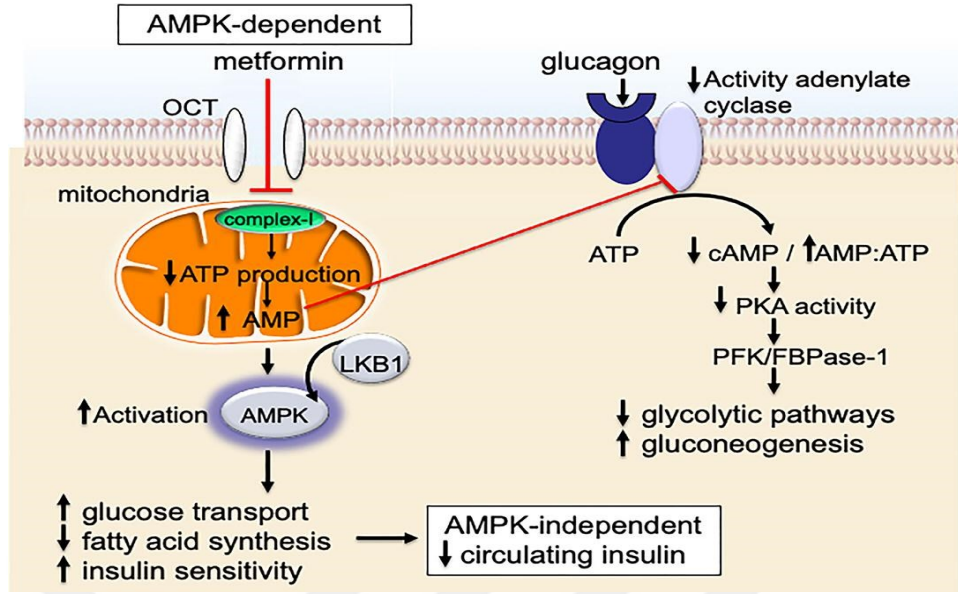
Metformin emilimi OCT1 (Organik katyon Taşıyıcı 2), MATE1 (Multidrug toksin ekstrüzyonu1) ve MATE2-K (Multidrug toksin ekstrüzyonu 2-k) taşıyıcıları ile gerçekleştirilir. Farmakogenomik çalışmalara göre yüksek MATE2 ekspresyonuna sahip kanser hücre hatlarının metformin büyüme inhibitörü etkilerine karşı direnç gösterdiği bulunmuştur(50).

Metforminin iki farklı etki yolağı bulunur. Bunlar mTOR ve AMPK yolaklarıdır. Metformin AMPK- bağımsız aracılı insülin serum düzeyini düşürür. Metformin AMPK-bağımlı olarak düzenlenir ve mitokondriyal kompleksin- I (komple- I)'i inhibe eder. AMPK-bağımsız yol ile metformin sinyal verir. Bu yolda metformin dolaşımdaki insülin seviyelerinin düşürür ve IGF-1 sinyalini inhibe eder. Çünkü IGF-1, IGF-1R'ye bağlanır ve PI3K, AKT, mTOR sinyalleri RAS, MAPK aktivasyonuna yol açar. PI3K ve MAPK yollarının aktivasyonu, hücre proliferasyonunu arttırır ve insanlarda agresif tipli kansere sebep olur. Metformin dolaşımdaki insülini düşürerek, IGF-1/IGF-1R sinyalleri ve PI3K, MAPK sinyal yollarını inhibe eder(51).



Şekil 8. Metforminin insülin direnci, serum insülini ve meme kanseri agresif biyolojisi için önemli olan sinyal yolları üzerindeki etkisini göstermektedir(52).

Metformin AMPK-bağlı yoldan sinyal verir; bu yolda metformin mitokondriyal elektron taşıma protein kompleksi-I'i inhibe eder. Kompleks-I inhibisyonu, mitokondriyal adenosin-5-trifosfat (ATP) üretimini bloke eder ve AMP/ATP arttırır. Hepatik enerji durumu kısıtlaması, AMP'nin AMPK'ya bağlanmasına ve böylece AMPK'nin serin-treonin karaciğer kinaz B1(LKB1) afinitesinin artmasına yol açar. AMPK-LKB1- aktivasyonu, S6-kinaz (S6K) ve 4E bağlayıcı proteininin (4EB-1) aşağı akış inhibisyonuna yol açan AKT/mTOR sinyalini inhibe eder. Metforminin mTOR inhibisyonu, kanseri teşvik eden yolları baskılar. NFkB, IL6, MAPK, Ras, ve cMyc birlikte doku iltihabi, metabolizma ve bağışıklık hücresi sinyalleşmesinde rol oynamaktadır(52).



Şekil 9. Karaciğerde metformin sinyalizasyonu(52)

2.10. Apoptoz

Apoptoz terimi sonbaharda ağaçların yapraklarının dökülmesi veya çiçeklerden taç yapraklarının dökülmesi anlamına gelen yunanca kökenlidir. Apoptoz kelime olarak programlanmış hücre ölümü anlamına gelir. Apoptoz kelimesi ilk kez 1972’ de Avusturyalı bir patolog J.F.K Kerr tarafından kullanılmıştır(53).

2.10.1. Apoptoz ’da Rol Alan Düzenleyici Moleküller

Apoptoz, çoklu sinyal yolları tarafından tetiklenir ve çok karmaşık dışsal ve içsel ligandlar tarafından düzenlenir. Bu süreç, çeşitlilik hücre sinyal yolu tarafından kontrol edilir ve hücre kaderinin düzenlenmesinde yani hücre ölümü veya hayatta kalma kararında rol alır. Kaspazların dahil olup olmamasına göre ayırt edilen iki ana apoptoz yolu vardır: hücre içi bir çok sinyal mekanizmasının ortak konuşma noktası organel olan mitokondri, farklı apoptoz yollarını birbirine bağlayabilir.

2.10.2. Apoptoz Tipleri

Apoptotik hücre ölümü mitokondri ile ilişkili olarak: Kaspaza bağımlı ve kaspazdan bağımsız yolak ile düzenlenebilen intrinsik yolak (iç mitokonriyel yolak) ve bununla birlikte

ligandlar ve çevresel faktörlerin tetiklediği ekstrinsik yolak (dışsal yolak) olarak apoptotik hücre ölümü tipleri mevcuttur (54).

2.10.2.1. İç Mitokondriyal yolak

Hücrelerde yarı özerk bir organel olan mitokondri, kendi genetik materyalini içermesinin yanı sıra, enerji metabolizmasında önemli bir rol oynar. Hücre yaşam aktivitesini sürdürmek için ATP üretebilir ve hücrelerde bir enerji santrali olarak bilinir. Bu önemli rolün yanı sıra mitokondri, ROS üretimi, apoptoz ve yaşlanmanın düzenlenmesi gibi birçok biyolojik reaksiyon sürecinin gerçekleştiği yerlerdir. Mitokondri disfonksiyonunun birçok hastalıkla (Alzheimer hastalığı; Parkinson hastalığı, kanser, diyabet) ilişkisi vardır. Bu hastalıkların apoptoz ile bir miktar ilişkisi olduğu tespit edilmiştir; Mitokondri tarafından üretilen ROS, apoptoz için önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmiştir. Şu anda birçok araştırma, bazı patojenlerin enfeksiyon durumunda üretilen ROS'un arttığını, ROS'un apoptozu tetikleyebildiğini, konakçının bu şekilde patojenin difüzyonunu savunabildiğini buldu. Bu roller nedeniyle mitokondri, bu tip hücre ölümüyle ilgili hastalıkları iyileştirmek için uygun bir terapötik hedef olarak kullanılabilir (55).

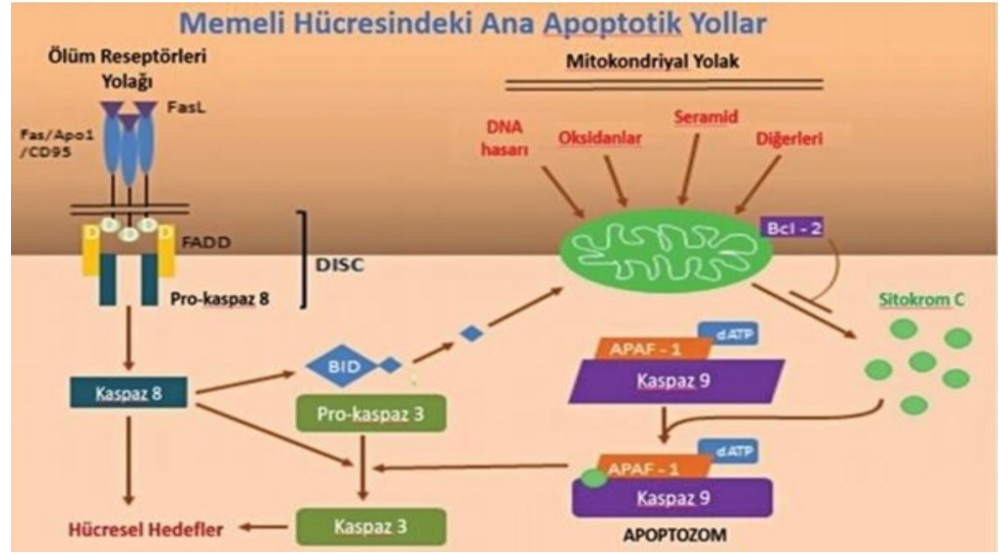
Mitokondriyal demir taşıyıcı sitokrom C mitokondriye bağlı apoptozda klasik bir rol oynar. Bir köprü olarak kaspaz kaskad reaksiyonu ile bağlanır. Alt sinyal yolağında bulunan kaspazlar ve içsel apoptozu indükler. Yani mitokondri sadece hücrenin enerji santrali değil, aynı zamanda sitokrom C, kalsiyum, morfoloji değişiklikleri (filyon/füzyon) veya bazı zar proteinleri ifade dengesizliği (Bcl-2) yoluyla içsel apoptoz yolunu kontrol etme yeteneğine de sahiptir.

Apoptozun mitokondriyal yolunda kaspaz aktivasyonu, dış mitokondriyal zarın Bcl ailesinin proapoptotik üyeleri tarafından polarizasyonu ile bağlantılıdır(56).Çok sayıda sitotoksik uyaran ve proapoptotik sinyal ileten moleküller, dış mitokondriyal membran geçirgenliğini indüklemek için mitokondri üzerinde bir araya gelir (57). Bu geçirgenlik, Bcl-2 ailesinden proteinler, mitokondriyal lipidler ve biyoenerjetik metabolit akışını düzenleyen proteinler tarafından düzenlenir(56). Dış mitokondriyal zarın potansiyelinin kaybı ile zar bütünlüğünün bozulması üzerine, sitokrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF ve endonükleaz G dahil olmak üzere normalde iç ve dış mitokondriyal zarlar arasındaki boşlukta bulunan bir dizi protein salınır (58). Sitozole girdikten sonra, bu apoptojenik proteinler, kaspaz aktivasyonunu teşvik ederek veya kaspazdan bağımsız ölüm efektörleri olarak hareket ederek hücre ölümünün yürütülmesini tetikler(58).

2.10.2.2. Dış yolak

Ölüm reseptörleri, hücre ölümü ve hayatta kalmasının düzenlenmesi, farklılaşma veya bağışıklık düzenlemesi dahil olmak üzere geniş bir biyolojik fonksiyon yelpazesine sahip 20'den fazla proteinden oluşan tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü gen üst ailesinin üyeleridir. TNF reseptör ailesinin üyeleri, benzer, sistein açısından zengin hücre dışı alanları paylaşır. Ek olarak, ölüm reseptörleri, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde çok önemli bir rol oynayan 'ölüm alanı' adı verilen yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alan tarafından tanımlanır. En iyi karakterize edilen ölüm reseptörleri arasında CD95 (APO-1/Fas), TNF reseptörü 1 (TNFR1), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörü 1 (TRAIL-R1) ve TRAIL-R2 bulunurken, DR3'ün (TRAMP) rolü /Apo-3/WSL-1/LARD) veya DR6 tam olarak tanımlanmamıştır. TNF üst ailesinin karşılık gelen ligandları, CD95 ligandı (CD95L), TNFa, lenfotoksin-a (sonraki ikisi TNFR1'ye bağlanır), TRAIL ve DR3 için bir ligand olan TWEAK gibi ölüm reseptörü ligandlarını içerir(59).

CD95 veya agonistik TRAIL reseptörleri TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 gibi ölüm reseptörlerinin aynı kökenli ligandları veya agonistik antikorları ile ligasyonu, reseptör trimerizasyonu, reseptörlerin ölüm alanlarının kümelenmesi ve Fas ile ilişkili ölüm alanı gibi adaptör moleküllerin (FADD) alınmasıyla sonuçlanır. Fas ile ilişkili ölüm alanı, CD95 ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşturmak için kaspaz-8'i aktive eder (60). Kaspaz-8 daha sonra kaspaz-3 gibi alt sinyal efektör kaspazları aktive eder. CD95 sinyal yolu için, iki farklı prototipik hücre tipi tanımlanmıştır (61).



Şekil 10 . Memeli hücrelerinde apoptotik yolları. (iç) mitokondriyal ve (dış) apoptotik yollar (62).

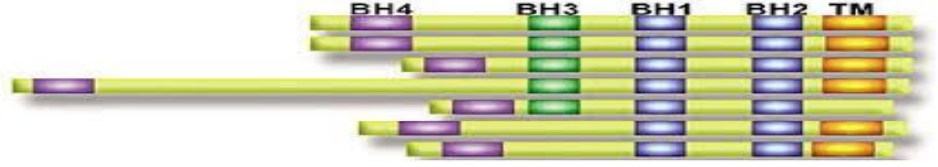
2.10.3. Bcl-2

Memelilerde bulunan Bcl-2 ailesi sağ kalımda görev alan CED-9'un en az beş homologunu taşır: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1. Bu homologların tümü gelişim sırasında ve hücrel strese yanıt olarak apoptozu inhibe eder. CED-9 ile en az üç korunmuş BH (Bcl-2 homoloji) alanını paylaşırlar. Bunlardan üçü, sağ kalım ile ilişkili BH1, BH2 ve BH3 domainleri hidrofobik bir yapıda birlikte katlanır(63). Bu yapı, pro-apoptotik EGL-1 veya Bik/Nbk/Blk, Bid, Bad, Hrk/DP5, Bim/Bod, Noxa, Puma/Bbc3, Bmf ve Bcl-Gs tarafından ligand bağlanması için hedef olarak hücrede bulunurlar (Şekil 11). Hücre ölümü ile ilgili proteinler pro-apoptotik olarak (yalnızca BH3 içeren proteinler), kısa BH3 domainini içerirler, ancak daha geniş Bcl-2 ailesiyle kayda değer başka domainleri içermeyen proteinlerdir(64). Yalnızca BH3 proteinlerine ek olarak, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin diğer sınıfı, çok alanlı Bax benzeri proteinlerdir (65).

Bcl-2 protein ailesi

anti-apoptotik

Bcl2
Bclx_L
Bclw
Mcl1
A1/Bfl1
Boo/Diva
Nr13



pro-apoptotik

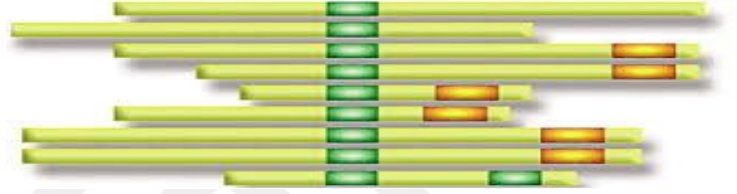
Çok bölgesi

Bax
Bak
Bok/Mtd



Sadece BH3 bölgesi

Bid
Bad
Bik/Nbk
Bik
Hrk
Bim/Bod
Bnip3
Nix
Noxa



Şekil 11. Bcl-2 ailesi üyeleri (65)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Metforminin Hazırlanışı

Metformin Sigma Aldrich firmasından (317240) CAS 1115-70-4 -Calbiochem olarak temin edildi. 1M olacak şekilde saf su ile hazırlandı. 1M olarak hazırlanan Metformin 1.2 mM, 2.25 mM, 5 mM 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM olacak şekilde hücre uygulaması hesaplanarak 24 sa, 48 sa ve 72 sa olarak uygulandı.

3.2. 10x TBS ve 1X TBS-T

86,6 g NaCl, 12,11g Tris-Baz distile su çözülür pH: 7,6 ya ayarlanır Ardından 1000ml'e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS, 1X TBS'e seyreltilerek kullanılır. 1X TBS içine 500 Tween 20 konularak hazırlanır.

3.3. Hücre Dondurma Solüsyonunun

9 ml FBS ve 1 ml DMSO oranında hazırlanan dondurma solüsyonu hücrelerin -80 derecede ya da sıvı azotta (-196 derece) saklanmasını sağlar.

3.4. miR-506

miScript miR-506 Mimic Sigma (QIAGEN), 20 µM olacak şekilde distile su ile hazırlanmıştır. 5 nm olacak şekilde hücre uygulaması hesaplanarak 24 saat, 48 saat olarak uygulandı.

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre kültürü

MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) ve MCF-7 (HTB-22 – ATCC) hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection)'dan temin edilmiştir. Hücreler, % 5 CO₂ ve 37 °C'lik inkübatörde, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco 's modified Eagle serum) besiyerinde inkübe edilmiştir. Hücreler belirli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işlemi için üst medya çekip atılarak, hücreler izotonik bir çözelti olan 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından, flask yüzeyini kaplayacak miktarda % 0,25 oranında tripsin-EDTA eklenerek, 37 °C' de 5 dakika hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanmıştır. Tripsin ile 1:1 oranda besiyeri eklenerek, tripsin inaktivasyonu sağlandıktan

sonra hücreler 500xg'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücre pelleti medya ile homojen hale getirilip, sayım işlemi hemasitometride gerçekleştirilmiştir.

4.2. Hücre Dondurma

Hücre ekiminden sonra yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerin bulunduğu 25 cm²'lik petri 1ml 1x PBS ile yıkanır. Bu işlemden sonra hücre üzerine Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'lik etüvde yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Santrifüj sonrası, hücre sayımı Neubauer hemoitometresi yardımıyla yapılmıştır. Dondurma işlemi için kullanılan tüpler (cryo tüp) hazırlandıktan sonra, hücreler dondurma solüsyonu ile homojen edilmiş ve -80°C de kademeli olarak dondurulmuştur.

4.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) (MTT) ajanı kullanılarak renge bağlı bir sağ kalım testi olan hücre sağ kalım deneyi gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisinde bulunan redüktaz enzimi ile tepkime giren MTT ajanı, formazan kristalleri halinde çökelerek mor renkli tanecikler oluşturur. DMSO gibi bir çözücü ile mor renkli bir solüsyon halini alır. 570 nm dalga boyunda bu renk değişimi kantitatif olarak plaka okuyucusunda hesaplanır. Çalışmamızda, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri 1X10⁴ hücre/kuyu olarak 96 kuyucuklu petriye ekilmiş ve gece boyu hücrelerin yapışması için inkübe edilmiştir. Bunu takiben hücrelere 24 saat farklı konsantrasyonlarda metformin (1,5- 25 mM) uygulanmıştır. Ardından, 4 saat boyunca % 5 CO₂ ve 37 °C'lik inkübatörde 10µL MTT ajanı uygulanan hücreler üzerinden üst sıvı dikkatlice alınmış ve 100µl DMSO eklenmiştir. Oluşan renk değişimine bağlı absorbans ölçümü ikili dalga boyunda (570 nm ve 655 nm) plaka okuyucuda yapılmıştır.

4.4. Floresan Boyama

4.4.1. DAPI (4'6 Diamidino-2-fenilindo) Boyaması

Meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231ve MCF-7, 5x10⁴ hücre/kuyu olarak 12 kuyucuklu petriye ekim yapılmıştır. Yapışmasından sonra hücrelere 24 saat boyunca 2.5mM ve 5mM metformin uygulanmıştır. DAPI (5mg/ml) eklenen besiyeri ile 15 dk bekleme

süresinden sonra eksitasyon 350 nm ve emisyon 470 nm' de floresan mikroskobunda mavi olarak nukleusların boyandığı gözlemlenmiştir.

4.4.2. DiOC6 (3,3-Diheksiloksakarbosiyaamin)

Meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231ve MCF-7, 5×10^4 hücre/kuyu olarak 12 kuyucuklu petriye ekim yapılmıştır. Yapışmasından sonra hücrelere 24 saat boyunca 2.5mM ve 5mM metformin uygulanmıştır. 4mM DiOC6 ile 15 dakika muamele edilen mitokondri membran yapısı bozulmayan hücreler Ext./Em. :488/525 nm' de floresan mikroskobunda yeşil renkte gözlemlenmiştir.

4.4.3. PI (Propidyum iyodür)

Meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231ve MCF-7, 5×10^4 hücre/kuyu olarak 12 kuyucuklu petriye ekim yapılmıştır. Yapışmasından sonra hücrelere 24 saat boyunca 2.5mM ve 5mM metformin uygulanmıştır. 5mg/ml PI ile 30 dakika boya maruziyeti sağlanmıştır. Floresan mikroskobu altında ölü hücreler kırmızı renkte Ext./Em.: 536/ 617 nm'de gözlemlenmiştir.

4.4.4. AO (3,6-dimetilaminoakridin Akridin turuncusu)

Meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231ve MCF-7, 5×10^4 hücre/kuyu olarak 12 kuyucuklu petriye ekim yapılmıştır. Yapışmasından sonra hücrelere 24 saat boyunca 2.5mM ve 5mM metformin uygulanmıştır. Örnekler, besiyerinde 1g AO ile 15 dakika bekletilir. Eksitasyon 502 nm ve emisyon 650 nm' de Floresan mikroskobu altında gözlemlenir.

4.5. Koloni Oluşumu

MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında metforminin ve miR-506 koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. 2000 hücre/kuyu olarak 6 kuyucuklu petriye ekim yapılmıştır. Yapışmasından sonra hücreler sentetik miR-506 miRNA mimik ile 24 saat transfekte edilmiştir. Ardından 24 saat boyunca 5mM metformin uygulanmıştır. 24 saat sonunda taze besiyeri ile ilaçlı besiyeri değiştirilmiştir. Hücreler yaklaşık iki hafta boyunca, kontrol gurubu % 80 koloni yoğunluğuna ulaştığında 3:1 oranda

metanol: asetik asit ile oda sıcaklığında 10 dk fikde edilmiş ve sonrasında %0,5'lik kristal viyole ile boyanarak gözlemlenmiştir.

4.6. Yara İyileşme Yöntemi

Hücre migrasyon testi olarak da ifade edilen yara iyileşme testi, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde metforminin ve miR-506 yara iyileşme potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 6×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petriye ekim yapılarak bir gece hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücreler miR-506 mimik ile transfekte edilmiştir. 24 saat sonunda $10 \mu\text{l}$ 'lik steril pipet ucu ile petri kabına çizik atılarak yara oluşturulmuştur. 1X PBS ile yıkamadan sonra, taze besiyeri ile metformin uygulaması yapılmıştır. 24, 48 ve 72 saat boyunca yara genişliğinin değişimi mikroskop yardımı ile ölçülmüştür.

4.7. Protein İzolasyonu

1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 60 mm'lik petrilere ekim yapılan hücreler gece boyu yapışma süresinden sonra miR-506 mimik transfeksiyonu yapılmıştır. 24 saat sonra 5 mM metformin uygulanmıştır. Ardında, aderent karakterdeki hücreler kazıyıcı ile 1xPBS varlığında santifüj tüpüne toplanmıştır. 2 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de 16000 rcf'de yapılan santrifüj sonrası hücrelerin üst fazı atılmıştır. Pelletin yoğunluğuna göre hücre lizis tamponu (CLB) eklenerek hücreler pipetaj ile homojen edilmiş ve hücre zarı parçalanmaya çalışılmıştır. CLB etkinliği için 20 dakika oda sıcaklığında çalkalanmış ve ardından 20 dakika süre ile 16000 rcf'de $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir ependorfa alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

4.8. Bradford Protein Miktar Tayini

Total protein izolasyonu sonrası protein miktarının belirlemek için Bradford Testi kullanılmıştır. BSA (sığır serum albumin) konsantrasyonu belli olmakla birlikte 1,5 mg/ml'dir. BSA kullanılarak bir standart eğri oluşturmak istendiğinde artan konsantrasyonlarda (1,5; 3; 4,5; 6; 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) BSA kullanılır. Konsantrasyonları bilinmeyen proteinlerden ise $1 \mu\text{l}$ kullanılır. Bradford ajanı eklendikten sonra 5 dk karanlıkta bekletilen lizatların, plaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Standart

absorbans/konsantrasyon grafiği yapılır. Standart eğim hesabı kullanılarak protein örneklerinin konsantrasyonları saptanmıştır.

4.9. İmmunoblotlama Yöntemi

Bu teknikte proteinlerin kDa'larına göre ayrılması için %12-15 oranlarında ayırma jeli hazırlanmıştır. Ayırma jelinin hizalanması için jel üzerine izopropanol yada butanol eklenir. Jel polimeleşmesinden, yükleme jeli prosedüre göre hazırlanır. 5x konsantrasyonda laemli tamponu ile 30-50 µg protein ile karıştırılarak 95°C'de 5 dakika boyunca kaynatılmıştır. %12-15'lik SDS-PAGE hazırlanarak 80 V'de yürütülmüştür. Jelden membrana transfer işlemi için PVDF membran kullanılmıştır. PVDF membranın aktivasyonu için, metanolde 20 sn bekletme işlemi yapılmıştır. Transfer işlemi 300 mA'de incelenmek istenen primer antikorun boyutuna göre 45 dk ile 60 dk boyunca yapılmıştır. Ardından membranlar, kontrolsüz bağlanmaları engellemek için membranlar 1saat yağsız süt ile bloklanmıştır. Membranlar primer antikorlarla gece boyunca +4°C'de rollerde muamele edilerek edilmiştir. Tezimizde kullanılan primer antikorlar: PARP, kaspaz9, kaspaz3, kaspaz7, Puma, Bak, Bax, Bim, AMPK'dir. Beta-actin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Sekonder antikor ile muameleye geçilmeden önce membranlar 10 dakika 3 tekrar şeklinde TBS-T ile yıkanmıştır. Sekonder antikor olarak, primer antikora uygun olacak şekilde anti-fare ve anti-tavşan sekonder antikorlar kullanılmıştır. Membranlar gece boyu +4°C'de yada oda sıcaklığında 3-2 saat sekonder antikor ile muamele edilmiştir. Ardından 10 'ar dakikalık 3 tekrar TBS-T ve 1 kez TBS yıkaması sonrasında, örneklerin kemiluninisans tampon çözelti (A ve B çözeltilerininin 1:1 karışımı) ile 5 dakika karanlıkta inkübasyonu sağlanmıştır.

4.10. Asılı Damla Modeli Tekniđi

Asılı Damla metodu ile 3D sferoid hücre kültürü, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri 60 mm'lik perilere her damlacıkta 2.500 hücre olacak şekilde kontrol, mir506, Metformin, mir506+Metformin grupları olarak 4 farklı petriye damlacık halinde ekilir. Hücreler ışık mikroskopunda 3 gün boyunca gözlenerek çapları kaydedilmektedir. 3.günün sonunda damlacıklar DIOC6 ve DAPI floresan boya ile boyanarak floresan mikroskopu altında gözlenmektedir.

4.11. PI Analizi

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde metforminin ve miR-506 hücre döngüsüne etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 6×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petriye ekim yapılarak bir gece hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücreler miR-506 mimik ile transfekte edilmiştir. Ardından 5 mM metformin uygulanmıştır. PI analizi için hücreler soğuk % 70 etanol ile fikse edilmiştir ve +4 °C’de saklanmıştır. PI boyama için 4 mg/ml PI ve 20 mg/ml RNaz, 1xPBS içinde hücrelere verilmiştir. Boyama işlemi için 30 dakika inkübasyon süresi oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hücre akış sitometrisinde analiz FL2 filtresi ile 10.000 hücre üzerinden yapılmıştır

4.12. İstatiksel Analiz

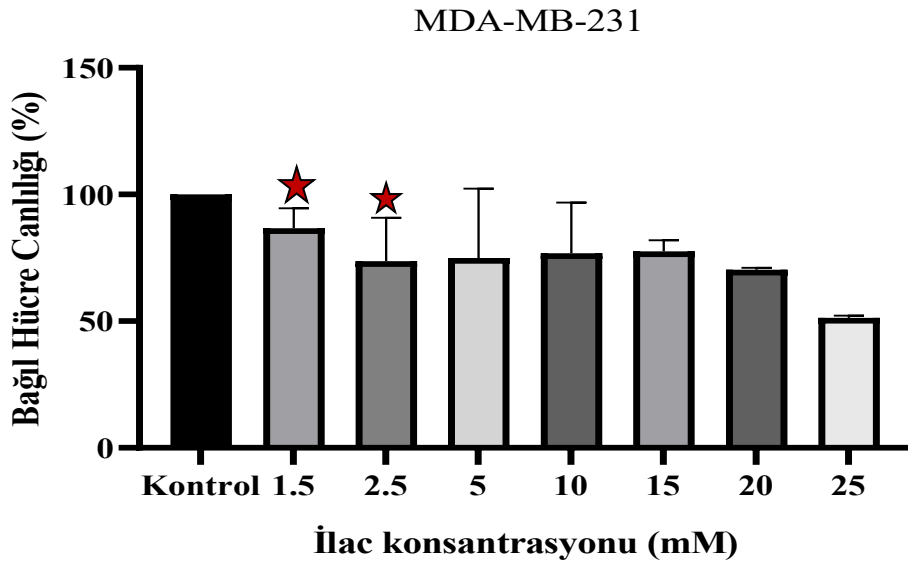
Metforminin hücre canlılığı ve hücre migrasyonuna etki mekanizmasına yönelik elde edilen tüm sonuçlar Graphpad programı kullanılarak veri sayısı ile uyumlu Two-way ANOVA İstatistiksel yöntemi ile incelemiş ve grafik/tablo olarak sunulmuştur.

5. BULGULAR

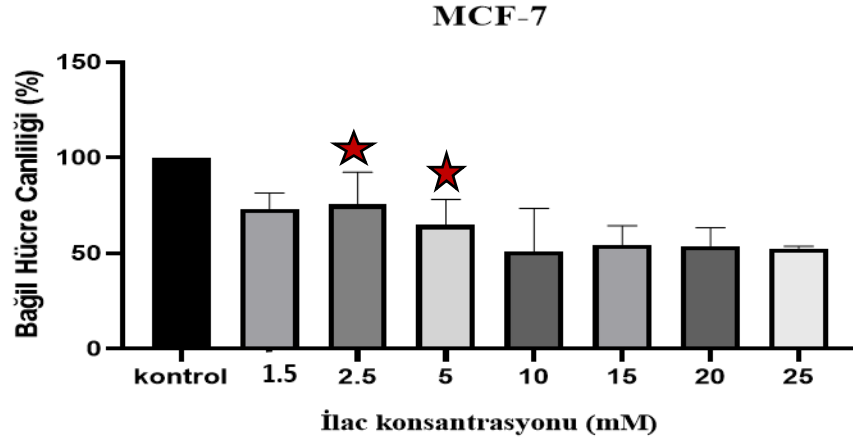
5.1. Metformin uygulamasının MDA- MB231 ve MCF-7 hücre canlılığı üzerinde etkisinin gösterilmesi

Metformin 'in MDA-MB-231 ve MCF- 7 meme kanseri hücreleri hücre canlılığını belirlemek amacıyla doza bağlı olarak (1.5, 2.5, 5, 10, 15, 20 ,25 mM) MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Metformin 'in artan doza bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF- 7 meme kanseri hücre canlılığı azalmıştır.

MDA- MB-231 kanseri hücreleri 24 saat 1.5 mM Metformin uygulandığında kontrol grubuna göre hücre canlılığını %10 azalmış, 2.5 mM Metformin uygulandığında %30 azalma göstermiştir. 5 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %30 azalma,10 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %28 azalma, 15 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %30 bir azalma, 20 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %40 azalma göstermiş, 25 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %50 azalma göstermiştir.



Şekil 12. MDA-MB-231 hücrelerinde doza bağlı Metformin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.



Şekil 13. MCF-7 hücrelerinde doza bağlı Metformin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

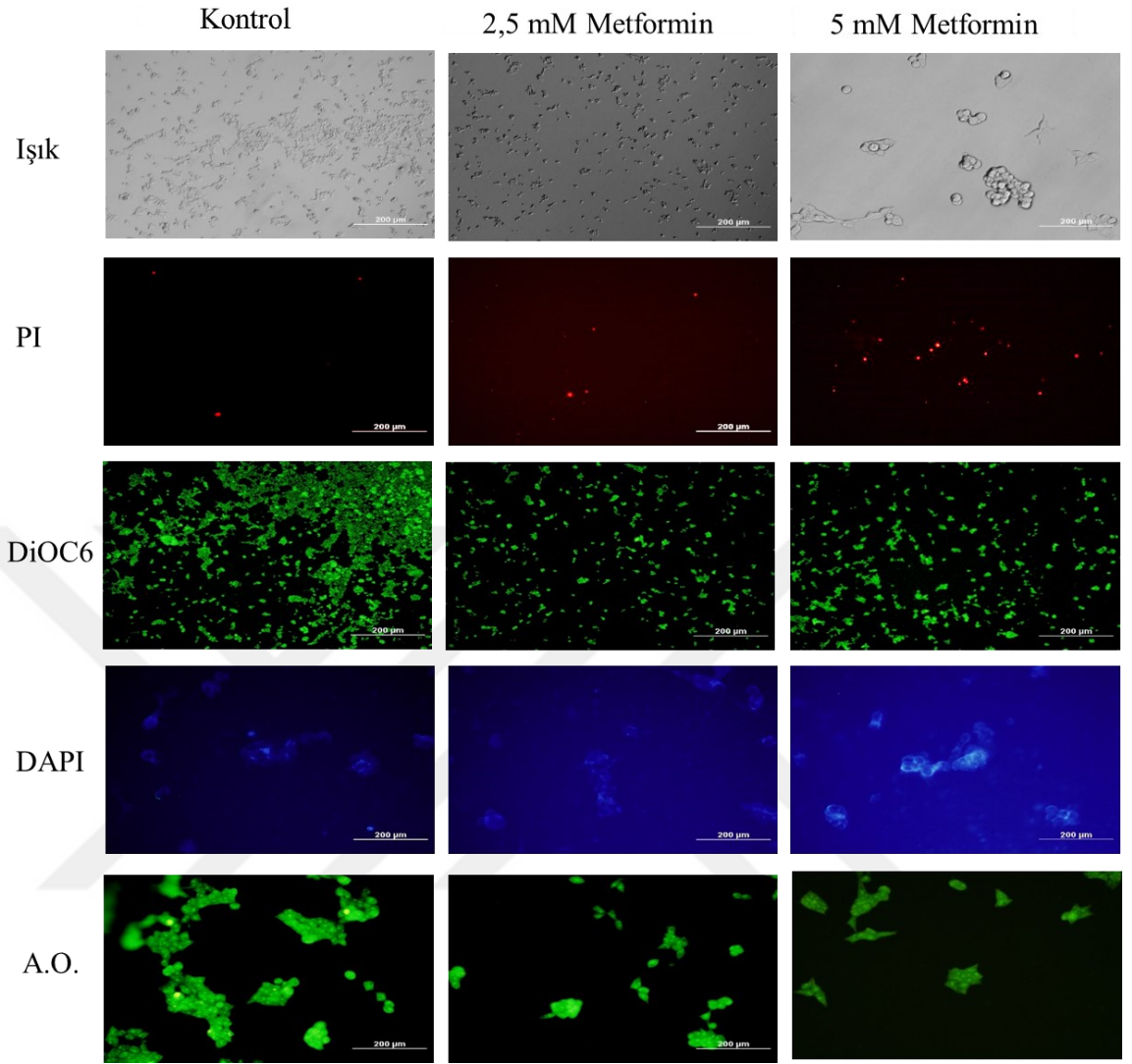
MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 saat 1.5 mM Metformin uygulandığında kontrol grubuna göre hücre canlılığını %25 azalmış, 2.5 mM Metformin uygulandığında %20 azalma göstermiştir. 5 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %40 azalma göstermiş, 10 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %50 azalma göstermiş, 15 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %55 azalma göstermiştir. 20 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %55 azalma göstermiş, 25 mM Metformin uygulanması hücre canlılığında %55 azalma göstermiştir.

5.2. MDA-M-231 ve MCF-7 Hücrelerine Doza Bağlı Metformin Uygulamalarının Hücre Ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

MDA-MB231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri canlılığının, ölümü ve DNA kırıklarını belirlenmesi amacıyla doza bağlı olarak (2.5mM, 5mM) floresan boyamaları analizi gerçekleştirilmektedir. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat metformin uygulaması ölen hücrelerin hücre membran permabilitelerinin bozulmasıyla birlikte PI boyasını hücre içine almaları ile hücre ölümünün belirlenmesi amaçlanmıştır. PI boyama ile 2.5mM ve 5mM metformin uygulamasından sonra hücre ölümünün arttığı gözlemlenmiştir. DIOC6 canlı hücrelerde korunan mitokondriyal membran potansiyeline bağlı olarak, canlı hücrelerin belirli dalga boyunda yeşil olarak görüntülediği bir floresan boyadır. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat metformin uygulaması takiben boyama gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 canlı hücre sayısında kontrol gruplarına kıyasla gözle görülür bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Meme kanseri hücrelerinde 24 saat metformin uygulaması ile oluşan DNA kırıkları DAPI boyama ile belirlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla doza bağlı olarak metformin uygulaması DNA kırıklarında artışa sebep olmuştur.

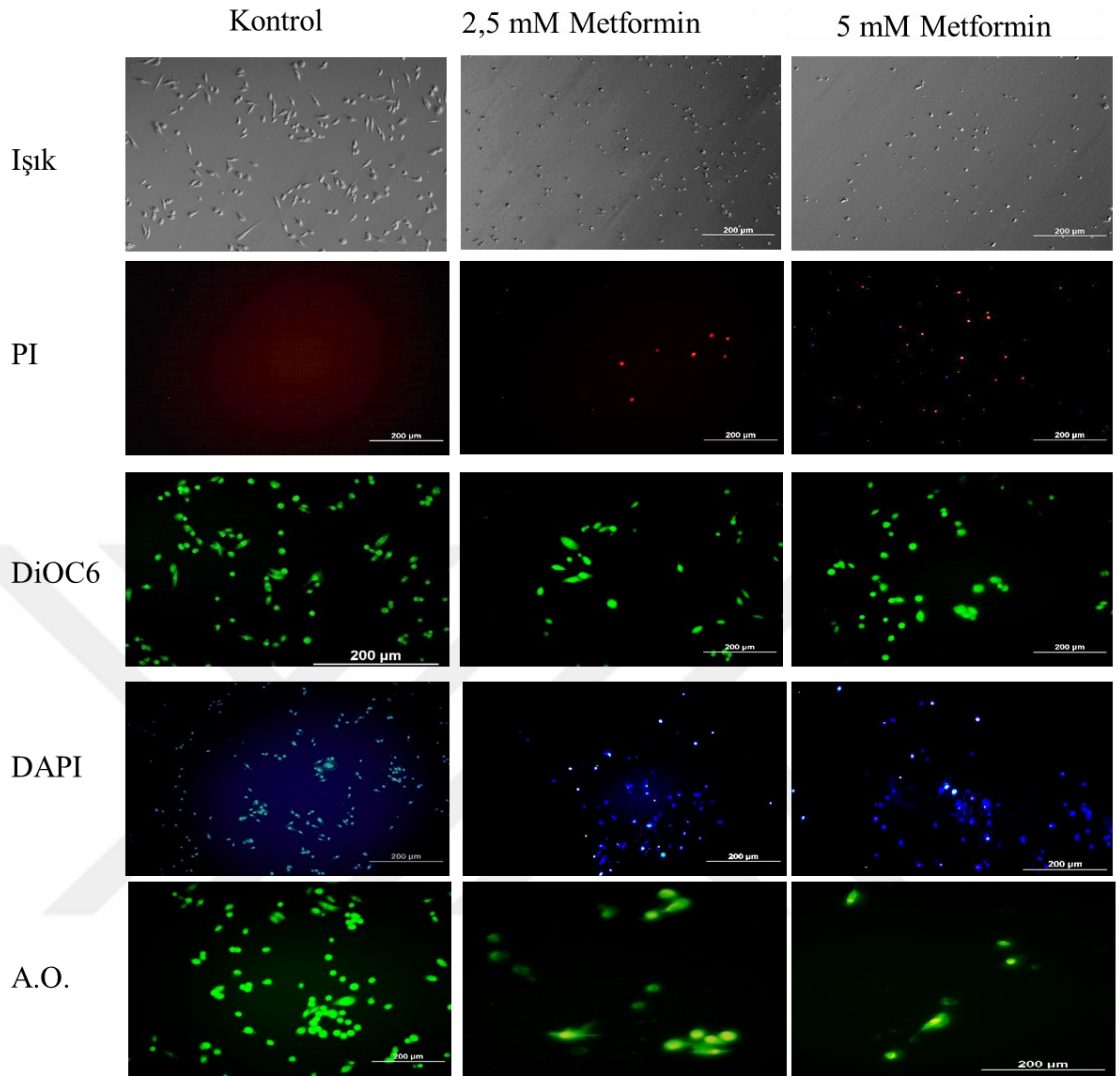
Akridin turuncusu (AO) canlı hücrelerin DNA'sının parlak yeşil, RNA'nın ise turuncu olarak boyandığı floresan bir boyadır. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerde (AO) floresan boyama ile göstermiştir.

MCF-7



Şekil 14. MCF-7 hücrelerine uygulanan metforminin hücre ölümüne etkisinin floresan mikroskopunda incelenmesi. Metformin (2.5 mM ve 5 mM) olarak MCF-7 hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır. PI, DiOC6, DAPI ve acridine orange floresan boya ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir.

MDA-MB-231

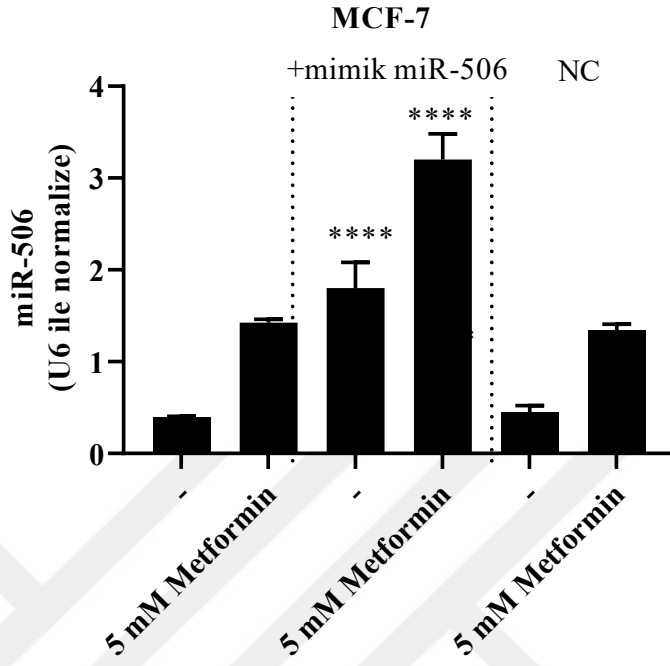


Şekil 15. MDA-MB-231 hücrelerinde metforminin hücre ölümüne etkisinin floresan mikroskopunda incelenmesi. Metformin (2,5 mM ve 5 mM) olarak MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır. PI, DiOC6, DAPI ve acridine orange floresan boya ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir.

5.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde miR-506 seviyesinin incelenmesi

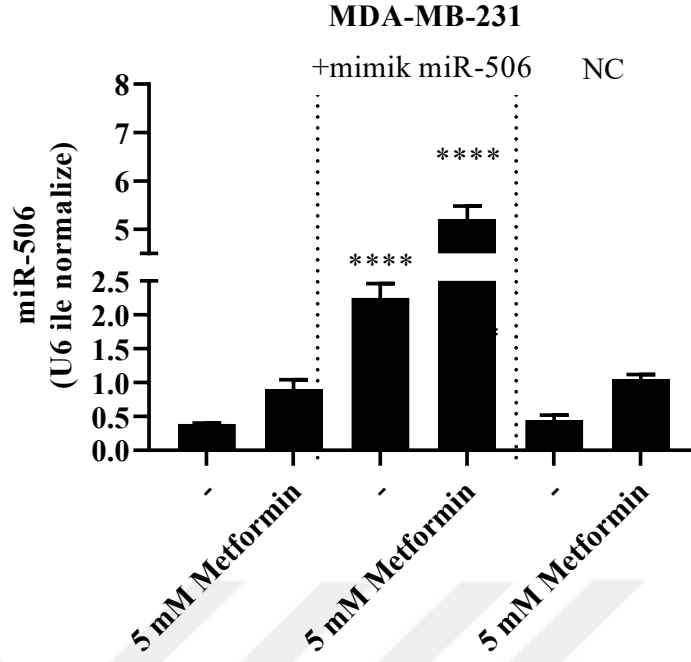
MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde bir tümör baskılayıcı olan miR-506 ifadesi miRNA izolasyonunu takiben gerçek zamanlı PZR ile incelenmiştir. Normalizasyon işlemleri hücre içinde internal kontrol olarak kullanılan RNU6 ifadesine göre yapılmıştır. miR-506 ifadesi MCF-7 hücrelerinde, MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha yüksek

olduğu gözlenmiştir. 24 saat 5 mM metformin uygulaması miR-506 ifadesini MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde sırasıyla 2,4 ve 2 kat arttırmıştır.



Şekil 16. miR-506 ifadesi arttırılan MCF-7 hücrelerinde transfeksiyon başarısı ve metforminin miR-506 ifadesine etkisinin gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelenmesi

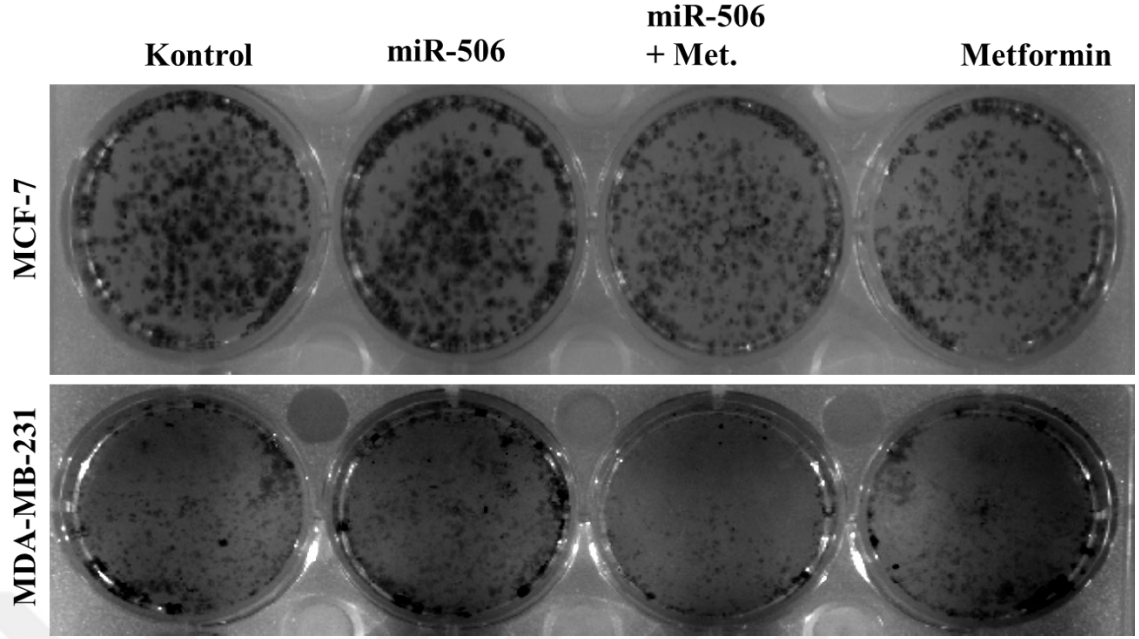
Her iki hücre hattına sentetik miR-506 transfeksiyonu yapılarak, miR-506 ifadesi qRT-PZR ile incelenmiştir. Transfeksiyon sonrası miR-506 ifadesinin MCF-7 hücrelerinde 4.3 kat, MDA-MB-231 hücrelerinde 6 kat artışı sağlanmıştır. Sonraki deneylerde kullanılmak üzere bu transfeksiyon oranları kullanılmaya devam edilmiştir.



Şekil 17. miR-506 ifadesi arttırılan MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısı ve metforminin miR-506 ifadesine etkisinin gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelenmesi

5.4. Metformin ve miR-506 uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin MDA-MB-231 VE MCF-7 meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

miR-506 ifadesi arttırılmasından sonra, metformin uygulamalarının koloni oluşturma potansiyeline etkisini belirlemek amacı ile koloni formasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattında miR-506 ifadesi arttırılması (miR-506+), metformin ve miR-506 ifadesi arttırılan hücrelere metformin uygulaması (miR-506+ Met.)'nin etkileri incelenmiştir. Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kontrol gruba kıyasla miR-506+ hücrelerinde koloni oluşumlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Metformin uygulaması MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumunu anlamlı ölçüde baskımlarken, MDA-MB-231 hücrelerinde bu etki dahadır. miR-506 ifadesi arttırılan MCF-7 hücrelerinde koloni sayısında yalnızca metformin uygulamasına göre bir azalma olduğu gözlenmiştir. Ancak miR-506 ifadesi arttırılan MDA-MB-231 hücrelerinde koloni sayısında miR-506+ ve (miR-506+Met) azalma olduğu gözlenmiştir.

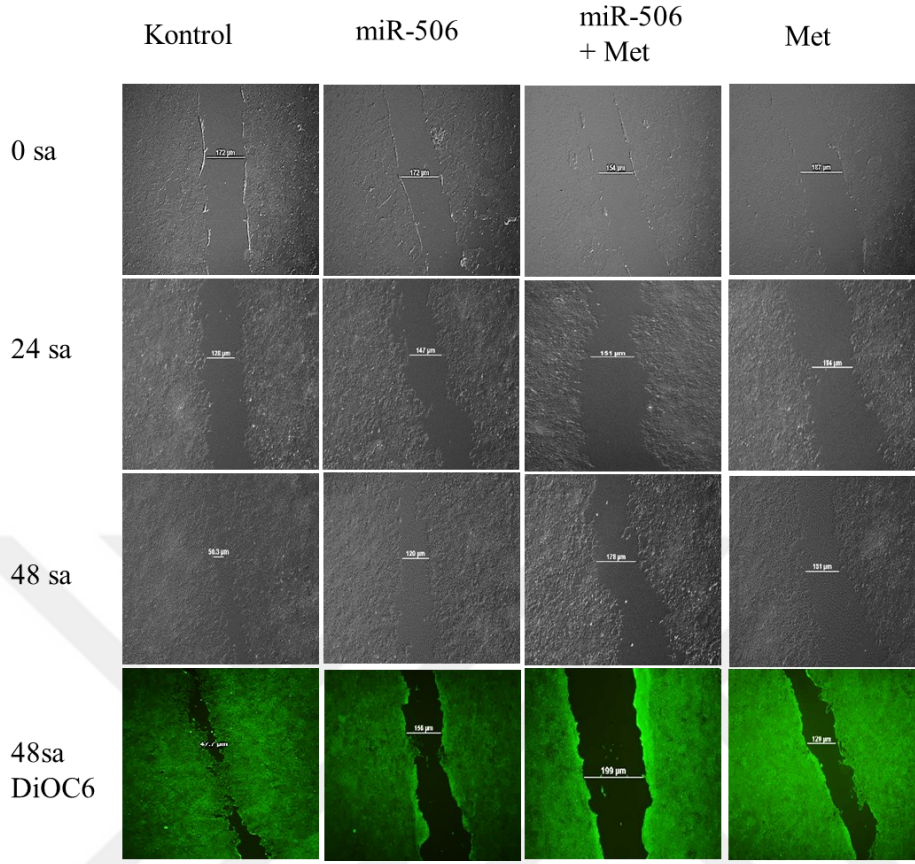


Şekil 18. miR-506 ifadesi arttırılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine metformin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi

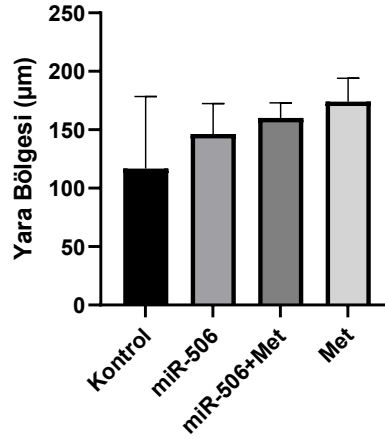
5.5. MCF-7 ve MDA- MB-231 meme kanseri hücre migrasyonuna miR-506 ve metforminin etkisinin incelenmesi

Normal ve miR-506+ MCF-7 ve MDA- MB-231 hücrelerine metformin uygulanması ardından hücre migrasyonunun etkisi yara iyileşmesi deneyi ile incelenmiştir. Hücrelere 24 saat miR-506 transfeksiyonu ardından %90 yoğunluğa ulaşan hücrelerde yara oluşturmak için 10µl'lik pipet ucu kullanılmıştır. 1xPBS ile yıkanan ve hücrelerin migrasyon hızı metformin varlığında ve yokluğunda zamana bağlı olarak incelenmiştir. miR-506 ifadesinin MCF-7 hücrelerinde arttırılması migrasyonu kontrol grubuna kıyasla baskılamıştır. Metformin uygulaması MCF-7 hücrelerinde migrasyonu aynı derecede baskılamıştır. miR-506+ hücrelere metformin uygulaması, yalnızca metformin uygulamasına kıyasla migrasyonu seviyesi anlamlı ölçüde baskılamıştır (Şekil 19).

MCF-7



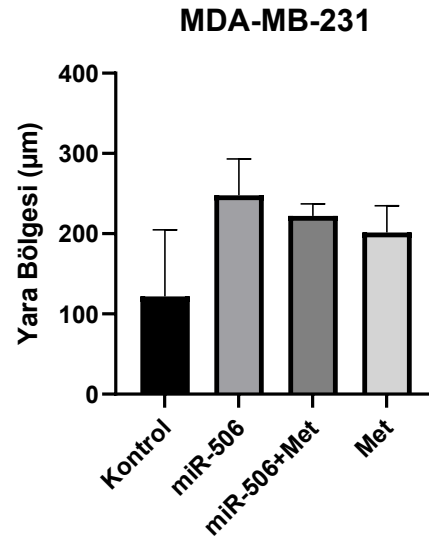
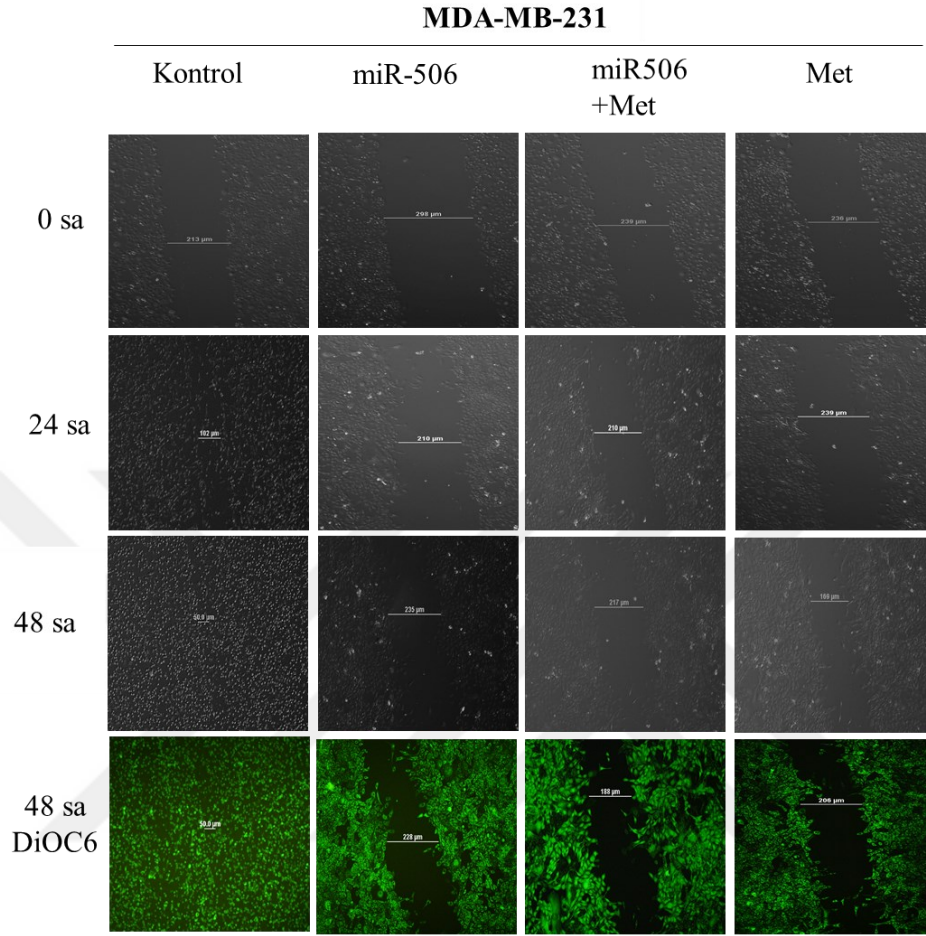
MCF-7



Şekil 19. Normal ve miR-506+ MCF-7 hücrelerinde metformin uygulamalarının hücre migrasyonuna etkisinin incelenmesi

miR-506 ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinde artırılması migrasyonu kontrol grubuna kıyasla baskılamıştır. Metformin uygulaması MCF-7 hücrelerinde migrasyonu aynı derecede baskılamıştır. miR-506 transfekte edilen hücelere metformin uygulandığında

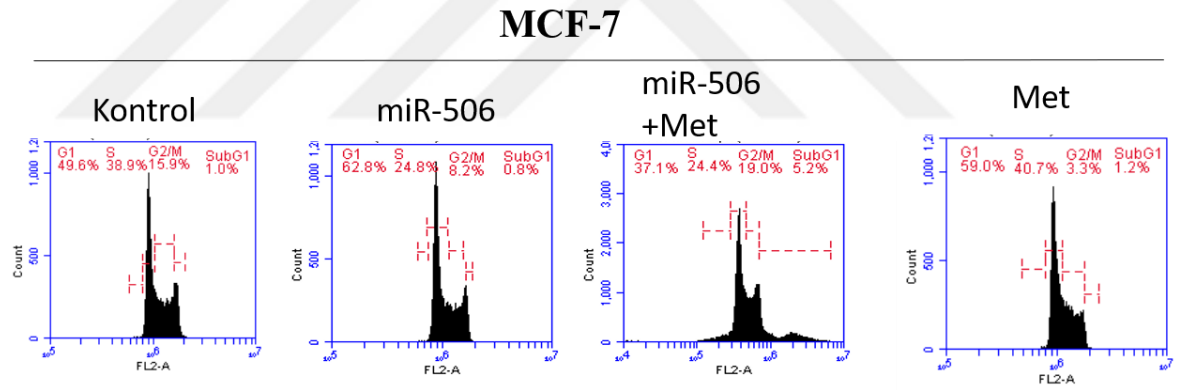
migrasyon kapasitesi, yalnız metformin uygulanan hücelere kıyasla daha yüksek oranda baskılanmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. MDA-MB-231 hücelerinde miR-506 ve metformin uygulamalarının hücre migrasyonuna etkisi yara iyileşmesi deneyi ile incelenmiştir.

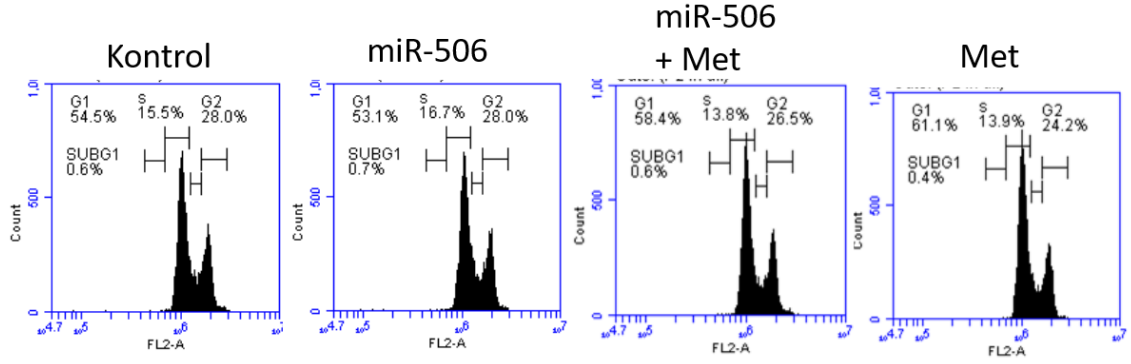
5.6. MDA-MB231 ve MCF-7 Meme kanseri Hücrelerinde miR-506 ve Metformin Uygulamasının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

miR-506 ve metformin uygulamalarının meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsüne etkisi propidyum iyodür (PI) boyama sonrası hücre akış sitometrisi ile incelenmiştir. miR-506 uygulanan hücelere 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 5mM metformin hücelere 24 saat boyunca uygulanmasından sonra hücreler analiz için %70 etanol ile 3-4 boyunca fikse edilmiştir. PI boyama gerçekleştirilmesi sonucunda BD Accuri marka hücre akış sitometrisinde FL2 filtresi ile analiz edilmiştir. MCF-7 hücre hattında, miR-506 ve metformin tedavisiyle G1 fazında tutulma olduğu gözlemiştir. miR-506 ve metformin uygulaması ile hücre döngüsü fazlarında kontrol grubuna kıyasla G1 popülasyonunun artışı gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında miR-506+ metformin ve metformin fazlarında kontrol grubuna kıyasla bir fark gözlemlenmiştir.



Şekil 21. MCF-7 Meme kanseri Hücrelerinde miR-506 ve metformin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi

MDA-MB-231



Şekil 22. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde miR-506 ve metformin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi

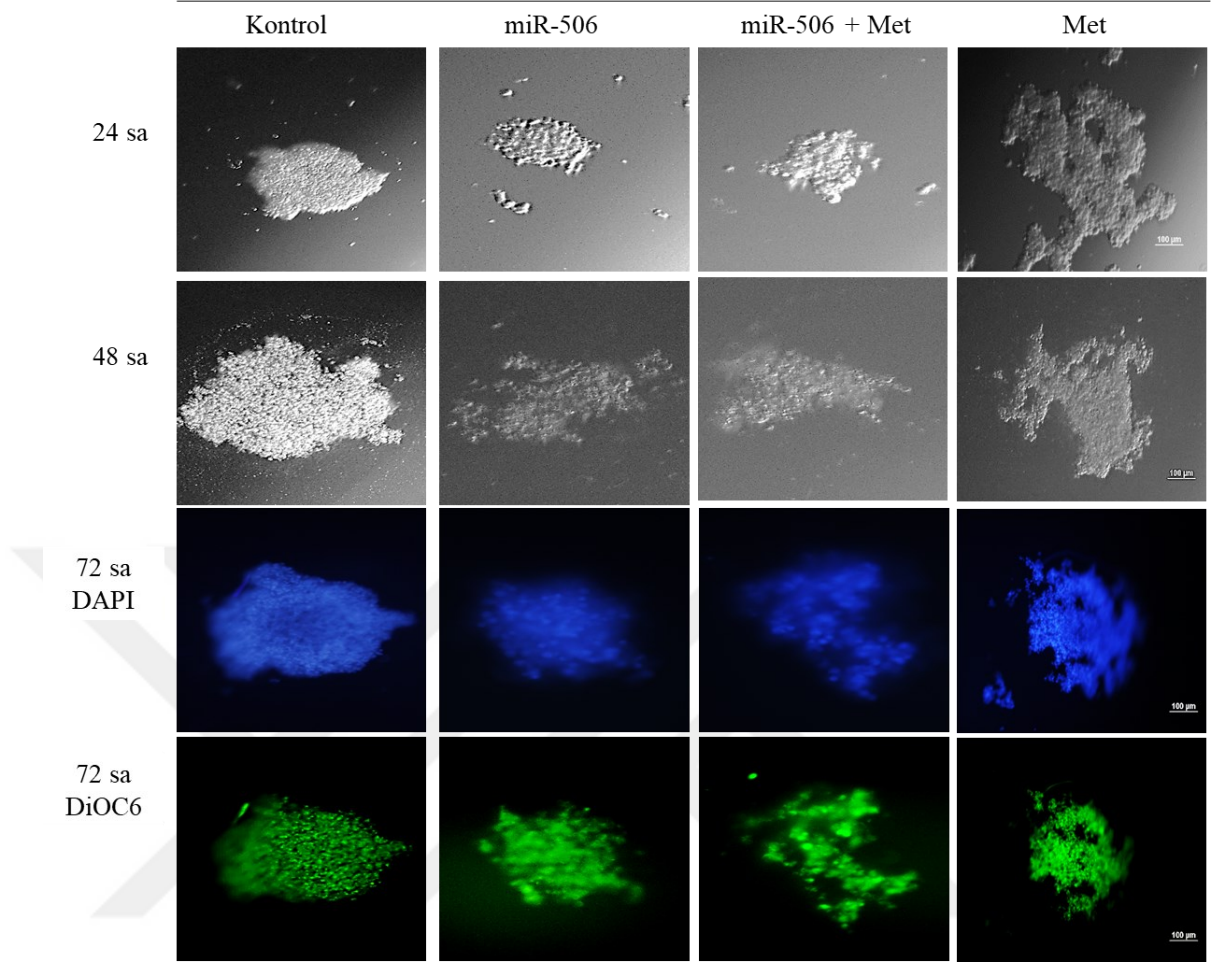
5.7. miR-506 İfadesinin Metformin Uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Üç Boyutlu Sferoid Kültür Formu Oluşturma Potansiyeline Etkisinin İncelenmesi

MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında miR-506 ile ilişkili olarak metformin üç boyutlu hücre formlarına etkisini belirlemek amacıyla asılı damla modeli analizi gerçekleştirilmiştir. Oluşan sferoid yapıları 3 gün boyunca gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde dağınık şekilde sferoid yapıları ilk 24 saatte gözlenmesine rağmen MDA-MB-231 hücrelerinde ilk 24 saatte hücre topluluğu şeklinde bir sferoid oluşumu hiçbir kondisyonda gözlenmemiştir.

MCF-7 meme kanseri hücreleri kontrol grubuna kıyasla miR-506+ hücrelerinin oluşturduğu sferoid çaplarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Metformin uygulaması ile kontrol grubuna göre sferoid oluşumunda baskılanma belirlenmiştir. Sferoid çaplarındaki azalma miR-506 transfeksiyonu yapılan ve metformin uygulanan hücrelerde çok daha yüksek seviyededir (Şekil 23).

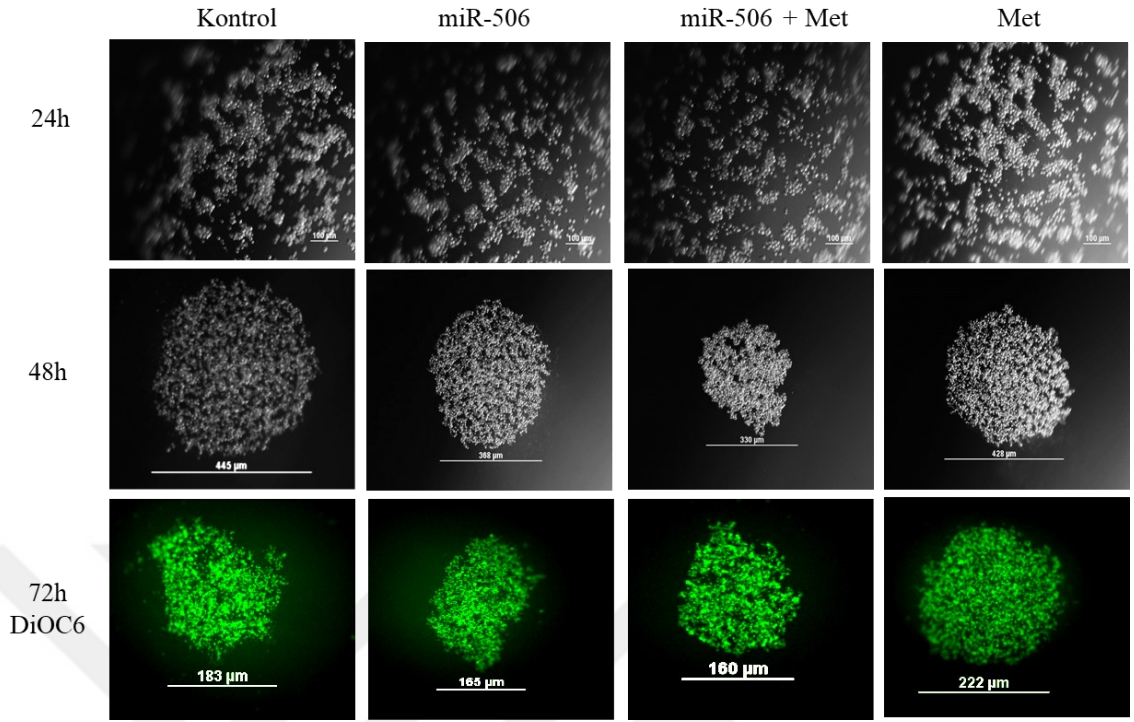
Yüksek metastatik karakter gösteren MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatten sonra sferoid oluşumu gözlenmiştir. Bu hücelere metformin uygulaması sferoid çaplarında azalmaya sebep olmuştur. miR-506+ MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sferoid oluşumu kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde baskılanmıştır. miR-506+ hücre grubunda metforminin etkisi artmıştır ve 72. saatte kontrol grubuna kıyasla sferoid çaplarının azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 24).

MCF-7



Şekil 23. miR-506 ifadesinin MCF-7 hücrelerinde metformin varlığında ve yokluğunda üç boyutlu sferoid kültür formlarına etkisinin asılı damla metodu ile gösterilmesi.

MDA-MB-231



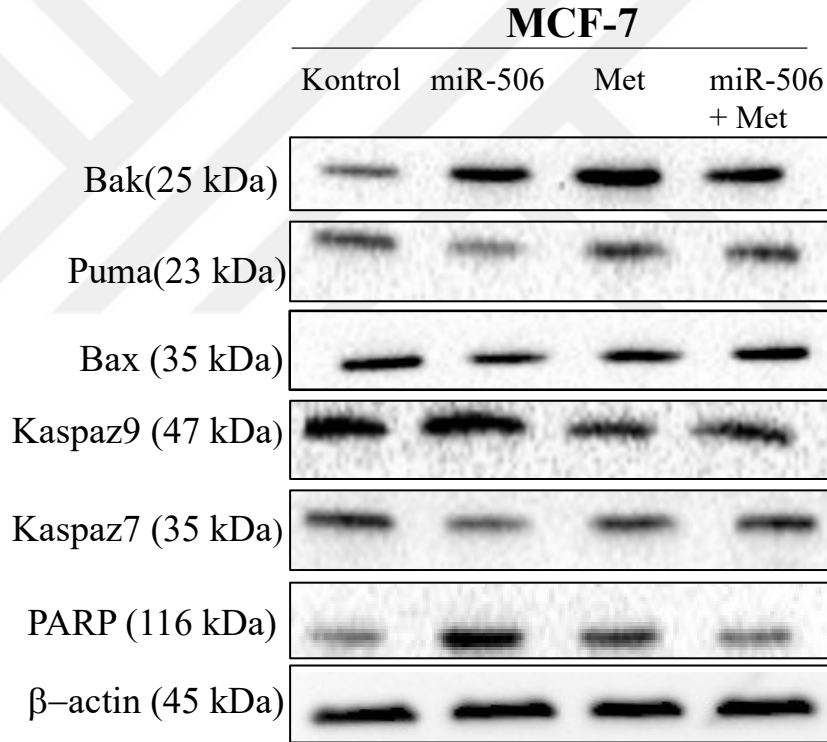
Şekil 24. miR-506 ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinde metformin varlığında ve yokluğunda üç boyutlu sferoid kültür formlarına etkisinin asılı damla metodu ile gösterilmesi.

5.8. MDA-MB-231 Ve MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatlarında miR-506 İfadesine Göre Metforminin Apoptotik Hücre Ölüm Mekanizmasına Etkisinin İncelenmesi

Metforminin apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkisinin gözlemek üzere miR-506 ifadesi arttırılan ve normal hücrelere 5 mM 24 saat metformin uygulaması sonrası toplam protein izolasyon yapılmıştır. Apoptozla ilişkili pro-apoptotik proteinlerin (Bak, Bax, puma, kaspaz 9, PARP) ifadelerindeki değişim immünoblotlama ile MCF-7 ve MDA-MB-231 mem kanseri hücrelerinde incelenmiştir (Şekil 25-26). miR-506 ifadesi arttırıldığında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Bak ifadesinde artış gözlenmiştir. Metformin tek başına Bak ifadesini MCF-7 hücrelerinde daha fazla arttırırken, MDA-MB-231 hücrelerinde benzer artış gözlenmemiştir. Ancak miR-506 ifadesi arttırılan (miR-506+) hücrelerde metformin Bak ifadesini anlamlı ölçüde arttırmıştır. Puma ve Bax ifadesi miR-506+ MDA-MB-231 hücrelerinde miR-506+ MCF-7 hücrelerine kıyasla daha yüksektir. Bu hücrelere metformin uygulandığında MDA-MB-231 hücrelerinde puma ifadesi daha fazla artmıştır. Ancak Bax

ifadesi metformin uygulanan miR-506+ MCF-7 hücrelerinde, MDA-MB-231 hücrelerine göre daha yüksektir.

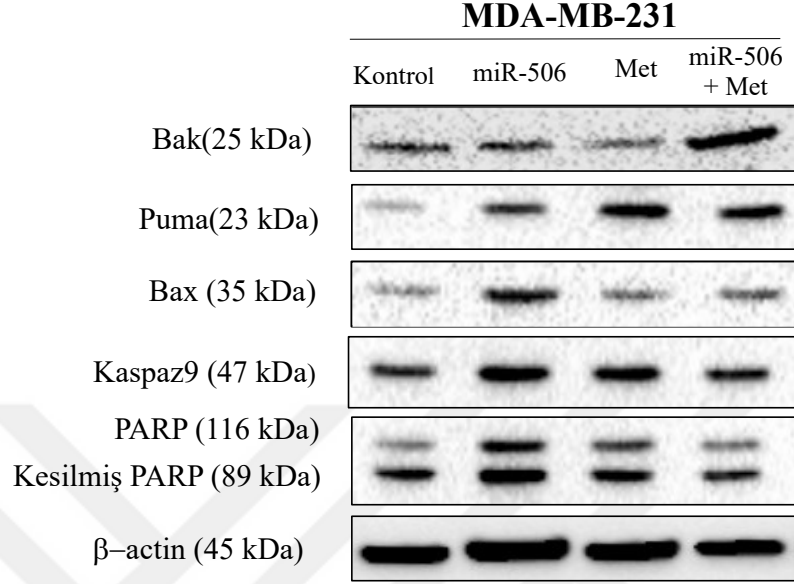
Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılmasında ve gerçekleşmesinde rol alırlar. İnaktif halde bulunan kaspaz ailesi, proteolitik olarak birbirini aktiveleştirme özelliğindedir. Başlatıcı kaspaz 9 tarafından efektör kaspaz 3 ve kaspaz 7 aktive edilir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine metformin uygulandığında inaktif kaspaz 9 ifadesi anlamlı oranda azalmıştır. miR-506+ hücrelere metformin uygulaması inaktif kaspaz 9 formunun daha yüksek oranda azalmasını sağlamıştır. MCF-7 hücrelerinde inaktif kaspaz 7 ifadesi miR-506+ hücrelerinde kontrol grubuna göre daha düşüktür. Metformin kaspaz 7 ifadesinde azalmaya sebep olmuştur. Kontrol grubuna kıyasla miR-506+ metformin grubunda inaktif kaspaz 7 ifadesi daha düşüktür (Şekil 25).



Şekil 25. miR-506 ifadesi arttırılan ve normal MCF-7 hücrelerinde metformin uygulamasının apoptotik hücre ölüm mekanizmasında görevli protein ifadelerine etkisinin immunoblotlama ile incelenmesi

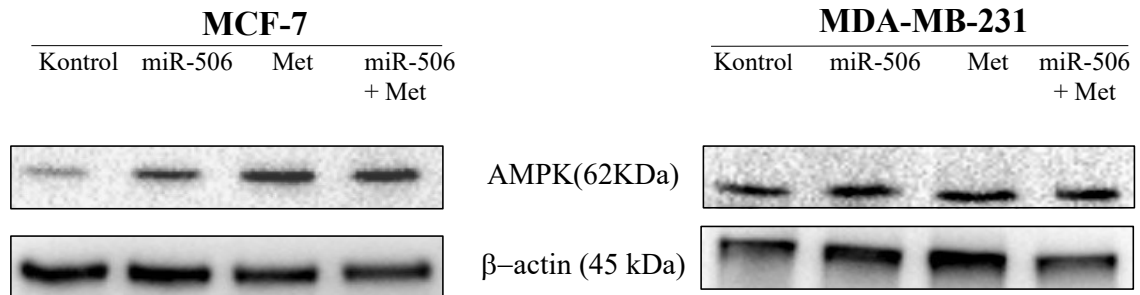
PARP (ADP-riboz) polimeraz, DNA onarımı, proteindir. Apoptoz gerçekleştiren hücrede bulunması muhtemel olan çok sayıdaki DNA ipliği kırıkları PARP aktivasyonuna yol açmaktadır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde aktif PARP (89 kDa) ifadesi incelendiğinde, metformin uygulaması sonrası PARP ifadesinde artış gözlenmiştir. miR-506

transfeksiyonu sonrası metformin uygulamasında ise kontrol grubuna göre bir artış olsa da, miR-506+ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine metformin uygulandığında PARP ifadesindeki artış azalmıştır.



Şekil 26. miR-506 ifadesi artırılan ve normal MDA-MB-231 hücrelerinde metformin uygulamasının apoptotik hücre ölüm mekanizmasında görevli protein ifadelerine etkisinin immnoblottlama ile incelenmesi

AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), hem tek hücreli organizmalar hem de memelilerde bulunur. AMPK metabolizmanın düzenlenmesinde ve hücrel enerji homeostazının sürdürülmesinde kilit rol oynar. AMPK meme kanseri hücreleri anti-proliferatif etisin ve hücrelerde otofaji indükleyerek hücre ölümüne neden olur. Metforminin kanser hücreleri üzerindeki etkisi, AMPK'yi aktive ederek mTOR'un inhibisyonu yoluyla akış aşağı büyüme faktörü sinyalini inhibe eder. Her iki hücre hattında miR-506 ifadesi arttırıldığında AMPK seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 27). Metformin uygulanan hücrelerde AMPK seviyesinde yine anlamlı bir artış gözlenmiştir. miR-506+ hücrelerde AMPK seviyesinde yalnızca metformin grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir.



Şekil 27. miR-506 ifadesi arttırılan ve normal MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde metformin uygulamasının AMPK ifadesine etkisinin immunoblotlama ile incelenmesi.



6. TARTIŞMA

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür, insidansı değerlendirildiğinde ikinci sırada görülen kanserdir. Çalışmamızda meme kanseri hücreleri hatları MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerinde miR-506 ifadesindeki artışın metforminin anti-proliferatif etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda öncelikle metforminin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. İleride kullanılacak metformin konsantrasyonlarının 2,5 mM ve 5 mM olması kararlaştırılmıştır. Ardından MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki miR-506 ifadeleri incelenmiştir. miR-506 ifadelerine metforminin etkisi gerçek zamanlı PZR analizi ile incelenmiştir. miR-506 ifadesinin metformin uygulaması ile arttığı her iki hücre hattında gözlenmiştir. Çalışmamızda, metforminin miR-506 ilişkili olarak hücre ölüm mekanizmasına ve migrasyonuna etkisi incelendiğinden, hücrelere sentetik miR-506 mimik transfeksiyonu yapılmıştır. Hücrelerde miR-506 ifadesi artırılmıştır. Normal ve miR-506+ hücreleri olmak üzere hücre migrasyon ve hücre sağ kalım/ölüm analizleri metformin varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Buna göre miR-506 ifadesi artırıldığında metforminin hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini, migrasyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Apoptotik hücre ölüm belirteçleri kaspaz 9 ve PARP ifadeleri incelendiğinde miR-506 ile metforminin sinerjistik etki yarattığı gözlenmiştir.

Metformin 2 Diyabet mellituslu tedavisi için kullanan, hepatik glukoneogenezi azaltarak kan glukoz seviyelerini düşürür bir biguanid ilaçtır. 2005 yılında metformin alan tip 2 diyabet mellituslu (T2DM) hastaların kanser insidansında diğer glukoz düşürücü ilaçlar alanlara göre anlamlı bir düşüş gösterdiğini bildiren retrospektif bir araştırmadan bu yana, ilacın etkisi üzerine epidemiyolojik ve deneysel çalışmaların sayısı hızla artmaktadır (51). Son klinik araştırmalar, metforminin meme kanseri riskini azalttığını, kanserli hastaların sağkalımını uzattığını göstermiştir (66). Kanada Kanser Araştırmaları Grubu (CCTG) standart tedavi gören yüksek riskli erken evre meme kanserli kadınlarda metforminin etkisinin test edilmesi 2010 yılında başlatılmıştır. Ek olarak, metforminin prostat kanseri, yumurtalık kanseri, karaciğer kanseri tümör büyümesini engellediği bildirilmiştir (67). Metforminin iki farklı etki yolağı bulunur. Metformin, siklin D1, siklin E1 ve E2F transkripsiyon faktörü 1 dahil olmak üzere G1-S hücre döngüsü geçişini düzenleyen proteinlerin ekspresyon seviyelerini modüle ederek hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasını ve koloni oluşumunu engeller (68)(69). AMP

kinaz (AMPK) düzenleyici sistem, metformin tedavisinin ana hedeflerinden biridir (70). AMPK'nin aktivasyonu, mTOR ve yağ asidi sentezi sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve tümör büyümesini düzenler ve ayrıca apoptotik yolu (p53/p21 eksen) uyarır (71). Bununla birlikte, meme kanserinde metforminin kesin moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılmayı beklemektedir.

EMT birçok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucu epitel hücrelerinin epitel özelliklerini kaybederek mezankimal özellikler kazanmalarına sebep olan önemli bir gelişim sürecidir. EMT'nin sonucunda kompakt ve düzenli olan epitel hücreleri normal gelişim sürecinde organizmanın farklı kısımlarına göç ederek bu kısımlarda farklı dokuları oluşturabilmelerini olanaklı kılan daha az kompakt ve hareketli bir yapı kazanırlar. Birincil tümörlerin EMT geçiren epitel hücreleri istilacı ve göç edici özellikler kazandığından, EMT karsinogenez sırasındaki metastaz oluşumuna da katkı sağlamış olur. Patolojik ve normal EMT arasındaki moleküler ve hücre benzerlikler nedeniyle, normal gelişim sırasında gerçekleşen EMT sürecini ve regülasyonu anlamak karsinogenezi daha iyi anlamamızı sağlayabilir. Yapılan çalışmalarda metforminin servikal ve meme kanseri dahil diğer kanser türlerinde mezankimal belirteçler olan Snail ve Slug ifadelerinin baskılanması ile hücredeki N-kaderin ve vimentin seviyelerinin azalmasına bağlı olarak EMT'yi baskıladığını göstermiştir (72). Meme kanseri üzerine yapılan diğer bir çalışmada, metforminin STAT3 ve NF- κ B'nin aktivasyonunu önleyerek IL-6 kaynaklı EMT'yi, hücre proliferasyonunu ve birincil meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. STAT3 inaktivasyonunun, AMPK aracılığıyla gerçekleştiği, ancak NF- κ B yoluyla gerçekleşmediği gösterilmiştir (73).

Kanser hücrelerinde düşük glukoz ve metformin tedavisinin ATP üretimini azaltarak ve hayatta kalma sinyal yollarını inhibe ederek hücre ölümüne yol açtığını bulmuşlardır (74). Çalışmamızda MDA-MB231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde metforminin anti-proliferatif etkisi gösterilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde metforminin (2.5 ve 5mM) 24 saat uygulanmasıyla hücre canlı azalma gösterilmiştir (75). Belirtilen konsantrasyonlar her iki meme kanseri hücresinde mitokondriyel membran potansiyelinin bozulmasına yol açmış ve hücre sağ kalımında azalmaya sebep olmuştur. Aynı zamanda metformin uygulanan hücreler floresan bir boya olan DAPI ile boyandığında DNA kırıklarında artış gözlenmiştir. miR-506 nispeten yakın zamanda klonlanmıştır ve çeşitli kanserlerde ve özellikle malign transformasyona uğramış hücrelerde tümör baskılayıcı bir miRNA görevi

görmektedir(76)(77). miR-506'nın seviyesinde azalma, çeşitli tümörlerde tanımlanmıştır ve miR-506'nın aşırı ekspresyonu, hepatoselüler karsinom, rahim ağzı kanseri ve yumurtalık kanserinin gelişimi ve ilerlemesi üzerinde inhibe edici etki gösterdiği belirtilmiştir (78). Ancak Streicher ve arkadaşları, miR-506'nın yüksek ifadesinin düzenlendiğini ve melanomlarda bir onkogen gibi davrandığını bildirmiştir (79). Birlikte ele alındığında, bu bulgular miR-506'nın işlevinin hücre tipine özgü görüldüğünü öne sürmüştür. Yapılan bir araştırmada, miR-506'nın meme kanseri hücrelerinde anti-onkojenik rolü gösterilmiştir. miR-506'nın hedeflerinden IQ motifi içeren GTPaz aktive edici protein 1 (IQGAP1) ifadesinin baskılanması ile miR-506'nın meme kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve adezyonunu ERK yolağı üzerinden baskıladığını ortaya çıkarmıştır (41). Ancak miR-506'nın farklı meme kanseri hücrelerindeki etki mekanizması hala araştırmaların odak noktasındadır.

Bu tez çalışmasında MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde miR-506 seviyesi incelenmiş ve metformin uygulandığında miR-506 seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bunun üzerine metformin-miR-506 ilişkisinin hücre çoğalmasına, migrasyonuna ve hücre ölüm mekanizmasına etkisi incelenmiştir.

miR-506 ifadesi sentetik miR-506 mimik transfeksiyonu ile MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde arttırılmıştır. miR-506 ifadesindeki artışın metforminin etki mekanizmasına katkısı öncelikle koloni testi ile incelenmiştir. Her iki hücre hattında metformin hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini baskılamıştır. miR-506+ hücrelerde koloni oluşum potansiyelinde özellikle MDA-MB-231 hücrelerinde anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir. miR-506-3p'nin meme kanserinde oynadığı önemli tümör baskılayıcı rolüne rağmen, sıklıkla düşük seviyede ifade edildiği bilinmektedir. Ayrıca, hücre döngüsü ilerlemesini yönetmedeki rolü, meme kanserinde kapsamlı bir şekilde çalışılmamıştır. Myc, E2F ve Rb proteinleri, hücre döngüsü düzenlemesinde kilit oyuncular ve meme kanseri olgularında CDK-RB-E2F eksenini, birkaç genetik mutasyon tarafından kapsamlı bir şekilde serbest bırakılır. Ek olarak, güçlü proto-onkogen Myc, meme kanserinde yüksek oranda ifade edilir. Böylece miR-506-3p'nin meme kanserinde hücre döngüsü düzenlemesinde oynadığı rolü ortaya çıkarılması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda miR-506-3p'nin ektopik ekspresyonunun, cMyc ve E2F proteinlerinde önemli bir azalmaya yol açtığı ve buna eşlik eden RB proteininde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. miR-506-3p, meme kanserinde nadiren araştırıldığından, miRNA-506-3p'nin gerçekleştirilen fonksiyonel analizi, hem

MDA-MB-231 hücrelerinde hem de MCF-7 hücrelerinde hücreysel canlılığı ve migrasyon kapasitesinde önemli bir düşüşe yol açtığı gözlenmiştir (80) .

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde metforminin miR-506 ile ilişkili olarak üç boyutlu hücre formlarına etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda MCF-7 hücreleri miR-506 ifadesinin artışına bağlı olarak dağınık formda sferoid oluşturmuşlardır. Metforminin bu hücreler üzerinde koloni oluşturma potansiyellerini baskılayıcı etkisi gözlenmiştir. Sferoid formlarda parçalanmış bir yapı gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde, MCF-7 hücrelerine kıyasla daha kompakt bir sferoid oluşumu gözlenmiştir. miR-506 ifadesinin arttırıldığı sferoid formlarının çapları daha düşüktür. MDA-MB-231 miR-506 hücrelerine metformin uygulandığında, yalnızca metformin uygulamasına göre sferoid çaplarında anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir. Metformin uygulanan sferoidlerin çaplarının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, glikoz yokluğunda metformin uygulanan MDA-MB-231 hücreleri, baskılanmış hücre çoğalmasına ve nihayetinde hücre ölümüne yol açan enerji stresiyle baş edemediği gösterilmiştir (81). Enerji stresi veya glukoz tükenmesi, bol besin bulunan koşullarda kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayan, ancak enerjiden yoksun koşullarda hücre sağkalımını destekleyebilen AMPK'yi aktive etmektedir(82). Glikozun metforminle uyarılan AMPK aktivasyonunu bloke ettiğini gözlemlenmiştir. AMPK aktivasyon yolunun bozulması, akciğer ve kolon kanseri hücrelerinin glukozu tükenmiş durumda metformine duyarlılığını arttırdığı da yapılan çalışmalarda ispatlanmıştır, bu da glukozsuz ortamda metformin ile uyarılan AMPK aktivasyonunun hayatta kalma yanlısı bir rolü olduğunu düşündürmektedir(83). Glikoz yokluğunda metformin, her iki in vitro hücre modelinde (2B tek katmanlı kültür ve 3B tümör sferoidleri) büyütülen MDA-MB-231 hücrelerinin hayatta kalmasını azalttığından, muhtemelen aynı zamanda zayıf perfüze kanser hücrelerinin in vivo ortamda hayatta kalmasını da azaltacaktır (84). Pankreas kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada miR-506 ifadesi arttırılan hücre gruplarının 3B hücre kültür formlarının oluşumunu baskıladığı ve ilaca karşı hassasiyeti arttırdığı gösterilmiştir (85).

Hepatoselüler karsinoma hücreleri (HCC) üzerinde yapılan çalışmada miR-506'nın aşırı ekspresyonu, HCC hücrelerinin in vitro göçünü ve invazivliğini ve in vivo metastazını önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Mekanizma açısından, IL8'i miR-506'nın doğrudan ve işlevsel bir hedef geni olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada, miR-506'nın ektopik ekspresyonunun, E-kadherin ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını ve aynı zamanda HCC hücrelerinde vimentin ekspresyonunu azalttığını gösterilmiş, bu da miR-

506'nın EMT'yi baskılayarak HCC metastazını inhibe ettiğini düşündürmüştür. miR-506'nın MDA-MB-231 hücreleri üzerinde invazyon ve migrasyon aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada miR-506'nın doğrudan CD151, VIM ve SNAI2'yi hedefleyerek EMT mekanizmasında baskılayıcı olarak rol oynadığını gözlenmiştir (12). Bu kapsamda miR-506 + meme kanseri hücrelerinde metforminin migrasyonu inhibe edici etkisinin arttığı çalışmamızla da gösterilmiştir.

miR-506 ifadesi arttırıldığında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde AMPK seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu hücreler metformin uygulandığında AMPK seviyesindeki artış daha çok indüklenmiştir. AMPK ifadesi Doku insülin duyarlılığını artıran hücrelerdeki lipid metabolizmasının ana düzenleyicisi olan SIRT1'in, miR-506-3p ve SIRT1 3'-UTR arasında kayda değer bir tamamlayıcılık ile, miR-506-3p'nin tahmin edilen bir hedefi olduğunu göstermiştir. Hücre içi lipid birikimi ile çakışan yüksek glukozla muamele edilmiş HepG2 ve Huh7 karaciğer hücrelerinde miR-506-3p ekspresyon seviyesinde önemli bir artış gözlendiği gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, bu hepatositlerin miR-506-3p mimikleri ile transfeksiyonu, glikoz maruziyeti üzerine bu hücreler içindeki lipid birikiminde önemli bir artışa yol açarken, bu hepatositlerin miR-506-3p inhibitörü ile transfeksiyonu, bunlar içindeki lipid birikiminde önemli bir azalma ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Metforminin hedefi olan AMPK aktivasyonunun lipid üretimini azalttığı ve yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada miR-506-3p mimik transfeksiyonunun, AMPK fosforilasyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiş ve SIRT1/AMPK ekseninin, mevcut in vitro hepatik steatoz modelinde miR-506-3p'nin metabolik etkilerine en azından kısmen aracılık ettiği öne sürülmüştür (86).

Çalışmamızda metforminin apoptotik hücre ölüm mekanizmasına etkisi apoptotik belirteçler ile immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak 5 mM metforminin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemiştir. Apoptoz, hücre proliferasyonunu kontrol altında tutan bir mekanizmadır ve BCL-2 protein ailesi, miyokard, endotelial ve kanser hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinin apoptoza yanıtında önemli bir rol oynar (87). Ayrıca, bu proteinler birincil olarak, hücreler tarafından doğrudan alınan sinyallerin hücre ölümüne yol açan bir olaylar dizisini başlatabildiği intrinsik (mitokondriyal) bir yol aracılığıyla apoptozu başlatmaktan sorumludur(88). BCL-2 protein ailesinin proapoptotik bir üyesi olan ve normalde sitosolik bölmede lokalize olan BAX, zar boyunca kanallar oluşturmak için dış mitokondriyal zara yer değiştirir ve üzerinde oligomerize olur. BAX gibi pro-apoptotik proteinlerin BCL-2 gibi

anti-apoptotik proteinlere nispi oranı, hücrenin hayatta kalmasını veya ölümünü belirler. Bu nedenle, yüksek bir BAX/BCL-2 oranı, apoptotik aktivasyona karşı daha fazla hassasiyetle ilişkilidir (89). Buna göre miR-506+ hücrelerde metformin uygulaması ile kontrol grubuna oranla artan Puma, Bak ve Bax ifadesi apoptozisin tetiklendiğini göstermiştir. İnaktif kaspaz ifadelerinde azalma, mitokondriyel membran potansiyeli kaybı ile ilişkili apoptozun miR-506 ifadesinin artışına bağlı olarak arttığını göstermiştir. Meme kanseri dokularından alınarak oluşturulan primer hücreler üzerinde yapılan çalışmada, meme kanseri hücrelerinde hem tümör büyümesinin inhibisyonu hem de metformin tedavisi yoluyla apoptozun indüklenmesi, p53 ve siklin D1 tutulumunu gerektirdiğini göstermiştir. Mevcut çalışmanın umut verici sonuçlara rağmen bazı sınırlamaları vardır. AMPK-a'nın kinaz aktivitesi belirlenmemiştir (90). Bu nedenle, metforminin kanser gelişimi ve tümör büyümesi üzerindeki inhibitör etkilerini nasıl gösterdiğine dair mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bu yeni antitümör moleküler yaklaşıma göre henüz birkaç dönüm noktasının geçilmesi gerekmektedir. İlk olarak, metforminin antikanser etkisi ve uygun güvenlik dozu için diyabetik olmayan kişilerde uygulanabilirliği aydınlatılmalıdır. İkinci olarak neoplastik dokuda metforminin yeterli ilaç konsantrasyonu belirlenmeli ve üçüncüsü gelecekte metforminin klinik belirteç olarak faydası tanımlanmalıdır.

7. KAYNAKÇA

1. ÇAPANOĞLU G, BAKAR E. MemeKanseri Ve MemeKanseri Metastazında Rol Oynayan MolekülerPrognostik Faktörler. Cumhuri Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü Derg. 2018;3(2):40–4.
2. Öztemur Y, Aydos A, Gür-dedeoğlu B. Meme kanseri mikrodizin verilerinin biyoinformatik yöntemler ile bir araya getirilmesi - Meta-analiz yaklaşımı. Turk Hij ve Deney Biyol Derg. 2015;72(2):155–62.
3. Fak TIP. TRIPLE NEGATİF MEME KANSERİ OLGULARINDA PD-L1 VE GALEKTİN-3'ÜN TÜMÖRE KARŞI İMMUN. 2020;
4. Neural C, Models N. Meme Kanserinin Evrimsel Sinir Ağları Modelleriyle Tespitinde Farklı Görüntü Büyütme Oranlarının Etkisi. 2020;10(2):186–94.
5. Cadenas C. Prognostic signatures of breast cancer: Perou's molecular subtypes and schmidt's metagenes. EXCLI J. 2012;11:204–7.
6. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. Cancers (Basel). 2021;13(17):1–30.
7. AÇIKGÖZ A, AKAL YILDIZ E. Meme Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri. Ergoter ve Rehabil Derg. 2017;5(1):45–56.
8. BALKAN B, DEMİR G, BALKAN F, ÇETİNGÖK H, ATIÇ E. Metformin İlişkili Laktik Asidoz; Bir Olgu Nedeni ile Literatürün Gözden Geçirilmesi. Aydın TıpFakültesiKlinikleriDergisi. 2020;3(1):0–1.
9. Samuel SM, Varghese E, Koklesová L, Líšková A, Kubatka P, Büsselberg D. Counteracting chemoresistance with metformin in breast cancers: Targeting cancer stem cells. Cancers (Basel). 2020;12(9):1–52.
10. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: From molecular landscape to clinical aspects. Int J Mol Sci. 2021;22(1):1–24.
11. Yu F, Lv M, Li D, Cai H, Ma L, Luo Q, et al. MiR-506 over-expression inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cells. Med Sci Monit. 2015;21:1687–92.
12. Arora H, Qureshi R, Park WY. miR-506 Regulates Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cell Lines. PLoS One. 2013;8(5):1–7.
13. YENMİŞ G. Metformin, Diyabet ve Meme Kanseri Üçgeni The Triangle of

- Metformin, Type 2 diabetes mellitus, and the Breast Cancer. *Aydın Tıp Fakültesi Klin Derg.* 2018;3(2):55–65.
14. Xu C, Ganesan K, Liu X, Ye Q, Cheung Y, Liu D, et al. Prognostic Value of Negative Emotions on the Incidence of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of 129,621 Patients with Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(3):1–18.
 15. Cejuela M, Martin-Castillo B, Menendez JA, Pernas S. Metformin and Breast Cancer: Where Are We Now? *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):1–19.
 16. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int.* 2022;2022.
 17. Heer E, Harper A, Escandor N, Sung H, McCormack V, Fidler-Benaoudia MM. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *Lancet Glob Heal.* 2020;8(8):e1027–37.
 18. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. Vol. 5, *Nature Reviews Disease Primers.* 2019.
 19. Marra A, Trapani D, Viale G, Criscitiello C, Curigliano G. Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. *npj Breast Cancer.* 2020;6(1):1–16.
 20. Lian CL, Zhang HY, Wang J, Lei J, Hua L, Chen YX, et al. Staging for Breast Cancer With Internal Mammary Lymph Nodes Metastasis: Utility of Incorporating Biologic Factors. *Front Oncol.* 2021;10(January):1–8.
 21. Tungasukruthai S, Petpiroon N, Chanvorachote P. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis and potential anti-metastatic compounds. *Anticancer Res.* 2018;38(5):2607–18.
 22. Konduri S, Singh M, Bobustuc G, Rovin R, Kassam A. Epidemiology of male breast cancer. *Breast.* 2020;54:8–14.
 23. Arafat HM, Omar J, Muhamad R, Al-Astani TAD, Shafii N, Al Laham NA, et al. Breast Cancer Risk From Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors among Palestinian Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2021;22(7):1987–95.
 24. Tepebaşı MY. Determination of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients at Risk of Breast and / or Ovarian Cancer by Next Generation Sequencing in the Isparta Region Isparta Bölgesinde Meme ve / veya Over Kanseri Riski Taşıyan

- Hastalarda BRCA1 ve BRCA2 Gen Mutasyonla. 2021;5(1):74–9.
25. A case-only study to identify genetic modifiers of breast cancer risk for BRCA1/BRCA2 mutation carriers. (2021).
 26. Chian J, Sinha S, Qin Z, Wang SM. BRCA1 and BRCA2 Variation in Taiwanese General Population and the Cancer Cohort. 2021;8(June):1–9.
 27. Bergamino MA, López-Knowles E, Morani G, Tovey H, Kilburn L, Schuster EF, et al. HER2-enriched subtype and novel molecular subgroups drive aromatase inhibitor resistance and an increased risk of relapse in early ER+/HER2+ breast cancer. *eBioMedicine*. 2022;83.
 28. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Tinchon C, Petzer A, Balic M, Heibl S, et al. Landscape of HER2-low metastatic breast cancer (MBC): results from the Austrian AGMT_MBC-Registry. *Breast Cancer Res*. 2021;23(1):1–9.
 29. Shen Z, Xue D, Wang K, Zhang F, Shi J, Jia B, et al. Metformin exerts an antitumor effect by inhibiting bladder cancer cell migration and growth, and promoting apoptosis through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *BMC Urol*. 2022;22(1):1–10.
 30. Xu F, Na L, Li Y, Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci*. 2020;10(1).
 31. Hervieu A, Kermorgant S. The role of PI3K in Met driven cancer: A recap. *Front Mol Biosci*. 2018;5(NOV):1–11.
 32. Zhao Y, Qian Y, Sun Z, Shen X, Cai Y, Li L, et al. Role of PI3K in the Progression and Regression of Atherosclerosis. *Front Pharmacol*. 2021;12(March):1–19.
 33. Luo Y, Xu W, Li G, Cui W. Weighing in on mTOR complex 2 signaling: The expanding role in cell metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
 34. Yoon MS. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass. *Front Physiol*. 2017;8(OCT):1–9.
 35. He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1).
 36. Götting I, Jendrossek V, Matschke J. A new twist in protein kinase b/akt signaling: Role of altered cancer cell metabolism in akt-mediated therapy resistance. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–34.
 37. Peng Y, Wang Y, Zhou C, Mei W, Zeng C. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Front Oncol*. 2022;12(March):1–17.
 38. Otmani K, Lewalle P. Tumor Suppressor miRNA in Cancer Cells and the Tumor

- Microenvironment: Mechanism of Deregulation and Clinical Implications. *Front Oncol.* 2021;11(October):1–15.
39. Lu Y. The Role of MicroRNAs in the Progression, Prognostication, and Treatment of Breast Cancer. *Nov Approaches Cancer Study.* 2020;4(2):337–46.
 40. Annese T, Tamma R, De Giorgis M, Ribatti D. microRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis. *Front Oncol.* 2020;10(November):1–21.
 41. Sun G, Liu Y, Wang K, Xu Z. MIR-506 regulates breast cancer cell metastasis by targeting IQGAP1. *Int J Oncol.* 2015;47(5):1963–70.
 42. Ju X, Tang Y, Qu R, Hao S. The emerging role of circ-shprh in cancer. *Oncotargets Ther.* 2021;14(38):4177–88.
 43. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(2):121–35.
 44. Chen YC, Lee S Da, Kuo CH, Ho LT. The effects of altitude training on the AMPK-related glucose transport pathway in the red skeletal muscle of both lean and obese zucker rats. *High Alt Med Biol.* 2011;12(4):371–8.
 45. Garcia D, Shaw RJ. of Metabolic Balance. *Mol Cell.* 2018;66(6):789–800.
 46. Lee JO, Lee SK, Kim JH, Kim N, You GY, Moon JW, et al. Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. *J Biol Chem.* 2012;287(53):44121–9.
 47. Kim HW. Metabolomic approaches to investigate the effect of metformin: An overview. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19).
 48. Goodwin PJ, Dowling RJO, Ennis M, Chen BE, Parulekar WR, Shepherd LE, et al. Effect of metformin versus placebo on metabolic factors in the MA.32 randomized breast cancer trial. *npj Breast Cancer.* 2021;7(1).
 49. Huda F, Ekawati S, Addina AP, Faried A, Berbudi A, Rusdiana T, et al. Anti-tumor activity of metformin in human epidermal growth factor receptor 2 positive breast cancer cells. *Sains Malaysiana.* 2021;50(5):1393–405.
 50. Mokhena T, Mochane M, Tshwafo M, Linganiso L, Thekisoe O, Songca S. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech.* 2016;225–40.

51. Diering, Maxson & Mitchell, Freeman. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139–48.
52. Jones VC, Dietze EC, Jovanovic-Talisman T, McCune JS, Seewaldt VL. Metformin and Chemoprevention: Potential for Heart-Healthy Targeting of Biologically Aggressive Breast Cancer. *Front Public Heal.* 2020;8(October):1–15.
53. Singh V, Khurana A, Navik U, Allawadhi P, Bharani KK, Weiskirchen R. Apoptosis and Pharmacological Therapies for Targeting Thereof for Cancer Therapeutics. 2022;
54. Panda P, Ray S, Behera S, Tripathy S kumar, Bhanja SS, Acharya V. A review on apoptosis: When death precedes life. *Eur J Mol Clin Med.* 2020;7(6):1174–82.
55. Sinha A. Apoptosis (A Programmed cell death) -A Review APOPTOSIS (PROGRAMMED CELL DEATH) -A REVIEW. 2020;6984(June):1133–43.
56. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
57. Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(13):1042–53.
58. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, Van Gurp M, Van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004;23(16 REV. ISS. 2):2861–74.
59. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):58–66.
60. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995;14(22):5579–88.
61. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17(6):1675–87.
62. Wanner E, Thoppil H, Riabowol K. Senescence and Apoptosis: Architects of Mammalian Development. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8(January):1–16.
63. Roufayel R, Younes K, Al-Sabi A, Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life.* 2022;12(2).
64. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim:

- A novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*. 1998;17(2):384–95.
65. D’Aguanno S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells*. 2020;9(5).
 66. Zhang J, Li G, Chen Y, Fang L, Guan C, Bai F, et al. Metformin inhibits tumorigenesis and tumor growth of breast cancer cells by upregulating miR-200c but downregulating AKT2 expression. *J Cancer*. 2017;8(10):1849–64.
 67. Long L, Hu X, Li X, Zhou D, Shi Y, Wang L, et al. The anti-breast cancer effect and mechanism of Glimepiride-Metformin adduct. *Onco Targets Ther*. 2020;13:3777–88.
 68. Song CW, Lee H, Dings RPM, Williams B, Powers J, Santos T Dos, et al. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci Rep*. 2012;2:28–31.
 69. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE, et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2009;8(13):2031–40.
 70. Soga M, Ohashi A, Taniguchi M, Matsui T, Tsuda T. The di-peptide Trp-His activates AMP-activated protein kinase and enhances glucose uptake independently of insulin in L6 myotubes. *FEBS Open Bio*. 2014;4:898–904.
 71. Hadad SM, Fleming S, Thompson AM. Targeting AMPK: A new therapeutic opportunity in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(1):1–7.
 72. Yin W, Liu Y, Liu X, Ma X, Sun B, Yu Z. Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma via the mTOR/HIF-1 α /PKM2/STAT3 pathway. *Oncol Lett*. 2021;21(1):1–7.
 73. Esparza-López J, Alvarado-Muñoz JF, Escobar-Arriaga E, Ulloa-Aguirre A, Ibarra-Sánchez MDJ. Metformin reverses mesenchymal phenotype of primary breast cancer cells through STAT3/NF- κ B pathways. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–13.
 74. Ma L, Wei J, Wan J, Wang W, Wang L, Yuan Y, et al. Low glucose and metformin-induced apoptosis of human ovarian cancer cells is connected to ASK1 via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-associated pathways. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):1–14.
 75. Gao ZY, Liu Z, Bi MH, Zhang JJ, Han ZQ, Han X, et al. Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro. *Exp Ther Med*. 2016;11(5):1700–6.

76. Wang Y, Cui M, Sun B Di, Liu FB, Zhang XD, Ye LH. MiR-506 suppresses proliferation of hepatoma cells through targeting YAP mRNA 3'UTR. *Acta Pharmacol Sin.* 2014;35(9):1207–14.
77. Zhao Y, Liu H, Li Y, Wu J, Greenlee AR, Yang C, et al. The role of miR-506 in transformed 16HBE cells induced by anti-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Toxicol Lett.* 2011;205(3):320–6.
78. Wen SY, Lin Y, Yu YQ, Cao SJ, Zhang R, Yang XM, et al. MiR-506 acts as a tumor suppressor by directly targeting the hedgehog pathway transcription factor Gli3 in human cervical cancer. *Oncogene.* 2015;34(6):717–25.
79. Streicher KL, Zhu W, Lehmann KP, Georgantas RW, Morehouse CA, Brohawn P, et al. A novel oncogenic role for the miRNA-506-514 cluster in initiating melanocyte transformation and promoting melanoma growth. *Oncogene.* 2012;31(12):1558–70.
80. Saad El Din G, Youness RA, Assal RA, Gad MZ. Mir-506-3p synergistically represses breast cancer progression through altering cell cycle regulators. *Ann Oncol.* 2018;29:vi28.
81. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* 2014;508(1):108–12.
82. Jeon SM, Hay N. The double-edged sword of AMPK signaling in cancer and its therapeutic implications. *Arch Pharm Res.* 2015;38(3):346–57.
83. Algire C, Amrein L, Bazile M, David S, Zakikhani M, Pollak M. Diet and tumor LKB1 expression interact to determine sensitivity to anti-neoplastic effects of metformin in vivo. *Oncogene.* 2011;30(10):1174–82.
84. Bizjak M, Malavašič P, Pirkmajer S, Pavlin M. Comparison of the effects of metformin on MDA-MB-231 breast cancer cells in a monolayer culture and in tumor spheroids as a function of nutrient concentrations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;515(2):296–302.
85. Rencüzoğullari Ö, Arisan ED. Palbociclib suppresses the cancer stem cell properties and cell proliferation through increased levels of miR-506 or miR-150 in Panc-1 and MiaPaCa-2 cells. *Turkish J Biol.* 2022;46(5):342–60.
86. Hu L-K, Chen J-Q, Zheng H, Tao Y-P, Yang Y, Xu X-F. MicroRNA-506-3p targets SIRT1 and suppresses AMPK pathway activation to promote hepatic steatosis. *Exp Ther Med.* 2021;22(6):1–8.

87. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175–93.
88. Picca A, Calvani R, Coelho-junior HJ, Marzetti E. Cell death and inflammation: The role of mitochondria in health and disease. *Cells.* 2021;10(3):1–17.
89. Rondelet B, Dewachter C, Kerbaul F, Kang X, Fesler P, Brimioulle S, et al. Prolonged overcirculation-induced pulmonary arterial hypertension as a cause of right ventricular failure. *Eur Heart J.* 2012;33(8):1017–26.
90. Yenmiş G, Beşli N, Yaprak Saraç E, Hoccoğlu Emre FS, Şenol K, Kanigür Sultuybek G. Metformin promotes apoptosis in primary breast cancer cells by downregulation of cyclin D1 and upregulation of P53 through an AMPK-alpha independent mechanism. *Turkish J Med Sci.* 2021;51(2):826–34.