



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**METFORMİN VE ELEKTROMANYETİK ALANIN KANSER
VE YAŞLANMA SÜRECİNE ETKİ EDEN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

TUĞBA SOYDAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. MATEM TUNÇDEMİR**

**II. DANIŞMAN
PROF. DR. GÖNÜL KANIGÜR**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yardımcı olan, yanında çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, karakteriyle ve sağlam duruşuyla her daim bana güç veren, bilime tutkulu, hayata karşı dik duruşu ile inancını, sevgisini ve desteğini hep arkamda hissettiğim emeklerinin hakkını verebilme kaygısı duyduğum çok sevgili hocam Prof. Dr. Gönül Kanıgür'e;

Tez çalışmam süresince, geniş bilgi birikimi ve tecrübeleriyle yol gösteren ve her türlü problem karşısındaki çözüm odaklılığı, sakin duruşu ile desteğini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim ve daha çok şey öğreneceğime inandığım, ihtiyaç duyduğum her an cesaret veren yaklaşımları için çok değerli danışmanım Temel Bilimler Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Matem Tunçdemir'e;

Tezimin laboratuvar çalışmasının önemli bir bölümünde verdiği destek ve laboratuvar imkanlarını sonuna kadar zorlayan, desteğini ve bana sağladığı motivasyonu hayatımın hiçbir anında unutmayacağım, geniş bilgi birikimiyle mesleki ve insani hiçbir konuda desteğini benden esirgemeyen Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli ağabeyim Dr. Öğr. Üyesi Güven Yenmiş'e;

Tez çalışmamda kullandığım elektromanyetik alan uygulama cihazının mimarı, güleryüzüyle destek ve yardımını esirgemeyen İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Tunaya Kalkan'a,

Lisansüstü hayatım boyunca daima yanımda olan, arkadaşlığı ile bana güven ve umut veren, cesaretlendiren, bitmek tükenmek bilmeyen her türlü sıkıntıda aradığım, ekibimizin değerli üyesi sevgili arkadaşım Kübra Tombultürk'e,

Değerli bilgilerinden yararlandığım ve her zaman desteğini hissettiğim Atlas Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ayhan Bilir'e, yine bu süreçte bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli Uzm. Biyolog Elif Yaprak'a

Ve hayatımın her aşamasında olduğu gibi lisansüstü eğitimim boyunca da her zaman yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim ve bana her daim güven veren sevgili aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34838



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yaşlanma ve Yaşlanma Teorileri.....	3
2.1.1. Yaşlanmada Serbest Radikal / Oksidatif Stres Teorisi	3
2.1.2. Yaşlanmada Genotoksik Stres Teorisi	4
2.2. Yaşlanma ve Kanserojenez	5
2.3. Hücresel Yaşlanma- Karsinogeneze ve Elektromanyetik Alanın Etkisi	6
2.4. Kanserojenez	10
2.4.1. NF-κB ve Kanserojenez	11
2.4.2. Proliferasyon Yolağı	14
2.4.3. Metastaz Yolağı	15
2.4.4. Anjiyogeneze Yolağı	15
2.5. Yaşlanma ve Kanserojeneze Sürecinde MMP'ler	16
2.6. Metformin' in Yaşlanma Üzerindeki Etkileri	17
2.6.1. Metforminin Yaşa Bağlı Hastalıklar Üzerindeki Etkileri	20
2.6.1.1. Kansere ve Metformin	21
2.6.2. Metforminin Kanserojeneze ve Yaşlanma Sürecine NF-kB yolağı üzerinden etkisi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. NIH/3T3 Fibroblast Hücre Soyu Kültürü	26
3.1.1. In vitro Deneyin Kurgulanması.....	26

3.2. NIH/3T3 Hücrelerine 50 Hz Elektromanyetik Alanın Uygulanması	27
3.3. Metformin ve/veya Manyetik Alan Uygulanan Deney Grupları	28
3.4. Tripan Mavisi Testi ile Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi.....	29
3.5. NIH/3T3 Hücre Proliferasyonunun BrdU Testi ile Tespit Edilmesi	30
3.6. MMP-2 ve MMP-9 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Yöntem ile Tespit Edilmesi	30
3.7. NF- κ B1 (p65) Aktivasyonunun ELISA Yöntemi ile Tayin Edilmesi	32
3.7.1. Nükleer Protein Ekstraksiyonu	32
3.7.2. NF- κ B (p65) DNA Bağlanma Aktivitesinin Elisa Yöntemi ile Tespit Edilmesi	33
3.8. <i>RELA</i> , <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>CDH1</i> Gen Ekspresyonu Analizi (QRT-PCR).....	38
3.8.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu	38
3.8.2. RNA ürünlerinden cDNA Sentezi.....	39
3.8.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	40
3.9. İstatistiksel Analiz.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. NIH/3T3 HÜCRELERİNDE METFORMİNİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN CANLILIK ÜZERİNE ETKİSİNİN TRİPAN MAVİSİ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ.....	44
4.2. NIH/3T3 HÜCRELERİNDE METFORMİNİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN BrdU TESTİ İLE BELİRLENMESİ.....	45
4.3. NIH/3T3 HÜCRELERİNDE METFORMİN VE ELEKTROMANYETİK ALANIN MMP-2 VE MMP-9 PROTEİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İMMÜNOSİTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ.....	46
4.4. METFORMİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN NF- κ B (p65) AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ELISA İLE BELİRLENMESİ	49
4.5. METFORMİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN <i>RELA</i> (p65), <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>CDH1</i> EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN QRT-PCR İLE BELİRLENMESİ	50
4.5.1 <i>RELA</i> (p65) mRNA Ekspresyon Düzeyleri	50
4.5.1. <i>MMP2</i> mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	51
4.5.2. <i>MMP9</i> mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	51
4.5.3. <i>CDH1</i> mRNA Ekspresyon Düzeyleri	52

5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	59
HAM VERİLER	76
FORMLAR	77
ETİK KURUL KARARI	78
PATENT HAKKI İZNİ	79
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	80
ÖZGEÇMİŞ	81



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3- 1: Farklı hücre hacimlerindeki örnekler için gerekli reaktif hacimleri	33
Tablo 3- 2: Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer (CTFB).....	35
Tablo 3- 3: Transkripsiyon Faktör NF- κ B (p65) Primer Antikoru Dilüsyonu	36
Tablo 3- 4: Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate Dilüsyonu	36
Tablo 3- 5: RNA ve Primer Reaksiyon İçeriği	39
Tablo 3- 6: Ters transkriptaz (RT) Reaksiyonunun İçeriği.....	40
Tablo 3- 7: QRT-PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primer Dizileri.....	41
Tablo 3- 8: RT-PCR reaksiyon karışımı	42
Tablo 3- 9: qRT-PCR Reaksiyonu Kullanılan Sıcaklık Döngüleri.....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Yüksek ROT seviyelerinin indüksiyonu ile AGE (ileri glikasyon son ürünleri), NF-κB klasik sinyal yolağını uyarır (15).....	4
Şekil 2-2:Kanser gelişiminde hücredeki fonksiyonel ve yapısal değişikliklerden sorumlu karsinojen olarak adlandırdığımız bu faktörler ekzojen ve endogen olarak sınıflandırılmaktadır (50).....	6
Şekil 2-3:Manyetik alanın karsinogenezdeki rolünü gösteren diyagram.....	8
Şekil 2-4:Manyetik spektruma ait diyagram.....	9
Şekil 2-5: Memelilerde NF-κB transkripsiyon faktör ailesinin üyelerinin şematik diyagramı (82).....	12
Şekil 2-6: IKK / NF-κB klasik yolağın diyagramı (82)	13
Şekil 2-7:Kanserojenin aşamalarını gösteren diyagram (91)	15
Şekil 2-8:NF-κB kanserogenezdeki rolünün gösteren diyagram (14'e göre uyarlanmıştır.)	16
Şekil 2-9:Metforminin in-vitro yaşlanma modelinde, yaşlanma karşıtı etki mekanizmasının diyagramı (128)	20
Şekil 2-10:Metforminin yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar üzerinde potansiyel etkisi (15)	21
Şekil 2-11:Metformin, NF-κB inhibisyonu yoluyla MMP-2 ve MMP-9'u ekspresyonunu baskılayarak kanser invazyon ve metastazını inhibe eder (15).....	23
Şekil 3-1: NIH/3T3 fibroblast hücreleri in vitro yaşlanma modeli ve seri pasajlama işlemlerinin şematik olarak gösterilmesi	27
Şekil 3-2: Manyetik alan uygulaması için hazırlanan deney düzeneğinin diyagramı	28
Şekil 3-3: NIH/3T3 fibroblast hücrelerinden elde edilen nukleer protein ekstraktı kullanılarak ELISA ile NF-κB (p65) aktivasyonunun belirlenmesi	34
Şekil 3-4: Deney planının özet gösterimi	43
Şekil 4-1: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası Tripan mavisi testi ile deney gruplarına ait canlılık (%) istatistiksel değerlendirilmesi	45
Şekil 4-2: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası BrdU proliferasyon immünohistokimya mikroyafları ve istatistiksel değerlendirilmesi	46

Şekil 4-3: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası ICC yöntemi ile deney gruplarına ait MMP2 protein ekspresyonunun H-score analizi ile (%) istatistiksel değerlendirilmesi	47
Şekil 4-4: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası ICC yöntemi ile deney gruplarına ait MMP9 protein ekspresyonunun H-score analizi ile (%) istatistiksel değerlendirilmesi	48
Şekil 4-5: Deney gruplarının NF-kB (p65) aktivitesi sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmes.....	49
Şekil 4-6: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait RELA(p65) relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	50
Şekil 4-7: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait <i>MMP2</i> relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	51
Şekil 4-8: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait MMP9 relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	52
Şekil 4-9: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait MMP9 relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

EMA: Elektromanyetik Alan

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

T2DM: Tip 2 Diabetes mellitus

ROT: Reaktif oksijen türleri

EMT: Epitel-Mezenkimal Geçiş

MMP: Matriks metalloproteinaz

AGE: İleri Glikasyon Son Ürünleri

AMPK: AMP ile aktive olan protein kinaz

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

ECM: Ekstrasellüler Matriks

IL: İnterlökin

AP-1: aktivatör protein-1

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B

I κ B: İnhibitör kappa B

QRT-PCR: Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ICC: İmmünohistokimya

NP-40: Nonidet P-40

PBS: Fosfat tampon çözeltisi

Bcl-2: B hücre lenfoması

DMEM : Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu

p53 : Tumor protein 53

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

DTT: Dithiothreitol



ÖZET

Soydaş, T. (2021). Metformin ve Elektromanyetik Alanın Kansere ve Yaşlanma Sürecine Etki Eden Moleküler Mekanizmaların Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Yaşlanma ve kanser birbiriyle son derece ilişkili biyolojik fenomenlerdir. Bu süreçler, genotoksik stres, oksidatif stres gibi homeostazdaki dengesizlik ile ilişkilendirilir. Mevcut veriler, hem yaşlanmanın hem de kanserin temel mekanizmalarının, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu endojen stres kaynaklı DNA hasarı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, 50 Hz düşük frekanslı elektromanyetik alanın DNA hasarına, kromozomal kararsızlığa neden olduğu bildirilmiştir. NF- κ B, yaşa bağlı kanserlerde upregüle edilir ve NF- κ B'nin inhibisyonunun yaşlanmayla ilişkili patolojilerin gecikmesine yol açtığı deneysel verilerle gösterilmiştir. Ayrıca, bir NF- κ B inhibitörü olan metformin, sadece NF- κ B aktivasyonunu ve ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmakla kalmaz, aynı zamanda yaşa bağlı birçok hastalıkta olası bir yaşlanma karşıtı ve anti-kanser etkiye de sahiptir. Böylece, 50 Hz frekanslı elektromanyetik alanın ve metformin uygulamasının yaşlı NIH/3T3 fibroblast hücrelerinin canlılık ve proliferasyonu üzerine etkilerini ve *RELA/p65*, *MMP2*, *MMP9*, *CHD1* genlerinin ekspresyonu üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık. Hücre canlılığı ve proliferasyonu analiz edildi. MMP-2 ve MMP-9 protein miktarı için immünohistokimya metodu ve NF- κ B aktivitesi için ELISA, qRT-PCR ile *RELA/p65*, *CDH1*, *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonları analiz edildi. Metforminin farklı dozları (500 μ M, 1 mM, 2mM, 10 mM), 50 Hz elektromanyetik alana maruz kalan yaşlanan NIH/3T3 fibroblastın canlılığını ve proliferasyonunu doza bağlı olarak azaltmış, maksimum inhibisyon ise 10 mM metformin konsantrasyonda gözlenmiştir. Metformin, sadece *RELA* ekspresyonunu önemli ölçüde downregüle etmek ve NF- κ B aktivitesini inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda *MMP2*, *MMP9* ve *CHD1* ifadesi aracılığıyla ters aracılık edilebilen 50 Hz frekanslı elektromanyetik alanda yaşlanan NIH/3T3 fibroblastlarının proliferasyonunu da baskıladı.

Anahtar Kelimeler: Yaşlanma, Kanser, Metformin, Elektromanyetik Alan, Nükleer Faktör kappa B

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34838

ABSTRACT

Soydaş, T. (2021). Investigation of Molecular Mechanisms of Metformin and Electromagnetic Field Affecting Cancer and Aging Process. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Doktora Tezi. İstanbul.

Aging and cancer are highly related biological phenomena. These processes are associated with imbalance in homeostasis, such as genotoxic stress, oxidative stress. Current evidence suggests that the key mechanisms of both aging and cancer are related to endogenous stress-induced DNA damage caused by reactive oxygen species. It has also been reported that 50 Hz of low frequency electromagnetic fields induces DNA damage, chromosomal instability. NF- κ B is upregulated in age-related cancers and has been demonstrated by experimental data showing that inhibition of NF- κ B leads to delayed aging-related pathologies. Moreover, metformin, an NF- κ B inhibitor, not only significantly reduces NF- κ B activation and expression, but also has a possible anti-aging and anti-cancer effect in many of the age-related diseases. We aimed to investigate effects of 50 Hz frequency electromagnetic fields and metformin treatment on viability and proliferation and of aging NIH/3T3 fibroblast, and the expression of *RELA/p65*, *MMP2*, *MMP9*, *CHD1* genes. The cell viability and proliferation were analyzed. Immunocytochemistry was performed for MMP-2 and MMP-9, and ELISA for NF- κ B activity, QRT-PCR for *RELA/p65*, *CDH1*, *MMP-2*, and *MMP-9* expression. Different doses of metformin (500 μ M, 1 mM, 2mM, 10 mM) reduced the viability and proliferation of aging NIH/3T3 fibroblast exposed to 50 Hz 5mT electromagnetic field in a dose-dependent manner, maximum inhibition was observed at 10 mM. Metformin not only significantly down-regulated *RELA* expression and inhibited NF- κ B activity, but also inhibited the proliferation of aging NIH/3T3 fibroblast at 50 Hz frequency electromagnetic field which could be inversely mediated via *MMP2*, *MMP9* and *CHD1* expression.

Key Words: Aging, Cancer, Metformin, Electromagnetic field, Nuclear Factor Kappa Beta

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.

Project No: 34838

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde elektromanyetik alanın (EMA) insan sağlığına zararlı etkilerinin ciddi boyutlarda olup olmadığı tartışma konusudur. Son yıllarda, bireylerin elektromanyetik alanlara maruz kalma oranı gün geçtikçe artmaktadır. Kanserojen etkenler arasında yer alan EMA kaynakları arasında mobil telefonlar, elektrikli ev aletleri, radyo ve televizyon vericileri, endüstriyel alanlarda kullanılan çeşitli aletler bulunmaktadır (1). Elektromanyetik alanla yapılan in vitro çalışmalarda, EMA'nın oksidatif strese bağlı olarak yaşlanma ve kanserogeneizde etkili mekanizmalardan, Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (2,3). DNA hasarları sonucu hücrede DNA onarım mekanizması yetersiz kaldığı durumda, DNA'sı mutasyona uğramış hücreler kontrolsüz olarak çoğalarak tümör gelişimine yol açar. Tümör oluşumundan sonra, anjiyogenez sonrası invaziv ve metastatik özelliklere sahip olan hücreler malign bir karakter kazanır (4). Yapılan son çalışmalar, elektrik şebekelerinden kaynaklanan çok düşük frekanslı 50 Hz (Hertz) EMA'nın tümör gelişimini ve ilerlemesini kolaylaştırarak ve muhtemelen DNA onarımını engelleyerek ko-kanserojen bir etkiyi indüklediğini göstermiştir ancak tam olarak moleküler mekanizması açıklanabilmiş değildir (5).

Metformin, T2DM (Tip 2 Diabetes Mellitus) hastaların tedavisinde anti-diyabetik bir ilaç olarak tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmakta ve anti-kanser ajan olma potansiyeline dair deneysel çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Son senelerde metforminin, kansere karşı koruyucu etkisi ve epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konmuştur. Metformin ile yapılan birkaç epidemiyolojik çalışma, prostat, kolorektal ve meme dokusu kaynaklı çeşitli tümörlerde antitümör ve anti-proliferatif etkisini göstermektedir (6). Kanser üzerinde yapılan çalışmalar uzun dönem metformin tedavisi görmüş diyabetli kadınların metformin tedavisi uygulanmamış hastalara kıyasla daha düşük kanser riskine sahip olduğunu ve metastaz eğiliminin de daha düşük olduğunu göstermektedir (7, 8).

Yaşlanma ve kanser gelişim sürecinde NF- κ B / IKK yolağı etkili yolaklardan biridir. Pleotropik transkripsiyon faktörü olan NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa B), proliferasyon, differansiyasyon, hücre büyümesi, canlılık ve apoptoz gibi süreçle ilgili ve bu süreçleri düzenleyen kritik bir role sahiptir (9-11). NF- κ B'nin hedef genleri arasında yer alan *MMP2* (Matriks Metalloproteinaz-2), *MMP9* (Matriks Metalloproteinaz-9) ve

CDH1(E-kaderin) genleri kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda epitel-mezenkimale geçiş (EMT), kanser hücrelerinin migrasyonu, invazyon ve diğer organlara metastaz yapması için kritik bir rol oynar. Bununla birlikte EMT'nin aktivasyonunda *MMP2*, *MMP9* ve *CDH1* gibi genlerin ekspresyonu NF-kB aktivitesi yoluyla meydana gelir (12-13). NF-kB'nın inhibisyonu yoluyla kanser gelişiminin engellenmesi meme, akciğer, melanom, kolon ve B-hücre lenfoma bu kanser türlerinde gösterilmiştir (14). Diğer taraftan antidiyabetik ilaç olan metforminin, hücre yaşlanma ve kanserogenez sürecinde etkili transkripsiyon faktör NF-kB tarafından aktive edilen çok sayıda genin ekspresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (15). Ancak metforminin elektromanyetik alanın yaşlanma ve kanserogenezin önemli aşamaları olan tümör gelişimi ve metastaz üzerindeki etkisi hala açıklanabilmiş değildir.

Bu çalışmada, NIH/3T3 fibroblast hücrelerinde EMA ve metforminin yaşlanma ve kanser üzerine etkisinin araştırılmasıyla birlikte, EMA ve metforminin kanserogenezdeki moleküler mekanizmasının araştırılmasını amaçladık. Bu amaç doğrultusunda NF-kB (p65) transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenen hücre proliferasyonu ve matriks metalloproteinaz proteinlerinden *MMP2*, *MMP9*, aynı zamanda önemli EMT belirteci olan *CDH1* gen ekspresyonları etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma ve Yaşlanma Teorileri

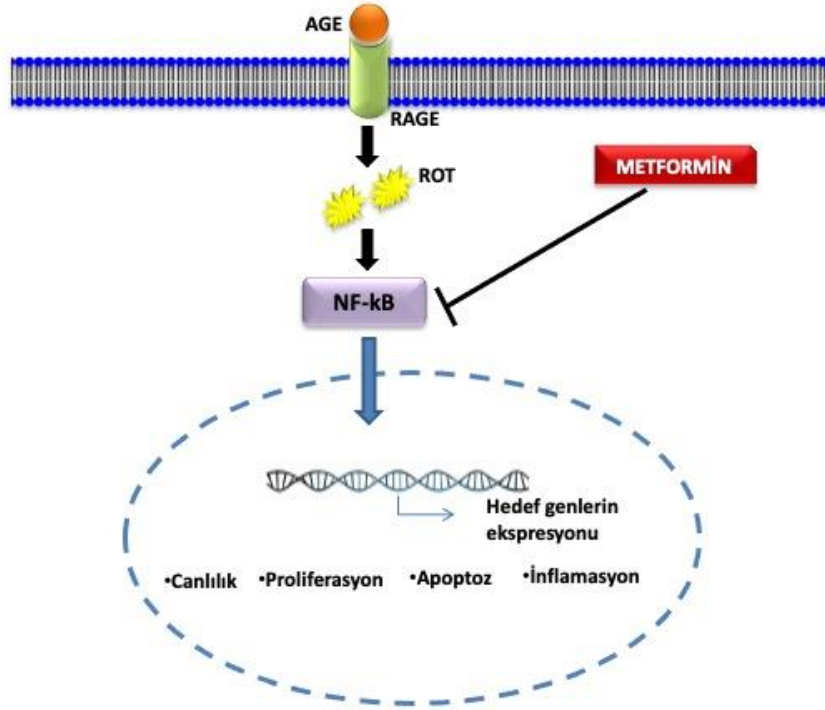
Yaşlanma ve yaşlanmayla ilişkili hastalıklar, oksidatif stres, genotoksik stres ve proteotoksik atık ürünlerin birikimi gibi homeostazdaki çeşitli dengesizliklerle ilişkilidir. DNA hasarı, mitokondriyal hasar, telomerlerin kısalması ve makromoleküler atıkların birikimi dahil olmak üzere birçok hücrel hasar, yaşlanma, apoptoz veya hücrede fonksiyon bozukluğuna neden olarak yaşlanmayı teşvik etmektedir. Dolayısıyla, hücrel makromolekül ve organel hasarlarının yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıkların arkasındaki tetikleyici güç olduğu düşünülmektedir (16-18). Yaşlanma ve yaşlanma nedenlerine ilişkin bugüne kadar tahmini 300 teori ortaya konulmuştur. Yaşlanma teorileri temelde 3 ana gruba ayrılır: genetik mutasyon teorileri, aşınma ve yıpranma teorileri ve hücrel hasarlarının birikimi ile ilişkili teoriler (19).

2.1.1. Yaşlanmada Serbest Radikal / Oksidatif Stres Teorisi

Serbest radikal / oksidatif stres teorisi en iyi bilinen yaşlanma teorisidir (20). Serbest radikaller DNA, proteinler ve lipitlerle reaksiyona girerek toksik bileşenler oluşturabilir (21,22). Antioksidan sistemler, hücrenin ömrü boyunca sürekli olarak üretilen tüm serbest radikalleri dengede tutmaya çalışır. Bu denge bozulduğunda hücrede ve dolayısıyla dokularda oksidatif stres ortaya çıkar (23, 24). Yaşlı bireylerde, gençlere göre oksidatif stres daha yüksektir. Oksidatif stres sonucu oksidasyona uğramış proteinler, DNA hasarları ve lipit peroksidasyonu gibi bozulmalar söz konusudur. Bu oksidatif hasarlar, yaşlı organizmalarda oksidatif strese bağlı artan serbest radikal üretimi (ROT) ile ilişkilidir (25, 26).

Reaktif oksijen türleri, diğer taraftan inflamatuvar ve immün yanıtta kritik rol oynayan transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'yi aktive eder. NF- κ B oksidatif türlerin sentezinin devam edebilmesi için sinyal göndererek yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıkların komplikasyonlarına neden olan proliferasyon, apoptoz ve inflamasyon gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen genlerin ekspresyonunu uyarır. Yüksek ROT seviyelerinin indüksiyonu ile AGE (ileri glikasyon son ürünleri), NF- κ B klasik sinyal yolağını uyarır (Şekil 2-1). Aktive NF- κ B, ise *FLIP*, *Bcl-XI*, *XIAP* gibi birkaç anti-apoptotik genin ekspresyonunu indükleyerek apoptoza karşı savaşı. Yaşa bağlı oksidatif stresin, hücreleri apoptotik hücre ölümüne karşı savunmak için anti-apoptotik NF- κ B sinyal yolağını aktive

ettiği bilinmektedir. Oksidatif stres, yaşlanma sırasında bu proapoptotik ve proinflamatuvar fenotipin korunmasında önemli bir role sahiptir (27, 28).



Şekil 2-1:Yüksek ROT seviyelerinin indüksiyonu ile AGE, NF-κB klasik sinyal yolağını uyarır (15)

2.1.2. Yaşlanmada Genotoksik Stres Teorisi

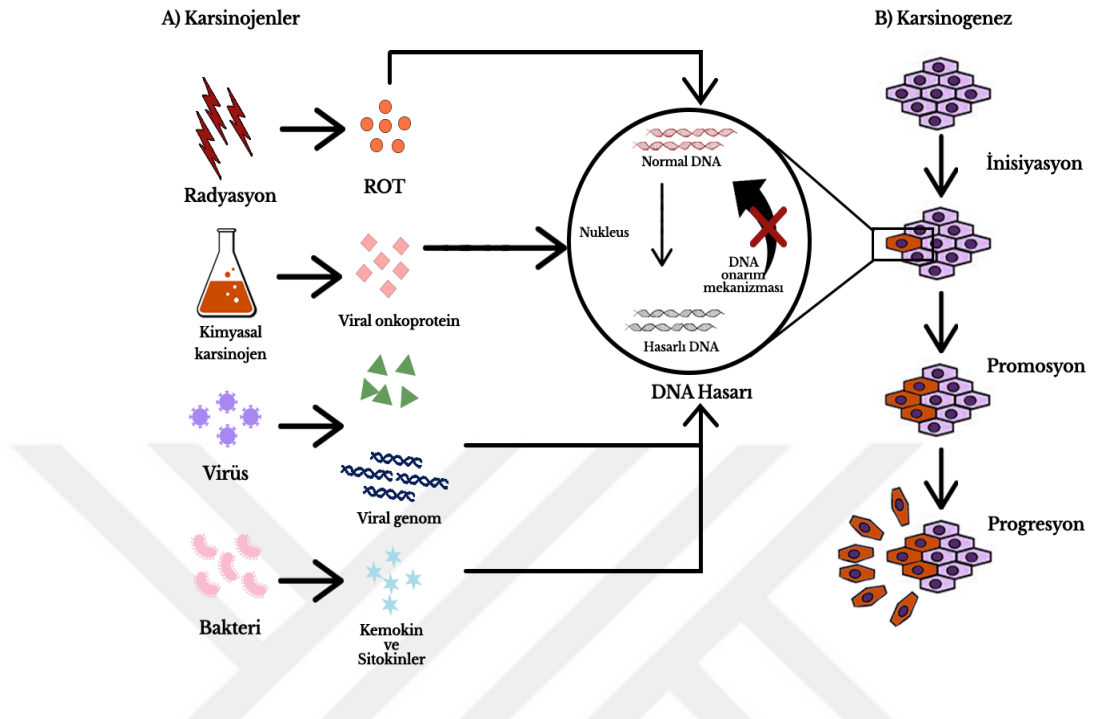
Genomik instabilite, yaşlanma sürecinde major mekanizma olarak görünmektedir (29-31). Bu teori, insan progeroid sendromları ve transgenik deneysel hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir. DNA'da mutasyonlar, yaşlanma süreci boyunca hem nükleer hem de mitokondriyal DNA'da ortaya çıkar. Birçok çalışma, serbest radikallerin ve oksidatif stresin muhtemelen yaşa bağlı DNA mutasyonlarının en önemli kaynağı olduğunu göstermiştir. Genotoksik stres tarafından indüklenen ana sinyal yolları p53, NF-κB ve PARP-1'dir (32-34). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, NF-κB yolağının aktivasyonunun DNA hasarının indüklediği temel yollardan biri olduğunu göstermiştir (35,36). Rodier ve ark. tarafından yapılan çalışmalar (2009), yaşlanan hücrelerde kalıcı DNA hasarının IL-1α / β, IL-2, 3, 6, 12 ve TNFα gibi inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını tetikleyebileceğini, dolayısıyla doğuştan gelen bağışıklık

savunmasını etkinleştirdiğini göstermiştir (37). NF- κ B tarafından sitokin ekspresyonunun kontrolü, patolojik durumlarda NF- κ B'nin yaşlanmadaki en önemli faktörlerden biri olduğunu göstermiştir. NF- κ B ayrıca, immün sistem hücrelerinin inflamasyon bölgelerine göçüne izin veren kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu da düzenlemektedir. Sonuçta, NF- κ B CD80/81, TLR-2 gibi reseptörlerin ekspresyonunu ve immün hücrelerde antijen sunumunda rol oynayan proteinlerin ekspresyonunu regüle ederek immün yanıtta önemli rol oynar (38).

2.2. Yaşlanma ve Kanserojeniz

Yaşlanmada oksidatif ve genotoksik hasarlar, yaşa bağlı hastalıklardan biri olan kansere neden olmaktadır (39). Ayrıca, yaşlanmada DNA hasar tamir mekanizmasının yetersiz olması, DNA hasarının hatalı onarımı, immün sistemin yetersizliği kanseri tetikleyen önemli mekanizmalar arasında yer alır (40). Dolayısıyla, oksidatif veya genotoksik hasarlar sonucu mutasyonların ve hasarlı hücrelerin birikimi kansere yol açar.

Kansere yol açan etkenler, bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar oldukça geniş bir dağılım gösterir. Kanser gelişiminde hücredeki fonksiyonel ve yapısal değişikliklerden sorumlu karsinojen olarak adlandırdığımız bu faktörler ekzojen ve endojen olarak sınıflandırılmaktadır (41, 42) (Şekil 2-2). Endojen faktörler; genetik yapı, yaş, endokrin sistem dengesi, fizyolojik koşullar ve belirsiz etiyolojiden kaynaklanan (örn. Ülseratif kolit, pankreatit, vb.) immün sistem hasarı ve inflamasyonu içermektedir (42-46). Ekzojen faktörler arasında beslenme alışkanlıkları, sosyo-ekonomik durum, yaşam tarzı, fiziksel ajanlar (iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon), kimyasal bileşikler (doğal ve sentetik) ve biyolojik ajanlar (*Helicobacter pylori*, Epstein Barr virüsü, insan T limfotropik virüsler I ve II, insan papilloma virüsü ve hepatit B virüsü, *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* ve *Opisthorchis viverrini* gibi parazitler; büyüme faktörleri) bulunur. Ekzojen faktörlerden fiziksel kanserojen ajanlar geniş bir yelpazeye sahiptir. Farklı türlerde elektromanyetik radyasyonlar, korpüsküler (alfa ve beta) radyasyonlar, düşük ve yüksek sıcaklıklar, mekanik travmalar ve katı ve jel malzemeler fiziksel ajanlar içerisinde yer almaktadır (43,47-49).



Şekil 2-2:Kanser gelişiminde hücredeki fonksiyonel ve yapısal değişikliklerden sorumlu karsinojen olarak adlandırdığımız bu faktörler ekzojen ve endojen olarak sınıflandırılmaktadır (50)

2.3. Hücresel Yaşlanma- Karsinogenez ve Elektromanyetik Alanın Etkisi

Yaşlanma, zamana bağlı olarak hücre fonksiyonlarında fizyolojik azalma ile karakterize bir süreçtir ve kanser gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Yaşlanma, kanserin en büyük risk faktörlerinden biri olmasına rağmen, iki sürecin temelini oluşturan ortak mekanizmalar ve bu bağlantıyı sağlayan biyolojik mekanizmalar hâlâ belirsizliğini korumaktadır (51). Yaşlanma sürecinde artan yaşlı hücreler yavaş çoğalan, az enerji üreten ve tüketen hipoaktif hücreler iken, kanser hücreleri ise avantajlı mutasyonlar sonucu, hızlı hücre bölünmesine ve artan enerji tüketimine sahip hiperaktif hücrelerdir (52).

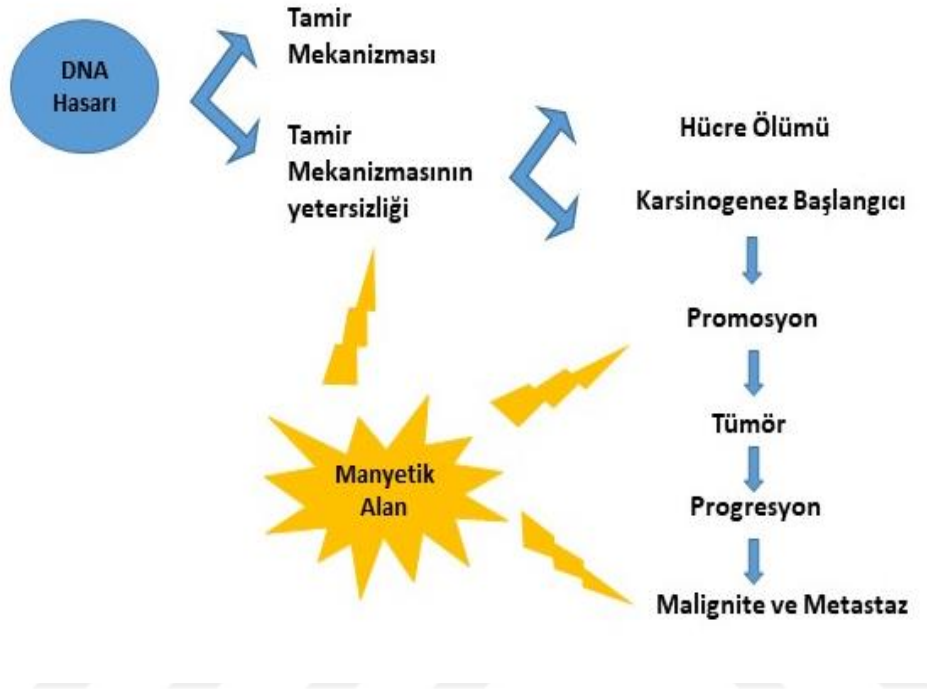
Yapılan deneysel çalışmalar hem yaşlanmanın hem de kanserin anahtar mekanizmalarının reaktif oksijen türlerinin neden olduğu endojen stres kaynaklı DNA hasarı ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (40). Son yıllarda, mobil telefonların, bilgisayarların ve yüksek gerilim hatlarının etrafında oluşan düşük frekanslı 50 Hz

elektromanyetik alana gündelik yaşamda sürekli maruz kalınması nedeniyle canlılar üzerine etkisi ile ilişkili araştırmalar büyük önem kazanmıştır (1).

Günümüzde bireylerin elektromanyetik alanlarına maruz kalma oranının gün geçtikçe arttığı bilinmektedir. Zamanla artan elektromanyetik kirlilik, bu alanların etkileri üzerine yapılan çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu alanların biyolojik sistemlerle etkileşim mekanizması henüz anlaşılamamış olmasına rağmen hücre moleküler yapısında ve fizyolojisinde değişimlere neden olduğu çeşitli araştırmalar ile tespit edilmiştir. Örneğin; cep telefonlarından kaynaklanan radyofrekans dalgalarının hücrede moleküler düzeyde birçok olumsuz etkiye neden olduğu son senelerde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Nitekim cep telefonu kullanımının oksidatif stres oluşturduğu ve bu yolla kanser riskini artırabileceği ifade edilmektedir (53). Elektromanyetik alanla yapılan in vitro çalışmalar, EMA'nın oksidatif strese bağlı olarak yaşlanma ve kanserogeneizde etkili mekanizmalar olan, DNA hasarı ve onarım mekanizmasındaki yetersizliğe neden olduğunu göstermiştir (2, 3). Lai ve ark. tarafından yapılan çalışmada da elektromanyetik alanın sıçan beyin hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğunu ortaya konulmuştur. Diğer bir çalışmada da HL-60 ve HL60R hücre hatlarında elektromanyetik alanın etkisi ile DNA tamir mekanizmasında yetersizlik olduğu tespit edildi. Elektromanyetik alanın DNA ile direkt olarak etkileşime girdiği birçok çalışma ile de gösterilmiştir (54, 55). İnsan kan örnekleri 7,7 GHz (Gigahertz) frekansındaki EMA'a maruz bırakıldığında oluşan kromozomal hasar ile mikronükleus insidansı arasında pozitif bir korelasyonun olduğu bildirilmiştir (56). Maes ve ark. insan periferik kan lenfositleri ile yaptıkları deneysel çalışmada 2450 MHz EMA'nın, mikronükleusların meydana gelmesi ve kromozomal bozukluklarda önemli bir artışa yol açtığı gözlenmiştir (57). Lary ve ark. 27.12 MHz (Megahertz) radyofrekans dalgalarının sıçanlarda teratojenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (58). Başka bir çalışmada da manyetik alanın embriyogenez evresinde ve beynin en fazla manyetik alana maruz kalan oksipital ve temporal bölgelerde tümör oluşum riskinin arttığını bulmuşlardır (59). Tümör oluşumundan sonra, sürekli EMA'a maruz kalma durumu tümörün daha fazla ilerlemesine ve artmış invaziv ve metastatik özellikler (malign bir karakter) kazanmasına sebep olmaktadır.

Birçok in vitro çalışma, en fazla maruz kalınan 50-60 Hz EMA mutajenik olmadığını, yani karsinogeneizde başlatıcı olmadığını, tümör gelişimini ve ilerlemesini

kolaylaştırabildiğini ve muhtemelen DNA onarımını engelleyerek ko-kanserojen bir etkiyi indüklediğini göstermiştir (60) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3:Manyetik alanın karsinogenezdeki rolünü gösteren diyagram

Şekil 2-4'te elektromanyetik spektrumda görüldüğü üzere evlerdeki elektrik tesisat ve güç iletim hatlarından yayılan alanlar 50 Hz civarında olup iyonize olmayan radyasyon içinde yer alan çok düşük frekanslı EMA'ları oluştururlar. En önemli çok düşük frekanslı EMA kaynağı enerji iletim hatlarıdır (1).

Elektromanyetik Spektrum



Şekil 2-4:Manyetik spektruma ait diyagram

Çok düşük frekanslı EMA'ların biyolojik etkileri Wertheimer ve Leeper tarafından çocukluk çağı kanserleri ile düşük frekanslı elektromanyetik alan maruziyeti arasındaki ilişkiyi göstermeleri sonrası büyük dikkat çekmiştir. Yapılan bu araştırmadan sonra çok düşük frekanslı EMA'ların sağlık üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda yoğun bir artış olduğu tespit edilmiştir (61). Epidemiyolojik çalışmalar ile çok düşük frekanslı EMA'ların biyolojik etkilerinin ortaya konması ile, Dünya Sağlık Örgütü'nün yan kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC), çok düşük frekanslı manyetik alanı hayvan deneylerinde yeterli kanserojen ve insanda ise sınırlı kanıta sahip kanserojen olarak tanımlanan grup 2B kanserojen olarak sınıflandırmıştır (62).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, yüksek ve düşük frekanslı manyetik alanların DNA zincirinde hasar oluşturduğuna dair bilgiler mevcuttur (63, 64). Çok düşük frekanslı EMA'nın (50 Hz) lökosit hücre DNA'sında 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine seviyesini artırdığı yönündedir. Bunun anlamı, DNA'da A-T (Adenin-Timin), G-C (Guanin-Sitozin) dönüşümüne neden olarak çok düşük frekanslı EMA'nın prekanserojenik etki oluşturmasıdır (65). Başka bir çalışmada ise, 0,1 mT (militesla) çok düşük frekanslı EMA maruziyetinin DNA'da bulunan diğer bazlarda da hasarlara yol açtığı gösterilmiştir (66).

Çok düşük frekanslı elektromanyetik alanın biyolojik etkisini araştıran hücre kültür çalışmalarında geniş bir aralıkta maruziyet ile kanserogenez mekanizmasına yoğunlaşmıştır. Akut 60 Hz EMA uygulamasının sıçan beyin hücrelerinde DNA zincir

kırıklarına sebep olduğu ve böylece hücre fonksiyonları etkileyerek hücre ölümüne ve kansere yol açabileceği rapor edilmiştir (54). 2005 yılında Winker ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada aralıklı olarak hücre kültür sistemlerinde uygulanan çok düşük frekanslı EMA'nın kromozom morfolojisi ve yapısını bozarak hasara neden olabileceği tespit edilmiştir (67). Aynı yıl yapılan in vitro çalışmada, hücre kültür sistemlerinde 24-72 saat ve 0,5-1 μ T çok düşük frekanslı elektromanyetik EMA maruziyetinin DNA'da çeşitli hasarlara yol açtığı ve hücre proliferasyonunu artırdığı bildirilmiştir (68).

2.4. Kanserojeniz

Kanser gelişimi, hücrelerin giderek anormal proliferatif ve invazif davranışlar kazandığı çok basamaklı bir süreçtir. Kanserojenizde olayların ilk basamağını neoplastik transformasyon oluşturmaktadır. Neoplastik transformasyon spontan olabileceği gibi çeşitli şekillerde indüklenerek de (baz çifti değişikliklerini, delesyon, translokasyonları ve amplifikasyonları) oluşabilir (69, 70). Başka bir deyişle oluşan neoplastik transformasyon, DNA replikasyonu ve tamir mekanizmalarında yetersizlik ve de hücrelerde oluşan mutasyonların birikimi sonucudur. Kanserojenizin ikinci basamağında yer alan neoplastik gelişme, kanser hücresinin klonal proliferasyonuna yol açarak, önce çevre dokulara sonra da uzak dokulara yayılarak hücre büyümesini sağlar. Sürekli proliferasyonla tümörün biyolojik davranışında malignansiye doğru giden progressif değişiklikler gerçekleşir (71, 72).

Kanserojenize neden olan mutasyonlar; hücre proliferasyonunu ve büyümesini indükleyen proto-onkogenlerin aktivasyonu ve apoptozun, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım enzimlerinin inaktivasyonu şeklinde sınıflandırılmaktadır (73-75). Onkogenlerin aktive olması; proto-onkogenlerin, hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olacak şekilde mutasyona uğraması ile aktive olmasıdır. Hücrenin onkogenleri aktive olduğunda, artık o hücre yeni bir fonksiyon kazanmış olacaktır (gain-of-function) (74, 75). Onkogenlerin aktivasyonları, proto-onkogenlerin kromozom translokasyonu, gen amplifikasyonu ve nokta mutasyonları sonucunda gerçekleşmektedir. Aktif onkogenler hücre proliferasyonunu uyaran proteinleri kodlamaya başlar. Bu proteinler; büyüme faktörlerinin hücre membranı üzerindeki reseptörlere bağlanarak hücre proliferasyonunu indüklemesinden, apoptozun inhibisyonuna kadar her bir aşamayı etkiler (74,76,77) Tümör süpresör genler; apoptozun ve DNA hasar onarım enzimlerinin inaktivasyonu

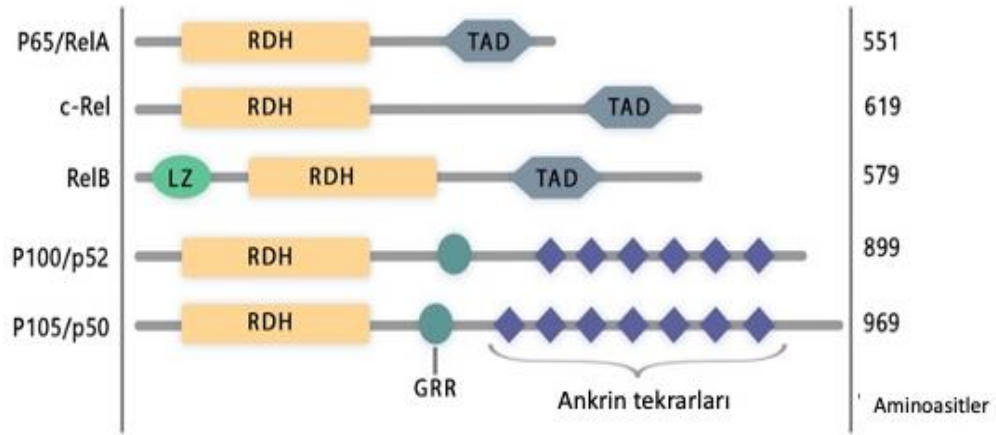
çevresel ve fiziksel faktörler, beslenme tarzı gibi yaşam şeklinden kaynaklanan nedenler ile DNA üzerinde mutasyon riski meydana getirmektedir. Oluşan bu mutasyonlar DNA hasar onarım mekanizması genleri ve bu genlerin kodladığı proteinler aracılığıyla etkisiz hale getirilir (74). Genetik materyalin kontrolünden sorumlu bu genlerin fonksiyonu, kontrolsüz hücre proliferasyonuna sebep olabilecek mutasyonları engellemek ve genomun bütünlüğünün sürekliliğini sağlamaktır (74,78). Tümör süpresör genler olarak tanımlanan bu genlerin en fazla bilinen p53 ve Rb genleridir (74). Normal koşullarda az eksprese olan p53 geni mutasyon sonucunda kanser hücresinin aşırı çoğalmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, tümör hücreleri apoptotik hücre ölümünden kaçacak mekanizmalar geliştirirler. Apoptoza karşı direnç kazanan bu hücreler DNA'larında bulunan mutasyonlar ile çoğalmaya ve büyümeye devam ederler (79).

Yaşlanmada karsinogenez sürecine giden yolda etkili yollardan biri de NF- κ B / IKK'dır. Hücre büyümesi, proliferasyon, differansiyasyon, canlılık ve apoptoz gibi çok sayıda biyolojik süreçle ilgili ve bu süreçleri düzenleyen anahtar bir role sahiptir (9-11).

2.4.1. NF- κ B ve Kanserogenez

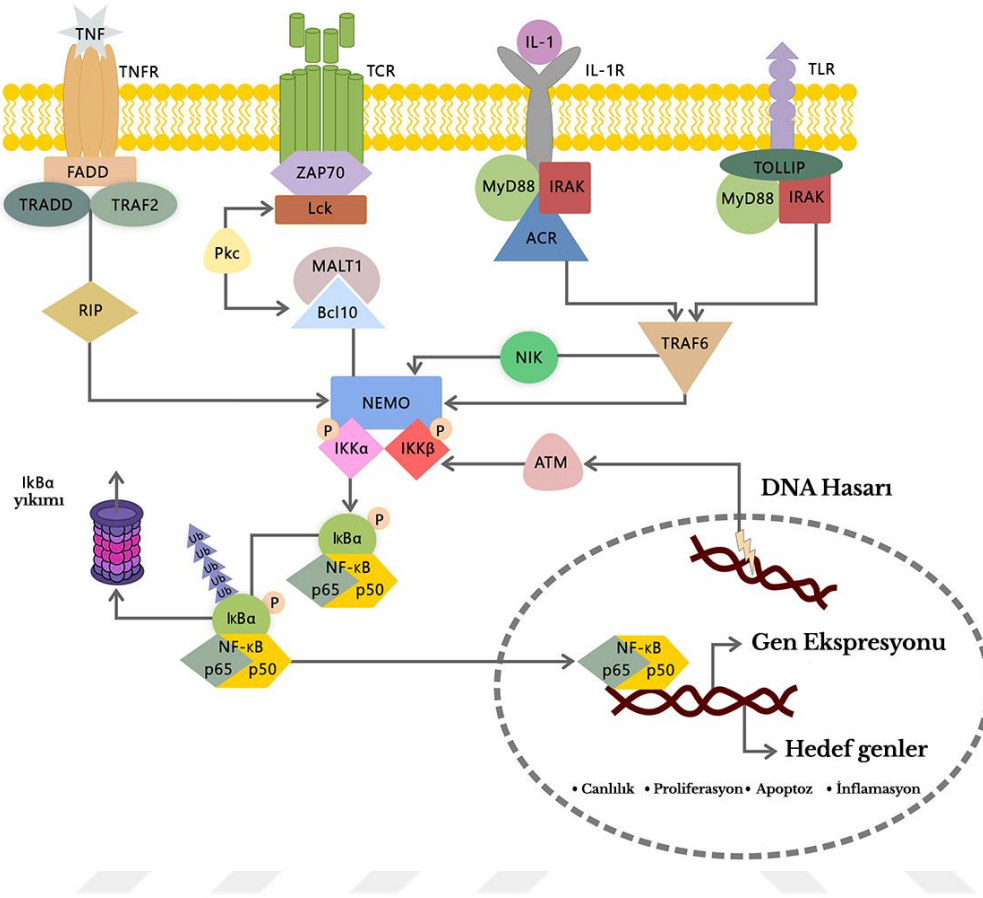
Hem yaşlanmada hem de karsinogenez yollarında etkin bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, hücre büyümesi, farklılaşma, inflamasyon, bağışıklık ve apoptoz gibi çok sayıda biyolojik süreçle ilgili, bir dizi sinyal iletim olayının merkezinde yer almaktadır (9,15).

NF- κ B ailesi; çeşitli homodimer ve heterodimerler oluşturan p50, p52, p65 (Rel A), c-Rel ve Rel-B üyelerinden oluşmaktadır (Şekil 2-5). En sık görülen aktif form p65, p50 veya p52/RelA heterodimerdir. Farklı dimer kombinasyonları transkripsiyonel aktivatörler veya baskılayıcılar olarak işlev görür (80). NF- κ B' nin dimer oluşumu DNA bağlanması için gereklidir. Dimerin N-terminal bölgeleri, spesifik DNA bölgeleri (gen) bağlanması için gereklidir. C-terminal bölgeleri genellikle yüksek oranda korunur ve dimerizasyon ve spesifik olmayan DNA fosfat bağlanması için gereklidir (81).



Şekil 2-5: Memelilerde NF- κ B transkripsiyon faktör ailesinin üyelerinin şematik diyagramı (82)

NF- κ B dimerleri hücre sitoplazmasında I κ B olarak bilinen inhibitör proteine bağlı inaktif formda bulunur. NF- κ B'nin inhibitörleri olan I κ B' ların N-terminal bölgelerindeki serin kalıntıların fosforilasyon sonrası I κ B'ler ubiquitinasyona uğrayarak proteolitik yolla yıkılırlar. I κ B'lerin yıkımı NF- κ B'yi aktive eder. Aktive olan NF- κ B'nin nükleer translokasyonu gerçekleşir. Aktive NF- κ B, nükleusta spesifik genlerin promotor veya enhancer (arttırıcı) bölgelerine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonu uyarır (83). Bunun için genellikle NF- κ B, IKK / NF- κ B klasik yollağını kullanır (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: IKK / NF-κB klasik yolağın diyagramı (82)

NF-κB ve NF-κB / IKK yolağı hemen hemen tüm hücresel olaylarda etkilidir. Örneğin; hücrenin hayatta kalmasını, hücre proliferasyonunu, apoptoz ve inflamasyon süreçlerini kontrol eden genlerin ekspresyonunu düzenler. NF-κB, aynı zamanda sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, kemokinlerin ve hücre adezyon moleküllerinin gen ekspresyonunu sağlamaktadır (84, 85). Dolayısıyla, birçok hücre tipinde, bu hücresel olaylardaki bozukluklardan kaynaklı çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynar (86).

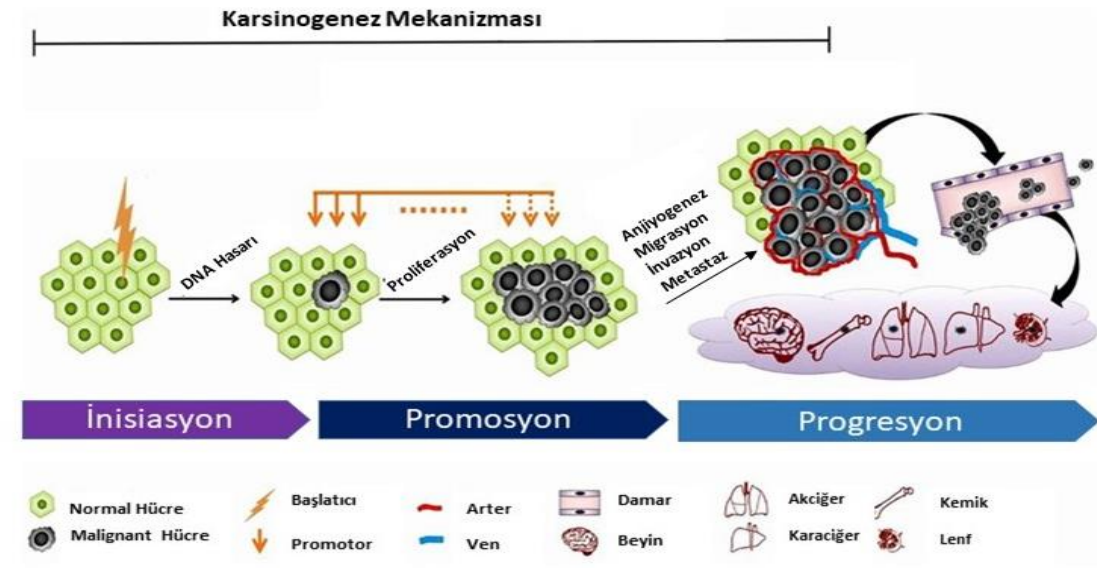
NF-κB aktivasyonu, hücre yaşam sinyallerini, inflamatuvar sitokinleri, hücre döngüsü modülatörlerini, anjiyojenik ve büyüme faktörlerini kodlayan genlerin NF-κB'ye bağımlı transkripsiyonuna yol açar ve bunların tümü, tümörü teşvik eden bir ortamda önemli rol oynar. Ayrıca NF-κB ve inhibitörü olan IκB arasındaki dengenin bozulması veya NF-κB aktivasyonu, kanser dahil birçok inflamatuvar hastalığın ortaya çıkması,

gelişimi ve ilerlemesi ile ilgilidir (80). NF- κ B ile kanser gelişimi arasında açık bir bağlantı bulunmaktadır. Meme kanseri de dahil birçok solid tümörde NF- κ B'nin ekspresyonu ile hastalığın prognozu arasındaki ilişkiyi gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur (87-90). NF- κ B'nin kanserogenezin her aşamasıyla ilişkisi birebir gösterilmiştir. Karsinogenez temel aşamaları, inisiyasyon (başlangıç), promosyon (gelişme) ve progresyon (ilerleme) dur (Şekil 2-7). Bu aşamalar tümör oluşumunda DNA hasarı, hücre proliferasyonu, invazyon, migrasyon, anjiogenez, metastaz yollarını içermektedir (14).

2.4.2. Proliferasyon Yolağı

Karsinogenez, çeşitli çevresel kanserojenler tarafından aktive edilebilen oldukça karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir. Bu maruz kalınan kanserojenlerin onkojenik transkripsiyon faktörlerini modüle ettiği bilinmektedir (10-11).

Transkripsiyon faktörü NF- κ B ve AP-1, inflamasyon, hücre proliferasyonu ve apoptoz yanıtları dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediğinden kanserin gelişiminde önemli bir rol oynar. Hücre büyümesinin uyarılması, kanserin oluşumu için önemli bir aşamadır ve hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan anormal olarak aktive edilen sinyal yolları ile süreç tetiklenir. Örneğin; karsinogenezde çok aktif olan hücre çoğalmasını düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin hedef genleri arasında CyclinD1, CDK2 ve c-Myc bulunurken, büyüme sinyalleri GM-CSF ve interlökin-6 (IL-6)'yı da içerir. NF- κ B'nin inhibisyonu yoluyla kanser gelişiminin inhibisyonu, meme, akciğer, melanom, kolon ve B-hücresi lenfoma bu kanser türlerinde gösterilmiştir (14) .



Şekil 2-7:Kanserogenezin aşamalarını gösteren diyagram (91)

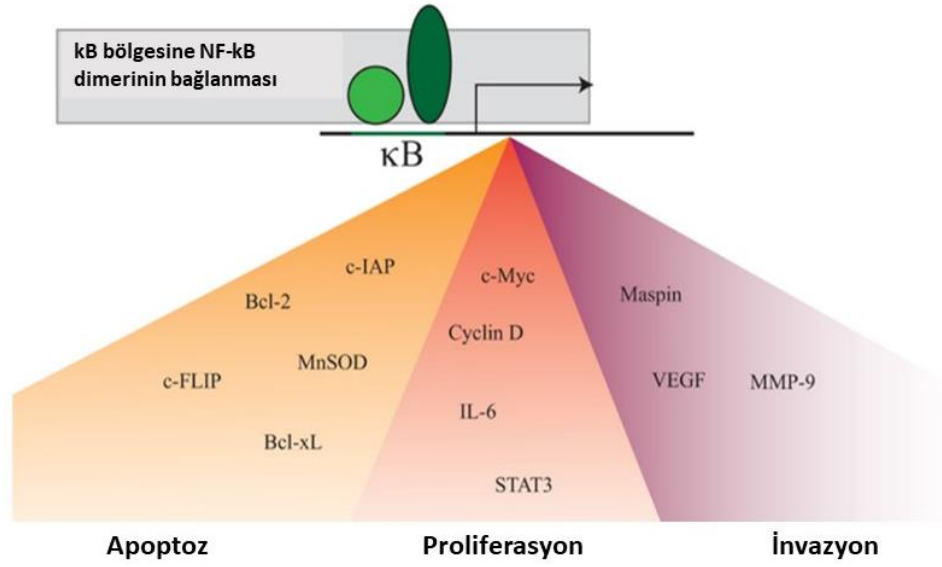
2.4.3. Metastaz Yolağı

Kanserde metastaz aşaması, geç evre tümör ilerlemesini gösterir ve bu önemli sürecin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. NF- κ B aktivasyonu, doku invazyonunu ve metastatik potansiyeli temsil eden bir değişiklik olan epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkilendirilmiştir (92). EMT'nin aktivasyonunda MMP2/9, E Kaderin, VCAM-1, ICAM-1, Katepsin B gibi proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonu NF- κ B aktivitesi aracılığıyla gerçekleşir (93). NF- κ B tarafından düzenlenen genler arasında olan E-kaderin, metastazda etkin bir faktördür (94). Ayrıca Bcl 2'nin NF- κ B aktivasyonunu teşvik ettiği ve kanserde daha malign bir fenotipe yol açtığı gösterilmiştir (95).

2.4.4. Anjiyogenez Yolağı

Büyüyen tümör kitlesi, yerel kan akışının kapasitesini hızla aştığından, tümör ilerlemesi için yeni kan damarlarının oluşturulması önemlidir. Anjiyogenezi düzenleyen sinyallerin çoğu, çoğu NF- κ B sinyallerine bağımlı olan tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ile detaylandırılır (96). NF- κ B koordineli enflamatuar sitokinler TNFa, IL-1 ve IL-6, anjiyogenezin ana düzenleyicilerinden biri olan vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunu uyarabilir ve VEGF, NF- κ B'nin hedef genidir (93).

Şekil 2-8'deki diyagramda NF- κ B'nin kanserogenezin proliferasyon, invazyon ve metastaz aşamalarında NF- κ B ile ilişkili proteinler gösterilmiştir.



Şekil 2-8:NF- κ B kanserogenezdeki rolünün gösteren diyagram (14'e göre uyarlanmıştır.)

2.5. Yaşlanma ve Kanserogenez Sürecinde MMP'ler

Hücre yaşlanma, hücre içi sinyal mekanizmasıyla ilişkili olarak komşu dokulardaki hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinin etkileşimi tarafından belirlenen, artan hücre boyutu ve azalmış proliferasyon gibi önemli morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerle ilgilidir (97). Bu süreçteki enzim ve reseptörlerin işlevlerindeki farklılıklar, dokularda yaşlanmaya bağlı fonksiyonel değişikliklere ve potansiyel neoplastik gelişime de neden olabilirler. ECM'nin bileşimindeki değişiklikler, MMP 'ler ve yüzey reseptörleri tarafından gerçekleştirilmektedir (98, 99).

MMP'ler, geniş bir substrat yelpazesine sahip çinko içeren endopeptidazlardır. Bu enzimler ECM proteinlerinin çeşitli bileşenlerini parçalayabilirler. Yapılarına ve substrat özgüllüklerine bağlı olarak, beş ana alt gruba ayrılırlar. Bunlar; kollajenazlar (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13); jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9); stromelisinler (MMP-3, MMP-10 ve MMP-11); matrilisin (MMP-7 ve MMP-26) ve membran tipi (MT) MMP'ler (MMP-14, MMP-15 ve MMP-16)'dir. MMP'ler kolajen, fibronektin, elastin ve proteoglikanlar gibi ECM proteinlerinin degrade edilmesinden sorumludur ve foto yaşlanmaya da katkıda bulunurlar (100).

Yaklaşık 23 çeşit enzimden oluşan MMP'ler, fizyolojik ve patolojik doku yıkımından sorumludur. İnflamasyon bağlı olarak hızla eksprese edilir ve doku gelişimi, farklılaşma, migrasyon gibi biyolojik süreçlerde major rol oynar. MMP'ler ayrıca tümör başlangıcı, büyüme, invazyon, anjiyogenez ve metastaz dahil olmak üzere tümör progresyonu ile ilgili çeşitli süreçleri düzenleyerek/etkileyerek karsinogeneizde de etkilidirler (101-102). Malign dokularda en fazla belirlenen metastatik potansiyelle ilişkili MMP'ler MMP-2 ve MMP-9'dur. Aynı zamanda sağ kalıma etkisi de tespit edilen MMP'ler, prognostik faktör olarak değerlendirilir. Ayrıca, MMP-2 ve MMP-9'un artan aktiviteleri ve ekspresyon seviyeleri, stromal dokuyu epitel hücrelerinden ayıran ve tümör invazyonuna izin veren bazal membranın bozulmasına neden olur (103). Meme kanseri hücre hatları ile yapılan *in vitro* çalışmada MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunda artışın, aktivatör protein-1 (AP-1) ve NF- κ B transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (90).

2.6. Metformin'in Yaşlanma Üzerindeki Etkileri

Yaşlanma ve yaşlanma ile ortaya çıkan hastalıklardan biri olan kanser üzerine son senelerde yoğun çalışmalar mevcuttur (103-106). *In vitro* ve *in-vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlar metforminin ileri yaştaki kronik durumların gelişmesiyle ilişkili metabolik ve hücreyel süreçleri etkileyebileceğini göstermektedir (107). Bu durumlar arasında inflamasyon, oksidatif hasar ve protein glikasyonu, hücre yaşlanması, azalmış otofaji ve apoptoz gibi hücreyel olaylar bulunmaktadır. Metforminin hücreyel düzeyde hasarları azaltarak yaşlanmayı hızlandıran temel faktörlerin çoğunu engelleyebileceği veya azaltabileceği potansiyeli açıktır (108-112). Ancak, metforminin gözlemlenen etkilerinin yaşlanma üzerindeki etki mekanizması hala tam olarak açıklanabilmiş değildir. Barzilai ve diğerleri (2016) tarafından incelendiği üzere metformin çeşitli moleküler yollar üzerinde farklı etkilere sahiptir (107).

Bonnefont ve ark. tarafından, metforminin ROT'lerini temizlediğini veya dolaylı olarak süperoksit anyon serbest radikallerinin hücre içi üretimini modüle ederek etki ettiği gösterilmiştir. ROT, DNA zincirinde kırıklar ve DNA ile proteinler arasında çapraz bağların oluşumu gibi DNA'da çeşitli lezyonlara neden olur. Ayrıca, yüksek ROT konsantrasyonları, DNA'da önemli miktarda tek ve çift zincir kırıklarına neden olabilir (113). Metforminin, kanser ve T2DM gibi yaşlanma ve yaşla ilişkili bozukluklar için

kritik olan DNA onarımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarımızda, metforminin farmakolojik konsantrasyondaki in vitro kısa süreli etkisinin, yaşlı deneklerin lenfositlerinde pro-oksidan uyaranla indüklenen DNA hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu tespit edildi (114, 115).

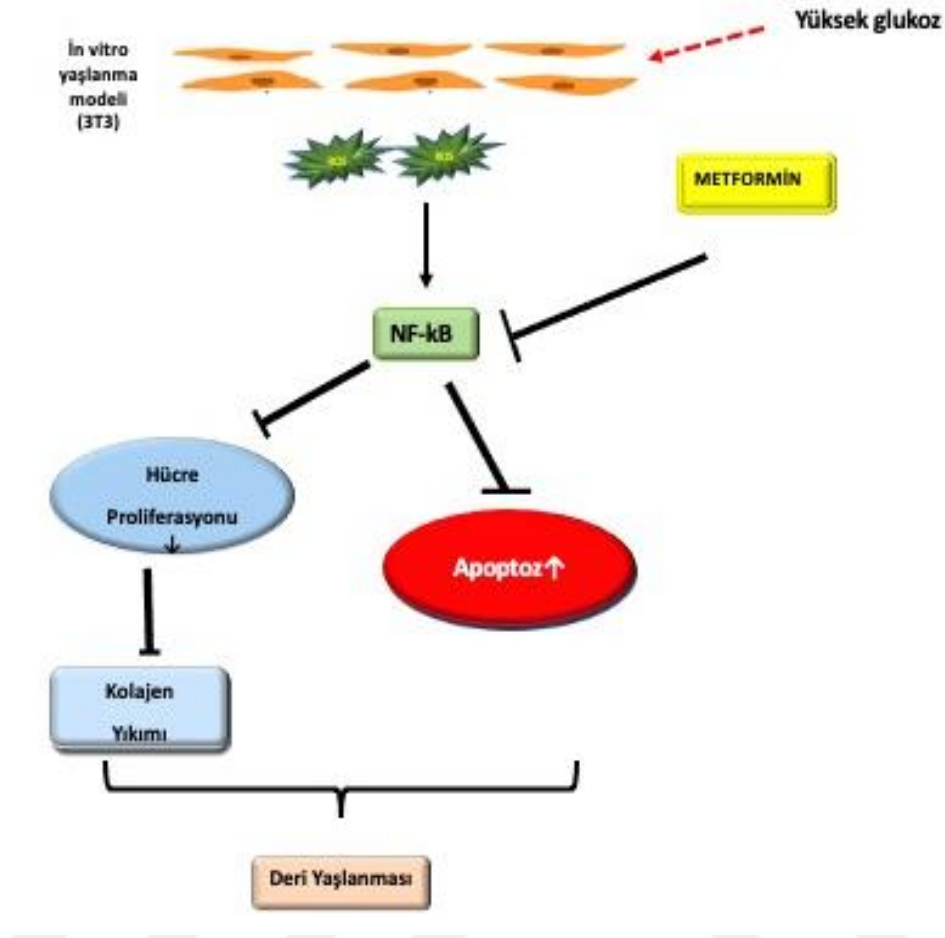
Metforminin etki mekanizması moleküler düzeyde hala belirsiz olsa da son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışma, metforminin, hücrenin metabolik sensörleri olan 5 'AMP ile aktive edilmiş protein kinazı (AMPK) aktive ederek, hepatik glukoneogenezi inhibe eden glukoz düşürücü etki sağladığını göstermiştir (116). AMPK, ayrıca yağ asidi sentezi yolunun, mTOR ve asetil-CoA-karboksilazın kısmen aşağı yönde düzenlenmesine aracılık eder (117). Metformin, mTOR sinyal yolağını, insülin benzeri büyüme faktörü 1(IGF-1)'in aşağı yönde regülasyonunu ve hiperinsülinemiyi indükler ve böylece proliferasyonu, otofajiyi ve hücre büyümesi gibi prosesleri etkiler (118). Proinflamatuvar NF-kB sinyal yolağının aşağı yönde regülasyonunun yanı sıra, azalmış hiperglisemiye paralel olarak artırılmış insülin duyarlılığı, ROT oluşumunu ve ileri glikasyon son ürünlerini en aza indirir. Son veriler, metforminin NF-kB'yi inhibe ettiğini ve bu nedenle hem AMPK'ye bağımlı hem de bağımsız yollarda inflamatuvar yanıtları baskılayabildiğini ortaya koymaktadır (119). Metformin, ayrıca ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış serin / treonin kinaz / kontrol noktası kinaz yolları ve mitokondriyal kompleks I ile etkileşime girerek DNA hasarını da önlemektedir. Epigenetik regülasyona katılan metformin, DNA asetiltransferazların ve metilazların aktivitelerini azaltarak histon modifikasyonuna aracılık eder (118).

Metformin ayrıca kanser, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıkların önlenmesinde de önemli bir rol oynar (120, 121). NF-kB'nin bir inhibitörü olarak metforminin, AMPK'yi aktive ederek yaşam süresini spesifik olarak etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Moisseva ve ark. (2013) metforminin NF-kB'nin nukleusa translokasyonunu engellediğini ve yaşlanan hücrelerde IκB ve IKKα fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (122).

NF-kB, memeli hücresindeki sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, kemokinlerin ve hücre adezyon moleküllerinin gen ekspresyonunu sağlayan bir pleiotropik transkripsiyon faktörüdür. (123, 124). Birçok hücre tipinde, NF-kB, farklılaşma, çoğalma, immün yanıt, hücre adezyonu ve apoptoz gibi çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynar (125). Yaşlı dokular ile yapılan çalışmaların biyoinformatik analize göre, yaşlanma süreciyle en çok ilişkili olan transkripsiyon faktörünün NF-kB olduğu belirtilerek, NF-

kB aktivitesinin azaltılmasının, progeria modelinde hızlandırılmış yaşlanmayı baskıladığı bildirilmiştir (126,127). NF-kB aktivasyonu, hücre yaşam sinyallerini, inflamatuvar sitokinleri, hücre döngüsü modülatörlerini, anjiyojenik ve büyüme faktörlerini kodlayan genlerin NF-kB'ye bağımlı transkripsiyonuna yol açar ve bunların tümü, tümörü teşvik eden bir ortamda önemli rol oynar. Daha önceki çalışmamızda metforminin, hücre proliferasyonu, kolajen I ve III üretimi, apoptoz ve NF-kB (p65) aktivitesini azaltması yoluyla, yüksek glukoz koşulları altında in-vitro yaşlanma modeli oluşturulan 3T3 fibroblastları üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu tespit ettik (128).

Deri yaşlanması ile ilişkili son zamanlarda yapılan çalışmalarda, metforminin deri yaşlanmasına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Protein glikasyonu ile kolajenler arasında çapraz bağlar oluştuğu için bu olay deri yaşlanmasına yol açmaktadır. Yaşlanma süreci boyunca AGE' deki artış, yalnızca hücrel makromoleküllerde oksidatif hasara neden olmakla kalmaz, aynı zamanda NF-kB'nin aktivasyonuna da neden olur. Ayrıca NF-kB, dermal fibroblastlarda tip I kollajeni parçalayan enzim olan MMP-1'in ekspresyon seviyesini düzenleyerek deri yaşlanmasının regülasyonunda yer alır. Dolayısıyla NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu, dermal fibroblastlar dahil olmak üzere birçok hücre tipinde MMP-1 ekspresyonunu baskılayabilmektedir (129, 130). Metformin, NF-kB aktivitesini azaltarak kolajen üretimini eski haline getirebilir. Dolayısıyla, kolajen üretimi ve hücre proliferasyonu, NF-kB aktivitesi ile düzenlenebilir. Örneğin, önceki deneysel çalışmamızda, yüksek glukozun kolajen üretimi ve NF-kB (p65) DNA bağlanma aktivitesindeki yaşa bağlı değişiklikleri hızlandırdığını doğrularken, metformin bu etkileri bir anti-diyabetik ajan olarak iyileştirebileceğini tespit ettik (Şekil 2-9). Metforminin sadece RELA / p65 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmadığını, aynı zamanda *COL1A1* ve *COL3A1* ekspresyonunu indükleyerek yaşlanmış insan derisinden elde edilen dermal fibroblastların primer kültürü üzerinde olası bir doğrudan yaşlanma karşıtı etkiye sahip olduğunu tespit ettik (131). Tüm bu bilgiler ışığında, hiperglisemik koşullar altındaki yaşlı insan hücrelerinin in vitro modellerinde metforminin, yaşlanma karşıtı ve NF-kB üzerindeki potansiyel inhibitör etkileri için potansiyel bir mekanizma sağlayabilir.

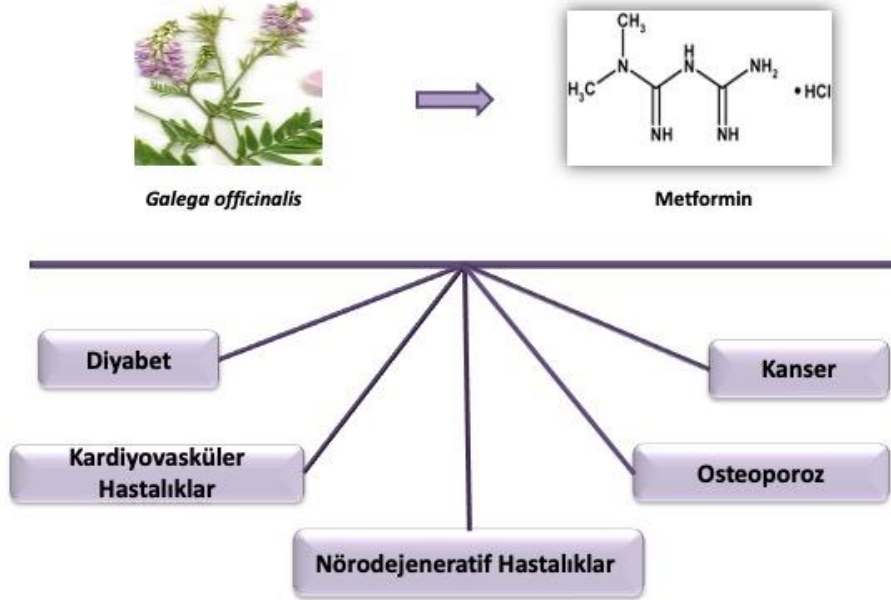


Şekil 2-9:Metforminin in-vitro yaşlanma modelinde, yaşlanma karşıtı etki mekanizmasının diyagramı (128)

2.6.1. Metforminin Yaşa Bağlı Hastalıklar Üzerindeki Etkileri

İnsanda yaşlanma, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalık için primer risk faktörüdür. Nitekim, bu koşullara bağlı ölüm riski ileri yaşlarda önemli ölçüde artmaktadır. Bu nedenle, yaşlı bireylerde yaşam süresini iyileştirmek ve sürdürmek için yeni mekanizmaların geliştirilmesine ihtiyaç vardır (132). Araştırmacılar yaşlanma, yaşlanmanın önlenmesi ve yaşa bağlı hastalıkların yavaşlatılması ile ilgili etkili mekanizmalar belirleyebilmek adına çalışmalarını yoğun bir şekilde devam ettirmektedir. Bu nedenle, yaygın olarak kullanılan versatil bir ilaç olan metformin, birçok araştırmacı tarafından yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıkların ilgili yönlerini tersine çevirmek için incelenmiştir. Metforminin yaşa bağlı hastalıklar üzerinde pleiotropik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir, bu da metformini

T2DM, kanser, obezite, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi yaşlanma ile ilişkili hastalıkların tedavisi için potansiyel bir aday haline getirmektedir (133) (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Metforminin yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar üzerinde potansiyel etkisi (15)

2.6.1.1. Kanser ve Metformin

Metformin, tüm dünyada T2DM hastalarının tedavisinde anti-diyabetik bir ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta ve anti-kanser ajan olma potansiyeline dair çalışmalar yoğun bir şekilde başlamıştır (134). Kanser biyolojisinde ortaya çıkan sorulardan biri şudur: "İnflamasyon ve metformin kullanımı kanserle nasıl bağlantılıdır?" T2DM hastaları ile yapılan bir kohort çalışmada, kontrollere (%11.6) kıyasla metformin kullanıcıları arasında (%7.3) kanser prevalansında önemli bir düşüş bulunmuştur (135). Bu zamana kadar metformin ile yapılan birkaç epidemiyolojik çalışma, prostat, kolorektal ve meme dokusu kaynaklı çeşitli tümörlerde antitümör etkisini göstermektedir (136-139). Metformin, moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve tümör oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir.

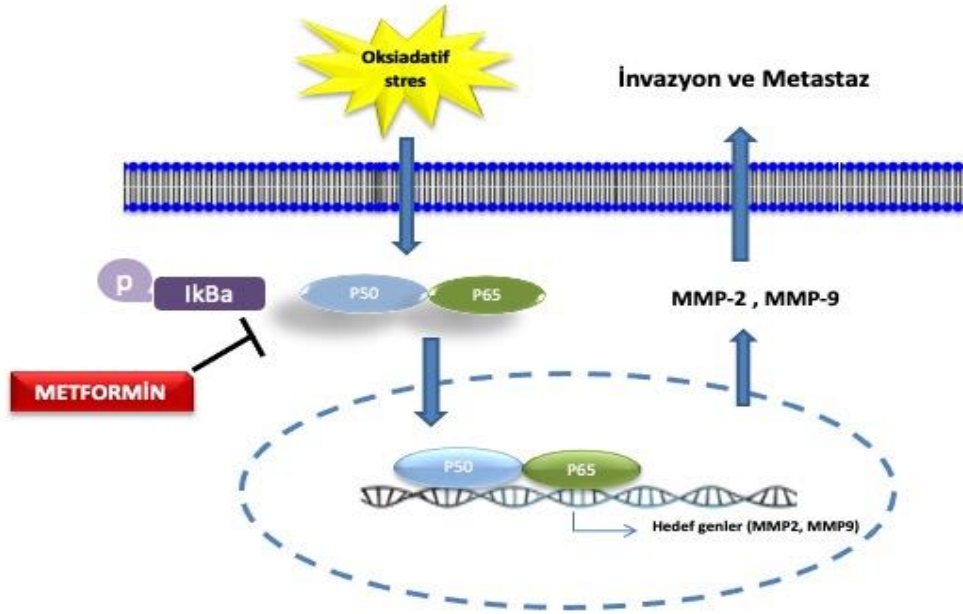
Epidemiyolojik çalışmalar, T2DM'li kadınlarda meme kanseri gelişme olasılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, bir meta-analiz çalışması, T2DM'nin özellikle menopoz sonrası kadınlarda % 23 oranında daha yüksek meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir (140). T2DM'li kadınlar ile yapılan bir çalışmada, uzun vadede karşılaşılan tip 2 diyabet hastalarının özellikle meme kanseri olmak üzere daha düşük kanser riskine sahip olduğu bulunmuştur (141).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, metforminin hem doğrudan hem de dolaylı olarak, meme kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkilerini, insülin duyarlılığını geliştirerek ve dolayısıyla hiperinsülinemiye azaltarak etki ettiğini göstermiştir (142,143). Esas olarak, metforminin bu etkileri AMPK üzerinden olmaktadır. Metformin ayrıca glikoliz yolağındaki heksokinaz-II enzimini aktive ederek ve glukoz alımını bozarak AMPK'dan bağımsız yolu baskılar ve hücresel enerji kaskadını da inhibe etmiş olur (144). Tümör gelişiminde, invazyon ve metastaz aşamaları genellikle kanserdeki birçok karmaşık biyolojik süreçten sorumludur. Hücre-ECM bağlantıları, hücreler arası adezyon moleküllerinin bozulması ve lenf ve kan damarları yoluyla ECM invazyonu, kanserogeneze çok önemli süreçlerdir (145). Birkaç proteolitik enzim, ECM ve bazal membran dahil kanserde mikroçevrenin bozulmasında kritik bir rol oynar (146).

Diğer taraftan MMP'lerin tümör invazyonu ve metastazdaki rolünü açıklayabilmek, tümör hücrelerinin yayılmasını engelleyebilmek adına çok önemlidir (147). Yapısal ve işlevsel olarak çinkoya bağımlı endopeptidazlar ailesi olan MMP'ler, kolajen ve fibronektin gibi çeşitli ECM bileşenlerinin proteolizine katılırlar (146). Bu proteinlerin aktivitesi, fizyolojik koşullar altında doku homeostazının bozulmasını engellemek için doğru bir şekilde düzenlenmektedir. Tümör hücrelerinde bu denge bozulabilir (148). Şu ana kadar, araştırmacıların çoğu, tip IV kollajeni parçalayabilen MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyon profillerini açıkladılar (149). Stromal dokuyu epitel hücrelerinden ayıran bazal membranın degradasyonu, tümör invazyonu için gerekli olan bir adımdır ve MMP-2 ve -9'un artan ekspresyon ve aktiviteleri ile sonuçlanır (150). Transkripsiyon süreçlerinde MMP-2 ve -9 ekspresyonunda AP-1 (aktivatör protein-1) ve NF- κ B gibi birçok aktivatör protein vardır. NF- κ B aktivasyonu ve kontrolü arasındaki denge, kronik inflamasyon ve kanser gibi patolojik durumlarda bozulur, ancak NF κ B1 geninin karsinogeneze oynadığı rol hala tam olarak açıklanamamıştır değildir.

Önceki in vitro çalışmamızın sonuçlarına göre metforminin, meme kanserine karşı doza bağımlı bir potansiyel ajan olarak kullanılabileceğini tespit ettik. Metforminin, MMP-2

ve MMP-9 gibi meme kanserinin invazyon ve metastaz yolağında yer alan proteinlerin azalmış ekspresyonunun yanı sıra nükleer translokasyonu inhibe ederek NF-kB'yi inhibe ettiğini gözlemledik (90) (Şekil 2-11).



Şekil 2-11:Metformin, NF-kB inhibisyonu yoluyla MMP-2 ve MMP-9'u ekspresyonunu baskılayarak kanser invazyon ve metastazını inhibe eder (15)

2.6.2. Metforminin Kanserojeniz ve Yaşlanma Sürecine NF-kB yolağı üzerinden etkisi

Kansere yönelik ilaç dizaynı için birçok araştırma büyük oranda yatırımları teşvik etmektedir (6). Kanser araştırmalarına konu olan ilaçlardan biri de potansiyel antikanser özellik taşıyan metformindir. 2005 yılındaki epidemiyolojik çalışmanın verilerine göre T2DM hastalarda metformin tedavisi ile kanser riskinin azalması konusunda bir bağlantı olduğu rapor edilmiştir (151). Bununla birlikte elde edilen bu veriler, metformin tedavisinin kanserojeniz aşamalarının ilerlemesini engelleyebilecek muhtemel moleküler mekanizmalarla olumlu yönde etkileyebileceğini göstermektedir (6). Diğer bir araştırmada, metforminin moleküler anlamda anti-kanser ajan olarak uygulanabilirliği rapor edilmiştir. Metforminin, oksidatif fosforilasyonu bozması ve kompleks-1

inhibisyonu ile kanserogenez sürecinin engellenmesi için kritik bir nokta olarak görünmektedir (152, 153).

Metforminin in vitro koşullarda tümör hücrelerine olan etkisini destekleyici ilk veri; in vitro koşullarda AMPK'yı aktive ederek mTOR inhibisyonu ve bununla ilişkili olarak hücre büyümesinin inhibisyonudur (154). Hücre kültür sistemlerinde doza bağlı metformin uygulamasının; MMP-2, MMP-9, N-kaderin ve fibronektin gibi kanserogenez ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını azaltması ile kanser hücrelerinin invazyonunun baskılandığı bildirilmiştir (155).

Metforminin hücre transformasyonundaki rolü, son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. PTEN, CYLD gibi tümör baskılayıcı genler ve NF- κ B /STAT3 yolağındaki transkripsiyon faktörleri ve Lin28B, IL-6, mikroRNA'lar (miR-21, Let-7) tarafından anti-inflamatuar etki ile transforme olmamış hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümündeki ilk evrede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Metforminin 0.1mM ve 0.3mM konsantrasyonlarda in-vitro koşullarda hücresel transformasyonu, NF- κ B/ STAT3 sinyal yolağının inhibisyonu aracılığıyla geciktirdiği bildirilmiştir (156).

Birçok biyolojik süreci de içeren kanser gelişimi ve metastaz aşamalarında kanserle ilgili ölümlerin en önemli sebebi olarak gösterilmektedir. Hücreler arası adezyon molekülleri arasındaki bağlantıların bozulması, hücre-ECM etkileşimleri, ECM'nin degradasyonu, lenf ve kan damarları kanser hücrelerinin invazyon ve metastazı için kritik basamakları oluşturmaktadır (157). Bazal membran ve ECM gibi bariyerlerin bozulmasında çeşitli proteolitik enzimler işlev görür (158). Kanseregoenezin anjiyogenez ve metastaz aşamalarında önemli rol oynayan MMP'ler ECM proteinlerinden özellikle fibronektin ve kollajen proteolozinden sorumludur (159).

MMP proteinleri pre-proenzim olarak sentezlenip hücrelerden pro-enzim olarak salınır (159, 160). Bu enzimlerden MMP-2 ve MMP-9 agresif haldeki tümör dokusunda yüksek düzeyde ekspresyonu ile invaziv ve metastatik kansere neden olmaktadır (159). MMP-2/MMP-9 çevresel bariyer olan bazal membran ve ECM'I degradasyonundan sorumlu olması nedeniyle tümör invazyonu aşaması için en önemli biyobelirteçlerdir (161). MMP-2 proteinin özellikle metastatik tümörlerde yüksek oranda devamlı sekresyonu gerçekleşir. MMP-9'un ekspresyonu ise sitokinler ve büyüme faktörleri ile NF- κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleriyle indüklenir (162, 163).

Genellikle MMP-2 belirleyici olarak metastatik tümörde fazla miktarda eksprese edilirken, MMP-9 ise inflammatuar sitokinlerden tümör nekroz faktör- α ve epidermal

büyüme faktörü ile birçok sinyal yolağı aracılığı ile stimüle edilir (159, 164). Bununla birlikte, NF-kB ve AP-1 transkripsiyon faktörleri de *MMP9* gen ekspresyonun regülasyonunda yer aldığı bilinmektedir. *MMP9*'un promotor bölgesi NF-kB ve AP-1 için bağlanma bölgesidir (159,165). Bundan dolayı, *MMP2* ve *MMP9*'un ekspresyonunun düzenlemesinde rol oynayan aktivatör proteinlerinin inhibisyonuna neden olan potansiyel ajanlar ile kanserde invaziv ve metastaz özellikler de baskılanmış olacaktır (166).

Metformin ile regüle edilen genlerin biyoinformatik analizleri, metforminin NF-kB aktivitesini inhibe eden bir ilaç olduğunu göstermektedir. Metformin, NF-kB'nin nükleusa translokasyonunu engeller ve I κ B, IKK α/β fosforilasyonunu inhibe eder (122). Son 10 yılda elde edilen verilerle birlikte, NF-kB'nin inflamasyon ve kanserle bağlantısında major rolü olduğu bildirilmiştir. NF-kB, IL-1, TNF α , IL-6, IL-8 gibi inflamatuvar sitokinleri düzenler ve bu faktörlerden birkaçının da potansiyel aktivatörü olarak görev alır. Bundan dolayı, kanserin başlangıcında, ilerlemesinde ve gelişiminde hücrelerin çoğalması ve transformasyonu NF-kB'nin aracılığı ile gerçekleşir (167, 168).

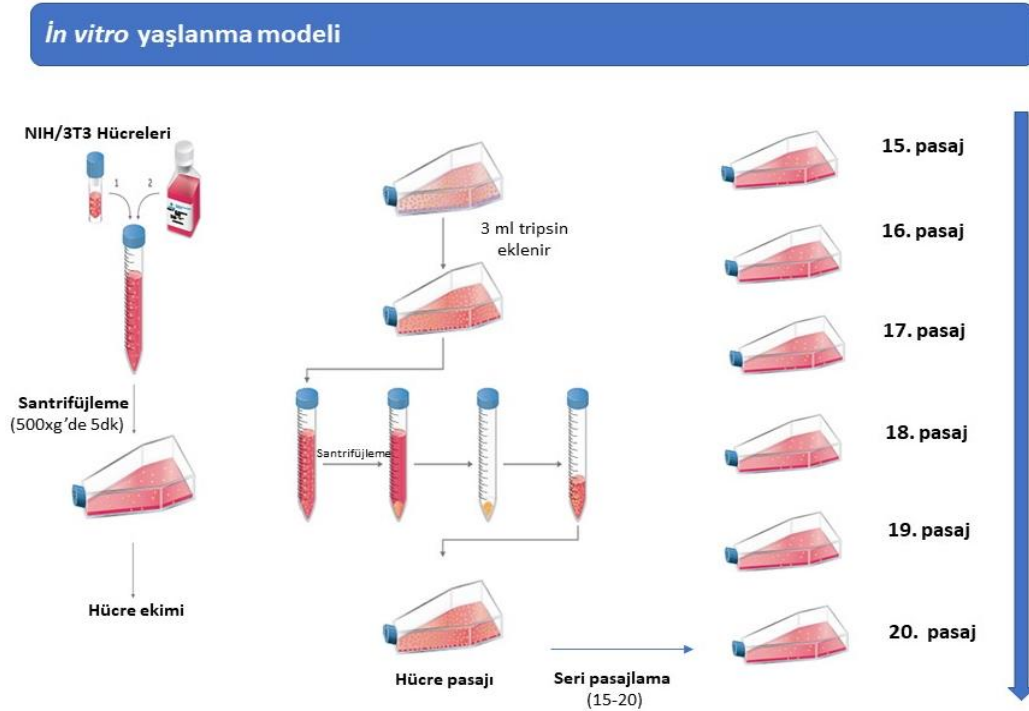
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. NIH/3T3 Fibroblast Hücre Soyu Kültürü

Ticari olarak ATCC'den temin edilen NIH/3T3 fare fibroblast hücrelerinin in vitro ortamda, in vivo ortamdaki gibi çoğalmalarını sağlamak için uygun besiyeri ortamı hazırlandı. Bu hücre kültüründe kullanılan standart kültür ortamı 100 ml Dulbecco Minimal Eagle's Medium F-12 (DMEM-F12) besiyeri, % 10 olacak şekilde ısıyla inaktive edilmiş fetal bovin serum (FBS), %1 olacak şekilde gentamisin, penisilin-streptomisin, antibiyotiği ilave edilerek hazırlandı. 37 °C'de, %95 nem, %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek tek tabaka kültür olacak şekilde inkübe edildi. Flasklar, belirli aralıklarla invert mikroskop altında gözlemlenerek hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında hücreler pasajlandı. Kültür kabı içindeki eski besiyeri uzaklaştırılarak steril 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, yüzeyden kaldırabilmek için hücrelere her 25 cm² lik flask için 3 ml % 25'lik tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek, CO₂ inkübatöründe 5 dakika bekletildi. Hücreler, yüzeyden kaldırıldıktan sonra tripsinin aktivitesini durdurmak için, taze serumlu medyum ilave edildi. Besiyeri ile süspanse edilen hücreler, kültür kabından toplanarak, 12 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Deneyler için optimum hücre sayısı uygunluğu hesaplandıktan sonra, 500 x g dönme hızında 5 dakika santrifüj edilen hücrelerden elde edilen hücre pelletinden medyum ile sulandırma yapılarak, hücre ekimleri gerçekleştirildi.

3.1.1. In vitro Deneyin Kurgulanması

NIH/3T3 hücreleri tripan mavisi canlılık testi, BrdU proliferasyon testi, immünohistokimya deneyleri için 24 kuyucuklu plate içerisine kuyucuk başına 50.000 hücre, Elisa ve qRT-PCR deneyleri için 6 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 300.000 hücre olacak şekilde ekildi. Ekilen hücreler standart hücre kültür ortamında %5 CO₂ ve % 95 nem içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Deneyler, fibroblast hücrelerinden in-vitro hücre yaşlanma modeli oluşturmak için literatüre göre belirlenen pasaj sayısında seri pasajlama yapılarak(15-20 pasaj) kuruldu (128) (Şekil 3-1).

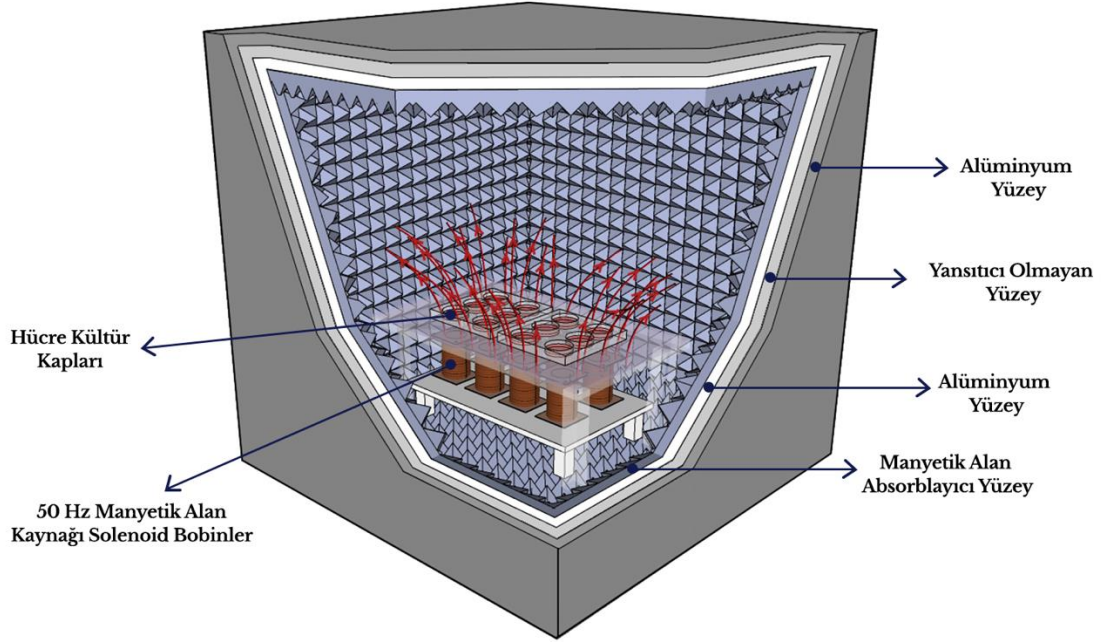


Şekil 3-1: NIH/3T3 fibroblast hücreleri in vitro yaşlanma modeli ve seri pasajlama işlemlerinin şematik olarak gösterilmesi

3.2. NIH/3T3 Hücrelerine 50 Hz Elektromanyetik Alanın Uygulanması

Çalışmada, farklı gruplardaki NIH/3T3 fibroblast hücrelerine 50 Hz frekansta manyetik alan uygulandı. EMA uygulaması, EMA'nın gücü ve elektriksel alan kuvveti ölçülerek; kültür kapları içerisindeki hücrelerin EMA'dan eşit uzaklıkta konumlandırılması sonrasında yapıldı. Deneyler, dışarıdan gelebilecek herhangi bir sinyalin çalışma sonuçlarını etkilememesi için, dış yüzeyi alüminyum ile kaplanmış, iç yüzeyinde de MA absorblayıcı materyal bulunan MA uygulama kabini içerisinde gerçekleştirildi. MA uygulama kabininin sıcaklığı termostat yardımı ile 37° C'de sabit tutulacak şekilde ayarlandı. Her biri 560 dönüşü sahip sekiz adet seri olarak bağlanmış bakır solenoid bobin ile manyetik alanlar oluşturuldu. Bobinlerin göbekleri yumuşak demir çubuklarla dolduruldu ve manyetik akı yoğunluğunu arttırmak için sıkıldı. Bobinler dikey olarak yerleştirildi ve olası titreşimden etkilenmemesi için hücrelerin bulunduğu kültür kapları bu bobinlerin 1,2 cm yukarısında tutuldu. Hücreleri bobinlerin olası ısısından korumak için araya 1 cm kalınlığında ahşap plakalar yerleştirildi. Bobinler 220 V 50 Hz sinüzoidal (şehir elektrik sistemleri) olarak uygulandı. Bobinlerden akım

geçtiğinde beş farklı yerde manyetik akım şiddetleri 5 mT olarak ölçüldü. Ölçüm için Leybold Heraeus 54050 model Hall etkili teslametre kullanıldı.



Şekil 3-2: Manyetik alan uygulaması için hazırlanan deney düzeneğinin diyagramı

3.3. Metformin ve/veya Manyetik Alan Uygulanan Deney Grupları

Standart hücre kültür ortamında (37 °C’de ,%95 nem, %5 CO₂) yeterli yoğunluğa ulaşan NIH/3T3 hücrelerinden metformin (MET) ve/veya manyetik alanın (MA) uygulandığı 6 deney grubu oluşturuldu.

1. **Kontrol grubu:** Standart hücre kültür ortamında (37 °C’de, %95 nem, %5 CO₂) inkübe edilen hücrelere, metformin ve/veya manyetik alan uygulanmadı.
2. **50 Hz MA grubu:** 1 saat süre boyunca 50 Hz frekanslı manyetik alana maruz bırakıldı.
3. **50 Hz MA+ 500 uM MET grubu:** 24 saat boyunca 500 uM metformin uygulanan grup, 24 saatin sonunda 1 saat boyunca 50 Hz frekanslı manyetik alana maruz bırakıldı.
4. **50 Hz MA + 1 mM MET grubu:** 24 saat boyunca 1 mM metformin uygulanan grup, 24 saatin sonunda 1 saat boyunca 50 Hz frekanslı manyetik alana maruz bırakıldı.

5. **50 Hz MA+ 2 mM MET grubu:** 24 saat boyunca 2 mM metformin uygulanan grup, 24 saatin sonunda 1 saat boyunca 50 Hz frekanslı manyetik alana maruz bırakıldı.
6. **50 Hz MA+10 mM MET grubu:** 24 saat boyunca 10 mM metformin uygulanan grup, 24 saatin sonunda 1 saat boyunca 50 Hz frekanslı manyetik alana maruz bırakıldı.

3.4. Tripan Mavisi Testi ile Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

Tripan mavisi canlılık testi, bir hücre süspansiyonunda bulunan canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılır. Canlı hücreler tripan mavisi gibi belirli boyaları dışlayan sağlam hücre zarlarına sahipken, canlı olmayan hücreler bu boyayı hücre içine alarak mikroskop altında mavi parlak renkte görünürler. Bu ilkeye dayanan canlılık testinde, hücre süspansiyonu boya ile karıştırılır ve ardından hücrelerin boyayı alıp almadığını belirlemek için bu süspansiyon görsel olarak invert mikroskop altında incelenir. Aşağıda da tarif edildiği gibi uyguladığımız protokole, canlı bir hücrede berrak bir sitoplazmaya,, cansız bir hücre ise mavi bir sitoplazmaya gözlendi.

- **Deney Protokolü**

1. NIH/3T3 fibroblast hücreleri yeterli yoğunluğa ulaşıldığında tripsin ile kültür kabından kaldırılarak 500 x g' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak hücre pelleti yeni besiyeri ile süspanse edildi.
2. Süspansiyon haline getirilen hücreler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Bu süspansiyondan hacimce 100 µl sayım için kulladığımız temiz ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 100 µl %0.4'lük Tripan mavisi (Gibco) eklenerek karıştırıldı.
4. Hazırlanan bu karışımdan mikropipet yardımıyla 10µl alınarak hemasitometre lamı ve lamel arasına bırakıldı.
5. Hücreler inverted mikroskop altında sayıldı.
6. Tripan mavisiyle boyanmayan hücreler “canlı” olarak değerlendirilirken, boyanan hücreler ise “canlı” olarak değerlendirildi.

7. Bu ilkeye bağılı olarak % canlılık hesaplanması aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$[(\text{Toplam Hücre Sayısı} - \text{Ölü Hücre Sayısı}) / \text{Toplam Hücre Sayısı}] \times 100$$

3.5. NIH/3T3 Hücre Proliferasyonunun BrdU Testi ile Tespit Edilmesi

NIH/3T3 hücrelerinin proliferasyon oranı, sentez faza özgü işaretleme yöntemi olan BrdU proliferasyon testi ile analiz edildi. 50 mM 5-Bromo-2-deoksiüridin (BrdU) stok çözeltisi hazırlandı. Hücreler, fiksasyon öncesi 1mM BrdU ile 1 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Ardından % 70 etil alkol ile 10 dk süreyle fiksasyon işlemi tamamlandı. PBS ile 3 kez 5 dk süre ile yıkama yapıldı. Yıkamaları takiben kuyulara DNA denatürasyonu için 2 M HCl uygulandı ve 30 dakika süreyle etüvde inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi yapılmadan, hücreler nötralizasyon işlemi için Borat tampon ile 10 dakika inkübe edildi. PBS yıkamalarını takiben 1:200 oranında dilüe edilen BrdU antikor (sc-20045, Santa Cruz) ile gece boyunca +4 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası PBS’le 5 dk süre ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sırasıyla; sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Mouse and Rabbit specific HRP) ve HRP peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, Mouse and Rabbit specific HRP) 20 dk süre boyunca inkübe edildi (Histostain Plus Kit, Invitrogen, Camarillo, ABD). Kromojen uygulaması için AEC boyama kiti (3-Amino-9-Etilkarbazol boyama kiti) kullanılarak invert mikroskop altında hücrelerde spesifik kırmızı renk reaksiyonu kontrol edildi. Kuyulardaki lameller kaldırılıp, preparatlar hazırlanarak, ışık mikroskopunda 40X büyütmede bütün alanlar tarandı ve her deney grubu için 10 alanın fotoğrafı çekilerek hücre sayımları yapıldı.

3.6. MMP-2 ve MMP-9 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Yöntem ile Tespit Edilmesi

24 kuyucuklu plate içerisine yerleştirilen yuvarlak lamel üzerine metformin ve/veya MA uygulanan NIH/3T3 fibroblast hücrelerinin ekimi yapıldı. 0.2×10^6 konfluensiye ulaştıktan sonra deney protokolünde belirtildiği şekilde antikorlar kullanılarak MMP-2 (MA5-13590, invitrogen) ve MMP-9 (MA5-15886, invitrogen) için ayrı ayrı uygulama yapıldı.

- **Deney Protokolü**

1. Metformin ve/veya MA uygulanan tüm deney gruplarına ait her bir kuyucuktaki medyum atıldıktan sonra, 3 kez 5 dk boyunca 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.
2. 10 dk süreyle %70 etil alkol uygulaması ile fiksasyon işlemi tamamlandı.
3. Yıkama işlemi, PBS ile 3 defa 5'er dk olacak şekilde tekrarlandı.
4. Kuyulara, antibody dilüent ile uygun oranlarda seyreltilen MMP-2 (1:200) ve MMP-9 (1:200) primer antikoru eklenerek, bir gece boyunca +4 °C de ışısız ortamda bekletildi.
5. Yıkama işlemi, PBS ile 3 defa 5'er dk olacak şekilde tekrarlandı.
6. Plate, her kuyucuğa, sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Mouse and Rabbit specific HRP) eklenerek, 20 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. Yıkama işlemi, PBS ile 3 defa 5'er dk olacak şekilde tekrarlandı.
8. Plate, her kuyucuğa HRP peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, Mouse and Rabbit specific HRP) eklenerek, 20 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
9. Yıkama işlemi, PBS ile 3 defa 5'er dk olacak şekilde tekrarlandı.
10. AEC boyama kiti (3-Amino-9-Etilkarbazol boyama kiti) kromojeni kit prokolüne uygun olarak substrat buffer ile dilüe edilerek her kuyucuğa ilave edildi.
11. Karanlık ortamda, kırmızı spesifik boyama olup olmadığı invert mikroskop altında kontrol edilerek reaksiyon 1X PBS ile durduruldu.
12. Daha sonra, lameller kuyucuklardan alındı, üzerlerine lam kapatılarak ışık mikroskopunda farklı on bölgenin fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar üzerinden h-score analizi yapıldı.

3.7. NF- κ B1 (p65) Aktivasyonunun ELISA Yöntemi ile Tayin Edilmesi

3.7.1. Nükleer Protein Ekstraksiyonu

Hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırılan hücrelerden nükleer protein ekstraksiyonu elde etmek amacıyla “NE-PER Nuclear and Cyctoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific 78835)” kiti kullanıldı.

- **Deney Protokolü**

1. Hücre kazıyıcı ile kaldırılan hücreler, 5 dakika boyunca 500 x g'de santrifüj edildi.
2. PBS ile hücre pelleti süspanse edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.
3. 1×10^6 hücre 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktararak, 500 x g'de 2-3 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirildi.
4. Süpernatant, pipet yardımıyla dikkatlice atılarak hücre pelletinin mümkün olduğunca kuru bırakılması sağlandı.
5. Hücre pelletine Tablo 3-1'de belirtilen miktara uygun olarak 200 μ L Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I) eklendi.
6. Hücre pelletini tamamen askıya almak için, mikrosantrifüj tüpü en yüksek ayarda 15 saniye boyunca kuvvetlice vortekslendi.
7. Hücreler, buz üzerinde 10 dakika boyunca inkübe edildi.
8. Tablo 3-1'de belirtilen miktara uygun olarak, tüpe önceden soğutulmuş 11 μ L Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II) eklendi.
9. Hücreler, en yüksek ayarda 5 saniye boyunca vortekslendi ve sonrasında 1 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
10. Hücrelerin, en yüksek ayarda 5 saniye vortekslennesi sonrasında, hücreler, maksimum hızda ($\sim 16.000 \times g$) 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
11. Elde edilen süpernatant, temiz, önceden soğutulmuş bir tüpe aktarıldı. Sitozolik fraksiyonu içeren bu süpernatant, deney sırasında kullanılmak üzere -80°C 'ye kaldırıldı.
12. Nükleer fraksiyonu içeren pellet, soğuk Nuclear Extraction Reagent (NER) solüsyonu ile süspanse edildi.

13. En yüksek ayarda, 15 saniye vorteksleme işlemi gerçekleştirildi. Örnekler, buz üzerinde 40 dakika boyunca muhafaza edilerek, her 10 dakikada bir 15 saniye vorteksleme işlemi gerçekleştirildi.
14. Örnekler, maksimum hızda ($\sim 16.000 \times g$) 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant (nükleer fraksiyon) önceden soğutulmuş temiz bir tüpe aktarıldı.
15. Ekstraktları NF- κ B aktivasyon ölçüm deneyinde kullanılmak üzere -80°C 'ye kaldırıldı.

Deneyler için gerekli reaktif hacimleri kit içerisindeki protokole göre belirlendi (Tablo 3-1).

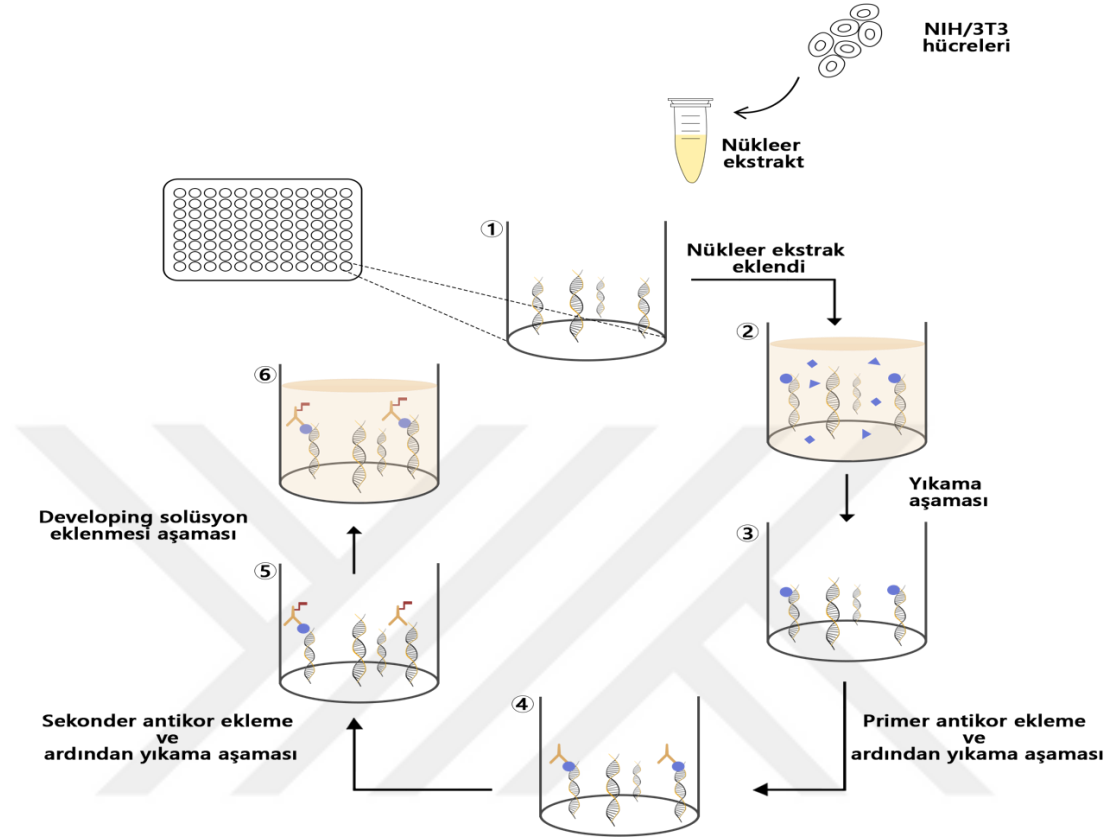
Tablo 3- 1: Farklı hücre hacimlerindeki örnekler için gerekli reaktif hacimleri

Hücre Hacmi (μL)	CER I (μL)	CER II (μL)	NER (μL)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1000	55	500

3.7.2. NF- κ B (p65) DNA Bağlanma Aktivitesinin Elisa Yöntemi ile Tespit Edilmesi

Manyetik alan ve/veya metformin uygulanan hücrelerden NF- κ B p65 DNA bağlanma aktivitesini ölçmek amacıyla “NF- κ B p65 Transcription Factor Assay Kit (Abcam-ab133122)” kullanıldı. Taze hücrelerden elde edilen nükleer ekstraktlardan spesifik transkripsiyon faktörü DNA bağlanma aktivitesi ölçmek için kullanılan radyoaktif olmayan, hassas bir metottur. Radyoaktif elektroforetik mobilite kaydırma analizinin (EMSA) yerine kullanılan bu metotta, NF- κ B cevap elementi içeren spesifik bir çift sarmallı DNA (dsDNA) dizisi, ELISA plate içerisindeki kuyucuklara sabitlenmiştir. NF- κ B içeren nükleer fraksiyon, spesifik olarak NF- κ B cevap elementine bağlanır. NF- κ B (p65), NF- κ B(p65)’ye spesifik primer antikor eklenerek tespit edilir.

HRP'ye konjüge sekonder antikor, 450 nm'de hassas bir kolorimetrik okuma sağlamak için eklenir (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: NIH/3T3 fibroblast hücrelerinden elde edilen nukleer protein ekstraktı kullanılarak ELISA ile NF-κB (p65) aktivasyonunun belirlenmesi

- **Reaktiflerin Hazırlanması**

Kit protokolüne uygun olarak plate ve tamponlar kiti açmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Deneye başlamadan önce gerekli reaktiflerin hazırlanması aşağıda da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

➤ **Transkripsiyon Faktörü Antikor Bağlama Tamponu (Transcription Factor Antibody Binding Buffer/ABB) (10X)**

10X Transkripsiyon faktörü antikor bağlama tamponu'ndan 1X'den ABB hazırlamak için 1:10 oranında ultra saf su ile seyreltme işlemi gerçekleştirildi.

➤ **Konsantre Yıkama Tamponu (400X)**

Konsantre yıkama tamponu 1:400 oranında ultra saf su ile seyreltildi. 1 litre yıkama tamponu için 0.5 ml Polisorbat 20 eklendi. Polisorbat 20, viskoz bir sıvı olduğu için pipetör yerine enjektör kullanılarak gerekli hacimde çekim yapıldı.

➤ **Transcription Factor Binding Assay Buffer (TFB) (4X)**

Tablo 3-2'de belirtilen miktarlarda 4X Transcription Factor Binding Assay Buffer (TFB) kullanılarak 15 ml falkonda deneyden hemen önce Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer (CTFB) hazır hale getirildi (Tablo 3-2).

Tablo 3- 2: Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer (CTFB)

Komponent	Hacim / Kuyucuk
Ultra saf su	73 µl
4X Transcription Factor Binding Assay Buffer (4X)	25 µl
Reaktif A	1 µl
300 mM DTT	1 µl
Total hacim	100 µl

➤ **Transkripsiyon Faktör NF-κB (p65) Pozitif Kontrol**

Pozitif kontrol, tekrarlanan dondurma / çözme döngülerinin sinyal gücünde bir azalmaya neden olabilmesi ihtimalinden dolayı 20'şer µl ependorflara alikotlanarak -80°C'de saklandı.

➤ **Transkripsiyon Faktör NF-κB (p65) Primer Antikor**

Tablo 3-3'de belirtilen miktarlara göre 1X ABB içerisinde 1:100 oranında dilüe edilen Transkripsiyon Faktörü NF-κB (p65) Primer Antikoru hemen deney öncesinde hazırlandı.

Tablo 3- 3: Transkripsiyon Faktör NF-κB (p65) Primer Antikoru Dilüsyonu

Komponent	Hacim / Kuyucuk
1XABB	99 µl
Transkripsiyon Faktörü NF-κB (p65) Primer Antikoru	1 µl
Total hacim	100 µl

➤ **Sekonder Antikor Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate**

Tablo 3-4' de belirtilen miktarlara göre 1X ABB içerisinde 1:100 oranında dilüe edilen Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate, hemen deneyden önce hazır hale getirildi.

Tablo 3- 4: Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate Dilüsyonu

Komponent	Hacim / Kuyucuk
1XABB	99 µl
Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate	1 µl
Total hacim	100 µl

- **Deney Protokolü**

1. Deney öncesi hazırlığında tamponlar ve plate oda sıcaklığına getirildi. Plate deneyde çalışılacak örnek sayısına uygun sayıda şerit ile hazır hale getirildi. CTFB tamponu uygun hacimlerde aşağıda belirtildiği gibi kuyucuklara ilave edildi.
 - Negatif kontrole ait kuyucuklara, 100 µl CTFB tamponu eklendi. Bu kuyucuklara NF-κB(p65) ilave edilmedi.
 - Pozitif kontrole ait kuyucuklara, 90 µl CTFB tamponu eklenerek, 10 µl pozitif kontrole ait olan nuklear ekstrakt ilave edildi.
 - Örneklerle ait kuyucuklara, 90 µl CTFB tamponu eklenerek, 10 µl örneklerle ait olan nuklear ekstraktlar ilave edildi.
2. Plaka, üzeri kapatılarak bir gece boyunca 4°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. Ertesi gün, kuyucuklar, 200 µl 1X yıkama tamponu kullanılarak 5 kez yıkandı. Her yıkama sonunda kuyucukların içi boşaltıldı. Son yıkamadan sonra plaka kağıt havluya 3-5 kez hafifçe vurularak, yıkama solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı.
4. 1X ABB ile 1:100 oranında dilüe edilen Transkripsiyon Faktör NF-κB(p65) primer antikorundan her kuyucuğa 100 µl eklendi, sadece negatif kontrole ait kuyucuğa ekleme yapılmadı.
5. Plaka, üzeri kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında hareket ettirilmeden inkübasyona bırakıldı.
6. Kuyucuklar, 200 µl 1X yıkama tamponu kullanılarak 5 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra, plaka, kağıt havluya 3-5 kez hafifçe vurularak, kalan yıkama solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı.
7. 1X ABB ile 1:100 oranında dilüe edilen Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate sekonder antikor tüm kuyucuklara 100 µl olacak şekilde eklendi.
8. Üzeri kapatılan plaka, 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

9. Kuyucuklar, 200 µl 1X yıkama tamponu kullanılarak 5 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra plaka, kağıt havluya 3-5 kez hafifçe vurularak, kalan yıkama solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı.
10. Yıkamadan sonra, her kuyucuğa 100 µl Transcription Factor Developing Solution ilave edilerek, 40 dakika oda sıcaklığında ışıktan uzak tutularak orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
11. Kuyucuklarda, mavi renk oluşumu ile reaksiyon gözlemlendiğinde her kuyucuğa 100 µl Stop Solution ilave edildi. Solüsyon ilavesiyle birlikte renk, maviden sarıya dönüştü.
12. ELISA okuyucuda (Thermo Scientific MULTISKAN GO, Finland) 5 dakika içerisinde 450 nm'de ölçüm yapıldı.

3.8. *RELA*, *MMP2*, *MMP9* ve *CDH1* Gen Ekspresyonu Analizi (QRT-PCR)

3.8.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, MasterPure™ RNA Purification (MCR85102, EPICENTRE) RNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıdaki deney protokolüne göre gerçekleştirildi.

- **Deney Protokolü**

1. Her örnek için 1,5 µl Proteinaz K 150 µl Lizis Solüsyonu (Tissue and Cell Lysis Solution) ile seyreltilti.
2. Proteinaz K içeren 150 µl Lizis Solüsyonu bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Proteinaz K içeren tüpe, 150 µl örnek de eklenerek, tüp iyice vortekslendi.
4. Vorteks sonrasında, tüp, 65 °C' de 15 dakika inkübe edildi (Her 5 dk' da düşük hızda vorteksleme işlemi gerçekleştirildi).
5. Örnekler, 3 dk boyunca buzda bekletildi.
6. 300 µl karışıma, 175 µl MPC Protein Çökeltme Reaktifi (MPC Protein Precipitation Reagent) eklendi, karışım 10 saniye boyunca kuvvetli bir şekilde vortekslendi.
7. Karışım, + 4 ° C'de 11.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
8. Süpernatant, temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, pellet atıldı.

9. Süpernatanta 500 µl izopropanol eklenerek, tüp 30-40 defa ters-düz edildi.
10. RNA, mikrosantrifüjde 4 ° C'de 10 dakika santrifüjleyerek pellet haline getirildi.
11. RNA'yı içeren pelletten izopropanol dikkatlice uzaklaştırıldı.
12. Pelleti yerinden çıkarmamaya dikkat ederek 200 µl % 70 etanol ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
13. Kalan etanolün tamamı bir pipetle çıkarıldı.
14. RNA, 35 µl TE tamponu ile süspanse edildi.
15. Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) spektrofotometre kullanılarak elde edilen RNA'ların konsantrasyon ölçümleri yapıldı.
16. RNA ürünleri, cDNA sentez çalışmasında kullanılmak üzere -80° C'ye kaldırıldı.

3.8.2. RNA ürünlerinden cDNA Sentezi

Kopya DNA (cDNA), cDNA sentez kiti (OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit, abm, Canada) kullanılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

- Kalıp RNA ve primer karışımı, 0.2'lik PCR tüpünde Tablo 3-5'te belirlenen hacimlere göre hazırlandı.

Tablo 3- 5: RNA ve Primer Reaksiyon İçeriği

Reaksiyon içeriği	Hacim
Total RNA	100 ng
Random Primer	1 µl
dNTP mix	1 µl
dH ₂ O	Değişken (14.5 µl'e kadar)

Denatüre edilmek amacıyla RNA-primer karışımı belirli sıcaklık döngüsünde (65°C 5 dk ve buz üzerinde 1dk) inkübe edildi.

- Bu işlem sonrasında, buzda ters transkriptaz (RT) reaksiyonu Tablo3-6’ de belirlenen oranlara göre gerçekleştirildi.

Tablo 3- 6:Ters transkriptaz (RT) Reaksiyonunun İçeriği

Reaksiyon içeriği	Hacim
5X Ters Transkriptaz Buffer (RT Buffer)	4 µl
RNaz inhibitörü (RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor) (40 U/µl)	0,5 µl
Ters transkriptaz (OneScript® Plus RTase) (200 U/µl)	1 µl

- Tüpün içine konan reaksiyon karışımı dikkatlice karıştırıldı ve ters transkriptaz reaksiyonu aşağıdaki sıcaklık döngülerine göre yapıldı.
25°C 10 dk
45°C 15 dk
85°C 5 dk
- Reaksiyondan elde edilen tüplerdeki cDNA ürünleri deney ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

3.8.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

RT-PCR ile elde edilen ürünler olan cDNA’ları kullanarak qPCR tekniği ile *RELA*, *MMP2*, *MMP9* ve *CDH1(E-kaderin)* mRNA seviyelerindeki değişimler tespit edildi. Tasarlanan primerler (Tablo 3-7) sentezi yapan firmanın protokolü doğrultusunda TE buffer içerisinde 100 pmol olacak şekilde çözüldü ve deney gününe kadar 20°C’de muhafaza edildi. Qiagen Quantitect SYBR Green PCR kitin kullanılarak Rotor-Gene Q- Qiagen cihazında ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. mRNA miktarlarındaki değişimi doğru bir şekilde belirlemek amacıyla referans gen olarak β -aktin (*ACTB*) kullanıldı. Her reaksiyonda, kontaminasyon varlığını dışlamak adına kalıp cDNA içermeyen bir örnek

negatif kontrol olarak kullanıldı. Kit protokolüne göre belirlenen hacimlerde (Tablo 3-8, Tablo 3-9) hazırlanan karışım RT-PCR cihazına (Rotor-Gene Q- Qiagen) yüklendi.

Tablo 3- 7: QRT-PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primer Dizileri

Gen	Primer	Dizi
RELA(P65)	Forward	AGTGTGTGAAGAAGCGAGACC
	Reverse	AAATCGGATGTGAGAGGACAG
MMP2	Forward	TCATTGGTTACACACCTGACCT
	Reverse	GGGTATCCATCTCCATGCTC
MMP9	Forward	TGTCACCTTCCCTTCACCTTC
	Reverse	CTCACTAGGGCAGAAACCAAA
CDH1	Forward	CTCCAGTCATAGGGAGCTGTC
	Reverse	CCCAGTCTCGTTTCTGTCTTC
ACTB	Forward	ATCTGGCACCACACCTTCTAC
	Reverse	GGTACGACCAGAGGCATACAG

Tablo 3- 8: RT-PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
SYBR Green Master Mix	12,5 µl
Primer F (7.5 pmol)	0,15 µl
Primer R (7.5 pmol)	0,15 µl
dH ₂ O	11,2 µl
cDNA	1 µl
Total hacim	25 µl

Tablo 3- 9: qRT-PCR Reaksiyonu Kullanılan Sıcaklık Döngüleri

Pre-İnkübasyon	95 °C	10dk	} 1 döngü
	95 °C	10sn	
Amplifikasyon	59 °C	10sn	} 45 döngü
	72 °C	10 sn	
Soğutma	40 °C	30sn	} 1 döngü

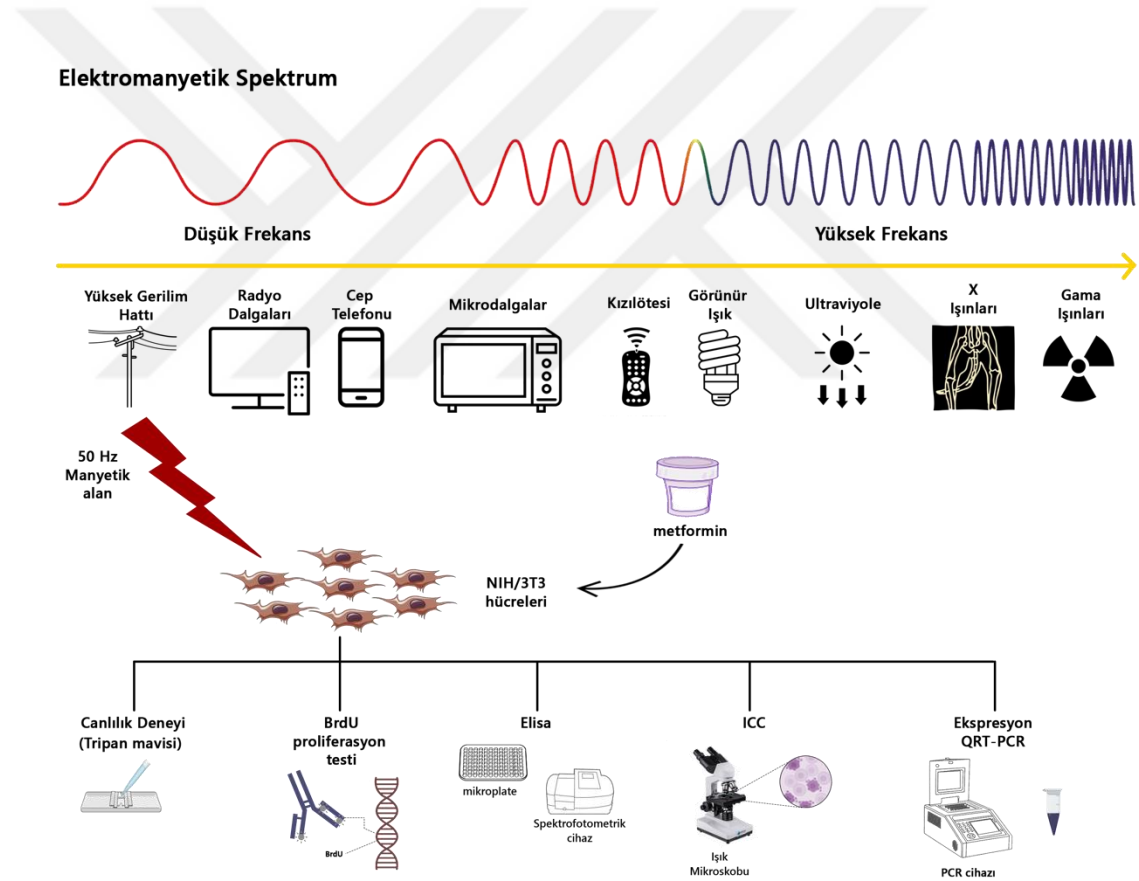
Relatif mRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılarak, ΔCt değerleri dikkate alınarak hesaplandı. ΔCt değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

$$\Delta Ct = Ct_{\text{hedef Gen}} - Ct_{\text{Referans}}$$

3.9. İstatistiksel Analiz

En az beş kez tekrarlanan deneylerin sonuçları, grup içi değerlendirmeler için GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı ile Paired t test analizi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çoklu kıyaslama ('post-hoc') testi olarak, gruplar arasında Tukey-Gramer testi uygulandı ve anlamlılık seviyesi $P < 0,05$ olarak belirlendi.

MA ve/veya MET uygulanan *in vitro* yaşlanma modeli oluşturulmuş NIH/3T3 hücrelerine uygulanan özet deney planı aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir (Şekil 3-4)



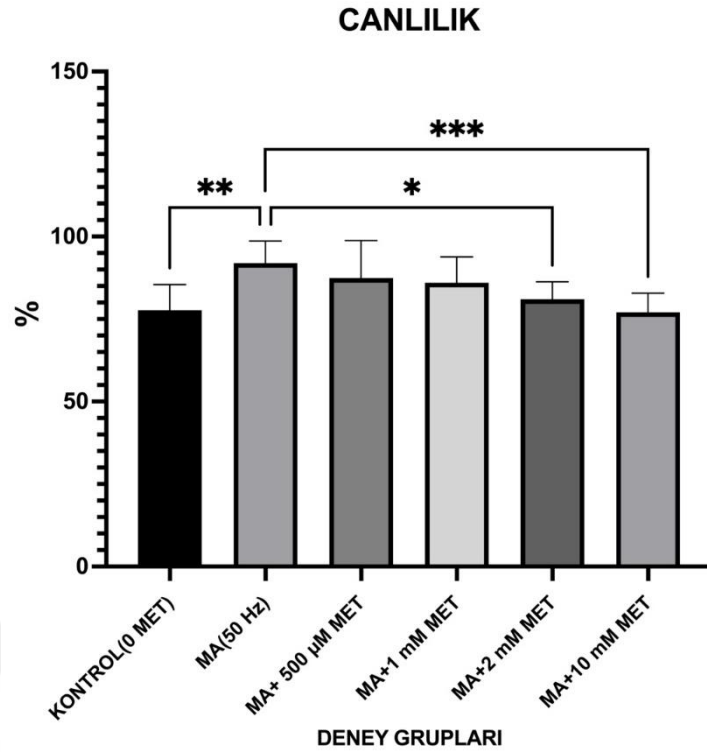
Şekil 3-4: Deney planının özet gösterimi

4. BULGULAR

4.1. NIH/3T3 HÜCRELERİNDE METFORMİNİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN CANLILIK ÜZERİNE ETKİSİNİN TRİPAN MAVİSİ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Çok düşük frekansta manyetik alanın (50 Hz 5 mT) NIH/3T3 fibroblast hücrelerinin canlılık üzerine olan etkisini Tripan mavisi testi ile belirlemek amacıyla yaşlanma modeli oluşturulan hücreler 1 saat 50 Hz frekansta manyetik alana maruz bırakıldı. Şekil 4-1’de görüldüğü gibi; 50 Hz 5mT EMA grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında; 50 Hz 5mT manyetik alana maruz bırakılan NIH/3T3 grupta canlılığın manyetik alanın uygulanmadığı gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($p < 0.01$).

Metforminin 50 Hz 5mT EMA’nın meydana getirdiği hücre canlılığındaki indükleyici etkiyi ortadan kaldırıp kaldırmadığını göstermek amacıyla 500 μ M, 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konsantrasyonları kullanıldı. 50 Hz 5mT EMA grubunda 2mM ve 10 mM metformin konsantrasyonlarının 24 saat muamele sonucunda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi ($p < 0.05$, $p < 0.001$).



Şekil 4-1: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası Tripan mavisi testi ile deney gruplarına ait canlılık (%) istatistiksel değerlendirilmesi

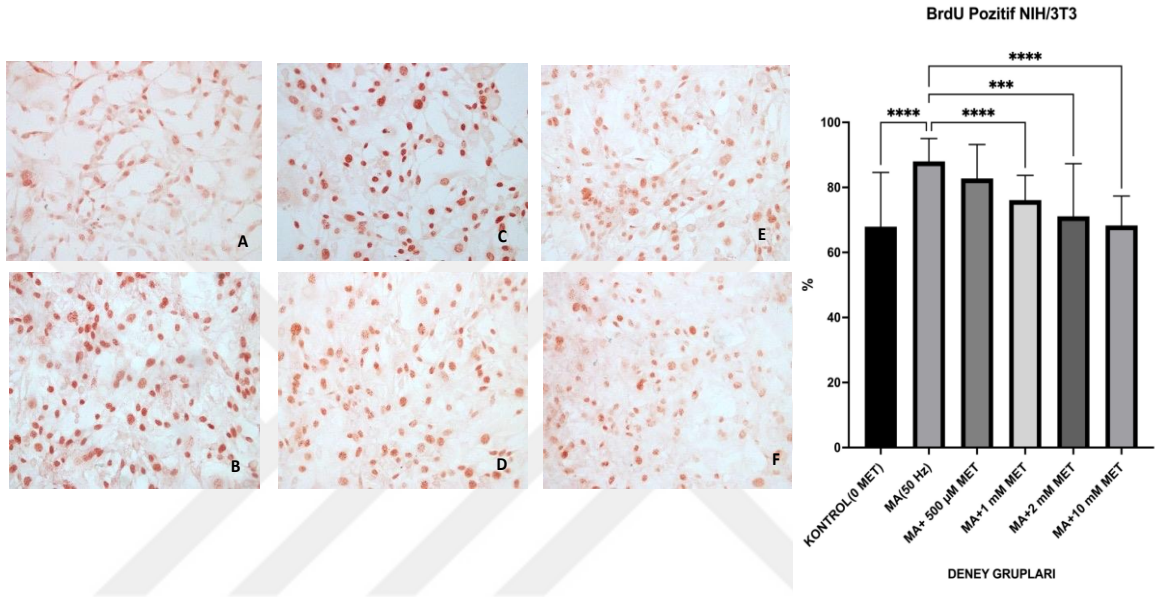
(A) kontrol grup (0 MET), (B) MA (50 Hz 5mT), (C) MA+500 µM MET, (D) MA+1 mM MET, (E) MA+2 mM MET, (F) MA+10 mM MET (*p=0.02, **p=0.0010 ***, p =0.0009, ***p=0.0006).

4.2. NIH/3T3 HÜCRELERİNDE METFORMİNİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN BrdU TESTİ İLE BELİRLENMESİ

Çok düşük frekansta manyetik alanın (50 Hz 5mT) NIH/3T3 fibroblast hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkisini BrdU proliferasyon testi ile belirlemek amacıyla yaşlanma modeli oluşturulan hücreler 1 saat 50 Hz frekansta manyetik alana maruz bırakıldı. Şekil 2’de görüldüğü gibi; 50 Hz EMA grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında; 50 Hz EMA uygulanan NIH/3T3 grupta proliferasyonun manyetik alanın uygulanmadığı gruba kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde arttığı tespit edildi ($p < 0.001$).

Metforminin 50 Hz EMA’nın meydana getirdiği hücre proliferasyondaki indükleyici etkiyi ortadan kaldırıp kaldırmadığını göstermek amacıyla 500µM, 1mM,

2mM ve 10 mM metformin konstrasyonları kullanıldı. 50 Hz EMA grubunda 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konsantrasyonlarının 24 saat muamele sonucunda hücre proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi (sırasıyla; $p < 0.001$, $p = 0.0009$, $p < 0.001$). Şekil 2'deki immünohistokimya mikrografları ve görüntüleri ile BrdU test istatistik bulguları birbirini destekler niteliktedir.



Şekil 4-2: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası BrdU proliferasyon immünohistokimya mikrografları ve istatistiksel değerlendirilmesi

(A) kontrol grup (0 MET), (B) MA (50 Hz), (C) MA+500 µM MET, (D) MA+1 mM MET, (E) MA+2 mM MET, (F) MA+10 mM MET ve BrdU pozitif hücre sayımı sonuçlarının (%) istatistiksel değerlendirilmesi (x40) (**p = 0.0009, ***p < 0.0001).

Streptavidin İmmün Boyama: Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi, poliklonal anti-BrdU antikor, büyütme:40X

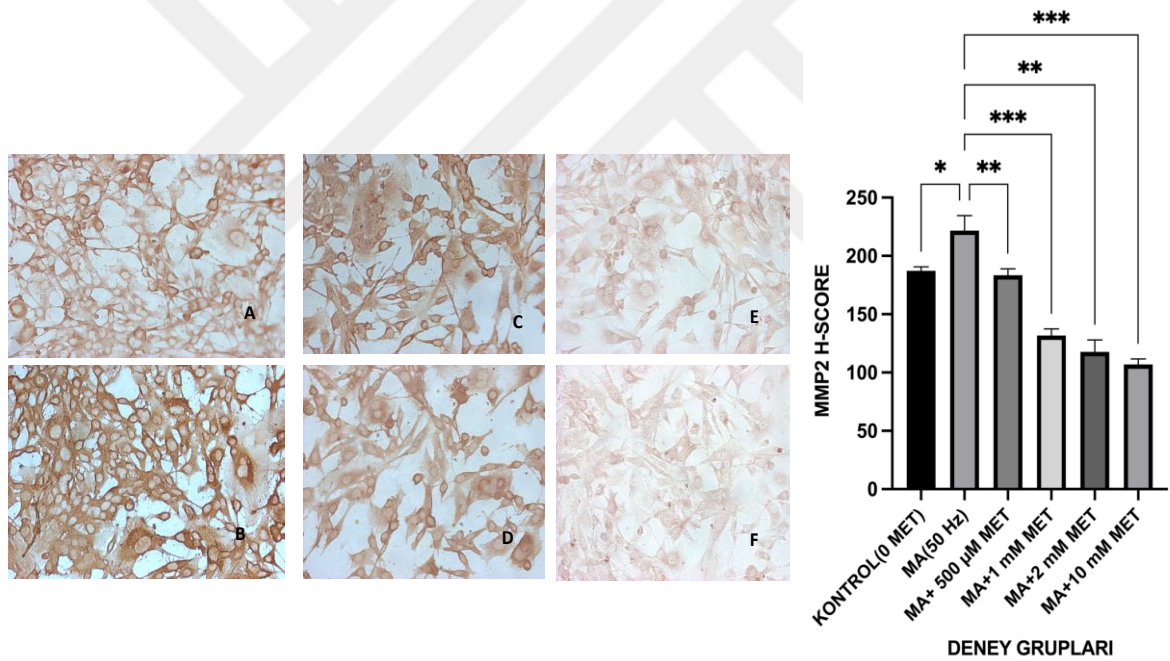
4.3. NIH/3T3 HÜCRELERİNDE METFORMİN VE ELEKTROMANYETİK ALANIN MMP-2 VE MMP-9 PROTEİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İMMÜNOSİTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ

Kültüre edilen NIH/3T3 fibroblast hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ICC yöntemiyle belirlendi. Yaşlanma modeli oluşturulan hücreler,

ışık mikroskopuyla hücresel düzeyde analizi çift kör olarak bağımsız iki araştırmacı ile x40 büyütmede rastgele seçilen on alanda değerlendirilme yapılarak analiz edildi.

➤ MMP-2

MMP-2 immunositokimyasal yöntem ile değerlendirilmesinde, 50 Hz manyetik alanın uygulandığı grupta MMP-2 immunopozitifliğinin manyetik alan uygulanmayan kontrol gruba kıyasla belirgin olarak arttığı gözlemlendi ($p=0.02$). 1 mM, 2 mM ve 10 mM metformin konsantrasyonlarının uygulandığı 50 Hz EMA gruplarda metformin uygulanmayan 50 Hz EMA kontrol grubuna kıyasla MMP-2 immunopozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme gözlemlendi (Şekil 4-3).



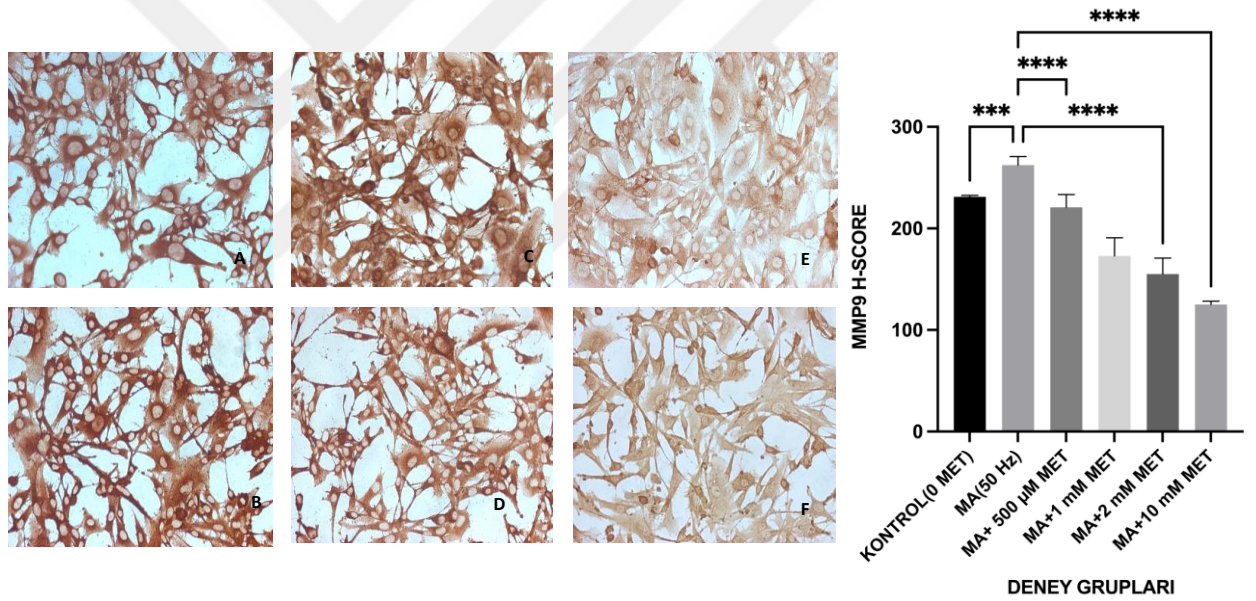
Şekil 4-3: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası ICC yöntemi ile deney gruplarına ait MMP2 protein ekspresyonunun H-score analizi ile (%) istatistiksel değerlendirilmesi

(A) kontrol grup (0 MET), (B) MA (50 Hz), (C) MA+500 µM MET, (D) MA+1 mM MET, (E) MA+2 mM MET, (F) MA+10 mM MET (* $p=0.02$, ** $p<0.0010$, *** $p>0.0001$). İmmün Boyama: Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi, poliklonal MMP2 antikoru, büyütme:40X

➤ MMP-9:

MMP-9 protein ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği manyetik alanın (50 Hz) uygulandığı NIH/3T3 hücre grubu da MMP-9 immunopozitifliğinin manyetik alan uygulanmayan kontrol gruba kıyasla istatistiksel olarak arttığı gözlemlendi ($p=0.0009$) (Şekil 4-4).

1mM, 2mM ve 10 mM metformin konsantrasyonlarının uygulandığı deney gruplarında MMP-9 immunopozitifliğinin kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4-4). NIH/3T3 hücreleri deney gruplarına ait MMP-9 immun pozitif h-score sonuçlarının (%) istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda 1mM, 2mM ve 10 mM metformin uygulanan gruplarda 50 Hz MA grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu saptandı ($p < 0.001$) (Şekil 4-4).



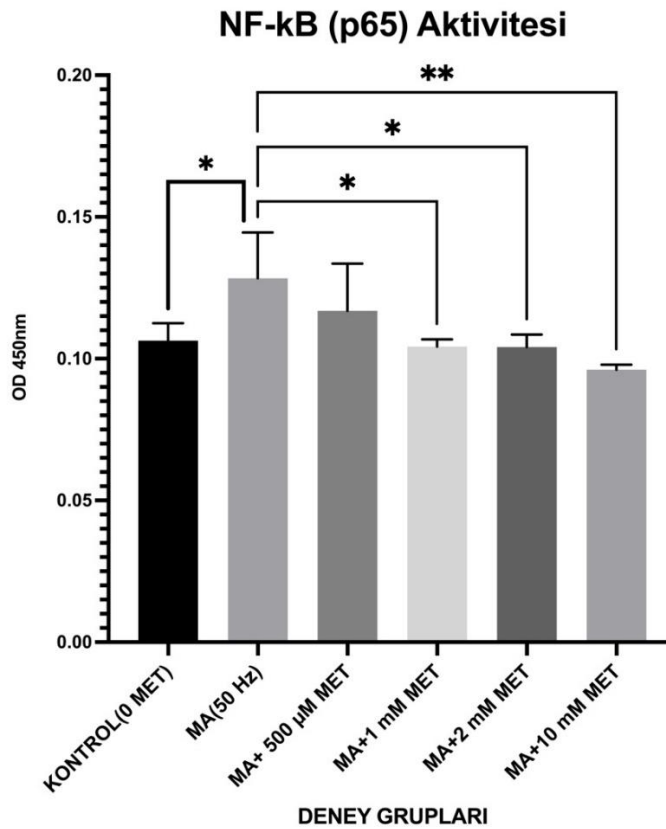
Şekil 4-4: İn vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinin MA ve metformin uygulaması sonrası ICC yöntemi ile deney gruplarına ait MMP9 protein ekspresyonunun H-score analizi ile (%) istatistiksel değerlendirilmesi

(A) kontrol grup (0 MET), (B) MA (50 Hz), (C) MA+500 µM MET, (D) MA+1 mM MET, (E) MA+2 mM MET, (F) MA+10 mM MET (x40) (**p=0.0009, ****p<0.0001).

İmmün Boyama: Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi, poliklonal MMP-2 antikoru, büyüme:40X

4.4. METFORMİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN NF-κB (p65) AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ELISA İLE BELİRLENMESİ

Yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 hücrelerinde (50 Hz) EMA'nın NF-κB (p65) aktivitesi üzerine etkisi ELISA testi ile belirlendi (Şekil 4-5). Çok düşük frekanstaki (50 Hz) EMA'nın NIH/3T3 fibroblastlarında NF-κB (p65) aktivitesini manyetik alan uygulanmayan kontrol gruba kıyasla anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlendi ($p<0.05$). 24 saat süreyle 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konsantrasyonlarının uygulandığı 1 saat süreyle 50 Hz frekansta EMA uygulanan deney gruplarında metformin uygulanmayan 50 Hz EMA gruba kıyasla anlamlı olarak NF-κB (p65) aktivitesinde azalma tespit edildi ($p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.01$).



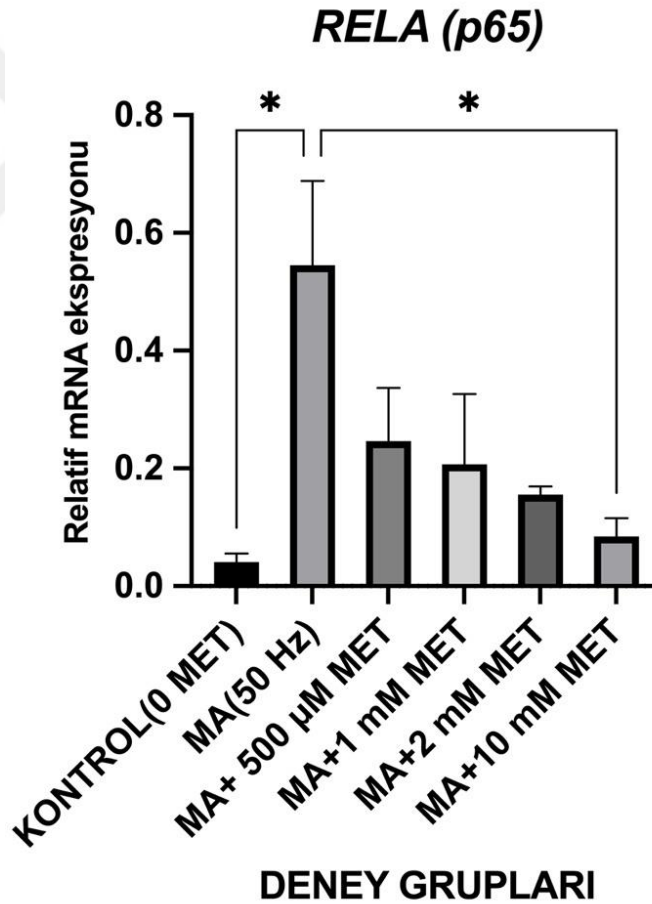
Şekil 4-5: Deney gruplarının NF-κB (p65) aktivitesi sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

4.5. METFORMİN ve ELEKTROMANYETİK ALANIN RELA (p65), MMP2, MMP9 ve CDH1 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN QRT-PCR İLE BELİRLENMESİ

4.5.1 RELA(p65) mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Yaşlanma ve kanser sürecinde merkezi rol oynayan ve çalışmamızda kullandığımız genlerden *RELA* (p65) tüm deney gruplarında mRNA ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, 50 Hz EMA uygulanan grubun *RELA* (p65) mRNA ekspresyon seviyelerinin EMA uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığını tespit ettik ($p < 0.05$).

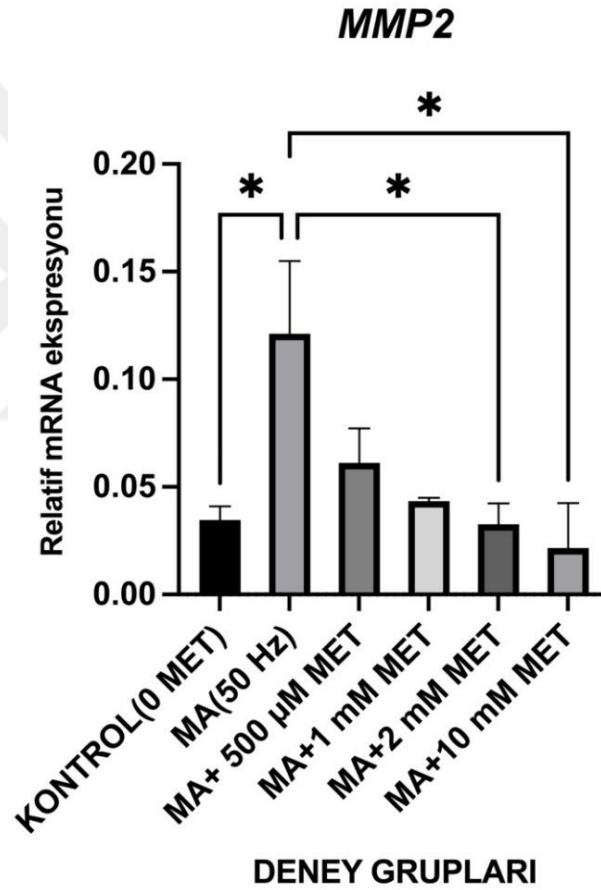
10 mM metformin konsantrasyonunun uygulandığı 50 Hz EMA uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla *RELA* (p65) mRNA ekspresyon düzeylerinin azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait RELA(p65) relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi

4.5.1. *MMP2* mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Kanserogenez yolağındaki önemli genlerden *MMP2* mRNA ekspresyon düzeyleri 50 Hz EMA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). Metforminin, 50 Hz EMA'nın etkisiyle artan *MMP2* ekspresyon düzeyleri üzerine etkisini tespit etmek için uygulanan 500 μ M, 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konstrasyonları kullanıldı. 50 Hz 5 mT EMA grubunda, 2mM ve 10 mM metformin dozlarının 24 saat muamele sonucunda *MMP2* mRNA ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($P<0,05$) (Şekil 4-7).

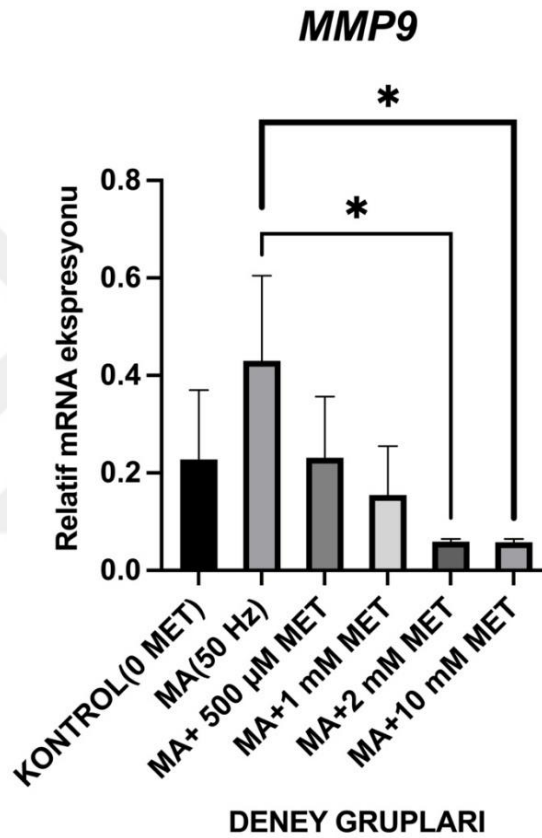


Şekil 4-7: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait *MMP2* relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi

4.5.2. *MMP9* mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Kanserogenezin metastaz yolağındaki önemli genlerden biri olan *MMP9* mRNA ekspresyon düzeyleri 50 Hz EMA grubunda kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir.

Metforminin, 50 Hz EMA'nın etkisiyle artan *MMP9* ekspresyon düzeyleri üzerine etkisini tespit etmek için 500µM, 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konstrasyonları kullanıldı. 50 Hz EMA grubunda, 2mM ve 10 mM uygulanan metformin dozlarının 24 saat muamele sonucunda *MMP9* mRNA ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı belirlendi ($P<0,05$) (Şekil 4-8).

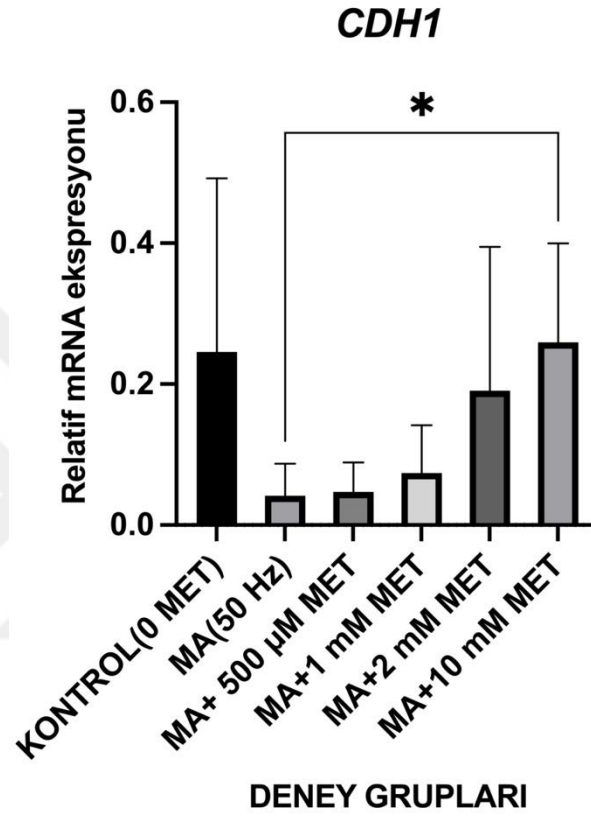


Şekil 4-8: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait *MMP9* relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi

4.5.3. *CDH1* mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Kanserogenez yolağındaki önemli genlerden biri olan *CDH1* ekspresyon düzeyleri 50 Hz EMA grubunda kontrol grubuna göre artış gözlemlendi. Metforminin, 50 Hz EMA'nın etkisiyle azalan *CDH1* ekspresyon düzeyleri üzerine etkisini tespit etmek için 500µM, 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konstrasyonları kullanıldı. 50 Hz EMA

grubunda, 10 mM uygulanan metformin konsantrasyonunun 24 saat muamele sonucunda *CDH1* mRNA ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: NIH/3T3 fibroblast hücreleri deney gruplarına ait *CDH1* relatif mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA

Yaşlanma ve yaşlanma ile ilişkili kanser gibi hastalıklardaki artışın, oksidatif stres ve genotoksik stres gibi homeostazdaki çeşitli dengesizliklere bağlı olarak hücre fonksiyonlarında azalma ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yaşlanmayla artan kanser sürecinde DNA hasar tamir mekanizmasında yetersizlik, DNA hasarının hatalı onarımı, immun sistemin yetersizliği kanserogenezi tetikleyen mekanizmalar arasında yer almaktadır (16-18). Bu nedenle, oksidatif veya genotoksik hasarlar sonucu mutasyonların ve hasarlı hücrelerin birikimi kansere yol açmaktadır. Özetle; yaşlanma ve yaşlanmayla artan kanser arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır (40).

Kanserojen olarak tanımladığımız faktörlerden ekzojen faktörler arasında yer alan fiziksel kanserojen ajanlar geniş bir dağılıma sahiptir. Farklı türlerde elektromanyetik radyasyonlar, düşük ve yüksek sıcaklıklar fiziksel ajanlar içerisinde yer almaktadır (41,42). Son zamanlarda, bu faktörler arasında yer alan mobil telefonların, bilgisayarların ve yüksek gerilim hatlarının etrafında oluşan düşük frekanslı 50 Hz elektromanyetik alana yaşamda sürekli maruz kalınması nedeniyle erken yaşlanma ve kanser üzerine etkisi ile ilişkili araştırmalar üzerine yoğunlaşmıştır (40,41).

Elektromanyetik alanla yapılan *in vitro* çalışmalar, EMA'nın oksidatif strese bağlı olarak yaşlanma ve kanserogeneze etkili mekanizmalar olan, DNA hasarı ve hasar onarım mekanizmasındaki yetersizliğe neden olduğu gösterilmiştir (2,3). Bu bulgular 50-60 Hz civarındaki EMA'nın, artan DNA hasarı ve hücre proliferasyon ile kanserogeneze sürecinden sorumlu olduğunu göstermektedir (60).

Yapılan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar hem yaşlanmanın hem de kanserin anahtar mekanizmalarının reaktif oksijen türlerinin neden olduğu endojen stres kaynaklı DNA hasarı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (40). Ayrıca, 50-60 Hz frekanstaki EMA'nın DNA'da çift zincir kırıklarına, hücre döngüsünün aktivasyonuna, kromozomal instabilite ve apoptoza neden olduğu da bildirilmiştir. Örneğin, 60 Hz'lik 14 μ T EMA'nın fare testiküler germ hücrelerinde apoptozu indüklediği, 50 Hz'lik 100 μ T EMA insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde G1'deki hücre döngüsünü durdurduğu ve 60 Hz'lik 1 mT EMA insan fibroblastlarında kromozomal instabiliteyi indüklediği ve 60 Hz'lik 5 mT EMA'nın, insan HL-60 promiyelositik lösemi hücrelerinde ROT oluşumu yoluyla hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (67, 170, 171). Bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü'nün

yan kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), çok düşük frekanstaki EMA'yı 2002 yılında grup 2B kanserojen olarak sınıflandırdı (62).

Anti-diyabetik bir ilaç metformin, T2DM hastaların tedavisinde tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmakta ve anti-kanser ajan olma potansiyeline dair araştırmalar da yoğun olarak devam etmektedir. Metformin ile yapılan birkaç epidemiyolojik çalışma, prostat, kolorektal ve meme dokusu kaynaklı çeşitli tümörlerde anti-proliferatif ve antitümör etkisini göstermektedir (6).

Son yıllarda, metformin tedavisinin kanserdeki çeşitli moleküler yollardaki rolünü, kanser gelişimi ve bu sürecin ilerlemesini geciktirdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (172). Bununla birlikte metforminin etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen, kanser hücresinin proliferasyonunu ve tümör oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Ayrıca metforminin, 50 Hz EMA'nın indüklediği kanserogenez sürecinin de önemli yolları olan proliferasyon ve metastaz üzerine olan etkilerini ortadan kaldıran mekanizmalarını ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak çok düşük frekansta EMA ile ilgili olan epidemiyolojik çalışmalar, hem normal hem de kanser hücrelerinde artan proliferasyon gözlemlendiğinden, bu gözlem, 50-60 Hz civarındaki EMA'nın tümör oluşumunu hızlandırdığını ve hücre proliferasyonunu aktive ederek etkisini gösterebileceği tezini öne sürmektedir (173-175).

Bu çalışma, metformin uygulamasının, 50 Hz EMA'nın hücre davranışları üzerine olan olası etkileri üzerine moleküler mekanizmalarının araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışma kapsamında; yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 fare fibroblast hücreleri kullanılarak 50 Hz EMA ve metforminin yaşlanma ve kanserogenez sürecinin önemli yolları olan proliferasyon ve metastaz üzerine etkisini incelendi.

Çalışmada öncelikle 50 Hz frekanstaki EMA ve metforminin hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla BrdU proliferasyon testi ve canlılık tayini için Tripan mavisi testi yapıldı. 50 Hz EMA grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; 50 Hz EMA grubunda manyetik alanın NIH/3T3 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı olarak artırdığı tespit edildi ($p < 0.001$). Metforminin 50 Hz EMA'nın meydana getirdiği hücre proliferasyondaki indükleyici etkiyi ortadan kaldırıp kaldırmadığını göstermek amacıyla 500µM, 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konsantrasyonları kullanıldı. 50 Hz EMA grubunda 1mM, 2mM ve 10 mM metformin konsantrasyonlarının 24 saat muamele sonucunda hücre proliferasyonu anlamlı olarak

azalttığı tespit edildi (sırasıyla; $p < 0.001$, $p = 0.0009$, $p < 0.001$). Metforminin 50 Hz EMA'nın indüklediği in vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 fibroblastlarında artan proliferasyon ve canlılık üzerindeki etkiyi düşürdüğü tespit edildi. Çok düşük frekanstaki manyetik alanın etkisini araştıran deneysel çalışmalar 0,5–5 mT EMA'nın insan epidermal kök hücrelerinde, prostat kanseri hücre hatlarında, HL-60 lösemi hücrelerinde, sıçan-1 fibroblastlarında ve WI-38 diploid fibroblastlarda hücre proliferasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir (176-178).

Artan proliferasyon kanserogenez sürecini etkileyen en önemli unsurdur. Ancak 50 Hz EMA'nın hücre proliferasyonu nasıl indüklediği ve metforminin bunu nasıl düzelttiğini açıklayan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Epidemiyolojik çalışmalar, hem normal hem de kanser hücrelerinde artan proliferasyon gözlemlendiğinden, bu gözlem, 50-60 Hz civarındaki EMA'nın tümör oluşumunu hızlandırdığını ve hücre proliferasyonunu aktive ederek yara iyileşmesine yardımcı olabileceği bulgusunu öne sürmektedir (179-181).

Yaşlanmada karsinogenez sürecine giden yolda etkili yollardan biri de NF- κ B/IKK'dır. Hücre büyümesi, proliferasyon, differansiyasyon, canlılık ve apoptoz gibi çok sayıda biyolojik süreçle ilgili ve bu süreçleri düzenleyen merkezi bir role sahiptir (9-11). Karsinogenez sürecinde etkili olan transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin hedef genleri arasında *CyclinD1*, *CDK2* ve *c-Myc* bulunurken, büyüme sinyalleri GM-CSF ve interlökin-6 (IL-6)'yı da içerir. NF- κ B'nin inhibisyonu yoluyla kanser gelişiminin inhibisyonu, meme, akciğer, melanom, kolon ve B-hücreli lenfoma bu kanser türlerinde gösterilmiştir (14). NF- κ B aktivasyonu, doku invazyonunu ve metastatik potansiyeli temsil eden bir değişiklik olan epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkilidir (92). EMT, durağan tümör hücrelerinin göç etmesi, invazyon ve diğer organlara metastaz yapması için anahtar bir rol oynar (182). E-kaderin, epitel hücrelerinin en önemli belirtecidir ve EMT inhibisyonunu belirlemek için yaygın olarak kullanılır (183). Bununla birlikte EMT'nin aktivasyonunda *MMP2*, *MMP9*, *CDH1*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *Katepsin B* gibi genlerin ekspresyonu NF- κ B aktivitesi aracılığıyla gerçekleşir (93). Wirth ve arkadaşları, meme kanseri progresyonunda NF- κ B'yi EMT'nin merkezi bir mediyatörü olarak tanımladılar (92). Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada 50 Hz EMA ile metforminin NF- κ B (p65) aktivasyonu üzerine tek tek ve kombine etkisi, in vitro yaşlı NIH/3T3 fibroblast hücrelerinde ELİSA testi kullanılarak belirlendi. NF- κ B (p65) aktivasyonu 50 Hz EMA uygulaması ile artarken; 24 saatlik metformin uygulamasıyla doza bağımlı (1,

2,10 mM MET) olarak azaldığı tespit edildi. Wolf ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada; 50 Hz EMA'nın HL-60, Rat-1 fibroblast ve WI diploit fibroblast hücrelerinde NF- κ B(p65) aktivitesi artırdığını tespit ettiler (78). Bu bulgular bu tez çalışmasını destekler niteliktedir.

Pleotropik transkripsiyon faktörü olan NF- κ B tarafından düzenlenen genler arasında olan E-kaderin proteini kodlayan *CDH1*, metastazda etkin bir faktördür. E-kaderin epitel hücreleri tarafından eksprese edilir ve bu EMT'nin önemli bir belirteçidir. Chua ve arkadaşları meme epitel hücrelerinde (MCF10A) yaptıkları çalışmada epitelyal hücrelerde NF- κ B ile uyarılan değişiklikler arasında EMT'ye benzer değişimler tespit ettiler. MCF10A hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunda spesifik bir azalma ve vimentin ekspresyonunda bir artış gözlemlenildi. Dolayısıyla NF- κ B, E-kaderin ekspresyonunu baskılayarak meme epitel hücrelerinin epitelyalden mezenkimal geçişini iyileştirir (94).

Bu çalışmada; NF- κ B'nin hedef genleri arasında yer alan ve kanserogeneizde EMT sürecinde rol alan E-kaderin proteini kodlayan *CDH1* gen ekspresyon seviyeleri QRT-PCR yöntemiyle tespit edildi. Ekspresyon sonuçlarına göre; 50 Hz EMA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla ekspresyon düzeylerinde azalma gözlemlendi. 10 mM konsantrasyondaki metforminin ise 50 Hz EMA uygulaması ile azalan *CDH1* ekspresyonu üzerinde indükleyici etki gösterdiği tespit edildi. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda da metforminin servikal karsinom, tiroid kanseri ve melanom gibi çeşitli tümörlerde EMT'yi etkileyerek migrasyon ve invazyon engellediği gösterilmiştir (184-187).

Bu çalışmada; NF- κ B'nin hedef genleri arasında yer alan ve kanser gelişiminin önemli aşamaları olan metastaz ve invazyon yolağında rol oynayan MMP-2 ve MMP-9 protein ekspresyon seviyeleri ICC yöntemiyle, gen ekspresyon düzeyleri ise QRT-PCR yöntemi ile tespit edildi. ICC sonuçlarına göre; 50 Hz EMA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla önemli oranda ($p < 0.05$) ekspresyon düzeylerinde önemli oranda artış gözlemlendi. Metforminin ise doza bağımlı olarak 50 Hz EMA aracılı artan MMP2 ve MMP9 protein ve gen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği tespit edildi. Metforminin, in vitro koşullarda insan fibrosarkoma HT-1080 hücre hattında invaziv ve metastatik özellik gösteren tümör hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese olan MMP-9 ve MMP-2 proteinini baskıladığı gösterildi. Böylece kanserogenezin, invazyon ve metastaz

aşamalarında potansiyel olarak işlev gören proteinlerin ekspresyonunu inhibe edebilmektedir (166).

Bu çalışma; topikal olarak uygulanan metforminin, çok düşük frekanstaki 50 Hz EMA'ya maruz bırakılan *in vitro* yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 fibroblast hücrelerinde kanserogenez sürecinde önemli belirteçler olan NF- κ B aktivitesine bağlı olarak *MMP2*, *MMP9*, *RELA* ve *CDH1* ekspresyonunun ne ölçüde değiştiğine dair literatürdeki ilk çalışmadır.

Sonuç olarak,

In vitro yaşlanma modeli oluşturulan NIH/3T3 fibroblast hücrelerinde 50 Hz EMA'nın, NF- κ B aktivasyonu aracılığıyla proliferatif ve kanseri indükleyici etki gösterdiği, metforminin NF- κ B transkripsiyon faktörünün inhibisyonu aracılığıyla potansiyel anti-proliferatif ve anti-kanser etki göstererek kanserogeneze karşı koruyucu etki gösterdiği sonucuna varıldı. Bu açıdan, metformin 50 Hz 5mT EMA'nın *in vitro* fibroblast yaşlanma modelinde indüklenen kanser gelişimi üzerine koruyucu etkilere sahip olduğu gözlemiyle tutarlıdır.

Çok düşük frekansta elektromanyetik alanın etki mekanizmasının moleküler düzeyde olmak üzere maruziyetinin farklı frekans ve uygulama süreleri ile *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda değerlendirileceği ve bu konuda metforminin koruyucu etkileri açısından daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Şeker S, Çerezci O. *Radyasyon Kuşatması*. İstanbul: Boğaziçi Üniversitesi Yayınevi-matbaası; 2000.
2. Guler G, Ozgur E, Keles H, Tomruk A, Vural SA, Seyhan N. Apoptosis resulted from radiofrequency radiation exposure of pregnant rabbits and their infants. *Bull Vet Inst Pulawy* 2011; **55**: 127-134.
3. Salah MB, Abdelmelek H, Abderraba M. Effects of olive leave extract on metabolic disorders and oxidative stress induced by 2.45 GHz WIFI signals. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; **36**(3):826-34.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646-74.
5. Löscher W, Liburdy RP. Animal and cellular studies on carcinogenic effects of low frequency (50/60-Hz) magnetic fields. *Mutat Res*. 1998; **410**(2):185-220.
6. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J* 2015; **471**(3): 307-22.
7. Bayraktar S, Hernandez-Aya LF, Lei X, Meric-Bernstam F, Litton JK, Hsu L ve ark. Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer. *Cancer* 2012; **118**(5): 1202-11.
8. Bodmer M, Meier C, Krähenbühl S, Jick SS, Meier CR. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care* 2010; **33**(6): 1304-8.
9. Biswas DK, Dai SC, Cruz A, Weiser B, Graner E, Pardee AB. The nuclear factor kappa B (NF-kappa B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**(18):10386-91.
10. Wu JT, Kral JG. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res* 2005; **123**(1):158-69.
11. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(1):49-62.
12. Bassères DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 2006; **25**(51):6817-30.

13. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 2007; **26**(5): 711-724.
14. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;**18**(1):19-26.
15. Kanigur Sultuybek G, Soydas T, Yenmis G. NF-κB as the mediator of metformin's effect on ageing and ageing-related diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2019; **46**(5): 413-422.
16. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; **292**: R18–R36.
17. Marnett LJ, Plataras JP. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 2001;**17**: 214–221.
18. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998; **78**: 547–581.
19. Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life.* 2007; **59**(4-5): 249-54.
20. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956; **11**: 298 – 300.
21. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006; **72**: 1493–1505.
22. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao J.-H, Xue X, Okumura K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappa B and JNK. *Cell Death Differ.* 2006; **13**: 730–737.
23. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998; **78**: 547–581.
24. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad. Biol. Med.* 2002; **33**: 575–586.
25. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med.* 2013; **60**: 1-4.
26. Birch- Machin M, Bowman A. Oxidative stress and ageing. *Br J Dermatol.* 2016; **175**: 26-29.

27. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermato-endocrinology*. 2012; **4**: 259-270.
28. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; **115**: 2625-2632.
29. Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*. 2005; **120**: 497–512.
30. Vijg J, Busuttil RA, Bahar R, Dollé ME. Aging and genome maintenance. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; **1055** :35-47.
31. Schumacher B, Garinis GA, Hoeijmakers JH. Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet*. 2008; **24**(2): 77-85.
32. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004; **73**: 39-85.
33. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Differ*. 2006; **13**: 773–784.
34. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; **7**(7): 517-28.
35. Habraken Y, Piette J. NF- κ B activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol*. 2006; **72**: 1132–1141.
36. Wu ZH, Miyamoto S. Many faces of NF- κ B signaling induced by genotoxic stress. *J. Mol. Med*. 2007; **85**: 1187–1202.
37. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR ve ark. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009;**11**(8): 973-979.
38. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B in Aging and Disease. *Aging Dis*. 2011; **2**(6): 449-465.
39. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D ve ark. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; **13**: 757-772.
40. Andressoo JO, Hoeijmakers JH. Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutat Res*. 2005; **577**(1-2): 179-94.

41. Camargo JLV, Salvadori DMF, Rocha NS, Baebisan LF, Ribeiro LR. The detection of chemical carcinogens in an alternative medium-term bioassay. *J Braz Ass Advan Science*. 1999; 51: 22-26.
42. Gutiérrez JB, Salsamendi AL. Fundamentos de ciência toxicológica. Madrid: Diaz de Santos; 2001. p. 155-177.
43. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers--a review. *Cancer Detect Prev*. 2000;**24**(1):1-12.
44. Dewhirst MW, Lora-Michiels M, Viglianti BL, Dewey WC, Repacholi M. Carcinogenic effects of hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 2003;**19**(3):236-51.
45. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2003;**417**(1):3-11.
46. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res*. 2005;**591**(1-2):110-22.
47. Lutz WK. Differences in individual susceptibility to toxic effects of chemicals determine the dose-response relationship and consequences of setting exposure standards. *Toxicol Lett*. 2002;**126**(3):155-8.
48. Weisburger JH. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. *Mutat Res*. 1999;**437**(2):105-12.
49. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P LF, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc*. 2007;**79**(4):593-616.
50. Subhayan D, Moumita K, Bikash CJ, Mahitosh M. Causes of cancer: physical, chemical, biological carcinogens, and viruses. İçinde Kundu S, Reis R, editor. *Biomaterials for 3D Tumor Modeling*. Netherlands : Elsevier; 2020. pp. 607-641.
51. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021;**71**(1):7-33.
52. Aunan JR, Cho WC, Søreide K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging Dis*. 2017;**8**(5):628-642.
53. Moustafa YM, Moustafa RM, Belacy A, Abou-El-Ela SH, Ali FM. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid

- peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;**26**(4):605-8.
54. Lai H, Singh NP. Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics.* 1997;**18**(6):446-54.
 55. Robison JG, Pendleton AR, Monson KO, Murray BK, O'Neill KL. Decreased DNA repair rates and protection from heat induced apoptosis mediated by electromagnetic field exposure. *Bioelectromagnetics.* 2002;**23**(2):106-12.
 56. Garaj-Vrhovac V, Fucić A, Horvat D. The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vitro. *Mutat Res.* 1992;**281**(3):181-6.
 57. Maes A, Verschaeve L, Arroyo A, De Wagter C, Vercruyssen L. In vitro cytogenetic effects of 2450 MHz waves on human peripheral blood lymphocytes. *Bioelectromagnetics.* 1993;**14**(6):495-501.
 58. Lary JM, Conover DL, Foley ED, Hanser PL. Teratogenic effects of 27.12 MHz radiofrequency radiation in rats. *Teratology.* 1982;**26**(3):299-309.
 59. Zmyślony M, Jajte JM. Udział wolnych rodników w mechanizmie biologicznego działania słabych, stałych i sieciowych pól magnetycznych [The role of free radicals in mechanisms of biological function exposed to weak, constant and net magnetic fields]. *Med Pr.* 1998;**49**(2):177-86.
 60. Heath CW Jr. Electromagnetic field exposure and cancer: a review of epidemiologic evidence. *CA Cancer J Clin.* 1996;**46**(1):29-44.
 61. Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol.* 1979;**109**(3):273-84.
 62. IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. June 2002. Erişim 20.05.2021, <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono80-1.pdf>
 63. Yokuş, Mete N. Oksidatif DNA hasarı. *Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi.* 2003; **7**(2): 51-64
 64. Jajte J, Zmyślony M, Palus J, Dziubałtowska E, Rajkowska E. Protective effect of melatonin against in vitro iron ions and 7 mT 50 Hz magnetic field-induced DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat Res.* 2001;**483**(1-2):57-64.

65. Ivancsits S, Diem E, Jahn O, Rüdiger HW. Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose-dependent way. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003;**76**(6):431-6.
66. Yokus B, Cakir DU, Akdag MZ, Sert C, Mete N. Oxidative DNA damage in rats exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *Free Radic Res*. 2005;**39**(3):317-23.
67. Winker R, Ivancsits S, Pilger A, Adlkofer F, Rüdiger HW. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res*. 2005;**585**(1-2):43-9.
68. Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M ve ark. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2005;**1743**(1-2):120-9.
69. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991; **64**(2): 235-248.
70. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;**396**(6712):643-9.
71. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*. 2000;**21**(3):379-85.
72. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *EXS*. 2006;(96):321-49.
73. Rieger PT. Cancer biology and implications for practice. *Clin J Oncol Nurs*. 2006;**10**(4):457-60.
74. Paşalak Şİ, Seven M. Onkolojide genetik gelişmeler ve hemşirenin rollerine etkisi. *Koç Üniversitesi Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*. 2017; **14**(3): 212-217.
75. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*. 2002;**347**(20):1593-603.
76. Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;**2**(2):a001107.
77. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;**358**(5):502-11.
78. Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;**21**(21):3475-95.

79. Beamer LC, Linder L, Wu B, Eggert J. The impact of genomics on oncology nursing. *Nurs Clin North Am*. 2013; **48**(4): 585-626.
80. Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016;**5**(2):15.
81. Mulero MC, Wang VY, Huxford T, Ghosh G. Genome reading by the NF- κ B transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 2019; **47**(19): 9967-9989.
82. Sultuybek GK, Soydas T, Yaprak Sarac E, Yaprak Bayrak B. Current Mechanisms and Strategies for the Therapeutic Manipulation of NF- κ B in Cell Aging and Breast Cancer. İçinde Watanabe HS, editor. *Horizons in Cancer Research*. New York: Nova Science Publisher; 2021. pp.252-5
83. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR ve ark. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;**162**(5):1877-83.
84. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*. 1999;**45**(1):7-17.
85. Dong QG, Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Peng B, Wu T ve ark. The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002;**21**(42):6510-9.
86. Berenson JR, Ma HM, Vescio R. The role of nuclear factor-kappaB in the biology and treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol*. 2001;**28**(6):626-33.
87. Izzo JG, Malhotra U, Wu TT, Ensor J, Luthra R, Lee JH ve ark. Association of activated transcription factor nuclear factor kappaB with chemoradiation resistance and poor outcome in esophageal carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;**24**(5):748-54.
88. Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Lee JH, Jang JS ve ark. Clinicopathologic significance of expression of nuclear factor- κ B RelA and its target gene products in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2012;**18**(34):4744-50.
89. Darb-Esfahani S, Sinn BV, Weichert W, Budczies J, Lehmann A, Noske A ve ark. Expression of classical NF-kappaB pathway effectors in human ovarian carcinoma. *Histopathology*. 2010;**56**(6):727-39.

90. Besli N, Yenmis G, Tuncdemir M, Sarac EY, Doğan S, Solakoğlu S ve ark. Metformin suppresses the proliferation and invasion through NF-kB and MMPs in MCF-7 cell line. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2019; **45**(3): 295–304.
91. Liu Y, Yin T, Feng Y, Cona MM, Huang G, Liu J ve ark. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg*. 2015;**5**(5):708-29.
92. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H ve ark. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2004;**114**(4):569-81.
93. Bassères DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. 2006; **25**(51):6817-30.
94. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*. 2007;**26**(5):711-24.
95. Wang X, Belguise K, Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, Galtier F ve ark. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol*. 2007;**9**(4):470-8.
96. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; **357**(9255):539-45.
97. Chaturvedi S, Hass R. Extracellular signals in young and aging breast epithelial cells and possible connections to age-associated breast cancer development. *Mech Ageing Dev*. 2011;**132**(5):213-9.
98. Cichon MA, Degnim AC, Visscher DW, Radisky DC. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;**15**(4):389-97.
99. Schedin P, Keely PJ. Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;**3**(1):a003228.
100. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;**147**:1-73.

101. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999;**13**(8):781-92.
102. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;**2**(3):161-74.
103. Goździalska A, Wojas-Pelc A, Drąg J, Brzewski P, Jaśkiewicz J, Pastuszczyk M. Expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in basal-cell carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2016;**43**(10):1027-33.
104. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;**292**(1):R18-36.
105. Marnett LJ, Plataras JP. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*. 2001;**17**(4):214-21.
106. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998;**78**(2):547-81.
107. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab*. 2016;**23**(6):1060-1065.
108. Formoso G, De Filippis EA, Michetti N, Di Fulvio P, Pandolfi A, Bucciarelli T ve ark. Decreased in vivo oxidative stress and decreased platelet activation following metformin treatment in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;**24**(3):231-7.
109. Garg G, Singh S, Singh AK, Rizvi SI. Metformin Alleviates Altered Erythrocyte Redox Status During Aging in Rats. *Rejuvenation Res*. 2017;**20**(1):15-24.
110. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, Mohan M, Forteath C, Beall C ve ark. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circ Res*. 2016;**119**(5):652-65.
111. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M ve ark. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 2013;**4**:2192.
112. Lee YS, Doonan BB, Wu JM, Hsieh TC. Combined metformin and resveratrol confers protection against UVC-induced DNA damage in A549 lung cancer cells via modulation of cell cycle checkpoints and DNA repair. *Oncol Rep*. 2016;**35**(6):3735-41.

113. Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardès-Albert M, Jore D, Legrand A ve ark. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*. 2003;**52**(5):586-9.
114. Onaran I, Guven GS, Ozdaş SB, Kanigur G, Vehid S. Metformin does not prevent DNA damage in lymphocytes despite its antioxidant properties against cumene hydroperoxide-induced oxidative stress. *Mutat Res*. 2006;**611**(1-2):1-8.
115. Kanigür-Sultuybek G, Ozdas SB, Curgunlu A, Tezcan V, Onaran I. Does metformin prevent short-term oxidant-induced dna damage? In vitro study on lymphocytes from aged subjects. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2007;**18**(2):129-40.
116. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA ve ark. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 2014;**510**(7506):542-6.
117. Garimella S, Seshayamma V, Rao HJ, Kumar S, Kumar U, Saheb SH. Effect of metformin on lipid profile of type II diabetes. *Int. J. Intg. Med. Sci*. 2016;**3**:449–453.
118. Piskovatska V, Stefanyshyn N, Storey KB, Vaiserman AM, Lushchak O. Metformin as a geroprotector: experimental and clinical evidence. *Biogerontology*. 2019;**20**(1):33-48.
119. Saisho Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;**15**(3):196-205.
120. Valencia WM, Palacio A, Tamariz L, Florez H. Metformin and ageing: improving ageing outcomes beyond glycaemic control. *Diabetologia*. 2017;**60**(9):1630-1638.
121. Campbell JM, Bellman SM, Stephenson MD, Lisy K. Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2017;**40**:31-44.

122. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE ve ark. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*. 2013;**12**(3):489-98.
123. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*. 1999;**45**(1):7-17.
124. Dong QG, Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Peng B, Wu T ve ark. The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002;**21**(42):6510-9.
125. Berenson JR, Ma HM, Vescio R. The role of nuclear factor-kappaB in the biology and treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol*. 2001;**28**(6):626-33.
126. Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev*. 2007;**21**(24):3244-57.
127. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP ve ark. NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest*. 2012;**122**(7):2601-12.
128. Soydas T, Yaprak Sarac E, Cinar S, Dogan S, Solakoglu S, Tuncdemir M ve ark. The protective effects of metformin in an in vitro model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions. *J Physiol Biochem*. 2018;**74**(2):273-281.
129. Dasu MR, Barrow RE, Spies M, Herndon DN. Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts. *Burns*. 2003;**29**(6):527-31.
130. Hong MJ, Ko EB, Park SK, Chang MS. Inhibitory effect of Astragalus membranaceus root on matrix metalloproteinase-1 collagenase expression and procollagen destruction in ultraviolet B-irradiated human dermal fibroblasts by suppressing nuclear factor kappa-B activity. *J Pharm Pharmacol*. 2013;**65**(1):142-8.
131. Soydas T, Sayitoglu M, Sarac EY, Cinar S, Solakoglu S, Tiryaki T, Sultuybek GK. Metformin reverses the effects of high glucose on human dermal fibroblasts of aged skin via downregulating RELA/p65 expression. *J Physiol Biochem*. 2021.

132. de Kreutzenberg SV, Ceolotto G, Cattelan A, Pagnin E, Mazzucato M, Garagnani P ve ark. Metformin improves putative longevity effectors in peripheral mononuclear cells from subjects with prediabetes. A randomized controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;**25**(7):686-93.
133. Wang YW, He SJ, Feng X, Cheng J, Luo YT, Tian L ve ark. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther*. 2017;**11**:2421-2429.
134. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;**32**(9):1620-5.
135. Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM ve ark. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;**27**(20):3297-302.
136. Campagnoli C, Pasanisi P, Abbà C, Ambroggio S, Biglia N, Brucato T ve ark. Effect of different doses of metformin on serum testosterone and insulin in non-diabetic women with breast cancer: a randomized study. *Clin Breast Cancer*. 2012;**12**(3):175-82.
137. Tseng CH. Metformin significantly reduces incident prostate cancer risk in Taiwanese men with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Cancer*. 2014;**50**(16):2831-7.
138. Sehdev A, Shih YC, Vekhter B, Bissonnette MB, Olopade OI, Polite BN. Metformin for primary colorectal cancer prevention in patients with diabetes: a case-control study in a US population. *Cancer*. 2015;**121**(7):1071-8.
139. Hardefeldt PJ, Edirimanne S, Eslick GD. Diabetes increases the risk of breast cancer: a meta-analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2012;**19**(6):793-803.
140. Bodmer M, Meier C, Krähenbühl S, Jick SS, Meier CR. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care*. 2010;**33**(6):1304-8.
141. Bodmer M, Meier C, Krähenbühl S, Jick SS, Meier CR. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care*. 2010;**33**(6):1304-8.
142. Pollack MN. Insulin, insulin-like growth factors, insulin resistance, and neoplasia. *Am J Clin Nutr*. 2007;**86**(3):820-2.

143. Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2007; **67**(22):10804-12.
144. Salani B, Del Rio A, Marini C, Sambuceti G, Cordera R, Maggi D. Metformin, cancer and glucose metabolism. *Endocr Relat Cancer.* 2014;**21**(6):461-71.
145. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999;**13**(8):781-92.
146. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; **2**(3):161-74.
147. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer.* 2009;**9**:188.
148. Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncol Rep.* 2002; **9**(3):565-9.
149. Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Kletsas D, Kalofonos HP, Karamanos NK. Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2003;**104**(2):155-60.
150. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J.* 2015;**471**(3):307-22.
151. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 2005;**330**(7503):1304-5.
152. Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;**111**(29):10574-9.
153. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E ve ark. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife.* 2014;**3**:e02242.

154. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;**66**(21):10269-73.
155. Cerezo M, Tichet M, Abbe P, Ohanna M, Lehraiki A, Rouaud F ve ark. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. *Mol Cancer Ther.* 2013;**12**(8):1605-15.
156. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsiachlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* 2009;**69**(19):7507-11.
157. Johnsen M, Lund LR, Rømer J, Almholt K, Danø K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;**10**(5):667-71.
158. Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest.* 1994;**70**(2):176-82.
159. Cho HJ, Kang JH, Kwak JY, Lee TS, Lee IS, Park NG ve ark. Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms. *Carcinogenesis.* 2007; **28**(5): 1104-10.
160. Kim DS, Suh KH. Cell Cycle-Dependent Activity Change Of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase 2 In NIH 3T3 Cells. *BMB Reports.* 2001; **34**(3): 212-218.
161. Park SY, Kim JH, Lee YJ, Lee SJ, Kim Y. Surfactin suppresses TPA-induced breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9 expression. *Int J Oncol.* 2013;**42**(1):287-96.
162. Stark AM, Anuszkiewicz B, Mentlein R, Yoneda T, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Differential expression of matrix metalloproteinases in brain- and bone-seeking clones of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Neurooncol.* 2007;**81**(1):39-48.
163. Park JH, Jeong YJ, Park KK, Cho HJ, Chung IK, Min KS ve ark. Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF-kappaB and AP-1-dependent MMP-9 expression. *Mol Cells.* 2010;**29**(2):209-15.

164. Kajanne R, Miettinen P, Mehlem A, Leivonen SK, Birrer M, Foschi M ve ark. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *J Cell Physiol.* 2007;**212**(2):489-97.
165. Shin Y, Yoon SH, Choe EY, Cho SH, Woo CH, Rho JY ve ark. PMA-induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKC α -NF- κ B cascade in human lung epithelial cells. *Exp Mol Med.* 2007;**39**(1):97-105.
166. Hwang YP, Jeong HG. Metformin blocks migration and invasion of tumour cells by inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation through a calcium and protein kinase C α -dependent pathway: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced/extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1. *Br J Pharmacol.* 2010;**160**(5):1195-211.
167. Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M ve ark. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science.* 1999;**284**(5412):316-20.
168. Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. *Trends Immunol.* 2005;**26**(6):318-25.
169. Luukkonen J, Höytö A, Sokka M, Liimatainen A, Syväoja J, Juutilainen J ve ark. Modification of p21 level and cell cycle distribution by 50 Hz magnetic fields in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Radiat Biol.* 2017;**93**(2):240-248.
170. Kim YW, Kim HS, Lee JS, Kim YJ, Lee SK, Seo JN ve ark. Effects of 60 Hz 14 microT magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics.* 2009;**30**(1):66-72.
171. Ding GR, Nakahara T, Hirose H, Koyama S, Takashima Y, Miyakoshi J. Extremely low frequency magnetic fields and the promotion of H₂O₂-induced cell death in HL-60 cells. *Int J Radiat Biol.* 2004;**80**(4):317-24.
172. Saraei P, Asadi I, Kakar MA, Moradi-Kor N. The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: a comprehensive review of recent advances. *Cancer Manag Res.* 2019;**11**:3295-3313.
173. Song K, Im SH, Yoon YJ, Kim HM, Lee HJ, Park GS. A 60 Hz uniform electromagnetic field promotes human cell proliferation by decreasing intracellular reactive oxygen species levels. *PLoS One.* 2018;**13**(7):e0199753.

174. Feychting M, Ahlbom A. Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines. *Am J Epidemiol*. 1993;**138**(7):467-81.
175. Savitz DA, Wachtel H, Barnes FA, John EM, Tvrdik JG. Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic fields. *Am J Epidemiol*. 1988;**128**(1):21-38.
176. Zhang M, Li X, Bai L, Uchida K, Bai W, Wu B ve ark. Effects of low frequency electromagnetic field on proliferation of human epidermal stem cells: An in vitro study. *Bioelectromagnetics*. 2013;**34**(1):74-80.
177. Khavari B, Ahmadian S, Bolouri B. The effects Of 50 Hz, 0.6 mT extremely low frequency (ELF) electromagnetic field (EMF) on proliferation of the prostate cancer cell line, DU-145. *Clinical Biochemistry*. 2011; **44**(13): 165.
178. Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M ve ark. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2005;**1743**(1-2):120-9.
179. Costin GE, Birlea SA, Norris DA. Trends in wound repair: cellular and molecular basis of regenerative therapy using electromagnetic fields. *Curr Mol Med*. 2012;**12**(1):14-26.
180. Canè V, Botti P, Soana S. Pulsed magnetic fields improve osteoblast activity during the repair of an experimental osseous defect. *J Orthop Res*. 1993;**11**(5):664-70.
181. Ahmadian S, Zarchi SR, Bolouri B. Effects of extremely-low-frequency pulsed electromagnetic fields on collagen synthesis in rat skin. *Biotechnol Appl Biochem*. 2006;**43**(2):71-5.
182. Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*. 2017; **11**(1):28-39.
183. Lee JY, Kong G. Roles and epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors in cancer initiation and progression. *Cell Mol Life Sci*. 2016 ;**73**(24):4643-4660.
184. Trinh SX, Nguyen HT, Saimuang K, Prachayasittikul V, Chan On W. Metformin Inhibits Migration and Invasion of Cholangiocarcinoma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;**18**(2):473-477.

185. Cheng K, Hao M. Metformin Inhibits TGF- β 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition via PKM2 Relative-mTOR/p70s6k Signaling Pathway in Cervical Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2016;**17**(12):2000.
186. Han B, Cui H, Kang L, Zhang X, Jin Z, Lu L ve ark. Metformin inhibits thyroid cancer cell growth, migration, and EMT through the mTOR pathway. *Tumour Biol.* 2015;**36**(8):6295-304.
187. Liang G, Ding M, Lu H, Cao NA, Niu Y, Gao Y ve ark. Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration. *Oncol Lett.* 2015;**10**(3):1527-1532



HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METFORMİN VE ELEKTROMANYETİK ALANIN KANSER VE YAŞLANMA SÜRECİNE ETKİ EDEN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 14	% 9	% 4	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 5
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	www.thefreelibrary.com İnternet Kaynağı	% 1
5	dspace.marmara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.unboundmedicine.com İnternet Kaynağı	<% 1

tez.sdu.edu.tr