



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI

**KANSER HÜCRE HATLARINDA SİSPLATİN VE
METFORMİN'İN MEKANİSTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ELİF DEMİRKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2021



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI

**KANSER HÜCRE HATLARINDA SİSPLATİN VE
METFORMİN'İN MEKANİSTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ELİF DEMİRKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr.Serap Yalçın Azarkan

KIRŞEHİR / 2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

ELİF DEMİRKAN



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Yüksek Lisansa başlamamda ve yüksek lisans ders sürecinde kendisini tanıdığım günden bu yana gösterdiği sakin ve sabırlı hali ile her zaman bana örnek olmasının yanı sıra bir bilim insanının nasıl çalışması gerektiğini kendisinden öğrendiğim değerli danışmanım Doç. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN'a büyük bir içtenlikle teşekkür ederim. Tezimin laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Seda Yalçinkaya 'ya teşekkürlerimi içtenlikle sunarım.

Tezimi, ailem başta olmak üzere özellikle oğlum Berat Demirkan'a ithaf ederim.

Eylül, 2021

ELİF DEMİRKAN

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---|-------------|
| ÖNSÖZ | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| ŞEKİL LİSTESİ | iv |
| TABLO LİSTESİ | viii |
| SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ | ix |
| ÖZET | x |
| SUMMARY | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Amaç..... | 1 |
| 1.2. Kanser Nedir?..... | 2 |
| 1.3. Kanser Oluşum Mekanizması..... | 3 |
| 1.4. Kanser Tedavi Yöntemleri..... | 5 |
| 1.4.1. Cerrahi Tedavi..... | 5 |
| 1.4.2. Hormonal Tedavi..... | 5 |
| 1.4.3. Radyoterapi..... | 6 |
| 1.4.4. Kemoterapi..... | 6 |
| 1.4.5. Alternatif Tıp..... | 6 |
| 1.4.6. Kök Hücre Tedavisi..... | 7 |
| 1.4.7. İmmünoterapi..... | 7 |
| 1.4.8. Gen Terapi..... | 8 |
| 1.5. Kanser Hücrelerinde Metastaz..... | 8 |
| 1.6. Kanser Hücrelerinde Apoptoz ve Nekroz Kavramları..... | 9 |
| 1.7. Kanser Hücre Hatları..... | 11 |
| 1.8. Metformin..... | 12 |
| 1.9. Sisplatin..... | 13 |
| 2. MATERYAL VE METOT | 15 |
| 2.1. Materyal..... | 15 |
| 2.1.1. Hücre Hatları..... | 15 |
| 2.1.2. Kimyasal Reaktifler..... | 15 |
| 2.1.3. Kullanılan Makine ve Teçhizat..... | 15 |
| 2.2. Metot..... | 16 |
| 2.2.1. Hücre Kültürü..... | 16 |
| 2.2.1.1. HeLa Hücre Hattının 2 Boyutlu Olarak Geliştirilmesi..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.1.2. HeLa Hücre Hattının Pasajlanması..... | 16 |
| 2.2.1.3. Tripan Mavisi İle Hücre Sayımı..... | 17 |
| 2.2.1.4. HeLa Hücre Hattının 3 Boyutlu Olarak Geliştirilmesi..... | 17 |
| 2.2.2. Metformin Ve Sisplatin İlaçlarının Hazırlanması..... | 18 |
| 2.2.3. HeLa Hücre Hattı Sitotoksite Analizi (XTT Assay)..... | 18 |
| 2.2.4. Metformin Ve Sisplatinin HeLa Hücrelerine Uygulanması..... | 20 |
| 2.2.5. Hücre Motilitesini ve Hücre İstilasını Tespit Etmek..... | 20 |
| 2.2.5.1. Migrasyon Assay (Yara İyileştirme Çalışması)..... | 20 |
| 2.2.5.2. İnvazyon Assay (Giemsa Boyama)..... | 21 |
| 3.BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 22 |
| 3.1. İki Boyutlu HeLa Hücre Hattı..... | 22 |
| 3.2. Üç Boyutlu HeLa Hücre Hattı..... | 22 |
| 3.2.1. Üç Boyutlu HeLa Hücre Hattı Üzerinde Metformin Etkisi..... | 23 |
| 3.2.2. Üç Boyutlu HeLa Hücre Hattı Üzerinde Sisplatin Etkisi..... | 25 |
| 3.2.3. Üç Boyutlu HeLa Hücre Hattı Üzerinde Metformin ve Sisplatinin Birlikte Etkisi..... | 27 |
| 3.3. İki Boyutlu Hücre Hattı Motilite Analizi..... | 29 |
| 3.3.1. İki Boyutlu HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde Metformin Etkisi... .. | 29 |
| 3.3.2. İki Boyutlu HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde Sisplatin Etkisi..... | 31 |
| 3.3.3. İki Boyutlu Hücre Hattı Motilite Analizinde Metformin ve Sisplatinin Birlikte Etkisi..... | 34 |
| 3.4.İki Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizi..... | 35 |
| 3.4.1. İki Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde Metformin Etkisi..... | 36 |
| 3.4.2. İki Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde Sisplatin Etkisi..... | 38 |
| 3.4.3. İki Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde Metformin ve Sisplatinin Birlikte Etkisi..... | 40 |
| 4.TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 43 |
| KAYNAKLAR..... | 46 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 49 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | Sayfa No |
|--|----------|
| Şekil 1.1. Hücre Döngüsü..... | 4 |
| Şekil 1.2. Metastaz Evreleri..... | 9 |
| Şekil 1.3. Apoptoz ve Nekroz ölümünün Karşılaştırılması..... | 10 |
| Şekil 1.4. Mitokondri Aracılı Apoptoz Tetiklenmesi ve Oluşumu..... | 10 |
| Şekil 1.5. Apoptozun Düzenlenmesi..... | 11 |
| Şekil 1.6. Metforminin Yapısı..... | 12 |
| Şekil 1.7. Metforminin Kanser Üzerindeki Etkilerini Gösteren Bazı Çalışmalar ve Sonuçları..... | 13 |
| Şekil 1.8. Sisplatinin Yapısı..... | 14 |
| Şekil 2.1. Flasklarda Yetiştirilen HeLa Hücresi..... | 16 |
| Şekil 2.2. 3 Boyutlu Hücre Ekimi..... | 18 |
| Şekil 2.3. XTT 1. Plate ve 2.Plate..... | 19 |
| Şekil 2.4. HeLa Hücresi Migrasyon Deneyi..... | 21 |
| Şekil 3.1. İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı..... | 22 |
| Şekil 3.2. Üç Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı..... | 23 |
| Şekil 3.3. Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinde Verilen Metformin | 23 |
| Şekil 3.4. Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 23 |
| Şekil 3.5. Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 24 |
| Şekil 3.6. Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 24 |
| Şekil 3.7. Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 24 |
| Şekil 3.8. Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 25 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Şekil 3.9. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 25 |
| Şekil 3.10. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 25 |
| Şekil 3.11. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 26 |
| Şekil 3.12. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 26 |
| Şekil 3.13. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 26 |
| Şekil 3.14. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 27 |
| Şekil 3.15. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Karışımının Etkisi..... | 27 |
| Şekil 3.16. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Karışımının Etkisi..... | 27 |
| Şekil 3.17. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Karışımının Etkisi..... | 28 |
| Şekil 3.18. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Karışımının Etkisi..... | 28 |
| Şekil 3.19. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Karışımının Etkisi..... | 28 |
| Şekil 3.20. | Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD ₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Karışımının Etkisi..... | 29 |
| Şekil 3.21. | İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı Motilite Analizi..... | 29 |
| Şekil 3.22. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 30 |
| Şekil 3.23. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 30 |
| Şekil 3.24. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 30 |
| Şekil 3.25. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 31 |
| Şekil 3.26. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 31 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Şekil 3.27. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi | 31 |
| Şekil 3.28. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 32 |
| Şekil 3.29. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 32 |
| Şekil 3.30. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 32 |
| Şekil 3.31 | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 33 |
| Şekil 3.32. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 33 |
| Şekil 3.33. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 33 |
| Şekil 3.34. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Etkisi..... | 34 |
| Şekil 3.35. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Etkisi..... | 34 |
| Şekil 3.36. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Etkisi..... | 34 |
| Şekil 3.37. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 35 |
| Şekil 3.38. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 35 |
| Şekil 3.39. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD ₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 35 |
| Şekil 3.40. | İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı İstila Analizi..... | 36 |
| Şekil 3.41. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinde Verilen Metformin Etkisi..... | 36 |
| Şekil 3.42. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 2 Verilen Metformin Etkisi..... | 36 |
| Şekil 3.43. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 4 Verilen Metformin Etkisi..... | 37 |
| Şekil 3.44. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 6 Verilen Metformin Etkisi..... | 37 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Şekil 3.45. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 8 Verilen Metformin Etkisi..... | 37 |
| Şekil 3.46. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 10 Verilen Metformin Etkisi..... | 38 |
| Şekil 3.47. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi..... | 38 |
| Şekil 3.48. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 2 Verilen Sisplatin Etkisi..... | 39 |
| Şekil 3.49. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 4 Verilen Sisplatin Etkisi..... | 39 |
| Şekil 3.50. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 6 Verilen Sisplatin Etkisi..... | 39 |
| Şekil 3.51. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 8 Verilen Sisplatin Etkisi..... | 40 |
| Şekil 3.52. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 10 Verilen Sisplatin Etkisi..... | 40 |
| Şekil 3.53. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Etkisi..... | 41 |
| Şekil 3.54. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 41 |
| Şekil 3.55. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 41 |
| Şekil 3.56. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 42 |
| Şekil 3.57. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 42 |
| Şekil 3.58. | İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD ₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi..... | 42 |

TABLO LİSTESİ

| | Sayfa No |
|---|-----------------|
| Tablo1.1. En Sık Görülen 5 Kanser Türü 2018 WHO Değerleri..... | 2 |
| Tablo2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler..... | 15 |
| Tablo2.2. Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizatlar..... | 15 |



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Kısaltmalar | Açıklama |
|--------------------|--|
| FBS | :Fetal Bovin Serum |
| 2D | : 2 Boyutlu |
| 3D | :3 Boyutlu |
| DMSO | :Dimetil Sülfoksit |
| WHO | :Dünya Sağlık Örgütü |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| pRb | :Retinoblastoma Proteini |
| NIDDM | :İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetesmellitus |
| ADA | :Amerikan Diyabet Birliği |
| EASD | :Avrupa Diyabet Çalışma Birliği |
| EDTA | :Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| PBS | : Phosphate Buffered Saline |



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KANSER HÜCRE HATLARINDA SİSPLATİN VE METFORMİN'İN MEKANİSTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ELİF DEMİRKAN

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serap Yalçın Azarkan

Günümüzde en yaygın hastalıklardan olan kanser birçok çalışma konusu olmuştur. Ölüm oranı yüksek olmasından dolayı sıklıkla bu konu üzerinde çalışılmış ve çeşitli tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Kanser hastalığı tek bir yöntemle tedavi edilemediği gibi, tek tip ilaçla da tedavi edilen bir hastalık değildir. Bundan dolayı çeşitli ilaçlar üzerinde birçok araştırmalar yapılmıştır.

Bu çalışma, son yılların önemli keşiflerinden olan Metformin ve kanser tedavisinde kullanılmakta olan Sisplatin ilaçlarının kanser hücre hattı üzerinde etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Toksikite analizi sonucunda Metformin LD₅₀ değeri: 43 mM, Sisplatin LD₅₀ değeri: 23 µM olarak belirlenmiştir. Bu değerler üzerinden Metformin ve Sisplatin ilaçlarının katları tek tek ve kombine halinde HeLa hücre hattı üzerinde çalışılmıştır. HeLa hücre hatları 3D ve 2D hücre modelleri şeklinde yetiştirilerek kullanılmıştır. 3D hücre modelleri, *in vivo* çalışmalara alternatif olma özelliğinden dolayı tercih edilmiştir. Bu çalışmada 2D hücre hatlarına uygulanan ilaç dozları 3D model yapıda etkisini göstermemektedir. Sistemik yapıya benzer şekilde kanser hücrelerinin ölümü için daha yüksek dozlara gereksinim olduğu kanısına varılmıştır. 2D ve 3D model yapıları üzerinde yapılan çalışmalar ışığında Metforminin serviks kanseri üzerinde etkili olduğu ve potansiyel bir ilaç olabileceği görülmüştür. Metforminin, Sisplatin ile kombine halinde

verilmesinde Metforminin etkisinin daha baskın olması da bu ilacın kuvvetliliğini göstermektedir.

EYLÜL 2021, 49 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Metformin, Sisplatin, Serviks Kanseri, 2D-3D Hücre Kültürü, HeLa Hücre Hattı



ABSTRACT

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE MECHANISTIC EFFECTS OF CISPLATIN AND METFORMIN IN CANCER CELL LINES.

ELİF DEMİRKAN

KırşehirAhi Evran University

Graduate School of Sciences and Engineering

Molecular Biology and Genetics Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serap YalçınAzarkan

Cancer, which is one of the most common diseases today, has been the subject of many studies. Due to its high mortality rate, this subject has been studied frequently and various treatment methods have been investigated. Cancer neither can be treated with a single method nor can it be treated with a single drug. Therefore, many studies have been carried out on various drugs.

This study aims to investigate the effects of Metformin, one of the important discoveries of recent years, and Cisplatin drugs, which are used in cancer treatment, on the cancer cell line. According to the results of the toxicity analysis, Metformin LD50 value: 43 mM, Cisplatin LD50 value: 23 μ M. Over these values, the multiples of Metformin and Cisplatin drugs were studied individually and in combination on the HeLa cell line. HeLa cell lines have been used by raising as 3D and 2D cell models. 3D cell models have been preferred because they are an alternative to in vivo studies. In this study, the drug doses applied to 2D cell lines do not show their effect in the 3D model structure. Similar to the systemic structure, it has been concluded that higher doses are needed for the death of cancer cells. In the light of studies on 2D and 3D model structures, it has been observed that Metformin is effective on cervical cancer and may be a potential drug. The fact that the effect of metformin is more dominant when given in combination with cisplatin also shows the efficacy of this drug.

September 2021, 49 Pages

Keywords: Metformin, Cisplatin, Cervical Cancer, 2D-3D Cell Culture, HeLa Cell Line



1. GİRİŞ

Günümüzde en yaygın hastalıklardan biri olan kanser hastalığı birçok çalışmaya konu olmuştur. Ölüm oranının yüksek olmasından dolayı sıklıkla bu konu üzerinde çalışılmış ve çeşitli tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Yapılan araştırmalarda, tedavi yöntemi olarak kullanılan çeşitli bitki ekstraktları ve yeni sentezlenen ilaçlar *in vitro* ve *in vivo* şeklinde araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olan Sisplatin ve son yılların önemli keşiflerinden olan Metforminin kanser hücre hattı üzerindeki mekanistik etkisi çalışılmıştır (El-Mir, M.D. ve diğ., 2000).

1.1. Amaç

Kanser, hem dünyada hem de ülkemizde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm sebebi olmasından dolayı önemli bir sağlık problemidir. Bunun yanında tedavinin neden olduğu yan etkilerin sosyal, maddi ve manevi yönleri ile mücadelesi zor bir hastalıktır. Kanser türlerinden biri olan serviks kanseri, kadınlarda meme kanserinden sonra en sık rastlanan kanser türüdür. Jinekolojik kanser türleri kadın sağlığı üzerinde birçok olumsuz etkiler bırakmaktadır. Diğer kanserlerde olduğu gibi çeşitli psikolojik olumsuzlukların yanında üreme ve cinsel yaşam üzerinde de etkileri fazla olduğundan çok daha yıpratıcı olabilmektedir (Kanbur,A., ve Çapık, C., 2011).

Hastaların çok az bir kısmı sadece cerrahi yöntemle kanseri yenmektedir. Kanser hastalarının %25'inden fazlası kemoterapi ile ilaç tedavisi görmektedir. Kemoterapi alan hastalarda ise iyileşme oranı oldukça yüksektir. Ancak iyileşme oranlarına rağmen ölüm oranı da yüksek bir hastalıktır (Çetin,A., 2013). Bu yüzden kanser hastalığının tedavi yöntemlerinde yeni yollar aranmaktadır.

Bu çalışma serviks kanserinde yeni tedavi yöntemleri geliştirmeyi amaçlayarak, normal şartlarda kanser hastalarında kullanılmayan Metformin ilacının etkisini ortaya koymayı hedeflemiştir. Aynı zamanda kanser hastalıklarında kullanılan Sisplatin ilacını da Metformin ile kombine şeklinde uygulayarak farklı ilaçların birlikte etkisini göstermeyi hedeflemiştir. Bu çalışma, iki ilacın da farklı dozlarda hücrelere verilerek en etkili ilaç dozunu bulmayı hedeflemektedir. Ayrıca iki ilacın kombine şeklinde kanser hücrelerinde denenmesi de farklı tedavi yollarının araştırılmasında önem taşımaktadır.

Yapılan bu proje, Sisplatinin ve Metforminin serviks kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin mekanistik düzeyde daha iyi anlaşılmasına ve diğer önemli kanserlerin tedavisi içinde yeni alternatif tedavi yollarının keşfedilmesine öncülük edecektir. Ayrıca Metformin gibi normal şartlarda başka hastalık tedavilerinde kullanılan ilaçların da kanser tedavisinde kullanılabileceğini gösterecektir.

1.2. Kanser Nedir?

Kelime anlamı, bir doku veya organdaki hücrelerin dengesiz çoğalması ile ortaya çıkan bir hastalık olan kanser, dünyada en ölümcül hastalık olmasından dolayı toplum açısından önemlidir. Kanser oluşumunda genetik faktörler etkili olduğu gibi çevresel faktörler ve rastgele mutasyonlar da etkilidir. Her organda görülebilen bu hastalık tek organı da etkileyebilir metastaz ile diğer organlara da yayılabilir (Özenoğlu,S. ve diğ.,2013). Ancak tanı koyulurken ilk çıkış yeri olan organ göz önünde bulundurularak isimlendirilir. Başlıca kanser çeşitleri;

- Meme kanseri
- Cilt kanseri
- Rahim ağzı kanseri
- Karaciğer kanseri
- Kolon kanseri
- Akciğer kanseri
- Mide kanseri
- Prostat kanseri
- Böbrek kanseri
- Mesane kanseri
- Pankreas kanseri... gibi kanser türleri sıkça karşımıza çıkmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2018 verilerine göre Dünya'da ve Türkiye'de hangi hastalıkların hangi cinsiyette çok görüldüğü aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü,2018).

Tablo 1.1: En sık görülen 5 kanser türü 2018 WHO değerleri

| En sık görülen 5 kanser türü 2018 WHO değerleri | | | |
|---|-----------|------------|---------|
| Dünya | | Türkiye | |
| Kadın ♀ | Erkek ♂ | Kadın ♀ | Erkek ♂ |
| Meme | Akciğer | Meme | Akciğer |
| Kolon | Prostat | Tiroid | Prostat |
| Akciğer | Kolon | Kolon | Kolon |
| Rahim ağzı | Mide | Rahim ağzı | Mesane |
| Tiroid | Karaciğer | Akciğer | Mide |

Kanser bir veya birden fazla genin mutasyona uğraması sonucunda oluşur ve o genin işleyişini değiştirir. Mutasyona uğrayan gende oluşan bazı etkiler; o genin susturulması veya olması gerekenden fazla aktif davranması olabilir. Ayrıca bazı enzimleri etkileyen faktörler de o reaksiyonun yavaşlamasına ya da çok hızlanmasına neden olabilir. Bazı mutasyonlar ise gen işleyişini, hücre döngülerini ve çeşitli metabolik olayları etkileyerek kanser oluşumunu gerçekleştirir (Özenoğlu,S. ve diğ.,2013).

Mutasyona neden olan etkiler ise; X ışınları, ultraviyole ışınlar, gama ışınları gibi radyoaktif etmenlerdir. Bunun yanında çeşitli kimyasal maddeler, biyolojik etmenler ve fiziksel unsurlar da kanserojen etkilere sahiptirler. Kalıtsal özelliklere sahip kişilerde de kansere yakalanma riski yüksektir. Otozomlarda değil de gonozomlarda meydana gelen mutasyonlar nesillere aktarıldığı için genetik faktör de kanserleşmede önemli bir yer tutmaktadır (Özenoğlu,S. ve diğ.,2013).

1.3. Kanser Oluşum Mekanizması

Kanserleşme proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Proto-onkogenler hücre büyümesinde rol alırken tümör baskılayıcı genler de büyümeyi engelleyen bir rol üstlenirler. Bu hücrelerde meydana gelen mutasyon sonucunda proto-onkogenler; onkogen olarak işlev yapar ve genin çok fazla aktif olmasıyla büyümeyi hızlandırır. Bu şekilde kontrolsüz çoğalan hücreler kanserleşmeyi sağlar. Tümör baskılayıcı genlerde ise durum; büyüme inhibe edilemediğinden kontrolsüz çoğalma meydana gelerek kanserleşme başlar (Ata,F.K.,2020)

Hücre siklusu ile onkogenesis arasındaki bağlantıyı gösteren birçok çalışma vardır. Hücre siklusunda kontrol noktalarında meydana gelen mutasyonlar hücrenin orantısız büyümesine neden olur. Hücre siklusu evreleri şöyledir: G1 evresi (hücrenin büyüme evresi, DNA sentezine hazırlık evresi), S evresi (sentez evresi, DNA'nın 2 katına çıkması)

1.4. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde göz önünde tutulan en önemli unsurlar kanser türü ve vücutta ne kadar yayıldığıdır. Kanser ne zaman teşhis edildiği, ne kadar yayıldığı, hangi organ kökenli olduğu ve hastanın durumuna göre çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır.

1.4.1. Cerrahi Tedavi

Genellikle kemoterapi ve radyoterapiyle birlikte kullanılan bu yöntem tek başına da kullanılmaktadır. Bu yöntemdeki asıl amaç kanserin yayılım göstermeden tamamen vücuttan alınmasıdır. Bunun haricinde bazı tümörlerin tamamının çıkarılması mümkün olmadığı zamanlarda ise bir kısmının cerrahi yöntemle çıkarılıp sonrasında kemoterapi veya radyoterapi ile tümörün azaltılması yöntemi kullanılmaktadır (Baykara, O., 2016).

Cerrahi tedavilerde lazer cerrahisi, mohs cerrahisi, laparoskopik cerrahi, robotik cerrahi, doğal orifis cerrahisi gibi teknikler de sıkça kullanılmaktadır (Baykara, O., 2016).

Serviks kanserinin cerrahi tedavisinde şu yöntemlere başvurulur;

- Radikal Histerektomi
- Lenf Nodu Diseksiyonu
- Radikal Trakelektomi
- Konizasyon
- Ekstrafasiyal (Tip I) Histerektomi
- Basit Histerektomi Sonrası Saptanan «nvaziv Serviks Kanserinde Cerrahi Tedavi (Başer, E. ve diğ., 2008)

1.4.2. Hormonal Tedavi

Hormonlar, vücutta kendiliğinden üretilen proteinlerdir. Vücudun bazı bölümleri büyümek için hormonlara ihtiyaç duyar. Bunun gibi bazı kanserlerin gelişimi ve büyümesi de hormonlara bağlıdır. Bu amaçla vücutta bu hormonların etkisini azaltmak için kullanılan tedavi şekline hormon tedavisi denir.

Genellikle meme kanseri, prostat kanseri ve endometriyum kanseri tedavisinde kullanılan bu yöntem kemoterapi gibi olsa da vücudun doğal yollardan hormon üretmesi yönünden farklılık göstermektedir. Hormon tedavisinde 3 yöntem kullanılmaktadır.

- Hormon sentez inhibitörleri: Hormonun üretilme aşamasında sentezin inhibe olmasıdır.
- Hormon reseptör antagonistleri: Hormonun hücre reseptörüne bağlanarak hormonun bağlanmasını engelleyip büyümeyi durdurmasıdır.
- Hormon takviyesi: Vücutta hormonlar birbirleriyle etkileşim halindedir. Bir hormonun etkisinin artması diğer hormonun etkisinde azalmaya gidebilir. Bu gibi durumlarda dışarıdan hormon takviyesi verilerek bu etkileşime dışarıdan etki edilmesi de bir tedavi şeklidir (Baykara, O., 2016).

1.4.3. Radyoterapi

Radyoterapi ışın kullanarak tümörü yok etmeyi hedef alan bir kanser tedavi yöntemidir. Meme kanseri, prostat kanseri gibi birçok kanser tedavisinde kullanılan bu yöntemin en büyük dezavantajı, sağlıklı dokularda da etki göstererek hücre bölünmesini olumsuz etkilemesidir.

Genellikle cerrahi yöntem ve kemoterapi ile birlikte tercih edilen bu tedaviyi, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre kanser hastalarının %52' sinin aldığı belirlenmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı Hak Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı,2021).

1.4.4.Kemoterapi

Kemoterapi, kanserin ilaçla tedavi edilme şeklidir. Kemoterapi yöntemi genellikle cerrahi yöntemle birlikte kullanılan bir yöntemdir. Ancak cerrahi müdahale yapılamadığı zamanlarda tek başına da kullanılır. Amaç kanser hücrelerini öldürerek, tümörün büyümesini ve yayılmasını önlemektir (Hastalar İçin Kemoterapi Rehberi,2021).

Kemoterapi ağız yoluyla ve damar yoluyla verilebilen ilaçlardır. Kemoterapi ilaçları kan yoluyla orantısız büyüme gösteren kanser hücrelerine ulaşır onları yok etme eğilimindedir. Ancak bu durumda sağlıklı hücreler de etkilendiği için çeşitli yan etkiler gösterir (Hastalar İçin Kemoterapi Rehberi,2021).

1.4.5. Alternatif Tıp

Alternatif tıp, tıbbın haricinde tedavi amaçlı kullanılan tüm yöntemlerdir. Kanser hastalarında da sıkça kullanılan bu yöntem üzerine 2014 yılında Düzen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bu yöntemin faydalı olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Bu

çalışmaya göre hastalar hem kanserle mücadelede hem de yaşam kalitesini arttırmada bu yöntemi kullanıyorlar. Yapılan çalışma kapsamındaki kanser hastalarının %14,5'i alternatif tıp yöntemlerinden en az birini kullanmakta ve büyük çoğunluğu tedavi süresindeyken bu yöntemlerden faydalanmaktadır. Ayrıca fayda sağladım ve zarar görmedim diyen hasta sayısının çokluğu da bu yöntemleri hastaların gözünde önemli yerde tutmaktadır. İlaç ve alternatif tıbbın birlikte uygulandığı hastalarda psikolojik olarak da fayda sağlandığı belirlenmiştir. (Düzen, K. Ö. ve Korkmaz, M., 2015).

1.4.6. Kök Hücre Tedavisi

Kendi kendine yenilenebilme özelliğine sahip mitozla özelleşmiş hücrelere dönüşebilen hücrelerdir. Birçok hastalık tedavisinde kullanılan bu yöntem kanser üzerinde de yaygınlaşmaya başlamıştır. İnsanda kullanılan 3 tip kök hücre tedavi yöntemi vardır.

- Allojenik transplantasyon: Vericinin başka kişi olduğu yöntemdir.
- Otolog transplantasyon: Kendi kök hücrelerinin kullanıldığı yöntemdir.
- Sinjeneik transplantasyon: Verici kişinin kendisinin olmadığı ancak ikizi veya üçüzü olduğu zaman kullanılan yöntemdir.

Verici kişinin başka kişi olması, o kişinin hücrelerinde kanser olmadığı için avantajlı bir durumdur. Ancak bu durum hücreler arası uyum konusunda dezavantajdır. En verimli verici bulmak amacıyla MCA yöntemiyle test edilir (Baykara, O., 2016).

1.4.7. İmmünoterapi

İmmünoterapi tedavi şekli vücudun bağışıklık sisteminin tüm uyarılara karşı verilen cevabın kullanılmasıdır.

Kanser immünoterapisinde kullanılan tedavi yöntemleri şunlardır;

- Monoklonal antikorlar: Vücutta antikorlar B hücreleri tarafından üretilir. Ancak bu üretilen antikorlar kansere karşı yeterli olmadığında belli tipteki proteine karşı laboratuvar ortamında antikorlar üretilerek kansere karşı savaşta kullanılır (Baykara, O., 2016).
- Aşılar: Hastayı kendi kanser hücreleri veya antijenleriyle aşılama yöntemidir (Barbaros, B. ve Dikmen, M., 2015).

- Sitokinler: Bağışıklık sisteminin ürettiği kimyasallardır. Genel olarak kullanılan iki çeşit nonspesifik bağışıklık terapi yöntemi vardır. Bunlar; interlökinler ve interferonlardır (Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği,2021).
- Adoptifimmünoterapi: Genellikle T hücreleri kullanılan bu yöntemde immünolojik aktif hücrelerin hastaya verilerek tedavi etme biçimidir (Barbaros, B. ve Dikmen, M.,2015).

1.4.8.Gen Terapi

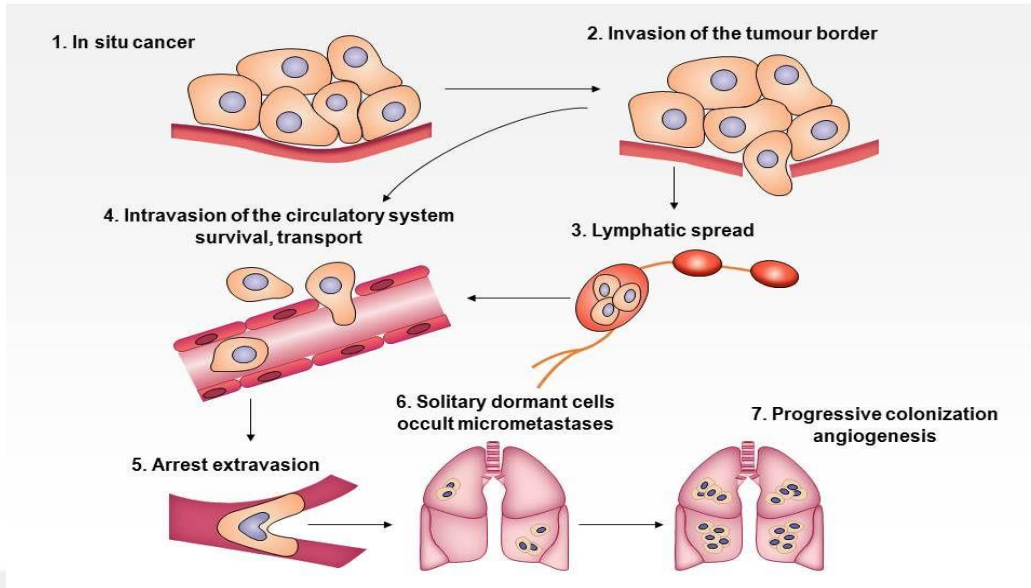
Gen terapisi, hatalı protein üretimine neden olan bir veya birden fazla genin yerine normal üretim yapan geni yerleştirmeye denir. Kanser hücrelerinde gen tedavisi kök hücre gibi kişiye özel bir tedavi şeklidir. Burada amaç sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümörü öldürmektir. Gen terapisi kanser tedavisinde iki şekilde kullanılır.

- Mutasyona uğramış genlerin düzeltilmesi: Bu yöntemde genel olarak apoptozda görev alan genler mutasyona uğradığında kullanılır.
- Anti-kanser ilaç ile birlikte gen terapi: Bu yöntem, öncelikle zararsız olan bir ilaç hücreye verilerek bu ilaçla aktifleşen ve vücutta bulunmayan enzimi, kanser hücresine göndererek gerçekleşir. Enzimle aktifleşen toksik ilaç tümörlerde ölüme neden olduğundan bu yönteme intihar gen terapisi de denir (Rashnonejad, A. ve diğ., 2014).

1.5. Kanser Hücrelerinde Metastaz

Metastaz, kısaca vücutta meydana gelen kanserleşmenin ana kökeni olan organdan başka organa sıçramasıdır. Kanser hücresinin ana tümöründen kopan neoplastik hücreler, kan dolaşımına veya lenfatik sisteme girerek farklı organlara taşınır. Ulaştığı organda uygun penetrasyonu gerçekleştirince orada da kontrolsüz büyümeye devam eder. İlk olarak anjiyogenez denilen olay gerçekleşerek tümör hücresi yeni damar oluşumunu uyarır. Sonrasında ana tümör dokusundaki hücrelerden bağını kopararak ekstraselüler matrikse geçer ve ilerler. Kimi zaman komşu organa geçer kimi zaman ise kan dolaşımına katılarak uzaktaki organlara ulaşırlar. Böylelikle kanser hücresi farklı dokulardan beslenerek yaşamlarını sürdürmeye çalışır ve çoğalır (Güllü, İ. H. ve Akalın, İ., 2005).

Metastasis

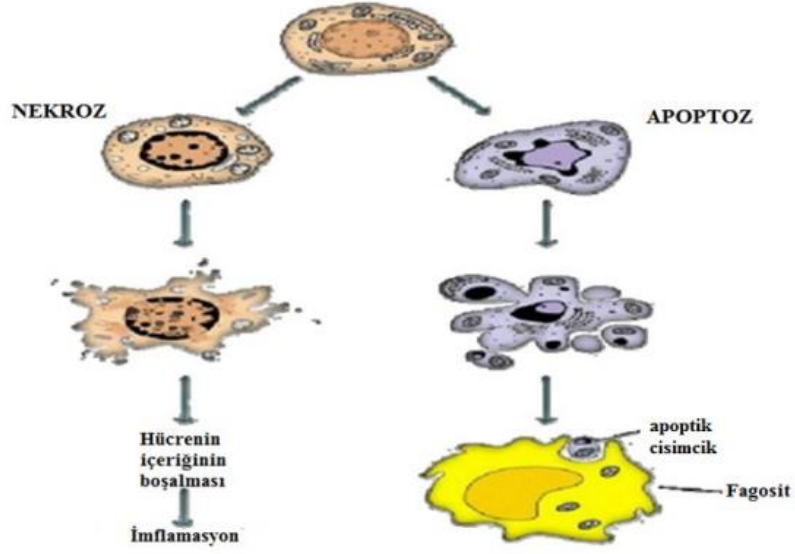


Şekil 1.2. Metastaz evreleri (Slide Team, 2021)

Moleküler biyolojinin gelişimiyle beraber metastazın meydana gelmesiyle ilgili birçok gen ve molekül bulunmuştur. Bunlardan bazıları şunlardır: Nm23, Kai1, Maspin, TIMPs, MTA, kaderin ailesi, integrinler, laminin - elastin bağlayıcı proteinler, CD44'ü de içeren hücre adezyon molekülleridir (Andishehtadbir, A. ve diğ., 2015; Güllü, İ. H. ve Akalın, İ., 2005; Çapanoğlu, G. ve Bakar, E., 2018).

1.6. Kanser Hücrelerinde Apoptoz ve Nekroz Kavramları

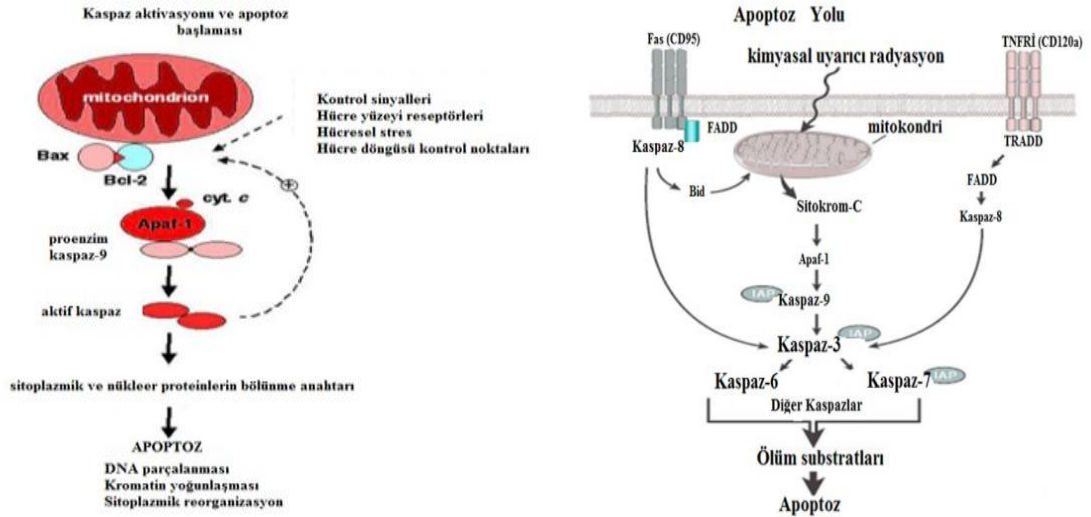
Apoptoz, hücrenin programlanmış şekilde kendi kendini imha etmesidir. Nekroz ise hücrelerin veya dokuların yenilenemez şekilde zarar görerek patolojik ölümdür. Kısacası nekroz da apoptoz gibi, vücuttaki hücrelerin ölmesidir ancak nekroz olayındaki hücre ölümü istenmeyen hücrelerin ölümüdür. Yetişkin insanlarda ortalama 50-70 milyar hücre apoptoz ile yok olur. Her gün kendini yenilenen dokularda yeni hücrelerin üretimi hızlıdır ve kendine yer açması gerekir. Bu yüzden apoptoz vücut içerisinde önemli yer tutmaktadır. Apoptozun yavaşladığı hastalıklar olduğu gibi hızlandığı hastalıklar da mevcuttur. Kanser, apoptozun yavaşladığı hastalıklardan biridir (Reed, J.C., 1999).



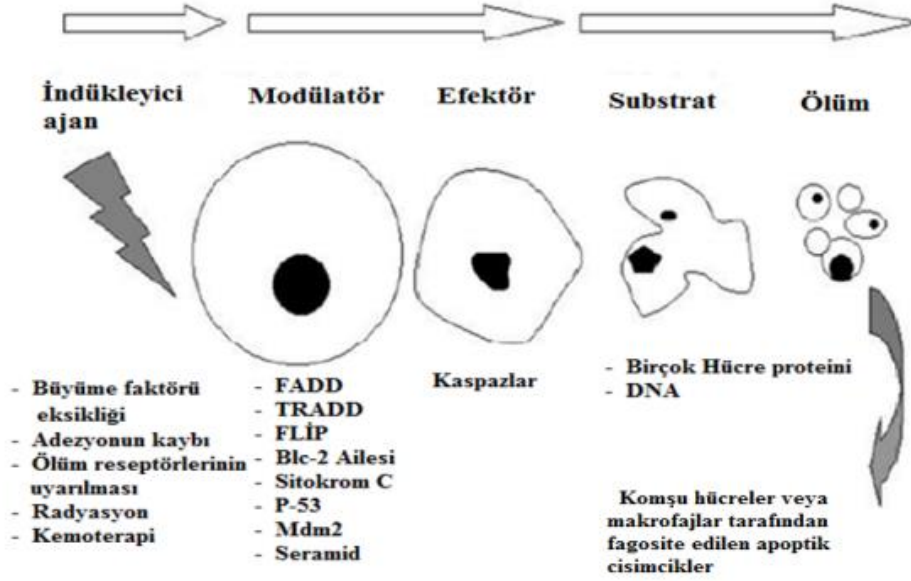
Şekil 1.3. Apoptoz ve Nekroz ölümünün karşılaştırılması (Binen, M.,2011)

Apoptoz oluşumunda proteinler, iyonlar, genler, moleküller gibi birden fazla faktör vardır. Apoptozun 3 farklı mekanizması vardır. Bunlar;

- Mitokondri yolu
- Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu
- Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz



Şekil 1.4. Mitokondri aracılı apoptoz tetiklenmesi ve oluşumu (Binen, M.,2011)



Şekil 1.5. Apoptozun düzenlenmesi (Binen, M.,2011)

1.7. Kanser Hücre Hatları

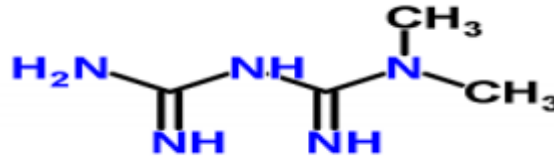
Günümüzde canlı dokularla çalışmalar bilimsel etik yönünden kısıtlanmasıyla birlikte hücre hatları ile çalışmak çok önemli bir yer tutmaktadır. *In vitro* olarak hücre hatları üzerinde denenmiş birçok ilaç model organizmalarla da denenerek insan üzerinde kullanılmaya başlanır. Bu yüzden hücre hatları yapılan bilimsel yayınların temelini oluşturmaktadır (Landry, J. ve diğ.,2013; Kaptanoğlu, A.,2020).

HeLa hücre hattı 1951 yılında rahim ağzı kanserine yakalanan Henrietta Lacks adlı hastanın hücreleridir. Kültür çalışmalarında ilk kullanılan hücre hattı HeLa, 70.000'den fazla çalışmada yer almıştır. İlk kullanıldığı zamanlarda önemli bir araştırma olan çocuk felci aşısında önemli yer tutmaktadır. Sonrasında HeLa hücre hattı AIDS, lösemi, kanser ve bunun gibi birçok çalışmada da kullanılmaya devam etmektedir (Landry, J. ve diğ.,2013).

HeLa hücre hattının birçok çalışmada yer almasının nedenlerinden biri 7-8 pasajlamadan sonra dahi canlılıklarını yitirmemesidir. HeLa hücre hattı 20 pasajlamaya kadar canlılıklarını devam ettiren bir hücre hattıdır. Ayrıca ölümsüz olması, hızlı çoğalması ve kolay üretimi gibi özelliklerinden dolayı araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır (Kaptanoğlu, A.,2020).

1.8. Metformin

Metformin, biguanidler ailesinin bir üyesi olup, insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) tedavisinde tercih edilen bir ilaçtır. ABD ve Avrupa’da en çok reçete edilen ilaçlardan biri olan Metformin Avrupa’da 60 yıldan fazla bir süredir milyonlarca hastaya verilen, nispeten iyi tolere edilen düşük maliyetli bir ilaç olarak belirtilmektedir (El-Mir, M.D. *ve diğ.*, 2000). Metformin, yaklaşık 10 yıldır tip 2 diyabetin tedavisinde ADA (Amerikan Diyabet Birliği) ve EASD (Avrupa Diyabet Çalışma Birliği)’ı da içeren bazı bilinen uluslararası kuruluşlarda yer almaktadır (Inzucchi, S.E. *ve diğ.*, 2015). Bu ilaç, hepatik glukogenez baskıladığı ve kan glukoz seviyesini düşürme yeteneğinde olduğu için antihiperglisemi ilacı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Clifford, J. B., 2017). Metforminin aynı zamanda polikistik over sendromu ve gebelik diyabeti gibi bazı metabolik hastalıkların tedavisinde de reçete edildiği belirtilmiştir (Ortiz-Flores, A.E. *ve diğ.*, 2018).



Şekil 1.6. Metforminin yapısı (Yetkin, İ., 2016)

Metformin üzerine son zamanlarda yapılmış çalışmalar yoğunlaşmış olup, Metformin çeşitli araştırmalar için yeniden formülize edilerek kullanılmaya başlandı. Metformin olarak görülmektedir. Öncü çalışmalar Metforminin mitokondri solunum zincirindeki kompleks I’i inhibe ettiğini göstermiştir (El-Mir, M.D. *ve diğ.*, 2000).

Yapılan araştırmalarda, Metforminin serviks kanserini önleme ve tedavi etme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. 2005 yılında yapılan çalışmada hipoglisemi tedavileri uygulanan diğer hastalara kıyasla, Metforminle tedavi edilen tip-2 diyabet hastalarının kanser riskinin azaldığı ilk olarak rapor edilmiştir (Boyle P. *ve diğ.*, 2012). O zamandan bu yana, Metforminin kanser insidansını ve kanserle ilişkili ölümlerin azalması ile ilgili çok sayıda klinik öncesi, epidemiyolojik ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmalar ise bu ilacın antitümör etkilerini açıklayan mekanizmalar sağlamıştır (Landman vd., 2010).

Günümüzde hemen hemen tüm kanser türlerinde Metforminin klasik kemoterapi ilaçlarına yardımcı olma potansiyelini araştıran 200'den fazla devam eden klinik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar Metforminin antikanser özelliğine ışık tutmaktadır(Faria , J. ve diğ.,2019).

| Referans | T2DM var mı? | Kanser Tipi | Anti-kanserojen etki |
|-------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Evans, 2005 | + | Herhangibiri | + |
| Decensi, 2010 | + | HCC, Pank | + |
| Decensi, 2010 | + | Kolon, meme, prost | -- |
| Hadad, 2011 | -- | Meme | + |
| Tan, 2011 | + | NS akciğer | + |
| Campagnoli, 2012 | -- | Meme | + |
| Yin, 2013 | + | Herhangibiri | + |
| Suissa, 2014 | + | Herhangibiri | -- |
| Lee, 2015 | + | Mide | + |
| Vissers, 2015 | + | Meme | -- |
| Dowling, 2015 | -- | Meme | + |
| El-Haggar, 2016 | -- | Meme | + |
| Jang WI, 2017 | + | Pankreas | + |

Şekil 1.7. Metforminin Kanser Üzerindeki Etkilerini Gösteren Bazı Çalışmalar ve Sonuçları (Nar,A., 2017).

Bu sonuçlardan yola çıkılarak Metforminin birçok kanser hücresinde gösterdiği etkiler incelenmiştir. Serviks kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada hücre bölünmesi inhibisyonunda etkili olduğu gözlenmiştir (Yudhani, R. ve diğ.,2016).

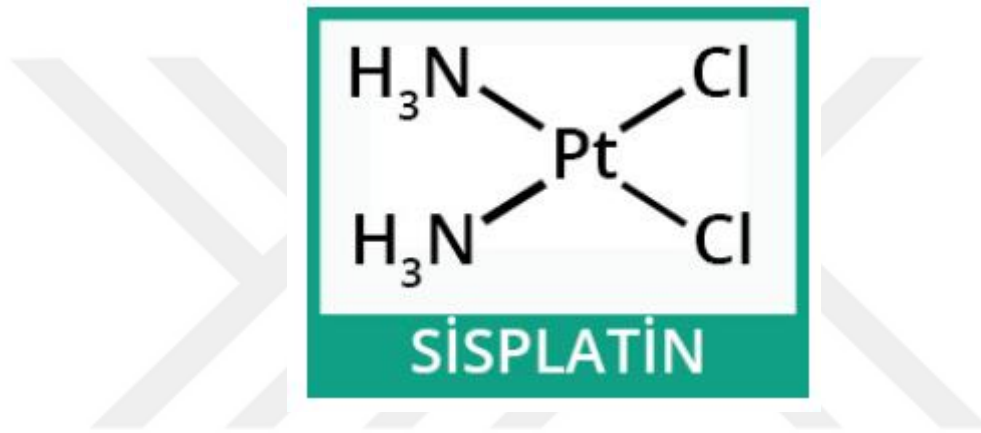
Son yıllarda ise kanser üzerinde tek bir ilaç yerine kombine ilaçlar denenmekte ve değişik dozları test edilmektedir. Bu durumun nedeni ise ilaçların terapötik etkilerini arttırmak ve olumsuz etkilerini en aza indirmektir (Yudhani, R. ve diğ.,2016). Bu bilgiler ışığında bu araştırmada Metformin ve Sisplatin ilaçları birlikte ve ayrı ayrı HeLa hücre hattında denenmiştir.

1.9. Sisplatin

Sisplatin (cis-diamindikloroplatinum, CDDP) DNA'nın transkripsiyon ve replikasyon özelliğini bozma yeteneğinden kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Yapılan çalışmalar

sonucunda Sispalitinin, over kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri gibi çeşitli kanserler üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Nefrotoksik etkisi de fazla bilinen ilaçlardan olması ve en sık kullanılması gibi özelliklerinden dolayı Sisplatin hakkında bir çok çalışmalar yapılmaktadır (Erkurt,M. A. ve diğ., 2009).

Sisplatin ilk olarak 1844 yılında M. Peyron tarafından keşfedilmiş ve 1893'te Alfred Werner kimyasal yapısını açıklamıştır. 1965 yılında *E.coli* üzerinde yapılan çalışmalarda hücre bölünmesini engellediği için önemli bir kanser ilacı olabileceği düşünüldü.1978 yılında ise ilk FDA onaylı platin bileşiği olarak kanser tedavisinde kullanılmaya başlandı (Dasari, S. ve Tchounwou, P.B.,2014).



Şekil 1.8.Sisplatinin Yapısı (Sarıgül, T., 2019)

Platin içeren Sisplatin serviks kanseri tedavilerinde ilk tercih edilen ilaçlardır. Büyüme inhibe edici bir aktivite gösterirken yan etkileri de mevcut olduğundan başka ilaçlar üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır (Yudhani, R. ve diğ.,2016).

Yapılan araştırmaların bir kısmında ise Sisplatin ve diğer kanser ilaçları ile kanser tedavisinde kullanılmayan bazı ilaçlar birlikte denenmiştir. Shaloam Dasari ve Paul Bernard Tchounwou araştırmalarında Sisplatin ile birlikte Paklitaksel, Gemsitabin, Doksorubisin, Tegafur-Urasil, D vitamini kullanarak etkilerini araştırmışlardır. Farklı dozlarda uygulanan karışımların karşılaştırılmaları yapılmıştır (Dasari, S. ve Tchounwou, P.B.,2014).

Bu çalışmada Meftormin ve Sisplatin ilaçları çeşitli dozlarda karıştırılarak ve tek başlarına HeLa hücrelerinde denenmiştir. Hücreler 2 boyutlu ve 3 boyutlu geliştirilerek sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla XTT deneyi belirlenen miktarlarda ilaç denemeleri yapılmıştır. 2D ve 3D kanser hücrelerinin koloni forming assay ve migrasyon deneyi yapılarak kanser üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2. MATEYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Hücre Hatları

Çalışmada Ahi Evran Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre laboratuvarından temin edilen HeLa hücre hattı kullanılmıştır.

2.1.2. Kimyasal ve Reaktifler

Tablo 2.1:Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler

| Kullanım amacı | Kimyasal ve Reaktif | Marka ismi |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Hücre bakımı | RPMI 1640 | CapricornScientific, Almanya |
| | FetalBovin Serum(FBS) | CapricornScientific, Almanya |
| | Gentamisin | CapricornScientific, Almanya |
| | Tripsin-EDTA | CapricornScientific, Almanya |
| | PhosphateBufferedSaline (PBS) | FisherChemical, ABD |
| Ticari kit | XTT Analiz Kiti | Biotium, ABD |
| Hücre İnvazyon Analizi | PhosphateBufferedSaline (PBS) | FisherChemical, ABD |
| | Formaldehit (%37) | Merck, Almanya |
| | Giemsa Çözeltisi | Merck, Almanya |
| İlaçlar | Metformin | Merck, Almanya |
| | Sisplatin | Koçak Farma, Türkiye |

2.1.3. Kullanılan Makine ve Teçhizatlar

Tablo 2.2:Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizatlar

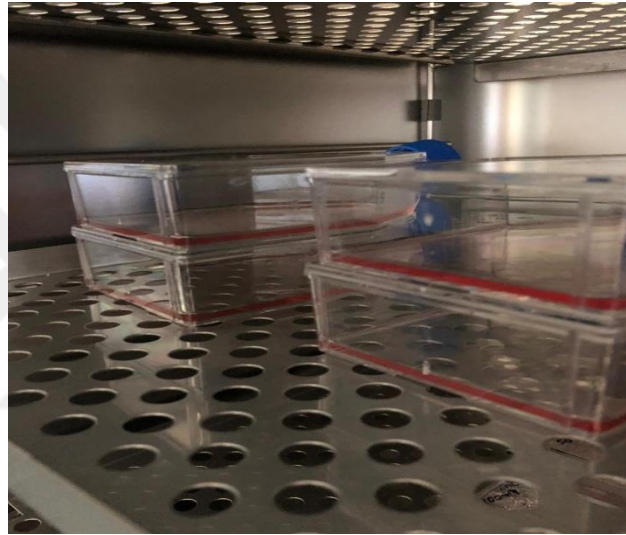
| Kullanım amacı | Makine ve Teçhizat | Marka İsmi |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Hücrel çalışma | CO ₂ İnkübatör | Nüve EC 160, Türkiye |
| | Laminar Akımlı Kabin | Nüve MN 090, Türkiye |
| | İnverted Mikroskop | BAB, Türkiye |
| | Mikroskop Kamerası | Leica, Almanya |
| | Santrifüj Cihazı | Nüve NF 400, Türkiye |
| | ELİSA Okuyucusu | Biotek Elx808, ABD |
| Hücre Depolanması | Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C) | Vestel, Türkiye |
| | Derin Dondurucu (-80 °C) | Vestel, Türkiye |
| Diğer Cihazlar | Masaüstü Bilgisayar | Hewlett Packard (Hp), ABD |
| | Dizüstü Bilgisayar | Toshiba, Japonya |

2.2. Metot

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. HeLa Hücre hattının 2 Boyutlu Olarak Geliştirilmesi

HeLa hücre hattı, Fetal bovin serum (FBS) ve gentamisin eklenmiş RPMI 1640 besiyerinde 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde ve 75 cm²'lik flasklara 12 mL taze medium eklenerek üretilmiştir.



Şekil 2.1. Flasklarda Yetiştirilen HeLa Hücresi

2.2.1.2. HeLa Hücre hattının Pasajlanması

Hücreler flask tabanında çok fazla ürediklerinde besi ortamından yeterince fayda göremez ve çoğalmaları durur. Bu yüzden hücrelerin pasajlanarak sayılarını azaltılmalı ve besi ortamında istenilen gibi çoğalmasını sağlamalıyız.

Pasajlama işlemi, hücrelerin yüzey alanından ayrılıp yeni bir kültür şişesine aktarılması olayına denir.

Pasajlama işlemi laminer akış kabininin içerisinde yapılır ve basamakları aşağıdaki gibidir.

- Flask içerisindeki besiyerinin uzaklaştırılması
- 4-5 mL PBS ile yıkama ve uzaklaştırılması

- 1-2 mL tripsin-EDTA eklenerek hücreler flask tabanının ayrılana kadar 37°C inkübatörde bekletilmesi
- Mikroskopta incelenerek hücrelerin ne kadar kalktığı gözlemlenmesi
- Tripsinin toksik etkisini inhibe etmek için, tripsin hacminin 2 katı kadar medium eklenmesi ve başka bir falcona alınması

İlk kullanılan flaska 12mL medium eklenerek hücrelerin devamlılığı sağlanmıştır.

2.2.1.3. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

Tripan mavisi boyasının kullanılma amacı canlı ve ölü hücreleri ayırt ederek hücre sayımının gerçekleştirilmesidir. Ölü hücreler maviye boyanırken canlı hücreler boyanmaz. Tripan mavisi negatif yüklü olduğundan, canlı ve zarar görmemiş membrandan geçemez böylece canlı hücreler boyanmamış olur. Ölü hücreler ise boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görmemizi sağlar.

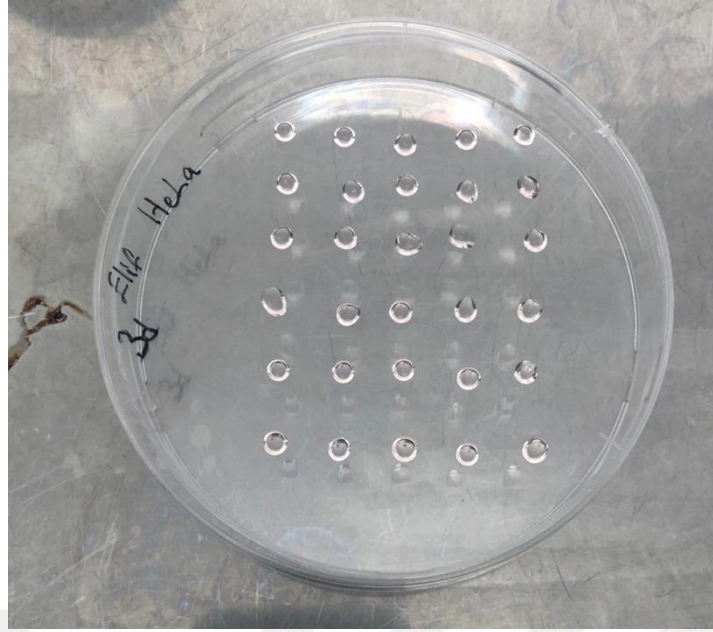
Tripsin-EDTA ile kaldırılıp medium eklenen hücrelerden 250 µL çekerek bir ependorfa alınır ve 25µL tripanblue boyası eklenir.(1:10 oranında) 5 dk oda sıcaklığında bekletilir.

Thoma lamında sayım yapılmıştır. 3 kez sayılarak ortalaması alınmıştır.

1mL'deki Hücre Sayısı = Karelerdeki Hücre Sayısı x Seyreltme Faktörü x 4 x 10⁶

2.2.1.4. HeLa Hücre Hattının 3 Boyutlu Olarak Geliştirilmesi

Asılı damla yöntemi ile 3 boyutlu hücreler geliştirilmiştir. Tripsin-EDTA ile kaldırılıp medium eklenen hücreler bir ependorfa alınır. 3dakika 4000rpm' da santrifüjleyerek süpernatant atılır ve 750 ml medium eklenir. Bu hazırlanan hücrelerden 10'ar µL (yaklaşık olarak 10.000 hücre) alınarak petrinin üst kapağına pipetle bırakılır. Nem dengesini sağlamak amacıyla petrinin alt tabanına PBS eklenir. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletilir.



Şekil 2.2. 3 Boyutlu Hücre Ekimi

2.2.2. Metformin ve Sisplatin İlaçlarının Hazırlanması

- **Sisplatin hazırlanması:**

Sisplatin ana stoktan 60 μL çekilerek 1000 μL besiyeri bulunan ependorfa aktarılır. Bunun en yüksek dozu (3/4 dilüsyon için) 50 μM olur. Ana stoktan 30 μL çekilerek 1000 μL besiyeri bulunan ependorfa aktarılır. Bunun en yüksek dozu 25 μM olur.

- **Metformin hazırlanması:**

Metformin tabletin yarısı ezerek 15ml'lik falcona alıp içerisine 5ml distile su eklenir. Vorteksle iyice karıştırılır. Bu karışım 600mM olur ve ana stok olmuştur.

Ana stoktan 166 μL alıp içinde 1000 μL medium bulunan ependorfa eklenir. Bunun en yüksek dozu 50 μM olur. Ana stoktan 332 μL alıp içinde 1000 μL medium bulunan ependorfa eklenir. Bunun en yüksek dozu 100 μM olur.

2.2.3. HeLa Hücre Hattı Sitotoksosite Analizi (XTT assay)

2 boyutlu ve 3 boyutlu geliştirilen HeLa hücrelerinde, Metformin ve Sisplatin ilaçlarının etkisini görmek ve hücelere uygulanacak dozu belirlemek için sitotoksosite analizi (XTT Assay) yapılmıştır.

Çalışma sırasında Cell Proliferation XTT (2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil) 2H-tetrazolyum) sitotoksosite analiz kiti kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 8000 hücre gelecek şekilde 96 kuyucuk olan plakalara ekim yapılmıştır.

Tek bir plate için 1 (Plate sayısı) x 50µL (her kuyucuğa eklenmesi gereken hacim)x100(kuyucuk sayısı)= 5mL (total hücre)

Tek bir plate için = 1 (Plate Sayısı) x 8000 (hücre sayısı) x100(kuyucuk sayısı)=8x10⁵mL/cell

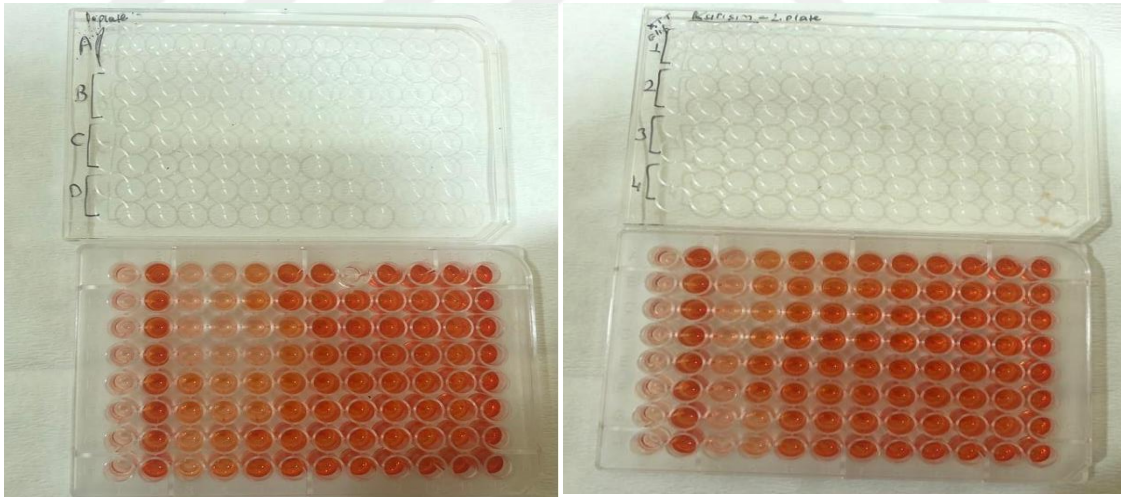
2plate için yapılan denklemde ise

1mL de 16x10⁵ hücre var ise

? mL de 13x10⁵ hücre olur

?=1,23µL total hücreden alınması gerekir. Total hacme tamamlamak için medium eklenir.

Plakanın bir kolonu besiyeri kontrolü olduğundan hücre ekimi yapılmamıştır. Diğer kuyucuklara da 50µL hacminde ekim yapılmıştır.



Şekil 2.3. XTT 1. Plate ve 2. Plate

Ekimden bir süre sonra 1.plate'e Metformin (50µM ile 100µM) ve Sisplatin (50µM ile 25µM), 2.plate'e Metformin ve Sisplatin karışım olarak seri dilüsyonlar halinde kuyucuklara verilmiştir. 72 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir.

72 saat sonra Biologicalindustries isimli XTT kiti kullanılmıştır. Her plate başına, bir şişe XTT reagent solusyonu A ve 100µL XTT aktivator solusyonu karışımı hazırlanır. Karışımdan her bir kuyucuğa 50µL eklenerek 4 saat inkübatörde beklenir. 450 absorbans aralığında ELİSA okuyucusu ile optik yoğunluklar belirlenmiştir.

İlaç verilmeyen kuyucukta büyüme oranını %100 kabul ederek farklı dilüsyonları içeren diğer kuyucuklardaki büyüme buna oranlanarak belirlenmiştir. Gen5 2.06 programı ile sonuçlar analiz edilmiştir.

XTT sonuçlarına göre Metformin IC₅₀ (LD₅₀): 43 mM, Sisplatin IC₅₀ (LD₅₀) : 23 µM olarak belirlenmiştir.

2.2.4. Metformin ve Sisplatin HeLa Hücrelerine Uygulanması

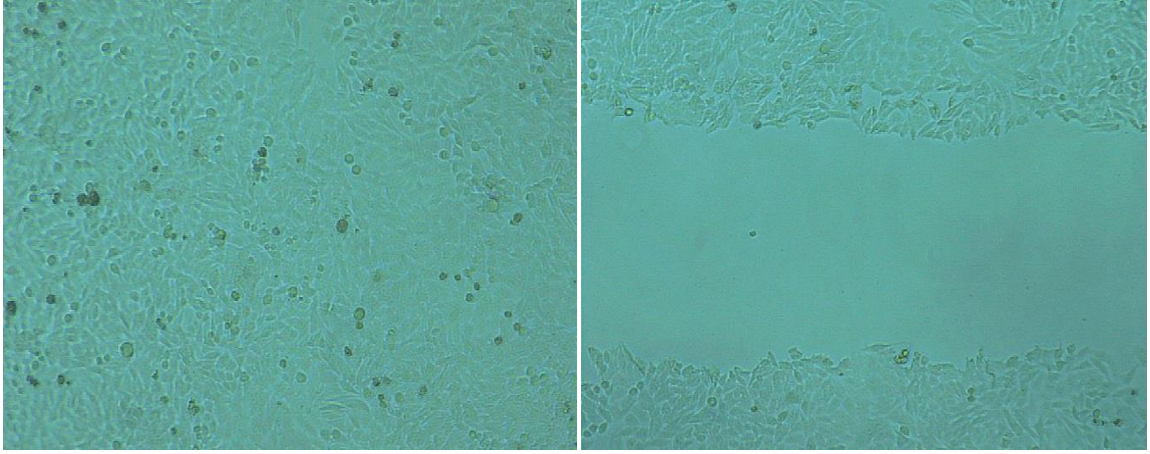
XTT sonuçlarına göre Metforminin IC₅₀ (LD₅₀): 43 mM, Sisplatinin IC₅₀ (LD₅₀) : 23 µM değerlerine ulaşılmıştır.

Ana stoklar hazırlandıktan sonra kullanılacak miktarlara göre $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülünü kullanarak ilaçların 2,4,6,8,10 katları hazırlanmıştır. Formüle göre ana stoktan gerekli miktarda ilaç alınarak üzerine medium eklenip toplam hacime ulaşılır.

2.2.5. Hücre Motilitesini ve Hücre İstilasını Tespit Etmek

2.2.5.1. Migrasyon Assay (Yara İyileştirme Çalışması)

Metastaz kabileyetini ölçmek için hücre göç analizi yapılır. 6'lı ve 12'li wellplate'lere hücre ekimleri yapılarak, hücreler tabana iyice yapışıp alanı kapladıklarında (yaklaşık 72 saat sonra) yara açılmıştır. Yara açılma olayı ise hücreler yeterince çoğaldığında pipet ucu yardımıyla hızlıca bir çizik çekilmesidir.



Şekil 2.4. HeLa Hücresi Migrasyon Deneyi

A: HeLa Hücresi Migrasyon öncesi (10x) B: HeLa Hücresi Migrasyon sonrası(10x)

Metformin ve Sisplatinin LD₅₀ değerlerinden 2,4,6,8,10 katları ve bu iki ilacın katları karışım halinde hücrelere verilmiştir. İlaç verilmiş hücrelerin 0,24,48,72. saatleri fotoğraflanmıştır. Kontrol olarak da hiçbir ilaç verilmeden sadece medium içerisinde yaranın kapanması incelenmiştir.

2.2.5.2. İnvazyon Assay (Giemsa Boyama)

Giemsa boyama tekniği ile apoptotik hücre oranı değerlendirilmiştir. Giemsa boyamasındaki amaç, Metformin ve Sisplatinin tek başına ve karışım halinde LD₅₀ değerleriyle çeşitli katlarını hücrelere verdiğimizde 48.saatte canlılığın ne kadar olduğunu bulmaktır.

Hücreler 6'lı ve 12'li wellplate'lere ekimleri yapılarak, hücreler tabana iyice yapışıp alanı kapladıklarında Metformin ve Sisplatin verilmiştir. Hücrelerin fotoğrafları 0 ve 24. saatlerde çekilerek 48.saatlerinde Giemsa ile boyanarak fotoğraflanmıştır.

Giemsa boyaması yapılırken aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

- Kuyucuklu plate'teki medium çekilerek 1 ml PBS ile yıkanması ve PBS'in uzaklaştırılması
- 2 ml formaldehit ekleyerek 2 dk oda sıcaklığında beklenmesi ve formaldehitin uzaklaştırılması

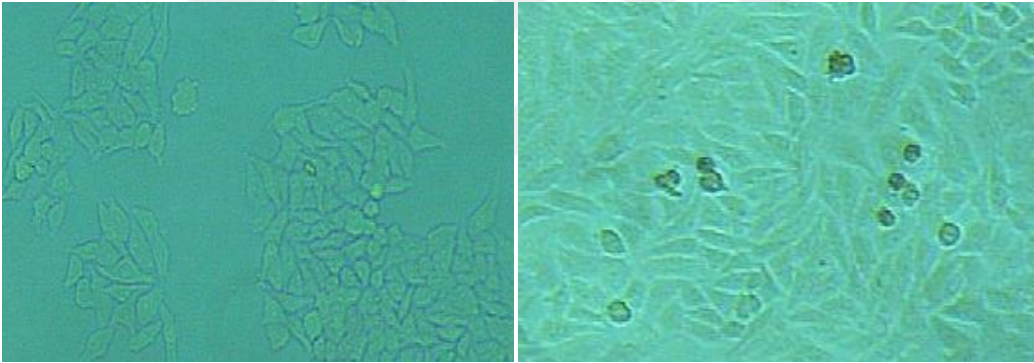
- 1 ml giemsa boyası eklenerek hücreler alüminyum folyo ile kapatılarak 20 dk beklenmesi
- Giemsa boyası uzaklaştırarak tekrar PBS ile yıkanması

Tüm bu işlemlerden sonra hücreler mikroskopta 10X büyüklüğünde fotoğraflanmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı

HeLa hücreleri geliştirilirken flask tabanının çoğunluğunu kaplamamıştır. Ekim yapıldıktan 72 saat sonra yeterince gelişme gösterdiği 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.

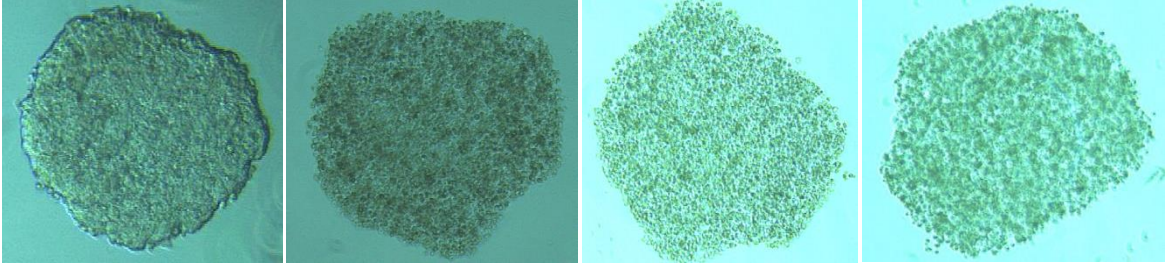


Şekil 3.1: İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı

A: HeLa hücre hattı 24.saat **B:** HeLa hücre hattı 72.saat

3.2. 3 Boyutlu HeLa Hücre Hattı

Yaklaşık 10.000 hücre alınarak yapılan 3 boyutlu HeLa hücre hattına Metformin ve Sisplatin verilerek 72.saate kadar incelenmiştir. Metformin ve Sisplatinin HeLa üzerindeki etkileri 10X mikroskop altında incelenmiştir.

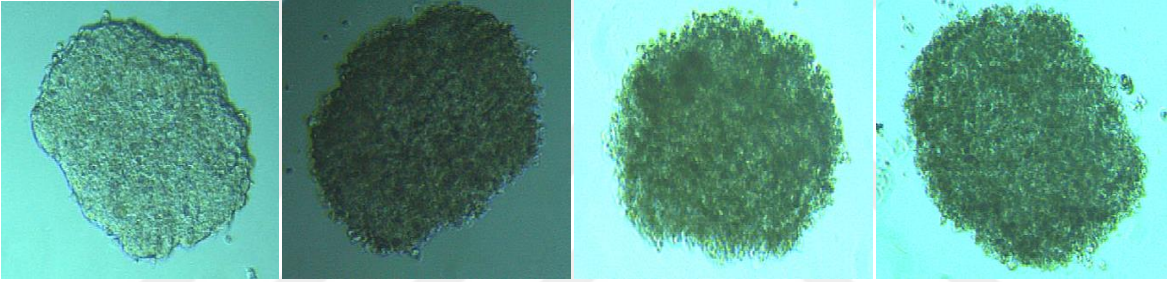


Şekil 3.2: Üç Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü D: 72.Saat Görüntüsü

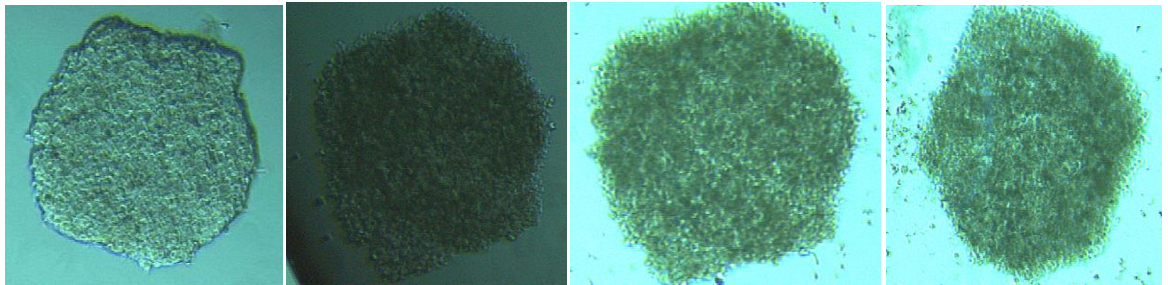
3.2.1. 3 Boyutlu HeLa Hücre Hattı Üzerinde Metformin Etkisi

Metformin ilacı, HeLa hücrelerine LD₅₀ değerinde ve LD₅₀ değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde verilmiş ve Metformin etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



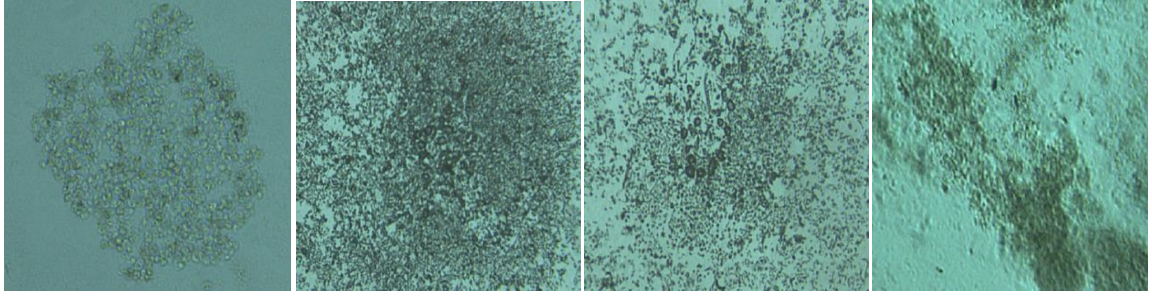
Şekil 3.3: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD₅₀ Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü D: 72.Saat Görüntüsü



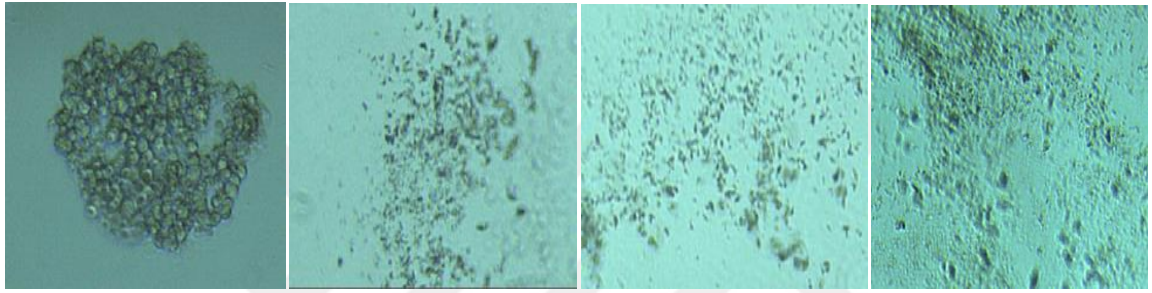
Şekil 3.4: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü D: 72.Saat Görüntüsü



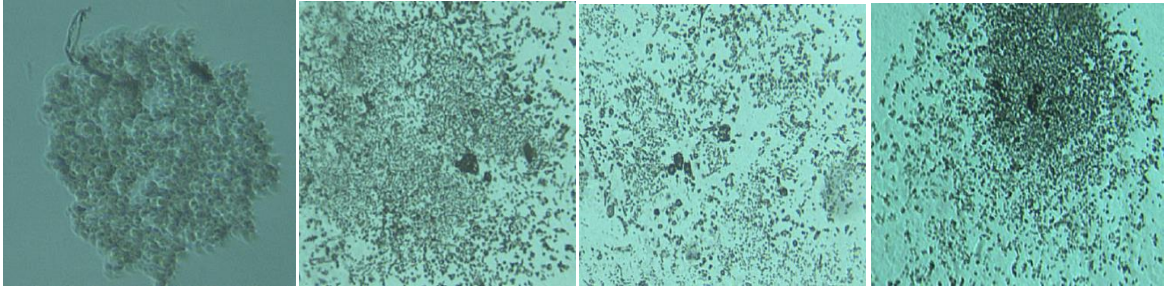
Şekil 3.5: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



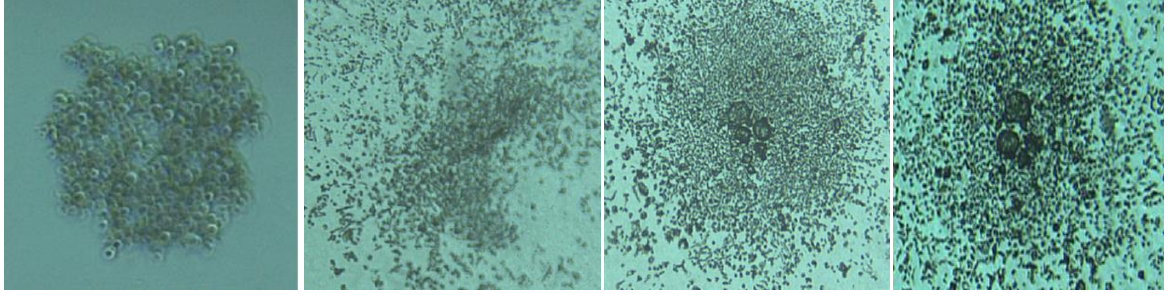
Şekil 3.6: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



Şekil 3.7: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

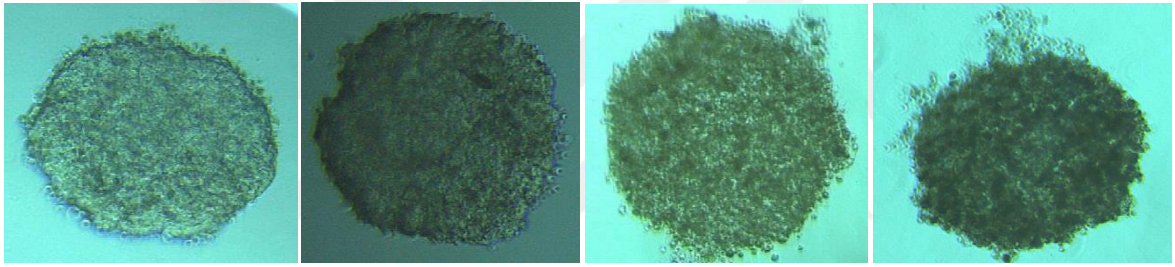


Şekil 3.8: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü D: 72.Saat Görüntüsü

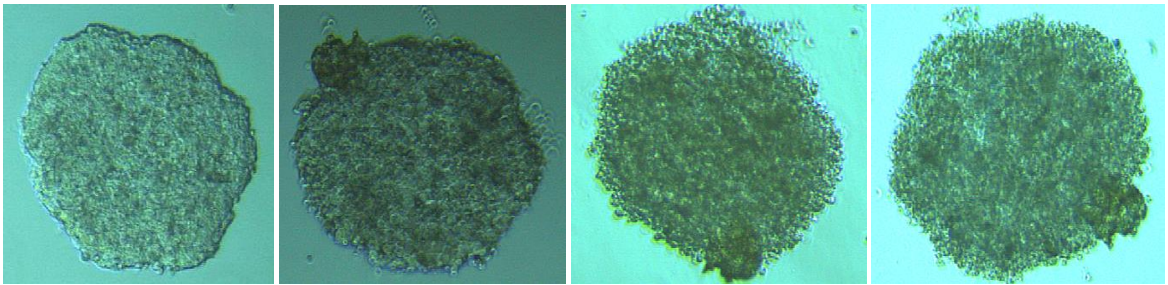
3.2.2. 3 Boyutlu HeLa Hücre Hattı Üzerinde Sisplatin Etkisi

Sisplatin ilacı, HeLa hücrelerine LD50 değerinde ve LD50 değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde verilmiş ve Sisplatin etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



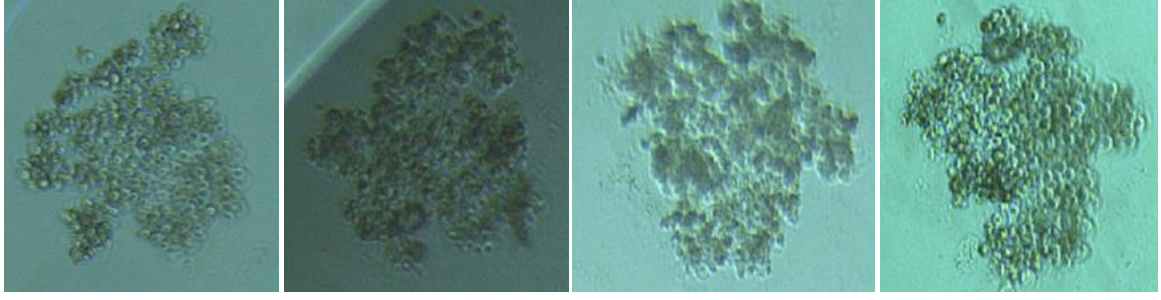
Şekil 3.9: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü D: 72.Saat Görüntüsü



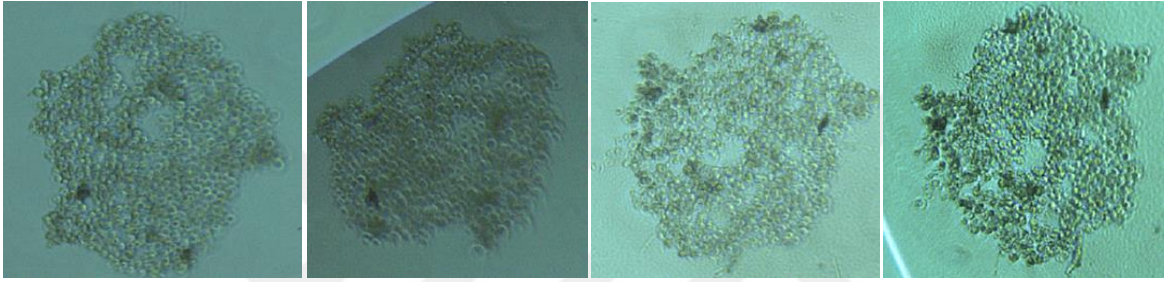
Şekil 3.10: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü D: 72.Saat Görüntüsü



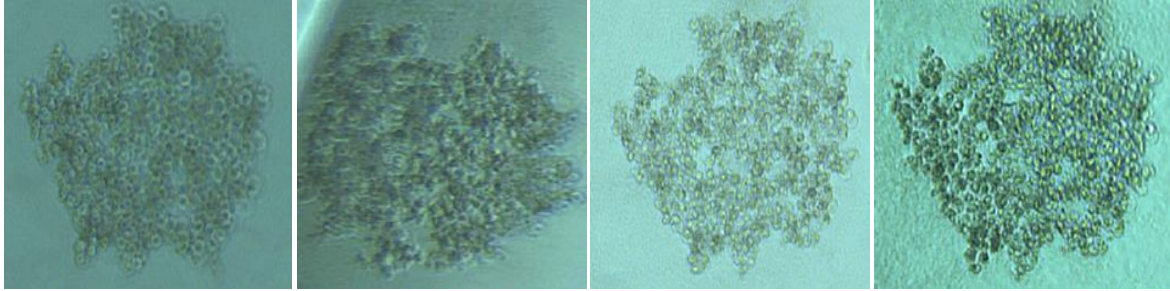
Şekil 3.11: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



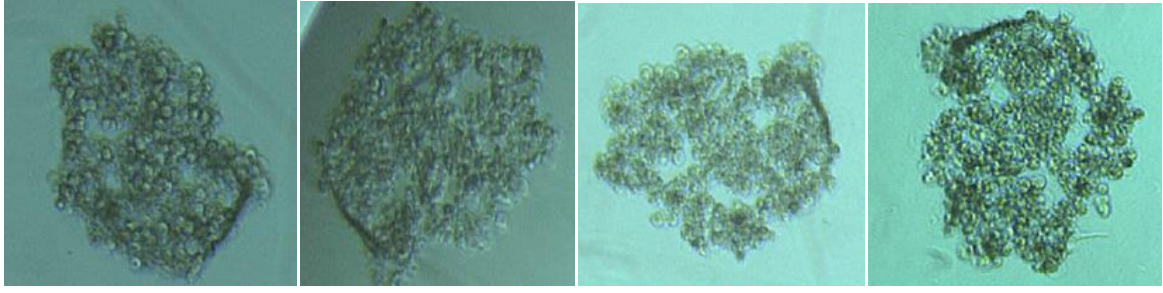
Şekil 3.12: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



Şekil 3.13: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

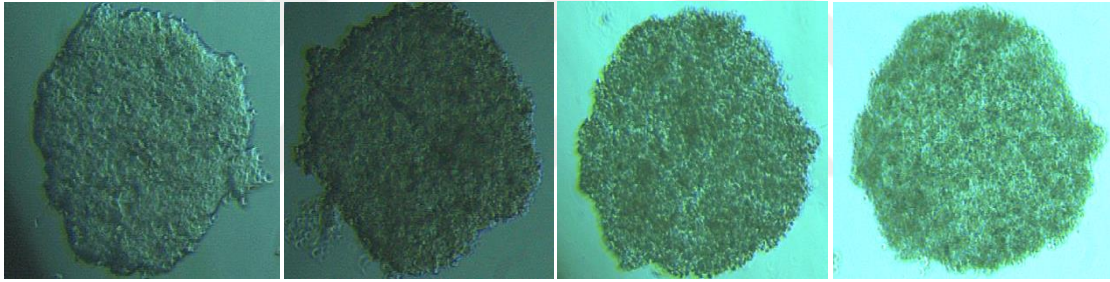


Şekil 3.14: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

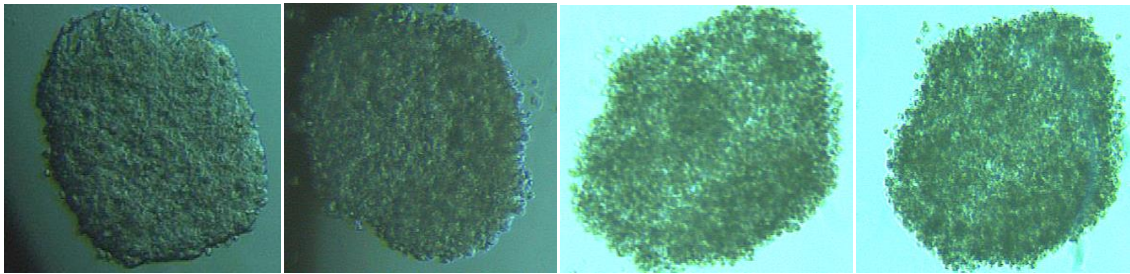
3.2.3. 3 Boyutlu HeLa Hücre Hattı Üzerinde Sisplatin ve Metforminin Birlikte Etkisi

Metformin ve Sisplatin ilaçlarını LD50 değerinde ve LD50 değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde karıştırılarak HeLa hücre hattına verilmiştir. Bu iki ilaç karışımının etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



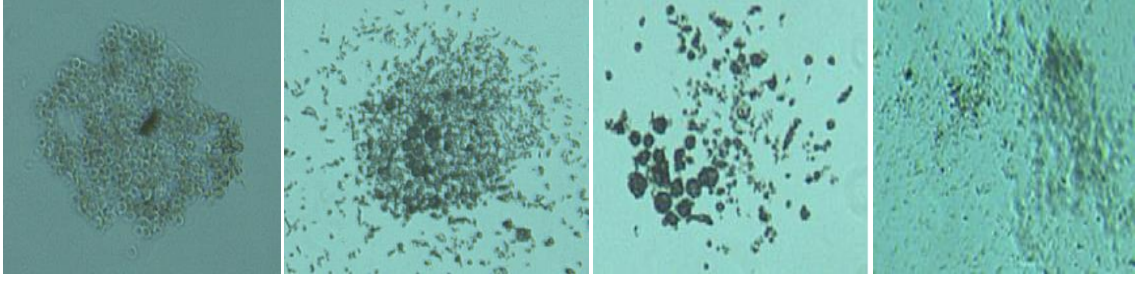
Şekil 3.15: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Karışımının Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



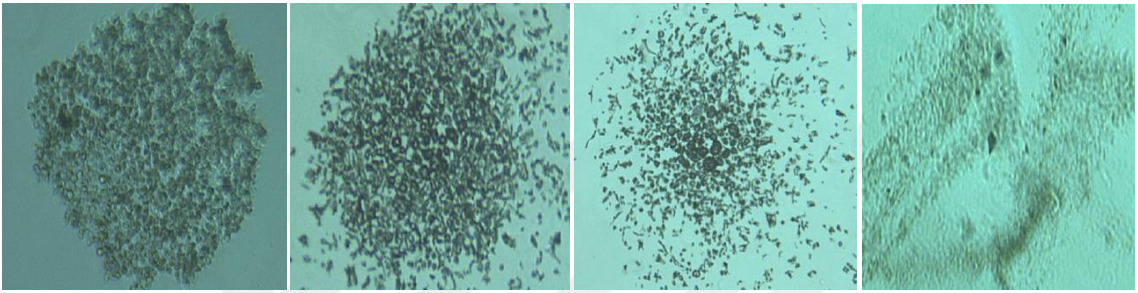
Şekil 3.16: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Karışımının Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



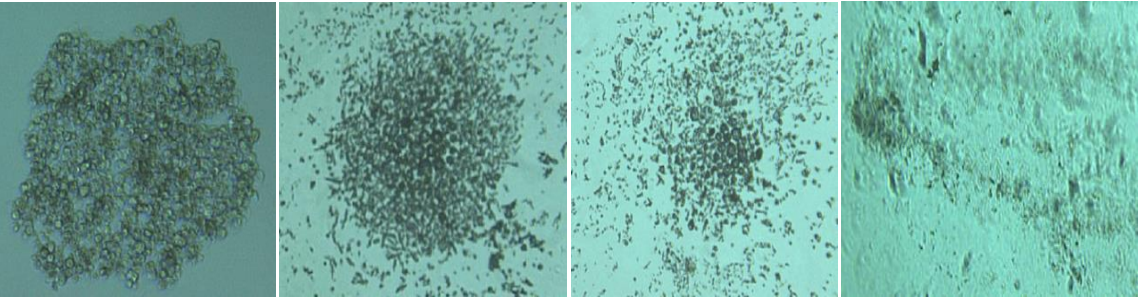
Şekil 3.17: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Karışımının Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



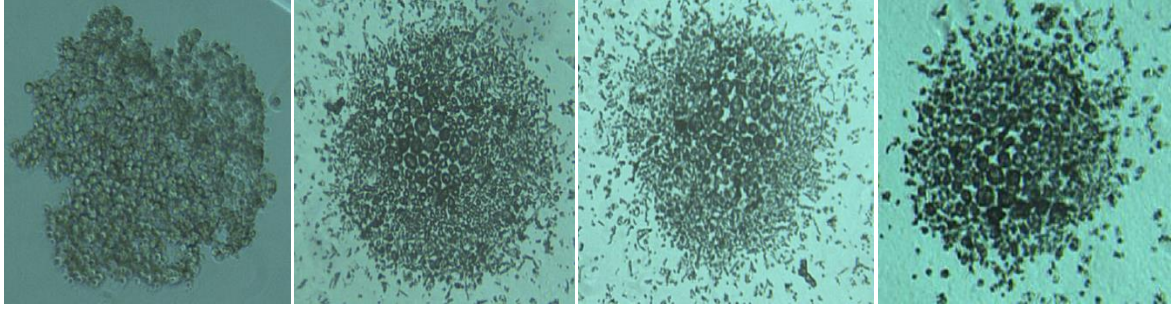
Şekil 3.18: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Karışımının Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



Şekil 3.19: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD50 Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Karışımının Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

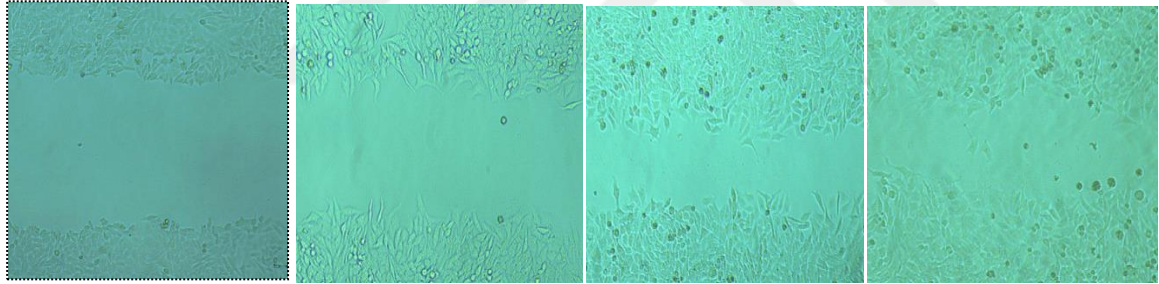


Şekil 3.20: Üç Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattına LD₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Karışımının Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

3.3. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı Motilite Analizi

Yaklaşık 200.000 hücre olan HeLa hücre hattı 6'lı wellplate'e ekilerek taban tamamen kaplandığında yara açılmıştır. Yara açıldığı anı 0. Saat olarak belirleyip Metformin ve Sisplatin verilmiştir.72. saate kadar incelenerek yaranın ne kadar sürede kapandığı ve verilen ilaçların etkileri 10X mikroskop altında incelenmiştir.

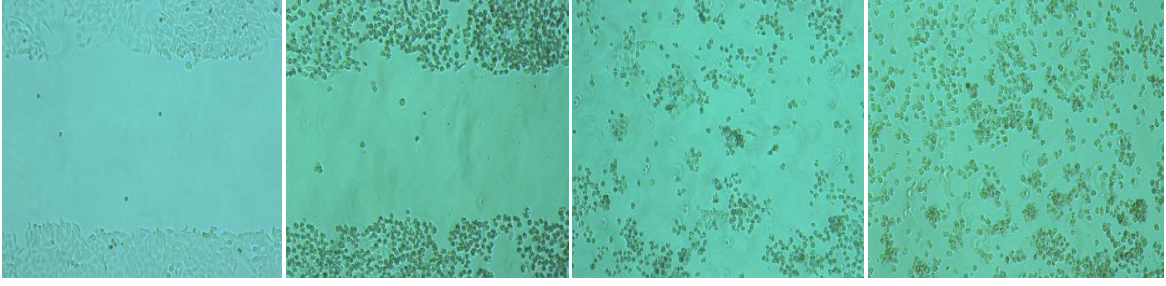


Şekil 3.21: İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı Motilite Analizi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

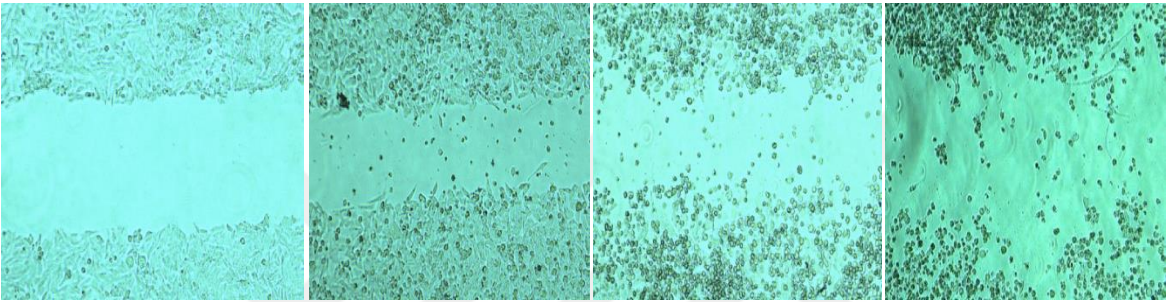
3.3.1. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde Metformin Etkisi

Yara açıldıktan sonra Metformin ilacı, HeLa hücrelerine LD₅₀ değerinde ve LD₅₀ değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde verilmiş ve Metformin etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



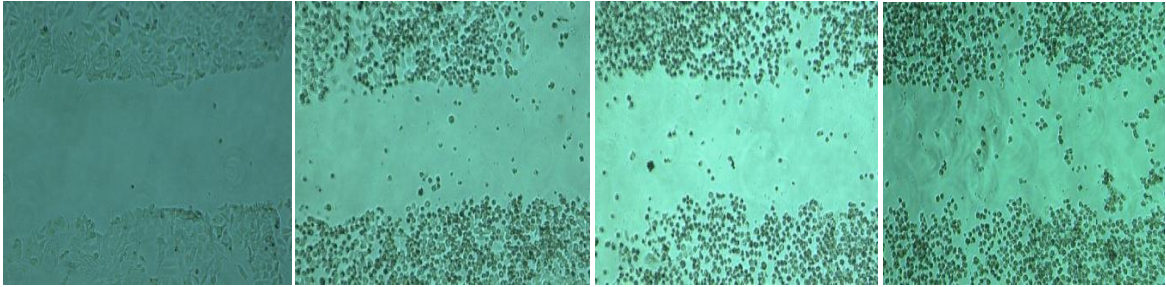
Şekil 3.22: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



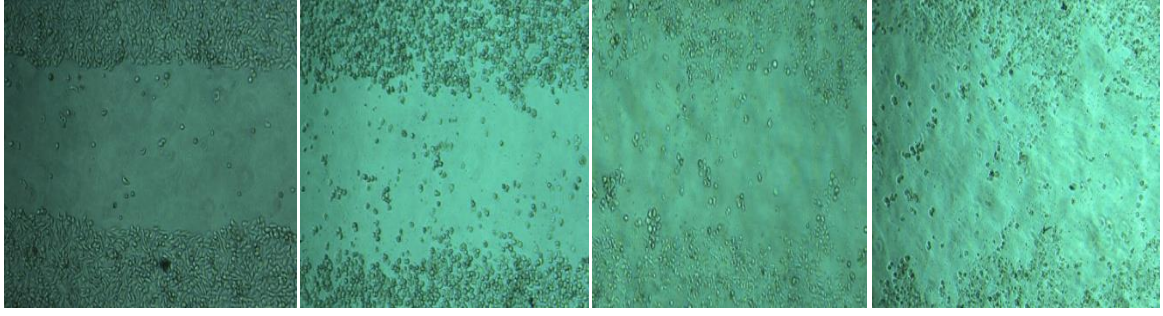
Şekil 3.23: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



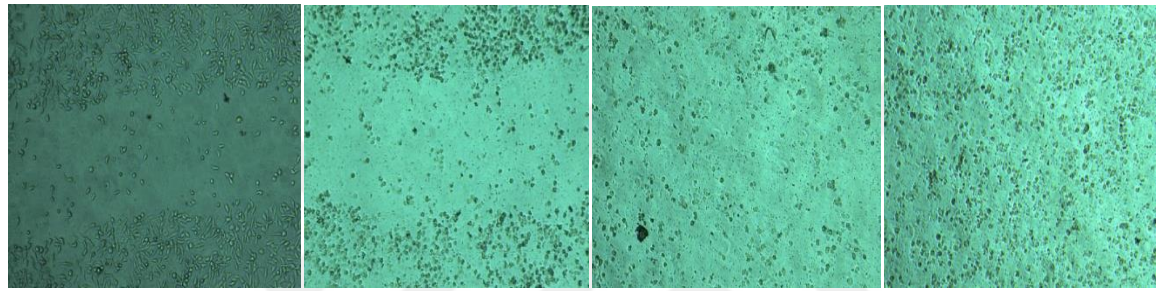
Şekil 3.24: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



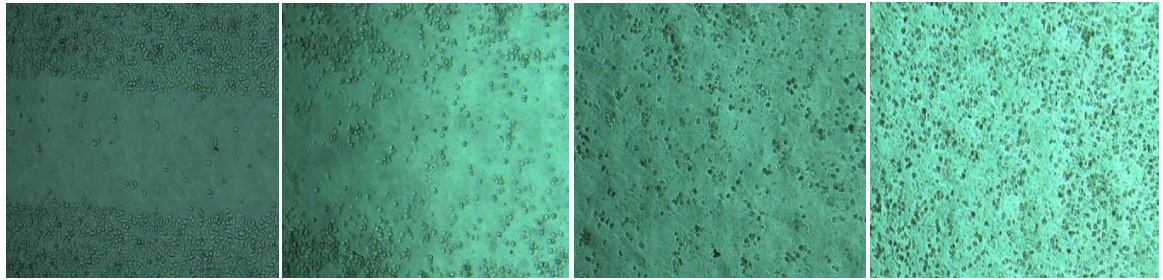
Şekil 3.25: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



Şekil 3.26: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

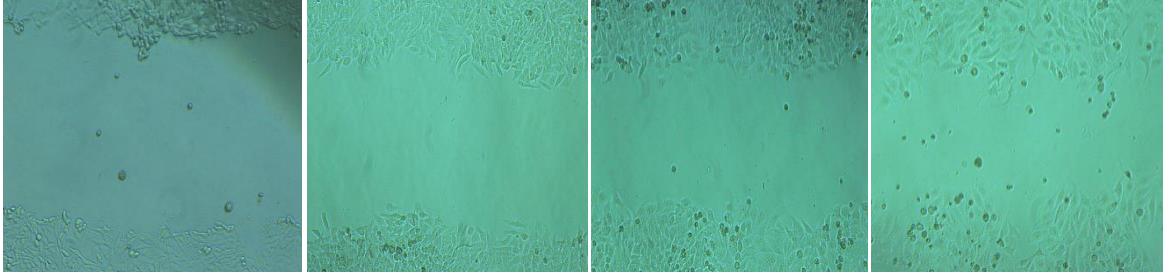


Şekil 3.27: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

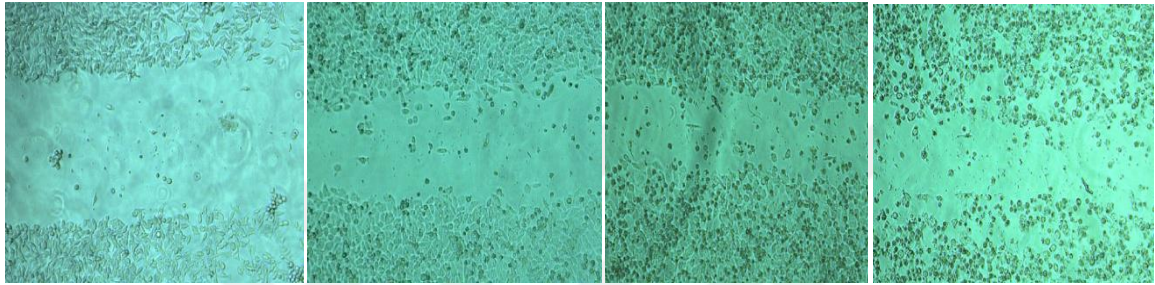
3.3.2. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde Sisplatin Etkisi

Yara açıldıktan sonra Sisplatin ilacı, HeLa hücrelerine LD50 değerinde ve LD50 değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde verilmiş ve Sisplatin etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



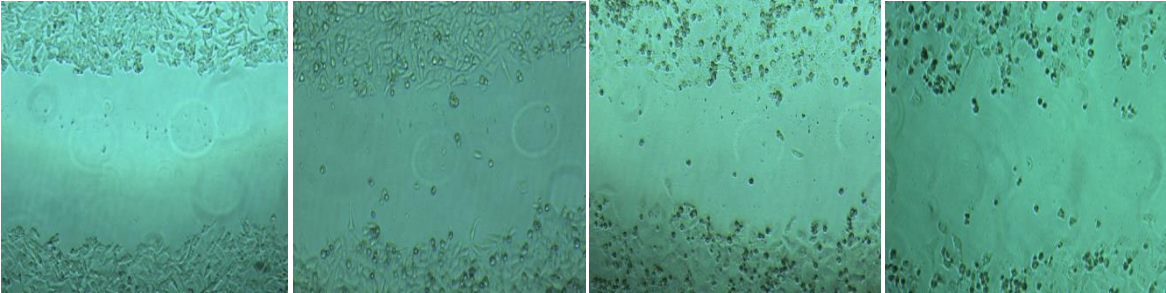
Şekil 3.28: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



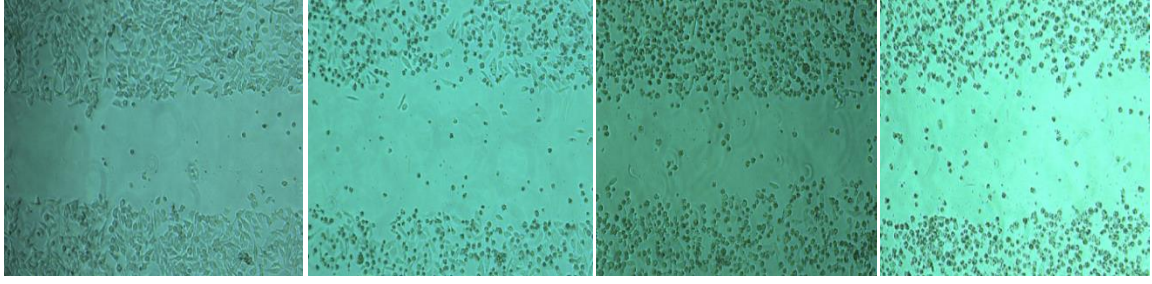
Şekil 3.29: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



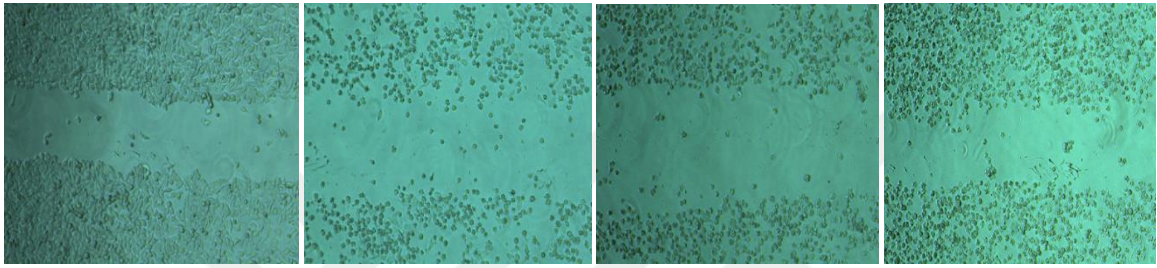
Şekil 3.30: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD50 Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



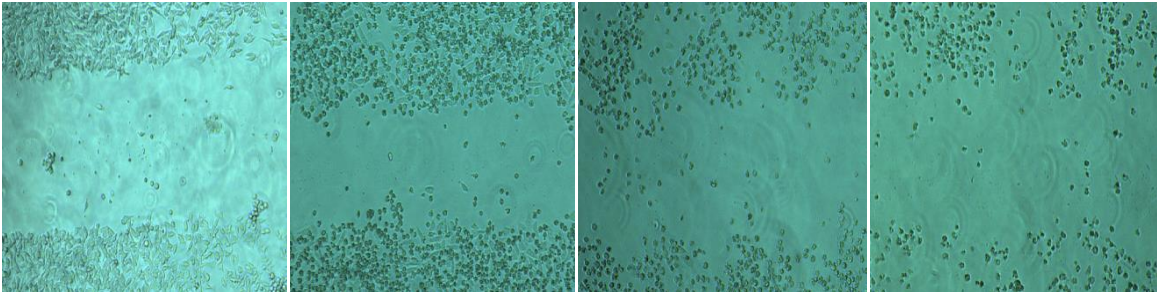
Şekil 3.31: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



Şekil 3.32: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

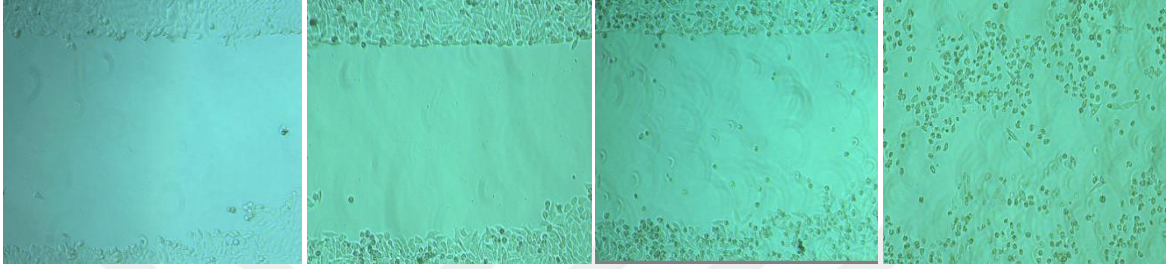


Şekil 3.33: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

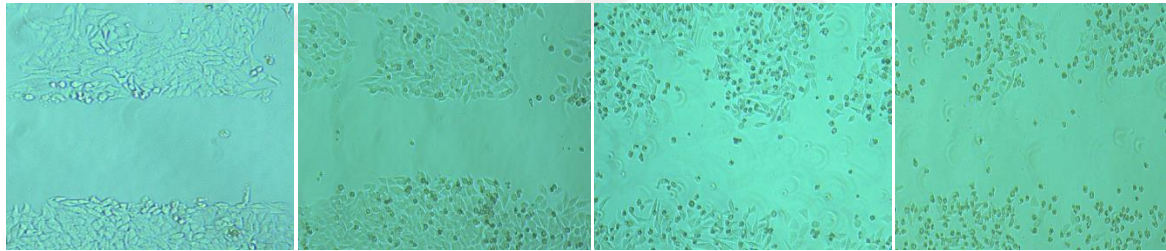
3.3.3. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde Sisplatin ve Metforminin Birlikte Etkisi

Yara açıldıktan sonra metformin ve sisplatin ilaçlarını LD₅₀ değerinde ve LD₅₀ değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde HeLa hücre hattına uygulanmıştır. Bu iki ilaç karışımının etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



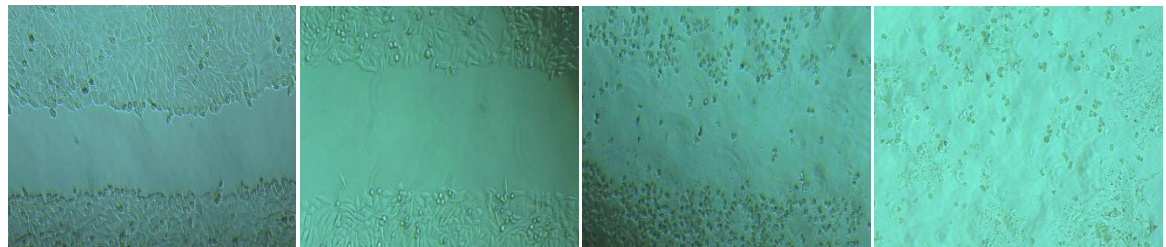
Şekil 3.34: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



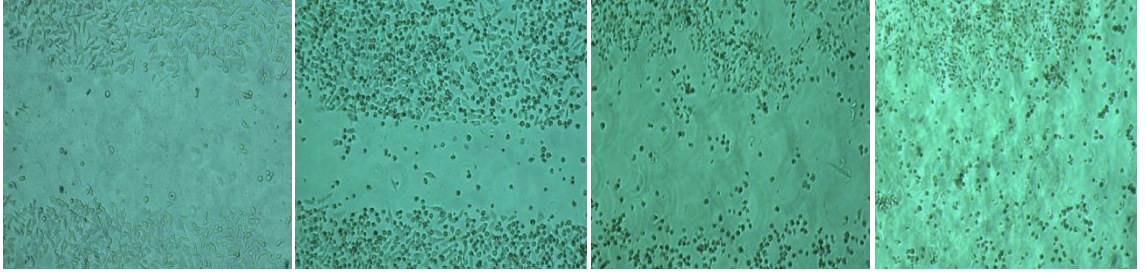
Şekil 3.35: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 2 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



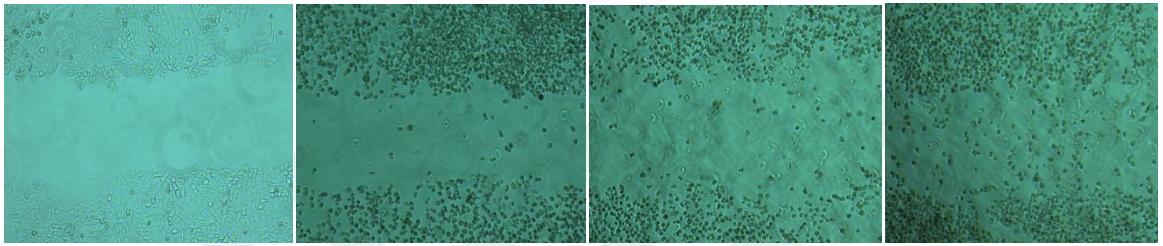
Şekil 3.36: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 4 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



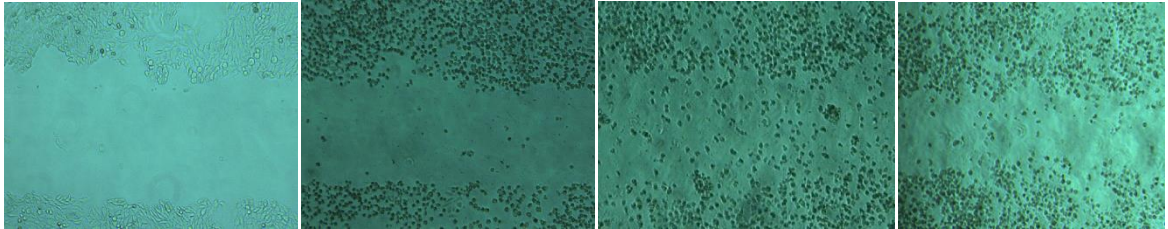
Şekil 3.37: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 6 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü



Şekil 3.38: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 8 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

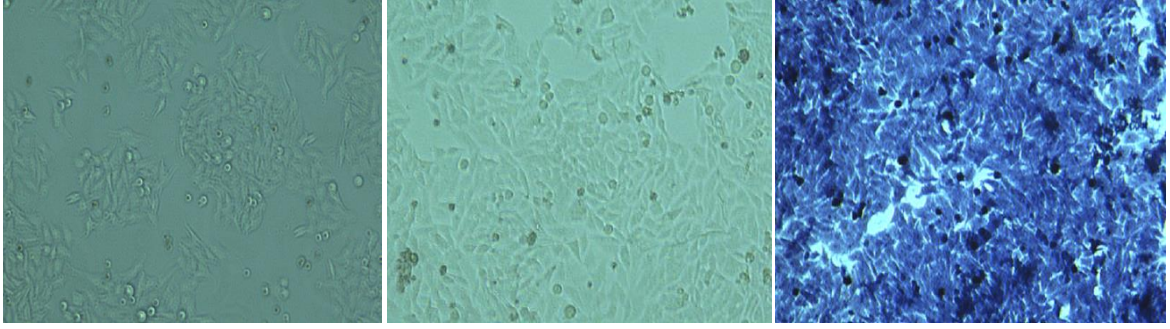


Şekil 3.39: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı Motilite Analizinde LD₅₀ Değerinin 10 Katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü **D:** 72.Saat Görüntüsü

3.4. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizi

Yaklaşık 200.000 hücre olan HeLa hücre hattı 6'lı kuyucuklu plate'e ekilerek taban tamamen kaplandığında 0. Saat olarak belirlenip Metformin ve Sisplatin ilaçları verilmiştir. 48. saate kadar incelenerek Giemsa ile boyanmıştır. Verilen ilaçların etkileri 10X mikroskop altında incelenmiştir.

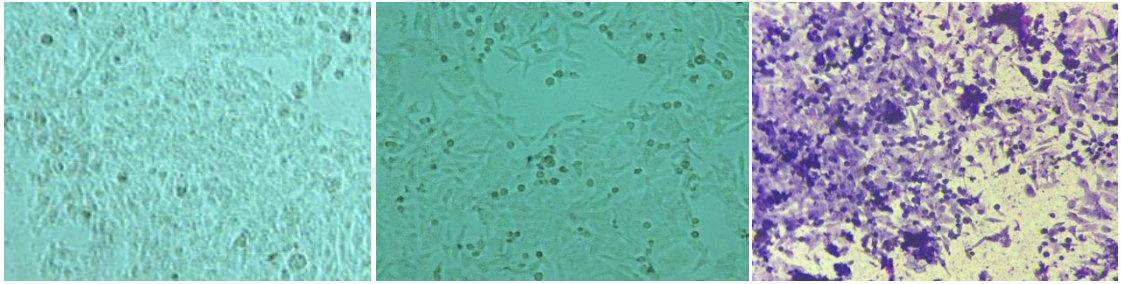


Şekil 3.40: İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol HeLa Hücre Hattı İstila Analizi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü

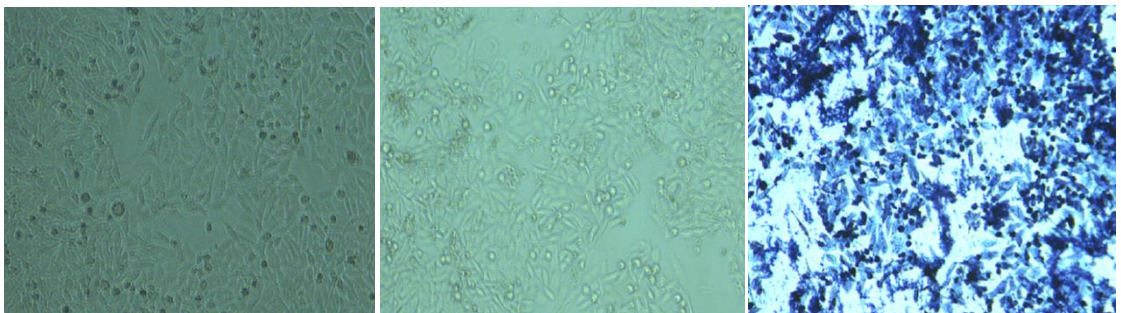
3.4.1. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde Metformin Etkisi

Metformin ilacı, HeLa hücrelerine LD50 değerinde ve LD50 değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde verilmiştir ve 48. Saatte Giemsa ile boyanarak etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



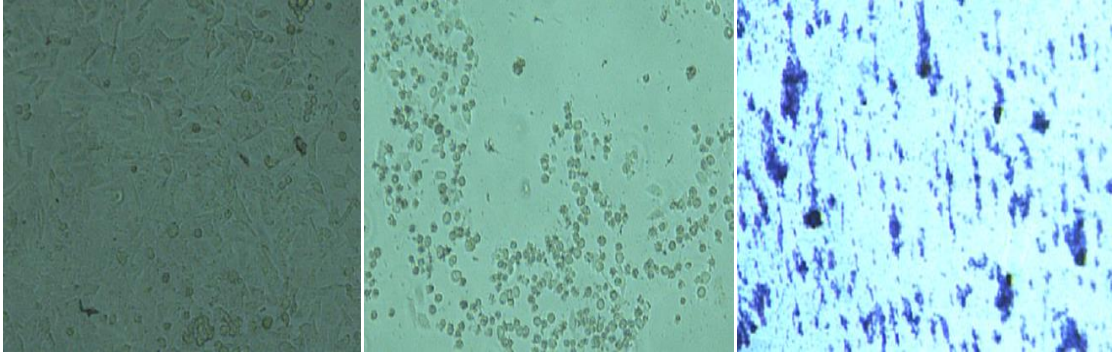
Şekil 3.41: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü



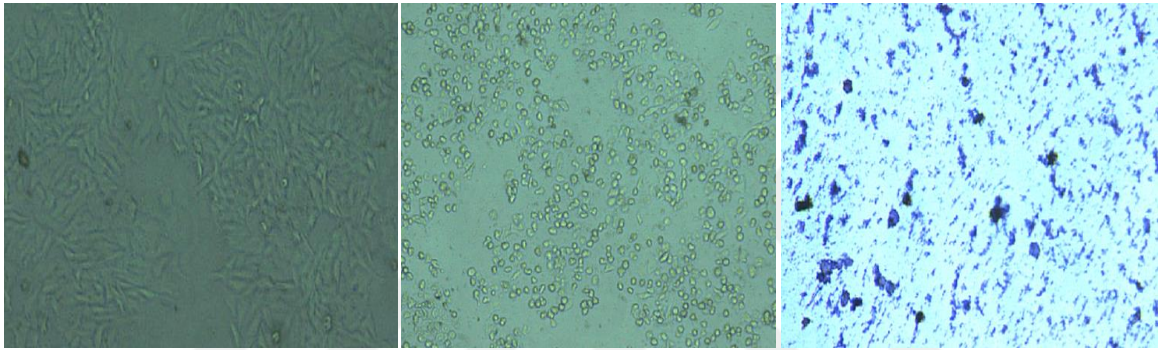
Şekil 3.42: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 2 katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü



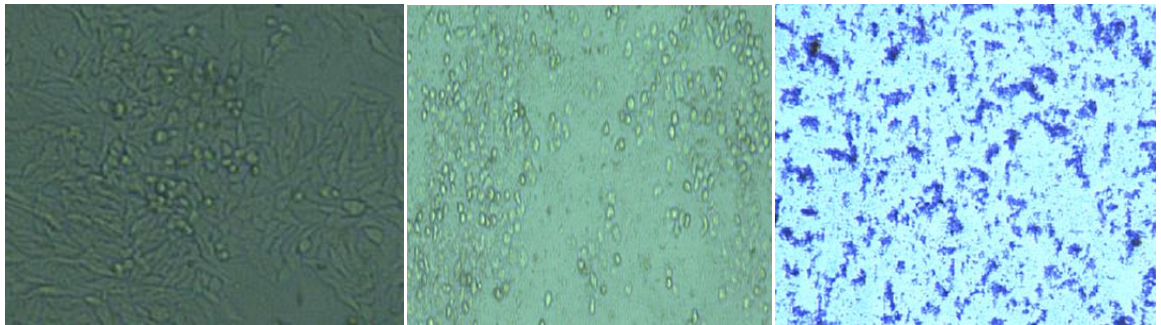
Şekil 3.43: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 4 katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü



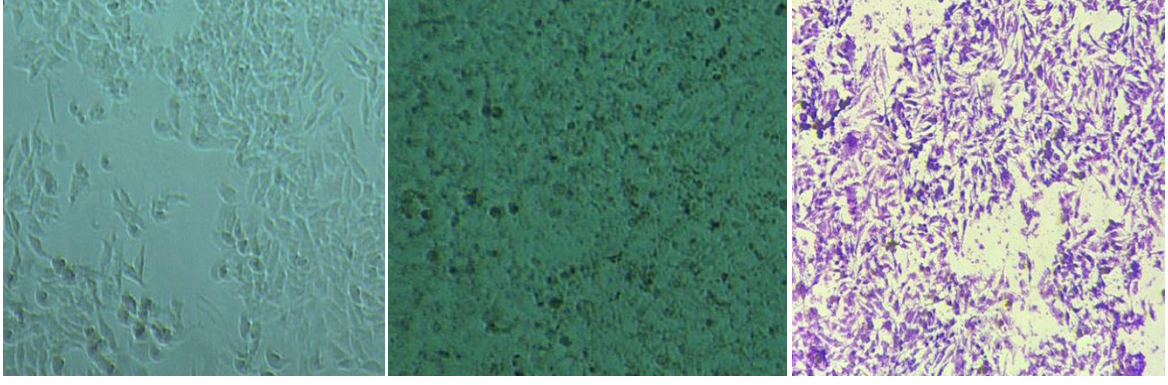
Şekil 3.44: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 6 katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü



Şekil 3.45: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 8 katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü

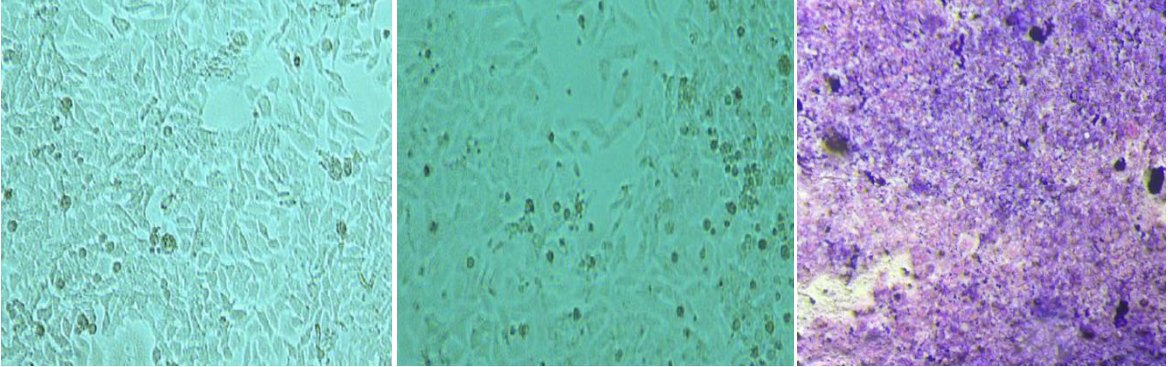


Şekil 3.46: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD₅₀ Değerinin 10 katı Değerinde Verilen Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü

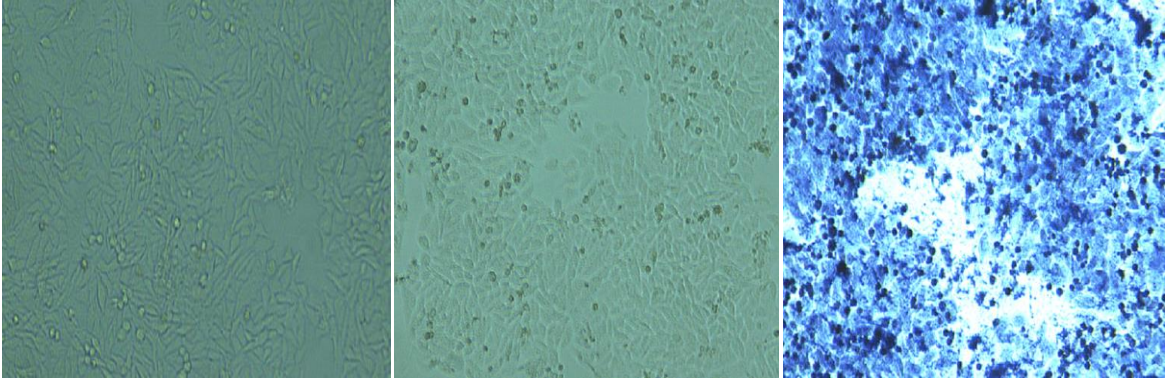
3.4.2. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde Sisplatin Etkisi

Sisplatin ilacı, HeLa hücrelerine LD₅₀ değerinde ve LD₅₀ değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde verilmiştir ve 48. Saatte Giemsa ile boyanarak etkileri 10X mikroskop altında gözlemlenmiştir.



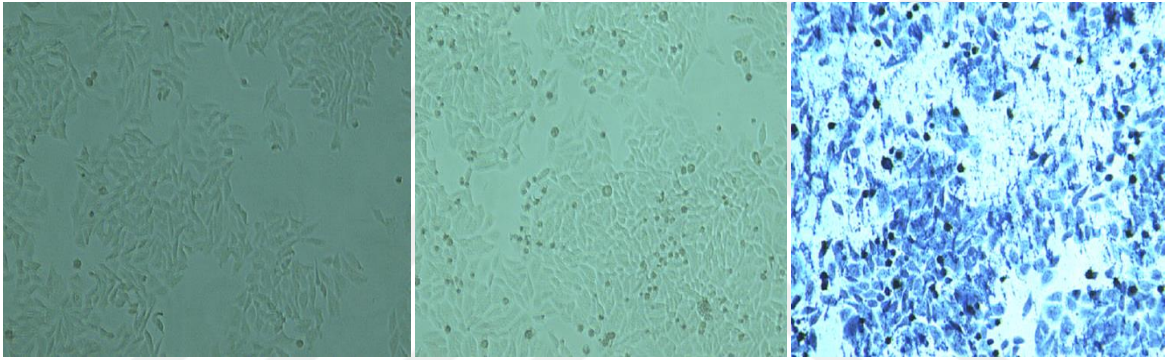
Şekil 3.47: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD₅₀ Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü



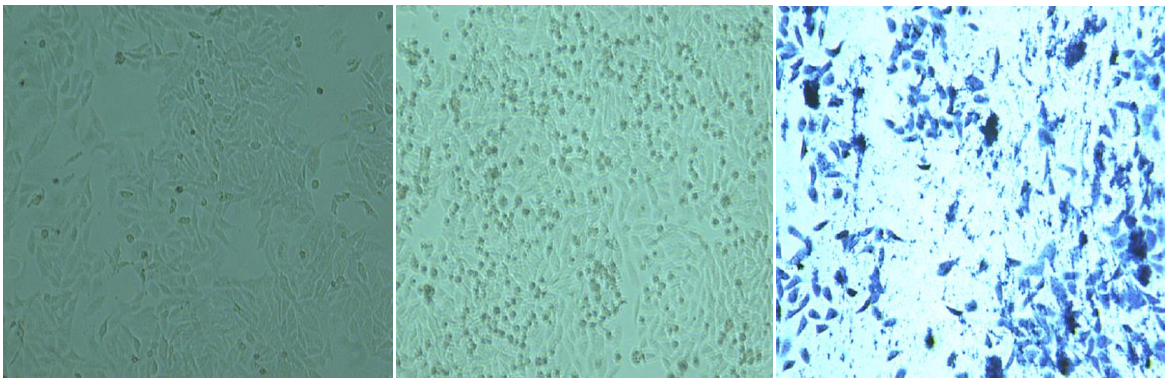
Şekil 3.48: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 2 katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü



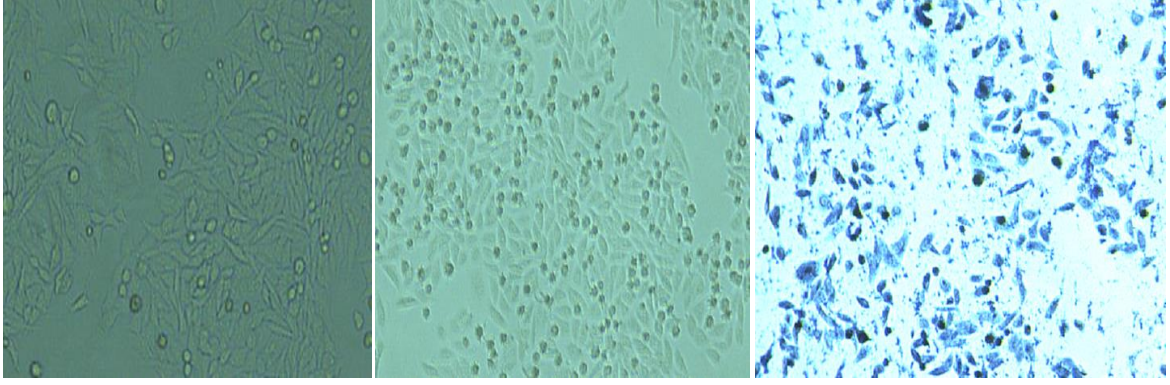
Şekil 3.49: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 4 katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü



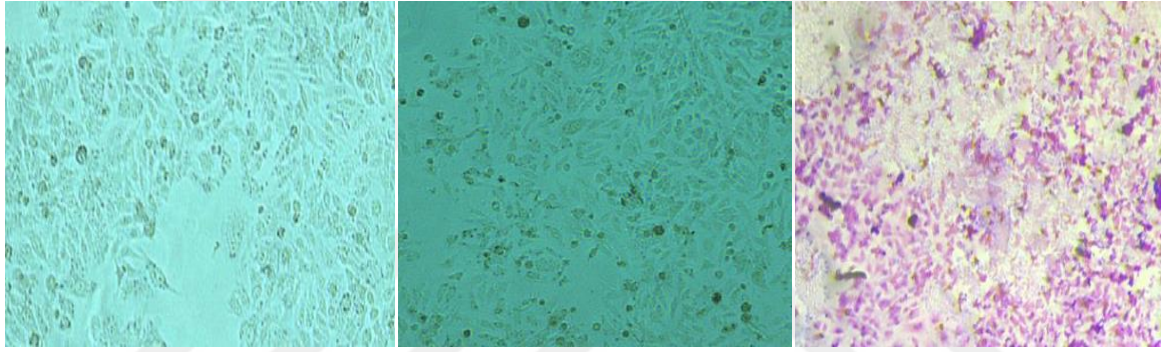
Şekil 3.50: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 6 katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü



Şekil 3.51: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 8 katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü

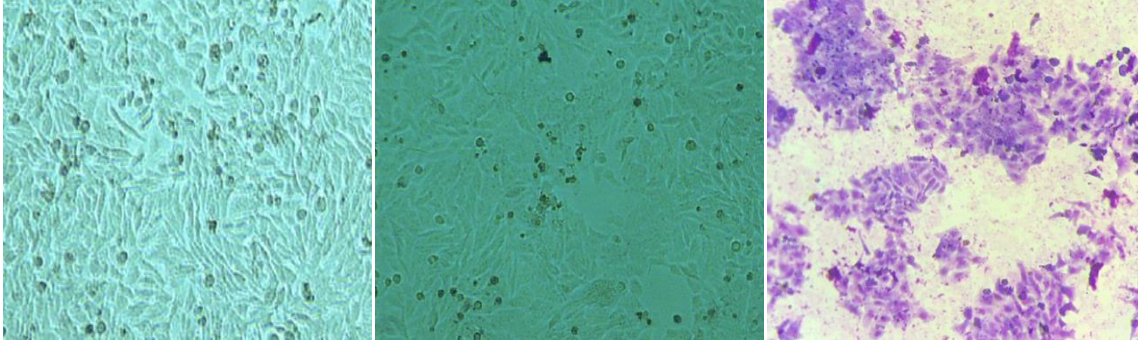


Şekil 3.52: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 10 katı Değerinde Verilen Sisplatin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü B: 24.Saat Görüntüsü C: 48.Saat Görüntüsü

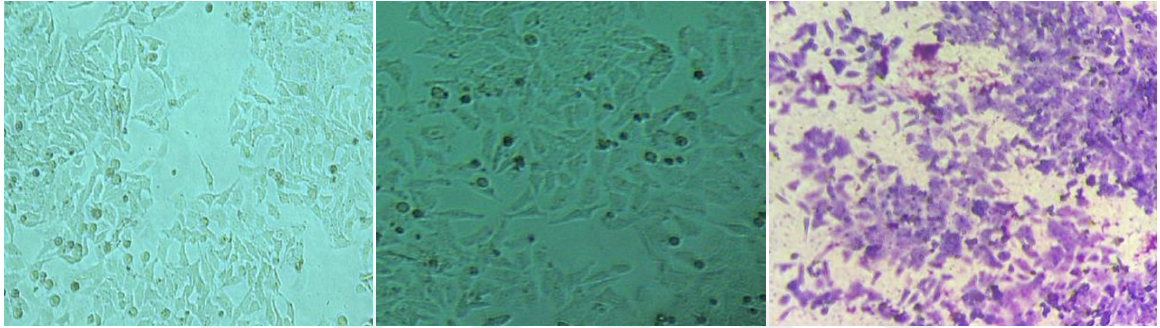
3.4.3. 2 Boyutlu HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde Sisplatin ve Metforminin Birlikte Etkisi

Sisplatin ve Metformin ilacı, HeLa hücrelerine LD50 değerinde ve LD50 değerinin 2,4, 6, 8, 10 katları şeklinde uygulanmıştır ve 48. Saatte Giemsa ile boyanarak etkileri 10X mikroskop lensi altında gözlemlenmiştir.



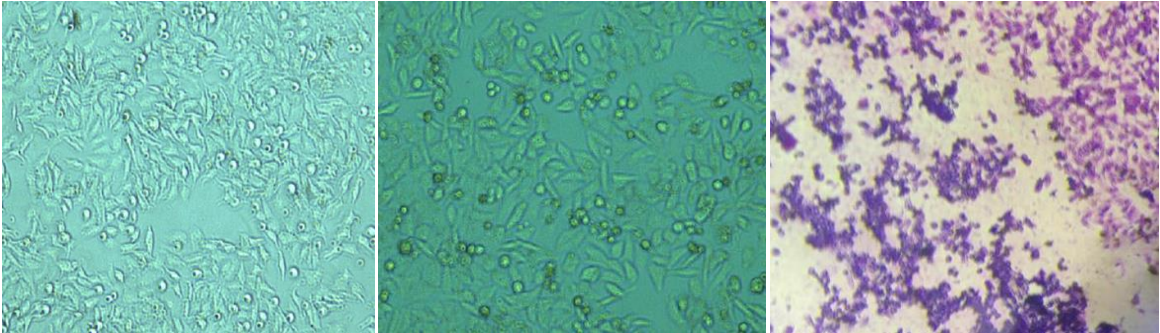
Şekil 3.53: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinde Verilen Sisplatin+ Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü



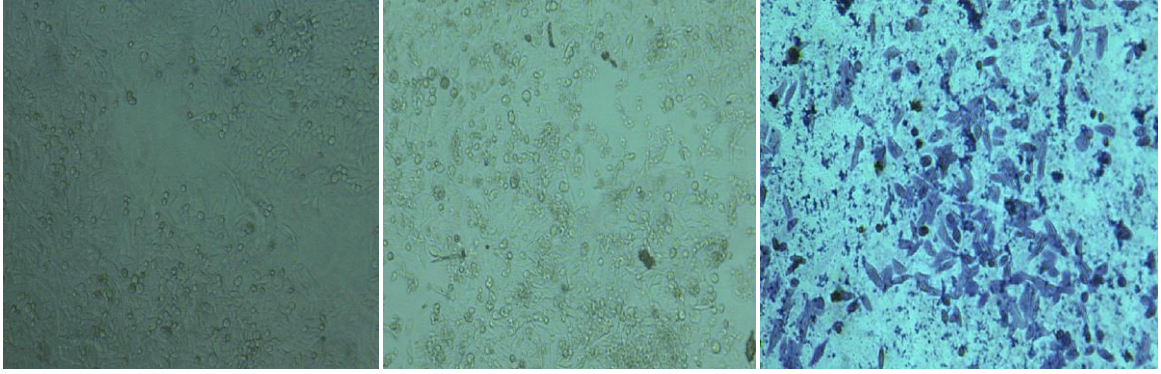
Şekil 3.54: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 2 katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü



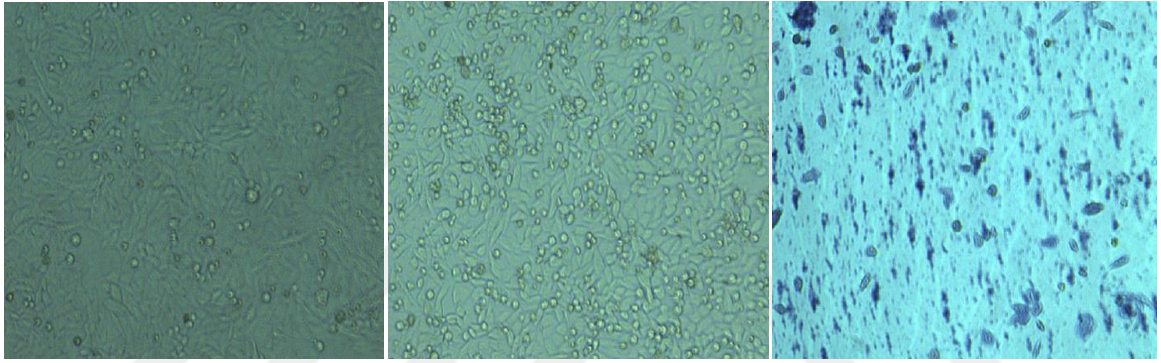
Şekil 3.55: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 4 katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü



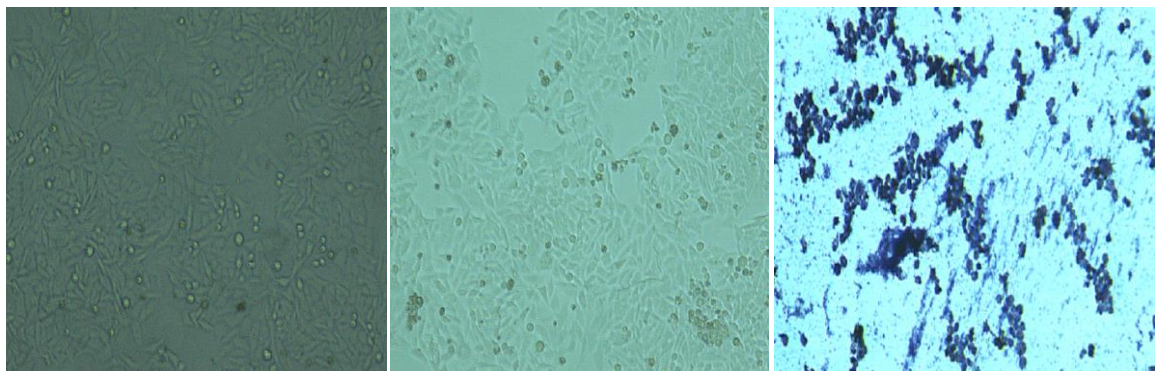
Şekil 3.56: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 6 katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü



Şekil 3.57: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 8 katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü



Şekil 3.58: İki Boyutlu Geliştirilen HeLa Hücre Hattı İstila Analizinde LD50 Değerinin 10 katı Değerinde Verilen Sisplatin+Metformin Etkisi

A:0.Saat Görüntüsü **B:** 24.Saat Görüntüsü **C:** 48.Saat Görüntüsü

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya üzerinde kanser vakaları arttıkça bu hastalık üzerine yapılan çalışmaların sayısı da artmaktadır. Ölüm oranı kalp hastalıklarından sonra en fazla olan bu hastalık üzerinde çeşitli tedavi yöntemleri ve yeni ilaç geliştirme çalışmaları tüm hızıyla devam etmektedir. Sisplatin; meme kanseri, rahim kanseri ve akciğer kanseri gibi hastalıklarda DNA replikasyonu ve transkripsiyon özelliğini bozmaya yönelik kullanılan bir ilaçtır. Metformin ilacı ise şimdiye kadar diyabet hastalıklarında kullanılmış ve son yapılan çalışmalarda kanser hastalarında da tedavi etkisi ve mekanizması araştırılmakta olan bir ilaçtır (El-Mir, M.D. *ve diğ.*,2000; Dasari, S. ve Tchounwou, P.B.,2014).

Diyabet hastası olup Metformin kullanan hastaların kanser riskinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı Metformin kanser üzerindeki etkilerini görmek için birçok çalışma yapılmıştır. Metformin çoklu etki bölgeleri olan bir ilaç olmasından dolayı tek çeşit kanser üzerine değil birkaç çeşit kanser üzerinde de denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Alp, H. *ve diğ.*,2021). Metforminin antikanser etkisinin nasıl gerçekleştiğine dair net kanıtlar olmasa da birçok mekanizmalar üzerinde çalışma sonuçları elde edilmiştir. Bunlardan birkaçı, P13K/AKT/mTOR yolu aktivasyonu, NFκB ve STAT3 yollarının aktivasyonunun inhibe edilmesi ve let-7 ve miR200 ekspresyonunu arttırmasıdır (Karadeniz, Z., 2019). Yapılan başka çalışmada ise HeLa hücresi üzerinde Metformin denenmiş ve hücre ölümleri gözlemlenmiştir (Yudhani, R. *ve diğ.*,2016).

Sisplatin, kanser çalışmalarında kullanılan en etkili ilaçlardan biridir. DNA'daki pürin bazlarıyla çapraz bağlanma yeteneğiyle ile etki gösteren sisplatin, DNA onarım mekanizmalarına müdahale etme ve kanser hücrelerinde apoptozu düzenleme gibi rollerde de etki gösterir. Tek başına birçok kanser hücresinde kullanıldığı gibi kombine halinde de kullanımı üzerinde çalışmalar mevcuttur (Dasari, S. ve Tchounwou, P.B.,2014).

Tez çalışmasında HeLa hücre hattı kullanılarak Metformin ve Sisplatin ilaçlarının çeşitli dozlarda etkileri incelenmiştir. 2D ve 3D olarak geliştirilen model hücre hatları Sisplatin ve Metforminin LD₅₀ değerleri ve katları hem ayrı ayrı, hem de birlikte HeLa hücre hatları üzerinde uygulanmıştır. HeLa hücre hattı üzerinde iki ilacın da etkileri 72.saate kadar incelenmiştir.

3D hücre hattında Metformin etkisi LD₅₀ değerinde 72.saatte etki gösterirken LD₅₀ değerinin 4 katından sonraki katlarında 24.saatinde hücrenin 3 boyutlu formasyonunu bozduğu gözlemlenmiştir. Sisplatin etkisi ise LD₅₀ değerinde ciddi bir değişiklik yokken LD₅₀ değerinin 4 katından sonra etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Sisplatin, hücrelerin 3 boyutlu yapısını bozmadan hücreleri öldürürken Metformin 3 boyutlu yapıyı bozup hücreleri dağıtmıştır. İlaçların ikisi birden verildiğinde LD₅₀ değerinin 2 katında hücre ölümü 48. saatte başlamıştır ve 4 katından sonraki katlarında da Metforminde olduğu gibi hücrenin 3 boyutlu formasyonu 24.saatten itibaren bozulmaya başlamıştır.

Yaptığımız tez çalışmasında 3D hücre modellerini kullanmamızın amacı *in vivo* çalışmalara alternatif olma özelliğidir. İlaç araştırmalarında deney hayvanlarından sonra en güvenilir yöntem 3D çalışmalarıdır. Çünkü insan vücuduna en uygun olan formasyon 3D hücre hattıdır. Bu çalışmada 2D hücre hatlarına uygulanan ilaç dozları, 3D model yapıda etkisini göstermemektedir. Sistemik yapıya benzer şekilde kanser hücrelerini ölümü için daha yüksek dozlara gereksinim vardır.

Motilite analizinde hücrelere yara açılarak kapanması 72 saat içinde kapanma hızı ve hücre ölümleri değerlendirilmiştir. Kontrol hücresinde her saat yavaşça yara kapanmaya başlamıştır. Metforminin 2D HeLa hücresinde aktivitesi 3D'ye göre daha hızlı olduğu gözlemlenmiştir. Metforminin LD₅₀ ve diğer katlarında 24.saatte hücre ölümleri gerçekleşmiştir. Sisplatinin aktivitesine bakıldığında Metformin kadar etkili olmadığı görülmüştür. Sisplatin LD₅₀ değerinde 72.saatte çok az hücre üzerinde etki gösterirken LD₅₀ değerinin 6 katından sonra ciddi hücre ölümleri görülmektedir. Sisplatin ve Metformin birlikte kullanıldığında ise her dozda 72.saatte hücre ölümleri fazladır ancak 24.saat ölümleri, önemli ölçüde LD₅₀ değerinin 6 katında gerçekleşmiştir.

2 boyutlu hücre istilası analizinde ise hücreler 48.saatte giemsa ile boyanarak canlılık tespiti yapılmıştır. Metformin LD₅₀ değerinin 4 katından itibaren etki gösterirken Sisplatinde aynı etki LD₅₀ değerinin 8 katında görülmüştür. İki ilacın birlikte verilmesinde ise LD₅₀ değerlerinin 4 katından sonra etki gözlemlenmiştir.

Tüm bu verilere bakıldığında Metforminin Sisplatine göre HeLa hücre hattı üzerinde etkisi daha kuvvetlidir. Metformin ve Sisplatinin birlikte kullanımında ise Metformin etkilerine yakın sonuçlar elde edilmiş olması Metforminin daha etkili olduğunu açıklamaktadır. Ancak Metforminin hücre ölümünde daha kuvvetli olması klinik boyutta düşünüldüğünde yan etkilerinin de fazla olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu ilaçların etkileri

organizma boyutunda dündüğümüzde 3 boyutlu hücre hattı üzerinde yapılan çalışmaların daha önemli yer tuttuğunu söylemek mümkündür. *In vivo* sisteme 2 boyutlu hücre hatlarına kıyasla 3 boyutlu hücre hatlarının daha yakın olması ilaç etkilerinde daha sağlıklı sonuçlar verdiğini düşünülmektedir. Geçmişte yapılan bir çalışmada 3 boyutlu geliştirilen insan yumurtalık kanser hücrelerinin 2 boyutlu yapılarına göre daha güçlü, ilaçlar karşısında daha kararlı bir yapıları olduğu gösterilmiştir (Yenmiş, G.,2020). İlaç etkilerine bakıldığında da 3 boyutlu hücre hattında daha geç veya daha yüksek dozlarda ortaya çıktığı görülmüştür.

Yapılan bu çalışma sonucunda farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların da kanser üzerinde etkili olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca Metforminin geleceğin ilacı olarak sadece diyabet hastalıklarında değil kanser ve bunun gibi farklı hastalıklarda da tedavi yöntemi olarak kullanılacağına sinyallerini vermektedir. Metformin etkisinin Sisplatin etkisine göre daha başarılı olması yeni tedavi şekli olarak bir ışık yakmıştır. Ancak 3 boyutlu yapıda çekirdek yapısını da dağıtarak hücreleri öldürmesi ve 3 boyutlu yapıyı önem arzetmektedir. Bu yüzden henüz literatüre geçmiş Metformin ile tedavi söz konusu değildir. İleriki çalışmalarımızda ilaç dirençli ve duyarlı kanser hücre hatlarında Metformin ve Sisplatinle birlikte, klinikte kullanılan diğer kemoterapötiklerin mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- El-Mir, M.D. ve diğ., 2000, Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I, *Journal of Biology and Chemistry*, 275 (1), 223-228
- Inzucchi, S.E. ve diğ., 2015, Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes, *Diabetes Care*, 38 (1), 140-149
- Erkurt, M. A. ve diğ., 2009, Kanser Kemoterapisi ve Böbrek, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 63-68
- Clifford, J. B., 2017, Metformin Historical Overview, *Diabetologia*, 60, 1566-1576
- Ortiz-Flores, A.E. ve diğ., 2018; Pharmacotherapeutic management of comorbid polycystic ovary syndrome and diabetes, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19 (17), 1915-1926
- Boyle, P. ve diğ., 2012, Diabetes and Breast Cancer Risk: a meta-analysis, *British Journal of Cancer*, 107 (9), 1608-1617
- Faria, J. ve diğ., 2019, Metformin and Breast Cancer: Molecular Targets, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 24(2), 111-123
- Dasari, S. ve Tchounwou, P.B., 2014, Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action, *European Journal of Pharmacology*, 740:364-78.
- World Health Organization, <https://www.who.int/>, [Ziyaret Tarihi: 10.04.2021]
- Özenoğlu, S. ve diğ., 2013, Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70 (4), 215-226
- Ata, F.K., 2020, *Annonamuricata Bitki Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hattında ve Drosophilamelanogaster Model Organizma Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Miller, D.M. ve diğ., 2012, c-MYC ve Kanser Metabolizması, *Clinical Cancer Research*, 18 (20), 5546-5553
- Hastalar için Kemoterapi Rehberi, 2021, *İst Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü*

- Baykara, O., 2016, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3), 154-165
- Hastalar İçin Kemoterapi Rehberi,2021, *İst Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü*
- Barbaros, B. ve Dikmen, M.,2015, Kanser İmmünoterapisi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31 (4), 177-181
- Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği,
https://www.trod.org.tr/hastalarimiz_icin.php?id=882[Ziyaret Tarihi: 25.04.2021].
- Rashnonejad, A. ve diğ., 2014, Gen Tedavisinin Genel İlkeleri ve Son Gelişmeler, *Ege Tıp Dergisi*,53 (4), 231-240
- T.C. Sağlık Bakanlığı Hak Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı,
<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-tedavisi/kanser-tedavisi-nelerdir/kanser-tedavisinde-radyasyon.html>[Ziyaret Tarihi: 23.04.2021].
- Düzen, K. Ö. ve Korkmaz, M., 2015, Kanser Hastalarında, Semptom Kontrolü Ve Tamamlayıcı Ve Alternatif Tıp Kullanımı, *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*,8 (2), 67-76
- Landry, J. ve diğ., 2013, The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line, *G3: Genler, Genomlar, Genetik Dergisi*,3 (8), 1213-1224.
- Andishehtadbir, A. ve diğ., 2015, Oral Skuamöz Hücreli Karsinomlarda Metastazla İlişkili Protein 1 Ekspresyonu: Metastaz ve Anjiyogenez ile Korelasyon, *Türk Patoloji Dergisi*, 31 (1), 9-15.
- Güllü, İ. H. ve Akalın, İ., 2005, Metastaz Biyolojisi, *Üroonkoloji Bülteni*, 4, 16-19.
- Çapanoğlu, G. ve Bakar, E., 2018, Meme Kanseri ve Meme Kanseri Metastazında Rol Oynayan Moleküler Prognostik Faktörler, *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*,3 (2), 40-48.
- Slide Team, <https://www.slideteam.net/0614-metastasis-biology-medical-images-for-powerpoint.html>, [Ziyaret Tarihi: 12.05.2021].
- Reed, J.C., 1999, Kanserde Apoptoz Düzensizliği, *Klinik Onkoloji Dergisi*, 17 (9), 2941
- Binen, M.,2011, *Kalpain İnhibitörü olan AK295" in sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon hasarında Kaspaz-3" e olan etkisinin araştırılması*,Yüksek Lisans Tezi,İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Kaptanoğlu, A.,2020, Covid-19 ve Ölümsüz HeLa Hücreleri,
<https://www.akademikakil.com/covid-19-ve-olumsuz-hela->

[hucreleri/aysegulkaptanoglu/](#), [Ziyaret Tarihi: 14.05.2021].

- Yetkin, İ., 2016, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı Ders Notu.
- Nar,A., 2017, Metforminin Antikanserojen Etkileri, *53.Ulusal Diyabet Kongresi*,19-23 Nisan 2017 Girne.
- Sarıgül, T., 2019, Türk Bilim İnsanlarından Kolon Kanseri Tedavisinde Kullanılabilecek İlaç Projesi, <https://bilimgenc.tubitak.gov.tr/makale/turk-bilim-insanlarindan-kolon-kanseri-tedavisinde-kullanilabilecek-ilac-projesi>, [Ziyaret Tarihi: 02.04.2021].
- Yenmiş, G.,2020, Metformin, Diyabet ve Meme Kanseri Üçgeni, *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 3(2), 55-64
- Kanbur, A. ve Çapık, C.,2011, Servikal Kanserden Korunma, Erken Tanı-Tarama Yöntemleri ve Ebe/Hemşirenin Rolü, Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Dergisi, 18(1), 61-72.
- Başer, E. ve diğ.,2008, Erken Evre Serviks Kanselerinde Güncel Cerrahi Tedavi, *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi*, 1, 1-8
- Yudhani, R. ve diğ.,2016, Metformin Enhances Anti-proliferative Effect of Cisplatin in Cervical Cancer Cell Line, *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy*,5(2), 75-83.
- Karadeniz, Z., 2019, Endometrial Kanserde Metformin Kullanımı, *Tıp Fakültesi Klinikler Dergisi*, 2(2), 1-8.
- Alp, H. ve diğ.,2021, Metforminin Melanom Cilt Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, *Genel Tıp Dergisi* ,31(2),111-115.
- Aslan, C.,2008, *Hormonların Endometriyum Hücrelerinde Hücre Proliferasyonunu Düzenleyen Mekanizmalar Üzerine Etkileri*,Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Çetin, A., 2013, Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar, Bitirme Ödevi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.

ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler | |
|-------------------------|--|
| Adı Soyadı | Elif DEMİRKAN |
| Uyruğu | <input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer: |



| Eğitim Bilgileri | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Lisans | |
| Üniversite | İstanbul Üniversitesi |
| Fakülte | Fen Fakültesi |
| Bölümü | Moleküler Biyoloji ve Genetik |
| Mezuniyet Yılı | 2015 |

| Yüksek Lisans | |
|----------------------|-------------------------------|
| Üniversite | Ahi Evran Üniversitesi |
| Enstitü Adı | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Moleküler Biyoloji ve Genetik |
| Programı | Moleküler Biyoloji ve Genetik |
| Mezuniyet Tarihi | 2021 |

| Makale ve Bildiriler | |
|---|--|
| Elif Demirkan and Serap Yalçın Azarkan , Kanser Hücre Hatlarında Metformin'in Mekanistik Etkisinin Araştırılması, 6. Uluslararası Akademik Araştırmalar Kongresi,Online,23-25 Ağustos 2011, 142 | |